



Universidade Federal do Maranhão
**Agência de Inovação, Empreendedorismo, Pesquisa, Pós-
Graduação e Internacionalização**
Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto
Mestrado Acadêmico



**AVALIAÇÃO DA DOR E PROCESSO INFLAMATÓRIO NA
ENDOMETRIOSE: USO DA TALIDOMIDA EM MODELO
EXPERIMENTAL**

Gustavo Medeiros Frota

**São Luís
2022**

GUSTAVO MEDEIROS FROTA

**AVALIAÇÃO DA DOR E PROCESSO INFLAMATÓRIO NA
ENDOMETRIOSE: USO DA TALIDOMIDA EM MODELO
EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão, para obtenção do título de Mestre em Saúde do Adulto.

Orientadora:

Prof^a Dra. Maria do Socorro de Sousa
Cartágenes

Coorientador:

Prof^o Dr. João Batista Santos Garcia

Coordenadora:

Prof^a Dra. Maria do Desterro Soares
Brandão Nascimento

São Luís
2022

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Frota, Gustavo Medeiros.

Avaliação da dor e processo inflamatório na
endometriose: uso da talidomida em modelo experimental /
Gustavo Medeiros Frota. - 2022.

86 p.

Coorientador(a): João Batista Santos Garcia.

Orientador(a): Maria do Socorro de Sousa Cartágenes.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Saúde do Adulto/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
São Luís, 2022.

1. Dor. 2. Endometriose. 3. Inflamação. 4. Ratos.
5. Talidomida. I. Cartágenes, Maria do Socorro de Sousa.
II. Garcia, João Batista Santos. III. Título.

Gustavo Medeiros Frota

**AVALIAÇÃO DA DOR E PROCESSO INFLAMATÓRIO NA ENDOMETRIOSE:
USO DA TALIDOMIDA EM MODELO EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão, para obtenção do título de Mestre em Saúde do Adulto.

A Banca Examinadora da Defesa da Dissertação de Mestrado apresentada em sessão pública, considerou o candidato aprovado em: / / .

Banca Examinadora

Prof^ª Dra. Maria do Socorro de Sousa Cartágenes (Orientadora)
Universidade Federal do Maranhão

Prof^º Dr. Thiago Alves Rodrigues
Hospital Universitário – HU/UFMA

Prof^º Dr. João Nogueira Neto
Universidade Federal do Maranhão

Prof^º Dr. Marcelo Souza de Andrade
Universidade Federal do Maranhão

Prof^ª Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento
Universidade Federal do Maranhão

*“Se você deseja progredir,
todas as idéias fixas devem ir embora”*

Joseph Campbell

À todas as pessoas que, mundo afora, dedicam seus esforços ao estudo e pesquisa da endometriose; também aos profissionais da saúde que de forma obstinada engajam-se no terreno desta enigmática doença; e principalmente àquelas mulheres e famílias que carregam diariamente este fardo na esperança de dias sem dor...

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder esta conquista.

Aos meus pais, Maria José Medeiros Frota e Luiz Soeiro Frota, alicerces da minha vida.

Aos meus irmãos, Gardênia Medeiros Frota e Luís Eduardo Medeiros Frota, esteios ao longo da minha caminhada, sou mais forte com vocês.

Aos meus sobrinhos Maria Isabel Frota e Arthur Trovão, por serem o elo de amor em nossa família.

À minha orientadora, professora Dra. Maria do Socorro de Sousa Cartágenes, agradeço por todos os ensinamentos, mas principalmente a oportunidade de aprender sobre como construir uma verdadeira amizade, de forma leve e saudável. Conte comigo sempre!

Ao meu coorientador, professor Dr. João Batista Santos Garcia, a quem tanto admiro como professor, estudioso, pesquisador e amigo. Obrigado por acreditar no meu potencial acadêmico e profissional. Gratidão eterna!

A todos os professores que colaboraram direta ou indiretamente para a produção deste estudo, em especial Dra. Mayara Cristina, Dra. Rosane Nassar Guerra, Dr. João Nogueira Neto, Dr. Marcelo Souza de Andrade e Dr. Rui Miguel da Costa, obrigado pela disposição e prazer em ensinar.

Ao Laboratório Experimental para Estudo da Dor (LEED) / UFMA e seus estimados pesquisadores, por permitirem a utilização de seu espaço e estrutura para o desenvolvimento da ciência.

Agradeço à Isabela Bastos e Priscylla Gouveia, que além de companheiras de pesquisa tornaram-se grandes amigas e certamente levarei para o resto da vida.

Obrigado aos alunos de iniciação científica Caio Viana, Paloma, Kevin e Alex, que além da habilidade técnica e conhecimento científico demonstraram empenho e compromisso. Desejo sucesso em suas caminhadas, vocês merecem.

Aos integrantes da Liga Acadêmica de Dor / UFMA que sempre foram solícitos. Obrigado pela presença e engajamento em nosso estudo.

Obrigado ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto (PPGSAD) / UFMA, por sempre buscar e manter alto grau de excelência ao programa de pós-graduação, enriquecendo nossa formação.

À Turma 18 do PPGSAD pelo exemplo de união, empenho e dedicação; em especial agradeço à Keiko Aramaki, Augusto Mesquita e Letácio Garcia, amigos que certamente deixaram o percurso mais leve e agradável.

E aos animais que doam suas vidas em prol do progresso da ciência, em especial aos que participaram deste estudo. Minha reverência e agradecimento.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AVC	Acidente Vascular Cerebral
CCBS	Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
COCs	Contraceptivos Orais Combinados
COX	Cicloxygenase
DP	Desvio Padrão
DPC	Dor Pélvica Crônica
DRG	Gânglios da Raiz Dorsal
DU	Dose Única
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
FDA	Food And Drug Administration
FGF	Fator de Crescimento Fibroblástico
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofina
Hb	Hemoglobina
HE	Hematoxilina-Eosina
Ht	Hematócrito
IL	Interleucina
IM	Intramuscular
INF	Interferon
LEED	Laboratório Experimental para Estudo da Dor
MCP	Proteína Quimiotática de Monócitos
MGS	Mouse Grimace Scale
mRNA	RNA mensageiro
NF- κ B	Fator Nuclear kappa Beta
PMN	Polimorfonucleados
rpm	rotações por minuto
TCE	Traumatismo Crânio Encefálico
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UFMA	Universidade Federal do Maranhão
3'-UTR	Região 3' não traduzida do RNAm
VEGF	Fator de Crescimento Derivado do Endotélio

LISTA DE SÍMBOLOS

cm	centímetro
g	gramas
kg	kilograma
L	Litro
m	metro
mm	milímetros
mg	miligrama
μL	microlitro
μm	micrometro
mL	mililitro
p	significância
π	<i>pi</i>
%	porcentagem
®	Marca Registrada
V	Volts
vs.	versus

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vista lateral esquemática da pelve ilustrando as 4 formas de endometriose: 1: endometrioma (OMA); 2: endometriose peritoneal superficial (SUP); 3: endometriose subperitoneal infiltrante profunda (DIE); 4: adenomioma (Ad).....	18
Figura 2 - Estrutura dos enantiômeros da talidomida.....	28
Figura 3 - Período de adaptação dos animais no Biotério Setorial do Prédio de Pesquisa e Pós-Graduação do CCBS/UFMA.....	34
Figura 4 - Animal anestesiado, fixado em prancha cirúrgica e com abdômen inferior depilado.....	35
Figura 5 - Identificação, ligadura e secção do corno uterino esquerdo.....	36
Figura 6 - Autotransplante fixado em parede peritoneal direita.....	37
Figura 7 - Confirmação da implantação da endometriose em ratas Wistar e medida dos diâmetros.....	38
Figura 8 - Fluxograma representativo da indução e confirmação da endometriose.....	39
Figura 9 - Esquema representativo do delineamento experimental.....	40
Figura 10 - Rat Grimace Scale.....	43
Figura 11 - Teste de von Frey.....	44
Figura 12 - Aparelho Rotarod.....	45
Figura 13 - Avaliação da dor espontânea pelo <i>Mouse Grimace Scale</i>	49
Figura 14 - Avaliação tátil sensitiva utilizando o do teste von Frey.....	50
Figura 15 - Avaliação da atividade motora/deambulação forçada usando o teste de rotarod.....	51
Figura 16 - Avaliação da concentração de TNF α em 2 momentos, D7 e D21.....	52
Figura 17 - Avaliação da concentração de INF γ em 2 momentos, D7 e D21.....	53
Figura 18 - Avaliação da concentração de IL-6 em 2 momentos, D7 e D21.....	54
Figura 19 - Avaliação da concentração de IL-10 em 2 momentos, D7 e D21.....	55
Figura 20 - Fotomicrografias dos epitélios endometrióticos.....	57

LISTA DE QUADROS E TABELAS

- Quadro 1** - Classificação do crescimento dos implantes endometriais.....38
- Quadro 2** - Escores de avaliação da persistência de células epiteliais em autotransplantes de endométrio.....47
- Tabela 1** - Variação do tamanho dos focos endometrióticos, após 21 dias de tratamento com 0,5mL/dia, por via oral, de solução fisiológica 0,9%; com talidomida por via oral, na dose de 25mg/kg/dia e com leuprolida em dose única subcutânea de 1mg/kg.....56
- Tabela 2** - Comparação dos escores semiquantitativos de persistência epitelial entre os grupos tratados com 0,5mL/dia, por via oral, de solução fisiológica 0,9%; com talidomida por via oral, na dose de 25mg/kg/dia e com leuprolida em dose única subcutânea de 1mg/kg.....57

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A - Parecer do CEUA.....	86
---------------------------------------	-----------

RESUMO

Introdução: Novas estratégias tem sido pesquisadas para o tratamento da endometriose, como a utilização de substâncias anti-inflamatórias de origem natural e fármacos que atuam na modulação da inflamação. Neste contexto, a talidomida traz evidências relacionadas à diminuição de volume tumoral e da contagem de células e citocinas inflamatórias. **Objetivos:** avaliar as propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e antitumorais da talidomida em um modelo experimental de endometriose. **Metodologia:** foram utilizadas 24 ratas da linhagem Wistar e separadas aleatoriamente em 04 grupos contendo 06 animais cada, sendo: o grupo CONTROLE(-), com administração diária de 0,5mL de solução fisiológica 0,9% via oral; o grupo LEUPROLIDA, com aplicação de 1mg/kg de acetato de leuprolida em dose única subcutânea; o grupo T25, com administração via oral de 25mg/kg de talidomida dissolvidos em 0,5mL de solução salina 0,9% e o grupo SHAM, como controle para o procedimento cirúrgico. Nos momentos D0, D7, D14 e D21 foram realizados testes para avaliação clínica da dor (Rat Grimace Scale, von Frey e Rota Rod); amostras de sangue foram coletas no D7 e D21, através de punção da veia caudal, para quantificação de citocinas (INF γ , TNF α , IL-6 e IL-10); aferições dos volumes dos implantes antes e ao final do protocolo de tratamento, e o estudo histopatológico das áreas de implante excisadas momentos antes da eutanásia, foram realizados. **Resultados:** quando comparada ao grupo controle, significativa redução dos escores faciais de dor, a partir do décimo quarto dia ($0,83 \pm 0,77$ vs. $1,77 \pm 1,00$; com $p=0,0021$) foram obtidas pela talidomida; uma melhora significativa na qualidade da marcha durante todo tratamento também foi atingida ($5,00 \pm 0,00$ vs. $4,33 \pm 0,54$; com $p < 0,001$); houve ainda, redução significativa dos níveis de INF γ no início do tratamento ($1490,75 \pm 357,01$ vs. $2066,75 \pm 551,65$; com $p=0,0459$), seguido por significativo aumento da IL-10 ao vigésimo primeiro dia do mesmo ($218,75 \pm 16,24$ vs. $137,5 \pm 30,59$; com $p=0,0306$). Os volumes dos implantes envolveram significativamente ($20,31 \pm 9,12$ vs. $1,43 \pm 1,43$; com $p=0,0065$), assim como os escores histopatológicos refletindo comprometimento significativo da camada epitelial endometriótica. Quando comparada à leuprolida, além da superioridade frente ao painel de citocinas, mostrou-se semelhante em relação à redução volumétrica dos implantes, escores histológicos e testes que avaliam o comportamento da dor, com exceção ao limiar nociceptivo evocado no qual o análogo de GnRH foi significativamente superior. **Conclusão:** os efeitos pleiotrópicos atingidos pela talidomida na dose oral de 25mg/kg durante 21 dias, mostraram significativa capacidade analgésica e antitumoral, assim como importante perfil anti-inflamatório, sugerindo um potencial de sua aplicabilidade no tratamento da endometriose.

Palavras chave: Endometriose; Inflamação; Dor; Talidomida; Ratos.

ABSTRACT

Introduction: New strategies have been researched for the treatment of endometriosis, such as the use of anti-inflammatory substances of natural origin and drugs that act in the modulation of inflammation. In this context, thalidomide brings evidence related to the decrease in tumor volume and in the count of inflammatory cells and cytokines. **Objectives:** to evaluate the analgesic, anti-inflammatory and antitumor properties of thalidomide in an experimental model of endometriosis. **Methodology:** 24 Wistar rats were used and randomly divided into 04 groups containing 06 animals each, as follows: the CONTROL(-) group, with daily administration of 0.5mL of 0.9% saline solution orally; the LEUPROLIDE group, with application of 1mg/kg of leuprolide acetate in a single subcutaneous dose; the T25 group, with oral administration of 25mg/kg of thalidomide dissolved in 0.5mL of 0.9% saline solution and the SHAM group, as a control for the surgical procedure. At moments D0, D7, D14 and D21, tests were performed for clinical evaluation of pain (Rat Grimace Scale, von Frey and Rota Rod); blood samples were collected on D7 and D21, through puncture of the tail vein, for quantification of cytokines (INF γ , TNF α , IL-6 and IL-10); measurements of the volumes of the implants before and at the end of the treatment protocol, and the histopathological study of the implant areas excised moments before euthanasia, were performed. **Results:** when compared to the control group, a significant reduction in facial pain scores from the fourteenth day onwards ($0,83 \pm 0,77$ vs. $1,77 \pm 1,00$; with $p=0,0021$) was obtained by thalidomide ; a significant improvement in gait quality during the entire treatment was also achieved ($5,00 \pm 0,00$ vs. $4,33 \pm 0,54$; with $p < 0,001$); there was also a significant reduction in INF γ levels at the beginning of treatment ($1490,75 \pm 357,01$ vs. $2066,75 \pm 551,65$; with $p=0,0459$), followed by a significant increase in IL-10 at the twentieth first day of the same ($218,75 \pm 16,24$ vs. $137,5 \pm 30,59$; with $p=0,0306$). Implant volumes significantly involuted ($20,31 \pm 9,12$ vs. $1,43 \pm 1,43$; with $p=0,0065$), as well as histopathological scores reflecting significant involvement of the endometriotic epithelial layer. When compared to leuprolide, in addition to being superior to the cytokine panel, it was similar in terms of volumetric reduction of implants, histological scores and tests that assess pain behavior, except for the evoked nociceptive threshold in which the GnRH analogue was significantly higher. **Conclusion:** the pleiotropic effects achieved by thalidomide at an oral dose of 25mg/kg for 21 days, showed significant analgesic and antitumor capacity, as well as an important anti-inflammatory profile, suggesting a potential for its applicability in the treatment of endometriosis.

Keywords: Endometriosis; Inflammation; Pain; Thalidomide; Rats.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 Endometriose.....	17
2.1.1 Etiopatogenia.....	17
2.1.2 Classificação.....	18
2.1.3 Endometriose e Dor.....	19
2.1.4 Diagnóstico.....	22
2.2 Modelos Experimentais para Endometriose.....	22
2.3 Tratamento.....	24
2.3.1 Talidomida.....	26
3 OBJETIVOS	32
3.1 Geral.....	32
3.2 Específicos.....	32
4 METODOLOGIA	33
4.1 Tipo de Estudo.....	33
4.2 Local e Data da Pesquisa.....	33
4.3 População do Estudo.....	33
4.4 Procedimento Anestésico Experimental.....	34
4.5 Indução da Endometriose Experimental (Primeira Cirurgia).....	35
4.6 Confirmação da Endometriose Experimental (Segunda Cirurgia).....	37
4.7 Protocolo de Tratamento.....	39
4.8 Avaliação Clínica da Dor.....	41
4.8.1 Avaliação da dor espontânea.....	41
4.8.2 Avaliação da Alodinia Mecânica.....	43
4.8.3 Avaliação de Atividade Motora/Deambulação Forçada.....	44
4.9 Dosagem de Citocinas.....	45
4.10 Eutanásia.....	45
4.11 Análise Histológica.....	46
4.12 Análise Estatística.....	47
4.13 Aspectos Éticos.....	47
5 RESULTADOS	48
5.1 Avaliação da dor espontânea.....	48

5.2 Avaliação da Alodinia Mecânica.....	49
5.3 Avaliação da Atividade Motora / Deambulação forçada.....	51
5.4 Determinação da concentração do TNF α	52
5.5 Determinação da concentração do INF γ	52
5.6 Determinação da concentração de IL-6.....	53
5.7 Determinação da concentração de IL-10.....	54
5.8 Análise Volumétrica dos Implantes.....	55
5.9 Avaliação Histológica.....	56
6 DISCUSSÃO.....	58
7 CONCLUSÃO.....	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
ANEXO A – Parecer do CEUA.....	86