**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

JOSÉ VITOR CABRAL ZANARDI

**Influência de agentes antiangiogênicos (propranolol) em endometriose
experimentalmente induzida em ratas**

Ribeirão preto

2017

JOSÉ VITOR CABRAL ZANARDI

Influência de agentes antiangiogênicos (propranolol) em endometriose
experimentalmente induzida em ratas

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

Área de concentração: Tocoginecologia

Orientador: Prof. Dr. Júlio César Rosa e Silva

Ribeirão Preto

2017

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.

Zanardi, José Vitor Cabral.

Influência de agentes antiangiogênicos (propranolol) em endometriose experimentalmente induzida em ratas. / José Vitor Cabral Zanardi: orientador Júlio César Rosa e Silva. Ribeirão Preto, 2017.

83f.: il.

Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto Universidade de São Paulo, 2017.

1.Endometriose. 2.Angiogênese. 3.Proliferação celular.
4.Apoptose. 5. Propranolol. 6. Ratas

ZANARDI, José Vitor Cabral. **Influência de agentes antiangiogênicos (propranolol) em endometriose experimentalmente induzida em ratas.** Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção de título de Doutor em Tocoginecologia.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____

Instituição: _____

Assinatura:

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____

Instituição: _____

Assinatura:

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____

Instituição: _____

Assinatura:

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____

Instituição: _____

Assinatura:

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____

Instituição: _____

Assinatura:

Dedicatória

Aos meus pais, **Alcinéia e José Vital**, pelos primeiros e mais importantes ensinamentos, e todas as oportunidades que me proporcionaram desde o meu nascimento.

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

À Helena e à Alice, filhas lindas, maiores bens da vida, fontes de inspiração para tudo que eu faço e planejo fazer.

Aos meus irmãos **Janeliz e Luiz Marcel** pela torcida, mesmo à distância, e carinho que mutuamente nos fortalece.

Agradecimento especial

Ao meu orientador, professor **Júlio César Rosa e Silva**, mais que um professor, um amigo que me ensina diariamente. Dos mais básicos conceitos bioquímicos, passando por sofisticados problemas estatísticos, aos mais complexos dilemas profissionais. Agradeço por todos os ensinamentos, sobretudo a resiliência.

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 Sra. Ilza Alves Rezende Mazzocato, Sr. Reinaldo Tavares, Sra. Rosane Casula, Gabriela Francisco Sicca e Suelen Soares, incansáveis colaboradores de minha jornada.

À Dra. Juliana Meola pelos inestimáveis conselhos, correções e co-orientações.

Às amigas Cristiana Carolina Padovan e Lilian Eslaine Costa Mendes da Silva, 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, Dr. Fenando Passador Valério, Dr. Guilherme Augusto da Silva Moraes, e aos Professores Drs. Omero Benedicto Poli-Neto e Antônio Alberto Nogueira, pela alegria que tem sido conviver com vocês, dentro e fora do trabalho.

À grande amiga Dra. Giovana da Gama Fortunato, que me apoiou, muito se dedicou, enormemente contribuiu, e foi indispensável à minha formação.

À mestre e doutaranda em ciências Gabriela Campos de Oliveira Filgueira pela inenarrável contribuição, dedicação e comprometimento.

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.

RESUMO

ZANARDI, J. V. C. **Influência de agentes antiangiogênicos (propranolol) em endometriose experimentalmente induzida em ratas**. 2016. 83 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2016.

Propõe-se que a angiogênese represente um importante passo no processo de adesão, implantação, invasão e crescimento das células endometriais, visto que, semelhante aos tumores metastáticos, implantes endometrióticos dependem de neovascularização para se proliferarem. Tal constatação sugere que a supressão do desenvolvimento de vasos sanguíneos por meio da inibição de fatores angiogênicos específicos pode ser uma nova oportunidade terapêutica na abordagem da endometriose. Estudos demonstram um efeito antiangiogênico do propranolol anticancerígeno em diferentes tipos de tumores. Tal achado sugere que o propranolol pode contribuir clinicamente exercendo papel sobre a inibição de neoangiogênese, e tal efeito resultar em um impacto sobre as lesões de endometriose. Foi estudado o efeito do propranolol sobre marcadores de diferenciação (Metalotioneínas MT1 e MT2), invasão (MMP9 e TIMP2), proliferação celular (PCNA) e apoptose (CASP8 – caspase 8) por coloração imunohistoquímica, e também a influência sobre a adesão, motilidade e angiogênese das lesões de endometriose por quantificação da expressão relativa (RQ) por PCR em tempo real dos genes *Vegf*, *Cald1*, *Pcna*, *Tnf* e *Sparc*. Foram utilizadas 30 ratas adultas Wistar, fêmeas, virgens que foram submetidas a laparotomia para indução de lesões de endometriose. As ratas foram separadas em três grupos, e sacrificados após 14 dias de tratamento de dose baixa (PB, n = 10) e dose elevada (PA, n = 10) de propranolol; e o grupo de controle (C, n = 10) sem tratamento. As lesões foram excisadas para análise histológica com o corno uterino contralateral, com confirmação da presença de tecido glandular e estroma endometrial. No presente estudo foi observada uma redução na marcação imunohistoquímica para Metalotioneínas, com 60% de positividade no grupo controle, 10% e 11,1% para o PA, PB, respectivamente ($p < 0,05$). Também observamos uma diminuição na expressão do gene de *Pcna* (C = 1,04; PA = 0,32; PB = 0,69). Em outros marcadores de imunohistoquímica e quantificação da expressão gênica nas lesões e no tecido uterino não foram observadas diferenças significativas. O tratamento com drogas antiangiogênicas como propranolol oferece novas perspectivas de abordagem terapêutica para pacientes com endometriose.

Palavras-chave: Endometriose. Angiogênese. Proliferação celular. Apoptose. Propranolol. Ratas.

ABSTRACT

ZANARDI, J. V. C. **Effect of anti-angiogenics drugs (propranolol) in experimentally induced endometriosis in rats.** 2016. 83 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2016.

Since endometrial implants rely on neovascularization to proliferate, in a similar way to metastatic tumors, it is proposed that angiogenesis represents an important step in the process of adhesion, implantation, invasion and growth of ectopic endometrial cells. These findings suggest that the suppression of the development of blood vessels by inhibition of specific angiogenic factors may be a new therapeutic opportunity in endometriosis approach. Studies demonstrate an antiangiogenic anticancer effect of propranolol in different types of tumors. This drug can play a role in the inhibition of neoangiogenesis, which could interfere on the growth of endometriotic lesions. The effect of propranolol on markers of differentiation (Metallothionein, MT1 and MT2), invasion (MMP9 and TIMP2), cell proliferation (PCNA) and apoptosis (CASP8 - caspase 8) was evaluated by immunohistochemical staining, as well as the influence of propranolol on adhesion, motility and angiogenesis of both endometriotic lesions and endometrial tissue through quantification of relative expression (RQ) by real-time PCR of the genes *Vegf*, *Cald1*, *Pcna*, *Tnf* and *Sparc*. Thirty Wistar adult rats, females, virgins who underwent laparotomy for induction of endometriosis lesions were used. The rats were divided into three groups, and sacrificed after 14 days of low (BP, n = 10) and high dose treatment (AP, n = 10) of propranolol; and the control group (C, n = 10), untreated. The lesions were excised for histological analysis with the contralateral uterine horn, with confirmation of the presence of glandular tissue and endometrial stroma. In the present study we observed a reduction in immunostaining for Metallothioneins, with 60% positive in the control group, in comparison to 10% and 11.1% for PA and PB, respectively ($p < 0.05$). Furthermore, there was a decrease in expression of *Pcna* gene (C = 1.04; PA = 0.32; PB = 0.69) which was statistically significant ($p < 0.05$). However, quantification of gene expression regarding other immunohistochemical markers evaluated both in the endometriotic lesions and uterine tissue showed no statistically significant difference. In conclusion, anti-angiogenic drugs like propranolol may offer new perspectives for the therapeutic approach of patients with endometriosis.

Keywords: Endometriosis. Angiogenesis. cell proliferation. Apoptosis. Propranolol. Rats.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Avaliação do Kappa de Cohen.....	36
Tabela 2 -	Comparações entre as variáveis relacionadas a imunohistoquímica.....	39
Tabela 3 -	Concordância entre as variáveis da lesão e do útero em cada grupo.....	41
Tabela 4 -	Comparação da expressão gênica de <i>Pcna</i> (Lesão) entre os grupos.....	43
Tabela 5 -	Comparação da expressão gênica de <i>Sparc</i> (Lesão) entre os grupos.....	43
Tabela 6 -	Comparação da expressão gênica de <i>Cald1</i> (Lesão) entre os grupos.....	43
Tabela 7 -	Comparação da expressão gênica de <i>Tnf</i> (Lesão) entre os grupos.....	44
Tabela 8 -	Comparação da expressão gênica de <i>Vegfa</i> (Lesão) entre os grupos.....	44
Tabela 9 -	Comparação da expressão gênica de <i>Vegfa</i> (Útero) entre os grupos.....	44
Tabela 10 -	Comparação da expressão gênica de <i>Tnf</i> (Útero) entre os grupos.....	45
Tabela 11	Comparação da expressão gênica de <i>Pcna</i> (Útero) entre os	

-	grupos.....	45
---	-------------	----

Tabela 12 Comparação da expressão gênica de *Sparc* (Útero) entre os

-	grupos.....	45
---	-------------	----

Tabela 13 Comparação da expressão gênica de *Cald1* (Útero) entre os

-	grupos.....	46
---	-------------	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Rata submetida a laparotomia.....	30
Figura 2 -	Técnica de indução de lesão de endometriose. Ressecado cerca de 4 cm do corno uterino direito seguido de sutura do coto proximal.....	31
Figura 3 -	Corno uterino ressecado submetendo-se a preparo.....	31
Figura 4 -	Fragmento de corno uterino.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS

ABNT Associação Brasileira de Normas Técnicas

ACTB: Beta cytoskeletal actin

ARS: Prof. Dr. Alfredo Arruda e Silva

B2M: Beta-2-microglobulin

BM: Membrana basal

C2: grupo de ratas controle

PA: grupo de ratas que receberam alta dose da droga propranolol

CALD1: Caldesmon CALM2: Calmodulin 2(phosporilase kinase, delta)

CASPASE 8: caspase 8

PB: grupo de ratas que receberam baixa dose da droga propranolol

Cd; Cádiz

cDNA: Ácido desóxi-ribonucleico

CU: Cobre

DAB: 3,3 diaminobenzina

FMRP-USP: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto Universidade de São Paulo

HE: Hematoxilina-eosina

Hg: Mercúrio

JZ: Mestre em Patologia Juliana Zanetti

KDa: Kilodalton- unidade de massa molecular

L: lesão

MEC: Matriz extracelular

MMPs: Metaloproteínas

MT1 e MT2: Metalotioneínas

ON: Osteonectina

PBS: Tampão de solução salina

PCNA: Antígeno nuclear celular proliferativo

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PH: Potencial hidrogeniônico

PPIA: Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase

RNA: Ácido ribonucleico

SPARC: Secreted protein acidic and rich in cysteine

SNP: Polimorfismo nucleotídeo individual

TBS: Tris buffered saline

TIMPs: Inibidor tecidual de Metaloproteínases

TNF: Fator de necrose tumoral

TNFR: Receptor Fator de necrose tumoral-Receptor

U: útero

USP: Universidade de São Paulo

UK: United Kingdom

VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular

Zn: Zinco

LISTA DE SÍMBOLOS

%: porcentagem

g/L: grama por litro

g: grama

M: molar

mg: miligrama

mg/kg: miligrama por kilograma

mL: mililitro

mM: milimolar

ng: nanograma

°C: graus Celsius

µg: micrograma

µL: microlitro

SUMÁRIO

1 Introdução.....	18
2 Justificativa.....	24
3 Objetivos.....	26
3.1 Objetivo geral.....	27
3.2 Objetivos específicos.....	27
4 Metodologia.....	28
4.1 Aspectos éticos.....	29
4.2 Técnica de indução das lesões de endometriose.....	30
4.3 Obtenção das lesões para análise histológica e molecular.....	32
4.4 Protocolo de imunohistoquímica.....	33
4.5 Expressão gênica (extração do RNA total, síntese do cDNA, quantificação por PCR em tempo real.....	34
4.6 Análise estatística.....	35
5 Resultados.....	37
5.1 Caracterização dos grupos e perdas.....	38
5.2 Imunohistoquímica.....	38
5.3 Expressão gênica.....	42
6 Discussão.....	47
7 Conclusões.....	55
Referências bibliográficas.....	57
Anexo.....	76
Apêndice.....	78

1. Introdução

A endometriose é definida pela presença de tecido endometrial, seja ele glandular ou estromal, fora da cavidade uterina, denominado endométrio ectópico (Farquhar, 2007). Afeta 10 a 15% das mulheres em idade reprodutiva (Dabrosin *et al.*, 2002).

A endometriose é considerada atualmente um problema de saúde pública devido ao seu impacto na saúde física e psicológica, bem como ao impacto socioeconômico diante dos custos para o seu diagnóstico, tratamento e monitoramento (Gao *et al.*, 2006; Signorile e Baldi, 2010; Nnoaham *et al.*, 2012).

A patogenia da endometriose ainda não pode ser compreendida por apenas uma hipótese. A presença de células epiteliais endometriais com características de adesão, implantação, crescimento e angiogênese no fluido peritoneal (Kruitwagen *et al.*, 1991), bem como a associação entre fluxo menstrual obstruído e o diagnóstico de endometriose corroboram para que a hipótese da menstruação retrógrada de Sampson seja a mais aceita. Entretanto, é importante salientar que apenas o refluxo tubário não é suficiente para estabelecer a doença, pois, 90% das mulheres possuem menstruação retrógrada e apenas 10 a 15% destas desenvolvem endometriose (Sampson, 1927; Olive e Henderson, 1987).

Outras conjecturas são amplamente discutidas, como a imunológica e metaplasia celômica. O aparecimento de endometriose em homens, mulheres que nunca menstruaram e pré-pubescentes, bem como em locais como as meninges e a cavidade pleural pode ser explicado pela metaplasia de células da linhagem peritoneal. O surgimento de lesões de endometriose na pleura, cicatriz umbilical, espaço retroperitoneal, vagina e colo do útero pode ser explicado pela disseminação linfática e hematogênica de células endometriais (Ridley, 1968; Suginami, 1991; Braun *et al.*, 2002; Chung, H. W. *et al.*, 2002; Witz *et al.*, 2002).

O sistema imunológico também é de suma importância no desenvolvimento de endometriose, pois acredita-se que o endométrio ectópico possui a capacidade de promover uma resposta autoimune patológica devido a supressão de células do sistema imune e a imunovigilância debilitada de pacientes que desenvolveram endometriose (Lebovic *et al.*, 2001; Siristatidis *et al.*, 2006).

A proliferação das células endometriais e a adesão ao peritônio podem ocorrer pela produção de citocinas inflamatórias por essas células endometriais ectópicas. As células endometriais, após a adesão, são induzidas principalmente

pelas enzimas metaloproteinases de matriz (MMPs) a invadirem a matriz extracelular. Macrófagos locais produzem as interleucinas 1 e 8 (IL-1 e IL-8), que estimulam a produção de MMPs, facilitando o desenvolvimento de endometriose (Liu *et al.*, 2015; Xin *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2015). Em seguida, o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e o fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) produzidos por macrófagos, juntamente com IL-8 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) estimulam a angiogênese, possibilitando o crescimento de células endometriais e contribuindo para a manutenção do endométrio ectópico (Dela Cruz e Reis, 2015).

A interleucina (IL) 1 β , a IL-1 dominante secretada por macrófagos peritoneais ativados, desempenha um importante papel na neovascularização de lesões endometrióticas (Lebovic *et al.*, 2000). Foi evidenciada a secreção de IL-6 e IL-8 de forma robusta por culturas de células do estroma endometrial humano de mulheres com endometriose (Rocha *et al.*, 2012). IL-6 é uma proteína multifuncional potente, que promove a proliferação de células do endométrio e a angiogênese (Giudice *et al.*, 1994; Cohen *et al.*, 1996); a sua secreção é elevada no tecido endometrial ectópico e as suas concentrações são elevadas no fluido peritoneal de pacientes com endometriose (Keenan *et al.*, 1994). IL-8 é uma citocina pró-inflamatória que induz a quimiotaxia de neutrófilos e tem um efeito estimulador potente da angiogênese (Koch *et al.*, 2001; Arici, 2002).

A expressão e a secreção de IL-8 e VEGF, a partir de células estromais do endométrio humano é modulada pela Activina A. O endométrio humano é uma fonte e destino de Activina A, que é um membro da superfamília de fator de crescimento transformante β , com efeitos sobre a inflamação e a angiogênese (Florio *et al.*, 2007). VEGF é um dos fatores angiogênicos mais potentes e específicos. Os seus efeitos incluem a proliferação celular endotelial, migração, organização em túbulos, e permeabilidade melhorada, os quais participam na cascata angiogênica (Muller e Griesmacher, 2000). A expressão endometrial de VEGF é aumentada pelo estradiol e as suas concentrações estão correlacionados com a neovascularização e aumento da permeabilidade vascular durante a fase proliferativa tardia (Charnock-Jones *et al.*, 2000). Alterações cíclicas na expressão de VEGF ao longo do ciclo menstrual são observados com expressão máxima durante a fase secretora e menstruação (Shifren *et al.*, 1996; Charnock-Jones *et al.*, 2000; McLaren, 2000); VEGF foi

observada no epitélio e em células do estroma de implantes de endometriose, sendo mais expresso no epitélio. Além disso, as células de endometriose podem sintetizar e secretar o VEGF (Shifren *et al.*, 1996; Gargett e Masuda, 2010).

Portanto a angiogênese também representa um importante passo nesse processo. Visto que, semelhante aos tumores metastáticos, implantes endometrióticos dependem de neovascularização para se estabelecerem, implantarem e invadirem (Fujishita *et al.*, 1999; Taylor *et al.*, 2002; Gescher *et al.*, 2003). De fato, uma peculiar característica dos implantes endometrióticos são suas vascularizações densas (Nisolle *et al.*, 1993). Isso nos traz a ideia de que a supressão do desenvolvimento de vasos sanguíneos por meio da inibição de fatores angiogênicos específicos pode ser uma nova oportunidade terapêutica no tratamento da endometriose (Hull *et al.*, 2003; Nap *et al.*, 2004; Olive *et al.*, 2004).

O padrão ouro no diagnóstico de endometriose é a visualização direta de lesões por via laparoscópica, acompanhada de confirmação histológica da presença de pelo menos duas das seguintes características: macrófagos contendo hemossiderina ou epitélio endometrial, glândulas ou estroma (Bulletins--Gynecology, 2000).

As opções terapêuticas vigentes para o tratamento de endometriose incluem cirurgia, tratamentos clínicos, e a associação de ambos. A opção a ser adotada depende de fatores como o estadiamento da doença, sintomatologia, a idade da paciente e desejo de concepção (Petta *et al.*, 2009).

As abordagens, no entanto, têm limitações significativas. Os tratamentos clínicos que atuam por meio de modulações hormonais (contraceptivos hormonais, progestágenos, anti-progestágenos, análogos e antagonistas do GnRH, e inibidores da aromatase) podem bloquear a ovulação e culminam com um microambiente hipoestrogênico (Brown e Farquhar, 2014). Logo, essa opção é inadequada para pacientes que possuem infertilidade associada à endometriose e que pretendam conceber normalmente (Dunselman *et al.*, 2014). Além disso, pode haver significativa recidiva dos sintomas (Streuli *et al.*, 2013) e até 25% das pacientes terão efeitos secundários intoleráveis, ou resposta clínica insuficiente (Vercellini *et al.*, 2009). Possivelmente, lesões com fibrose extensa e eventuais distorções anatômicas são menos susceptíveis à modulação hormonal (Remorgida *et al.*, 2005). A intervenção cirúrgica é o tratamento de escolha para formas graves de

endometriose refratárias ao tratamento clínico, como endometriose profunda infiltrativa com acometimento intestinal sintomático, eventuais estenoses de ureter e grandes massas anexiais sintomáticas (Vercellini *et al.*, 2009; Meuleman *et al.*, 2011; Abrao *et al.*, 2015).

A remoção cirúrgica das lesões de endometriose profunda infiltrativa pode ser complexa e os resultados são altamente dependentes das habilidades e experiência da equipe cirúrgica. Uma recente meta-análise revelou que as taxas de complicações para a anastomose do intestino em ressecção de lesões de endometriose foram de 2,7% de fístula reto-vaginal, de 1,5% para deiscência de anastomose e 0,34% para os abscessos pélvicos. As técnicas menos agressivas apresentaram taxas ligeiramente mais baixas, mas foram associadas com um aumento da recorrência, entre 5,8-17,6% (Meuleman *et al.*, 2011).

Portanto, em virtude da ausência de um tratamento que contemple melhora clínica significativa associada à possibilidade de gestação espontânea, sem que aumente os riscos ou a morbidade da paciente, compreende-se haver uma lacuna no tratamento de endometriose, e, por conseguinte, novas opções terapêuticas deverão ser aventadas.

O propranolol é um antagonista competitivo dos receptores adrenérgicos beta-1 e beta-2. Foi um dos primeiros β -bloqueadores desenvolvidos para uso na clínica (Mak e Weglicki, 2004). O bloqueio competitivo do receptor beta-adrenérgico foi demonstrado no homem através de um deslocamento paralelo para a direita da curva de resposta da frequência cardíaca aos beta-agonistas versus dose, tal como a isoprenalina (Black *et al.*, 1965). Cloridrato de propranolol é uma mistura racêmica cuja forma ativa é o isômero S(-)-propranolol. Com exceção da inibição da conversão da tiroxina à triiodotironina, é improvável que qualquer propriedade adicional inerente ao isômero R(+) do propranolol desencadeie efeitos terapêuticos diferentes, em comparação com a mistura racêmica (Silber e Riegelman, 1980). O propranolol é completamente absorvido após administração oral, e as concentrações plasmáticas máximas ocorrem entre 1 e 2 horas após a administração em pacientes em jejum (Routledge e Shand, 1979). O fígado remove até 90% de uma dose oral, com uma meia-vida de eliminação de 3 a 6 horas. O propranolol é ampla e rapidamente distribuído pelo corpo, sendo que concentrações mais altas ocorrem

nos pulmões, fígado, rins, cérebro e coração. O propranolol apresenta um alto índice de ligação às proteínas plasmáticas (90-95%) (Shand, 1976).

Há relatos de que β -bloqueadores como o propranolol possuem efeitos anticancerígeno em diferentes tipos de tumores (Glasner *et al.*, 2010; Storch e Hoeger, 2010; Ji *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2013). Também se observou o efeito antitumoral dos β -bloqueadores em sarcomas *in vivo* e *in vitro* (Ji *et al.*, 2012; Stiles *et al.*, 2013), diversos tumores vasculares possuem receptores β -adrenérgicos (Chisholm *et al.*, 2012). Por fim, Pasquier e colaboradores relataram a existência de um sinergismo entre quimioterapia e β -bloqueadores em câncer de mama e neuroblastoma, por mecanismos ainda não totalmente elucidados (Pasquier *et al.*, 2011; Pasquier *et al.*, 2013). Em conjunto, tais achados sugerem que o propranolol pode contribuir clinicamente exercendo papel sobre a inibição de neoangiogênese, e tal efeito resultar em um impacto sobre as lesões de endometriose.

A condução de estudos em endometriose que versem sobre a resposta clínica frente à intervenção medicamentosa requer métodos invasivos. E, portanto, para que novas opções terapêuticas sejam testadas lança-se mão de modelos animais definidos (Rosa-E-Silva *et al.*, 2010). Modelos experimentais têm sido produzidos cirurgicamente em animais de pequeno porte, como coelhos, ratos e camundongos (Vernon e Wilson, 1985; Sharpe-Timms, 2002; Rosa-E-Silva *et al.*, 2010). O modelo em roedores proposto por Jones é amplamente aceito (Jones, 1984). Com técnica cirúrgica simples, permite implantação com sucesso das lesões o que torna a indução de endometriose efetiva e reprodutível (Schor *et al.*, 1999).

Em face à sugestão de que o propranolol possa contribuir clinicamente exercendo papel sobre a inibição de neoangiogênese e tal efeito resultar em um impacto sobre as lesões de endometriose, foi proposto o uso dessa droga em um modelo experimental consagrado (Jones, 1984; Vernon e Wilson, 1985; Schor *et al.*, 1999; Sharpe-Timms, 2002; Rosa-E-Silva *et al.*, 2010) para a observação do comportamento de lesões de endometriose *in vivo*, com e sem tratamento, e aventar uma nova opção terapêutica clínica no tratamento de pacientes com endometriose.

2. Justificativa

A patogênese da endometriose necessita de atividade de neoangiogênese. A cascata angiogênica inclui a proliferação celular endotelial, migração, organização em túbulos, e permeabilidade melhorada, regulada por fatores de crescimento e citocinas, e regulação metabólica em que intervêm agentes estimuladores e inibidores da matriz intersticial tumoral. Drogas com ação de inibição angiogênica devem ter efeito sobre as lesões endometrióticas experimentalmente induzidas.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do propranolol sobre endometriose experimentalmente induzida em ratas.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar a influência do propranolol e seu efeito antiangiogênico sobre o útero e lesões de endometriose experimentalmente induzidas:

- 1) Investigar o comportamento de marcadores de diferenciação (MT1 e MT2 – Metalotioneínas 1 e 2), invasão (MMP9 – *matrix metallopeptidase 9* e TIMP2 – *metallopeptidase inhibitor 2*), proliferação (PCNA- *proliferating cell nuclear antigen*) e apoptose celular (CASP8 – *caspase 8*) por imunohistoquímica;
- 2) Avaliar a expressão de genes envolvidos em adesão e motilidade (*Cald1* – *caldesmon 1*), angiogênese (*Vegfa* – *vascular endothelial growth factor A* e *Sparc* – *secreted protein acidic and cysteine rich*), regulação da proliferação celular, indução de apoptose e resposta inflamatória (*Tnf* – *tumor necrosis factor*) nas lesões de endometriose e útero por PCR em tempo real de ratas submetidas ao tratamento.

4. Metodologia

4.1 Aspectos éticos

Após uma vasta revisão da literatura sobre o tema e aprovações pela Comissão de Pesquisa do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (protocolo nº 339/2011) e pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (protocolo 183/2011), foram solicitadas as ratas e aplicado o modelo técnico-cirúrgico para indução de lesões de endometriose (Jones, 1984; Vernon e Wilson, 1985; Schor *et al.*, 1999; Sharpe-Timms, 2002; Rosa-E-Silva *et al.*, 2010).

O estudo foi realizado no Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Departamento de Patologia e Medicina Legal e Setor de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). Foram utilizadas trinta ratas Wistar, virgens, da mesma ninhada, de aproximadamente 250 g no início do experimento, idade de quarenta e nove dias, provenientes do Serviço de Biotério do Campus Universitário de Ribeirão Preto. Tais ratas, mantidas em *ad libitum* (livre acesso à água e ração Nuvilab CR1 autoclavável), inicialmente permaneceram por sete dias para ambientarem-se em gaiolas metabólicas (41 cm x 32 cm x 17 cm) sob controle de umidade e temperatura (22° a 25°C) e regime de luz com ciclo claro-escuro de 12/12 horas. Após este período, os grupos, descritos abaixo, foram submetidos à laparotomia para indução da lesão de endometriose.

Os animais foram alocados em 3 grupos de 10 animais divididos da seguinte forma:

Grupo C (controle, n=10): ratas com endometriose induzida experimentalmente e sem tratamento da droga no pós-operatório.

Grupo PB (propranolol baixa dose, n=10): ratas que receberam diariamente droga propranolol em baixa dose (0,05 mg/Kg) por 2 semanas após 4 semanas da cirurgia para indução das lesões.

Grupo PA (propranolol alta dose, n=10): ratas que receberam diariamente droga propranolol em alta dose (0,1 mg/kg) por 2 semanas após 4 semanas da cirurgia para indução das lesões.

4.2 Técnica de indução das lesões de endometriose

A indução da lesão de endometriose foi realizada após injeção intramuscular com 1 ml de Xilazina 2 mg/mL (Dopaser, Hertape Calier), e 1 ml cloridrato de cetamina 10% (Ketamina Agener, União Química Farmacêutica Nacional AS, Uso veterinário), sendo 0,15 unidades para cada 100 g de peso do animal. A figura 1 representa as estruturas observadas no momento da laparotomia.

Figura 1 – Rata submetida a laparotomia. Identificação de estruturas. A: ovário; B: trompa uterina; C: útero (lobo esquerdo); D: cérvis uterino; E: gordura abdominal; F: fígado; G: cécum; H: intestino delgado.

Após anestesia, foi realizado tricotomia pélvica, seguida dos cuidados de antisepsia com lavagem das luvas de látex com soro fisiológico para redução da formação de aderências. Todos os procedimentos foram realizados pelo mesmo pesquisador. A cavidade pélvica foi aberta com incisão longitudinal mediana de aproximadamente 2 cm, sendo a 2 cm do púbis do animal. Posteriormente, ressecado cerca de 4 cm do corno uterino direito seguido de sutura do coto proximal. A porção uterina dissecada foi imersa em soro fisiológico 0,9% a 4°C por cerca de 2 minutos e então incisada longitudinalmente, sendo retirado dois fragmentos de 5 x 5mm. Estes fragmentos de tecido endometrial foram suturados ao peritônio próximo ao trato reprodutivo da rato utilizando fio Vicryl 6.0 com a face endometrial livre voltada para a cavidade abdominal, sendo um fragmento suturado

a direita e outro a esquerda, com posterior fechamento da incisão cirúrgica. Nenhuma suplementação hormonal ou antimicrobiana foi administrada antes ou após a laparotomia.

Figura 2 – Técnica de indução de lesão de endometriose. Ressecado cerca de 4 cm do corno uterino direito seguido de sutura do coto proximal.

Figura 3 – Corno uterino ressecado submetendo-se a preparo. Corno uterino ressecado submetido a

incisão longitudinal e 2 fragmentos de 5mm x 5mm são suturados ao peritônio em cada lado da parede abdominal com a face endometrial voltada para a cavidade

Figura 4 – Fragmento de corno uterino. Fragmento de corno uterino que será suturado ao peritônio pélvico com a face endometrial voltada para a cavidade peritoneal.

4.3 Obtenção das lesões para análise histológica e molecular

Quatro semanas após a cirurgia, tempo necessário para a implantação da lesão (Rosa E Silva, 2004; Rodriguez-Romaguera *et al.*, 2009), os grupos de estudo receberam diariamente a injeção intraperitoneal de propranolol (PB = 0,05mg/Kg ou PA = 0,1mg/kg) por 2 semanas, sendo então eutanasiadas. O grupo controle foi eutanasiado após estas quatro semanas de seguimento inicial.

Ao término do protocolo, as ratas foram eutanasiadas e realizado o inventário da cavidade abomino-pélvica, identificando e documentando as lesões. Após esta etapa, as lesões de endometriose foram excisadas para análise histológica e molecular.

As ratas foram pesadas após 4 semanas, e a cada semana de droga administrada, fizemos o ajuste de dose da medicação conforme estabelecido previamente pelo protocolo dose/peso.

Os tecidos retirados foram divididos ao meio, sendo que metade seguiu o protocolo para técnicas de Imunohistoquímica e a outra metade foi incluída em RNA later Solution (Ambion, par number AM7020) e após 24hs à 4°C, o tecido foi armazenado à -80°C para posteriores análises de expressão gênica.

4.4 Protocolo de Imunohistoquímica

A parte extraída destinada à avaliação imunohistoquímica foi fixada em formol 10%, processada para inclusão em parafina e corada por hematoxilina e eosina (HE) com objetivo de identificar a presença de lesões compatíveis com endometriose e posterior realização de Imunohistoquímica. Foram realizados cortes histológicos com 4 a 5µm. Os cortes foram desparafinizados em xileno e desidratados em uma série de álcoois. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada em uma solução contendo 0,3% de peróxido de hidrogênio por 30 minutos. Os cortes foram submetidos à recuperação antigênica com tampão de citrato a 10 mM e colocados em panela a vapor por 40 minutos e, logo após, as amostras foram resfriadas por 30 minutos em temperatura ambiente e incubadas a 4° C *overnight* com o anticorpo primário. Aplicado o protocolo de sequências conforme o Kit Mach 4:

- Primeiro dia: recuperação antigênica: Tampão citrato pH 6.0, 35 minutos, lavagem com Tris Buffered Saline-TBS, bloqueio da peroxidase endógena 10

minutos, lavagem com TBS por 5 minutos, bloqueio da proteína BSA 2% por 10 minutos, lavagem com TBS e incubação com anticorpo primário overnight;

- Segundo dia: lavagem, incubação no pós primário por 30 minutos, lavagem com TBS por 3 minutos, incubação no polímero por 30 minutos, lavagem com TBS e aplicação de DAB (3,3 diaminobenzina).

Os anticorpos utilizados neste estudo, suas diluições e respectivas marcas foram: PCNA (1:500, PC10:SC-56, Santa Cruz Biotechnology, INC), CASP8 (1:100, clone 11B6, Novacastra Laboratories, United Kingdom), MTs (1:100, clone E9, Dako, USA), TIMP-2 (1:100, 3A4, Novacastra Laboratories, United Kingdom), MMP-9 (1:100, 15W2, Leica Biosystem, United Kingdom).

O tecido coletado foi analisado por Imunohistoquímica quanto aos seguintes marcadores:

- Índice de proliferação celular através da marcação do PCNA (*proliferative cell nuclear antigen*), marcação de núcleo;
- Índice de apoptose através da marcação da Caspase-8, marcação de citoplasma e núcleo;
- Expressão de moléculas envolvidas na diferenciação celular como Metalotioneínas (Monoclonal Mouse Anti-Metallothionein Clone E9), marcação de citoplasma.
- Marcadores de invasão tecidual como MMP-9 (Mouse Monoclonal Antibody Matrix Metaloproteínases 9) e TIMP-2 (Tissue Inhibitor of Matrix Metaloproteínases 2), marcação de citoplasma.

As lâminas foram analisadas por dois médicos (ARS e JVCZ). As células foram marcadas positiva ou negativamente, para cada marcador, segundo critérios utilizados na literatura - *Imuno Reactive Score* (Weigel *et al.*, 2012).

Assim, para os marcadores MMP-9, MTs, TIMP-2 e CASP8:

- 1) a ausência de marcação (0%) foi definida como “1+”;
- 2) marcações entre 1 e 10% foram definidas como “2+”;
- 3) marcações entre 10 e 50%, conferiram o score de “3+”;
- 4) marcações entre 51 e 80% foram definidas como “4+”;
- 5) E, por fim, marcações superiores a 80% foram associadas ao score de “5+”.

Em relação às marcações de PCNA:

- 1) marcações inferiores a 20% definiu-se o score “1+”;
- 2) marcações entre 20 e 70% conferiram o status de “2+”;
- 3) marcações superiores a 70% estabeleceram o score de “3+”.

4.5 Expressão gênica (extração do RNA total, síntese do cDNA, quantificação da expressão por PCR em tempo real)

As amostras de tecido congeladas em RNA later à -80°C foram descongeladas e lavadas em PBS 1X.

O RNA total foi extraído a partir de 50 mg de tecido utilizando Trizol Plus RNA Purification Kit (Ambion, part number 12183-555) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA genômico foi removido usando DNA-free Kit (Ambion, part number AM1906). Após o tratamento com DNase, o RNA total foi quantificado por espectrofotometria à OD 260/280 (NanoDrop2000c, Thermo Scientific). Em seguida, o cDNA foi sintetizado a partir de 1000 ng de RNA total utilizando High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (Applied Biosystems, part number 4374966) que faz uso de *primers* randômicos. A PCR em tempo real foi realizada utilizando o equipamento 7500 Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems). As seguintes sondas de hidrólise do tipo TaqMan (Applied Biosystems) foram utilizadas neste estudo: Rn00582935_m1 (*Vegfa*), Rn00565719_m1 (*Cald1*), Rn01514538_g1 (*Pcna*), Rn99999017_m1 (*Tnf*), Rn01644671_m1 (*Sparc*). Os ciclos de PCR foram os seguintes: um ciclo de 95°C durante 20 segundos, 40 ciclos de 95°C por 3 segundos e a 60°C por 30 minutos. Cada reação de PCR foi realizada em triplicata. Os genes *Actb* (Rn00667869_m1) e *B2m* (Rn 00560865_m1) foram utilizados como genes de referência para normalizar as reações. As eficiências das sondas e primers foram testadas na reação de amplificação dos genes selecionados. Para esse estudo, foram consideradas ideais as eficiências na faixa de 90 a 110%. A expressão relativa para os genes analisados foi calculada para cada amostra de acordo com o método de $2^{-\Delta\Delta CT}$.

4.6 Análise estatística

Primeiramente realizou-se análise exploratória dos dados. Esta metodologia tem como objetivo sintetizar uma série de valores de mesma natureza, permitindo que se tenha uma visão global da variação de tais valores organizando e

descrevendo os dados de duas maneiras: PROC FREQ por meio de tabelas com medidas descritivas e por gráficos.

A análise descritiva foi realizada com o software SAS® 9.0, utilizando o PROC MEANS e os gráficos (Apêndice A) foram plotados utilizando-se o software R.

Parte 1: Para verificar a associação entre os grupos e os marcadores foi utilizado o teste exato de Fisher. Os cálculos foram realizados através do software SAS® 9.0, utilizando o PROC FREQ.

Parte 2.1 – Para comparar os grupos em cada local, propusemos a análise de variância (ANOVA). Esta análise tem como pressuposto que seus resíduos tenham distribuição normal com média 0 de variância 02 constantes. Para as variáveis que não atingiram esse pressuposto utilizou-se uma transformação logarítmica na variável resposta. Esse procedimento foi realizado através do software SAS® 9.0, utilizando-se o PROC GLM.

Parte 2.2 e 3 - Para a comparação o modelo de regressão com efeitos mistos (efeitos aleatórios e fixos).

Os modelos lineares de efeito misto são utilizados na análise de dados em que as respostas estão agrupadas e a suposição de independência entre as observações num mesmo grupo não é adequada. Esses modelos têm como pressuposto que seus resíduos tenham distribuição normal com média 0 de variância 02 constantes. Para as variáveis que não atingiram esse pressuposto usou-se a transformação logarítmica na variável resposta. Este procedimento foi realizado através do software SAS® 9.0, utilizando o PROC MIXED. Para a comparação foi utilizado o pós-teste por contrastes ortogonais (Team, 2011).

É possível representar os resultados das análises de marcações Imunohistoquímica em uma tabela de contingência. Na qual nas linhas são representados os scores de marcação para as proteínas em tecidos obtidos a partir de endométrio eutópico (útero). Enquanto nas colunas são representados os scores das análises de tecido obtido a partir das lesões, para as mesmas proteínas.

As frequências em que há concordância de scores entre os diferentes tecidos se encontram na diagonal da tabela. A proporção de concordância será o número de casos em que os dois tecidos estão em concordância em relação ao score para a mesma proteína (soma das frequências da diagonal) sobre o número total de casos.

O Kappa de Cohen é uma medida de concordância que pondera a proporção de concordância observada para a concordância obtida pelo acaso, ou seja, é o quociente entre a proporção de concordância observada menos a proporção de concordância esperada pelo acaso e a concordância máxima, ou seja 1, menos a concordância esperada pelo acaso (Borkowf e Gail, 1997; Borkowf *et al.*, 1997).

Embora não haja muitos critérios para avaliar os valores de Kappa entre 0 e 1, Landis e Koch em 1977 sugeriram a seguinte escala (Koch *et al.*, 1977; Landis e Koch, 1977a; b):

Tabela 1 - Avaliação do Kappa de Cohen.

Kappa entre:	Concordância:
0.00 e 0.20	Pobre
0.21 e 0.40	Razoável
0.41 e 0.60	Moderada
0.61 e 0.80	Substancial
0.80 e 1.00	Alta

5. Resultados

5.1 Caracterização dos grupos e perdas

Foram utilizadas 30 ratas da raça Wistar. Dessas, 10 foram utilizadas em cada grupo conforme descrito na metodologia.

Não houve perda de animais, não foram observados processos infecciosos ou desprezo de material por qualquer motivo. Observou-se em todos os grupos eutanasiados a presença de lesões bilateralmente localizadas na parede abdominal dos animais, visíveis macroscopicamente com tamanho aproximado de 1cm de comprimento.

À análise imunohistoquímica, observamos que não houve material satisfatório para análise nas lâminas confeccionadas para o estudo dos tecidos obtidos do animal de número 10 do grupo PB para os marcadores MTs, CASP8 e TIMP-2.

Para a análise de expressão gênica também observamos perdas no estudo por material apresentando quantidade insuficiente de cDNA em algumas amostras, a saber: *Cald1* do tecido obtido da lesão ectópica do animal 9, do grupo PA; *Vegf*, *Tnf*, *Pcna*, e *Sparc* do tecido obtido da lesão ectópica dos animais 8, do grupo PB e 1, do grupo C.

5.2 Imunohistoquímica

Na análise Imunohistoquímica dos tecidos obtidos a partir das lesões de endometriose induzidas e endométrio eutópico (útero) as marcações foram quantificadas e realizada análise comparativa entre as diferentes variáveis.

Não foram observadas diferenças significativas para os marcadores MMP-9, TIMP-2, CASP8 e PCNA. Entretanto, para as MTs, houve redução significativa de marcação após tratamento, dose independente, tanto em endométrio tópico como em ectópico (Tabela 2).

Tabela 2 - Comparações entre as variáveis relacionadas a imunohistoquímica.

Variáveis	Grupos			Total	p-valor
	C (n=10)	PA (n=10)	PB (n=10)		
MMP_9_UTERO					
3+	1 (10)	1 (10)	1 (10)	3	0,8638
4+	2 (20)	3 (30)	1 (10)	6	
5+	7 (70)	6 (60)	8 (80)	21	
MMP_9_LESAO					
1+	6 (60)	4 (40)	9 (90)	19	0,3423
2+	0 (0)	1 (10)	0 (0)	1	
3+	1 (10)	0 (0)	0 (0)	1	
4+	1 (10)	1 (10)	0 (0)	2	
5+	2 (20)	4 (40)	1 (10)	7	
MTs_UTERO					
1+	0 (0)	9 (90)	8 (88,89)	17	0,0001
3+	0 (0)	1 (10)	0 (0)	1	
4+	1 (10)	0 (0)	1 (11,11)	2	
5+	9 (90)	0 (0)	0 (0)	9	
MTs_LESAO					
1+	2 (20)	9 (90)	8 (88,89)	19	0,0018
3+	0 (0)	1 (10)	0 (0)	1	
4+	1 (10)	0 (0)	1 (11,11)	2	
5+	7 (70)	0 (0)	0 (0)	7	
CASP8_UTERO					
1+	0 (0)	1 (10)	0 (0)	1	0,6202
2+	0 (0)	1 (10)	0 (0)	1	
3+	1 (10)	1 (10)	0 (0)	2	
4+	1 (10)	2 (20)	1 (11,11)	4	

5+	8 (80)	5 (50)	8 (88,89)	21	
CASP8_LESAO					
1+	4 (40)	6 (60)	6 (66,67)	16	0,0806
2+	0 (0)	2 (20)	3 (33,33)	5	
3+	1 (10)	1 (10)	0 (0)	2	
5+	5 (50)	1 (10)	0 (0)	6	
TIMP2_UTERO					
1+	0 (0)	4 (40)	0 (0)	4	0,0848
3+	1 (10)	0 (0)	0 (0)	1	
4+	1 (10)	0 (0)	1 (11,11)	2	
5+	8 (80)	6 (60)	8 (88,89)	22	
TIMP2_LESAO					
1+	4 (40)	5 (50)	6 (66,67)	15	0,1266
2+	0 (0)	2 (20)	3 (33,33)	5	
3+	0 (0)	1 (10)	0 (0)	1	
4+	1 (10)	0 (0)	0 (0)	1	
5+	5 (50)	2 (20)	0 (0)	7	
PCNA_UTERO					
2+	1 (10)	5 (50)	1 (10)	7	0,0507
3+	9 (90)	5 (50)	9 (90)	23	
PCNA_LESAO					
1+	4 (40)	4 (40)	8 (80)	16	0,2968
2+	1 (10)	1 (10)	1 (10)	3	
3+	5 (50)	5 (50)	1 (10)	11	

Segundo a avaliação de proporção de concordância (kappa de Cohen) obtida entre os scores de marcação do tecido uterino e tecido ectópico, observamos uma correlação de 1 (alta) para a análise Imunohistoquímica das proteínas MTs, nos diferentes grupos. Para as demais proteínas as correlações são baixas ($<0,20$) (Tabela 3).

Tabela 3 - Concordância entre as variáveis da lesão e do útero em cada grupo.

Variáveis	Grupos			Total	p-valor
MMP_9_UTERO	C (n=10)	PA (n=10)	PB (n=10)		
3+	1 (10)	1 (10)	1 (10)	3	0,8638
4+	2 (20)	3 (30)	1 (10)	6	
5+	7 (70)	6 (60)	8 (80)	21	
MMP_9_LESAO					
1+	6 (60)	4 (40)	9 (90)	19	0,3423
2+	0 (0)	1 (10)	0 (0)	1	
3+	1 (10)	0 (0)	0 (0)	1	
4+	1 (10)	1 (10)	0 (0)	2	
5+	2 (20)	4 (40)	1 (10)	7	
METALOTIONEINA_UTERO					
1+	0 (0)	9 (90)	8 (88,89)	17	0,0001
3+	0 (0)	1 (10)	0 (0)	1	
4+	1 (10)	0 (0)	1 (11,11)	2	
5+	9 (90)	0 (0)	0 (0)	9	
METALOTIONEINA_LESAO					
1+	2 (20)	9 (90)	8 (88,89)	19	0,0018
3+	0 (0)	1 (10)	0 (0)	1	
4+	1 (10)	0 (0)	1 (11,11)	2	
5+	7 (70)	0 (0)	0 (0)	7	

CASPASE8_UTERO					
1+	0 (0)	1 (10)	0 (0)	1	0,6202
2+	0 (0)	1 (10)	0 (0)	1	
3+	1 (10)	1 (10)	0 (0)	2	
4+	1 (10)	2 (20)	1 (11,11)	4	
5+	8 (80)	5 (50)	8 (88,89)	21	
CASPASE8_LESAO					
1+	4 (40)	6 (60)	6 (66,67)	16	0,0806
2+	0 (0)	2 (20)	3 (33,33)	5	
3+	1 (10)	1 (10)	0 (0)	2	
5+	5 (50)	1 (10)	0 (0)	6	
TIMP2_UTERO					
1+	0 (0)	4 (40)	0 (0)	4	0,0848
3+	1 (10)	0 (0)	0 (0)	1	
4+	1 (10)	0 (0)	1 (11,11)	2	
5+	8 (80)	6 (60)	8 (88,89)	22	
TIMP2_LESAO					
1+	4 (40)	5 (50)	6 (66,67)	15	0,1266
2+	0 (0)	2 (20)	3 (33,33)	5	
3+	0 (0)	1 (10)	0 (0)	1	
4+	1 (10)	0 (0)	0 (0)	1	
5+	5 (50)	2 (20)	0 (0)	7	
PCNA_UTERO					
2+	1 (10)	5 (50)	1 (10)	7	0,0507
3+	9 (90)	5 (50)	9 (90)	23	

PCNA_LESAO					
1+	4 (40)	4 (40)	8 (80)	16	0,2968
2+	1 (10)	1 (10)	1 (10)	3	
3+	5 (50)	5 (50)	1 (10)	11	

5.3 Expressão gênica

Detectamos diferenças significativas entre os níveis de expressão de *Pcna* obtidos na lesão entre os grupos controle e os grupos tratados. No presente estudo não foram observadas diferenças significativas em relação à expressão de *Cald1*, *Sparc*, *Vegfa* e *Tnf*, nas lesões, nos três grupos analisados. Os resultados são apresentados nas tabelas que seguem.

Tabela 4 - Comparação da expressão gênica de *Pcna* (Lesão) entre os grupos.

<i>Pcna</i> (Lesão)					
Grupo	N	Média	Desvio Padrão	p-valor	Pós teste de Dunn*
C	9	1,21	0,77		a
PA	10	0,48	0,4	0,02	b
PB	9	0,73	0,27		ab

*Letras diferentes representam diferenças significativas ao nível de significância de 0,05. Expressão gênica em unidades arbitrárias. C=Grupo controle; PA=Grupo tratado com propranolol a 0,1 mg/kg; PB=Grupo tratado com propranolol a 0,05 mg/kg.

Tabela 5 - Comparação da expressão gênica de *Sparc* (Lesão) entre os grupos.

<i>Sparc</i> (Lesão)				
Grupo	n	Média	Desvio Padrão	p-valor
C	9	1,29	1,08	
PA	10	0,6	0,37	0,09
PB	9	1,06	0,7	

Expressão gênica em unidades arbitrárias. C=Grupo controle; PA=Grupo tratado com propranolol a 0,1 mg/kg; PB=Grupo tratado com propranolol a 0,05 mg/kg.

Tabela 6 - Comparação da expressão gênica de *Cald1* (Lesão) entre os grupos.

<i>Cald1</i> (Lesão)				
Grupo	n	Média	Desvio Padrão	p-valor
C	9	1,49	1,51	0,08
PA	9	0,57	0,53	
PB	9	0,36	0,31	

Expressão gênica em unidades arbitrárias. C=Grupo controle; PA=Grupo tratado com propranolol a 0,1 mg/kg; PB=Grupo tratado com propranolol a 0,05 mg/kg.

Tabela 7 - Comparação da expressão gênica de *Tnf* (Lesão) entre os grupos.

<i>Tnf</i> (Lesão)				
Grupo	n	Média	Desvio Padrão	p-valor
C	9	1,24	0,86	0,15
PA	10	1,16	0,5	
PB	9	1,9	1,3	

Expressão gênica em unidades arbitrárias. C=Grupo controle; PA=Grupo tratado com propranolol a 0,1 mg/kg; PB=Grupo tratado com propranolol a 0,05 mg/kg.

Tabela 8 - Comparação da expressão gênica de *Vegfa* (Lesão) entre os grupos.

<i>Vegfa</i> (Lesão)				
Grupo	n	Média	Desvio Padrão	p-valor
C	9	1,2	0,64	0,77
PA	10	1,42	1,91	
PB	9	1,29	1,12	

Expressão gênica em unidades arbitrárias. C=Grupo controle; PA=Grupo tratado com propranolol a 0,1 mg/kg; PB=Grupo tratado com propranolol a 0,05 mg/kg.

A análise de expressão gênica no fragmento uterino entre os grupos Controle e grupos que receberam a medicação não revelou diferenças estatísticas significantes para *Pcna*, *Sparc*, *Vegfa*, *Tnf* e *Cald1*. Os resultados são apresentados abaixo:

Tabela 9 - Comparação da expressão gênica de *Vegfa* (Útero) entre os grupos.

<i>Vegfa</i> (Útero)				
Grupo	n	Média	Desvio Padrão	p-valor
C	10	1,08	0,46	0,49
PA	10	1,19	0,56	
PB	10	1,69	1,14	

Expressão gênica em unidades arbitrárias. C=Grupo controle; PA=Grupo tratado com propranolol a 0,1 mg/kg; PB=Grupo tratado com propranolol a 0,05 mg/kg.

Tabela 10 - Comparação da expressão gênica de *Tnf* (Útero) entre os grupos.

<i>Tnf</i> (Útero)				
Grupo	n	Média	Desvio Padrão	Valor p
C	10	1,23	0,73	0,16
PA	10	2,42	1,71	
PB	10	1,7	1,13	

Expressão gênica em unidades arbitrárias. C=Grupo controle; PA=Grupo tratado com propranolol a 0,1 mg/kg; PB=Grupo tratado com propranolol a 0,05 mg/kg.

Tabela 11 - Comparação da expressão gênica de *Pcna* (Útero) entre os grupos.

<i>Pcna</i> (Útero)				
Grupo	n	Média	Desvio Padrão	Valor p
C	10	1,09	0,5	0,41
PA	10	1,32	0,52	
PB	10	1,68	1,31	

Expressão gênica em unidades arbitrárias. C=Grupo controle; PA=Grupo tratado com propranolol a 0,1 mg/kg; PB=Grupo tratado com propranolol a 0,05 mg/kg.

Tabela 12. Comparação da expressão gênica de *Sparc* (Útero) entre os grupos.

<i>Sparc</i>				
Grupo	n	Média	Desvio Padrão	Valor p
C	10	1,04	0,3	0,42
PA	10	0,95	0,39	
PB	10	0,88	0,65	

Expressão gênica em unidades arbitrárias. C=Grupo controle; PA=Grupo tratado com propranolol a 0,1 mg/kg; PB=Grupo tratado com propranolol a 0,05 mg/kg.

Tabela 13 - Comparação da expressão gênica de *Cald1* (Útero) entre os grupos.

<i>Cald1</i>				
Grupo	n	Média	Desvio Padrão	Valor p
C	10	1,69	1,28	0,09
PA	10	2,08	1,81	
PB	10	4,17	3,34	

Expressão gênica em unidades arbitrárias. C=Grupo controle; PA=Grupo tratado com propranolol a 0,1 mg/kg; PB=Grupo tratado com propranolol a 0,05 mg/kg.

6. Discussão

A capacidade de adesão, invasão e desenvolvimento das lesões de endometriose estão relacionadas ao desequilíbrio entre as enzimas que degradam os componentes da matriz extracelular (como a MMP 9), e seus reguladores endógenos – os inibidores de tecidos de metaloproteinases (como o TIMP-2). A viabilidade do tecido ectópico é atribuída em partes à ocorrência de neoangiogênese estimulada pelo fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e citocinas.

O uso de inibidores de neoangiogênese têm sido amplamente estudados no tratamento de endometriose (Hsiao *et al.*, 2014; Pittatore *et al.*, 2014; Arosh *et al.*, 2015; Ozcan Cenksoy *et al.*, 2015). β -bloqueadores como o propranolol, devido à sua ação em inibição de neoangiogênese, possuem efeitos antitumorais em diferentes tipos de tumores, e principalmente tumores vasculares (Koch *et al.*, 1977; Ji *et al.*, 2012; Stiles *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2013).

Por meio de análises imunohistoquímicas e estudos de biologia molecular foi possível analisar a resposta das lesões experimentalmente induzidas, bem como dos tecidos obtidos a partir de endométrio eutópico.

A presença de lesões de endometriose no modelo experimental utilizado foi comprovada macroscopicamente pela presença de implantes típicos na face peritoneal das ratas, e também microscopicamente, por meio de estudo imunohistoquímico com hematoxilina-eosina e observação de glândula e estroma endometrial nos tecidos excisados, confirmando o sucesso da técnica empregada no estudo.

Com o intuito de avaliar os efeitos do propranolol nas lesões endometrióticas induzidas, em vários aspectos, alguns marcadores foram selecionados afim de que alguns mecanismos como neoangiogênese, apoptose, proliferação celular, motilidade e invasão celular fossem avaliados. Para tanto, os marcadores MTs, PCNA, CASP8, MMP-9 e TIMP-2 foram analisados por imunohistoquímica, e por biologia molecular foram analisadas as expressões dos genes *Vegfa*, *Tnf*, *Sparc* e *Cald1*.

A MT é uma proteína de baixo peso molecular com papéis funcionais no crescimento celular, diferenciação e reparação, inversamente correlacionada com o índice de apoptose. A localização perinuclear da metalotioneína é importante para a função de proteção contra danos no DNA e apoptose induzida por estímulos

externos de estresse (Tsangaris e Tzortzatou-Stathopoulou, 1998; Levadoux-Martin *et al.*, 2001; Cherian *et al.*, 2003; Theocharis *et al.*, 2004).

As MTs têm diversas funções que continuam a ser descobertas como armazenamento, transporte e metabolismo de metais, proteção contra radicais livres, controle da concentração de traços de elementos livres como zinco e cobre, proteção contra condições de estresse e proteção contra danos cerebrais (Jacob *et al.*, 1998)

O estudo de Tapiero e Tew (Tapiero e Tew, 2003) sugere que altos níveis de MTs podem estar presentes em tecidos com rápido crescimento e desenvolvimento. As MTs fornecem zinco e cobre para o metabolismo de ácidos nucléicos, síntese de proteínas e outros processos metabólicos, portanto pode haver uma ligação entre MTs e tumores cancerosos.

De acordo com o estudo de Wicherek e colaboradores (Wicherek *et al.*, 2005) a superexpressão de MT pode proteger as células tumorais da apoptose e, assim, contribuir para a expansão do tumor. A expressão de MT foi aumentada em casos de carcinoma endometrial quando comparado com lesões endometriais hiperplásicas benignas. Em adenocarcinoma endometrial, o conteúdo elevado de MT foi associado com alto grau de câncer e estágio da doença (Mccluggage *et al.*, 1999).

No presente estudo houve uma redução significativa de marcação desta proteína após tratamento, dose independente, tanto em endométrio tópico como em ectópico, sugerindo que o tratamento com propranol foi eficaz.

O PCNA (antígeno de proliferação celular) é uma proteína nuclear e sua expressão se relaciona com o estado proliferativo das células (Yu *et al.*, 1991). O antígeno é expresso no núcleo das células, durante a fase de síntese do DNA. Ele pode ser usado para a classificação de diferentes lesões neoplásicas e benignas com comportamento proliferativo. O PCNA é um marcador de proliferação específica validado que é resistente à fixação (Theile e Muller, 1996)

O estudo de Fujishita e colaboradores (Fujishita *et al.*, 1999) avaliou o PCNA em endometriose e mostrou maiores níveis proteicos em lesões vermelhas, quando comparadas a lesões brancas e negras. Há diferenças relevantes no padrão proteico de PCNA em diferentes estádios de endometriose e em câncer de endométrio. Estes marcadores podem ser úteis para avaliar a agressividade e a invasão endometriótica

em diferentes localizações. A expressão de *PCNA* foi significativamente maior em endometriose colorretal que em endometriose peritoneal e carcinoma endometrial (Korbel *et al.*, 2010; Weigel *et al.*, 2012), sugerindo uma maior atividade mitótica nas lesões de endometriose.

Estudos demonstram que drogas antiestrogênicas usadas no tratamento da endometriose diminuem a expressão do *PCNA*, provavelmente por diminuírem a proliferação de células mediadas por estrogênio e consequentemente diminuir as lesões ectópicas (Kulak *et al.*, 2011). A avaliação de pacientes tratadas com agonistas de GnRH e com Sistema Intrauterino liberador de Levonorgestrel (SIU-LNG) mostrou uma redução na proliferação celular avaliada por uma menor expressão de *PCNA* em células estromais e glandulares do endométrio eutópico e ectópico (Gomes *et al.*, 2009).

Esses resultados corroboram o nosso estudo, pois observamos uma menor expressão significativa de *Pcna* em ratas tratadas com propranolol. Portanto a redução de proliferação celular, devido a uma menor expressão de *Pcna* poderia sugerir uma provável resposta terapêutica.

Tanto a apoptose e a proliferação de células são alvos de tratamentos habitualmente utilizados para controlar a dor em pacientes com endometriose (Gomes *et al.*, 2009).

Durante o ciclo menstrual a apoptose auxilia a manutenção da homeostasia celular, pois, durante a fase secretora tardia, ocorre a eliminação de células envelhecidas presentes na camada funcional do endométrio uterino (Suganuma *et al.*, 1997). As células mais resistentes à apoptose são as células endometriais ectópicas obtidas de sítios da endometriose (Gebel *et al.*, 1998).

Um estudo de Dmowsk (Dmowski *et al.*, 2001) reportou um baixo índice de apoptose celular em mulheres com endometriose na fase secretora tardia e proliferativa precoce do ciclo menstrual. Esse baixo índice de apoptose pode levar a um aumento de células endometriais viáveis regurgitadas na cavidade pélvica durante a menstruação. Dessa forma há uma maior facilidade de sobrevivência e implantação ectópica. A apoptose, portanto pode ser apenas um mecanismo de controle do desenvolvimento e evolução da endometriose.

As Caspases são um grupo de proteases baseadas em cisteína. São importantes para a apoptose celular e algumas caspases são essenciais para o

sistema imunológico, pois são responsáveis pela maturação de citocinas. Existem dois tipos de caspases: caspases iniciadoras e caspases efetoras. Caspases iniciadoras (CASP8, CASP9) clivam pro-formas inativas de caspases efetoras e assim as ativam. As caspases efetoras (CASP3, CASP7) clivam outros substratos protéicos da célula levando ao processo apoptótico. O início da reação em cascata é regulada por inibidores de caspases (Lavrik *et al.*, 2005; Mcilwain *et al.*, 2013)

No entanto, algumas evidências estão emergindo que suportam a existência de muitas outras funções não-apoptóticas destas caspases, que são essenciais para a homeostase do tecido e recuperação pós-lesão. As caspases apoptóticas em células que morrem induzidas pelo estresse podem ativar os sinais mitogênicos que conduzem à proliferação de células vizinhas, um fenômeno denominado proliferação induzida por apoptose. Aparentemente, estas funções não apoptóticas das caspases precisam ser controladas e contidas durante o desenvolvimento para evitar os seus efeitos prejudiciais. Os estudos de acumulação sugerem que a célula cancerígena é capaz de utilizar estas funções de caspases para permitir a sua sobrevivência, proliferação e metástase, a fim de crescer e progredir (Dabrowska *et al.*, 2016).

Entretanto, em nosso estudo não houve diferenças significativas para a marcação de CASP8 nos grupos tratados e controle.

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são uma família de endopeptidases zinco-dependente que estão envolvidas na degradação de matriz extracelular (Woessner, 1991; Raza e Cornelius, 2000; Di Nezza *et al.*, 2002). Elas são de grande importância em processos fisiológicos e patológicos, tais como angiogênese, infiltração e propagação de tumores malignos. Além disso, elas estão presentes em endométrio eutópico e ectópico (Osteen *et al.*, 2003; Uzan *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2007) As MMPs têm expressão multigênica e quando estão associadas ao seus inibidores tissulares de metaloproteinases (TIMPs) são possíveis mediadores da remodelagem da matriz extracelular (Page-Mccaw *et al.*, 2007).

A MMP-2 (gelatinase A) é uma collagenase tipo IV, que é especialmente importante para a degradação da membrana basal (Stetler-Stevenson, 1994). Uma sobre expressão tem sido encontrada em muitos tumores malignos e também no endométrio de pacientes com endometriose (Chung, M. K. *et al.*, 2002). A MMP-9 (gelatinase B) também processa o colagênio tipo IV e além disso divide colágeno tipo II e V. A sua presença, em muitos tipos de câncer, incluindo células malignas e

estroma circundante tem sido demonstrada. MMP-9 pode ser encontrada em endometriose infiltrante (Xin *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2016)

As MMP-2 e MMP-9 estão presentes não só no endométrio normal na fase proliferativa, mas também em endométrio hiperplásico e carcinoma do endométrio (Graesslin *et al.*, 2006). Por conseguinte, a MMP-2 e MMP-9, entre outras MMPs, parecem ser fatores importantes para a progressão de tumores e invasão de câncer do endométrio. Os padrões de expressão destas MMPs também são de interesse em diferentes tipos de endometriose também (Amalinei *et al.*, 2011). Em mulheres com endometriose, foram observados elevados níveis de MMPs em endométrio ectópico em relação ao endométrio tópico. A superexpressão de *MMPs* pode auxiliar o desenvolvimento da endometriose (Kokorine *et al.*, 1997; Di Carlo *et al.*, 2009).

O estudo de Weigel (Weigel *et al.*, 2012) mostrou que a expressão de *MMP-2* e *MMP-9* em carcinoma maligno é mais alta que em endometriose. *MMP-2* foi mais expressa em endometriose colorretal invasiva que em endometriose peritoneal superficial, portanto é possível sugerir que a *MMP-2* é um forte fator de promoção da proliferação em tecido endometrial.

O *TIMP-2* (Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase) é um membro da família de genes *TIMPs*. Os *TIMPs* são uma família de inibidores naturais e específicos das *MMPs*. Esses dois fatores têm importante papéis na manutenção da estabilidade e integridade estrutural dos componentes da matriz extracelular (Taylor *et al.*, 2002; Loffek *et al.*, 2011). Estudos têm mostrado que a desordem das *MMPs* / *TIMPs* pode promover a destruição e degradação da matriz extracelular do peritônio, provocando o desenvolvimento de endometriose (Gottschalk *et al.*, 2000; Chung, H. W. *et al.*, 2002).

Mulheres com endometriose expressam baixos níveis de *TIMP-2*, levando a uma alta atividade proteolítica da *MMP* e favorecendo a invasão de células endometrióticas. O equilíbrio entre *MMPs* e *TIMPs* é importante para manter a atividade adequada de *MMP*. A incapacidade de manter esse equilíbrio pode auxiliar a degradação da matriz e invasão celular. O estrogênio pode aumentar a expressão de *MMP-2* e promover a implantação de tecido endometrial ectópico, entretanto a progesterona pode inibir a expressão de *TIMP-2* e melhorar a invasão de endométrio ectópico promovendo sua implantação (Hulboy *et al.*, 1997; Londero *et al.*, 2012).

Em nosso estudo não houve diferença significativamente estatística para os grupos controle e tratados em relação à marcação de MMP-9 e TIMP-2.

Quanto aos resultados de biologia molecular demonstrados neste trabalho, ao analisar a expressão dos genes *Vegfa*, *Tnf*, *Sparc* e *Cald1* no grupo controle e nos grupos de lesões tratadas com baixa e alta dose de propranolol, bem como no endométrio tópico desses animais, observamos que não houve diferença significativa da expressão gênica.

O Fator de crescimento endotelial vascular (*VEGF*) colabora com a patogênese e progressão da endometriose pela indução da proliferação celular endotelial, migração, diferenciação, organização em túbulos e formação de capilares. Ademais, alguns trabalhos observaram aumentos tanto dos níveis proteicos quanto nos transcritos de *VEGF* no fluido peritoneal e soro de pacientes com endometriose (Mclaren *et al.*, 1996; Pupo-Nogueira *et al.*, 2007). Esses dados demonstram a importância do *VEGF* na patogênese da endometriose.

Avaliando o resultado obtido em nosso estudo, como não houve diferença significativamente estatística entre os grupos estudados, provavelmente o propranolol nas doses administradas não foi capaz de inibir a angiogênese e diminuir a expressão de *Vegf*.

O fator de necrose tumoral (TNF) é uma citocina secretada principalmente por macrófagos. Em resposta ao estímulo inflamatório, o $TNF\alpha$ é secretado e pode induzir a morte celular por apoptose ou necrose de algumas linhas de células tumorais. O *TNF* também pode induzir a proliferação e diferenciação celulares em muitos tipos de células (Ihlenfeld, 2008).

A meta-análise de Lu e colaboradores (Lu *et al.*, 2013) não encontrou nenhuma evidência de benefício clínico quando administraram medicamentos anti-TNF- α (infliximab) ao analisar estudos que versavam sobre a lesão de endometriose, dismenorreia, dispareunia e sensibilidade pélvica. Um aumento de expressão de citocinas pró-inflamatórias, IL-1, 6, 8, TNF e HGF foi observada em tecido endometrial ectópico e tópico de mulheres com endometriose (Berbic *et al.*, 2009).

Em nosso estudo não houve diferença significativa entre os grupos estudados, sugerindo que não houve diminuição de expressão de *Tnf* nas ratas tratadas com propranolol.

Osteonectina (ON), também conhecida como proteína secretada ácida e rica em cisteína (SPARC) ou proteína de membrana basal-40 (BM-40) (Swaroop *et al.*, 1988). Ela apresenta várias funções biológicas e está relacionada com a angiogênese, proliferação e migração de células tumorais (Maillard *et al.*, 1992).

Estudos recentes demonstram que a desregulação dos genes *SPARC*, *MYC*, *MMP3*, *IGFBPI* e *PAEP* pode ser responsável pela perda da homeostase celular em lesões endometrióticas, consequentemente pode auxiliar a implantação e sobrevivência do tecido endometrial ectópico (Meola *et al.*, 2010)

Em nossa amostra, não detectamos diferença significativa nos níveis de expressão de *Sparc* entre os grupos tratados com alta e baixa dose e o grupo controle de lesões induzidas.

Caldesmon (CALD1) é uma proteína de ligação a calmodulina. A CALD1 inibe tonicamente a atividade ATPase da miosina no músculo liso (Hayashi *et al.*, 1992). Alguns estudos demonstram que o gene *CALD1* é superexpresso em lesões endometrióticas de pacientes com endometriose na fase proliferativa do ciclo menstrual (Meola *et al.*, 2010) e em endometrioma ovariano por CGH-array (Zafrakas *et al.*, 2008). CALD1 auxilia a predição de desregulação endometrial em pacientes com endometriose (Meola *et al.*, 2009).

Não foram encontradas diferenças significativas de expressão de *Cald1* entre os grupos controle e tratados com propranolol.

Uzunlar e colaboradores (Uzunlar *et al.*, 2014) sugerem que o propranolol possa suprimir o desenvolvimento da lesão endometrióticas devido a sua atividade antiangiogênica pela inibição de VEGF, MMP-2 e MMP-9. O presente estudo não observou essa inibição, entretanto observou uma redução nos níveis proteicos de MTs sugerindo que o propranolol possa apresentar uma provável resposta terapêutica.

Também observamos uma redução na expressão de *Pcna*, não corroborada pela redução de marcação imunohistoquímica da proteína PCNA nos grupos estudados. Uma análise *in silico* revelou uma discordância entre os níveis de expressão do transcriptoma e proteínas associada com o processo da endometriose (Wren *et al.*, 2007). Isto sugere que a expressão gênica não é somente regulada em

nível de transcriptoma, mas que mecanismos regulatórios pós-transcricionais possam atuar na endometriose. Um exemplo deste tipo de regulação atualmente muito estudado na doença é a regulação por microRNAs (Pan *et al.*, 2007; Burney *et al.*, 2009; Ohlsson Teague *et al.*, 2009; Filigheddu *et al.*, 2010).

A pesquisa experimental é uma maneira de se obter conclusões causais, com relação a intervenções ou tratamentos e estabelecer se um ou mais fatores causam uma mudança em um resultado. No presente estudo observamos, de maneira reprodutível, a ação do propranolol sob diferentes regimes de dose diária sobre a marcação proteica e expressão gênica de proteínas e genes envolvidos na patogenia da endometriose. É conveniente abordar que a pesquisa experimental pode criar situações artificiais que não são extrapoláveis para a prática clínica. Isto é em grande parte devido ao fato de que todas as outras variáveis são rigorosamente controladas que podem não criar uma situação totalmente real. As principais limitações desse estudo são a não utilização dos mesmos marcadores na análise imunohistoquímica e na quantificação de expressão gênica, reduzindo nosso poder de análise da interferência da medicação estudada sobre o comportamento da doença à observação das lesões.

7. Conclusões

No presente estudo de lesões endometrióticas experimentalmente induzidas em ratas e tratadas com propranolol observou-se que houve redução significativa de marcação de Metalotioneína após tratamento, dose independente, tanto em endométrio tópico como em ectópico, sugerindo que o tratamento com propranolol foi eficaz.

Tais achados nos permitem crer em futuras abordagens no tratamento clínico da endometriose que podem incluir inibidores de neoangiogênese. Poderíamos aventar um estudo randomizado duplo-cego em humanos, com o uso adjuvante do propranolol às terapêuticas já existentes, ou outras medicações com conhecida ação de inibição sobre a cascata de angiogênese. A descoberta de novas drogas seguras com alvo sobre essa etapa do estabelecimento da lesão de endometriose poderia beneficiar milhões de mulheres acometidas, que diariamente sofrem com redução da qualidade de vida, dor e/ou dificuldade em conceber.

Referências Bibliográficas

ABRAO, M. S. et al. Deep endometriosis infiltrating the recto-sigmoid: critical factors to consider before management. **Hum Reprod Update**, v. 21, n. 3, p. 329-39, May-Jun 2015. ISSN 1460-2369 (Electronic)

1355-4786 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25618908> >.

AMALINEI, C. et al. Immunohistochemical analysis of steroid receptors, proliferation markers, apoptosis related molecules, and gelatinases in non-neoplastic and neoplastic endometrium. **Ann Anat**, v. 193, n. 1, p. 43-55, Feb 20 2011. ISSN 1618-0402 (Electronic)

0940-9602 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21145716> >.

ARICI, A. Local cytokines in endometrial tissue: the role of interleukin-8 in the pathogenesis of endometriosis. **Ann N Y Acad Sci**, v. 955, p. 101-9; discussion 118, 396-406, Mar 2002. ISSN 0077-8923 (Print)

0077-8923 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11949939> >.

AROSH, J. A. et al. Molecular and preclinical basis to inhibit PGE2 receptors EP2 and EP4 as a novel nonsteroidal therapy for endometriosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 112, n. 31, p. 9716-21, Aug 4 2015. ISSN 1091-6490 (Electronic)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26199416> >.

BERBIC, M. et al. Macrophage expression in endometrium of women with and without endometriosis. **Hum Reprod**, v. 24, n. 2, p. 325-32, Feb 2009. ISSN 1460-2350 (Electronic)

0268-1161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19049988> >.

BLACK, J. W.; DUNCAN, W. A.; SHANKS, R. G. Comparison of some properties of pronethalol and propranolol. **Br J Pharmacol Chemother**, v. 25, n. 3, p. 577-91, Dec 1965. ISSN 0366-0826 (Print)

0366-0826 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4380598> >.

BORKOWF, C. B.; GAIL, M. H. On measures of agreement calculated from contingency tables with categories defined by the empirical quantiles of the marginal distributions. **Am J Epidemiol**, v. 146, n. 6, p. 520-6, Sep 15 1997. ISSN 0002-9262 (Print)

0002-9262 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9290513> >.

BORKOWF, C. B. et al. Analyzing bivariate continuous data grouped into categories defined by empirical quantiles of marginal distributions. **Biometrics**, v. 53, n. 3, p. 1054-69, Sep 1997. ISSN 0006-341X (Print)

0006-341X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9290229> >.

BRAUN, D. P. et al. Relationship between apoptosis and the number of macrophages in eutopic endometrium from women with and without endometriosis. **Fertil Steril**, v. 78, n. 4, p. 830-5, Oct 2002. ISSN 0015-0282 (Print)

0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12372464> >.

BROWN, J.; FARQUHAR, C. Endometriosis: an overview of Cochrane Reviews. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 3, p. CD009590, 2014. ISSN 1469-493X (Electronic)

1361-6137 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24610050> >.

BULLETINS--GYNECOLOGY, A. C. O. P. ACOG practice bulletin. Medical management of endometriosis. Number 11, December 1999 (replaces Technical Bulletin Number 184, September 1993). Clinical management guidelines for obstetrician-gynecologists. **Int J Gynaecol Obstet**, v. 71, n. 2, p. 183-96, Nov 2000. ISSN 0020-7292 (Print)

0020-7292 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11186465> >.

BURNEY, R. O. et al. MicroRNA expression profiling of eutopic secretory endometrium in women with versus without endometriosis. **Mol Hum Reprod**, v. 15, n. 10, p. 625-31, Oct 2009. ISSN 1460-2407 (Electronic)

1360-9947 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19692421> >.

CHARNOCK-JONES, D. S. et al. The effect of progestins on vascular endothelial growth factor, oestrogen receptor and progesterone receptor immunoreactivity and endothelial cell density in human endometrium. **Hum Reprod**, v. 15 Suppl 3, p. 85-95, Aug 2000. ISSN 0268-1161 (Print)

0268-1161 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11041225> >.

CHERIAN, M. G.; JAYASURYA, A.; BAY, B. H. Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. **Mutat Res**, v. 533, n. 1-2, p. 201-9, Dec 10 2003. ISSN 0027-5107 (Print)

0027-5107 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14643421> >.

CHISHOLM, K. M. et al. beta-Adrenergic receptor expression in vascular tumors. **Mod Pathol**, v. 25, n. 11, p. 1446-51, Nov 2012. ISSN 1530-0285 (Electronic)

0893-3952 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22743651> >.

CHUNG, H. W. et al. Matrix metalloproteinase-2, membranous type 1 matrix metalloproteinase, and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression in ectopic and eutopic endometrium. **Fertil Steril**, v. 78, n. 4, p. 787-95, Oct 2002. ISSN 0015-0282 (Print)

0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12372458> >.

CHUNG, M. K. et al. The evil twins of chronic pelvic pain syndrome: endometriosis and interstitial cystitis. **JSLS**, v. 6, n. 4, p. 311-4, Oct-Dec 2002. ISSN 1086-8089 (Print)

1086-8089 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12500828> >.

COHEN, T. et al. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. **J Biol Chem**, v. 271, n. 2, p. 736-41, Jan 12 1996. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8557680> >.

DABROSIN, C. et al. Therapeutic effect of angiostatin gene transfer in a murine model of endometriosis. **Am J Pathol**, v. 161, n. 3, p. 909-18, Sep 2002. ISSN 0002-9440 (Print)

0002-9440 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12213719> >.

DABROWSKA, C.; LI, M.; FAN, Y. Apoptotic Caspases in Promoting Cancer: Implications from Their Roles in Development and Tissue Homeostasis. **Adv Exp Med Biol**, v. 930, p. 89-112, 2016. ISSN 0065-2598 (Print)

0065-2598 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27558818> >.

DELA CRUZ, C.; REIS, F. M. The role of TGFbeta superfamily members in the pathophysiology of endometriosis. **Gynecol Endocrinol**, v. 31, n. 7, p. 511-5, Jul 2015. ISSN 1473-0766 (Electronic)

0951-3590 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25986305> >.

DI CARLO, C. et al. Metalloproteinases, vascular endothelial growth factor, and angiopoietin 1 and 2 in eutopic and ectopic endometrium. **Fertil Steril**, v. 91, n. 6, p. 2315-23, Jun 2009. ISSN 1556-5653 (Electronic)

0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18644593> >.

DI NEZZA, L. A. et al. Presence of active gelatinases in endometrial carcinoma and correlation of matrix metalloproteinase expression with increasing tumor grade and invasion. **Cancer**, v. 94, n. 5, p. 1466-75, Mar 1 2002. ISSN 0008-543X (Print)

0008-543X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11920503> >.

DMOWSKI, W. P. et al. Apoptosis in endometrial glandular and stromal cells in women with and without endometriosis. **Hum Reprod**, v. 16, n. 9, p. 1802-8, Sep 2001. ISSN 0268-1161 (Print)

0268-1161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11527879> >.

DUNSELMAN, G. A. et al. ESHRE guideline: management of women with endometriosis. **Hum Reprod**, v. 29, n. 3, p. 400-12, Mar 2014. ISSN 1460-2350 (Electronic)

0268-1161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24435778> >.

FARQUHAR, C. Endometriosis. **BMJ**, v. 334, n. 7587, p. 249-53, Feb 3 2007. ISSN 1756-1833 (Electronic)

0959-535X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17272567> >.

FILIGHEDDU, N. et al. Differential expression of microRNAs between eutopic and ectopic endometrium in ovarian endometriosis. **J Biomed Biotechnol**, v. 2010, p. 369549, 2010. ISSN 1110-7251 (Electronic)

1110-7243 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20300586> >.

FLORIO, P. et al. Interleukin 1beta and progesterone stimulate activin a expression and secretion from cultured human endometrial stromal cells. **Reprod Sci**, v. 14, n. 1, p. 29-36, Jan 2007. ISSN 1933-7205 (Electronic)

1933-7191 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17636213> >.

FUJISHITA, A. et al. Immunohistochemical study of angiogenic factors in endometrium and endometriosis. **Gynecol Obstet Invest**, v. 48 Suppl 1, p. 36-44, 1999. ISSN 0378-7346 (Print)

0378-7346 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10559663> >.

GAO, X. et al. Economic burden of endometriosis. **Fertil Steril**, v. 86, n. 6, p. 1561-72, Dec 2006. ISSN 1556-5653 (Electronic)

0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17056043> >.

GARGETT, C. E.; MASUDA, H. Adult stem cells in the endometrium. **Mol Hum Reprod**, v. 16, n. 11, p. 818-34, Nov 2010. ISSN 1460-2407 (Electronic)

1360-9947 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20627991> >.

GEBEL, H. M. et al. Spontaneous apoptosis of endometrial tissue is impaired in women with endometriosis. **Fertil Steril**, v. 69, n. 6, p. 1042-7, Jun 1998. ISSN 0015-0282 (Print)

0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9627290> >.

GESCHER, D. M. et al. [The importance of angiogenesis for the pathogenesis of endometriosis]. **Zentralbl Gynakol**, v. 125, n. 7-8, p. 243-6, Jul-Aug 2003. ISSN 0044-4197 (Print)

0044-4197 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14505257> >.

GIUDICE, L. C. et al. The insulin-like growth factor system in human peritoneal fluid: its effects on endometrial stromal cells and its potential relevance to endometriosis. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 79, n. 5, p. 1284-93, Nov 1994. ISSN 0021-972X (Print)

0021-972X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7525631> >.

GLASNER, A. et al. Improving survival rates in two models of spontaneous postoperative metastasis in mice by combined administration of a beta-adrenergic antagonist and a cyclooxygenase-2 inhibitor. **J Immunol**, v. 184, n. 5, p. 2449-57, Mar 1 2010. ISSN 1550-6606 (Electronic)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20124103> >.

GOMES, M. K. et al. Effects of the levonorgestrel-releasing intrauterine system on cell proliferation, Fas expression and steroid receptors in endometriosis lesions and normal endometrium. **Hum Reprod**, v. 24, n. 11, p. 2736-45, Nov 2009. ISSN 1460-2350 (Electronic)

0268-1161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19661125> >.

GOTTSCALK, C. et al. Matrix metalloproteinases and TACE play a role in the pathogenesis of endometriosis. **Adv Exp Med Biol**, v. 477, p. 483-6, 2000. ISSN 0065-2598 (Print)

0065-2598 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10849774> >.

GRAESSLIN, O. et al. Endometrial tumor invasiveness is related to metalloproteinase 2 and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 expressions. **Int J Gynecol Cancer**, v. 16, n. 5, p. 1911-7, Sep-Oct 2006. ISSN 1048-891X (Print)

1048-891X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17009991> >.

HAYASHI, K. et al. Genomic structure of the human caldesmon gene. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 24, p. 12122-6, Dec 15 1992. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1465449> >.

HSIAO, K. Y. et al. Inhibition of dual specificity phosphatase-2 by hypoxia promotes interleukin-8-mediated angiogenesis in endometriosis. **Hum Reprod**, v. 29, n. 12, p. 2747-55, Dec 2014. ISSN 1460-2350 (Electronic)

0268-1161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25316445> >.

HULBOY, D. L.; RUDOLPH, L. A.; MATRISIAN, L. M. Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. **Mol Hum Reprod**, v. 3, n. 1, p. 27-45, Jan 1997. ISSN 1360-9947 (Print)

1360-9947 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9239706> >.

HULL, M. L. et al. Antiangiogenic agents are effective inhibitors of endometriosis. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 88, n. 6, p. 2889-99, Jun 2003. ISSN 0021-972X (Print)

0021-972X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12788903> >.

IHLENFELD, M. F. K., DIAS, R. Determination of cytokines in the laboratory diagnosis of minimal and mild peritoneal endometriosis. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet**, v. 30, n. 1, 2008. ISSN 0100-7203.

Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-72032008000100010> >.

JACOB, C.; MARET, W.; VALLEE, B. L. Control of zinc transfer between thionein, metallothionein, and zinc proteins. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 7, p. 3489-94, Mar 31 1998. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9520393> >.

Jl, Y. et al. Effects of propranolol on the proliferation and apoptosis of hemangioma-derived endothelial cells. **J Pediatr Surg**, v. 47, n. 12, p. 2216-23, Dec 2012. ISSN 1531-5037 (Electronic)

0022-3468 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23217879> >.

JONES, R. C. The effect of a luteinizing hormone releasing hormone (LRH) agonist (Wy-40,972), levonorgestrel, danazol and ovariectomy on experimental endometriosis in the rat. **Acta Endocrinol (Copenh)**, v. 106, n. 2, p. 282-8, Jun 1984. ISSN 0001-5598 (Print)

0001-5598 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6428124> >.

KEENAN, J. A. et al. Interferon-gamma (IFN-gamma) and interleukin-6 (IL-6) in peritoneal fluid and macrophage-conditioned media of women with endometriosis. **Am J Reprod Immunol**, v. 32, n. 3, p. 180-3, Oct 1994. ISSN 1046-7408 (Print)

1046-7408 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7880401> >.

KIM, Y. S. et al. A pivotal role of matrix metalloproteinase-3 activity in dopaminergic neuronal degeneration via microglial activation. **FASEB J**, v. 21, n. 1, p. 179-87, Jan 2007. ISSN 1530-6860 (Electronic)

0892-6638 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17116747> >.

KOCH, A. E. et al. Regulation of angiogenesis by the C-X-C chemokines interleukin-8 and epithelial neutrophil activating peptide 78 in the rheumatoid joint. **Arthritis Rheum**, v. 44, n. 1, p. 31-40, Jan 2001. ISSN 0004-3591 (Print)

0004-3591 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11212173> >.

KOCH, G. G. et al. A general methodology for the analysis of experiments with repeated measurement of categorical data. **Biometrics**, v. 33, n. 1, p. 133-58, Mar 1977. ISSN 0006-341X (Print)

0006-341X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/843570> >.

KOKORINE, I. et al. Expression of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) is related to the activity of human endometriotic lesions. **Fertil Steril**, v. 68, n. 2, p. 246-51, Aug 1997. ISSN 0015-0282 (Print)

0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9240251> >.

KORBEL, C.; MENDER, M. D.; LASCHKE, M. W. Size and spatial orientation of uterine tissue transplants on the peritoneum crucially determine the growth and cyst formation of endometriosis-like lesions in mice. **Hum Reprod**, v. 25, n. 10, p. 2551-8, Oct 2010. ISSN 1460-2350 (Electronic)

0268-1161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20693239> >.

KRUITWAGEN, R. F. et al. Endometrial epithelial cells in peritoneal fluid during the early follicular phase. **Fertil Steril**, v. 55, n. 2, p. 297-303, Feb 1991. ISSN 0015-0282 (Print)

0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1991528> >.

KULAK, J., JR. et al. Treatment with bazedoxifene, a selective estrogen receptor modulator, causes regression of endometriosis in a mouse model. **Endocrinology**, v. 152, n. 8, p. 3226-32, Aug 2011. ISSN 1945-7170 (Electronic)

0013-7227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21586552> >.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. An application of hierarchical kappa-type statistics in the assessment of majority agreement among multiple observers. **Biometrics**, v. 33, n. 2, p. 363-74, Jun 1977a. ISSN 0006-341X (Print)

0006-341X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/884196> >.

_____. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v. 33, n. 1, p. 159-74, Mar 1977b. ISSN 0006-341X (Print)

0006-341X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/843571> >.

LAVRIK, I. N.; GOLKS, A.; KRAMMER, P. H. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. **J Clin Invest**, v. 115, n. 10, p. 2665-72, Oct 2005. ISSN 0021-9738 (Print)

0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16200200> >.

LEBOVIC, D. I. et al. Induction of an angiogenic phenotype in endometriotic stromal cell cultures by interleukin-1beta. **Mol Hum Reprod**, v. 6, n. 3, p. 269-75, Mar 2000. ISSN 1360-9947 (Print)

1360-9947 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10694276> >.

LEBOVIC, D. I.; MUELLER, M. D.; TAYLOR, R. N. Immunobiology of endometriosis. **Fertil Steril**, v. 75, n. 1, p. 1-10, Jan 2001. ISSN 0015-0282 (Print)

0015-0282 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11163805> >.

LEVADOUX-MARTIN, M. et al. Influence of metallothionein-1 localization on its function. **Biochem J**, v. 355, n. Pt 2, p. 473-9, Apr 15 2001. ISSN 0264-6021 (Print)

0264-6021 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11284736> >.

LIU, H. et al. Correlation between matrix metalloproteinase-9 and endometriosis. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 8, n. 10, p. 13399-404, 2015. ISSN 1936-2625 (Electronic)

1936-2625 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26722547> >.

_____. The plasma and peritoneal fluid concentrations of matrix metalloproteinase-9 are elevated in patients with endometriosis. **Ann Clin Biochem**, v. 53, n. Pt 5, p. 599-605, Sep 2016. ISSN 1758-1001 (Electronic)

0004-5632 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26744503> >.

LOFFEK, S.; SCHILLING, O.; FRANZKE, C. W. Series "matrix metalloproteinases in lung health and disease": Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. **Eur Respir J**, v. 38, n. 1, p. 191-208, Jul 2011. ISSN 1399-3003 (Electronic)

0903-1936 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21177845> >.

LONDERO, A. P. et al. Survivin, MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2: their impact on survival, implantation, and proliferation of endometriotic tissues. **Virchows Arch**, v. 461, n. 5, p. 589-99, Nov 2012. ISSN 1432-2307 (Electronic)

0945-6317 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23011643> >.

LU, D.; SONG, H.; SHI, G. Anti-TNF-alpha treatment for pelvic pain associated with endometriosis. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 3, p. CD008088, Mar 28 2013. ISSN 1469-493X (Electronic)

1361-6137 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23543560> >.

MAILLARD, C.; MALAVAL, L.; DELMAS, P. D. Immunological screening of SPARC/Osteonectin in nonmineralized tissues. **Bone**, v. 13, n. 3, p. 257-64, 1992. ISSN 8756-3282 (Print)

1873-2763 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1637573> >.

MAK, I. T.; WEGLIICKI, W. B. Potent antioxidant properties of 4-hydroxyl-propranolol. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 308, n. 1, p. 85-90, Jan 2004. ISSN 0022-3565 (Print)

0022-3565 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14569064> >.

MCCLUGGAGE, W. G. et al. High metallothionein expression is associated with features predictive of aggressive behaviour in endometrial carcinoma. **Histopathology**, v. 34, n. 1, p. 51-5, Jan 1999. ISSN 0309-0167 (Print)

0309-0167 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9934584> >.

MCILWAIN, D. R.; BERGER, T.; MAK, T. W. Caspase functions in cell death and disease. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 5, n. 4, p. a008656, Apr 01 2013. ISSN 1943-0264 (Electronic)

1943-0264 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23545416> >.

MCLAREN, J. Vascular endothelial growth factor and endometriotic angiogenesis. **Hum Reprod Update**, v. 6, n. 1, p. 45-55, Jan-Feb 2000. ISSN 1355-4786 (Print)

1355-4786 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10711829> >.

MCLAREN, J. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis. **Hum Reprod**, v. 11, n. 1, p. 220-3, Jan 1996. ISSN 0268-1161 (Print)

0268-1161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8671190> >.

MEOLA, J. et al. Glycodelin expression in the endometrium of healthy women and in the eutopic and ectopic endometrium of women with endometriosis. **Fertil Steril**, v. 91, n. 5, p. 1676-80, May 2009. ISSN 1556-5653 (Electronic)

0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18402941> >.

MEOLA, J. et al. Differentially expressed genes in eutopic and ectopic endometrium of women with endometriosis. **Fertil Steril**, v. 93, n. 6, p. 1750-73, Apr 2010. ISSN 1556-5653 (Electronic)

0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19200988> >.

MEULEMAN, C. et al. Surgical treatment of deeply infiltrating endometriosis with colorectal involvement. **Hum Reprod Update**, v. 17, n. 3, p. 311-26, May-Jun 2011. ISSN 1460-2369 (Electronic)

1355-4786 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21233128> >.

MULLER, M. M.; GRIESMACHER, A. Markers of endothelial dysfunction. **Clin Chem Lab Med**, v. 38, n. 2, p. 77-85, Feb 2000. ISSN 1434-6621 (Print)

1434-6621 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10834393> >.

NAP, A. W. et al. Antiangiogenesis therapy for endometriosis. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 89, n. 3, p. 1089-95, Mar 2004. ISSN 0021-972X (Print)

0021-972X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15001592> >.

NISOLLE, M. et al. Morphometric study of the stromal vascularization in peritoneal endometriosis. **Fertil Steril**, v. 59, n. 3, p. 681-4, Mar 1993. ISSN 0015-0282 (Print)

0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8458479> >.

NNOAHAM, K. E. et al. Is early age at menarche a risk factor for endometriosis? A systematic review and meta-analysis of case-control studies. **Fertil Steril**, v. 98, n. 3, p. 702-712 e6, Sep 2012. ISSN 1556-5653 (Electronic)

0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22728052> >.

OHLSSON TEAGUE, E. M. et al. MicroRNA-regulated pathways associated with endometriosis. **Mol Endocrinol**, v. 23, n. 2, p. 265-75, Feb 2009. ISSN 0888-8809 (Print)

0888-8809 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19074548> >.

OLIVE, D. L.; HENDERSON, D. Y. Endometriosis and mullerian anomalies. **Obstet Gynecol**, v. 69, n. 3 Pt 1, p. 412-5, Mar 1987. ISSN 0029-7844 (Print)

0029-7844 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3822289> >.

OLIVE, D. L.; LINDHEIM, S. R.; PRITTS, E. A. New medical treatments for endometriosis. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 18, n. 2, p. 319-28, Apr 2004. ISSN 1521-6934 (Print)

1521-6934 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15157645> >.

OSTEEN, K. G.; YEAMAN, G. R.; BRUNER-TRAN, K. L. Matrix metalloproteinases and endometriosis. **Semin Reprod Med**, v. 21, n. 2, p. 155-64, May 2003. ISSN 1526-8004 (Print)

1526-8004 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12917785> >.

OZCAN CENKSOY, P. et al. A potential novel treatment strategy: inhibition of angiogenesis and inflammation by resveratrol for regression of endometriosis in an experimental rat model. **Gynecol Endocrinol**, v. 31, n. 3, p. 219-24, Mar 2015. ISSN 1473-0766 (Electronic)

0951-3590 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25373440> >.

PAGE-MCCAW, A.; EWALD, A. J.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, n. 3, p. 221-33, Mar 2007. ISSN 1471-0072 (Print)

1471-0072 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17318226> >.

PAN, Q. et al. The expression profile of micro-RNA in endometrium and endometriosis and the influence of ovarian steroids on their expression. **Mol Hum Reprod**, v. 13, n. 11, p. 797-806, Nov 2007. ISSN 1460-2407 (Electronic)

1360-9947 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17766684> >.

PASQUIER, E. et al. Propranolol potentiates the anti-angiogenic effects and anti-tumor efficacy of chemotherapy agents: implication in breast cancer treatment. **Oncotarget**, v. 2, n. 10, p. 797-809, Oct 2011. ISSN 1949-2553 (Electronic)

1949-2553 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22006582> >.

PASQUIER, E. et al. beta-blockers increase response to chemotherapy via direct antitumour and anti-angiogenic mechanisms in neuroblastoma. **Br J Cancer**, v. 108, n. 12, p. 2485-94, Jun 25 2013. ISSN 1532-1827 (Electronic)

0007-0920 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23695022> >.

PETTA, C. A. et al. A 3-year follow-up of women with endometriosis and pelvic pain users of the levonorgestrel-releasing intrauterine system. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 143, n. 2, p. 128-9, Apr 2009. ISSN 1872-7654 (Electronic)

0301-2115 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19181433> >.

PITTATORE, G. et al. Endometrial adult/progenitor stem cells: pathogenetic theory and new antiangiogenic approach for endometriosis therapy. **Reprod Sci**, v. 21, n. 3, p. 296-304, Mar 2014. ISSN 1933-7205 (Electronic)

1933-7191 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24037753> >.

PUPO-NOGUEIRA, A. et al. Vascular endothelial growth factor concentrations in the serum and peritoneal fluid of women with endometriosis. **Int J Gynaecol Obstet**, v. 99, n. 1, p. 33-7, Oct 2007. ISSN 0020-7292 (Print)

0020-7292 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17602688> >.

RAZA, S. L.; CORNELIUS, L. A. Matrix metalloproteinases: pro- and anti-angiogenic activities. **J Investig Dermatol Symp Proc**, v. 5, n. 1, p. 47-54, Dec 2000. ISSN 1087-0024 (Print)

1087-0024 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11147675> >.

REMORGIDA, V. et al. The involvement of the interstitial Cajal cells and the enteric nervous system in bowel endometriosis. **Hum Reprod**, v. 20, n. 1, p. 264-71, Jan 2005. ISSN 0268-1161 (Print)

0268-1161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15576386> >.

RIDLEY, J., ET AL. The histogenesis of endometriosis: a review of facts and fancies. **Obstetrical & gynecological Survey**, v. 23, n. article 1, 1968.

ROCHA, A. L. et al. Activin A stimulates interleukin 8 and vascular endothelial growth factor release from cultured human endometrial stromal cells: possible implications for the pathogenesis of endometriosis. **Reprod Sci**, v. 19, n. 8, p. 832-8, Aug 2012. ISSN 1933-7205 (Electronic)

1933-7191 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22477338> >.

RODRIGUEZ-ROMAGUERA, J. et al. Systemic propranolol acts centrally to reduce conditioned fear in rats without impairing extinction. **Biol Psychiatry**, v. 65, n. 10, p. 887-92, May 15 2009. ISSN 1873-2402 (Electronic)

0006-3223 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19246030> >.

ROSA-E-SILVA, J. C. et al. Increased cell proliferation in experimentally induced endometriosis in rabbits. **Fertil Steril**, v. 93, n. 5, p. 1637-42, Mar 15 2010. ISSN 1556-5653 (Electronic)

0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19304285> >.

ROSA E SILVA, J. C., R E S. A., COLTRO, P.S., GARCIA, S.B., CÂNDIDO DOS REIS, F. J., NOGUEIRA, A. A. Modelo Experimental para Endometriose em Coelhas com Seguimento Evolutivo das Lesões. **RBGO**, v. 26, n. 9, p. 715-19, 2004.

ROUTLEDGE, P. A.; SHAND, D. G. The present status of propranolol. **Ration Drug Ther**, v. 13, n. 12, p. 1-6, Dec 1979. ISSN 0031-7020 (Print)

0031-7020 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/575225> >.

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 43, Mar 1927. ISSN 0002-9440 (Print)

0002-9440 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19969738> >.

SCHOR, E. et al. Effects of conjugated estrogens and progestogen in surgically induced endometriosis in oophorectomized rats. **Clin Exp Obstet Gynecol**, v. 26, n. 3-4, p. 158-61, 1999. ISSN 0390-6663 (Print)

0390-6663 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10668143> >.

SHAND, D. G. Pharmacokinetics of propranolol: a review. **Postgrad Med J**, v. 52 Suppl 4, p. 22-25, 1976. ISSN 0032-5473 (Print)

0032-5473 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/787953> >.

SHARPE-TIMMS, K. L. Using rats as a research model for the study of endometriosis. **Ann N Y Acad Sci**, v. 955, p. 318-27; discussion 340-2, 396-406, Mar 2002. ISSN 0077-8923 (Print)

0077-8923 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11949958> >.

SHIFREN, J. L. et al. Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: implications for angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 81, n. 8, p. 3112-8, Aug 1996. ISSN 0021-972X (Print)

0021-972X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8768883> >.

SIGNORILE, P. G.; BALDI, A. Endometriosis: new concepts in the pathogenesis. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 42, n. 6, p. 778-80, Jun 2010. ISSN 1878-5875 (Electronic)

1357-2725 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20230903> >.

SILBER, B.; RIEGELMAN, S. Stereospecific assay for (-)- and (+)-propranolol in human and dog plasma. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 215, n. 3, p. 643-8, Dec 1980. ISSN 0022-3565 (Print)

0022-3565 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7441523> >.

SIRISTATIDIS, C. et al. Immunological factors and their role in the genesis and development of endometriosis. **J Obstet Gynaecol Res**, v. 32, n. 2, p. 162-70, Apr 2006. ISSN 1341-8076 (Print)

1341-8076 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16594919> >.

STETLER-STEVENSON, W. G. Progelatinase A activation during tumor cell invasion. **Invasion Metastasis**, v. 14, n. 1-6, p. 259-68, 1994. ISSN 0251-1789 (Print)

0251-1789 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7657518> >.

STILES, J. M. et al. Targeting of beta adrenergic receptors results in therapeutic efficacy against models of hemangioendothelioma and angiosarcoma. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e60021, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23555867> >.

STORCH, C. H.; HOEGER, P. H. Propranolol for infantile haemangiomas: insights into the molecular mechanisms of action. **Br J Dermatol**, v. 163, n. 2, p. 269-74, Aug 2010. ISSN 1365-2133 (Electronic)

0007-0963 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20456345> >.

STREULI, I. et al. An update on the pharmacological management of endometriosis. **Expert Opin Pharmacother**, v. 14, n. 3, p. 291-305, Feb 2013. ISSN 1744-7666 (Electronic)

1465-6566 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23356536> >.

SUGANUMA, N. et al. Apoptosis in human endometrial and endometriotic tissues. **Hormone Research**, v. 48, p. 42-47, 1997. ISSN 0301-0163. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1997XP03800008 >.

SUGINAMI, H. A reappraisal of the coelomic metaplasia theory by reviewing endometriosis occurring in unusual sites and instances. **Am J Obstet Gynecol**, v. 165, n. 1, p. 214-8, Jul 1991. ISSN 0002-9378 (Print)

0002-9378 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1853899> >.

SWAROOP, A.; HOGAN, B. L.; FRANCKE, U. Molecular analysis of the cDNA for human SPARC/osteonectin/BM-40: sequence, expression, and localization of the gene to chromosome 5q31-q33. **Genomics**, v. 2, n. 1, p. 37-47, Jan 1988. ISSN 0888-7543 (Print)

0888-7543 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2838412> >.

TAPIERO, H.; TEW, K. D. Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. **Biomed Pharmacother**, v. 57, n. 9, p. 399-411, Nov 2003. ISSN 0753-3322 (Print)

0753-3322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14652165> >.

TAYLOR, R. N.; LEOVIC, D. I.; MUELLER, M. D. Angiogenic factors in endometriosis. **Ann N Y Acad Sci**, v. 955, p. 89-100; discussion 118, 396-406, Mar 2002. ISSN 0077-8923 (Print)

0077-8923 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11949968> >.

TEAM, R. D. C. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria : the R Foundation for Statistical Computing., 2011. ISSN 3-900051-07-0. Disponível em: < <http://www.R-project.org/> >.

THEILE, A.; MULLER, K. M. [Proliferation kinetics of bronchioloalveolar tumorlets]. **Pathologe**, v. 17, n. 2, p. 163-70, Mar 1996. ISSN 0172-8113 (Print)

0172-8113 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8650148> >.

THEOCHARIS, S. E. et al. Metallothionein expression in human neoplasia. **Histopathology**, v. 45, n. 2, p. 103-18, Aug 2004. ISSN 0309-0167 (Print)

0309-0167 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15279628> >.

TSANGARIS, G. T.; TZORTZATOU-STATHOPOULOU, F. Metallothionein expression prevents apoptosis: a study with antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides in a human T cell line. **Anticancer Res**, v. 18, n. 4A, p. 2423-33, Jul-Aug 1998. ISSN 0250-7005 (Print)

0250-7005 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9703889> >.

UZAN, C. et al. Eutopic endometrium and peritoneal, ovarian and bowel endometriotic tissues express a different profile of matrix metalloproteinases-2, -3 and -11, and of tissue inhibitor metalloproteinases-1 and -2. **Virchows Arch**, v. 445, n. 6, p. 603-9, Dec 2004. ISSN 0945-6317 (Print)

0945-6317 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15452706> >.

UZUNLAR, O. et al. Effects of repeated propranolol administration in a rat model of surgically induced endometriosis. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 182, p. 167-71, Nov 2014. ISSN 1872-7654 (Electronic)

0301-2115 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25300058> >.

VERCELLINI, P. et al. Surgery for endometriosis-associated infertility: a pragmatic approach. **Hum Reprod**, v. 24, n. 2, p. 254-69, Feb 2009. ISSN 1460-2350 (Electronic)

0268-1161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18948311> >.

VERNON, M. W.; WILSON, E. A. Studies on the surgical induction of endometriosis in the rat. **Fertil Steril**, v. 44, n. 5, p. 684-94, Nov 1985. ISSN 0015-0282 (Print)

0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4054348> >.

WEIGEL, M. T. et al. Differential expression of MMP-2, MMP-9 and PCNA in endometriosis and endometrial carcinoma. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 160, n. 1, p. 74-8, Jan 2012. ISSN 1872-7654 (Electronic)

0301-2115 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22056701> >.

WICHEREK, L. et al. Metallothionein and RCAS1 expression in comparison to immunological cells activity in endometriosis, endometrial adenocarcinoma and endometrium according to menstrual cycle changes. **Gynecol Oncol**, v. 99, n. 3, p. 622-30, Dec 2005. ISSN 0090-8258 (Print)

0090-8258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16112719> >.

WITZ, C. A. et al. The alpha(2)beta(1) and alpha(3)beta(1) integrins do not mediate attachment of endometrial cells to peritoneal mesothelium. **Fertil Steril**, v. 78, n. 4, p. 796-803, Oct 2002. ISSN 0015-0282 (Print)

0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12372459> >.

WOESSNER, J. F., JR. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. **FASEB J**, v. 5, n. 8, p. 2145-54, May 1991. ISSN 0892-6638 (Print)

0892-6638 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1850705> >.

WREN, J. D.; WU, Y.; GUO, S. W. A system-wide analysis of differentially expressed genes in ectopic and eutopic endometrium. **Hum Reprod**, v. 22, n. 8, p. 2093-102, Aug 2007. ISSN 0268-1161 (Print)

0268-1161 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17562676> >.

XIN, L. et al. Association between matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 polymorphisms and endometriosis: A systematic review and meta-analysis. **Biomed Rep**, v. 3, n. 4, p. 559-565, Jul 2015. ISSN 2049-9434 (Print)

2049-9434 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26171166> >.

XU, T. et al. Antiangiogenic effect of propranolol on the growth of the neuroblastoma xenografts in nude mice. **J Pediatr Surg**, v. 48, n. 12, p. 2460-5, Dec 2013. ISSN 1531-5037 (Electronic)

0022-3468 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24314187> >.

YANG, M. et al. The involvement of osteopontin and matrix metalloproteinase- 9 in the migration of endometrial epithelial cells in patients with endometriosis. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 13, p. 95, Aug 20 2015. ISSN 1477-7827 (Electronic)

1477-7827 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26289107> >.

YU, C. C. et al. Haemangiopericytomas: the prognostic value of immunohistochemical staining with a monoclonal antibody to proliferating cell nuclear antigen (PCNA). **Histopathology**, v. 19, n. 1, p. 29-33, Jul 1991. ISSN 0309-0167 (Print)

0309-0167 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1680785> >.

ZAFRAKAS, M. et al. Genome-wide microarray gene expression, array-CGH analysis, and telomerase activity in advanced ovarian endometriosis: a high degree of differentiation rather than malignant potential. **Int J Mol Med**, v. 21, n. 3, p. 335-44, Mar 2008. ISSN 1107-3756 (Print)

1107-3756 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18288381> >.

Anexo

ANEXO A – Aprovação do comitê de ética em experimentação animal

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 183/2011, sobre o projeto intitulado “*Influência de agentes antiangiogênicos (Propranolol) em endometriose experimentalmente induzida em ratas*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Júlio César Rosa e Silva** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** em reunião de 30 de janeiro de 2012.

(We certify that the protocol nº 183/2011, about “*Effect of antiangiogenic drugs (Propranolol) in experimental endometriosis in rats*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the College of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo – Ethical Commission of Ethics in Animal Research (CETEA) in 01/30/2012.

Ribeirão Preto, 31 de janeiro de 2012.

Prof. Dr. Márcio Dantas
Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal

APÊNDICE A – Gráficos de descrição das amostras

APÊNDICE B – Manuscrito

Influência de agentes antiangiogênicos (propranolol) em endometriose experimentalmente induzida em ratas

Effect of anti-angiogenics drugs (propranolol) in experimentally induced endometriosis in rats

ZANARDI JVC¹, MEOLA J¹, SILVA AR¹, FORTUNATO GG¹, POLI-NETO OB¹, NOGUEIRA AA¹, ROSA-E-SILVA JC¹,

¹ Department of Obstetrics and Gynecology, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil.

RESUMO

Propõe-se que a angiogênese represente um importante passo no processo de adesão, implantação, invasão e crescimento das células endometriais, visto que, semelhante aos tumores metastáticos, implantes endometrióticos dependem de neovascularização para se proliferarem. Tal constatação sugere que a supressão do desenvolvimento de vasos sanguíneos por meio da inibição de fatores angiogênicos específicos pode ser uma nova oportunidade terapêutica na abordagem da endometriose. Estudos demonstram um efeito antiangiogênico do propranolol anticancerígeno em diferentes tipos de tumores. Tal achado sugere que o propranolol pode contribuir clinicamente exercendo papel sobre a inibição de neoangiogênese, e tal efeito resultar em um impacto sobre as lesões de endometriose. Foi estudado o efeito do propranolol sobre marcadores de diferenciação (Metalotioneínas MT1 e MT2), invasão (MMP9 e TIMP2), proliferação celular (PCNA) e apoptose (CASP8 – caspase 8) por coloração imunohistoquímica, e também a influência sobre a adesão, motilidade e angiogênese das lesões de endometriose por quantificação da expressão relativa (RQ) por PCR em tempo real dos genes Vegf, Cald1, Pcn, Tnf e Sparc. Foram utilizadas 30 ratas adultas Wistar, fêmeas, virgens que foram submetidas a laparotomia para indução de lesões de endometriose. As ratas foram separadas em três grupos, e sacrificadas após 14 dias de tratamento de dose baixa (PB, n = 10) e dose elevada (PA, n = 10) de propranolol; e o grupo de controle (C, n = 10) sem tratamento. As lesões foram excisadas para análise histológica com o corno uterino contralateral, com confirmação da presença de tecido glandular e estroma endometrial. No presente estudo foi observada uma redução na marcação imunohistoquímica para Metalotioneínas, com 60% de positividade no grupo controle, 10% e 11,1% para o PA, PB, respectivamente (p < 0,05). Também observamos uma diminuição na expressão do gene de Pcn (C = 1,04; PA = 0,32; PB = 0,69). Em outros marcadores de imunohistoquímica e quantificação da expressão gênica nas lesões e no tecido uterino não foram observadas diferenças significativas. O tratamento com drogas antiangiogênicas como propranolol oferece novas perspectivas de abordagem terapêutica para pacientes com endometriose.

Palavras-chave: Endometriose. Angiogênese. Proliferação celular. Apoptose. Propranolol. Ratas.

1. Introdução

A endometriose é definida pela presença de tecido endometrial, seja ele glandular ou estromal, fora da cavidade uterina, denominado endométrio ectópico ¹. Afeta 10 a 15% das mulheres em idade reprodutiva ².

Semelhante aos tumores metastáticos, implantes endometrióticos dependem de neovascularização para se estabelecerem, implantarem e invadirem ³⁻⁵. A supressão do desenvolvimento de vasos sanguíneos por meio da inibição de fatores angiogênicos específicos pode ser uma nova oportunidade terapêutica no tratamento da endometriose ⁶⁻⁸.

A ação anticancerígena do propranolol em diferentes tipos de tumores ⁹⁻¹², além de efeito antitumoral dos β -bloqueadores em sarcomas *in vivo* e *in vitro* ^{11,13}, e por fim, pelo sinergismo entre quimioterapia e β -bloqueadores em câncer de mama e neuroblastoma, por mecanismos ainda não totalmente elucidados ^{14,15} é sugerido que o propranolol possa contribuir clinicamente exercendo papel sobre a inibição de neoangiogênese, e tal efeito resultar em um impacto sobre as lesões de endometriose.

Foi proposto o uso dessa droga em um modelo experimental consagrado ¹⁶⁻²⁰ para a observação do comportamento de lesões de endometriose *in vivo*, com e sem tratamento, e aventar uma nova opção terapêutica clínica no tratamento de pacientes com endometriose.

2. Materiais e métodos

Após uma vasta revisão da literatura sobre o tema e aprovações pela Comissão de Pesquisa do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (protocolo nº 339/2011) e pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (protocolo 183/2011), foram solicitadas as ratas e aplicado o modelo técnico-cirúrgico para indução de

lesões de endometriose¹⁶⁻²⁰. Foram utilizadas trinta ratas Wistar, virgens, da mesma ninhada, de aproximadamente 250 g no início do experimento, idade de quarenta e nove dias. Tais ratas, mantidas em *ad libitum* (livre acesso à água e ração Nuvilab CR1 autoclavável), inicialmente permaneceram por sete dias para ambientarem-se em gaiolas metabólicas (41 cm x 32 cm x 17 cm) sob controle de umidade e temperatura (22° a 25°C) e regime de luz com ciclo claro-escuro de 12/12 horas. Após este período, os grupos, descritos abaixo, foram submetidos à laparotomia para indução da lesão de endometriose.

Os animais foram alocados em 3 grupos de 10 animais divididos da seguinte forma:

Grupo C (controle, n=10): ratas com endometriose induzida experimentalmente e sem tratamento da droga no pós-operatório.

Grupo PB (propranolol baixa dose, n=10): ratas que receberam diariamente droga propranolol em baixa dose (0,05 mg/Kg) por 2 semanas após 4 semanas da cirurgia para indução das lesões.

Grupo PA (propranolol alta dose, n=10): ratas que receberam diariamente droga propranolol em alta dose (0,1 mg/kg) por 2 semanas após 4 semanas da cirurgia para indução das lesões.

A indução da lesão de endometriose foi realizada após injeção intramuscular com 1 ml de Xilazina 2 mg/mL (Dopaser, Hertape Calier), e 1 ml cloridrato de cetamina 10% (Ketamina Agener, União Química Farmacêutica Nacional AS, Uso veterinário), sendo 0,15 unidades para cada 100 g de peso do animal.

Após anestesia, foi realizado tricotomia pélvica, seguida dos cuidados de antisepsia com lavagem das luvas de látex com soro fisiológico para redução da formação de aderências. Todos os procedimentos foram realizados pelo mesmo pesquisador. A cavidade pélvica foi aberta com incisão longitudinal mediana de aproximadamente 2 cm, sendo a 2 cm do púbis do animal. Posteriormente, ressecado cerca de 4 cm do corno uterino direito seguido de sutura do coto proximal. A porção uterina dissecada foi imersa em soro fisiológico 0,9% a 4°C por cerca de 2 minutos e então incisada longitudinalmente, sendo retirado dois fragmentos de 5 x 5mm. Estes fragmentos de tecido endometrial foram suturados ao peritônio próximo ao trato reprodutivo da rata utilizando fio Vicryl 6.0 com a face endometrial livre voltada para a cavidade abdominal, sendo um fragmento suturado a direita e outro a esquerda, com posterior fechamento da incisão cirúrgica. Nenhuma suplementação hormonal ou antimicrobiana foi administrada antes ou após a laparotomia.

Quatro semanas após a cirurgia, tempo necessário para a implantação da lesão^{21,22}, os grupos de estudo receberam diariamente a injeção intraperitoneal de propranolol (0.05mg/Kg ou 0.1mg/kg) por 2 semanas, sendo então eutanasiadas. O grupo controle foi eutanasiado após estas quatro semanas de seguimento inicial.

Ao término do protocolo, as ratas foram eutanasiadas e realizado o inventário da cavidade abomino-pélvica, identificando e documentando as lesões. Observou-se em todos os grupos eutanasiados a presença de lesões bilateralmente localizadas na parede abdominal dos animais, visíveis macroscopicamente com tamanho aproximado de 1cm de comprimento. Após esta etapa, as lesões de endometriose foram excisadas para análise histológica e molecular.

As ratas foram pesadas após 4 semanas, e a cada semana de droga administrada, fizemos o ajuste de dose da medicação conforme estabelecido previamente pelo protocolo dose/peso.

Os tecidos retirados foram divididos ao meio, sendo que metade seguiu o protocolo para técnicas de Imunohistoquímica e a outra metade foi incluída em RNA later Solution (Ambion, par number AM7020) e após 24hs à 4°C, o tecido foi armazenado à -80°C para posteriores análises de expressão gênica.

Os tecidos retirados foram divididos ao meio, sendo uma parte fixada em formol 10%, processada para inclusão em parafina e corada por hematoxilina e eosina (HE) com objetivo de identificar a presença de lesões compatíveis com endometriose e posterior realização de Imunohistoquímica. Foram realizados cortes histológicos com 4 a 5µm. Os cortes foram desparafinizados em xileno e desidratados em uma série de álcoois. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada em uma solução contendo 0,3% de peróxido de hidrogênio por 30 minutos. Os cortes foram submetidos à recuperação antigênica com tampão de citrato a 10 mM e colocados em panela a vapor por 40 minutos e, logo após, as amostras foram resfriadas por 30 minutos em temperatura ambiente e incubadas a 4º C overnight com o anticorpo primário. Aplicado o protocolo de sequências conforme o Kit Mach 4:

- Primeiro dia: recuperação antigênica: Tampão citrato pH 6.0, 35 minutos, lavagem com Tris Buffered Saline-TBS, bloqueio da peroxidase endógena 10 minutos, lavagem com TBS por 5 minutos, bloqueio da proteína BSA 2% por 10 minutos, lavagem com TBS e incubação com anticorpo primário overnight;

- Segundo dia: lavagem, incubação no pós primário por 30 minutos, lavagem com TBS por 3 minutos, incubação no polímero por 30 minutos, lavagem com TBS e aplicação de DAB (3,3 diaminobenzina).

Os anticorpos utilizados neste estudo, suas diluições e respectivas marcas foram: PCNA (1:500, PC10:SC-56, Santa Cruz Biotechnology, INC), CASPASE- 8 (1:100, clone 11B6, Novacastra Laboratories, United Kingdom), METALOTIONEINA(1:100, clone E9, Dako, USA), TIMP-2 (1:100, 3A4, Novacastra Laboratories, United Kingdom), MMP-9 (1:100, 15W2, Leica Biosystem, United Kingdom).

O tecido coletado foi analisado por Imunohistoquímica quanto aos seguintes marcadores:

- Índice de proliferação celular através da marcação do PCNA (*proliferative cell nuclear antigen*), marcação de núcleo;
- Índice de apoptose através da marcação da Caspase-8, marcação de citoplasma e núcleo;
- Expressão de moléculas envolvidas na diferenciação celular como Metalotioneína (Monoclonal Mouse Anti-Metallothionein Clone E9);
- Marcadores de invasão tecidual como MMP-9 (Mouse Monoclonal Antibody Matrix Metaloproteínases 9) e TIMP-2 (Tissue Inhibitor of Matrix Metaloproteínases 2), marcação de citoplasma.

As lâminas foram analisadas por dois médicos (ARS e JVCZ). As células foram marcadas positiva ou negativamente, para cada marcador, segundo critérios utilizados na literatura - *Imuno Reactive Score* ²³. Para MMP-9, Metalotioneína, TIMP-2 e Caspase-8 a ausência de marcação (0%) foi definida como "1+". Marcações entre 1 e 10% foram definidas como "2+". Por sua vez, marcações avaliadas entre 10 e 50%, conferiram o score de "3+". Já para as observações que continham entre 51 e 80% das células marcadas foram definidas como "4+". E, por fim, marcações superiores a 80% foram associadas ao score de "5+". Em relação às marcações de PCNA definiu-se o score "1+" para marcações inferiores a 20% das células. Marcações entre 20 e 70% conferiram o status de "2+". Da mesma maneira, marcações superiores a 70% estabeleceram o score de "3+".

As amostras de tecido congeladas em RNA later à -80°C foram descongeladas e lavadas em PBS 1X.

O RNA total foi extraído a partir de 50 mg de tecido utilizando Trizol Plus RNA Purification Kit (Ambion, part number 12183-555) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA total foi quantificado por espectrofotometria à OD 260/280 (NanoDrop2000c, Thermo Scientific). O DNA genômico foi removido usando DNA-free Kit (Ambion, part number AM1906). Em seguida, o cDNA foi sintetizado a partir de 1000 ng de RNA total utilizando High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (Applied Biosystems, part number 4374966). A PCR em tempo real foi realizada utilizando o equipamento 7500 Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems). As seguintes sondas de hidrólise do tipo TaqMan (Applied Biosystems)

foram utilizadas neste estudo: Rn00582935_m1 (*Vegfa*), Rn00565719_m1 (*Cald1*), Rn01514538_g1 (*Pcna*), Rn99999017_m1 (*Tnf*), Rn01644671_m1 (*Sparg*). Os ciclos de PCR foram os seguintes: um ciclo de 95°C durante 20 segundos, 40 ciclos de 95°C por 3 segundos e a 60°C por 30 minutos. Cada reação de PCR foi realizada em triplicata. Os genes *Actb* (Rn00667869_m1) e *B2m* (Rn 00560865_m1) foram utilizados como gene de referência para normalizar as reações. As eficiências das sondas e primers foram testadas na reação de amplificação dos genes selecionados. Para esse estudo, foram consideradas ideais as eficiências na faixa de 90 a 110%. A expressão relativa para os genes analisados foi calculada para cada amostra de acordo com o método de $2^{-\Delta\Delta CT}$.

3. Resultados

Foram utilizadas 30 ratas da raça Wistar. Dessas, 10 foram utilizadas em cada grupo conforme descrito na metodologia.

Não houve perda de animais, não foram observados processos infecciosos ou desprezo de material por qualquer motivo.

À análise imunohistoquímica, observamos que não houve material satisfatório para análise nas lâminas confeccionadas para o estudo dos tecidos obtidos do animal de número 10 do grupo PB para os marcadores Metalotioneína, Caspase-8 e Timp-2.

Para a análise de expressão gênica também observamos perdas no estudo por material apresentando quantidade insuficiente de cDNA em algumas amostras, a saber: *CALD1* do tecido obtido da lesão ectópica do animal 9, do grupo PA; *VEGF*, *TNF*, *PCNA*, e *SPARC* do tecido obtido da lesão ectópica dos animais 8, do grupo PB e 1, do grupo C.

Imunohistoquímica

Na análise Imunohistoquímica dos tecidos obtidos a partir das lesões de endometriose induzidas e endométrio eutópico (útero) as marcações foram quantificadas e realizada análise comparativa entre as diferentes variáveis.

Não foram observadas diferenças significativas para os marcadores MMP-9, TIMP-2, Caspase-8 e PCNA. Entretanto, para a Metalotioneína, houve redução significativa de marcação após tratamento, dose independente, tanto em endométrio tópico como em ectópico (Tabela 1).

Tabela 1 - Comparações entre as variáveis relacionadas à imunohistoquímica.

Variáveis	Grupos			Total	p-valor
	C (n=10)	PA (n=10)	PB (n=10)		
METALOTIONEINA_UTERO					
1+	0 (0)	9 (90)	8 (88,89)	17	0,0001
3+	0 (0)	1 (10)	0 (0)	1	
4+	1 (10)	0 (0)	1 (11,11)	2	
5+	9 (90)	0 (0)	0 (0)	9	
METALOTIONEINA_LESAO					
1+	2 (20)	9 (90)	8 (88,89)	19	0,0018
3+	0 (0)	1 (10)	0 (0)	1	
4+	1 (10)	0 (0)	1 (11,11)	2	
5+	7 (70)	0 (0)	0 (0)	7	

Expressão gênica

Detectamos diferenças significativas entre os níveis de expressão de *PCNA* obtidos na lesão entre os grupos controle e os grupos tratados. No presente estudo não foram observadas diferenças significativas em relação à expressão de *CALD1*, *SPARC*, *VEGFA* e *TNF*, nas lesões, nos três grupos analisados, conforme é observado na tabela 2.

Tabela 2 - Comparação da expressão gênica de *PCNA* (Lesão) entre os grupos.

PCNA (Lesão)					
Grupo	N	Média	Desvio Padrão	p-valor	Pós teste de Dunn*
C	9	1,21	0,77		a
PA	10	0,48	0,4	0,02	b
PB	9	0,73	0,27		ab

*Letras diferentes representam diferenças significativas ao nível de significância de 0,05. Expressão gênica em unidades arbitrárias. C=Grupo controle; PA=Grupo tratado com propranolol a 0,1 mg/kg; PB=Grupo tratado com propranolol a 0,05 mg/kg.

Discussão

A capacidade de adesão, invasão e desenvolvimento das lesões de endometriose estão relacionadas ao desequilíbrio entre as enzimas que degradam os componentes da matriz extracelular (como a Metaloproteinase 9), e seus reguladores endógenos – os inibidores de tecidos de metaloproteinases (como o Timp-2). A viabilidade do tecido ectópico é atribuída em partes à ocorrência de neoangiogênese estimulada pelo fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e citocinas.

O uso de inibidores de neoangiogênese têm sido amplamente estudados no tratamento de endometriose ²⁴⁻²⁷.

β -bloqueadores como o propranolol, devido à sua ação em inibição de neoangiogênese, possuem efeitos antitumorais em diferentes tipos de tumores, e principalmente tumores vasculares ^{10,11,13,28}.

Por meio de análises imunohistoquímicas e estudos de biologia molecular foi possível analisar a resposta das lesões experimentalmente induzidas, bem como dos tecidos obtidos a partir de endométrio eutópico.

Os anticorpos empregados nas análises imunohistoquímica e em biologia molecular foram Metalotioneína (MT), PCNA, Caspase-8, MMP-9, TIMP-2, *VEGFA*, *TNF*, *SPARC*, *CALD1*.

A MT é uma proteína de baixo peso molecular com papéis funcionais no crescimento celular, diferenciação e reparação, inversamente correlacionada com o índice de apoptose ²⁹⁻³². Altos níveis de MTs podem estar presentes em tecidos com rápido crescimento e desenvolvimento. As MTs fornecem zinco e cobre para o metabolismo de ácidos nucleicos, síntese de proteínas e outros processos metabólicos, portanto pode haver uma ligação entre MTs e tumores cancerosos ³³. A superexpressão de MT pode proteger as células tumorais da apoptose e, assim, contribuir para a expansão do tumor ³⁴. Para essa proteína houve redução significativa de marcação após tratamento, dose independente, tanto em endométrio tópico como em ectópico, sugerindo que o tratamento com propranolol foi eficaz.

O antígeno de proliferação celular (*PCNA*) é uma proteína nuclear e sua expressão se relaciona com o estado proliferativo das células ³⁵. O antígeno é expresso no núcleo das células, durante a fase de síntese do DNA. Ele pode ser usado para a classificação de diferentes lesões neoplásicas e benignas com comportamento proliferativo. O *PCNA* é um marcador de proliferação específica validado que é resistente à fixação ³⁶.

Observa-se maior expressão de *PCNA* entre lesões vermelhas, quando comparadas a lesões brancas e negras ³. Há diferenças relevantes no padrão de expressão de *PCNA* em diferentes estádios de endometriose e em câncer de endométrio. Demonstrou-se previamente que drogas antiestrogênicas usadas no tratamento da endometriose diminuem a expressão do *PCNA*, provavelmente por diminuírem a proliferação de células mediadas por estrogênio e consequentemente diminuir as lesões ectópicas ³⁷. A avaliação de pacientes tratadas com agonistas de GnRH e com Sistema Intrauterino liberador de Levonorgestrel (SIU-LNG) mostrou uma redução na proliferação celular avaliada por uma menor expressão de *PCNA* em células estromais e glandulares do endométrio eutópico e ectópico ³⁸. Esses resultados corroboram o nosso estudo, pois observamos uma menor expressão significativa de *PCNA* em ratas tratadas com propranolol. Portanto a redução de proliferação celular, devido a uma menor expressão de *PCNA* sugere uma provável resposta terapêutica.

As Caspases são importantes para a apoptose celular e algumas caspases são essenciais para o sistema imunológico, algumas evidências estão emergindo que suportam a existência de muitas outras funções não-apoptóticas destas caspases, que são essenciais para a homeostase do tecido e recuperação pós-lesão. As caspases apoptóticas em células que morrem induzidas pelo stress podem ativar os sinais mitogênicos que conduzem à proliferação de células vizinhas, um

fenômeno denominado "Proliferação Induzida Por Apoptose". Entretanto, em nosso estudo não houve diferença estatísticas significante para a marcação de caspases nos grupos tratados e controle.

As metaloproteinases de matriz (*MMPs*) são uma família de endopeptidases zinco-dependente que estão envolvidas na degradação de matriz extracelular ³⁹⁻⁴¹. Elas são de grande importância em processos fisiológicos e patológicos, tais como angiogênese, infiltração e propagação de tumores malignos. Além disso, elas estão presentes em endométrio eutópico e ectópico ⁴²⁻⁴⁴. As *MMPs*, tem expressão multigênica e quando estão associadas aos seus inibidores tissulares e metaloproteinases (*TIMPs*) são possíveis mediadores da remodelagem da matriz extracelular ⁴⁵. Observa-se que a expressão de *MMP-2* e *MMP-9* em carcinoma maligno é mais elevada que a observada em endometriose. *MMP-2* foi mais expressa em endometriose colorretal invasiva que em endometriose peritoneal superficial, portanto é possível sugerir que a *MMP-2* é um forte fator de promoção da proliferação em tecido endometrial ²³.

O *TIMP-2* (Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase) é um membro da família de genes *TIMPs*. Os *TIMPs* são uma família de inibidores naturais e específicos das *MMPs*. Esses dois fatores têm importante papéis na manutenção da estabilidade e integridade estrutural dos componentes da matriz extracelular. Mulheres com endometriose expressam baixos níveis de *TIMP-2*, levando a uma alta atividade proteolítica da *MMP* e favorecendo a invasão de células endometrióticas. O equilíbrio entre *MMPs* e *TIMPs* é importante para manter a atividade adequada de *MMP*. A incapacidade de manter esse equilíbrio pode auxiliar a degradação da matriz e invasão celular. O estrogênio pode aumentar a expressão de *MMP-2* e promover a implantação de tecido endometrial ectópico, entretanto a progesterona pode inibir a expressão de *TIMP-2* e melhorar a invasão de endométrio ectópico promovendo sua implantação ^{46,47}.

Em nosso estudo não houve diferença significativamente estatística para os grupos controle e tratados em relação à marcação de *MMP-9* e *TIMP-2*.

Quanto aos resultados de biologia molecular demonstrados neste trabalho, ao analisar a expressão dos genes: *VEGFA*, *TNF*, *PCNA*, *SPARC*, *CALD1* no grupo controle e nos grupos de lesões tratadas com baixa e alta dose de propranolol, bem como no endométrio tópico desses animais, observamos que não houve diferença significativa da expressão gênica.

O Fator de crescimento endotelial vascular (*VEGF*) colabora com a patogênese e progressão da endometriose pela indução da proliferação celular endotelial, migração, diferenciação, organização em túbulos e formação de capilares. Ademais, alguns trabalhos observaram altos níveis de *VEGF* no fluido peritoneal, soro, expressão de RNAm e proteínas em pacientes com endometriose ^{48,49}. Esses dados demonstram a importância do *VEGF* na patogênese da endometriose.

Avaliando o resultado obtido em nosso estudo, como não houve diferença significativamente estatística entre os grupos estudados, provavelmente o propranolol nas doses administradas não foi capaz de inibir a angiogênese e diminuir a expressão de *VEGF*.

O fator de necrose tumoral (*TNF*) é uma citocina secretada principalmente por macrófagos. Em resposta ao estímulo inflamatório, o *TNFα* é secretado e pode induzir a morte celular por apoptose ou necrose de algumas linhas de células tumorais. O *TNF* também pode induzir a proliferação e diferenciação celulares em muitos tipos de células ⁵⁰.

Em nosso estudo não houve diferença significativa entre os grupos estudados, sugerindo que não houve diminuição de expressão de *TNF* nas ratas tratadas com propranolol.

Osteonectina (*ON*), também conhecida como proteína secretada ácida e rica em cisteína (*SPARC*) ou proteína de membrana basal-40 (*BM-40*) ⁵¹. Ela apresenta várias funções biológicas e está relacionada com a angiogênese, proliferação e migração de células tumorais ⁵².

Estudos recentes demonstram que a desregulação dos genes *SPARC*, *MYC*, *MMP3*, *IGFBPI* e *PAEP* pode ser responsável pela perda da homeostase celular em lesões endometrióticas, consequentemente pode auxiliar a implantação e sobrevivência do tecido endometrial ectópico ⁵³.

Em nossa amostra, não detectamos diferença significativa nos níveis de expressão de *SPARC* entre os grupos tratados com alta e baixa dose e o grupo controle de lesões induzidas.

Caldesmona (CALD1) é uma proteína de ligação a calmodulina. A CALD1 inibe tonicamente a atividade ATPase da miosina no músculo liso ⁵⁴. Alguns estudos demonstram que o gene CALD1 é superexpresso em lesões endometrióticas de pacientes com endometriose na fase proliferativa do ciclo menstrual, e em endometrioma ovariano por CGH-array ^{55,56}. CALD1 auxilia a predição de desregulação endometrial em pacientes com endometriose ⁵³.

Não foram encontradas diferenças significativas de expressão de CALD1 entre os grupos controle e tratados com propranolol.

Uzunlar e colaboradores ⁵⁷ sugerem que o propranolol possa suprimir o desenvolvimento da lesão endometrióticas devido a sua atividade antiangiogênica pela inibição de VEGF, MMP-2 e MMP-9. O presente estudo não observou essa inibição, entretanto observou uma redução da expressão de MTs, sugerindo que o propranolol possa apresentar uma provável resposta terapêutica.

Também observamos uma redução na expressão de Pcn, não corroborada pela redução de marcação imunohistoquímica da proteína PCNA nos grupos estudados. Uma análise *in silico* revelou uma discordância entre os níveis de expressão do transcriptoma e proteínas associada com o processo da endometriose (Wren *et al.*, 2007). Isto sugere que a expressão gênica não é somente regulada em nível de transcriptoma, mas que mecanismos regulatórios pós-transcricionais possam atuar na endometriose.

5. Conclusões

No presente estudo de lesões endometrióticas experimentalmente induzidas em ratas e tratadas com propranolol observou-se redução significativa de marcação de Metalotioneína após tratamento, dose independente, tanto em endométrio tópico como em ectópico, sugerindo que o tratamento com propranolol foi eficaz.

Tais achados nos permitem crer em futuras abordagens no tratamento clínico da endometriose que podem incluir inibidores de neoangiogênese.

6. Referências Bibliográficas

1. Farquhar C. Endometriosis. *Bmj* 2007;334:249-53.
2. Dabrosin C, Gyorffy S, Margetts P, Ross C, Gaudie J. Therapeutic effect of angiostatin gene transfer in a murine model of endometriosis. *The American journal of pathology* 2002;161:909-18.
3. Fujishita A, Hasuo A, Khan KN, Masuzaki H, Nakashima H, Ishimaru T. Immunohistochemical study of angiogenic factors in endometrium and endometriosis. *Gynecologic and obstetric investigation* 1999;48 Suppl 1:36-44.
4. Gescher DM, Haensel A, Meyhofer-Malik A, Malik E. [The importance of angiogenesis for the pathogenesis of endometriosis]. *Zentralblatt für Gynäkologie* 2003;125:243-6.
5. Taylor RN, Lebovic DI, Mueller MD. Angiogenic factors in endometriosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2002;955:89-100; discussion 18, 396-406.

6. Hull ML, Charnock-Jones DS, Chan CL, et al. Antiangiogenic agents are effective inhibitors of endometriosis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2003;88:2889-99.
7. Nap AW, Griffioen AW, Dunselman GA, et al. Antiangiogenesis therapy for endometriosis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2004;89:1089-95.
8. Olive DL, Lindheim SR, Pritts EA. New medical treatments for endometriosis. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology* 2004;18:319-28.
9. Glasner A, Avraham R, Rosenne E, et al. Improving survival rates in two models of spontaneous postoperative metastasis in mice by combined administration of a beta-adrenergic antagonist and a cyclooxygenase-2 inhibitor. *Journal of immunology* 2010;184:2449-57.
10. Xu T, Xiao X, Zheng S, et al. Antiangiogenic effect of propranolol on the growth of the neuroblastoma xenografts in nude mice. *Journal of pediatric surgery* 2013;48:2460-5.
11. Ji Y, Li K, Xiao X, Zheng S, Xu T, Chen S. Effects of propranolol on the proliferation and apoptosis of hemangioma-derived endothelial cells. *Journal of pediatric surgery* 2012;47:2216-23.
12. Storch CH, Hoeger PH. Propranolol for infantile haemangiomas: insights into the molecular mechanisms of action. *The British journal of dermatology* 2010;163:269-74.
13. Stiles JM, Amaya C, Rains S, et al. Targeting of beta adrenergic receptors results in therapeutic efficacy against models of hemangioendothelioma and angiosarcoma. *PloS one* 2013;8:e60021.
14. Pasquier E, Street J, Pouchy C, et al. beta-blockers increase response to chemotherapy via direct antitumour and anti-angiogenic mechanisms in neuroblastoma. *British journal of cancer* 2013;108:2485-94.
15. Pasquier E, Ciccolini J, Carre M, et al. Propranolol potentiates the anti-angiogenic effects and anti-tumor efficacy of chemotherapy agents: implication in breast cancer treatment. *Oncotarget* 2011;2:797-809.
16. Rosa-e-Silva JC, Garcia SB, de Sa Rosa-e-Silva AC, et al. Increased cell proliferation in experimentally induced endometriosis in rabbits. *Fertility and sterility* 2010;93:1637-42.
17. Sharpe-Timms KL. Using rats as a research model for the study of endometriosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2002;955:318-27; discussion 40-2, 96-406.
18. Vernon MW, Wilson EA. Studies on the surgical induction of endometriosis in the rat. *Fertility and sterility* 1985;44:684-94.
19. Jones RC. The effect of a luteinizing hormone releasing hormone (LRH) agonist (Wy-40,972), levonorgestrel, danazol and ovariectomy on experimental endometriosis in the rat. *Acta endocrinologica* 1984;106:282-8.
20. Schor E, Baracat EC, Simoes MJ, de Freitas V, Giannotti Filho O, de Lima GR. Effects of conjugated estrogens and progestogen in surgically induced endometriosis in oophorectomized rats. *Clinical and experimental obstetrics & gynecology* 1999;26:158-61.
21. Rosa e Silva JC, R e S. A., Coltro, P.S., Garcia, S.B., Cândido dos Reis, F. J., Nogueira, A. A. Modelo Experimental para Endometriose em Coelhas com Seguimento Evolutivo das Lesões. *RBGO* 2004;26:715-19.
22. Rodriguez-Romaguera J, Sotres-Bayon F, Mueller D, Quirk GJ. Systemic propranolol acts centrally to reduce conditioned fear in rats without impairing extinction. *Biological psychiatry* 2009;65:887-92.
23. Weigel MT, Kramer J, Schem C, et al. Differential expression of MMP-2, MMP-9 and PCNA in endometriosis and endometrial carcinoma. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 2012;160:74-8.

24. Arosh JA, Lee J, Balasubramanian D, et al. Molecular and preclinical basis to inhibit PGE2 receptors EP2 and EP4 as a novel nonsteroidal therapy for endometriosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2015;112:9716-21.
25. Ozcan Cenksoy P, Oktem M, Erdem O, et al. A potential novel treatment strategy: inhibition of angiogenesis and inflammation by resveratrol for regression of endometriosis in an experimental rat model. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology* 2015;31:219-24.
26. Hsiao KY, Chang N, Lin SC, Li YH, Wu MH. Inhibition of dual specificity phosphatase-2 by hypoxia promotes interleukin-8-mediated angiogenesis in endometriosis. *Human reproduction* 2014;29:2747-55.
27. Pittatore G, Moggio A, Benedetto C, Bussolati B, Revelli A. Endometrial adult/progenitor stem cells: pathogenetic theory and new antiangiogenic approach for endometriosis therapy. *Reproductive sciences* 2014;21:296-304.
28. Koch GG, Landis JR, Freeman JL, Freeman DH, Jr., Lehnen RC. A general methodology for the analysis of experiments with repeated measurement of categorical data. *Biometrics* 1977;33:133-58.
29. Theocharis SE, Margeli AP, Klijanienko JT, Kouraklis GP. Metallothionein expression in human neoplasia. *Histopathology* 2004;45:103-18.
30. Cherian MG, Jayasurya A, Bay BH. Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. *Mutat Res* 2003;533:201-9.
31. Levadoux-Martin M, Hesketh JE, Beattie JH, Wallace HM. Influence of metallothionein-1 localization on its function. *Biochem J* 2001;355:473-9.
32. Tsangaris GT, Tzortzatou-Stathopoulou F. Metallothionein expression prevents apoptosis: a study with antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides in a human T cell line. *Anticancer Res* 1998;18:2423-33.
33. Tapiero H, Tew KD. Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. *Biomed Pharmacother* 2003;57:399-411.
34. Wicherek L, Popiela TJ, Galazka K, et al. Metallothionein and RCAS1 expression in comparison to immunological cells activity in endometriosis, endometrial adenocarcinoma and endometrium according to menstrual cycle changes. *Gynecol Oncol* 2005;99:622-30.
35. Yu CC, Hall PA, Fletcher CD, et al. Haemangiopericytomas: the prognostic value of immunohistochemical staining with a monoclonal antibody to proliferating cell nuclear antigen (PCNA). *Histopathology* 1991;19:29-33.
36. Theile A, Muller KM. [Proliferation kinetics of bronchioloalveolar tumorlets]. *Pathologe* 1996;17:163-70.
37. Kulak J, Jr., Fischer C, Komm B, Taylor HS. Treatment with bazedoxifene, a selective estrogen receptor modulator, causes regression of endometriosis in a mouse model. *Endocrinology* 2011;152:3226-32.
38. Gomes MK, Rosa-e-Silva JC, Garcia SB, et al. Effects of the levonorgestrel-releasing intrauterine system on cell proliferation, Fas expression and steroid receptors in endometriosis lesions and normal endometrium. *Hum Reprod* 2009;24:2736-45.
39. Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 1991;5:2145-54.
40. Raza SL, Cornelius LA. Matrix metalloproteinases: pro- and anti-angiogenic activities. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2000;5:47-54.

41. Di Nezza LA, Misajon A, Zhang J, et al. Presence of active gelatinases in endometrial carcinoma and correlation of matrix metalloproteinase expression with increasing tumor grade and invasion. *Cancer* 2002;94:1466-75.
42. Osteen KG, Yeaman GR, Bruner-Tran KL. Matrix metalloproteinases and endometriosis. *Semin Reprod Med* 2003;21:155-64.
43. Uzan C, Cortez A, Dufournet C, Fauvet R, Siffroi JP, Darai E. Eutopic endometrium and peritoneal, ovarian and bowel endometriotic tissues express a different profile of matrix metalloproteinases-2, -3 and -11, and of tissue inhibitor metalloproteinases-1 and -2. *Virchows Arch* 2004;445:603-9.
44. Kim YS, Choi DH, Block ML, et al. A pivotal role of matrix metalloproteinase-3 activity in dopaminergic neuronal degeneration via microglial activation. *FASEB J* 2007;21:179-87.
45. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:221-33.
46. Hulboy DL, Rudolph LA, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. *Mol Hum Reprod* 1997;3:27-45.
47. Londero AP, Calcagno A, Grassi T, et al. Survivin, MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2: their impact on survival, implantation, and proliferation of endometriotic tissues. *Virchows Arch* 2012;461:589-99.
48. McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, Smith SK. Vascular endothelial growth factor (VEGF) concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Hum Reprod* 1996;11:220-3.
49. Pupo-Nogueira A, de Oliveira RM, Petta CA, Podgaec S, Dias JA, Jr., Abrao MS. Vascular endothelial growth factor concentrations in the serum and peritoneal fluid of women with endometriosis. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics* 2007;99:33-7.
50. Ihlenfeld MFK, Dias, R. Determination of cytokines in the laboratory diagnosis of minimal and mild peritoneal endometriosis. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2008;30.
51. Swaroop A, Hogan BL, Francke U. Molecular analysis of the cDNA for human SPARC/osteonectin/BM-40: sequence, expression, and localization of the gene to chromosome 5q31-q33. *Genomics* 1988;2:37-47.
52. Maillard C, Malaval L, Delmas PD. Immunological screening of SPARC/Osteonectin in nonmineralized tissues. *Bone* 1992;13:257-64.
53. Meola J, Dentillo DB, Rosa e Silva JC, et al. Glycodelin expression in the endometrium of healthy women and in the eutopic and ectopic endometrium of women with endometriosis. *Fertil Steril* 2009;91:1676-80.
54. Hayashi K, Yano H, Hashida T, et al. Genomic structure of the human caldesmon gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:12122-6.
55. Meola J, Rosa e Silva JC, Dentillo DB, et al. Differentially expressed genes in eutopic and ectopic endometrium of women with endometriosis. *Fertil Steril* 2010;93:1750-73.
56. Zafra M, Tarlatzis BC, Streichert T, et al. Genome-wide microarray gene expression, array-CGH analysis, and telomerase activity in advanced ovarian endometriosis: a high degree of differentiation rather than malignant potential. *Int J Mol Med* 2008;21:335-44.
57. Uzunlar O, Ozyer S, Engin-Ustun Y, et al. Effects of repeated propranolol administration in a rat model of surgically induced endometriosis. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 2014;182:167-71.