

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

**Fertilidade, resultados gestacionais e perinatais relacionados a
endometriose experimental em modelo murino**

Ribeirão Preto

2023

NATHALIA FRANZONI SMARGIASSI

Fertilidade, resultados gestacionais e perinatais relacionados a endometriose experimental em modelo murino

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

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

Área de Concentração: Ginecologia e Obstetrícia – Opção: Biologia da Reprodução

Orientadora: Prof^ª. Dra. Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro

Ribeirão Preto

2023

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

Smargiassi, Nathalia Franzoni

Fertilidade, resultados gestacionais e perinatais relacionados a endometriose experimental em modelo murino / Nathalia Franzoni Smargiassi; orientadora, Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2023

51p. : il. ; 30 cm

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

1. Endometriose; 2. Infertilidade; 3. Modelo murino; 4. Morbidade gestacional; 5. Prole.

Nome: SMARGIASSI, Nathalia Franzoni

Título: Fertilidade, resultados gestacionais e perinatais relacionados a endometriose experimental em modelo murino

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

Aprovada em: 22 de novembro de 2023.

Banca Examinadora

Prof^a. Dra.: Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovada

Prof^a. Dra.: Marcia Mendonça Carneiro

Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais

Julgamento: Aprovada

Prof. Dr.: Eduardo Schor

Instituição: Universidade Federal de São Paulo

Julgamento: Aprovada

AGRADECIMENTOS

À Deus.

À minha orientadora Prof^a. Dra. Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro, por ser um exemplo de profissional a ser seguido e por toda a paciência e dedicação ao me ensinar tanto. Serei eternamente grata pelos conselhos, acolhimento e amizade.

À Prof^a. Dra. Juliana Meola, pelos conselhos, oportunidades de aprendizado e, principalmente, pelo acolhimento e carinho.

Ao Prof. Dr. Julio Cesar Rosa e Silva, por todos os ensinamentos, conselhos e dedicação ao me ensinar.

À Prof. Dra. Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva, pelos ensinamentos e apoio.

À Caroline Mantovani, pela amizade, parceria, por todo o apoio e gentileza ao me treinar e pelo auxílio nos experimentos.

À técnica Cristiana Padovan, pelo auxílio nos experimentos, ensinamentos e conselhos, sempre com boas risadas.

À técnica Maria Aparecida Vasconcelos pelo carinho, acolhimento, pelos ensinamentos e apoio nos experimentos.

Aos técnicos José Carlos Vanni e Danniely Nair da Silva Barros pelo auxílio nos experimentos.

À técnica Paula Payão, pela amizade, pelo apoio durante todos os momentos e auxílio nos experimentos.

À estatística Suleimy Mazin, pela ajuda e paciência.

À secretária Suelen Soares, pela ajuda e por todo o apoio.

À comissão organizadora do 4º Curso de Inverno em Saúde da Mulher, pelo aprendizado e amizade.

À minha querida Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP – Jaboticabal) e todas as amigadas que me proporcionou, pela minha formação profissional e pessoal.

Aos meus pais, Maria Cristina e Edemir por toda o amor, dedicação, paciência, suporte e, principalmente, por sempre me apoiarem.

À minha irmã Mariana e meus primos Lucas e Thiago, por serem meu porto seguro.

Ao meu melhor amigo e namorado Iago, pelo amor, compreensão e por estar sempre ao meu lado.

À Mell, Suri, Sophia, Clara e Cecília, minhas companheiras leais, pela contribuição direta em me tornar uma profissional melhor a cada dia e pela companhia e amor incondicionais.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) por meio do Programa de Excelência Acadêmica (PROEX) pelo apoio financeiro.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro através do auxílio a projetos de pesquisa (Processo Nº 2021/13512-6).

Ao Programa de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP) pelo suporte financeiro e estrutural.

Aos membros da banca avaliadora pela disponibilidade e pelas contribuições.

De modo muito especial, aos animais que contribuíram para que esse estudo fosse realizado.

“Às vezes é época de flores; em outra estação está tudo seco e parece que nunca mais veremos uma folha! São apenas nossos sentidos nos pregando uma peça. Sabemos, na alma, que a vida está lá, debaixo do solo em forma de sementes, ganhando força para brotar com os raios de sol da primavera e tudo o que temos que fazer é aguardar o tempo certo. Não é possível apressar; sequer precisamos ter esperança, porque vai acontecer!”
(Mariana Rios, 2020)

“Eu quase que nada não sei.
Mas desconfio de muita coisa.”
(Guimarães Rosa, 1956)

RESUMO

SMARGIASSI, N. F. **Fertilidade, resultados gestacionais e perinatais relacionados a endometriose experimental em modelo murino**. 2023. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

A endometriose está relacionada à infertilidade e ao aumento do risco de efeitos adversos gestacionais e neonatais, cujos mecanismos precisam ser melhor esclarecidos para fundamentar novas abordagens terapêuticas. Recentemente foi identificado um modelo murino de infertilidade relacionada à endometriose, cuja infertilidade foi avaliada por um mês após o procedimento cirúrgico de indução da endometriose experimental. Para saber se este modelo poderá ser usado em estudos de intervenção terapêutica, é importante testá-lo e entendê-lo, inclusive no sentido de investigar seus potenciais impactos na gestação e prole. Desta forma, objetivamos investigar se o transplante de 1 e 2 fragmentos de tecido endometrial em cada lado da parede peritoneal de camundongos fêmeas promove endometriose experimental e redução da fertilidade natural por 4 semanas após a realização do procedimento cirúrgico. Além disso, comparamos a duração da prenhez, o tamanho da ninhada, os pesos dos filhotes ao nascer e ao desmame, assim com as taxas de retorno ao acasalamento, perdas gestacionais, natimortos e canibalismo entre animais dos grupos experimentais. Para isso, foi desenvolvido um estudo experimental em que as fêmeas foram divididas em 4 grupos: grupo controle 1 (cirurgia simulada), grupo endometriose 1 (transplante peritoneal de 2 fragmentos de tecido endometrial de 5 mm cada), grupo controle 2 (cirurgia simulada), grupo endometriose 2 (transplante peritoneal de 4 fragmentos de tecido endometrial de 5 mm cada), e, criadas com machos férteis após 4 semanas do procedimento cirúrgico. As fêmeas prenhas foram eutanasiadas após o desmame da ninhada. Após a eutanásia foi coletado tecido dos implantes dos grupos experimentais para análise histológica. Não observamos diferença estatisticamente significativa nas taxas de gestação, tempo de gestação, número total de filhotes ao nascimento, número de filhotes vivos ao nascimento, retorno ao acasalamento, perda gestacional, natimortos e canibalismo ao compararmos os grupos C, E1 e E2. Observamos que o peso da ninhada ao nascer foi menor em E2 quando

comparado aos grupos C ($p= 0,0467$) e E1 ($0,0004$) e maior em E1 comparado ao C ($p=0,0183$). O número de filhotes vivos ao desmame foi menor em E2 comparado aos grupos C ($p= 0,0398$) e E1 ($0,0004$) e maior em E1 comparado ao C ($p=0,0197$). O peso da ninhada ao desmame foi menor em E2 comparado ao E1 ($0,0009$), mas não houve diferença dessa variável entre E2 e C. O peso da ninhada ao desmame foi maior em E1 comparado ao grupo C ($p=0,0076$). A endometriose experimental com sutura de fragmentos de tecido endometrial no peritônio de camundongos não comprometeu a fertilidade das fêmeas após 4 semanas do procedimento de indução de endometriose ao compararmos os grupos, sugerindo que esse não é um modelo translacional adequado para o estudo da infertilidade relacionada a endometriose. Fêmeas transplantadas com 2 fragmentos de endométrio ectópico tiveram ninhadas com maior peso ao nascer e ao desmame e maior número de filhotes vivos ao desmame. Fêmeas transplantadas com 4 fragmentos de endométrio ectópico tiveram ninhadas com menor peso ao nascer e menor número de filhotes vivos ao desmame. Esses achados indicam que ninhadas provenientes de fêmeas com maior número de fragmentos uterinos transplantados podem ter desenvolvimento prejudicado durante a gestação, apresentando menor peso ao nascer e maior mortalidade perinatal, mas estudos com casuísticas adequadas para esses desfechos devem ser feitos para melhor avaliação se esse é um modelo adequado para investigar o impacto da endometriose experimental em resultados gestacionais e perinatais.

Palavras-chave

Endometriose, infertilidade, modelo murino, morbidade gestacional, prole.

ABSTRACT

SMARGIASSI, N. F. **Fertility, pregnancy outcomes and perinatal results related to experimental endometriosis in a murine model.** 2023. Dissertation (Master's Degree in Sciences) – Graduated Program in Gynecology and Obstetrics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Endometriosis is related to infertility and an increased risk of adverse pregnancy and neonatal outcomes, the mechanisms of this disease need to be better understood to support new therapeutic approaches. Recently, a murine model of endometriosis related to infertility was developed, and its infertility was assessed for one month following the surgical induction of experimental endometriosis. To determine if this model can be used in therapeutic intervention studies, it is important to test and understand it. Our objective was to investigate whether the transplantation of 1 and 2 fragments of endometrial tissue on each side of the peritoneal wall of female mice promotes experimental endometriosis and reduces natural fertility (pregnancy rate) 4 weeks after the surgical procedure. Additionally, we compared pregnancy duration, litter size, pup weights, mating return rates, pregnancy losses, stillbirths, and cannibalism rates among animals in the experimental groups. For this purpose, an experimental study was conducted in which females were divided into 4 groups: control group 1 (sham surgery), endometriosis group 1 (peritoneal transplantation of 2 fragments of endometrial tissue, each 5 mm in size), control group 2 (sham surgery), and endometriosis group 2 (peritoneal transplantation of 4 fragments of endometrial tissue, each 5 mm in size). These females were then paired with fertile males 4 weeks after the surgical procedure. Pregnant females were euthanized after weaning the offspring. After euthanasia, implant tissue of the experimental groups was collected for histological analysis. We did not observe a statistically significant difference in pregnancy rates, pregnancy duration, total number of pups at birth, number of live pups at birth, return to mating, gestational loss, stillbirths, and cannibalism when comparing groups C, E1, and E2. We observed that the litter weight at birth was lower in E2 when compared to groups C ($p=0.0467$) and E1 ($p=0.0004$), and higher in E1 compared to C ($p=0.0183$). The number of live pups at weaning was lower in E2 compared to groups C

($p=0.0398$) and E1 ($p=0.0004$), and higher in E1 compared to C ($p=0.0197$). The litter weight at weaning was lower in E2 compared to E1 ($p=0.0009$), but there was no difference in this variable between E2 and C. The litter weight at weaning was higher in E1 compared to the C group ($p=0.0076$). Experimental endometriosis with the suture of fragments of endometrial tissue in the peritoneum of mice did not compromise the fertility of females after 4 weeks of the endometriosis induction procedure when comparing the groups, suggesting that this is not an appropriate translational model to study endometriosis related to infertility. Females transplanted with 2 fragments of ectopic endometrium had litters with higher birth and weaning weights and a higher number of live pups at weaning. Females transplanted with 4 fragments of ectopic endometrium had litters with lower birth weights and a lower number of live pups at weaning. These findings indicate that litters from females with a higher number of transplanted uterine fragments may have impaired development during pregnancy, with lower birth weights and higher perinatal mortality. However, studies with adequate sample sizes for these outcomes should be conducted for a better evaluation of whether this is an appropriate model to investigate the impact of experimental endometriosis on gestational and perinatal outcomes.

Keywords:

Endometriosis, infertility, murine model, gestational morbidity, offspring.

Lista de Figuras

Figura 1.	25
Figura 2.	26
Figura 3.	26
Figura 4.	27
Figura 5.	29
Figura 6.	33
Figura 7.	33
Figura 8.	34
Figura 9.	34

Lista de Tabelas

Tabela 1.	21
Tabela 2.	35
Tabela 3.	36
Tabela 4.	36
Tabela 5.	36

Lista de siglas

C	Controle
C1	Controle 1
C2	Controle 2
E1	Endometriose 1
E2	Endometriose 2
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
H.E.	Hematoxilina e eosina
kg	quilograma
mg	miligrama
PIG	pequenos para idade gestacional
USP	Universidade de São Paulo

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Endometriose e infertilidade	15
1.2 Endometriose e resultados gestacionais	16
1.3 Modelo experimental murino	19
1.3.1 Acasalamento.....	21
1.3.2 Ninhadas.....	21
1.4 Endometriose e modelo experimental murino	22
2. OBJETIVOS.....	23
2.1 Objetivo primário	23
2.2 Objetivo secundário	23
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1 Considerações éticas	24
3.2 Animais	24
3.3 Delineamento experimental	24
3.4 Procedimento cirúrgico	25
3.5 Acasalamento dos animais	27
3.6 Variáveis analisadas	28
3.7 Eutanásias	28
3.8 Análise histológica do endométrio ectópico	29
3.9 Cálculo amostral	30
3.10 Análises estatísticas	30
4. RESULTADOS.....	31
4.1 Fluxograma do grupo Controle 1	31
4.2 Fluxograma do grupo Controle 2	31
4.3 Fluxograma do grupo Endometriose 1	32
4.4 Fluxograma do grupo Endometriose 2	32
4.5 Histologia	33
4.6 Variáveis analisadas	34
5. DISCUSSÃO.....	37
6. CONCLUSÃO.....	41
REFERÊNCIAS.....	43
ANEXO A.....	51

1. INTRODUÇÃO

1.1 Endometriose e infertilidade

A endometriose é uma doença ginecológica estrogênio-dependente comum, debilitante e complexa. É caracterizada pelo implante e crescimento de tecido endometrial, glândulas e/ou estroma, fora da cavidade uterina (Giudice e Kao, 2004; Sonavane et al., 2011). Implantes ectópicos podem ser encontrados em ovários, tubas uterinas, ligamentos útero-sacros, parede abdominal, períneo, trato urinário e gastrointestinal, tórax e mucosa nasal (Simoglou et al., 2012).

Considerada um problema de saúde pública, estima-se que entre 2% e 10% das mulheres na população tenham endometriose e que 30% a 50% das mulheres com problemas de fertilidade tenham endometriose (ESHRE, 2022).

Os sintomas da endometriose são comuns a outras desordens ginecológicas e não ginecológicas, não apresentando sintomas patognomônicos, o que pode dificultar o diagnóstico e impactar negativamente na qualidade de vida das pacientes (Taylor et al., 2021). Sintomas de desordens ginecológicas, incluindo dismenorreia primária, cistos ovarianos, doença inflamatória pélvica e aderências pélvicas, se sobrepõem à endometriose e distúrbios funcionais do intestino e da bexiga, fibromialgia e distúrbios musculoesqueléticos também podem apresentar sintomas semelhantes aos da endometriose (Brawn et al., 2014; Nezhat et al., 2016).

Embora a etiopatogenia da infertilidade relacionada a endometriose ainda não esteja completamente esclarecida, existem diversas teorias sobre as causas da doença. Alguns estudos evidenciam que a endometriose, mesmo nos estágios iniciais (estágios I e II), em que não existem alterações anatômicas significativas na cavidade pélvica, pode favorecer a subfertilidade. Acredita-se que os microambientes peritoneal, folicular e endometrial apresentem alterações pró inflamatórias e estresse oxidativo, impactando negativamente na foliculogênese, ovulação, qualidade do oócito, receptividade endometrial e na função espermática (Andrade et al., 2010; Agarwal et al., 2012; Da Broi et al., 2014; Da Broi et al., 2016; Da Broi e Navarro, 2016; Gupta et al., 2008; Jianini et al., 2017; Sanchez et al., 2017; Malvezzi et al., 2018; Da Broi et al., 2018; Da Broi et al., 2019; Ferreira et al., 2019).

Alterações peritoneais parecem promover um microambiente prejudicial e pró-oxidativo, podendo haver comprometimento do complexo cumulus-oócito e do microambiente folicular, impactando negativamente na foliculogênese e, possivelmente, afetando também a competência oocitária de mulheres com endometriose. As mudanças peritoneais também podem danificar os espermatozoides e dificultar a interação dos gametas. Evidências sugerem que a piora da qualidade gamética está associada ao estresse oxidativo sistêmico e folicular (Da Broi et al., 2019), uma vez que o uso de antioxidantes foi passível de reverter os efeitos deletérios da doença sobre marcadores de qualidade oocitária (Giorgi et al., 2016).

Diversas teorias abordam a etiopatogênese da endometriose. Atualmente, a teoria que parece melhor aceita é a proposta por Sampson (1927), conhecida como teoria da menstruação retrógrada, que propõe que parte do tecido endometrial flua para trás durante a menstruação, chegando até as tubas uterinas. Dessa maneira, o tecido pode implantar e crescer fora do útero, possivelmente sendo também disseminado através do sistema linfático ou sanguíneo através de diferentes órgãos e formando, assim, lesões de endometriose.

Miller et al. (2017) sugere que o sistema imunológico de mulheres com infertilidade relacionada a endometriose pode estar potencialmente disfuncional, podendo implicar em danos a foliculogênese, qualidade de oócitos e embriões e receptividade endometrial.

É possível notar através de estudos que existe uma severa complexidade na etiopatogenia da doença, que provavelmente envolve interações entre diversos fatores e, portanto, pesquisas relacionadas a infertilidade de mulheres com endometriose se fazem necessárias para aprofundar o conhecimento acerca da relação entre essas condições.

1.2 Endometriose e resultados gestacionais

Além de sua forte relação com a infertilidade, diferentes mecanismos vêm sendo associados aos impactos negativos da endometriose na gravidez. Eventos hormonais agudos ou crônicos em resposta ao estresse, eventos infecciosos ou fatores como estresse oxidativo podem causar um desequilíbrio

de citocinas, que ocasiona produção de citocinas inflamatórias relacionadas ao aumento da contratilidade uterina, amadurecimento do colo do útero e ruptura de membranas devido ao enfraquecimento das mesmas, sinais fortemente relacionados ao parto, mas também relacionados ao aborto espontâneo e ao parto prematuro (Challis et al., 2009).

A inflamação está envolvida tanto nos principais processos fisiológicos (menstruação, ovulação, implantação do embrião e gravidez) quanto em condições patogênicas no sistema reprodutivo feminino. É um processo usado como resposta à infecção, irritação ou lesão e é reconhecida como um tipo de resposta imune não específica (aguda ou crônica). A condição de inflamação exacerbada pode resultar em distúrbios entre o sistema imunológico e endócrino, predispondo a alterações na gestação (Weiss et al., 2009; Vannuccini et al., 2016; Vaisi-Raygani e Asgari, 2021). Diabetes mellitus gestacional, hipertensão gestacional, pré-eclâmpsia e parto prematuro são exemplos de resultados adversos gestacionais relacionados à inflamação bem estabelecidos (Wolf et al., 2004; Bodnar et al., 2005; Goldenberg et al., 2008).

Distúrbios reprodutivos como a endometriose e a infertilidade inexplicada compartilham vias inflamatórias, alterações hormonais, senescência decidual e anormalidades vasculares que podem comprometer o sucesso da gravidez (Vannuccini et al., 2016).

Além da inflamação local, peritoneal e sistêmica, mecanismos como má qualidade do oócito (prejudicando a implantação do embrião), contratilidade uterina inadequada e placentação deficiente parecem estar associados a resultados adversos na implantação, crescimento fetal e duração da gestação de mulheres com endometriose (Aguilar e Mitchell, 2010; Maggiori et al., 2016).

Maggiori et al. (2016) realizaram uma revisão sistemática de artigos que examinaram as relações entre endometriose e gravidez, trazendo evidências de uma associação da endometriose com aborto espontâneo, parto prematuro, placenta prévia e recém-nascidos pequenos para a idade gestacional. Além disso, parece não haver evidências de que a cirurgia profilática evitaria o potencial impacto negativo da endometriose no resultado da gravidez. Glavind et al. (2017) indicaram haver um maior risco de pré-eclâmpsia, parto prematuro (com risco mais elevado para partos muito prematuros) e necessidade de

cesariana em mulheres com endometriose quando comparadas com mulheres sem a doença.

Breintoft et al. (2021) realizaram uma revisão sistemática com metanálise que apoia a ideia de que a endometriose está associada a aumento no risco de resultados gestacionais adversos como hipertensão gestacional, pré-eclâmpsia, parto prematuro, placenta prévia, descolamento de placenta, necessidade de cesariana e natimortos. Além disso, também apresenta indícios de associação da doença com hemoperitônio espontâneo e perfuração intestinal espontânea na gravidez.

Resultados de estudos mais recentes como o de Gebremedhin et al. (2023) são semelhantes aos relatados previamente, apoiando a hipótese de que a endometriose está associada a resultados adversos na gravidez, como maior risco de pré-eclâmpsia, placenta prévia e parto prematuro. Velez et al. (2022) também constatou associação da doença com aumento no risco de distúrbios hipertensivos da gravidez, parto prematuro, cesariana, indução do trabalho de parto, placenta prévia, descolamento de placenta, hemorragia pós-parto e natimortos.

Assim como descrito por Maggiori et al. (2016), é importante destacar que, aparentemente, não há evidências que comprovem que o procedimento cirúrgico de retirada das lesões de endometriose traria bons resultados gestacionais. A eliminação dessas lesões e restauração anatômica local não necessariamente irá reverter possíveis alterações inflamatórias e biomoleculares relacionadas a infertilidade (Bafort et al., 2020).

Todavia, estudos observacionais não permitem estabelecermos relações causais, de modo que a utilização de modelos animais seria de grande valia para esclarecermos os mecanismos etiopatogênicos envolvidos no potencial impacto deletério da endometriose na gestação e prole, cujo conhecimento poderá fundamentar novas abordagens diagnósticas e terapêuticas.

Escassos estudos experimentais investigaram o potencial impacto da endometriose em resultados gestacionais e perinatais. Bilotas et al. (2015) estudaram um modelo experimental de endometriose e notaram uma queda na fertilidade das fêmeas de camundongos com lesões de endometriose, porém não encontraram diferenças significativas na taxa de reabsorção fetal, no

tamanho da ninhada e no peso dos filhotes ao compararem animais com e sem endometriose, após realizarem a eutanásia das fêmeas com 18 dias de prenhez.

Elsherbini et al. (2022) avaliaram o impacto da exposição crônica à endometriose em resultados perinatais através de investigações em fêmeas de camundongos jovens e idosas. As fêmeas foram submetidas a injeções intraperitoneais de úteros de doadoras, acasaladas em 1 (jovens) ou 43 dias (idosas) após o procedimento e eutanasiadas no 18º dia de gestação. O número de filhotes e reabsorções foi contado, o peso corporal dos filhotes foi medido, e a lesão de endometriose foi identificada e pesada. Fêmeas jovens não tiveram alterações significativas entre os grupos, mas as fêmeas acasaladas após maior tempo de exposição à endometriose experimental apresentaram número de reabsorções significativamente maior e o peso corporal dos filhotes foi significativamente menor na endometriose em comparação com o grupo de controle. O peso total da lesão de endometriose por mãe foi significativamente menor no grupo de Endometriose Idoso em comparação com o grupo de Endometriose Jovem, o que pode sugerir que a exposição crônica à endometriose antes da gestação pode ter impactos negativos nos resultados perinatais.

Já Hayashi et al. (2020) estabeleceram um modelo de endometriose ovariana em camundongos que revelou um número significativamente reduzido de filhotes implantados no grupo experimental. Tan et al. (2023) também desenvolveram um estudo de endometrioma em camundongos e notaram, além de uma redução da fertilidade, menores tamanho dos filhotes e peso das ninhadas de fêmeas com endometrioma experimental, além de maior taxa de aborto e natimortos nesse grupo quando comparado ao grupo controle (sham).

1.3 Modelo experimental murino

Grande parte dos estudos no campo de ciências da vida utiliza modelo murino experimental (*Mus musculus*) para investigar as implicações na saúde e no corpo humano. Seres humanos e esse modelo compartilham grande parte de suas características fisiológicas e patológicas. Existem semelhanças na diferenciação e morte celular e nos mecanismos moleculares pelos quais ambas as espécies executam processos celulares básicos. Além disso, roedores como

ratos e camundongos e humanos também compartilham órgãos e fisiologia sistêmica e apresentam consistência na patogênese de doenças (Demetrius, 2006; Rosenthal e Brown, 2007).

Por meio de análises comparativas dos genomas de ambas as espécies é possível relacionar características comuns e realizar manipulações genômicas no animal para gerar modelos de patologias humanas. Assim, esses animais podem ser submetidos a experimentos biomédicos que não são possíveis em pacientes humanos. Conforme ocorre a evolução nos estudos sobre doenças humanas que roedores normalmente não contraem, existe uma crescente de abordagens experimentais sendo aplicadas para “humanizar” a fisiologia do roedor e mimetizar as manifestações clínicas que ocorrem em humanos (Rosenthal e Brown, 2007).

Camundongos fornecem condições experimentais análogas e resultados comparáveis aos humanos. Quase 80% dos animais experimentais são roedores, incluindo ratos, camundongos, cobaias e outros e, comparado a outros mamíferos, esses animais são baratos, fáceis de manter e simples de criar em cativeiro. São pequenos, dóceis, rápidos e prolíficos reprodutores (Rosenthal e Brown, 2007; Sengupta, 2013).

Considerando a reprodução desses animais, algumas similaridades entre a placenta de camundongos e humanos são relatadas. Em ambas as espécies é do tipo discoidal, além disso há íntimo contato na barreira materno-fetal, caracterizando a placentação de humanos e roedores como hemocorial (Burton et al, 2006).

Existem diversos modelos experimentais murinos para estudar mecanismos patogênicos de doenças humanas que cursam com problemas de placentação, como a diabetes gestacional e a pré-eclâmpsia (Plows et al., 2017; Chau et al., 2020; Bakrania et al., 2022; Liu et al., 2022; Grupe e Scherneck, 2023). Modelos experimentais contribuem significativamente para a compreensão das bases moleculares, patogênese e eficácia terapêutica de medicamentos em doenças multifatoriais (Chatzigeorgiou et al., 2009).

1.3.1 Acasalamento

A evidência de acasalamento nos camundongos pode ser detectada pela presença de placa vaginal, que pode persistir por 16 a 24 horas após a cópula. A placa preenche a vagina desde a cérvix até a vulva. A hipófise anterior libera prolactina para capacitar o corpo lúteo a secretar progesterona por aproximadamente 13 dias. Se ocorrer fertilização, a placenta assume a produção de progesterona. Caso a fertilização não ocorra, há um período de pseudoprenhez, não ocorrendo estro e ovulação durante os 12 dias dessa fase. A fertilização geralmente ocorre na ampola do oviduto, 10 a 12 horas após a ovulação (Ko et al., 2017).

Alguns parâmetros importantes sobre fisiologia e reprodução de camundongos usados em pesquisa são listados na **Tabela 1**.

Tabela 1. Fisiologia geral e dados reprodutivos de camundongos *Mus musculus* (adaptada de Dutta e Sengupta, (2016) e Ko et al., (2017))

Dados fisiológicos comuns		Dados reprodutivos	
Tamanho da ninhada	2-10 animais	Maturidade sexual macho	6-8 semanas
Peso ao nascer	1-2 gramas	Maturidade sexual fêmea	6-8 semanas
Duração do período reprodutivo	10-15 meses	Duração do ciclo estral	4-5 dias
Peso macho adulto	20-30 gramas	Duração do estro	10-20 horas
Peso fêmea adulta	18-35 gramas	Tempo de ovulação	8,5 horas após início do estro
Longevidade	1-3 anos	Duração média gestação	20 dias
Volume sanguíneo total	1,5-2,5 mL		

1.3.2 Ninhadas

O camundongo nasce sem pelos, com o corpo avermelhado, de olhos fechados e pavilhões auriculares fechados, aderidos à cabeça. Por volta do terceiro dia de vida, a pele desses animais começa a clarear ou escurecer (dependendo da coloração da linhagem), os pelos começam a aparecer e as orelhas começam a se afastar da cabeça e se abrir. Aos dez dias de vida, abrem os olhos e, a partir dos quinze dias, já começam a se alimentar de ração que a mãe fornece. Após o parto, a fêmea amamenta a ninhada e apesar de, aos 18 dias de idade, já estarem aptos ao desmame, linhagens consanguíneas

geralmente realizam o desmame por volta de 4 semanas de idade (Andrade e Oliveira, 2002).

A perda de filhotes e ninhadas parece ser comum na espécie. Fatores estressantes relacionados a manejo, ambiente, socialização e fatores genéticos parecem afetar a sobrevivência desses animais (Reeb-Whitaker et al., 2001; Bond et al., 2002; Gaskill et al., 2009; Gaskill et al., 2013; Weber et al., 2013; Gaskill et al., 2015; Wasson, 2017; Leidinger et al., 2019). Alguns protocolos evitam inspecionar as gaiolas de reprodução nos primeiros dias de vida dos animais, na tentativa de evitar a mortalidade perinatal, mas inspecionar de 12 a 24 horas após o parto pode resultar em subestimação da mortalidade, visto que adultos canibalizam filhotes mortos, tornando-os incontáveis. Sendo assim, o adiamento na inspeção pode ser inadequado. Apesar de o infanticídio de filhotes ser raro em condições normais na criação de camundongos de laboratório, pode ocorrer (Brajon et al., 2021).

1.4 Endometriose e modelo experimental murino

A endometriose ocorre espontaneamente apenas em humanos e primatas que eliminam endométrio durante o ciclo menstrual (Jabbour et al., 2006; Emera et al., 2012), sendo possível realizar a indução da patologia cirurgicamente em alguns modelos animais. Neste contexto, um estudo recentemente publicado estudou um modelo murino de infertilidade relacionada à endometriose (Rosa e Silva et al., 2019). Neste estudo, foram avaliados quatro grupos experimentais, sendo um controle (cirurgia simulada) e três grupos de endometriose induzida pelo transplante peritoneal de 1, 2 ou 4 fragmentos endometriais de 5 mm de cada lado da parede peritoneal, provenientes de fêmeas doadoras. Um mês após o procedimento cirúrgico, as fêmeas foram inseridas no mesmo ambiente que machos de fertilidade comprovada, durante quatro semanas ou até apresentarem sinais de prenhez e as taxas de gestação, tempo até o parto e tamanho da ninhada foram comparados entre os 4 grupos. Os autores evidenciaram que as taxas de prenhez foram significativamente menores nas fêmeas transplantadas com 2 (67%) ou 4 segmentos (57%) de tecido endometrial (de cada lado da parede peritoneal da fêmea) em comparação com os grupos controle (100%) ou 1 segmento (100%). Todavia, os animais não

evidenciaram aderências peritoneais quando da eutanásia, sugerindo que a redução da fertilidade observada nestes animais não foi decorrente de fator anatômico, o que, talvez, permita extrapolar os achados para mulheres com infertilidade relacionada a endometriose, em que não se observam alterações significativas da morfologia pélvica.

Os achados de Rosa e Silva et al., (2019) são bastante interessantes, e, verificar se são reprodutíveis é importante para justificar o seu uso para avaliar os mecanismos etiopatogênicos da infertilidade relacionada a endometriose, assim como testar novas intervenções terapêuticas. Aliado a isto, considerando o potencial impacto negativo da endometriose na gestação e na prole, ainda não confirmado em estudos experimentais, investigar estes desfechos também é de grande relevância, justificando a realização do presente estudo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo primário

Este trabalho teve como objetivo primário investigar se o transplante de 1 e 2 fragmentos de tecido endometrial em cada lado da parede peritoneal de camundongos fêmeas promoveria endometriose experimental e redução da fertilidade natural, avaliada 4 semanas após a realização do procedimento cirúrgico, comparando animais controle (cirurgia simulada) e animais transplantados com 1 e 2 fragmentos de tecido endometrial em cada lado da parede peritoneal.

2.2 Objetivo secundário

O objetivo secundário foi investigar se o transplante de 1 e 2 fragmentos de tecido endometrial em cada lado da parede peritoneal de camundongos fêmeas promoveria comprometimento dos resultados gestacionais e perinatais da prole até o desmame, comparando a duração da prenhez, o tamanho da ninhada, o peso dos filhotes ao nascer e ao desmame, natimortos, canibalismo por parte da mãe, perdas gestacionais e retorno ao acasalamento entre animais com e sem endometriose experimental.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Considerações éticas

O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Pesquisa do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, FMRP/USP e pela Comissão de Ética no Uso de Animais, FMRP/USP, sob o protocolo 163/2020.

3.2 Animais

Foi realizado um estudo experimental, usando o camundongo C57BL/6J (linhagem Black) como modelo experimental. Foram utilizadas fêmeas com 8 a 12 semanas de vida e machos reprodutores com fertilidade comprovada por acasalamento e proles anteriores, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo. As fêmeas foram recebidas do Biotério Central após 6 semanas de vida e mantidas no Biotério de Cirurgia Experimental até completarem 8-12 semanas de vida. Neste período os animais foram mantidos em ciclo de claro-escuro de 12 horas com temperatura controlada e com água e ração Nuvilab *ad libitum*.

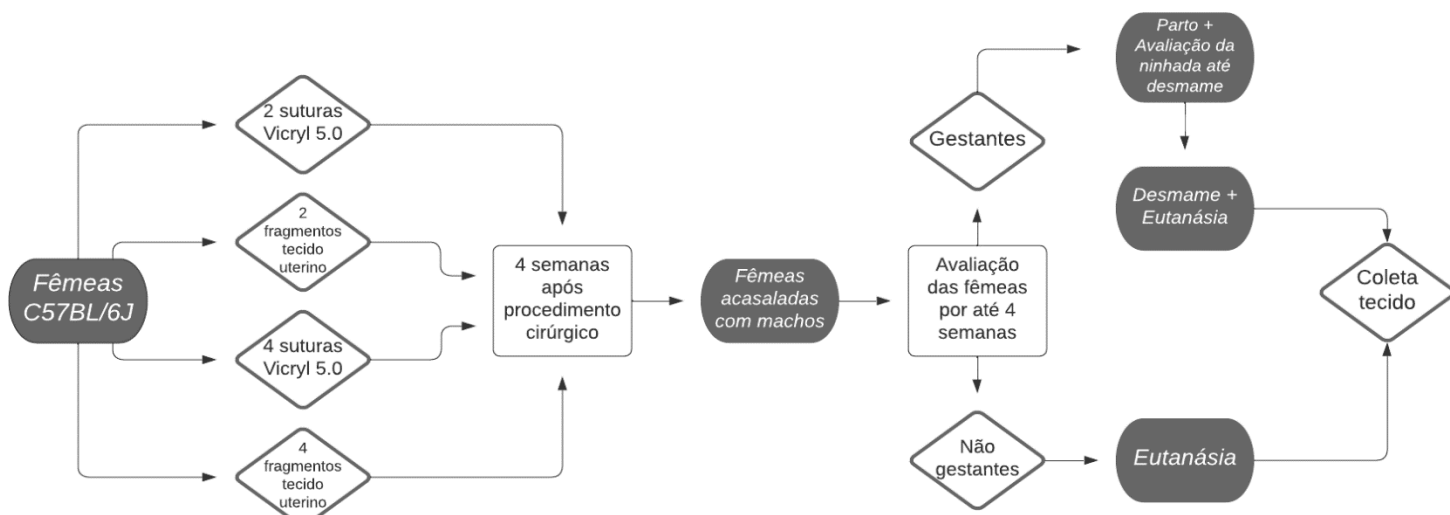
3.3 Delineamento experimental

O estudo conta com quatro grupos experimentais (**Figura 1**):

- Controle 1 (C1): cirurgia simulada com um ponto cirúrgico de cada lado da parede abdominal da fêmea (total de 19 animais);
- Endometriose 1 (E1): cirurgia com sutura de 1 fragmento de 5 mm de tecido uterino de doadora em cada lado da parede pélvica da receptora, totalizando 2 fragmentos (total de 20 animais);
- Controle 2 (C2): cirurgia simulada com dois pontos cirúrgicos de cada lado da parede abdominal da fêmea (total de 23 animais);
- Endometriose 2 (E2): cirurgia com sutura de 2 fragmentos de 5 mm de tecido uterino de doadora em cada lado da parede pélvica da receptora, totalizando 4 fragmentos (total de 22 animais).

Pelo fato de o procedimento cirúrgico em si causar uma resposta inflamatória, optamos por desenvolver grupos sham como controle. Os animais passaram pelo mesmo procedimento que as fêmeas dos grupos experimentais, assim eliminamos possíveis efeitos que sejam consequência da cirurgia.

Figura 1. Resumo do delineamento experimental.



Fonte: acervo pessoal.

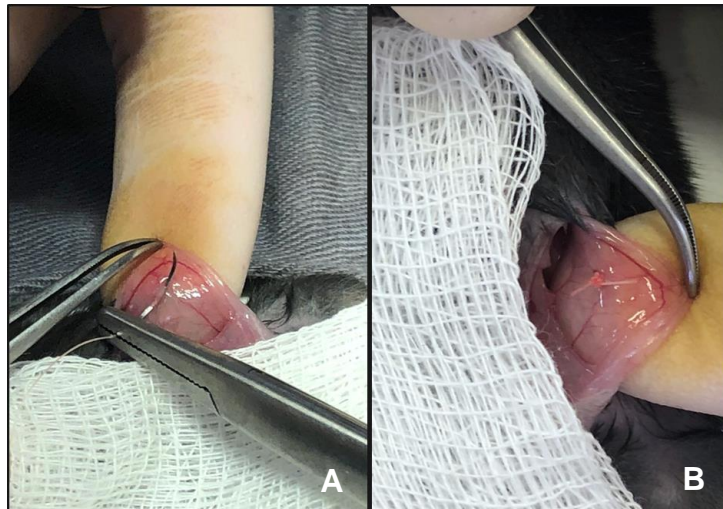
3.4 Procedimento cirúrgico

Os úteros de 32 doadoras foram removidos por histerectomia sob anestesia e imersos em tampão de solução salina fisiológica para implantação imediata na parede peritoneal de 42 receptoras. Antes da implantação, os cornos foram separados e o lúmen de cada um foi aberto longitudinalmente.

As fêmeas foram submetidas a laparotomia sob anestesia, com aplicação de xilazina 2% (5 mg/kg) e cetamina 10% (25 mg/kg) intramuscular, para indução de endometriose ou cirurgia simulada como controle. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados por cirurgião experiente. A cavidade pélvica foi aberta por incisão longitudinal mediana de aproximadamente 2 cm, a face peritoneal interna foi exposta e os fragmentos do útero suturados no local com Vicryl 5.0. A quantidade total de tecido uterino suturado foi dois fragmentos de tecido de 5 mm por animal no grupo Endometriose 1 (N=21) e quatro fragmentos de tecido de 5 mm no grupo Endometriose 2 (N=22). Os animais pertencentes ao grupo controle foram submetidos ao mesmo procedimento, recebendo duas e quatro suturas de Vicryl 5.0, sem o tecido endometrial (Grupos C1 e C2,

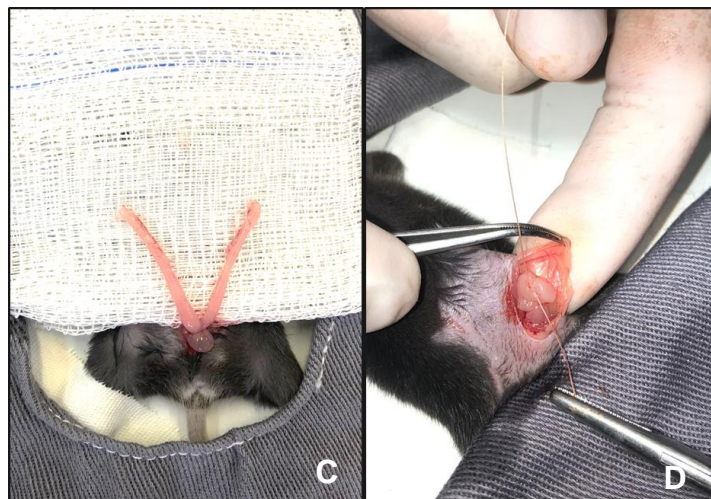
respectivamente). A incisão abdominal foi então fechada com Sutura Vicryl 4.0. Não houve suplementação hormonal ou administração de antibióticos antes ou após a cirurgia. Para minimizar a dor pós-operatória, todos os animais receberam analgesia com meloxicam 1,0 mg/kg de peso corporal por meio de injeções intraperitoneais, a cada 24 horas por 72 horas. Os procedimentos cirúrgicos estão demonstrados nas **Figuras 2, 3 e 4**.

Figura 2. Parede abdominal de fêmea de camundongo pertencente ao grupo Controle.



Nota: A: realização do ponto cirúrgico sem a presença de fragmento endometrial. B: Ponto cirúrgico finalizado. Fonte: acervo pessoal.

Figura 3. Útero e parede abdominal de fêmea de camundongo pertencente ao grupo Endometriose 1.



Nota: C: cornos uterinos expostos. D: sutura de um fragmento de tecido uterino suturado na parede peritoneal da fêmea. Fonte: acervo pessoal.

Figura 4. Parede abdominal de fêmea de camundongo pertencente ao grupo Endometriose 2.



Nota: Dois fragmentos de tecido uterino suturados na parede peritoneal da fêmea. Fonte: acervo pessoal.

3.5 Acasalamento dos animais

Quatro semanas após a cirurgia, as fêmeas de cada um dos 4 grupos foram colocadas em caixas com camundongos machos com fertilidade comprovada por um período de até 4 semanas. Foram colocadas, no máximo, 2 fêmeas para 1 macho em cada caixa. As fêmeas foram avaliadas diariamente quanto a sinais de acasalamento e prenhez. A confirmação de acasalamento foi realizada através de visualização de placa vaginal, quando a fêmea foi separada do macho e mantida com outras fêmeas até três dias antes da data prevista para o parto (20 dias após visualização da placa vaginal). Ao atingir esse período de prenhez, cada fêmea foi isolada em uma gaiola e ali mantida com sua ninhada.

O desenvolvimento da prenhez foi monitorado por meio de pesagens a cada 2 dias. Não havendo aumento de peso até próximo do sétimo dia após visualização da placa vaginal, a fêmea era novamente colocada na presença do macho para acasalar até apresentar plugue ou completar 4 semanas de criada com macho. Esse ato diminui a possibilidade de a fêmea não ter desenvolvido a gestação por motivos que não possuam relação com a indução da endometriose por procedimento cirúrgico, visto que o plugue vaginal indica presença de cópula, mas a fertilização pode não ter ocorrido.

Sabe-se que, na medicina humana, a infertilidade é definida pela dificuldade de um casal engravidar tendo relações sexuais sem uso de nenhuma forma de anticoncepção no período de um ano. Apesar de não haver um conceito definido sobre quando um camundongo é considerado infértil, levamos em consideração a definição para humanos e permitimos que a fêmea tivesse mais de uma cópula para evitar possíveis considerações errôneas a respeito da taxa de gestação.

3.6 Variáveis analisadas

A taxa de prenhez (definida como a porcentagem de animais que gestaram em relação ao número total de animais do grupo), a duração da prenhez (número de dias a partir da visualização da placa vaginal até a data do parto), o número de filhotes por ninhada ao nascer e ao desmame (quatro semanas após o nascimento), o peso dos filhotes ao nascimento e ao desmame, natimortos (feto que nasceu morto), presença de canibalismo (prática de um indivíduo se alimentar de outro da mesma espécie) por parte da mãe, as perdas gestacionais e necessidade de retorno ao acasalamento foram comparados entre os grupos. A fêmea foi considerada gestante a partir do momento em que ganhou peso após apresentar placa vaginal. Duas situações foram consideradas perda gestacional: a prenhez que passou da data prevista para o parto e a fêmea perdeu peso gradualmente e a fêmea prenhe que, pouco tempo antes da data prevista para o parto começou, lentamente, a perder peso. Já a variável retorno ao acasalamento remete às fêmeas que, após visualização da placa vaginal, não ganharam peso na primeira semana de acompanhamento e, portanto, foram novamente colocadas para criar com machos até presença de nova placa vaginal (ou até completar 30 dias de exposição ao macho).

3.7 Eutanásias

As fêmeas foram submetidas a eutanásia após o desmame dos filhotes e tecido das lesões de endometriose foi coletado para análise histológica.

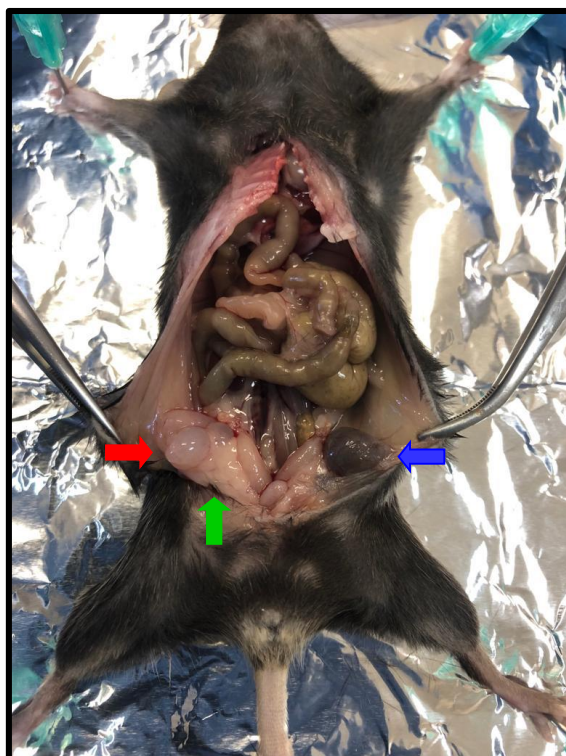
Machos após criados com fêmeas e filhotes (após devidas avaliações) também foram submetidos a eutanásia.

As eutanásias dos animais foram realizadas por meio de deslocamento cervical para evitar possíveis alterações em parâmetros plasmáticos associadas ao uso de anestésicos.

3.8 Análise histológica do endométrio ectópico

As lesões de endometriose foram coletadas após eutanásia dos animais e posicionadas em cassetes histológicos. Macroscopicamente, algumas lesões eram estruturas ovais translúcidas preenchidas com fluido. Outras lesões possuíam aspecto amarronzado, com conteúdo espesso e escuro. Além disso, em algumas fêmeas foram encontradas aderências à intestino, corno uterino e ovário. Na **Figura 5** é possível perceber essas características citadas em apenas um animal.

Figura 5. Animal eutanasiado apresentando lesões ectópicas de endometriose.



Nota: Em vermelho: lesão oval e preenchida por fluido translúcido. Em azul: lesão de aspecto castanho, com conteúdo espesso e escuro. Em verde: aderência da lesão em corno uterino e ovário direito. Fonte: acervo pessoal.

A fixação do material foi realizada com solução formalina neutra tamponada a 10% pelo período de 24 horas. Após esse período, as lesões foram

transferidas para o álcool 70% e mantidas até as próximas etapas de preparação da lâmina. A etapa de fixação tem por finalidade a interrupção do metabolismo celular, preservando e conservando elementos teciduais (Santos et al., 2021).

As lesões então passaram pelos processos de clivagem, desidratação, diafanização, impregnação e inclusão. A microtomia fez cortes com espessura de 3 micrômetros para passagem de luz e observação do tecido ao microscópio. A coloração utilizada para a técnica foi hematoxilina e eosina (H.E.), indicada para observação geral de tecidos (Santos et al., 2021).

Para a leitura da lâmina foi utilizado um microscópio binocular Zeiss Axio Scope.A1 de luz convencional com aumento de 20 vezes e as lâminas foram visualizadas e analisadas em busca de células endometriais.

3.9 Cálculo amostral

Considerando a gestação como desfecho (variável binária) e assumindo uma diferença clinicamente relevante de 43% na taxa de gestação entre os grupos (100% no grupo controle versus 57% no grupo 1; Rosa e Silva et al., 2019) e assumindo um nível de significância de 5% com um poder de teste de 80%, necessitamos de 16 animais por grupo. O cálculo do tamanho da amostra foi realizado usando a calculadora implementada no site <https://www.sealedenvelope.com/>.

3.10 Análises estatísticas

Foi realizada uma análise exploratória dos dados por meio de medidas de posição central e dispersão. O gráfico box plot foi utilizado para verificar a distribuição dos dados. Após verificar os resultados da análise exploratória de dados, optamos pela mediana e o intervalo interquartil para sumarizar os resultados obtidos na amostra.

As variáveis qualitativas (taxas de prenhez, natimortos, perda gestacional, retorno ao acasalamento e canibalismo) foram resumidas considerando as frequências absolutas e relativas. Para verificar se os grupos diferiam em relação a estas variáveis foi aplicado o teste Qui-Quadrado.

À princípio foi utilizado o teste estatístico de Wilcoxon para amostras independentes para comparar as variáveis quantitativas (duração da prenhez, número de filhotes por ninhada e pesos dos filhotes ao nascimento e ao desmame) entre os dois grupos controle (C1 e C2) e garantir que não há diferença estatística entre eles. Após isto, os grupos Controle 1 e Controle 2 foram unificados em grupo Controle, visto que apenas diferem no período em que foram realizados e o teste não paramétrico de Kruskal Wallis foi aplicado para verificar se existe diferença estatisticamente significativa entre os grupos de estudo (Controle, Endometriose 1 e Endometriose 2) em cada variável analisada. Quando o teste demonstrou a existência de uma diferença entre os grupos, realizamos o pós-teste de Dunn para encontrar tal fator.

As análises foram realizadas no programa SAS versão 9.4 e no programa R versão 4.2.2.

4. RESULTADOS

4.1 Fluxograma do grupo Controle 1

Dezenove fêmeas foram submetidas ao procedimento cirúrgico simulado. Duas fêmeas morreram: uma fêmea por distocia fetal e outra por aborto seguido de morte da gestante com 18 dias de prenhez, sem causa aparente, restando um total de dezessete fêmeas analisadas. Dessas, três fêmeas cometeram canibalismo de seus filhotes e não foi possível checar as variáveis ao desmame. Além disso, uma fêmea perdeu a gestação aos 18 dias de prenhez.

4.2 Fluxograma do grupo Controle 2

Vinte e três fêmeas foram submetidas ao procedimento cirúrgico simulado. Duas fêmeas morreram no decorrer do estudo: uma fêmea com ninhada de 14 dias e outra com ninhada de 5 dias, ambas sem causas aparentes, restando um total de vinte e uma fêmeas analisadas. Dessas, nenhuma fêmea cometeu canibalismo dos filhotes, mas três fêmeas perderam gestações: a primeira fêmea perdeu a gestação com 14 dias de prenhez, após retornar ao acasalamento duas vezes. A segunda fêmea perdeu a gestação aos 21 dias de

prenhez (houve perda de peso sem sinais de parto na gaiola) e a terceira fêmea perdeu a gestação com 13 dias de prenhez, após retornar ao acasalamento duas vezes.

4.3 Fluxograma do grupo Endometriose 1

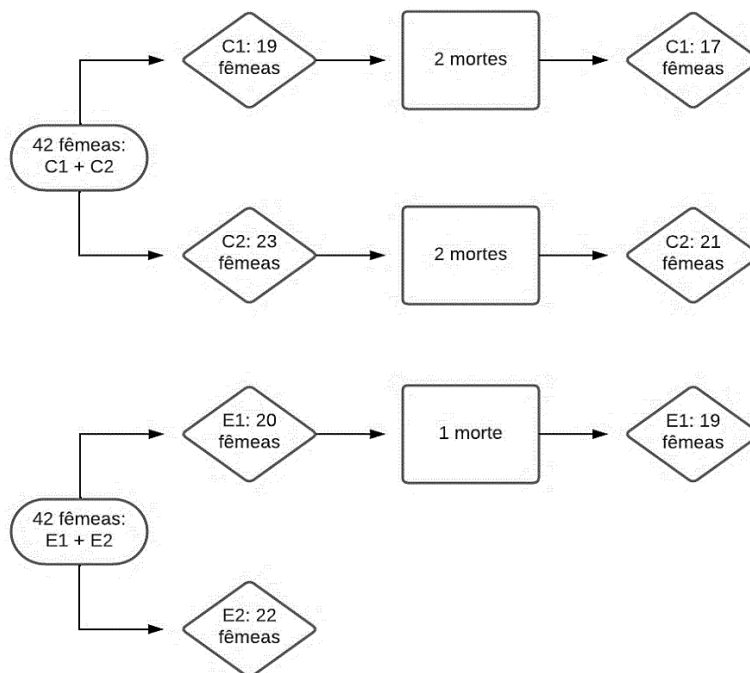
Vinte fêmeas foram submetidas ao procedimento cirúrgico para indução de endometriose. Uma fêmea morreu no decorrer do estudo por distocia fetal, restando dezenove fêmeas. Dessas, uma fêmea cometeu canibalismo dos filhotes, e não houve perda gestacional.

4.4 Fluxograma do grupo Endometriose 2

Vinte e duas fêmeas foram submetidas ao procedimento cirúrgico para indução de endometriose. Nenhuma fêmea desse grupo morreu durante o decorrer do estudo. Quatro fêmeas cometeram canibalismo dos filhotes. Houve uma perda gestacional de fêmea com 15 dias de prenhez, após retornar ao acasalamento uma vez. Uma fêmea desse grupo foi encontrada sem ninhada imediatamente após o parto, portanto não foi possível monitorar esses filhotes.

A **Figura 6** resume as perdas de animais durante o experimento. As ninhadas foram eutanasiadas por meio de dose excessiva de isoflurano após detecção da morte das mães. Nenhum animal teve complicação pós-cirúrgica.

Figura 6. Perdas de animais por morte durante o experimento.

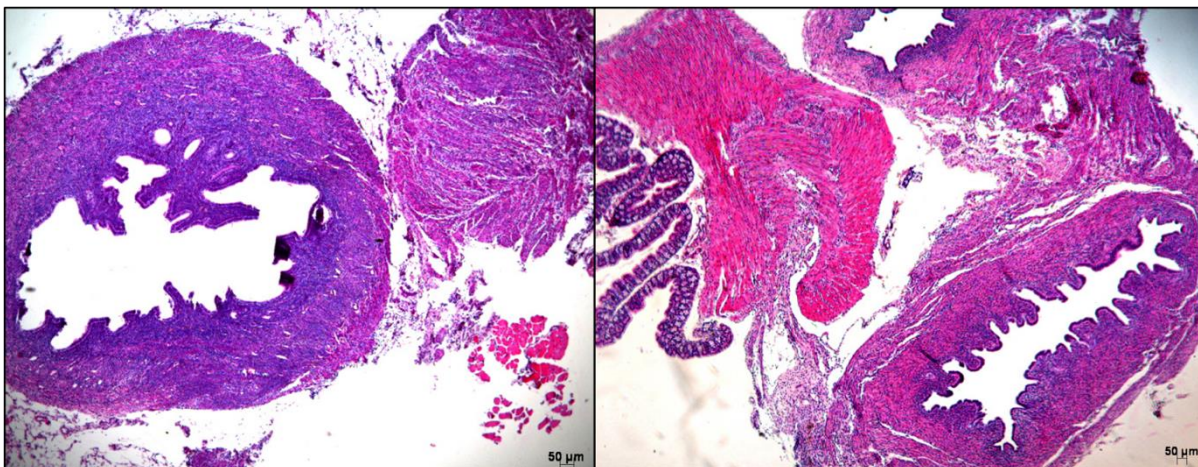


Fonte: acervo pessoal.

4.5 Histologia

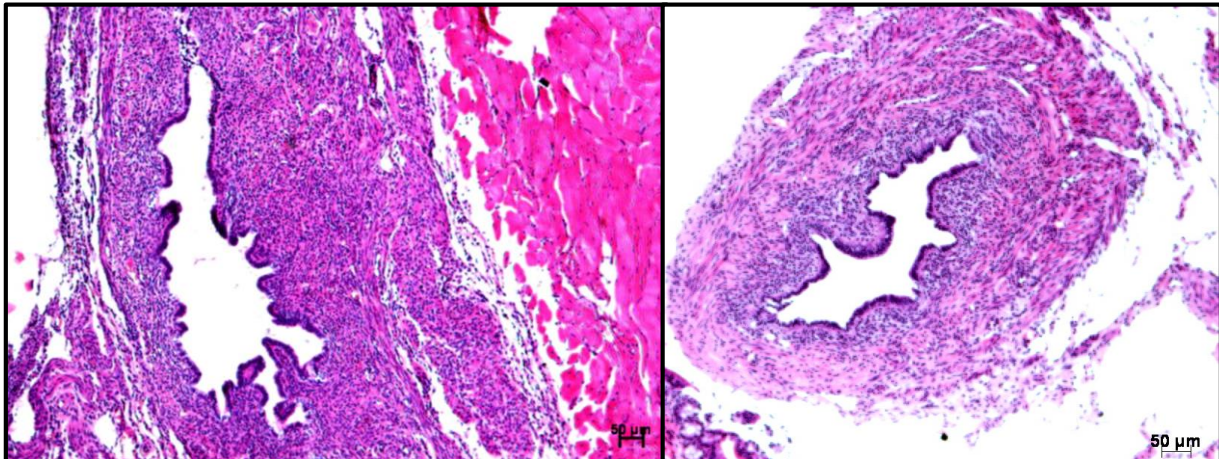
Foi realizada a confirmação histológica das lesões ectópicas de endometriose em todos os animais submetidos ao procedimento cirúrgico (como exemplificado nas **Figuras 7, 8 e 9**).

Figura 7. Fragmentos uterinos de diferentes animais vistos no aumento de 5x em microscopia ótica.



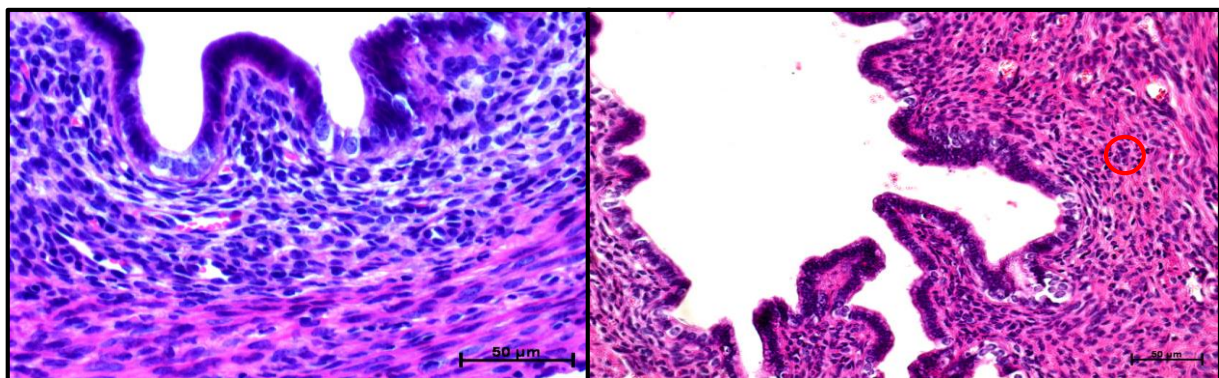
Fonte: acervo pessoal.

Figura 8. Fragmentos uterinos de diferentes animais visto no aumento de 10x em microscopia eletrônica.



Fonte: acervo pessoal.

Figura 9. Células endometriais vistas no aumento de 40x em microscopia eletrônica.



Nota: células endometriais destacadas por círculo vermelho. Fonte: acervo pessoal.

4.6 Variáveis analisadas

À princípio, as taxas de prenhez, tempo de gestação, número total de filhotes ao nascer, número de filhotes vivos ao nascer, peso da ninhada ao nascer, número de filhotes vivos no desmame e peso da ninhada ao desmame foram comparados entre os grupos Controle 1 e Controle 2. Não houve diferença estatisticamente significativa nestas variáveis entre os grupos controle 1 e controle 2 (**Tabela 2**), de modo que foram agrupados como grupo Controle (C) e, a seguir, comparado com os grupos experimentais Endometriose 1 e Endometriose 2.

Tabela 2. Comparação dos resultados gestacionais nos grupos Controle 1 e Controle 2

Variável	Controle 1 N = 17	Controle 2 N = 21	p
Taxa de prenhez (%)	100%	100%	
Tempo gestação	20 (20; 21)	20 (20; 20)	0,2754
Total filhotes nascimento	8 (7,5; 9)	8 (7; 9)	1,000
Filhotes vivos nascimento	8 (7; 8)	8 (7; 9)	0,7717
Peso ninhada nascimento	10 (8; 10)	10 (8; 10)	0,7963
Filhotes desmame	6 (4,5; 7)	7 (6; 7)	0,2792
Peso ninhada desmame	108 (102; 118)	102 (96; 106)	0,0842

Nota: dado apresentado como mediana (quartil inferior; quartil superior). N= número. $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo. Teste estatístico da soma dos postos de Wilcoxon. Tempo de gestação: dias. Pesos ninhadas nascimento e desmame: gramas.

Não observamos diferença estatisticamente significativa nas taxas de gestação, tempo de gestação, número total de filhotes ao nascimento e número de filhotes vivos ao nascimento ao compararmos os grupos C, E1 e E2 (**Tabela 3**).

O peso da ninhada ao nascer foi significativamente menor em E2 quando comparado aos grupos C ($p = 0,0467$) e E1 ($0,0004$) e significativamente maior em E1 quando comparado ao C ($p = 0,0183$) (**Tabela 3**).

O número de filhotes vivos ao desmame foi significativamente menor em E2 quando comparado aos grupos C ($p = 0,0398$) e E1 ($0,0004$) e significativamente maior em E1 do que no C ($p = 0,0197$) (**Tabela 3**).

O peso da ninhada ao desmame foi significativamente menor em E2 quando comparado ao e E1 ($0,0009$), mas não houve diferença dessa variável entre E2 e C. O peso da ninhada ao desmame foi maior em E1 quando comparado ao grupo C ($p = 0,0076$) (**Tabela 3**).

Não houve diferença estatisticamente significativa nas taxas de retorno ao acasalamento, perda gestacional, natimortos e canibalismo ao compararmos os grupos C, E1 e E2 (**Tabelas 4 e 5**). Enquanto 23,6% das fêmeas do grupo Controle não engravidaram na primeira vez que apresentaram placa vaginal, o mesmo ocorreu em 10,5% (1/10) das fêmeas do grupo E1 e em 4,5% (1/25) das fêmeas do grupo E2 (Tabela 4). Apesar de não haver diferença estatisticamente significativa no número de natimortos entre os três grupos, em pouco mais que 1/5 (23,5%) das fêmeas pertencentes ao grupo C foi possível notar a presença de filhotes mortos ao nascimento. Já nos grupos E1 e E2 a porcentagem de

fêmeas com filhotes natimortos foi de 42,1% (poucos mais que 2/5) e 40% (2/5), respectivamente (**Tabela 5**). Apesar de não haver diferença estatisticamente significativa também na taxa de canibalismo entre os 3 grupos, no grupo C, 1/10 (8,8%) das fêmeas cometeram ato de canibalismo, no grupo E1, 1/20 (5,2%) das fêmeas e no grupo E2, 1/5 (20%) das fêmeas (**Tabela 5**).

Tabela 3. Comparação dos resultados gestacionais observados nos grupos Controle, Endometriose 1 e Endometriose 2

Variável	Controle N = 38	Endometriose 1 N = 19	Endometriose 2 N = 22	p
Taxa de gestação	100%	100%	100%	
Tempo gestação	20 (20; 20)	20 (20; 20)	20 (20; 20)	0,17
Total filhotes nascimento	8 (7; 9)	9 (8; 10)	8 (7; 8,5)	0,13
Filhotes vivos nascimento	8 (7; 8)	8 (7; 9)	8 (6,5; 8)	0,23
Peso ninhada nascimento	10 (8; 10) ^{ac}	10 (10; 12) ^{ab}	8 (6; 10) ^{bc}	0,00001
Filhotes desmame	7 (5; 7) ^{ac}	8 (7; 8) ^{ab}	5 (3,5; 7) ^{bc}	0,00001
Peso ninhada desmame	104 (96; 112) ^a	116 (110; 128) ^{ab}	96 (67; 109) ^b	0,01

Nota: N= número. Tempo de gestação: dias. Pesos ninhadas nascimento e desmame: gramas. Dados apresentados como mediana (quartil inferior; quartil superior). A mesma letra na mesma linha significa presença de diferença significativa ($p < 0,05$). Teste estatístico Kruskal-Wallis e pós-teste Dunn.

Tabela 4. Comparação de e retorno ao acasalamento e perda gestacional observados nos grupos Controle, Endometriose 1 e Endometriose 2

Variável	Controle N = 38	Endometriose 1 N = 19	Endometriose 2 N = 22	p
Retorno acasalamento	9 (23,68%)	2 (10,53%)	1 (4,55%)	0,1117
Perda gestacional	4 (10,53%)	0 (0%)	1 (4,55%)	0,2821

Nota: dado apresentado como frequência e porcentagem. N= número. $p < 0,05$ considerado estatisticamente significante. Teste estatístico Qui-quadrado.

Tabela 5. Comparação de natimortos e presença de canibalismo observados nos grupos Controle, Endometriose 1 e Endometriose 2

Variável	Controle N = 34	Endometriose 1 N = 19	Endometriose 2 N = 20	p
Natimortos	8 (23,53%)	8 (42,11%)	8 (40%)	0,2809
Canibalismo	3 (8,82%)	1 (5,26%)	4 (20%)	0,2914

Nota: dado apresentado como frequência e porcentagem. N= número. $p < 0,05$ considerado estatisticamente significante. Teste estatístico Qui-quadrado.

5. DISCUSSÃO

Inicialmente observamos que o transplante de um ou dois fragmentos de tecido uterino em cada lado da parede peritoneal de fêmeas de camundongo não comprometeu a taxa de prenhez dos animais, evidenciando que o modelo não é adequado para o estudo da infertilidade relacionada a endometriose. Esse fato não corrobora com o estudo de Rosa e Silva et al. (2019) que, ao compararem quatro grupos: Sham (cirurgia simulada), Endometriose 1 (sutura de 1 fragmento de tecido uterino na parede pélvica), Endometriose 2 (sutura de 2 fragmentos de tecido uterino) e Endometriose 4 (sutura de 4 fragmentos), não encontraram diferença significativa entre as taxas de gestação dos grupos Sham e Endometriose 1, porém encontraram uma redução significativa da fertilidade nos grupos Endometriose 2 e 4. Neste contexto, é importante salientarmos que o procedimento cirúrgico experimental no nosso trabalho foi realizado por cirurgião experiente e, além disso, na eutanásia foram visualizadas lesões macroscópicas compatíveis com as de endometriose em todas as fêmeas operadas. Também confirmamos histologicamente a presença de tecido endometrial em todos os animais dos grupos experimentais, de modo que nossos dados são confiáveis.

A técnica de transplante de fragmentos uterinos murinos para testar o modelo de infertilidade relacionada a endometriose foi selecionada de acordo com o que havia disponível quando o nosso projeto começou a ser realizado, mas atualmente já existem outros estudos, como de Hayashi et al. (2020) e Tan et al. (2023), que desenvolveram endometriose em modelos translacionais por meio de procedimentos diferentes. Questionamos se o transplante de maior quantidade de tecido uterino poderia comprometer a fertilidade de uma parcela das fêmeas. Também questionamos se outros modelos de endometriose experimental murino poderão ser adequados para o estudo da infertilidade, o que precisará ser avaliado em estudos futuros.

Investigamos também se o transplante de 1 e 2 fragmentos de tecido endometrial em cada lado da parede peritoneal de camundongos fêmeas promoveria comprometimento dos resultados gestacionais e perinatais da prole até o desmame. Evidenciamos que os implantes endometriais não interferiram no tempo de gestação e no tamanho da ninhada ao nascer de acordo com nossos resultados e, o estudo de Rosa e Silva et al. (2019), corrobora com esses

achados. Porém, nesse trabalho, não foi realizado o acompanhamento das ninhadas até o desmame e, até o momento, não foram encontrados, na literatura, trabalhos que acompanharam as ninhadas pelo período de 30 dias após o parto.

Se por um lado o implante de endométrio ectópico não comprometeu a fertilidade, o tempo de gestação, o total de filhotes e o número de filhotes vivos ao nascimento, por outro, tanto dois quanto quatro fragmentos de tecido endometrial implantados promoveram algumas alterações nos desfechos gestacionais e/ou perinatais avaliados.

O grupo E1 teve o peso da ninhada ao nascer e ao desmame significativamente maior quando comparado aos grupos C e E2. Na tentativa de procurar explicações para estes achados, supomos que o desenvolvimento desses filhotes poderia ser comparado ao desenvolvimento de bebês humanos recém-nascidos grandes para a idade gestacional. A exposição a um ambiente intrauterino adverso pode resultar em alterações epigenéticas durante o desenvolvimento, resultando em alterações na estrutura e função de órgãos e sistemas de controle na prole (Barker, 1995). Um exemplo disso é a exposição à hiperglicemia materna, que pode contribuir para o aumento da obesidade, intolerância à glicose, hipertensão, dislipidemia e risco cardiovascular alterado nos descendentes, sabe-se que existe uma forte associação entre a diabetes gestacional e a hiperglicemia materna (Ma et al., 2015). Há tempos estudos levam a crer que existe uma relação direta entre o diabetes gestacional e recém-nascidos grandes para a idade gestacional (Formby et al., 1987; Vohr et al., 1999). O diabetes, assim como a endometriose, é uma doença inflamatória também relacionada ao estresse oxidativo e distúrbios imunológicos, sendo o diabetes gestacional relacionado a inflamação sistêmica e a endometriose relacionada a inflamação crônica (Richardson e Carpenter, 2007; King et al., 2008; López-Tinoco et al., 2013; Shang et al., 2015). O estado inflamatório poderia levar a complicações na gestação que impactem no desenvolvimento fetal, podendo afetar o aporte de nutrientes ao feto. Acreditamos que as semelhanças em ambas as doenças podem ser uma hipótese para justificar o maior peso dos filhotes pertencentes ao grupo E1, fato que permaneceu desde o nascimento até o período de desmame, porém a conexão entre a endometriose e esses resultados não está estabelecida na literatura.

Por outro lado, evidenciamos que o peso da ninhada ao nascer e o número de filhotes vivos ao desmame foi significativamente menor em E2 quando comparado aos grupos C e E1. Além disso, o peso da ninhada ao desmame foi significativamente menor em E2 quando comparado ao E1, porém sem diferença quando comparado ao C. Esses dados demonstram que as ninhadas provenientes de fêmeas com maior número de fragmentos uterinos transplantados podem ter desenvolvimento prejudicado durante a gestação, nascendo com menor peso e apresentando maior mortalidade perinatal. Porém, os filhotes que sobrevivem, parecem conseguir recuperar o peso ao desmame, visto que não há diferença significativa entre os grupos E2 e C na variável peso dos filhotes ao desmame.

Tan et al. (2023) desenvolveram um modelo de endometriose ovariana, aplicando fragmentos de tecido uterino na bolsa ovariana de camundongos receptoras. Demonstraram, além de redução da fertilidade de fêmeas pertencentes ao grupo experimental, redução do número e tamanho dos filhotes ao nascer, semelhante ao que observamos no grupo E2 do nosso estudo. Apesar de não podermos relacionar diretamente esses achados com os nossos resultados, uma vez que o modelo experimental é distinto, não há mais detalhes sobre o desenvolvimento dos filhotes, o que dificulta nossa comparação no que diz respeito à recuperação do peso dos filhotes ao desmame.

As revisões de literatura e meta-análises de Bruun et al. (2018) e de Zullo et al. (2017) demonstram que mulheres com endometriose e adenomiose possuem maior probabilidade de parto prematuro e restrição de crescimento intrauterino, culminando em recém-nascidos pequenos para idade gestacional. Horton et al. (2019) publicaram uma revisão sistemática e meta-análise a respeito de resultados neonatais de mulheres com endometriose, concluindo que a doença pode impactar de forma negativa parâmetros como peso ao nascer adequado para o período gestacional e necessidade de internação neonatal por complicações variadas. Uma metanálise recentemente publicada (Breintoft et al., 2021) evidenciou que a endometriose está associada a aumento no risco de resultados gestacionais adversos em mulheres, como hipertensão gestacional, pré-eclâmpsia, parto prematuro, placenta prévia, descolamento de placenta, necessidade de cesariana e natimortos. Gebremedhin et al. (2023) e Velez et al. (2022) também destacam a associação de aumento no risco de distúrbios

hipertensivos da gravidez, parto prematuro, necessidade de cesariana, indução do trabalho de parto e natimortos em mulheres com endometriose. Alguns destes desfechos gestacionais adversos podem favorecer a restrição de crescimento intrauterino, cursando com o nascimento de recém-nascidos pequenos para a idade gestacional. Crianças nascidas pequenas para idade gestacional (PIG) (Hokken-Koelega et al., 2023) possuem maior risco de morbidade perinatal, estatura baixa persistente e alterações metabólicas (Clayton et al, 2007). Além disto, o baixo peso ao nascer é considerado uma causa importante de morbidade e mortalidade na primeira infância e na infância. (Clayton et al, 2007). Grande parte dos recém-nascidos PIG a termo alcança crescimento compensatório até 2 anos de vida, principalmente no que diz respeito ao peso, que supera o aumento de comprimento (Huang et al., 2018). Questionamos, assim, se o grupo E2 poderia ser utilizado como modelo translacional para investigar o papel da endometriose em alguns dos desfechos gestacionais adversos observados em humanos, assim como nos mecanismos associados, o que precisa ser mais bem estudado em estudos futuros.

As taxas de retorno ao acasalamento, perda gestacional, natimortos e canibalismo não foram estatisticamente diferentes entre os grupos C, E1 e E2. Todavia, é interessante notar que os grupos E1 e E2 apresentaram uma taxa de natimortos clinicamente mais elevada (42,1 e 40%, respectivamente) do que o grupo C (23,5%) e o grupo E2 apresentou taxa de canibalismo (20%) maior quando comparado aos outros grupos (8,8 e 5,3%, respectivamente nos grupos C e E1). É possível que, se esses parâmetros forem mantidos, em estudos com maiores casuísticas, evidenciarão impacto adverso em ambas as variáveis, sendo mais um desfecho gestacional negativo relacionado ao modelo murino de endometriose. Enquanto tais estudos não são desenvolvidos, nossa hipótese para explicar a aparente maior fragilidade dos fetos pertencentes aos grupos experimentais é um possível estresse sistêmico que os implantes endometriais trariam à fêmea. O estresse de variadas origens vem sendo, há muito tempo, apontado como causa de fêmeas de camundongos negligenciarem, matarem e/ou comerem suas ninhadas (Poley, 1974; Elwood, 1991). O canibalismo parece ser incomum e, quando ocorre, geralmente é observado nos dois primeiros dias de vida dos filhotes, acontecendo principalmente com filhotes já mortos, para manutenção do ninho limpo. O infanticídio parece ser raro e está

associado a fatores estressantes para a mãe (Neto et al., 2015; Ko et al., 2017; Brajon et al., 2021). Neste contexto, Li et al., 2018 desenvolveram endometriose experimental em modelo murino, por meio de procedimento cirúrgico semelhante ao realizado em nosso trabalho, e evidenciaram que as fêmeas pertencentes ao grupo endometriose parecem possuir maior ansiedade, menor atividade locomotora e maior sensibilidade a dor quando comparadas às fêmeas do grupo sham. Todos esses sinais podem ser relacionados a fatores estressantes para a mãe, o que nos faz refletir sobre a possibilidade do estresse relacionado à dor no local dos implantes ectópicos ter impactado diretamente nos possíveis achados de negligência e canibalismo por parte das fêmeas pertencentes ao grupo E2. Larauche et al., 2012 sugerem que a dor crônica, o estresse e funções executivas compartilham circuitos neurais centrais comuns em roedores, sendo que alterações estruturais e funcionais que ocorrem no cérebro induzidas pela dor e pelo estresse crônicos podem resultar até mesmo em prejuízo no desempenho cognitivo. Sugerimos que esses fatores podem estar relacionados a negligência das ninhadas por parte das mães, mas destacamos a importância de estudos com maior casuística para comprovação.

6. CONCLUSÃO

Este trabalho teve como objetivos investigar se o transplante de 1 e 2 fragmentos de tecido endometrial em cada lado da parede peritoneal de camundongos fêmeas promoveria endometriose experimental e redução da fertilidade natural e se o transplante também promoveria comprometimento dos resultados gestacionais e perinatais da prole até o desmame, comparando a duração da prenhez, o tamanho da ninhada, o peso dos filhotes ao nascer e ao desmame, natimortos, canibalismo por parte da mãe, perdas gestacionais e retorno ao acasalamento entre animais com e sem endometriose experimental.

A endometriose experimental com sutura de fragmentos de tecido endometrial no peritônio de animais não comprometeu a fertilidade das fêmeas após 4 semanas do procedimento de indução de endometriose ao compararmos os grupos experimentais ao grupo controle, sugerindo que esse não é um modelo translacional adequado para o estudo da infertilidade relacionada a endometriose.

Até o momento, nosso estudo parece ser o primeiro que avalia desfechos gestacionais e perinatais até 30 dias de vida das ninhadas provenientes de modelo animal de endometriose. Evidenciamos que fêmeas transplantadas com 2 fragmentos de endométrio ectópico tiveram ninhadas com maior peso ao nascer e ao desmame e maior número de filhotes vivos ao desmame. Por outro lado, fêmeas transplantadas com 4 fragmentos de endométrio ectópico tiveram ninhadas com menor peso ao nascer e menor número de filhotes vivos ao desmame. Esses dados demonstram que as ninhadas provenientes de fêmeas com maior número de fragmentos uterinos transplantados podem ter desenvolvimento prejudicado durante a gestação, nascendo com menor peso e apresentando maior mortalidade perinatal. Todavia, estudos subsequentes, com casuísticas adequadas para analisar os desfechos citados, devem ser desenvolvidos para melhor avaliação se esse pode ser um modelo adequado para investigar o impacto da endometriose experimental em resultados gestacionais e perinatais.

Também consideramos importante refletir sobre os desafios de encontrar um modelo translacional adequado para estudar o potencial impacto da endometriose na fertilidade e desfechos gestacionais e perinatais. O fato de a endometriose espontânea não ocorrer em camundongos e as diferenças entre a fisiologia de humanos e camundongos nos levam a reconhecer que precisamos aprofundar os estudos acerca de como a doença se comporta no modelo murino antes de afirmarmos que esse possa ser um modelo adequado para estudarmos estes desfechos relacionados a endometriose.

REFERÊNCIAS

AGARWAL, Ashok et al. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. **Reproductive biology and endocrinology**, v. 10, p. 1-31, 2012.

AGUILAR, Hector N.; MITCHELL, B. F. Physiological pathways and molecular mechanisms regulating uterine contractility. **Human reproduction update**, v. 16, n. 6, p. 725-744, 2010.

ANDRADE, Aline Zyman de et al. Serum markers of oxidative stress in infertile women with endometriosis. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 32, p. 279-285, 2010.

ANDRADE, Antenor; PINTO, Sergio Correia; OLIVEIRA, Rosilene Santos de. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Editora Fiocruz, 2006.

ARNAUD, J. et al. Simultaneous determination of retinol, α -tocopherol and β -carotene in serum by isocratic high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 572, n. 1-2, p. 103-116, 1991.

AUGOULEA, Areti et al. The role of the oxidative-stress in the endometriosis-related infertility. **Gynecological Endocrinology**, v. 25, n. 2, p. 75-81, 2009.

BAFORT, Celine et al. Laparoscopic surgery for endometriosis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 10, 2020.

BAKRANIA, Bhavisha A.; GEORGE, Eric M.; GRANGER, Joey P. Animal models of preeclampsia: Investigating pathophysiology and therapeutic targets. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 226, n. 2, p. S973-S987, 2022.

BARKER, D. J. Intrauterine programming of adult disease. **Mol Med Today**, v. 1, n. 9, p. 418-423, 1995.

BECKER, Christian M. et al. ESHRE guideline: endometriosis. 2022.

BILOTAS, Mariela Andrea et al. Interplay between endometriosis and pregnancy in a mouse model. **PloS one**, v. 10, n. 4, p. e0124900, 2015.

BODNAR, Lisa M. et al. Inflammation and triglycerides partially mediate the effect of prepregnancy body mass index on the risk of preeclampsia. **American journal of epidemiology**, v. 162, n. 12, p. 1198-1206, 2005.

BOND, Tamara LY et al. Nest building in nulligravid, primigravid and primiparous C57BL/6J and DBA/2J mice (*Mus musculus*). **Physiology & behavior**, v. 75, n. 4, p. 551-555, 2002.

BRAJON, Sophie et al. All the pups we cannot see: cannibalism masks perinatal death in laboratory mouse breeding but infanticide is rare. **Animals**, v. 11, n. 8, p. 2327, 2021.

BRAWN, Jennifer et al. Central changes associated with chronic pelvic pain and endometriosis. **Human reproduction update**, v. 20, n. 5, p. 737-747, 2014.

BREINTOFT, Kjerstine et al. Endometriosis and risk of adverse pregnancy outcome: a systematic review and meta-analysis. **Journal of clinical medicine**, v. 10, n. 4, p. 667, 2021.

BRUUN, Mette R. et al. Endometriosis and adenomyosis are associated with increased risk of preterm delivery and a small-for-gestational-age child: a systematic review and meta-analysis. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, v. 97, n. 9, p. 1073-1090, 2018.

CHALLIS, John R. et al. Inflammation and pregnancy. **Reproductive sciences**, v. 16, p. 206-215, 2009.

CHATZIGEORGIU, Antonios et al. The use of animal models in the study of diabetes mellitus. **In vivo**, v. 23, n. 2, p. 245-258, 2009.

CHAU, Katrina et al. Effect of placental growth factor in models of experimental pre-eclampsia and trophoblast invasion. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 47, n. 1, p. 49-59, 2020.

CLAYTON, P. E. et al. Management of the child born small for gestational age through to adulthood: a consensus statement of the International Societies of Pediatric Endocrinology and the Growth Hormone Research Society. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 92, n. 3, p. 804-810, 2007.

DA BROI, Michele Gomes et al. Estresse oxidativo sistêmico e folicular em mulheres inférteis com endometriose submetidas à injeção intracitoplasmática de espermatozoide. **Reprodução & Climatério**, v. 29, n. 3, p. 112-122, 2014.

DA BROI, Michele Gomes et al. Follicular fluid from infertile women with mild endometriosis may compromise the meiotic spindles of bovine metaphase II oocytes. **Human Reproduction**, v. 29, n. 2, p. 315-323, 2014.

DA BROI, Michele Gomes; NAVARRO, Paula Andrea. Oxidative stress and oocyte quality: ethiopathogenic mechanisms of minimal/mild endometriosis-related infertility. **Cell and tissue research**, v. 364, n. 1, p. 1-7, 2016.

DA BROI, Michele G. et al. Increased concentration of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in follicular fluid of infertile women with endometriosis. **Cell and tissue research**, v. 366, n. 1, p. 231-242, 2016.

DA BROI, M. G. et al. Influence of follicular fluid and cumulus cells on oocyte quality: clinical implications. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 35, n. 5, p. 735-751, 2018.

DA BROI, Michele Gomes; FERRIANI, Rui Alberto; NAVARRO, Paula Andrea. Ethio-pathogenic mechanisms of endometriosis-related infertility. **JBRA Assisted Reproduction**, v. 23, n. 3, p. 273, 2019.

DEMETRIUS, Lloyd. Aging in mouse and human systems: a comparative study. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1067, n. 1, p. 66-82, 2006.

DRÖGE, Wulf. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological reviews**, 2002.

DUTTA, Sulagna; SENGUPTA, Pallav. Men and mice: relating their ages. **Life sciences**, v. 152, p. 244-248, 2016.

ELSHARBINI, Mohammed et al. Impact of Chronic Exposure to Endometriosis on Perinatal Outcomes: Establishment of a Mouse Model. **Biomedicines**, v. 10, n. 10, p. 2627, 2022.

ELWOOD, Robert W. Ethical implications of studies on infanticide and maternal aggression in rodents. **Animal Behaviour**, v. 42, n. 5, p. 841-849, 1991.

EMERA, Deena; ROMERO, Roberto; WAGNER, Günter. The evolution of menstruation: a new model for genetic assimilation: explaining molecular origins of maternal responses to fetal invasiveness. **Bioessays**, v. 34, n. 1, p. 26-35, 2012.

FERREIRA, Elisa Melo et al. Systemic oxidative stress as a possible mechanism underlying the pathogenesis of mild endometriosis-related infertility. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 39, n. 5, p. 785-794, 2019.

FORMBY, Bent et al. The offspring of the female diabetic “nonobese diabetic” (NOD) mouse are large for gestational age and have elevated pancreatic insulin content: a new animal model of human diabetic pregnancy. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 184, n. 3, p. 291-294, 1987.

GASKILL, Brianna N. et al. Some like it hot: mouse temperature preferences in laboratory housing. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 116, n. 2-4, p. 279-285, 2009.

GASKILL, Brianna N. et al. Energy reallocation to breeding performance through improved nest building in laboratory mice. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e74153, 2013.

GASKILL, Brianna N.; PRITCHETT-CORNING, Kathleen R. The effect of cage space on behavior and reproduction in Crl: CD1 (Icr) and C57BL/6NCrl laboratory mice. **PLoS One**, v. 10, n. 5, p. e0127875, 2015.

GEBREMEDHIN, Amanuel T. et al. Associations between endometriosis and adverse pregnancy and perinatal outcomes: a population-based cohort study. **Archives of gynecology and obstetrics**, p. 1-9, 2023.

GIORGI, Vanessa SI et al. N-acetyl-cysteine and l-carnitine prevent meiotic oocyte damage induced by follicular fluid from infertile women with mild endometriosis. **Reproductive sciences**, v. 23, n. 3, p. 342-351, 2016.

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

GLAVIND, Maria Tølbøll et al. Endometriosis and pregnancy complications: a Danish cohort study. **Fertility and sterility**, v. 107, n. 1, p. 160-166, 2017.

GOLDENBERG, Robert L. et al. Epidemiology and causes of preterm birth. **The lancet**, v. 371, n. 9606, p. 75-84, 2008.

GREAVES, Erin et al. A novel mouse model of endometriosis mimics human phenotype and reveals insights into the inflammatory contribution of shed endometrium. **The American journal of pathology**, v. 184, n. 7, p. 1930-1939, 2014.

GRUPE, Katharina; SCHERNECK, Stephan. Mouse Models of Gestational Diabetes Mellitus and Its Subtypes: Recent Insights and Pitfalls. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 6, p. 5982, 2023.

GUPTA, Sajal et al. Pathogenic mechanisms in endometriosis-associated infertility. **Fertility and sterility**, v. 90, n. 2, p. 247-257, 2008.

HAYASHI, Shotaro et al. Novel ovarian endometriosis model causes infertility via iron-mediated oxidative stress in mice. **Redox Biology**, v. 37, p. 101726, 2020.

HOKKEN-KOELEGA, Anita CS et al. International consensus guideline on small for gestational age: etiology and management from infancy to early adulthood. **Endocrine Reviews**, v. 44, n. 3, p. 539-565, 2023.

HORTON, Joanne et al. Reproductive, obstetric, and perinatal outcomes of women with adenomyosis and endometriosis: a systematic review and meta-analysis. **Human reproduction update**, v. 25, n. 5, p. 593-633, 2019.

HUANG, Lili et al. A prospective study about physical growth of children from birth to 2 years old born full-term small-for-gestational-age. **Journal of paediatrics and child health**, v. 55, n. 2, p. 199-204, 2019.

INSTITUTE OF MEDICINE et al. **Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc**. Dietary Reference Intakes, 2002.

JABBOUR, Henry N. et al. Endocrine regulation of menstruation. **Endocrine reviews**, v. 27, n. 1, p. 17-46, 2006.

JIANINI, Bruna Talita Gazeto Melo et al. Peritoneal fluid from infertile women with minimal/mild endometriosis compromises the meiotic spindle of metaphase II bovine oocytes: a pilot study. **Reproductive Sciences**, v. 24, n. 9, p. 1304-1311, 2017.

KING, George L. The role of inflammatory cytokines in diabetes and its complications. **Journal of periodontology**, v. 79, p. 1527-1534, 2008.

KO, Gui Mi; LUCA, R. R.; OLIVEIRA, G. M. Camundongo de Laboratório. **Cuidado e Manejo Animais Laboratório**, p. 169-99, 2017.

LARAUCHE, Muriel; MULAK, Agata; TACHÉ, Yvette. Stress and visceral pain: from animal models to clinical therapies. **Experimental neurology**, v. 233, n. 1, p. 49-67, 2012.

LEIDINGER, Charlotte S. et al. Environmental enrichment prevents pup mortality in laboratory mice. **Laboratory animals**, v. 53, n. 1, p. 53-62, 2019.

LEONE ROBERTI MAGGIORE, Umberto et al. A systematic review on endometriosis during pregnancy: diagnosis, misdiagnosis, complications and outcomes. **Human reproduction update**, v. 22, n. 1, p. 70-103, 2016.

LI, Tian et al. Endometriosis alters brain electrophysiology, gene expression and increases pain sensitization, anxiety, and depression in female mice. **Biology of reproduction**, v. 99, n. 2, p. 349-359, 2018.

LIVREA, Maria A. et al. Contribution of vitamin A to the oxidation resistance of human low density lipoproteins. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 18, n. 3, p. 401-409, 1995.

LIU, Yao et al. Procyanidins and its metabolites by gut microbiome improves insulin resistance in gestational diabetes mellitus mice model via regulating NF- κ B and NLRP3 inflammasome pathway. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 151, p. 113078, 2022.

LÓPEZ-TINOCO, Cristina et al. Oxidative stress and antioxidant status in patients with late-onset gestational diabetes mellitus. **Acta diabetologica**, v. 50, p. 201-208, 2013.

MA, Ronald CW et al. Maternal diabetes, gestational diabetes and the role of epigenetics in their long term effects on offspring. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 118, n. 1-2, p. 55-68, 2015.

MAGGIORE, U. Leone Roberti et al. A systematic review on endometriosis during pregnancy: diagnosis, misdiagnosis, complications and outcomes. **Hum Reprod Update**, v. 22, n. 1, p. 70-103, 2016.

MALVEZZI, Helena et al. Peritoneal fluid of women with endometriosis reduces SOD1 in bovine oocytes in vitro maturation. **Cell and tissue research**, v. 372, n. 3, p. 621-628, 2018.

MIER-CABRERA, Jennifer et al. Effect of vitamins C and E supplementation on peripheral oxidative stress markers and pregnancy rate in women with endometriosis. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 100, n. 3, p. 252-256, 2008.

MILLER, Jessica E. et al. Implications of immune dysfunction on endometriosis associated infertility. **Oncotarget**, v. 8, n. 4, p. 7138, 2017.

NETO, Jaime José da Silveira Barros; ALMEIDA, Isabela Barros; OLIVEIRA, Tharcia Kiara Beserra de. Princípios básicos de pesquisa com animais de laboratório. 2015.

NEZHAT, Camran et al. Strong association between endometriosis and symptomatic leiomyomas. **JSLS: Journal of the Society of Laparoendoscopic Surgeons**, v. 20, n. 3, 2016.

NIKI, Etsuo. Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 4, p. 503-515, 2010.

PLOWS, Jasmine F. et al. Absence of a gestational diabetes phenotype in the LepRdb/+ mouse is independent of control strain, diet, misty allele, or parity. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 45130, 2017.

PRIOR, Ronald L.; WU, Xianli; SCHAICH, Karen. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4290-4302, 2005.

REEB-WHITAKER, C. K. et al. The impact of reduced frequency of cage changes on the health of mice housed in ventilated cages. **Laboratory animals**, v. 35, n. 1, p. 58-73, 2001.

RICHARDSON, Alvie C.; CARPENTER, Marshall W. Inflammatory mediators in gestational diabetes mellitus. **Obstetrics and gynecology clinics of North America**, v. 34, n. 2, p. 213-224, 2007.

ROSA-E-SILVA, Ana CJS et al. Dose-dependent decreased fertility in response to the burden of endometriosis in a murine model. **Reproductive Sciences**, v. 26, n. 10, p. 1395-1400, 2019.

ROSENTHAL, Nadia; BROWN, Steve. The mouse ascending: perspectives for human-disease models. **Nature cell biology**, v. 9, n. 9, p. 993-999, 2007.

SAMPSON, John A. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity, **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 14, n. 4, pp. 422-469, 1927.

SANCHEZ, Ana Maria et al. Is the oocyte quality affected by endometriosis? A review of the literature. **Journal of ovarian research**, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2017.

SANTOS, Katharine Raquel Pereira et al. Manual de técnica histológica de rotina e de colorações. 2021.

SENGUPTA, Pallav. The laboratory rat: relating its age with human's. **International journal of preventive medicine**, v. 4, n. 6, p. 624, 2013.

SHANG, Min et al. Oxidative stress and antioxidant status in women with gestational diabetes mellitus diagnosed by IADPSG criteria. **Diabetes research and clinical practice**, v. 109, n. 2, p. 404-410, 2015.

SIMOGLOU, Christos et al. Abdominal wall endometrioma mimicking an incarcerated hernia: a case report. **International Journal of General Medicine**, p. 569-571, 2012.

SONAVANE, Sushilkumar K.; KANTAWALA, Kartikeya P.; MENIAS, Christine O. Beyond the boundaries—endometriosis: typical and atypical locations. **Current Problems in Diagnostic Radiology**, v. 40, n. 6, p. 219-232, 2011.

SZCZEPAŃSKA, Małgorzata et al. Oxidative stress may be a piece in the endometriosis puzzle. **Fertility and sterility**, v. 79, n. 6, p. 1288-1293, 2003.

TAN, Z. et al. P-331 Transcriptomic profiling of ovaries with experimental endometrioma in mice reveals the underlying mechanisms of abnormal oocyte quality and functions in endometrioma-associated infertility. **Human Reproduction**, v. 38, n. Supplement_1, p. dead093. 689, 2023.

TAYLOR, Hugh S.; KOTLYAR, Alexander M.; FLORES, Valerie A. Endometriosis is a chronic systemic disease: clinical challenges and novel innovations. **The Lancet**, v. 397, n. 10276, p. 839-852, 2021.

VAISI-RAYGANI, Asad; ASGARI, Rezvan. Association of inflammation with female reproductive system disorders. 2021.

VANNUCCINI, Silvia et al. Infertility and reproductive disorders: impact of hormonal and inflammatory mechanisms on pregnancy outcome. **Human reproduction update**, v. 22, n. 1, p. 104-115, 2016.

VELEZ, Maria P. et al. Mode of conception in patients with endometriosis and adverse pregnancy outcomes: A population-based cohort study. **Fertility and Sterility**, v. 118, n. 6, p. 1090-1099, 2022.

VOHR, Betty R.; MCGARVEY, Stephen T.; TUCKER, Richard. Effects of maternal gestational diabetes on offspring adiposity at 4-7 years of age. **Diabetes care**, v. 22, n. 8, p. 1284-1291, 1999.

WASSON, Katherine. Retrospective analysis of reproductive performance of pair-bred compared with trio-bred mice. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 56, n. 2, p. 190-193, 2017.

WEBER, E. M. et al. Influence of strain and parity on the risk of litter loss in laboratory mice. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, n. 2, p. 292-296, 2013.

WEISS, Gerson et al. Inflammation in reproductive disorders. **Reproductive sciences**, v. 16, p. 216-229, 2009.

WOLF, Myles et al. Inflammation and glucose intolerance. A prospective study of gestational diabetes mellitus. **Clinical Diabetology**, v. 5, n. 2, p. 85-94, 2004.

ZULLO, Fabrizio et al. Endometriosis and obstetrics complications: a systematic review and meta-analysis. **Fertility and sterility**, v. 108, n. 4, p. 667-672. e5, 2017.

ANEXO A



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



AUTORIZAÇÃO


A CEUA-FMRP autoriza a execução do projeto intitulado: **“Duração da infertilidade relacionada a endometriose em modelo murino”**, registrado com o número do protocolo **163/2020**, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O Protocolo foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em reunião de 28 de março de 2022.

Colaboradores: Nathalia Franzoni Smargiassi
Julio Cesar Rosa e Silva
Alceu Afonso Jordao Junior

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

Finalidade			() Ensino (X) Pesquisa Científica	
Vigência da autorização			28/03/2022 a 17/01/2023	
Espécie/Linhagem	Nº de Animais	Peso/Idade	Sexo	Origem
Camundongo / C57Bl 6	32	23g / 60 dias	Macho	Serviço de Biotério
Camundongo / C57Bl 6	96	23g / 60 dias	Fêmea	Serviço de Biotério
Camundongo / C57Bl 6	270	07g / 0 dia	Macho	Serviço de Biotério
Camundongo / C57Bl 6	270	09g / 0 dia	Fêmea	Serviço de Biotério

Ribeirão Preto, 28 de março de 2022


Prof. Dr. Luiz Carlos C. Navegantes
Coordenador da CEUA/FMRP-USP