

Universidade Federal do Maranhão  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde  
Doutorado

**TRATAMENTO DA ENDOMETRIOSE EXPERIMENTAL: a**  
talidomida produz efeito antivasogênico satisfatório?

RAFAEL DE ABREU LIMA

São Luís

2023

RAFAEL DE ABREU LIMA

**TRATAMENTO DA ENDOMETRIOSE EXPERIMENTAL: a  
talidomida produz efeito antivasogênico satisfatório?**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Santos Garcia.

Co-orientador: Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho.

São Luís

2023

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

Lima, Rafael de Abreu

Tratamento da endometriose experimental: a talidomida produz efeito antivasogênico satisfatório? / Rafael de Abreu Lima. - 2023.

72 f.: il.

Orientador: João Batista Santos Garcia

Co-orientador: Rafael Cardoso Carvalho

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís/MA, 2023.

1. Endometriose. 2. Tratamento. 3. Talidomida. 4. Fator de Crescimento Endotelial Vasogênico (VEGF). 5. Ratas (Modelo experimental). I. Garcia, João Batista Santos. II. Título.

RAFAEL DE ABREU LIMA

**TRATAMENTO DA ENDOMETRIOSE EXPERIMENTAL: a  
talidomida produz efeito antivasogênico satisfatório?**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Aprovação em:     /     /

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. João Batista dos Santos Garcia (Orientador)  
Universidade Federal do Maranhão

---

Profa. Dra. Maria do Socorro Sousa Cartágenes (1º Examinadora)  
Universidade Federal do Maranhão

---

Profa. Dra. Joicy Cortez de Sá Sousa (2º Examinadora)  
Universidade CEUMA

---

Prof. Dr. Eduardo Martins de Sousa (3º Examinador)  
Universidade CEUMA

---

Profa. Dra. Renata Mondego de Oliveira (4º Examinadora)  
Universidade Estadual do Maranhão

“Todo mundo é capaz de dominar a dor, exceto quem a sente.”

William Shakespeare

## AGRADECIMENTOS

Início esses agradecimentos refletindo em tudo que me foi proporcionado ao longo dessa jornada, com um misto de sentimentos e lágrimas de alegria que escorrem pelo meu rosto e sendo eternamente grato à Deus e toda espiritualidade que permeiam em minha vida... Por todas as experiências e momentos a mim concedidos, pelo sustentáculo espiritual proporcionado por vocês (Mãe Maria Légua, José Maria Tupinambá, Antônio Luiz Corre Beirada, João de Una e a todos os demais guias de luz presentes em minha vida, toda essa corrente espiritual da Encantaria, gratidão pela ajuda e esteio espiritual. Minha mãe sempre muito sábia em suas palavras, costuma dizer que a nossa vida espiritual deve estar acima de tudo que é material, o resto é consequência;

Confesso que agora as lágrimas escorrem com mais intensidade, pois quando falamos de família e por muitas lembranças vividas até aqui, já imaginam o quanto serei eternamente grato, também! O amor de Deus existente e incondicional, me permite e permitiu viver ao lado de pessoas que considero esteio e base para minha vida. Seres estes que me amam, me respeitam, me acolhem e que zelam sempre por minha vida. Mamãe (Kátia de Fátima de Abreu Lima), Bidu (Rayana de Abreu Lima), Vovó Dedé (Maria Ideltrudes Abreu de Souza) e Tia Lalá (Maria Carvalho Lima), obrigado por tudo e por tanto, como é gostoso estar ao seu lado de vocês, sentir o cheiro da vida, da força e do amor justo que vocês emanam. Ao meu pai Raimundo Carvalho Lima (in memoriam) por tudo que me foi concedido, através dos seus ensinamentos retos, corretos e justos, mas carregados de amor. Pai, nunca vou esquecer quando o senhor disse “eu te amo”, nos últimos momentos de sua vida, sem nem poder falar verbalmente, devido ao câncer. Pai, aquilo me encheu de sua coragem e até hoje corre em minhas veias. Gratidão a minha tia Pama (Maria de Fátima Cardoso Abreu), pelo zelo, cuidado e nossos momentos que são ímpares. Sou um felizardo, por ter vocês em minha vida! Gratidão também, aos demais familiares!

Ao meu querido companheiro e amor de longas datas, Sidney Cantanhede, que sempre me ampara, me defende, me protege e me mata de conforto em qualquer circunstância. Obrigado por ser o companheiro, o filho, o irmão, o tio, o padrinho, o genro, o cunhado sempre muito amoroso, carinhoso, atencioso e respeitoso. Te amo e obrigado por me aturar (risos)!

Aos meus filhos, Pepeto (Davi Lucas Cantanhede) e Dan (Daniel Lucas Lopizic), a quem procuro dar o meu melhor amor, carinho, conselho e atenção. Com vocês eu me sinto o homem mais completo do mundo, pois vocês permitem o meu lado paternal ser mais intenso.

Eu transbordo de alegria e liberdade quando estou ao lado de vocês e principalmente, me vem na memória a nostalgia da minha infância ao lado do meu pai. Amo vocês meus meninos!

Às Professoras Dra. Adalgiza de Sousa Paiva Ferreira que recentemente descobriu que seu nome é escrito com a letra “z” e não com “s” (risos), a qual considero minha mãe científica e a Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento, a qual considero a minha madrinha científica, se não existem esses títulos carinhosos, acabei de inventar... (risos)! Vocês são exemplos de mulheres fortes e de destaque, cientistas éticas, responsáveis, que emanam empatia, respeito e amor. Minhas professoras, fiquem cientes da minha eterna gratidão, respeito, carinho e por me acolherem no início dessa jornada, me proporcionando um olhar diferenciado da ciência... E nunca esquecerei das nossas conversas!

Ao Professor João Batista Santos Garcia, meu orientador, pelo acolhimento ao projeto, oportunidade e confiança a mim depositados. Sabe professor, você me proporcionou um crescimento acadêmico com muita leveza e maestria. E mesmo que em poucos encontros presenciais percebi sua vibração positiva e serena, seu profissionalismo e principalmente por acreditar no potencial dos seus orientandos! Que sua vida seja regada com muito amor, champanhe e boas viagens (risos)!

Ao Professor Rafael Cardoso Carvalho, meu coorientador que se tornou um amigo. “Prof. Rafa” ou “Grão-mestre”, como sempre me reporto a ele, de forma carinhosa, respeitosa e sem bajulação, eu não tenho palavras para agradecer o seu carinho e empatia, seu empenho, sua confiança, seus ensinamentos e principalmente sua disponibilidade. Poderia ficar horas escrevendo sobre você e confesso que fiz um grande esforço pra escrever somente em um parágrafo o sentimento que vibra a todo momento. Agiste como um pai quando pega nas mãos de um filho para ensinar! Obrigado por abrir meus caminhos, me encaminhando a Universidade de São Paulo (USP), me acolher no Biotério Central da UFMA, me ensinar a gostar de pesquisas experimentais, por me apresentar pessoas certas nos momentos mais oportunos e principalmente por exemplificar que a pós-graduação pode ser uma vivência muito prazerosa. Ao meu Grão-mestre, gratidão, respeito, amor e carinho, pois desejo continuar essa caminhada acadêmica ao seu lado, aprendendo mais a cada dia, pois és um gigante!

Às Professoras Dra. Maria Angélica Miglino e Dra. Ana Cláudia Oliveira Carreira Nishiyama, aos funcionários Dra. Rose Eli Rici e Ronaldo Agostinho e doutoranda Bruna Pantoja do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), sou tão grato pelo carinho, acolhimento, ensinamentos e confiança a mim depositados e principalmente pelo acesso irrestrito aos laboratórios e a tudo que a ciência e pesquisa experimental poderia proporcionar a um estudante

de pós-graduação. Vocês me fizeram crescer em muito pouco tempo e foi impressionante essa virada de chave na minha vida acadêmica;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS/UFMA) e todo o corpo docente, por me fazerem sair da zona de conforto, com temáticas tão distintas e assuntos que jamais pensaria em conhecer. E principalmente por manter sempre o alto nível de excelência e conceito junto a CAPES;

Aos professores Dr. Eduardo Martins de Sousa, Dra. Joicy Cortez de Sá Sousa e Dra. Maria do Socorro Sousa Cartágenes, que além de exímios professores, se tornaram parceiros de pesquisa e amigos. Toda colaboração e confiança de vocês nesse momento, foi imprescindível, meu eterno respeito, gratidão e meu desejo de mais sucesso na vida de cada um;

Aos colegas/amigos Hildecy Silva da Luz, Verônica Saraiva, Nádia Guimarães, Giuliano Lima, Nathália Santos, Alexandre Magno, Hugo Leonardo Melo Dias, Dona Erianda, Seu Rodrigo e demais funcionários do Biotério Central da UFMA. Pessoal, conheci vocês por intermédio do “Prof. Rafa” e esse acolhimento e o clima do ambiente de trabalho de vocês é maravilhoso, além de serem profissionais altamente capacitados... Bom seria se todos os ambientes de trabalho da nossa UFMA fossem assim. Obrigado pelo carinho, pelos cafés regados de conversas descontraídas, risos, macaxeira cozida e cuscuz... Contem sempre comigo e principalmente para as resenhas (risos)!

Aos colegas e amigos de turma do PPGCS/UFMA conquistados ao longo desses anos, em especial a Isabela Bastos Jácome de Souza, Irla Correia Lima Licá e Érica Caldas, onde sempre estamos na arquibancada da vida, torcendo pelo sucesso e êxito mútuo nesse doutoramento, principalmente nos momentos de aflição (risos);

A Universidade Federal do Maranhão, como costume falar carinhosamente “A MÃE UFMA” e docentes do Departamento de Enfermagem (DEENF) em especial as professoras Dra. Maria Lucia Holanda Lopes (famosa Lucia Holanda), Dra. Ana Hélia de Lima Sardinha, Dra. Lena Maria Barros Fonseca, Dra. Poliana Pereira Costa Rabelo (Mon Chouchou) e Profa. Arlene de Jesus Mendes Caldas, gratidão pelo companheirismo, confiança e carinho de sempre. Sempre sinto a vibração positiva vindo de vocês para que eu conclua esse doutoramento;

Aos meus amigos e irmãos de jornada, que fui conquistando ao longo da vida, Pit (Maria da Piedade Portela), Pat (Ana Patrícia Sileoni), Naná (Maria Nazareth Trinta), Ju (Juliana Moura), Paulinho (Paulo Moreira), vocês são como irmãos e estão sempre presentes nos momentos que mais oportunos. Obrigado pela amizade sincera, pela confiança depositada e tantas coisas vividas e que iremos viver um dia;



Ao Fundo de Amparo a Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA), Centro de Pesquisa Clínica do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (CEPEC/HUUFMA), Laboratório Experimental para Estudo da Dor da UFMA (LEED/UFMA), Laboratório de Imunofluorescência e Microscopia Eletrônica do HUUFMA (LIME/HUUFMA) obrigado pelo apoio financeiro, logístico, utilização dos espaços físicos e equipamentos, para a concretização dessa pesquisa;

E por fim, a todos seres que contribuíram direta e indiretamente na execução deste trabalho, aos animais que doam suas vidas para a realização das pesquisas experimentais, em prol do progresso da ciência. Minha reverência e agradecimento.

## RESUMO

A endometriose é uma doença crônica e debilitante associada a dor pélvica e infertilidade acometendo mulheres em fase reprodutiva. Além do diagnóstico ser tardio na maioria das vezes, os tratamentos clínicos não são tão eficazes, pois não tratam definitivamente. A patogênese da endometriose é semelhante à de tumores, o processo de angiogênese é bem evidente, principalmente com a presença de proteínas que estimulam a proliferação de células endoteliais como, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de crescimento de fibroblastos (FCF $\beta$ ). Novas estratégias de tratamento têm sido pesquisadas, porém, contestadas. Neste contexto, a talidomida, ressurge como modalidade de tratamento farmacológico e pode-se hipotetizar que em doses ajustadas, possa produzir um efeito terapêutico. O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos antivasogênico e cicatrizantes da talidomida no modelo experimental de endometriose em ratas. Foram utilizadas 36 ratas da linhagem Wistar, as quais foram submetidas ao protocolo experimental de autotransplante de endométrio. Após diagnóstico da endometriose os animais foram divididos em 6 grupos: Grupo A: sham, Grupo B: controle negativo, Grupos tratados com talidomida em diferentes doses (C: 25mg/kg, D: 50mg/kg e E: 100mg/kg) e Grupo F: tratado com leuprolida (1mg/kg). Após 21 dias de tratamento os animais foram eutanasiados e o fígado, rim e os cornos uterinos foram coletados, para avaliação imunohistoquímica (Anti-VEGF) e histológica (fibroblastos e toxicidade). Os resultados demonstram que as ratas tratadas com talidomida dos grupos D (pvalor 0,014) e E (pvalor 0,017) e leuprolida (pvalor 0,001) tiveram os volumes dos implantes endometrióticos inibidos, quando comparados aos demais grupos. Histologicamente houve diminuições na expressão do VEGF e FCF $\beta$  nos grupos D, E e F. Ficou evidenciado ainda, alterações morfológicas no parênquima hepático do grupo D, E e F. Conclui-se que, para o modelo proposto nesta pesquisa, a talidomida proporciona uma recuperação volumétrica e histopatológica em implantes, principalmente nos grupos tratados com doses de 50 e 100 mg/kg produzindo efeito antivasogênico e cicatrizante satisfatório, contudo, há indícios de lesões no parênquima hepático destes grupos. Sugere-se então, que a talidomida possa ser eficaz no tratamento da endometriose.

Palavras-chaves: Endometriose; Tratamento; Talidomida; Fator de Crescimento Endotelial Vasogênico (VEGF); Ratas.

## ABSTRACT

Endometriosis is a chronic and debilitating disease associated with pelvic pain and infertility affecting women in the reproductive phase. In addition to the diagnosis being delayed in most cases, clinical treatments are not as effective, as they do not definitively treat. The pathogenesis of endometriosis is similar to that of tumors, the process of angiogenesis is quite evident, mainly with the presence of proteins that stimulate the proliferation of endothelial cells, such as vascular endothelial growth factor (VEGF) and fibroblast growth factor (FCF $\beta$ ). New treatment strategies have been researched, however, contested. In this context, thalidomide reappears as a pharmacological treatment modality and it can be hypothesized that in adjusted doses, it can produce a therapeutic effect. The objective of this work was to evaluate the antivasogenic and healing effects of thalidomide in the experimental model of endometrial autotransplantation. After diagnosis of endometriosis, the animals were divided into 6 groups: Group A: sham, Group B: negative control, Groups treated with thalidomide at different doses (C: 25mg/kg, D: 50mg/kg and E: 100mg/kg) and Group F: treated with leuprolide (1mg/kg). After 21 days of treatment, the animals were euthanized and the liver, kidney and uterine horns were collected for immunohistochemical (Anti-VEGF) and histological (fibroblasts and toxicity) evaluation. The results demonstrate that the rats treated with thalidomide in groups D (pvalue 0.014) and E (pvalue 0.017) and leuprolide (pvalue 0.001) had the volumes of the endometriotic implants inhibited, when compared to the other groups. Histologically, there were decreases in VEGF and FCF $\beta$  expression in groups D, E and F. It was also evidenced, morphological alterations in the hepatic parenchyma of the groups D, E and F. It is concluded, for the model proposed in this research, that thalidomide provides volumetric and histopathological recovery in implants, especially in groups treated with doses of 50 and 100 mg/kg, producing a satisfactory antivasogenic and healing effect, however, there are indications of lesions in the hepatic parenchyma of these groups. It is suggested that thalidomide may be effective in the treatment of endometriosis.

**Keywords:** Endometriosis; Treatment; Thalidomide; Vasogenic Endothelial Growth Factor (VEGF); Rats.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- Morfologia dos órgãos genitais femininos da mulher, com o útero em destaque.....	19
Figura 2	- Vista lateral da pelve e as formas de endometriose .....	22
Figura 3	- Os 6d's da endometriose que é composto pelas seis principais e mais prevalentes manifestações clínicas da doença .....	23
Figura 4	- Estrutura química dos enantiômeros da talidomida .....	30
Quadro 1	- Classificação do crescimento dos implantes endometriais .....	36
Figura 5	- Procedimento cirúrgico de endometriose experimental em ratas <i>Winstar</i> .....	37
Figura 6	- Linha do tempo experimental da pesquisa.....	39
Figura 7	- análise histopatológica dos implantes endometrióticos de ratas (Wistar), induzidas cirurgicamente e submetidas a diferentes terapêuticas e presença de fator de crescimento vasogênico (VEGF). .....	45
Figura 8	- Análise histopatológica dos implantes endometrióticos de ratas (Wistar), induzidas cirurgicamente e submetidas a diferentes terapêuticas e presença de fator de crescimento vasogênico (VEGF). .....	46
Figura 9	- Principais achados na análise histopatológica dos implantes endometrióticos das ratas (Winstar), induzidas cirurgicamente e submetidas a diferentes terapêuticas e presença de fator de crescimento vasogênico (VEGF). .....	47
Figura 10	- Análise histopatológica dos implantes endometrióticos de ratas (Wistar), induzidas cirurgicamente e submetidas a diferentes terapêuticas e presença de colágeno. ....	48
Figura 11	- Análise histopatológica dos implantes endometrióticos de ratas (Wistar), induzidas cirurgicamente e submetidas a diferentes terapêuticas e presença de colágeno e fibrose.....	49
Figura 12	- Análise histopatológica dos implantes endometrióticos de ratas (Wistar), induzidas cirurgicamente e submetidas a diferentes terapêuticas e presença de colágeno e fibrose.....	50
Figura 13	- Análise histopatológica de fígados de ratas (Wistar) com implantes endometrióticos induzidas cirurgicamente e submetidas a diferentes terapêuticas e processo de toxicidade pelas terapias medicamentosas. ....	51

Figura 14 - Análise histopatológicas dos córtex renais e glomérulos de ratas (Wistar) com implantes endometrióticos induzidas cirurgicamente e processo de toxicidade pelas terapias medicamentosas .....	52
Figura 15 - Análise histopatológicas dos córtex renais e glomérulos de ratas (Wistar) com implantes endometrióticos induzidas cirurgicamente e processo de toxicidade pelas terapias medicamentosas .....	53

**LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

aFGF	<i>Acidic Fibroblast Growth Factor</i>
ASRM	<i>American Society of Reproductive Medicine</i>
bFGF	<i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CHI3L1	<i>Chitinase-3-Like Protein 1</i>
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COX-2	<i>Ciclooxigenase 2</i>
COX-2	<i>Ciclo-Oxigenase 2</i>
ENL	<i>Erythema Nodosum Leprosy</i>
FGF-2	<i>Fibroblast Growth Factor 2</i>
FGFRs	<i>Fibroblast Growth Factor Receptors</i>
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
FSH	<i>Follicle-Stimulating Hormone</i>
GnRH	<i>Gonadotropin-Releasing Hormone</i>
HC-gp-39	<i>Human Cartilage Glycoprotein-39</i>
HDL	High Density Lipoprotein
HE	<i>Hematoxilina-Eosina</i>
HIV-1	<i>Human Immunodeficiency Virus 1</i>
IgM	<i>Imunoglobulina M</i>
IL-1	<i>Interleucina-1</i>
IL-6	<i>Interleucina-6</i>
IL-8	<i>Interleucina-8</i>
LEED	Laboratório Experimental para Estudos da Dor
LH	<i>Luteinizing Hormone</i>
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
MM	Mieloma Múltiplo
MMP-9	<i>Matriz Metaloproteinase-9</i>
PON-I	<i>Paroxonase 1</i>
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
TGF	<i>Fator de Crescimento de Fibroblasto</i>

TGF- $\beta$	<i>Fator de Crescimento de Fibroblasto-Beta</i>
TNF- $\alpha$	<i>Fator de Necrose Tumoral Alfa</i>
UFMA	Universidade Federal do Maranhão
USP	Universidade de São Paulo
VEGF	<i>Fator de Crescimento Endotelial Vascular</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	18
<b>2.1</b>	<b>Endometriose</b> .....	18
2.1.1	Conceito .....	18
2.1.2	Etiologia .....	20
2.1.3	Fisiopatologia .....	21
2.1.4	Classificação, estadiamento e manifestações clínicas .....	21
2.1.5	Diagnóstico .....	23
2.1.6	Biomarcadores .....	24
2.1.7	Tratamento da endometriose .....	26
2.1.8	Modelos experimentais em endometriose .....	28
<b>2.2</b>	<b>Talidomida como possível recurso terapêutico a endometriose</b> .....	29
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	33
<b>3.1</b>	<b>Geral</b> .....	33
<b>3.2</b>	<b>Específicos</b> .....	33
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	34
<b>4.1</b>	<b>Tipo de estudo, período, local</b> .....	34
<b>4.2</b>	<b>Aspectos éticos</b> .....	34
<b>4.3</b>	<b>Protocolo experimental</b> .....	34
4.3.1	Animais .....	34
4.3.2	Anestesia .....	34
4.3.3	Indução da endometriose experimental (primeira cirurgia) .....	35
4.3.4	Confirmação do diagnóstico da endometriose (segunda cirurgia) .....	36
<b>4.4</b>	<b>Eutanásia</b> .....	38
<b>4.5</b>	<b>Aferição dimensional</b> .....	39
<b>4.6</b>	<b>Processamento histológico</b> .....	39
<b>4.7</b>	<b>Processamento imuno-histoquímico</b> .....	40
<b>4.8</b>	<b>Análises histomorfométrica e histomorfológica</b> .....	41
<b>4.9</b>	<b>Análise estatística</b> .....	42
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	44
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	54
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	60



**REFERÊNCIAS** ..... 61  
**ANEXO** ..... 71

## 1 INTRODUÇÃO

A endometriose é uma condição ginecológica benigna, inflamatória crônica, estrogênio-dependente e de origem multifatorial, caracterizada pela proliferação benigna de tecido semelhante ao endometrial fora da cavidade uterina, com predomínio na pelve feminina (INTERNATIONAL WORKING GROUP OF AAGL *et al.*, 2021). Essa enfermidade tem relação com dismenorreia, dispareunia profunda, dor pélvica crônica e infertilidade (AGOSTINIS *et al.*, 2015; BERLANDA *et al.*, 2013) e acomete de 6% a 10% das mulheres em idade reprodutiva no mundo todo, além de 25 a 50% das mulheres inférteis e, 75 a 80% em mulheres com dor pélvica crônica (LIU, 2017).

Por ainda não ter uma patogênese totalmente definida, a endometriose tem características semelhantes as neoplasias como o crescimento progressivo e inativo, com tendência a metástase e recorrência, devido a angiogênese, principal fator de proliferação celular. As vias de diagnósticos são possíveis, mesmo que tardio, e com relação aos tratamentos clínicos ou cirúrgico, ainda não há um consenso na literatura de qual é o mais eficaz. Acredita-se que a cirurgia para cauterizar os focos endometrióticos e retirar as aderências formadas pela doença seja o tratamento definitivo, porém, existe a possibilidade de recidiva e a piora do quadro clínico (VERCELLINI *et al.*, 2014; PODGAEC *et al.*, 2018; TAYLOR *et al.*, 2021).

Havendo necessidade de novos medicamentos para o tratamento da endometriose, pois os tratamentos hormonais e anti-inflamatórios em uso atualmente não são tão eficazes (KENNEDY, *et al.*, 2005), a talidomida ressurge como possibilidade terapêutica e tem sido utilizada em estudos experimentais com resultados promissores (AZIMIRAD, *et al.*, 2014; BAKACAK, *et al.*, 2015; ANTÔNIO, *et al.*, 2019). Este fármaco já é usado de forma eficaz em tratamentos de muitas doenças devido as suas propriedades antiangiogênicas, anti-inflamatórias, pleiotrópicas e imunomoduladoras (JUNG *et al.*, 2019).

A angiogênese consiste em um processo sequencial iniciado nas células endoteliais, as quais proliferam, migram e aderem a outros tecidos. É um dos principais fatores associados a este processo é a presença de proteínas que estimulam a proliferação de células endoteliais, como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento de fibroblastos (FCF  $\beta$ ). Em seres humanos e animais, esses fatores encontram-se elevados em muitos tipos de tumores e tem sido proposta de indicadores de diagnóstico e prognóstico relacionado com a diminuição da sobrevida em diversos cânceres (GIUDICE; KAO, 2004; BULUN *et al.*, 2010; STRATTON; BERKLEY, 2011).

Por razões éticas, os efeitos da talidomida no tratamento da endometriose em mulheres não são suficientemente conhecidos, portanto um modelo experimental de endometriose, em ratas, induzidas cirurgicamente, foi usado neste estudo para pesquisar a eficácia deste fármaco com relação a angiogênese (VEGF), processo de cicatrização (FCF, FCF  $\beta$ ) e toxicidade medicamentosa.

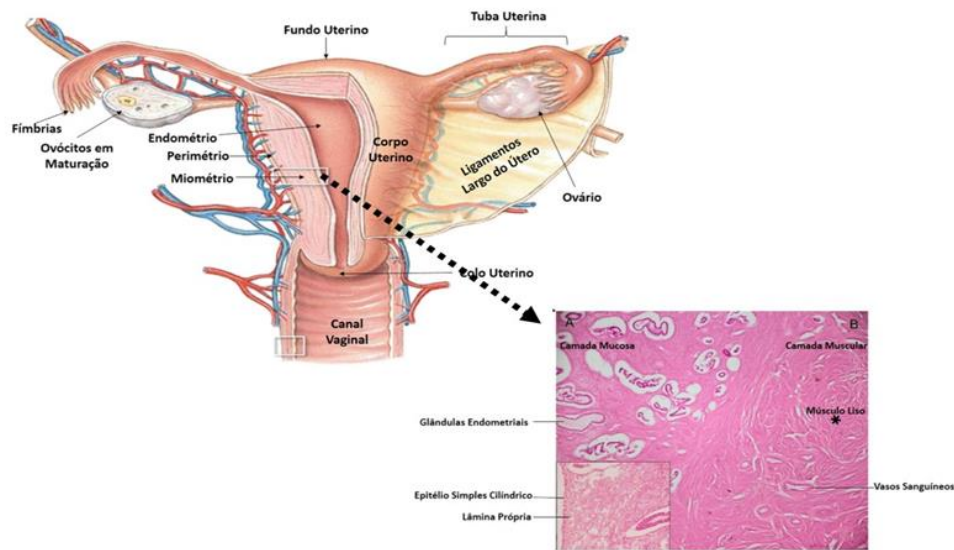
## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Endometriose

#### 2.1.1 Conceito

Na espécie humana o útero (Figura 1) é um órgão oco, visceral, em forma de pêra, localizado na pelve entre a bexiga e o reto, onde a parede uterina é relativamente espessa e apresentam 3 camadas: **perimétrio**, camada mais externa sendo **delgada serosa**, constituída de mesotélio e tecido conjuntivo, ou dependendo da porção do órgão, uma **camada adventícia**, constituída de tecido conjuntivo sem revestimento de mesotélio. As outras camadas uterinas são **miométrio**, com uma espessa camada de músculo liso, separadas por tecido conjuntivo e bem vascularizada. E o **endométrio** ou mucosa uterina, consiste é um epitélio e uma lâmina própria que contém glândulas tubulares simples, que contém duas camadas: a) **a camada basal**, sendo mais delgada e profunda, sendo adjacente ao miométrio, composta por tecido conjuntivo e pela porção inicial das glândulas uterinas, permanecendo inalterada para que suas células proliferem e regenerem a camada a cada ciclo menstrual; b) **a camada funcional**, é mais superficial, formada pelo restante do tecido conjuntivo da lâmina própria, sendo desprendida na menstruação (LAGANÀ *et al.*, 2017).

Os vasos sanguíneos que irrigam o endométrio são muito importantes para o fenômeno cíclico de perda da parte do endométrio durante o ciclo menstrual. E durante a menstruação pode haver eliminação, através das tubas uterinas, de material endometrial viável, o qual teria capacidade de implantação, e conseqüentemente, originar um quadro clínico denominado de endometriose (LAGANÀ *et al.*, 2017).



**Figura 1.** Morfologia dos órgãos genitais femininos da mulher, com o útero em destaque.

Nota: Notar as estruturas anatômicas e à direita, observar a histologia uterina, evidenciando o endométrio, miométrio e perimétrio.

Fonte: Tavares-Bastos e Oliveira (2020).

As primeiras descrições da endometriose datam do final do século XIX. Em 1893, Friedrich Von Recklinghausen, apresentou o primeiro relato de caso, entretanto, o cientista não soube referir a origem das glândulas no tecido adenomiosomatoso. Em 1894, Thomas Stephen Cullen, foi o primeiro cientista que observou a presença de glândulas derivadas da mucosa uterina, denominando-a de adenomioma e distinguindo-o em adenomioma intrauterino e extrauterino. Em 1903, o cientista Robert Meyer, ao realizar uma cirurgia de laparotomia em uma paciente com queixa de dor pélvica, identificou presenças de glândulas epiteliais em pontos cirúrgicos de fios de seda, recebendo a denominação de endometriose, pela primeira vez. A manifestação ovariana da doença, foi mencionada por Russel W. Aberrant, quando descreveu um caso de endometrioma (BENAGIANO *et al.*, 2011). Porém, em 1921 e 1927, coube a John A. Sampson, descrever a única origem endometrial, de todas as apresentações das doenças (SAMPSON, 1927).

Apesar de ser considerada uma condição ginecológica benigna, a endometriose pode cursar com sintomas como: dor pélvica crônica, dor durante a menstruação, dor durante a relação sexual e dismenorreia. A prevalência exata é desconhecida, contudo, a doença acomete de 6% a 10% das mulheres em idade reprodutiva no mundo todo, além de 25 a 50% das mulheres inférteis e 75 a 80% em mulheres com dor pélvica crônica (LIU, 2017). Nos Estados Unidos é a terceira causa de internação ginecológica e uma das principais causas de infertilidade em mulheres jovens (ZONDERVAN *et al.*, 2018). E no Brasil, Salomé *et al.* (2020), identificaram mais de 59 mil casos de internação por endometriose entre os anos de 2015 e

2019, onde 43% estavam na região sudeste e 26% na região nordeste, sendo o perfil bem característico para a doença como: mulheres casadas, em idade reprodutiva e nulíparas.

### 2.1.2 Etiologia

Para Maruyama e Yoshimura (2012), a histogênese da endometriose é controversa, pois existem várias teorias descritas na literatura: teoria implantação (menstruação retrógrada); teoria da metaplasia celômica e teoria das células tronco.

A teoria da implantação pelo mecanismo da menstruação retrógrada proposta por Sampson (1927), sendo a melhor e mais bem aceita, passou por aprimoramentos importantes dos estudiosos Parkin e Fazleabas (2016) e Ural *et al.* (2015). Adicionalmente a esse aspecto soma-se a possibilidade de metástases de tecidos linfáticos ou até de tecido endometrial surgirem e utilizarem a rede venosa para seu transporte. Ainda é considerado, que nessa teoria há a hipótese do implante iatrogênico que consiste em transferir material endometrial acidentalmente de um local para outro no mesmo sítio cirúrgico.

A teoria da metaplasia celômica foi delineada para explicar a presença de endometriose em mulheres que nunca menstruaram ou que apresentaram implantes em locais onde existam células de mesotélio como é o caso dos pulmões. Tal teoria afirma que existam células no mesotélio capazes de se diferenciarem em células endometriais iniciando uma resposta inflamatória clássica. Ainda, neste contexto se enquadra a teoria da implantação de restos embrionários que passam por estímulos adequados e diferenciam-se em tecido endometrial e implantam-se fora do útero. A teoria da indução, propõem que fatores presentes na menstruação ou no endométrio podem induzir a diferenciação celular (CACCIATORI; MEDEIROS, 2015).

A teoria das células tronco presentes no endométrio, tem se destacado, pois, tais células normalmente se encontram na camada basal do endométrio servindo como fonte para a regeneração do endométrio nos sucessivos ciclos menstruais. Esta teoria afirma que a endometriose ocorre por um transporte destas células por mecanismos distintos como menstruação retrógrada, disseminação linfática e vascular, migração direta ou uma combinação de todos até o local de implantação, influenciadas por fatores ainda não elucidados completamente. Estas células multipotentes iniciam seu processo de proliferação, muitas vezes dependentes dos ciclos hormonais, em especial em níveis adequados de estrogênios (FARKHAT *et al.*, 2016).

Além disso, Vercellini *et al.* (2014) referem sobre uma possível teoria genética, onde a predisposição genética ou alterações epigenéticas associadas a modificações no ambiente

peritoneal (fatores inflamatórios, imunológicos, hormonais, estresse oxidativo) poderiam iniciar a doença nas suas diversas formas.

### 2.1.3 Fisiopatologia

As lesões endometrióticas são heterogêneas, variando de lesões peritoneais superficiais de 1 mm a lesões profundamente invasivas de 4 cm junto ao septo retrovaginal. As lesões ovarianas da endometriose podem exibir aumentos de tamanhos da ordem de 4 a 10 cm, necessitando de ressecção cirúrgica. Estas também passam por ciclos de crescimento e sangramento conforme o ciclo menstrual, onde, o sangramento intraperitoneal a partir das lesões deflagra uma resposta inflamatória na pelve que está associada à dor e à infertilidade (CORRÊA, 2014).

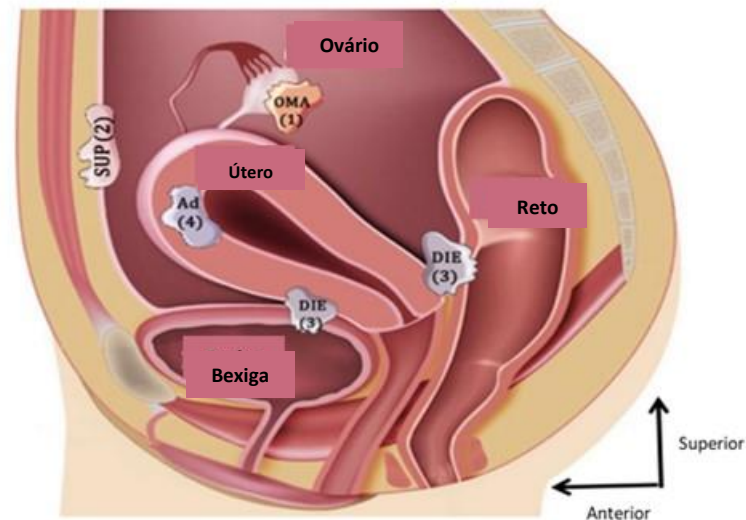
O processo inflamatório pélvico em mulheres com endometriose, decorrente de fenômenos vasculares mediados principalmente pela histamina, deflagram o início da produção local de mediadores inflamatórios que promovem um aumento da permeabilidade capilar e também quimiotaxia, processo químico pelo qual células polimorfonucleares, neutrófilos e macrófagos são atraídos para o foco da lesão. Essas células, por sua vez, realizam fagocitose dos elementos que originam a inflamação e produzem mais mediadores químicos, como citocinas [fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucinas], quimiocinas, bradicinina, prostaglandinas e leucotrienos. Junto a isso, há ativação plaquetária e sistema de coagulação sanguínea, e conseqüentemente, fatores de adesão são expressos na superfície das células endoteliais que revestem os vasos sanguíneos internamente. Esses fatores vão mediar a adesão e diapedese de monócitos circulantes, além de recrutar outras células inflamatórias para o local da lesão (JANSEN; CODDINGTON, 2010).

Segundo Bulun *et al.* (2010), além das alterações imunológicas na fisiopatologia da doença, parecem estar envolvidos expressivamente o aumento de VEGF e fibroblastos, induzindo a angiogênese e neovascularização dos focos endometrióticos, e contribuir para a formação de aderências, fibrose e produção de ciclo-oxigenase 2 (COX-2) que é elevada em células estromiais endometriais e no fluido peritoneal de mulheres com endometriose.

### 2.1.4 Classificação, estadiamento e manifestações clínicas

As lesões endometrióticas são frequentemente detectadas nos ovários, tubas uterinas, ligamentos do útero, área cervico-vaginal, parede abdominal e umbigo, trato urinário e reto

(LAGANÀ *et al.*, 2016), havendo 4 fenótipos para classificação conforme a localização: endometrioma ovariano, lesões peritoneais superficiais, endometriose infiltrativa subperitoneal profunda e endometriose interna (endométrio presente no miométrio – adenomiose) conforme a Figura 2 (CHANTALAT *et al.*, 2020).



**Figura 2.** Vista lateral da pelve e as formas de endometriose

Nota: **1:** endometrioma (OMA); **2:** endometriose peritoneal superficial (SUP); **3:** endometriose subperitoneal infiltrante profunda (DIE); **4:** adenomiose (Ad)

Fonte: Chantalat *et al.* (2020).

O sistema de estadiamento mais comumente utilizado é da American Society of Reproductive Medicine (ASRM), que classifica em 4 estágios e considerado o tamanho, a profundidade e a localização dos implantes endometrióticos e a gravidade das aderências, sendo: Estágio 1 (doença mínima): implantes isolados e sem aderências significativas; Estágio 2 (doença leve): implantes superficiais com menos de 5 cm, sem aderências significativas; Estágio 3 (doença moderada): múltiplos implantes, aderências peritubárias e periovarianas evidentes; Estágio 4 (doença grave): múltiplos implantes extensos, superficiais e profundos, incluindo endometriomas, aderências densas e firmes (ZONDERVAN *et al.*, 2018). Autores consideram que a intensidade de dor não está correlacionada com o estágio da doença e prognóstico em si, mas com a profundidade do implante endometriótico e localização em áreas de maior inervação (ANDRES *et al.*, 2018).

As manifestações clínicas mais evidentes e relatadas pelas mulheres portadoras de endometriose são dor pélvica crônica ou dor acíclica, dismenorreia, dispareunia de profundidade, disúria, dirquesia e dificuldade para engravidar, os “6D’s” da endometriose (Figura 3). Ainda, sintomas como alterações intestinais cíclicas (distensão abdominal, sangramento nas fezes, constipação e dor anal no período menstrual) e alterações urinárias



cíclicas (hematúria, polaciúria e urgência miccional no período menstrual), são em menor proporção, contudo, não se deve ignorar, até o diagnóstico médico está definido. Nos casos de endometriose profunda, a associação com a dor intensa é presente em 95% dos casos, já que a intensidade dos sintomas funcionais é proporcional à profundidade das lesões (STRATTON; BERKLEY, 2011).



**Figura 3.** Os 6d's da endometriose que é composto pelas seis principais e mais prevalentes manifestações clínicas da doença

Fonte: Created in CANVAS®.

A dor pélvica crônica apresenta-se como uma das manifestações mais evidentes e incidentes, além de ser um estímulo indesejável, independente da intensidade, podendo ser incapacitante, resultando no consumo contínuo e demasiado de medicamentos analgésicos e anti-inflamatórios, e consequentemente aos impactos dos efeitos adversos destes (MOROTTI *et al.*, 2016).

### 2.1.5 Diagnóstico

Podgaec *et al.* (2018) afirmaram que os sintomas da endometriose são considerados inespecíficos, podendo ocorrer em diversas doenças ginecológicas e não ginecológicas, tornando o diagnóstico retardado tardio, onde a média estimada do tempo entre o início dos sintomas referidos pelas mulheres até o diagnóstico definitivo é de aproximadamente 7 anos, havendo a necessidade de consultas médicas frequentes com e exames diagnósticos de boa acurácia.

Para diagnóstico definitivo da endometriose, o padrão ouro é uma intervenção cirúrgica denominada videolaparoscopia com biópsia das lesões para análise anatomopatológica, entretanto, achados nos exames físico, de imagem e laboratoriais já podem prever, com alto grau de confiabilidade, que a paciente apresenta a doença.

Dentre os exames de imagem, a ultrassonografia pélvica e/ou transvaginal, bem como a ressonância nuclear magnética, são os mais solicitados por serem eficientes, sendo utilizados principalmente para detectar lesões profundas, porém o resultado é altamente influenciado pela experiência do examinador, o que pode dificultar o diagnóstico. Nos casos sem achados positivos de imagem, é recomendado a análise histológica da lesão, coletadas por cirurgia videolaparoscópica. Todavia, este procedimento é oneroso, mais invasivo e requer anestesia geral (GUPTA *et al.*, 2016; NISENBLAT *et al.*, 2016; GUERRIERO *et al.*, 2018).

#### 2.1.6 Biomarcadores

A demanda por testes diagnósticos de alta acurácia e pouco invasivos são tendências para o diagnóstico clínico da endometriose (FALCONE; FLYCKT, 2018; LIU *et al.*, 2015; NISENBLAT *et al.*, 2016).

Fassbender *et al.* (2015) elencaram possíveis biomarcadores em estudos para detectar endometriose: Glicoproteínas (CA-125, CCR-1), marcadores imunológicos e citocinas inflamatórias (Proteína C reativa, IL-6, IL-8, YKL-40, TNF- $\alpha$ ), espécies envolvidas nos processos de estresse oxidativo (paroxonase 1 – PON-I), lipoproteína de alta densidade (*High Density Lipoprotein* – HDL) e plasma superoxide dismutase), espécies envolvidas nos processos de adesão e invasão celular (osteopontina, metaloproteinases – MMP-2, MMP-3 E MMP-9), moléculas envolvidas nos processos de angiogênese (VEGF - Fator de Crescimento Endotelial Vascular, FCF - Fator de Crescimento de Fibroblastos, FCF  $\beta$  Fator de Crescimento de Fibroblastos beta), hormônios (prolactina, leptina e luteinizante), autoanticorpos (anti-PDIK1L, anti-sIntaxina 5, IMP1, TPM3, SLP2, TMOD3), micro RNAs (miR-199a and miR-122), proteômica, metabolômica e DNA livre.

Dentre os biomarcadores principais e mais promissores no diagnóstico clínico, destacam-se:

- a) **Glicoproteínas:** a - *Dosagem Ca-125* (antígeno de câncer 125): quando coletado no primeiro ou segundo dia do ciclo menstrual, pode ser útil para o diagnóstico da endometriose em estágio avançado, principalmente quando os valores são superiores a 100 UI/ml, sendo este um dos mais utilizados na prática clínica; b - *Dosagem de*

*CCR-1* (receptor de quimiocina 1) que passou a ser requisitado por apresentar maior especificidade, sensibilidade e acurácia que o CA-125, porém é mais oneroso e não é capaz de estabelecer o diagnóstico definitivo. Embora concentrações normais não excluam a doença, casos com níveis elevados no pré-operatório podem auxiliar no acompanhamento da paciente e na suspeita clínica de recidiva da endometriose (NÁCUL; SPRITZER, 2010);

- b) **Interleucinas:** a - *Interleucina-1 (IL-1)*, *interleucina-6 (IL-6)*, *interleucina-8 (IL-8)* e *TNF $\alpha$* : em concentrações elevadas no fluido peritoneal de mulheres doentes, parece que contribuem para a persistência e progressão de focos de endometriose, porém a *IL-6* é a mais característica da endometriose, por ter sensibilidade de 63% e especificidade de 69%; b - Proteína *YKL-40* (chitinase-3-like protein 1 (CHI3L1), *human cartilage glycoprotein-39* (HC-gp-39), gp-38k, chondrex), biomarcador de inflamação, secretado por macrófagos ativados e neutrófilos em vários tecidos inflamados, quando dosados em altas concentrações séricas parecem ter relação com o diagnóstico e monitoramento da endometriose (NISENBLAT *et al.*, 2016; OTHMAN *et al.*, 2008; URAL *et al.*, 2015; VIGANÒ *et al.*, 2004);
- c) **MicroRNAs:** níveis de *miRNAs 199b-3p*, *224-5p* e *Let-7d-3p* no plasma são potenciais biomarcadores diagnósticos para pacientes com endometriose (ZAFARI *et al.*, 2021), e *miR-146a*, *miR-149* e *miR-499* podem ter um papel na patogênese da endometriose e por auxiliar na definição do melhor medicamento utilizado em terapias medicamentosas ou quimioterapias (FARSIMADAN *et al.*, 2021);
- d) **Metaloproteinase:** a *matriz metaloproteinase-9 (MMP-9)* é um membro das proteinases, estimulada pelo VEGF que desempenha um papel essencial na remodelação da matriz extracelular e possibilita a migração dos vasos (CHEN *et al.*, 2004). A superexpressão da enzima MMP-9 em lesões endometriais ectópicas primárias parece exacerbar a angiogênese e invasão de implantes ectópicos (MACHADO *et al.*, 2010; WEIGEL *et al.*, 2012);
- e) **Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF):** consiste em um fator de sobrevivência para as células endoteliais localizado no *gene 6p21.3* em humanos, onde foram identificados seis membros (VEGF A, B, C, D, E e PGF – Fator de Crescimento Placentário), sendo que o VEGF A é o membro mais estudado e melhor compreendido e o mais importante regulador da vasculogênese e angiogênese fisiológica ou patológica, que intermedia a neovascularização em lesões do endometriose conforme aumento e diminuição dos níveis de estrogênio (SHIBUYA;

CLAESSON-WELSH, 2006). Estudos relataram a maior concentração de VEGF no fluido peritoneal de mulheres com endometriose comparada com mulheres saudáveis e sua correlação com os estágios da doença (MCLAREN *et al.*, 1996; MAHNKE *et al.*, 2000);

- f) **Fator de Crescimento de Fibroblastos- $\beta$  (FCF- $\beta$ ):** são polipeptídicas com nove membros que expressão fibrose e colágeno tipo I e III, que são liberados por plaquetas, macrófagos, fibroblastos, onde controlam o crescimento, a diferenciação, o metabolismo celular durante as fases de cicatrização e quimioatraentes de monócitos, e induzem fibrose e angiogênese em implantes ectópicos e causam progressão da endometriose (HULL *et al.*, 2012; YOUNG *et al.*, 2017). O fluido peritoneal de mulheres com estágio III e IV de endometriose tem níveis mais elevados de TGF- $\beta$  em comparação com mulheres com estágios iniciais da doença, e uma diminuição significativa nas concentrações foi alcançada após o tratamento com um agonista do hormônio liberador de gonadotropina (GnRH) (KUPKER *et al.*, 1998).

#### 2.1.7 Tratamento da endometriose

No Brasil, existe um protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para tratamento da endometriose, estabelecido pelo Ministério da Saúde, onde está previsto tratamento clínico, cirúrgico ou ainda a combinação desses, no intuito de aliviar as dores causadas pela doença e estabelecer melhoria da qualidade de vida (BRASIL, 2016; SÃO BENTO; MOREIRA, 2017). Ainda não existe um consenso definindo qual a primeira escolha do tratamento, porém, considera-se a gravidade dos sintomas, a extensão e localização da doença, o desejo reprodutivo, a idade da paciente, efeitos adversos dos medicamentos, taxas de complicações cirúrgicas e custos. A eficácia dos tratamentos tem sido medida por avaliações de melhora da dor e taxas de fertilidade (SCHENKEN, 2014).

A endometriose geralmente fica inativa e regride gradualmente durante a amenorreia induzida ou menopausa. Mas, durante o período da menstruação, o tratamento é determinado pelo médico e os efeitos colaterais variam entre as pacientes, por isso, a individualização do tratamento torna-se mais importante e, às vezes, a combinação de medicamentos faz-se necessária (DAVIS; MCMILLAN, 2003).

O tratamento clínico baseia-se na supressão do ciclo menstrual induzindo pseudogravidez, pseudomenopausa ou anovulação crônica. O efeito terapêutico não é curativo e

os fármacos podem causar efeitos adversos significativos, o que justifica a busca de novos tratamentos. Os medicamentos considerados de primeira linha são os anticoncepcionais hormonais orais, administrados de forma contínua e cíclica e os derivados sintéticos da progesterona (noretridona, medroxiprogesterona e levonorgestrel) administrados por via oral, intramuscular, subcutâneo ou dispositivo intrauterino. Ainda, outros medicamentos como agonistas e antagonistas de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), danazol, gestrinona e inibidores de aromatase, também são usados. Os anti-inflamatórios não hormonais são prescritos frequente para o alívio da dor, mas possuem evidências inconclusivas como proposta definitiva para o tratamento da endometriose (GIUDICE, 2010).

No tratamento cirúrgico a laparoscopia é considerada o padrão ouro para tratamento da endometriose, onde os implantes peritoneais, nódulos profundos e cistos ovarianos são removidos, pois é o único meio eficaz para determinar o grau de aderências; embora forneça resultados satisfatórios para doença sintomática, a taxa de recorrência dos sintomas pode chegar a 20% ao ano, 75% em 2 anos, sendo necessário reabordagem cirúrgica (WASSON, 2019).

A técnica cirúrgica é minimamente invasiva, incluindo menores incisões abdominais, melhor visualização das lesões, menor necessidade de analgesia pós-operatória, recuperação rápida com baixos índices de complicações e menor tempo de internação hospitalar (COHN *et al.*, 2016; FANFANI *et al.*, 2016). Mais recentemente, a cirurgia laparoscópica robótica tornou-se disponível e tem sido implementada no tratamento da doença, bem como vem sendo utilizada em outros procedimentos ginecológicos (BERLANDA *et al.*, 2017).

Outros tratamentos são pertinentes e aceitos como: a fisioterapia específica para endometriose, considerado não invasivo e conservador de distúrbios do assoalho pélvico em mulheres. A fisioterapia objetiva ensinar o paciente a relaxar os músculos, o que, por sua vez, ajuda a quebrar o ciclo da dor e conseqüentemente atua na restauração da eficiência e função dos tecidos e órgãos da região pélvica, auxiliando no processo de tratamento cirúrgico, alívio da dor, melhorando a qualidade de vida (VURAL, 2018).

A prática de exercícios físicos também é indicada para o tratamento, no intuito de aliviar as dores, melhorar o estado psicológico e beneficiar a qualidade de vida das portadoras. O estímulo à prática de atividades físicas é reforçado pelas políticas públicas, sendo um fator de promoção de saúde, como forma de tratamento para doenças crônicas, pois a sua realização melhora os aspectos emocionais, físicos, sociais e culturais das portadoras, além de reduzir a ingestão de medicamentos e diminuir os gastos na saúde (SILVA; MARQUI, 2014).

Pode-se destacar também, o acompanhamento psicoterápico que é adjuvante no tratamento, pois manifestações como: humor deprimido ou ansiedade, diminuição acentuada

do interesse e do prazer pelas atividades anteriormente satisfatórias, perda ou aumento do peso, entre outros, estão relacionados diretamente com a dor. E é possível que a intensidade da dor determine o grau de depressão e ansiedade (SÃO BENTO; MOREIRA, 2017).

#### 2.1.8 Modelos experimentais em endometriose

O desenvolvimento de modelos *in vitro* ou *in vivo* que determinam as características da endometriose é uma tarefa desafiadora, pois apresenta mecanismos fisiopatológicos complexos, a pensar que: a doença é de diagnóstico geralmente tardio, pois os sintomas são comuns a outras doenças ginecológicas, tem início súbito, apresenta recidiva mesmo após o tratamento cirúrgico (MALVEZZI *et al.*, 2020). Dadas às limitações óbvias e as considerações éticas da experimentação humana, os estudiosos da área da endometriose consideram que modelos de animais como os ratos, camundongos e primatas não humanos são os melhores, pois reproduzem com melhor fidelidade as características fisiológicas e genéticas dos humanos, contudo, modelos de animais experimentais como coelhos, galináceos e outros roedores também são utilizados, porém com algumas limitações e ressalvas (BRUNER-TRAN *et al.*, 2018).

Segundo Story e Kennedy (2004), os modelos murinos são os mais amplamente empregados, pois a técnica operatória é simples e a maioria dos implantes tem sucesso, pois a indução da endometriose é eficaz e reprodutível, além disso, para esse tipo de escolha do modelo experimental com ratos é baseada em baixo custo e na resistência desses animais às infecções, contudo, as comparações são dificultadas pelo grande número de técnicas experimentais utilizadas e pela ampla lacuna filogenética entre não primatas e humanos. No entanto, um dos principais problemas do uso de roedores na pesquisa de endometriose é que apenas lesões superficiais podem ser induzidas nesses animais e esses são os tipos de lesão mais simples e talvez os menos clinicamente importantes (MALVEZZI *et al.*, 2020).

Diversos são os modelos experimentais propostos, como: Modelo experimental de Jones (1984), que consiste na fixação de fragmentos de endométrio retirados do corno uterino à parede lateral do abdome; Modelo de Vernon e Wilson (1985), que é a implantação de pequenos fragmentos de endométrio no mesentério e ligamento útero-ovárico desses animais; Modelo experimental de Sakata *et al.* (1990) onde são implantados fragmentos de endométrio sob a cápsula renal dos animais.

Embora haja um crescimento no número de estudos pré-clínicos de endometriose, a tradução dos achados obtidos por estudos em modelos animais em ensaios clínicos tem sido

escassos, principalmente associado a medicamentos não padronizados para tratar a doença, desta forma, isso denota lacunas no que tange a compreensão da doença, mecanismos fisiopatológicos e experimentação com novos compostos terapêuticos para endometriose (GUO; EVERS, 2013; MALVEZZI *et al.*, 2020).

Para atender aos critérios da pesquisa, optou-se pelo modelo experimental de Nogueira Neto *et al.* (2011) que é um modelo com técnica fixação de autotransplante de retalhos de corno uterinos (tamanho 4x4 mm), para o mesentério e próximo ao vaso que irriga o ceco. Desta forma, mantêm-se a superfície serosa do retalho em contato com o mesentério e a superfície endometrial voltada para a luz da cavidade peritoneal, onde nenhuma suplementação hormonal é administrada antes ou após o procedimento.

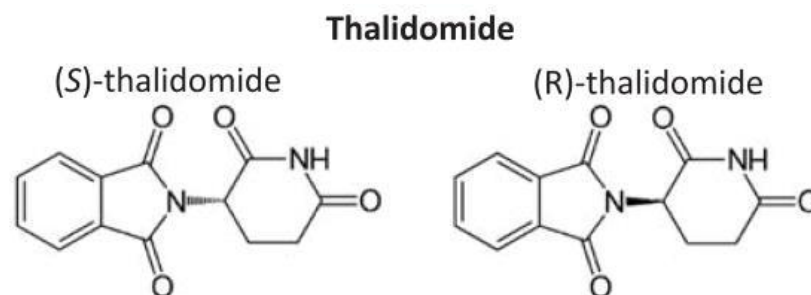
## **2.2 Talidomida como possível recurso terapêutico a endometriose**

O tratamento farmacológico da endometriose, em especial os relacionadas com o controle algico, na maioria das vezes é focado em terapias hormonais e, quando findados, percebe-se o retorno dos sintomas algicos e adjunta progressão da doença (BERLANDA *et al.*, 2017). Posto isto, verifica-se a necessidade um agente terapêutico eficaz, benéfico e de baixo custo em relação às cirurgias e outras formas terapia medicamentosa, onde pode-se destacar a talidomida, principalmente pelas propriedades farmacológicas da droga, que incluem atividade antivasogênica, antiinflamatória e de imunomodulação, tornando-a provável recurso terapêutico que pode ser utilizado em pesquisas para o tratamento de várias doenças (KUMAR; RAJKUMAR, 2006; COOK; FIGG, 2010).

A talidomida foi originalmente sintetizada no ano de 1954, pela empresa farmacêutica alemã Chemie-Grunenthal, inicialmente comercializada como um sedativo. Posteriormente, descobriu-se sua ação antiemética, eficaz para tratar enjôos matinais de gestantes, sendo amplamente comercializada em mais de 40 países (VARGESSON, 2009). No entanto, no início da década de 1960, McBride (1961) da Austrália e Lenz (1962) da Alemanha, de forma independente, relataram que o medicamento era altamente teratogênico. Quando as mulheres grávidas tomam talidomida, os recém-nascidos sofriam graves defeitos de desenvolvimento, como focomelia e orelha pequena, os índices de aborto aumentaram entre gestantes e casos de neuropatia periférica também foram relatados. Embora esse fármaco tenha sido retirado do mercado, os pesquisadores continuaram estudando seu mecanismo de ação e atividade (McCREDIE, 2009; STEPHENS, 2009; VARGESSON, 2009, 2013).

Segundo Moro e Invernizzi (2017), devido a tragédia e efeitos causados pela talidomida, veio à tona a necessidade de regulamentação no desenvolvimento de medicamentos, bem como para o desenvolvimento de protocolos de testes sistemáticos de toxicidade pelas agências regulatórias internacionais. Uhl *et al.* (2006) referem que a talidomida é cuidadosamente monitorada pelo programa *System for Thalidomide Education and Prescribing Safety* (S.T.E.P.S.), para que garanta que pacientes não estejam grávidas durante o tratamento.

A talidomida (α-N-ftalimidoglutarimida) é um análogo sintético do ácido glutâmico, um aminoácido natural envolvido em importantes processos fisiológicos como: neurotransmissão cerebral e metabolismo, sendo formada por dois anéis ligados, um anel de glutarimida e outro de ftalimida (Figura 4), possui um carbono quiral, que é instável e permite a coexistência de dois enantiômeros S(-) e R(+), em uma mistura racêmica na proporção de 1:1, que podem alternar rapidamente entre os dois estados quando em fluidos corporais e na água (FRANKS *et al.*, 2004). O S (-) determina as propriedades anti-TNFα, porém com ação teratogênica, já o R (+) efeito sedativo por ação direta e seletiva nos receptores dos centros do sono diencefálicos (DIAMANTI *et al.*, 2015).



**Figura 4.** Estrutura química dos enantiômeros da talidomida  
Fonte: Vargesson (2009).

A prescrição médica deste fármaco é recomendada a ingestão por via oral, principalmente à noite devido os efeitos sedativos. O pico deste medicamento na corrente sanguínea ocorre de 2 a 6 horas, sendo amplamente distribuída nos tecidos e fluidos corporais devido à baixa afinidade com as proteínas plasmáticas, e a meia-vida varia de 5 a 7 horas, possuindo metabolização por uma enzima de biotransformação, o citocromo P450 (CYP450); menos de 1% é eliminado inalterado pela urina, onde não é mais detectável após 48 h (FRANKS *et al.*, 2004). Neiger (2000) relatou que mesmo o paciente fazendo uso do medicamento constante e de forma controlada, o mecanismo de ação é bem amplo, pois ainda não se mensurou possíveis efeitos deletérios, por ser um fármaco extremamente teratogênico.



Takumi e Hiroshi (2020) afirmam que recentemente a talidomida e seus análogos como a pomalidomida (IMiD), lenalidomida (IMiD) e apremilast (SelCiD) são eficazes no tratamento de diversas doenças como: eritema nodoso hansênico (*Erythema Nodosum Leprosy* – ENL), artrite reumatoide, mieloma múltiplo (MM) recidivo, linfomas, sarcoma de Kaposi associado ao *Human Immunodeficiency Virus 1* (HIV-1), câncer de próstata avançado e complicações pós transplante de medula com a doença crônica do enxerto-versus-hospedeiro. Apresentam vários mecanismos terapêuticos onde destacamos: atividade imunomoduladora, anti-inflamatória, inibição de angiogênese para efeitos anticancerígenos, indução de apoptose de células cancerígenas, entre outros (MCFARLANE *et al.*, 2018; THERAPONOTOS *et al.*, 2009).

As propriedades imunomoduladoras e anti-inflamatórias ocorrem pela inibição da secreção de várias citocinas inflamatórias (IL-6, IL-10, IL-12) e pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ ), pois elas desempenham um papel na progressão do mieloma, além de ser um importante indicador de prognóstico para a doença. Também pode modular o padrão de linfócitos Th1 para Th2. Também reduzir, a produção de anticorpos em resposta a estímulos antigênicos. Ainda, foi demonstrada uma supressão da síntese de Imunoglobulina M (IgM), tornando-a útil em gamopatias monoclonais, como mieloma múltiplo (PALUMBO; ANDERSON, 2011).

A talidomida também pode atuar por meio da coestimulação de células T CD8<sup>+</sup> humanas e resultar no aumento da produção de interleucinas (IL-2 e IL-12) e Interferon  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ). A IL-2, aumenta a proliferação das células T, enquanto a IL-12 e o IFN- $\alpha$  ativam as células Natural killer (NK) para eliminar as células cancerosas (KAWAMATA *et al.*, 2006). Além disso, a combinação de anti-inflamatório com a talidomida pode aumentar significativamente as atividades antivasogênica e antitumoral da talidomida (TSAI *et al.*, 2018).

Morotti *et al.* (2016) descreveram as propriedades antivasogênicas e antiproliferativas, pois a talidomida desempenha um papel importante na inibição do VEGF e do Fator de Crescimento Fibroblástico tipo 2 (FGF-2). D'Amato *et al.* (1994) afirmaram que o seu uso foi capaz de diminuir os níveis plasmáticos desses fatores de crescimento vasogênicos em pacientes com mieloma múltiplo ou síndromes mielodisplásicas e sugeriram seu uso potencial para o tratamento de processos de doença dependentes de angiogênese. Desde então, a talidomida tem sido avaliada em vários tipos de câncer. Outros estudos experimentais com implantes de endometriose em ratas, referiram resultados promissores, porém não conclusivos (ANTÔNIO *et al.*, 2019; MACHADO *et al.*, 2010).

A talidomida exibe profunda inibição, dependente da concentração, da proliferação de células cancerosas resistentes a quimioterapia, por exemplo, células de mieloma múltiplo, onde esses efeitos podem estar relacionados à sua inibição na produção de IL-6, que é um importante

fator de crescimento para células deste tipo de tumor, e à síntese de DNA e progressão do ciclo celular, favorecendo a apoptose de células cancerosas (TSAI *et al.*, 2018).

Desta forma, mesmo a talidomida sendo teratogênica e capaz de produzir outros efeitos indesejáveis, é capaz de produzir efeitos benéficos anti-inflamatórios para tratar dores neuropáticas, condições crônicas intratáveis como a síndrome de dor regional complexa, dermatoses inflamatórias típicas de doenças crônicas e endócrino-metabólicas (FAVER *et al.*, 2005).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Avaliar os efeitos antivasogênicos e cicatrizante da talidomida em modelo experimental de endometriose em ratas *Wistar*.

#### **3.2 Específicos**

- a) Descrever o efeito antivasogênico da talidomida no modelo de endometriose experimental, via anti-VEGF;
- b) Avaliar o efeito cicatrizante da talidomida em endométrio uterino após tratamento experimental, via FCF $\beta$ ;
- c) Investigar a toxicidade do tratamento nos animais com endometriose;
- d) Analisar a evolução macroscópica dos focos endometrióticos após tratamento com talidomida;

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Tipo de estudo, período, local**

Este estudo experimental e analítico, foi realizado no período entre dezembro de 2019 a julho 2020 no Laboratório Experimental para Estudos da Dor (LEED) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), Campus São Luís.

### **4.2 Aspectos éticos**

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)/UFMA, sob o número de protocolo 23115.016944/2019-25 (ANEXO A). Todos os procedimentos experimentais estão de acordo com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as Diretrizes da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

### **4.3 Protocolo experimental**

#### **4.3.1 Animais**

Neste experimento, foram utilizadas 36 ratas *Wistar* adultas (2 meses de idade), procedentes do Biotério Central da UFMA, as quais foram mantidas em condições controladas de temperatura, luz e umidade (temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , umidade relativa 40 a 60% e ciclos claro/escuro de 12/12 horas). As ratas foram acompanhadas diariamente com registro de data, peso, substância administrada, aparência física, comportamento não provocado, resposta a estímulos externos, sinais clínicos, intercorrências e observações. Qualquer alteração nos parâmetros que incluíam mudanças na aparência, respiração, eliminações fisiológicas, dificuldades de locomoção, icterícia, anemia, sinais neurológicos e sangramentos foi avaliado pela equipe executora e também pelo médico veterinário que auxiliou durante pesquisa.

#### **4.3.2 Anestesia**

As ratas foram submetidas a anestesia inalatória com isoflurano (indução 5%, manutenção 2%). Após a certificação do plano anestésico, com a perda do reflexo córneo-

palpebral, realizou-se uma incisão sobre a linha mediana da parede abdominal com posterior exposição dos cornos uterinos e implantação intrauterina de tecido endometriótico conforme a Figura 5A (NEVES *et al.*, 2013).

#### 4.3.3 Indução da endometriose experimental

Os animais foram posicionados em mesa cirúrgica em decúbito dorsal, com os membros em abdução. Realizou-se a antisepsia da região abdominal utilizando solução de clorexidine a 2%. A técnica de autotransplante foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Nogueira Neto *et al.* (2011).

Realizou-se uma incisão mediana de 3 cm com bisturi de lâmina n. 15, acometendo pele, plano músculo-aponeurótico e peritônio, seguido de identificação dos órgãos intracavitários e exposição do útero, anexos e mesentério. O procedimento cirúrgico seguiu com identificação, apreensão, ligadura e secção do terço médio do corno uterino esquerdo usando fio de nylon 6-0 (Mononylon®, Ethicon, São Paulo, Brasil) com três pontos simples e hemostasia (Figura 5B).

Concomitantemente, realizou-se a secção da peça extraída do útero em cortes longitudinais, seguido de cortes transversais, formando retalhos com medidas de 4 x 4 mm, em meio líquido com ringer lactato®, sendo transpassado ponto com fio de nylon 6-0 na superfície serosa do retalho e mantido reparado. O retalho foi autotransplantado para o mesentério, próximo ao vaso que irriga o ceco, mantendo-se a superfície serosa em contato com o mesentério e a superfície endometrial voltada para a luz da cavidade peritoneal. A fixação foi realizada com um ponto simples do retalho reparado acima (Figura 5C).

A cavidade peritoneal ficou coberta com gaze embebida com solução fisiológica a 0,9% durante todo o procedimento. A síntese da parede abdominal foi realizada em dois planos de sutura contínua acometendo o plano músculo-aponeurótico e a pele com fio de nylon 5-0. É importante destacar que, nenhuma suplementação hormonal foi administrada antes ou após a laparotomia.

Após a primeira operação, todos os animais foram observados por 21 dias no Biotério Setorial da Pós-Graduação, com protocolo analgésico pós-operatório com cloridrato de tramadol na dose de (1mg para cada 100 gramas de peso), de 8/8 horas, por gavagem (FLECKNELL, 2016).

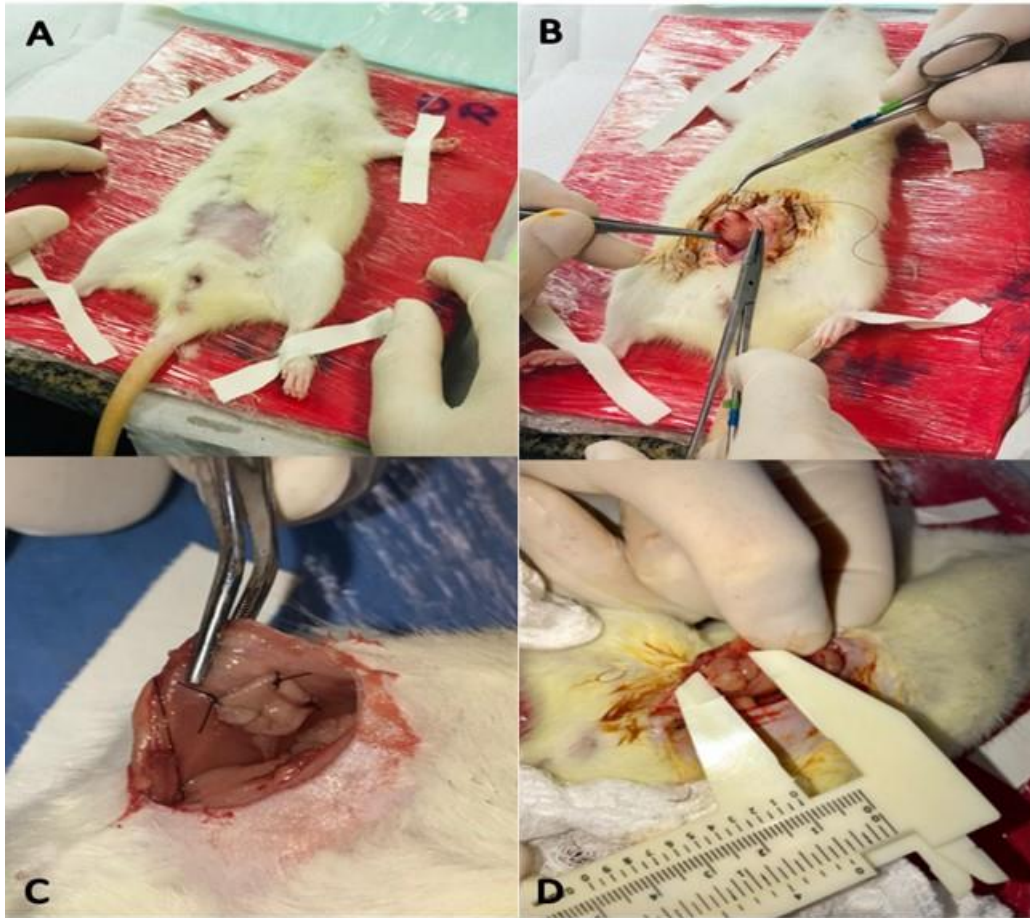
#### 4.3.4 Confirmação do diagnóstico da endometriose

Após o período inicial, as ratas foram submetidas a uma laparotomia exploratória na cavidade peritoneal com identificação e medida do foco de autotransplante com paquímetro digital, seguido do cálculo do volume [ $4\pi$  (comprimento/2) x (largura/2) x (altura/2)/3]. Os implantes foram classificados de acordo com o Sistema de Classificação dos Implantes em Grau de Crescimento de Quereda *et al.* (1996), conforme o Quadro 1. Somente aquelas que desenvolveram grau de crescimento cístico  $\geq$  III, ou seja, com diâmetro  $\geq$  4,5mm, seguiram no estudo (Figura 5D). Tal mensuração foi realizada por um mesmo cirurgião, de forma cega e aleatória.

<b>Grau de Crescimento</b>	<b>Características dos Implantes</b>
0	O implante desaparece, ou se visível não se torna um cisto.
I	O implante forma uma vesícula cujo diâmetro principal é <2 mm ou, se maior, é sólido
II	O implante forma um cisto com fluido, e seu diâmetro principal é > 2 mm, mas < 4,5 mm (menor que o tamanho inicial do implante)
III	O diâmetro da vesícula é semelhante ou maior que o tamanho inicial do implante (> 4,5 mm)

**Quadro 1.** Classificação do crescimento dos implantes endometriais

Fonte: Quereda *et al.* (1996).



**Figura 5.** Procedimento cirúrgico de endometriose experimental em ratas *Winstar*

Nota: **A:** Animal anestesiado, fixado em prancha cirúrgica e com abdômen inferior epilado; **B:** Ligadura e secção do corno uterino esquerdo; **C:** Autotransplante fixado em parede peritoneal; **D:** Confirmação da implantação da endometriose e medida dos volumes dos implantes por paquimetria.

Após 48 horas da laparotomia e diagnóstico da endometriose, iniciaram-se os tratamentos experimentais nos animais previamente selecionados, os quais foram divididos aleatoriamente em seis grupos:

- a) Grupo A (n: 06): Sham, grupo saudável (não operado e não tratado);
- b) Grupo B (n: 06): Controle negativo, operado e tratado com SF 0,9%, no volume de 1 ml/100g de peso corpóreo do animal, diariamente, administrado via oral (gavagem), por 21 dias;
- c) Grupo C (n: 06): Tratado com dose única diária com 25 mg/kg Talidomida diluídos em 0,5mL de solução salina, administrados via oral (gavagem), diariamente, por 21 dias;
- d) Grupo D (n: 06): Tratado com dose única diária com 50 mg/kg Talidomida diluídos em 0,5mL de solução salina, administrados via oral (gavagem), diariamente, por 21 dias;

- e) Grupo E (n: 06): Tratado com dose única diária com 100 mg/kg Talidomida diluídos em 0,5mL de solução salina, administrados via oral (gavagem), diariamente, por 21 dias;
- f) Grupo F (n: 06): Controle positivo, tratado com dose única em todo experimento com 1mg/kg Acetato de Leuprolida, administrados via subcutânea.

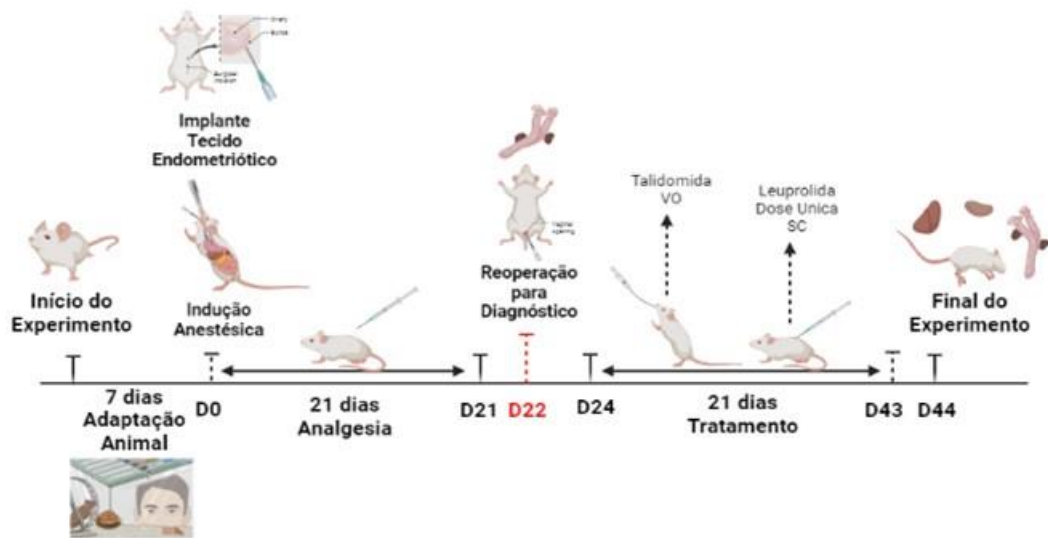
A decisão pelas doses de 25mg/kg, 50mg/kg e 100mg/kg de talidomida, foi estabelecida a partir de estudos prévios de Azimirad *et al.* (2014) e Bakacak *et al.* (2015). A dose única de 1 mg/kg, por via subcutânea de acetato de leuprolida foi baseada em estudos de Cavkaytar *et al.* (2015) e Goktolga *et al.* (2015).

#### **4.4 Eutanásia**

Os animais de cada grupo foram anestesiados com associação de cloridrato de cloridrato de ketamina (150mg/Kg) e cloridrato de xilazina (15mg/Kg). Após perda dos reflexos motores e constatação de perda do reflexo de retirada da pata por pinçamento, os animais foram posicionados em decúbito dorsal, toda a área ventral abdominal foi epilada, seguido da realização de duas incisões transversais: uma acima, margeando o rebordo costal, e outra abaixo, margeando os ossos pélvicos; e uma terceira incisão longitudinal lateral esquerda, unindo as incisões transversais, expondo completamente a cavidade peritoneal.

Realizou-se então a descrição da cavidade, identificação do local de implantação endometrial e novas aferições das dimensões dos autotransplantes foram tomadas, desta vez pós-tratamento, seguido de suas excisões. As peças retiradas (cornos uterinos, fígado e rins) foram limpas com soro fisiológico a 0,9% e acondicionadas em recipientes devidamente identificados e contendo paraformaldeído tamponado a 4%, para posteriores análises histopatológica e de imunohistoquímica. As carcaças dos animais foram encaminhadas à incineração de acordo com o protocolo do Biotério Central da UFMA. Para o método utilizado na pesquisa, criamos uma linha do tempo experimental, conforme demonstrado na Figura 6.





**Figura 6.** Linha do tempo experimental da pesquisa

Fonte: Created in BioRender®, em 2022.

#### 4.5 Aferição dimensional

Ao 22º dia pós-operatório de laparotomia (segunda cirurgia) para confirmação da endometriose e 44º dia de finalização do experimento (eutanásia), foi realizada a visualização das lesões e estabelecimento das áreas de endometriose com aferições dimensionais (largura e comprimento) com uso do paquímetro. Os valores tomados foram aplicados na fórmula para cálculo do volume  $[4\pi (\text{comprimento}/2) \times (\text{largura}/2) \times (\text{altura}/2/3)]$  e de acordo com os resultados, foram classificados conforme o Sistema de Classificação dos Implantes em Grau de Crescimento de Quereda *et al.* (1996) (Quadro 1).

#### 4.6 Processamento histológico

Avaliação histológica das peças anatômicas (corno uterinos, fígado e rins) foi realizada no Laboratório de Histologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP). Os órgãos de cada animal foram fixados em paraformaldeído a 4% (tampão fosfato) por 24 horas e depois desidratado em concentrações crescentes de álcool (70, 80, 95 e 100%), diafanizado pelo xilol e impregnados pela parafina líquida em estufa, regulada à temperatura de 60 °C, segundo a metodologia preconizada por Michalany (1998). Em sequência, os blocos foram cortados em micrótomo do tipo Minot, ajustado para 4 µm com distância entre os cortes de 50µm de acordo com o preconizado por (REGAN et al., 2005).

Os cortes assim obtidos, foram colocados em lâminas previamente untadas com albumina de Mayer e mantidos em estufas a temperaturas de 37 °C, durante 24 horas, para secagem em colagem. Três lâminas de cada animal foram então submetidas ao método de coloração pela hematoxilina e eosina (H.E), para marcação de constituintes celulares, Tricômio de Gômori para determinar a localização e o grau de fibrose e Picrosirius Red para marcação do tipo de colágeno endometrial, ambas determinam Fatores de Crescimento de Fibroblastos (FCFβ). Finalizadas colorações, foi efetuada a montagem das lâminas com lamínula e *Entellan Merck*<sup>®</sup>.

As lâminas foram analisadas e todos os achados foram fotodocumentados utilizando câmera fotográfica (AxioCam MRm<sup>®</sup>) acoplada ao microscópio (ZEISS<sup>®</sup> Imager.Z2). Para o material corado pelo método do Picrosirius Red, utilizou-se microscópio de luz polarizada, para posterior diagnóstico e comprovação científica, por parte de uma médica veterinária patologista.

#### **4.7 Processamento imuno-histoquímico**

A avaliação imuno-histoquímica é uma técnica utilizada para identificar e localizar proteínas específicas empregando anticorpos específicos. Esta foi realizada no Laboratório de Imunohistoquímica da FMVZ/USP. Os tecidos com implantes endometrióticos de cada animal foram fixados em paraformaldeído a 4% (tampão fosfato) por 24 horas e depois desidratado em concentrações crescentes de álcool (70, 80, 90 e 100%), diafanizado pelo xilol e impregnados pela parafina líquida em estufa, regulada à temperatura de 60 °C, segundo a metodologia preconizada por Michalany (1998). Em sequência, os blocos foram cortados em micrótomo do tipo Minot, ajustado para 4 µm com distância entre os cortes de 50µm de acordo com o preconizado por (REGAN et al., 2005). Três lâminas silanizadas de cada animal foram submetidas ao método da estreptavidina-biotina-peroxidase. Para estes experimentos, os cortes parafinados em lâminas silanizadas foram desparafinizadas em xilol (2x de 15 minutos em estufa à 60° C) e reidratadas em uma série de etanol com concentrações decrescentes (100, 95, 80 e 70%), água destilada e PBS (Phosphate Buffered Saline / Tampão fosfato-salino (5 minutos cada).

A reativação antigênica foi feita com tampão EDTA (tampão Tris-Acetato-EDTA), durante 20 minutos em microondas, em potência máxima. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada em solução de peróxido de hidrogênio diluído em metanol, durante 30 minutos, no escuro e em temperatura ambiente, obedecendo as orientações do fabricante.

Depois de lavagens com PBS, as reações inespecíficas foram bloqueadas com solução de leite desnatado a 5%, diluído em água destilada, durante 15 minutos em estufa à 36°C. Na sequência, as seções foram incubadas com o anticorpo monoclonal de camundongo anti-VEGF SC-507 – Santa Cruz – Biotechnology – INC (diluição 1:50, por 15 horas, em câmara úmida, a 4° C), e posteriormente foram imersas em solução tampão de lavagem por 5 minutos. Após, foi realizada a amplificação das reações com polímero envision flex (DAKO®) por 20 minutos e procedeu-se a contracoloração com hematoxilina e montagem.

Foi realizada imersão em água amoniacal, lavagem em água corrente, desidratação em álcool absoluto e imersão em xilol. Finalizadas as reações as reações imuno-histoquímicas, foi efetuada a montagem das lâminas com lamínula e *Entellan Merck®*.

Como controle externo positivo para VEGF foi utilizado o tecido endometrial do grupo Sham. Finalizando esta análise, todos os achados foram fotodocumentados utilizando câmara fotográfica (AxioCam MRm®) acoplada ao microscópio (ZEISS® Imager.Z2), para posterior diagnóstico e comprovação científica, por parte de uma médica veterinária patologista.

Para a interpretação da imunexpressão do VEGF utilizou-se como critério: a presença ou não de vasos sanguíneos com marcação da cor marrom-acastanhada nos endotélios vasculares da região endometrial, sendo que esta análise foi descritiva e subjetiva, categorizada como expressão positiva (marcação intensa a moderada do anticorpo no endotélio do vaso) e expressão negativa (marcação fraca a ausente do anticorpo no endotélio do vaso).

#### **4.8 Análises histomorfométrica e histomorfológica**

A análise das lâminas foi realizada no Laboratório Imunofluorescência e Microscopia Eletrônica do Hospital Universitário da UFMA (LIME/HUUFMA) por uma médica patologista.

##### **Histomorfométricas:**

- Para as lâminas da imuno-histoquímica (endométrie), foram analisados os processos inflamatórios observados nas lâminas e quantificados por área periimplante endometrial, como: neocelularização, proliferação vascular e congestão (acúmulo de sangue tecidual).

##### **Histomorfológicas:**

- Para lâminas coradas com Tricômio de Gômori (endométrie), foram analisados a localização e o grau de fibrose pela intensidade da coloração azul nas imagens captadas, onde o azul mais intenso determina o maior grau de fibrose no tecido e o azul mais claro o menor grau de fibrose tecidual (MONTES; JUNQUEIRA,

1998). A referência para o grau de intensidade considerado forte foi o tecido endometrial do grupo A (Sham). Os demais graus de coloração foram classificados em moderado, fraco ou ausente e a localização foi caracterizada como focal ou difusa. A análise desta coloração foi descritiva e subjetiva;

- Para as lâminas coradas com Picrossirius Red (endométerio), foram analisados os componentes do tecido conjuntivo, representado pelos tipos de colágeno: colágeno tipo I mostra-se como fibras grossas, muito birrefringentes de cor vermelho alaranjado, considerado um colágeno maduro, colágeno tipo III aparece sob a forma de fibras finas, fracamente birrefringentes e de predomínio de cor amarela e pontos esverdeados, considerado um colágeno em processo de maturação (MONTES, 1996). A referência para o colágeno tipo I ou mais maduro foi o tecido endometrial do grupo A (Sham). A análise desta coloração foi descritiva e subjetiva;
- Para lâminas coradas em HE (fígado e rim), foram feitas avaliações qualitativas da presença e tipo de fenômenos degenerativos, inflamações renais (no córtex e cálices renais, congestão em glomérulos e túbulos uriníferos) e inflamações hepáticas e toxicidade medicamentosa (espaço porta e cápsula; congestão sinusoidal; hiperemia; presença de granulomas nas regiões intralobulares e nos espaços porta). A análise desta coloração foi descritiva e subjetiva;

As imagens foram capturadas através de uma câmera de alta resolução (AxioCamICc da Carl Zeiss) adaptada ao microscópio de luz (AxioLab, Carl Zeiss) com objetivas de 40X que foram transmitidas ao computador com programa Windows 7 Ultimate, com auxílio do software AxioVision Se 64 Rel 4.9.1(Carl Zeiss).

#### **4.9 Análise estatística**

Os dados foram coletados a partir de uma ficha de avaliação, tabulados e comparados entre os grupos estudados. Utilizou-se o teste Shapiro-Wilk para testar a normalidade das variáveis quantitativas. A comparação das médias de diferentes grupos experimentais foi realizada com a análise de variância univariada (*One-way ANOVA*), seguida pelo teste de Tukey de múltiplas comparações. Na avaliação de duas fontes de variabilidade, foi utilizado análise de variância bivariada (*Two-way ANOVA*).

Os dados obtidos foram analisados através do software GraphPad Prisma<sup>®</sup>, versão 7.0 (GraphPad Software, San Diego, Inc., CA, USA) e os resultados que apresentaram probabilidade de ocorrência da hipótese de nulidade menor que 5% ( $p < 0.05$ ) foram consideradas estatisticamente significantes.

## 5 RESULTADOS

Observou-se uma redução estatisticamente significativa dos volumes dos implantes nos grupos tratados com talidomida: grupo D: 151,94 mm<sup>3</sup> (*p*valor 0,014); grupo E: 188,23 mm<sup>3</sup> (*p*valor 0,017) e leuprolida: grupo F: 117,71 mm<sup>3</sup>(*p*valor 0,047), conforme mostrado na tabela 1.

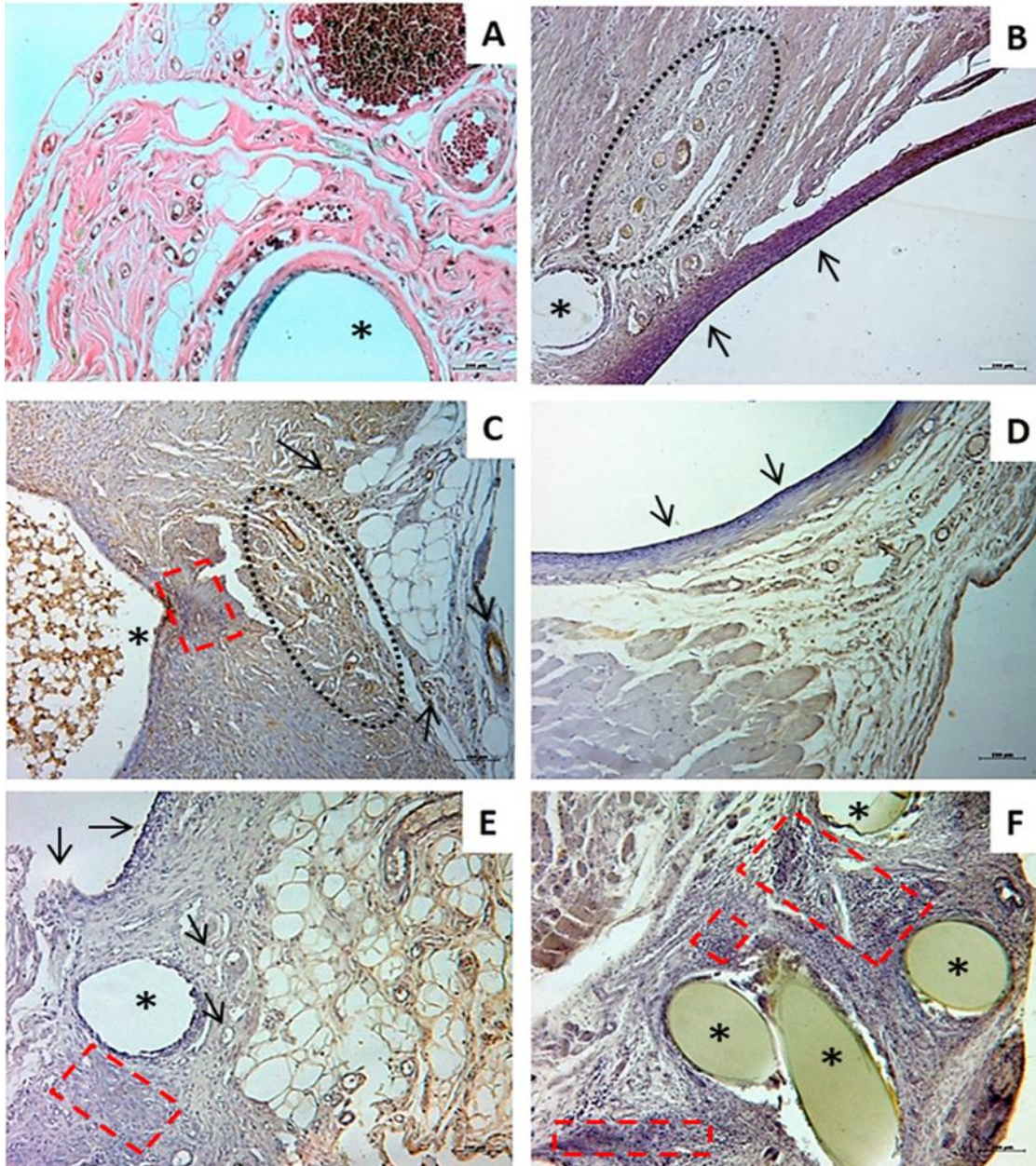
**Tabela 1.** Volume dos implantes endometrióticos de ratas (*Wistar*), induzidas cirurgicamente e submetidas a diferentes terapêuticas medicamentosas por 21 dias.

Grupos/Tratamento	Volume Inicial Média mm <sup>3</sup> ± dp	Volume Final Média mm <sup>3</sup> ± dp	<i>p</i> valor*
B Controle (-)	113,35 ±36,76	121,21 ±19,25	0,600
C Talidomida 25mg/kg/VO	99,56±76,61	50,35 ± 68,01	0,078
D Talidomida 50mg/kg/VO	157,73±102,20	5,79 ± 6,66	0,014
E Talidomida 100mg/kg/VO	193,45 ±129,22	5,22 ± 5,59	0,017
F Leuprolida 1mg/kg/SC	122,03 ± 29,82	4,32 ± 4,30	0,001

Nota: **B:** Grupo Controle negativo; **C:** Grupo 25 mg/kg de Talidomida; **D:** Grupo 50 mg/kg de Talidomida; **E:** Grupo 100 mg/kg de Talidomida; **F:** Grupo 1 mg/kg Acetato de Leuprolida.

\*Teste t pareado, para comparações intragrupos avaliando a média do volume inicial e final das lesões.

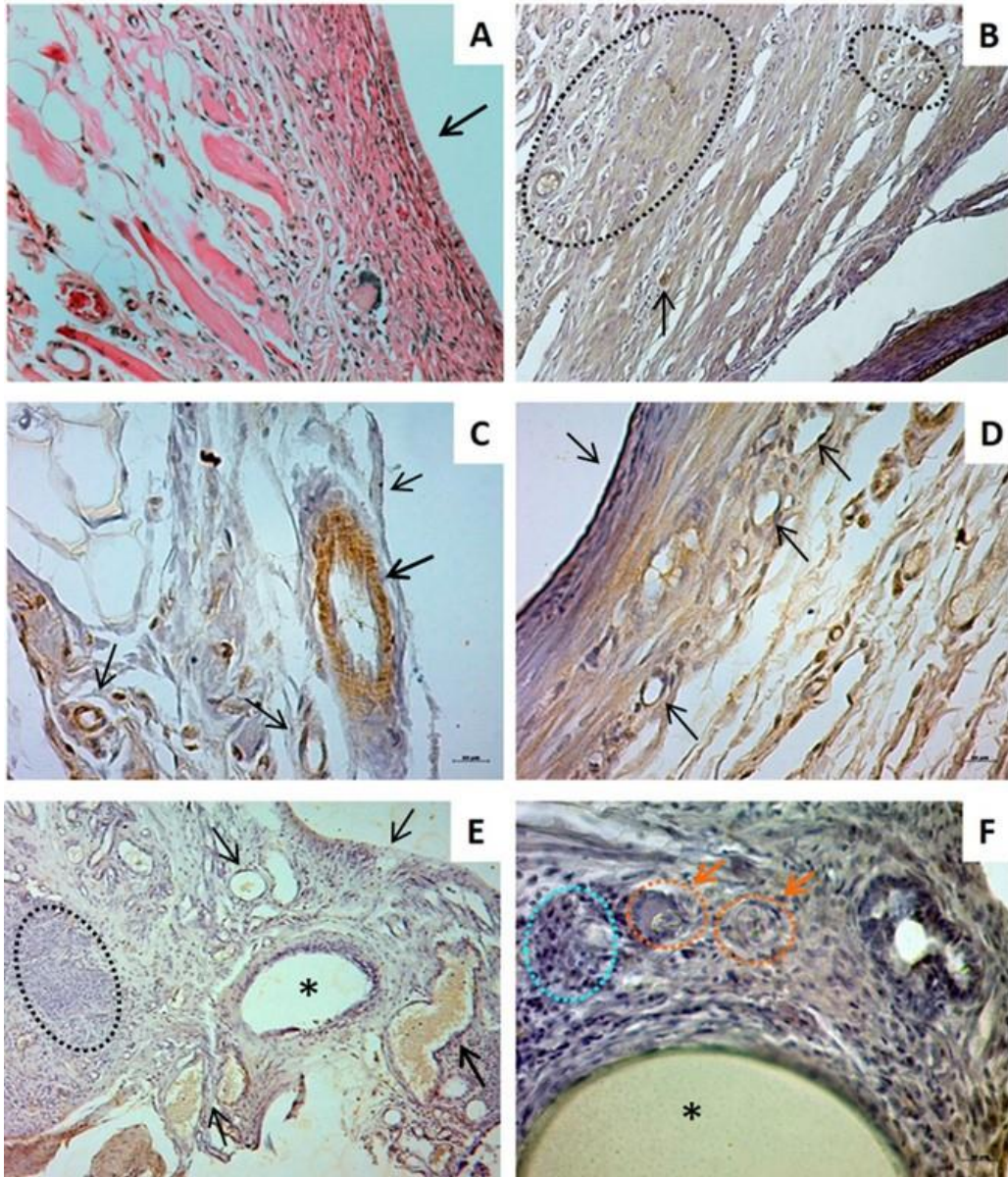
Na análise por imunohistoquímica, notamos nas Figuras 7 e 8 que nas ratas dos grupos B (controle negativo), C (25 mg/kg Talidomida) e D (50 mg/kg Talidomida), houve expressão positiva do VEGF, contudo é evidente a diminuição deste fator conforme o aumento das dosagens de talidomida. Nos animais dos grupos E (100 mg/kg Tadalomida) e F (1mg/kg Acetato de leuprolida) a expressão do VEGF foi negativa, não sendo evidenciado este fator nas estruturas endoteliais.



**Figura 7.** Análise histopatológica dos implantes endometrióticos de ratas (Wistar), induzidas cirurgicamente e submetidas a diferentes terapêuticas e presença de fator de crescimento vasogênico (VEGF). Aumento 10X. Anticorpo AntiVEGF.

Nota: **A:** Grupo Shan; **B:** Grupo Controle negativo; **C:** Grupo 25 mg/kg de Talidomida **D:** Grupo 50 mg/kg de Talidomida; **E\*:** Grupo 100 mg/kg de Talidomida; **F\*:** Grupo 1 mg/kg Acetato de Leuprolida.

Legenda: **A:** Endométrio íntegro, ausência de alterações inflamatórias e fibróticas, estroma ricamente vascularizado, presença de glândula e células decíduais. **B:** Endométrio com tecido epitelial estratificado e pavimentoso simples, estroma com implante endometrial, vascularizado e expressão positiva (marcação de cor marrom - anticorpo antiVEGF) e marcações inespecíficas. **C:** Endométrio com processo inflamatório, área de congestão (hemácias), vacuolização, expressão positiva em vasos (marcação de cor marrom - anticorpo antiVEGF) e marcações inespecíficas. **D:** Endométrio com epitélio moderadamente preservado, vascularizado com expressão positiva (marcação de cor marrom - anticorpo antiVEGF) e marcações inespecíficas no endométrio e miométrio. **E:** Endométrio com epitélio pobremente preservado e roto, com implante endometrial, processo inflamatório e diminuição da vascularização e expressão negativa (pouca/ausência marcação de cor marrom - anticorpo antiVEGF) e marcações inespecíficas com vacuolização e congestão no endométrio. **F:** Endométrio com várias glândulas, tipo cisto Naboth (conteúdo mucoso), presença de células decíduais com infiltrado inflamatório. Marcação negativa (ausência de vasos com marcação de cor marrom (anticorpo antiVEGF) e marcações inespecíficas com vacuolização e congestão no endométrio.



**Figura 8.** Análise histopatológica dos implantes endometrióticos de ratas (Wistar), induzidas cirurgicamente e submetidas a diferentes terapêuticas e presença de fator de crescimento vasogênico (VEGF). Aumento 40X. Anticorpo AntiVEGF.

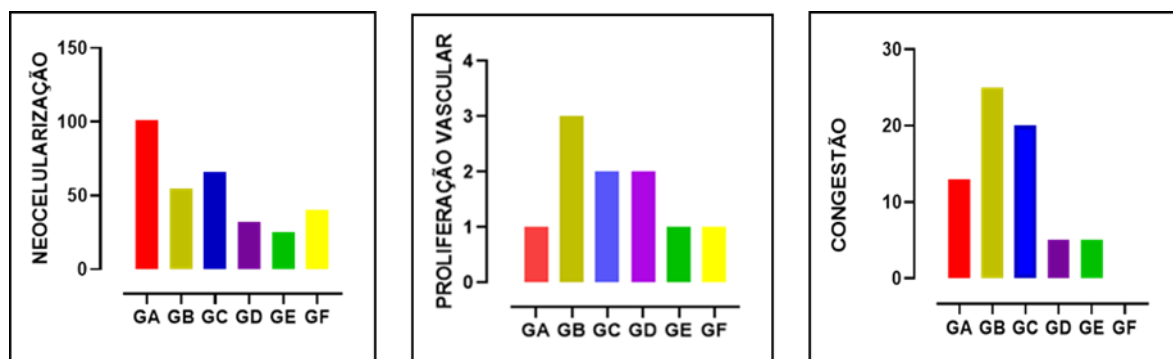
Nota: **A:** Grupo Shan; **B:** Grupo Controle negativo; **C:** Grupo 25 mg/kg de Talidomida **D:** Grupo 50 mg/kg de Talidomida; **E\*:** Grupo 100 mg/kg de Talidomida; **F\*:** Grupo 1 mg/kg Acetato de Leuprolida.

Legenda: **A:** Endométrio com camada epitelial bem preservada, íntegro e estroma ricamente vascularizado, presença de glândula e células decíduais. **B:** Endométrio com tecido epitelial estratificado e pavimentoso simples, na região estromal presença de implante endometriótico, vascularizado e expressão positiva (anticorpo antiVEGF) e marcações inespecíficas no endométrio. **C:** Endométrio com processo inflamatório, área de congestão (hemácias), vacuolização, vasos com expressão positiva (anticorpo antiVEGF) e marcações inespecíficas. **D:** Endométrio com epitélio moderadamente preservado, vascularizado com expressão positiva (anticorpo antiVEGF) e marcações inespecíficas. **E:** Endométrio com epitélio pobremente preservado, com implante endometrial, processo inflamatório e diminuição de vasos sanguíneos e expressão negativa (anticorpo antiVEGF), marcações inespecíficas com vacuolização e congestão no endométrio (presença de hemácias). **F:** Endométrio com glândula semelhante a cisto Naboth\* (conteúdo mucoso), presença de células decíduais, com infiltrado inflamatório intenso e presença de histiócitos multinucleados. Expressão negativa (anticorpo antiVEGF) e marcações inespecíficas com vacuolização e congestão no endométrio.



A Figura 9 mostra numa análise representativa da tendência do que se observa nas lâminas histológicas na presença do anticorpo antiVEGF. Os principais achados histológicos foram a neocelularização, proliferação vascular e presença de congestão. A neocelularização foi menor nos grupos D (50 mg/kg Talidomida) e E (100 mg/kg Talidomida). A proliferação vascular que é caracterizada pelo processo de angiogênese foi mais bem evidenciada nos grupos B (controle negativo), C (25 mg/kg Talidomida) e D (50 mg/kg Talidomida). A congestão que é o acúmulo de sangue tecidual, foi presente principalmente nos grupos B (controle negativo) e C (25 mg/kg Talidomida) e ausente no grupo F (1 mg/kg de Acetato de leuprolida).

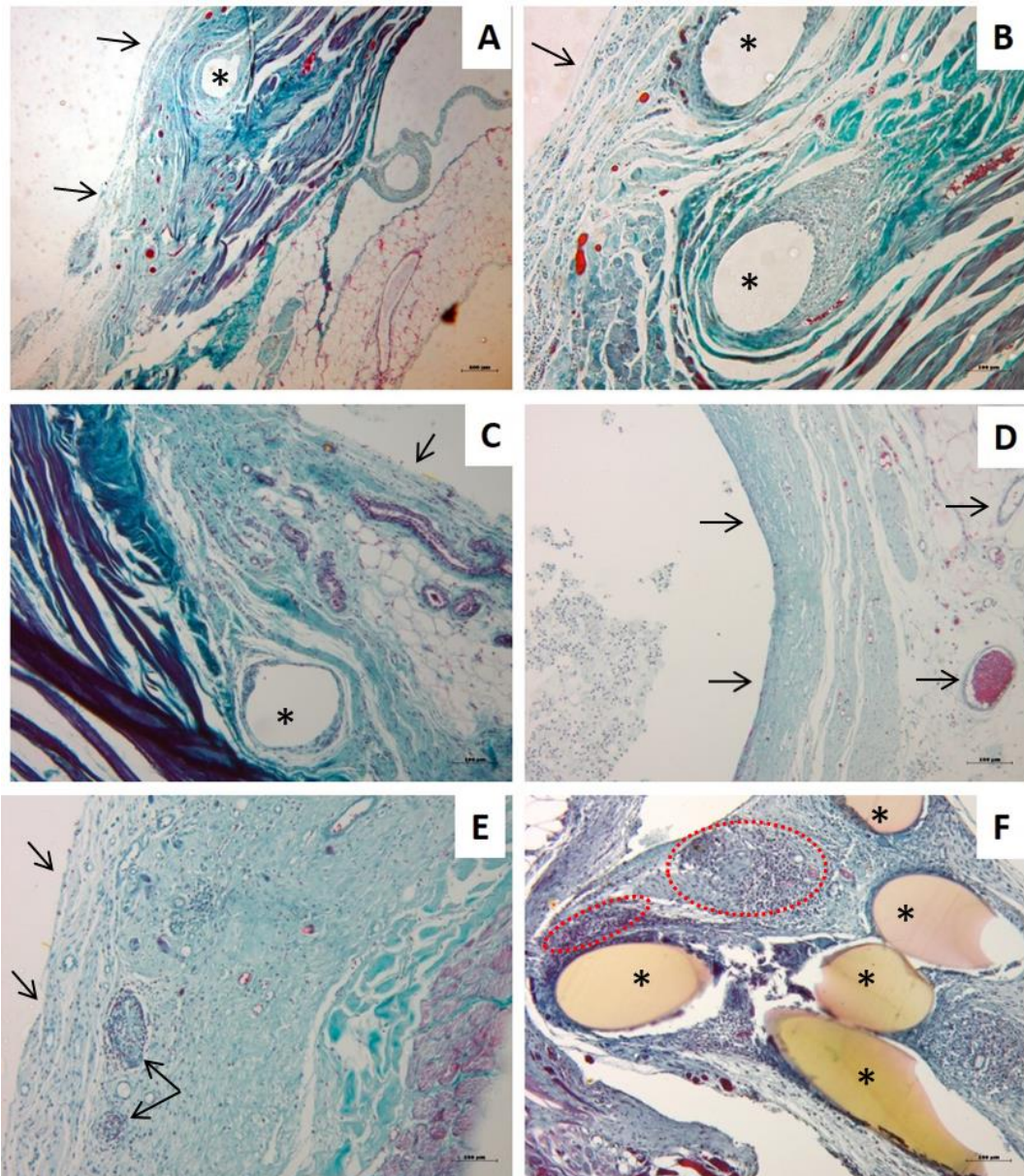
Vale ressaltar que para cada achado histológico, notamos uma tendência decrescente nos grupos tratados com talidomida, à proporção que aumentamos a dose do medicamento. E no grupo tratado com leuprolida esses achados variaram, mesmo assim, resultaram em diminuição da expressão do VEGF.



**Figura 9.** Principais achados na análise histopatológica dos implantes endometrióticos das ratas (*Wistar*), induzidas cirurgicamente e submetidas a diferentes terapêuticas e presença de fator de crescimento vasogênico (VEGF).

Nota: **GA:** Grupo Shan; **GB:** Grupo Controle negativo; **GC:** Grupo 25 mg/kg de Talidomida; **GD:** Grupo 50 mg/kg de Talidomida; **GE:** Grupo 100 mg/kg de Talidomida; **GF:** Grupo 1 mg/kg Acetato de Leuprolida

A Figura 10 mostra que em todos os grupos de animais tratados houve presença de fibras colágenas identificadas (coloração azul) e difusas, contudo, nos grupos D (50 mg/kg Talidomida) e E (100mg/kg Talidomida), é evidente a perda do padrão epitelial, com coloração moderada e fraca no espaço endometrial. No grupo B (controle negativo) e grupo C (25mg/kg Talidomida) as fibras de colágenas apresentam cor mais intensa, principalmente na região muscular (miométrio). No grupo F (1 mg/kg Acetato de leuprolida) essa coloração azulada é moderada e difusa em todo endométrio e bem intensa e focal na região de perivacuolização (bolsas de coloração amarelada) localizadas na região endometrial, sugestivo de ação medicamentosa (deposição de estrogênio).

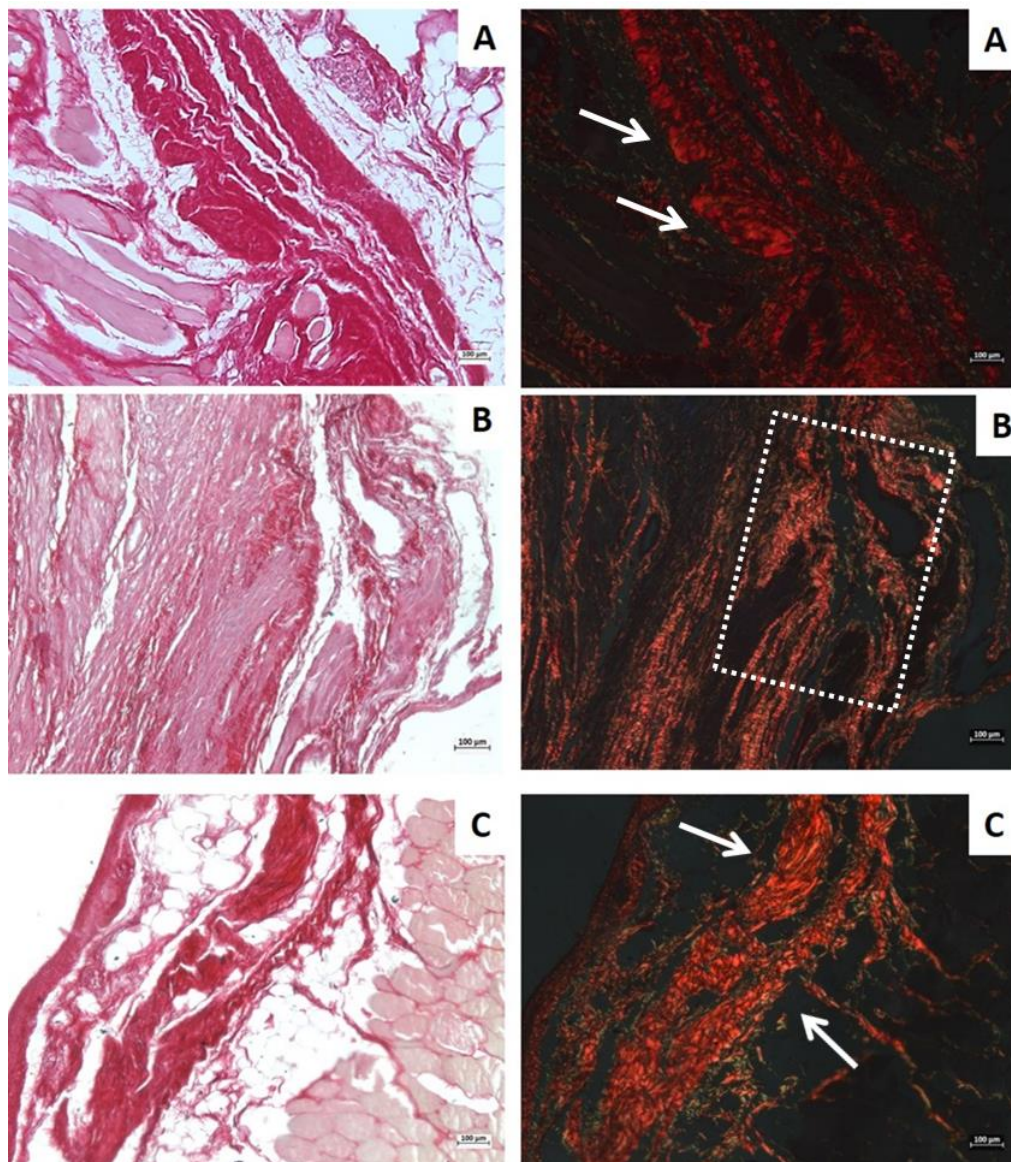


**Figura 10.** Análise histopatológica dos implantes endometrióticos de ratas (*Wistar*), induzidas cirurgicamente e submetidas a diferentes terapêuticas e presença de fibrose. Aumento 10X. Coloração Tricômio de Gômori.

Nota: **A:** Grupo Shan; **B:** Grupo Controle negativo; **C:** Grupo 25 mg/kg de Talidomida **D:** Grupo 50 mg/kg de Talidomida; **E\*:** Grupo 100 mg/kg de Talidomida; **F\*:** Grupo 1 mg/kg Acetato de Leuprolida.

Legenda: **A:** Endométrio com camada epitelial bem preservada, sem alterações patológicas, ausência de alterações inflamatórias, estroma ricamente vascularizado, com marcação azul intensa nas fibras colágenas de endométrio e miométrio. **B:** Endométrio com tecido epitelial estratificado e pavimentoso simples, na região estromal presença de implantes endometrióticos, vascularizado e marcação intensa (cor azul de fibras colágenas peri-implantes no endométrio e miométrio). **C:** Endométrio com processo inflamatório devido implante, área de congestão (hemácias), vacuolização com marcação intensa (azul claro de fibras colágenas na região estromal, marcação lilás nos vasos congestos (HE) e marcação azul escuro no miométrio). **D:** Endométrio com epitélio moderadamente preservado, com marcação moderada a fraca (cor azul claro de fibras colágenas), as hemácias dos vasos congestos com marcação de cor rosada (HE) e outras marcações inespecíficas. **E:** Endométrio com epitélio pobremente preservado, com marcação fraca (cor azul claro de fibras colágenas), com processo inflamatório (granulomas) e diminuição de vasos sanguíneos e marcações inespecíficas de cor azul e lilás no miométrio. **F:** Endométrio com marcação intensa (cor azul escuro de fibras colágenas nas regiões peri-císticas), (glândula semelhante a cisto Naboth\*), com conteúdo mucoso, e marcação fraca (azul na região estromal com presença de células decíduais), com infiltrado inflamatório intenso. Poucos vasos congestos com marcação de cor rosa (HE).

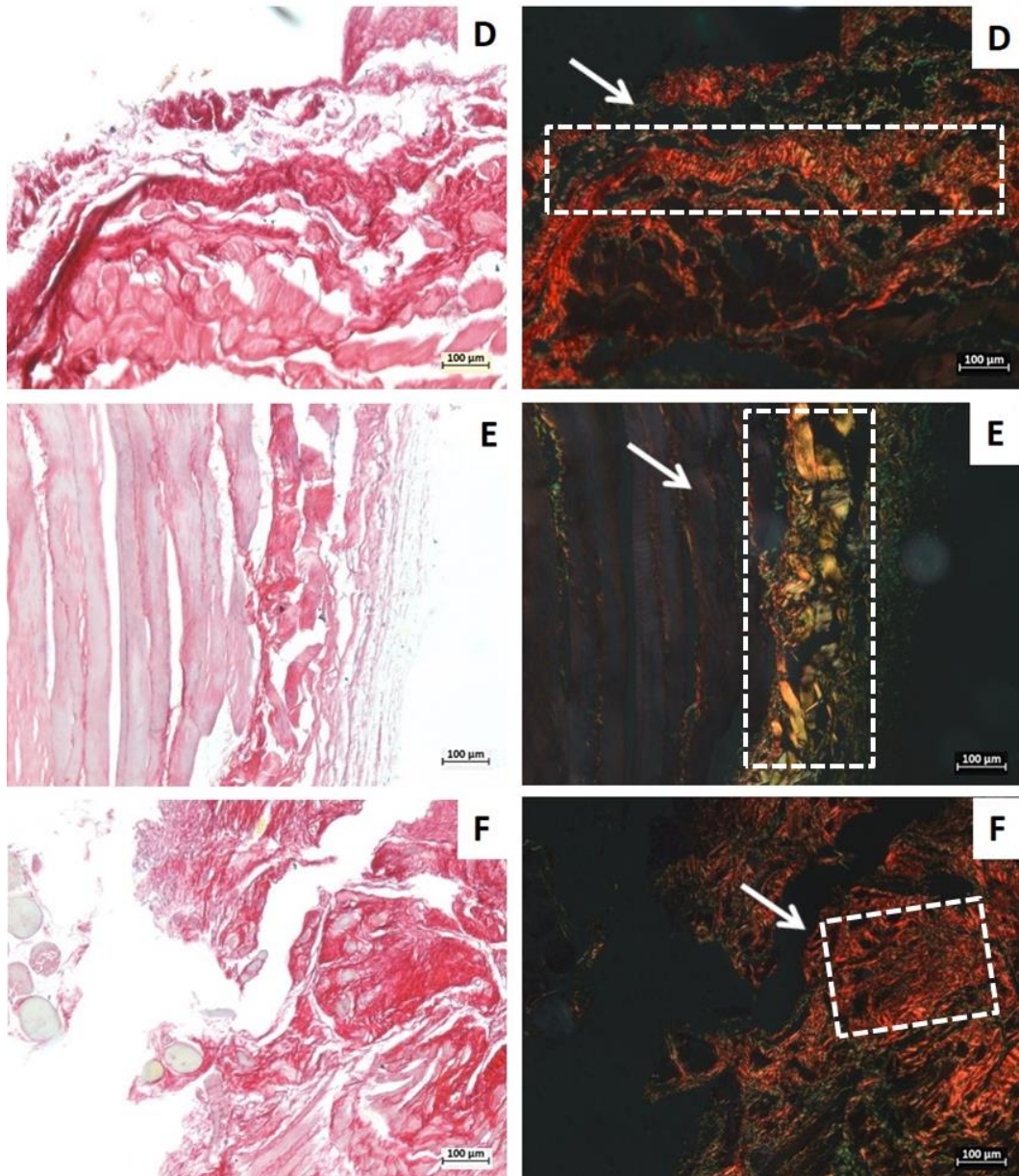
Nas Figuras 11 e 12, notam-se que nos grupos de animais tratados foi evidenciado uma variação na densidade de colágeno I (corados em vermelho-alaranjado) e com distribuição reticular e difusa pelo endométrio e áreas de miométrio. Nos grupos A (Sham), B (controle negativo), C (25 mg/kg Talidomida), D (50 mg/kg Talidomida) e F (1mg/kg Acetato de leuprolida) evidenciamos uma intensa deposição de colágeno I (coloração vermelho-alaranjado), demonstrando um colágeno mais maduro e processo de fibrose intensa. Já no grupo F (100 mg/kg Talidomida) nota-se uma deposição de colágeno III menos denso (coloração amarelada), típico de colágeno em processo de maturação.



**Figura 11.** Análise histopatológica dos implantes endometrióticos de ratas (*Wistar*), induzidas cirurgicamente e submetidas a diferentes terapêuticas e presença de colágeno. Aumento 10X. Coloração Picrosirius, em luz polarizada e não polarizada.

Nota: **A:** Grupo Shan; **B:** Grupo Controle negativo; **C:** Grupo 25 mg/kg de Talidomida.

Legenda: **A:** Endométrio com distribuição de colágeno tipo I (vermelho). **B:** Endométrio e miométrio com distribuição de colágeno tipo I (vermelho-alaranjado). **C:** Endométrio com distribuição predominante de colágeno tipo I (vermelho-alaranjado) e escassos pontos com colágeno tipo III (amarelo).



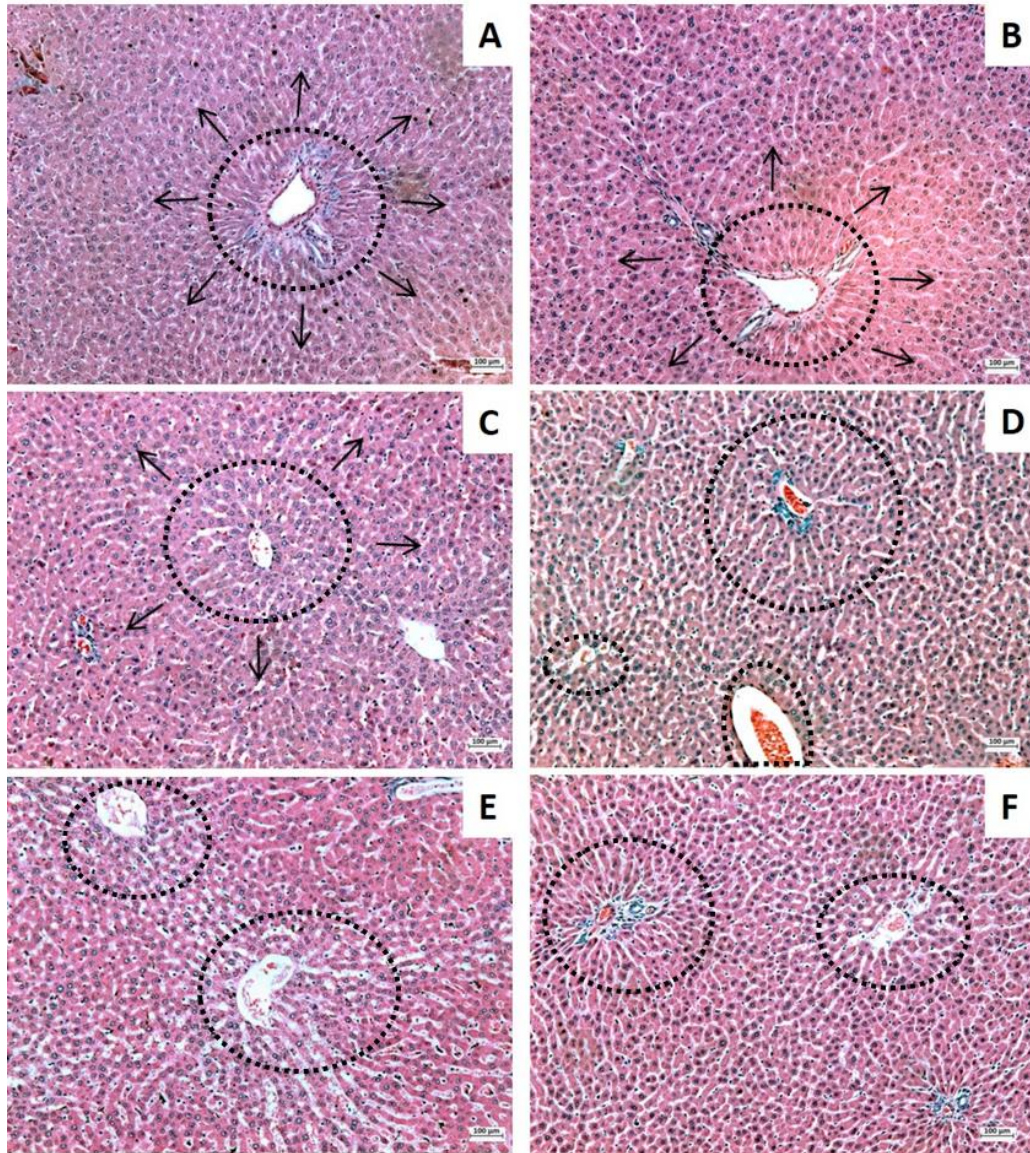
**Figura 12.** Análise histopatológica dos implantes endometrióticos de ratas (*Wistar*), induzidas cirurgicamente e submetidas a diferentes terapêuticas e presença de colágeno. Aumento 10X. Coloração Picrosirius, em luz polarizada e não polarizada.

Nota: **D:** Grupo 50 mg/kg de Talidomida; **E:** Grupo 100 mg/kg de Talidomida; **F:** Grupo 1 mg/kg Acetato de Leuprolida.

Legenda: **D:** Endométrio com distribuição predominante de colágeno tipo I (vermelho-alaranjado) e focos de colágeno tipo III (amarelo). **E:** Endométrio com distribuição predominante de colágeno tipo III (amarelo e verde). **F:** Endométrio com distribuição predominante de colágeno tipo I (vermelho-alaranjado) e focos de colágeno tipo III (amarelo).

Na Figura 13, observou-se que o grupo C (25 mg/kg Talidomida) manteve os padrões de normalidade com a manutenção de cápsula hepática, hepatócitos organizados em cordões e congestão em espaço porta (situação causada possivelmente pelo método de eutanásia), denotando baixa toxicidade. E nos grupos D (50 mg/kg Talidomida), E (100 mg/kg Talidomida) e F (1mg/kg Acetato de leuprolida) evidenciou-se alterações no parênquima hepático, com maior

desorganização morfológica, com degeneração hidrópica/balonizante/vacuolar, mudança de tom de coloração de hepatócitos, hepatócitos em formato de colmeia e com aumento da matriz extracelular, essas alterações que são típicas de toxicidade, em estágios avançados, provoca compressão dos capilares sinusóides deixando-os pouco visíveis e dificultando a circulação sanguínea.

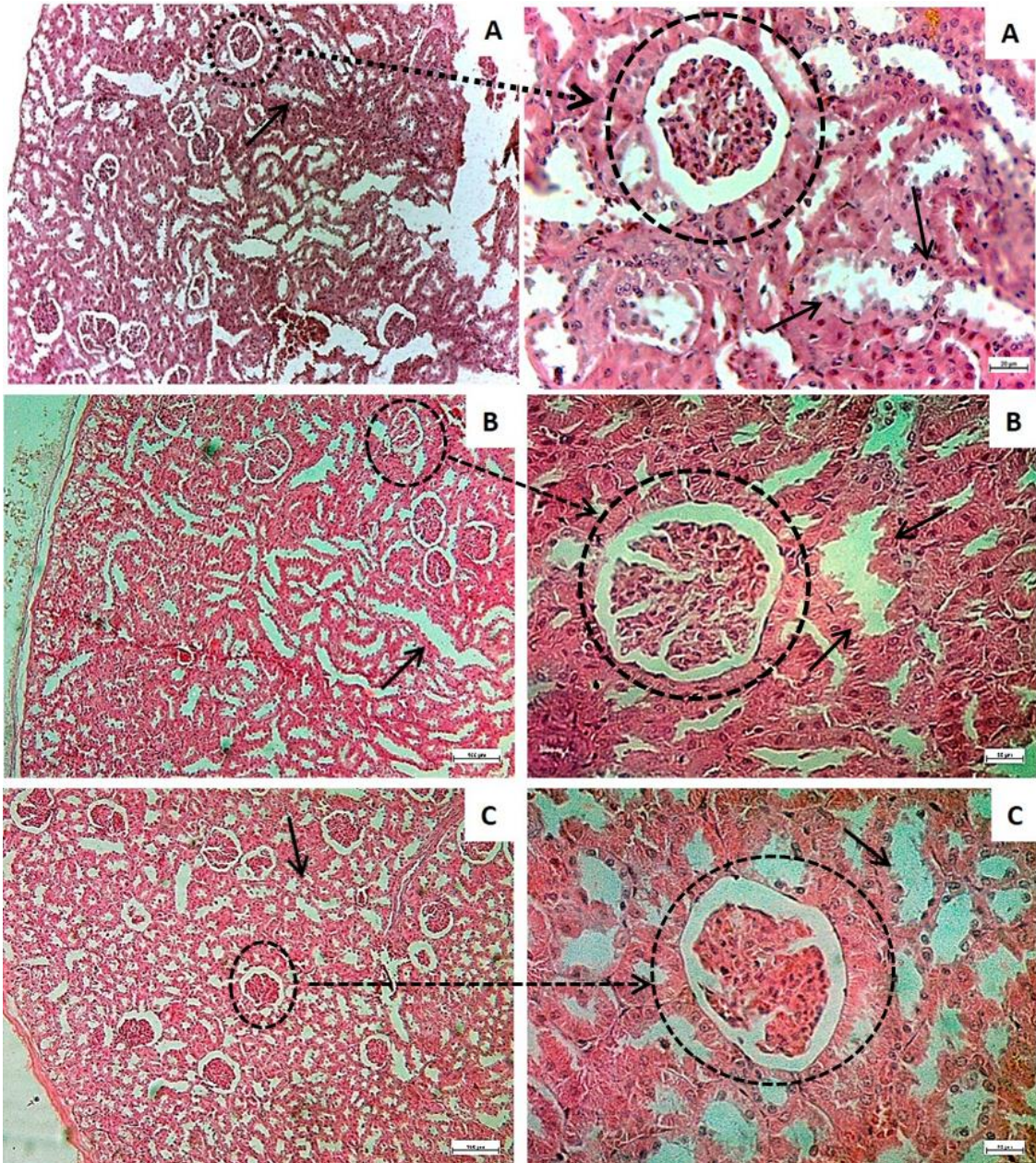


**Figura 13.** Análise histopatológica de fígados de ratas (*Wistar*) com implantes endometrióticos induzidas cirurgicamente e submetidas a diferentes terapêuticas e processo de toxicidade pelas terapias medicamentosas. Aumento 10X. Coloração HE.

Nota: **A:** Grupo Shan; **B:** Grupo Controle negativo; **C:** Grupo 25 mg/kg de Talidomida **D:** Grupo 50 mg/kg de Talidomida; **E:** Grupo 100 mg/kg de Talidomida; **F:** Grupo 1 mg/kg Acetato de Leuprolida.

Legenda: **A:** Fígado em padrão de normalidade, espaço porta sem congestão, hepatócitos organizados em cordões e marcações inespecíficas. **B:** Fígado com padrão de normalidade, espaço porta sem congestão, hepatócitos organizados em cordões. **C:** Fígado com padrão de normalidade, espaço porta com congestão (hemácias), hepatócitos organizados em cordões. **D:** Fígado com degeneração hidrópica, espaço porta congestionado (hemácia), com mudança de tom na coloração (HE), hepatócitos em formato de colmeia, com aumento da matriz extracelular e não alinhados. **E:** Fígado com degeneração hidrópica, espaço porta menos congestionado (hemácia), hepatócitos em formato de colmeia, com aumento da matriz extracelular e não alinhados. **F:** Fígado com degeneração hidrópica, espaço porta congestionado (hemácia), hepatócitos organizados em cordão.

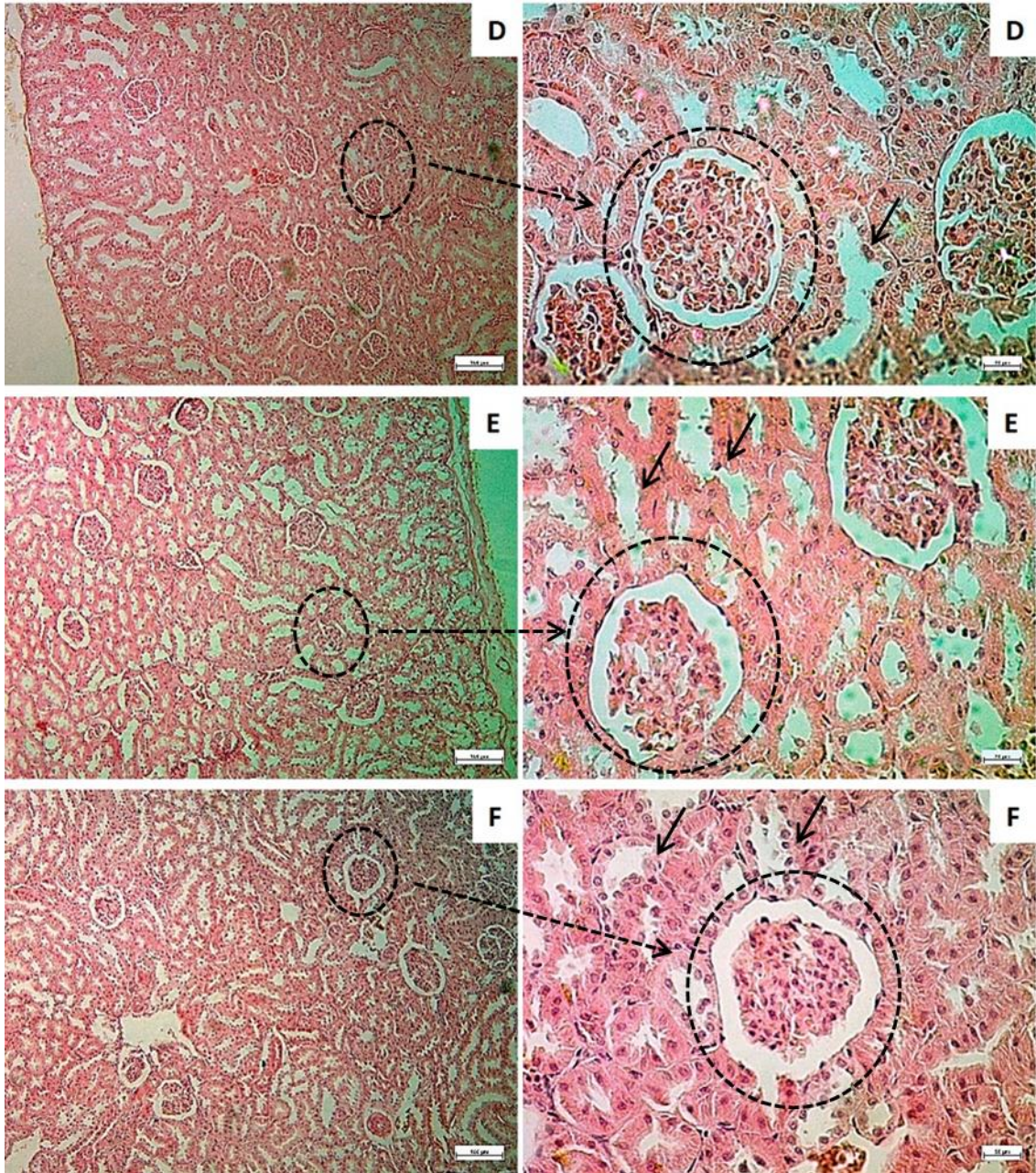
Nas Figuras 14 e 15 evidenciou-se que os grupos C (25mg/kg Talidomida), D (50 mg/kg Talidomida), E (100 mg/kg Talidomida) e F (1mg/kg Acetato de leuprolida) mantiveram a estrutura renal a nível de córtex e medula renal, nos padrões de normalidade, mantendo os corpúsculos renais com espaços uriníferos e túbulos renais íntegros, limpos e uniformes, denotando ausência de toxicidade no órgão.



**Figura 14.** Análise histopatológicas dos córtex renais e glomérulos de ratas (*Wistar*) com implantes endometrióticos induzidas cirurgicamente e processo de toxicidade pelas terapias medicamentosas. Aumentos de 10X (córtex) e 40X (glomérulo). Coloração HE.

Nota: **A:** Grupo Shan; **B:** Grupo Controle negativo; **C:** Grupo 25 mg/kg de Talidomida.

Legenda: **A/B/C:** Rim com capsula e córtex sem alterações, corpúsculo renal com espaços uriníferos limpos e túbulos renais uniformes e com padrão de normalidade.



**Figura 15.** Análise histopatológicas dos córtex renais e glomérulos de ratos (*Wistar*) com implantes endometrióticos induzidas cirurgicamente e processo de toxicidade pelas terapias medicamentosas. Aumentos de 10X (córtex) e 40X (glomérulo). Coloração HE.

Nota: **D:** Grupo 50 mg/kg de Talidomida; **E:** Grupo 100 mg/kg de Talidomida; **F:** Grupo 1 mg/kg Acetato de Leuprolida.

Legenda: **D:** Rim com capsula normal e córtex com discreto aumento do volume glomerular, corpúsculo renal com espaços uriníferos limpos e túbulos renais uniformes com padrão de normalidade. **E / F:** Rim com capsula e córtex sem alterações, corpúsculo renal com espaços uriníferos limpos e túbulos renais uniformes e com padrão de normalidade.

## 6 DISCUSSÃO

Para melhor compreendermos a fisiopatologia da endometriose associado ao uso da talidomida, o presente estudo reproduziu um modelo experimental que garantisse o estabelecimento da doença, permitindo o tratamento experimental e posterior avaliação de marcadores vasogênicos, fibroblastos e toxicidade, utilizando o modelo experimental desenvolvido por Nogueira Neto *et al.* (2011) e já realizado por Antônio *et al.* (2019). Além de comprovarem a eficácia do modelo, os achados morfológicos da endometriose possibilitaram a obtenção de análise histomorfométricas e imuno-histoquímicas dos tecidos, que se assemelham ao descrito na literatura para humanos.

Neste ponto é importante destacar o diferencial metodológico do presente estudo em relação aos autores citados anteriormente, pois, o protocolo experimental previu o autotransplante do endométrio, confirmação da endometriose por meio de segunda cirurgia, além de uma nova proposta terapêutica, a base de talidomida, fármaco que está em processo de redescoberta, após longo período de desuso. Outra vantagem que merece destaque no protocolo proposto é o tempo experimental que possibilitou um maior controle clínico e melhor análise dos efeitos terapêuticos da medicação.

Neste estudo, avaliamos a expressão do VEGF e FCF $\beta$  em modelos experimentais de ratas autotransplantadas com endométrio, onde os resultados evidenciam uma baixa ou ausência da expressão do VEGF e FCF $\beta$  à medida em que há o aumento da dosagem da talidomida, principalmente os grupos de animais tratados com 100 mg/kg de talidomida e 1mg/kg de acetato de leuprolida. Destacamos ainda, que as ratas tratadas com talidomida acima de 50mg/kg tiveram alterações no parênquima hepático, típicas de toxicidade medicamentosa. Nos grupos tratados com 25 mg/kg e 50 mg/kg de talidomida nota-se a expressão positiva do anticorpo no endotélio vascular.

A baixa ou ausência de expressão do VEGF tem relação com a baixa densidade de vasos e pode ter relação com três fatores: a redução da COX-2 que é responsável pela produção dos mediadores da inflamação de células endoteliais (GAZVANI; TEMPLETON, 2002) ou pela redução dos receptores VEGFR-1 e VEGFR-2 expressados predominantemente no endotélio vascular (DVORAK *et al.*, 1995; FERRARA, 2004) ou até redução de secreção de citocinas e interleucinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$ ), que são expressas nos tecidos das pacientes com endometriose, e que também influenciam diretamente na expressão de receptores de estrogênio (LIN *et al.*, 2006; LEBOVIC *et al.*, 2004).



Outros autores como Azimirad *et al.* (2014), Bakacak *et al.* (2015), Lourenço *et al.* (2019) e Young *et al.* (2015) com resultados semelhantes a este estudo, afirmaram que além da baixa expressão do VEGF produzido pelo uso de talidomida, há redução no volume dos implantes, nas contagens de leucócitos, linfócitos e interleucina 6 (IL-6) presentes no fluido peritoneal, confirmando o VEGF como um importante mediador angiogênico.

Esse efeito antivasogênico que a talidomida produz, foi relatado por D'Amato *et al.* (1994) quando conclui que, uso oral do fármaco, inibe a angiogênese induzida por FCF $\beta$  em modelos experimentais de tumor de córnea de coelhos, porém, naquela época, não estudou o mecanismo de inibição provocado pela talidomida. Anos mais tarde, Yagyü *et al.* (2005), Azimirad, *et al.* (2014) e Bakacak, *et al.* (2015) confirmaram que estes mecanismos de ação ocorrem devido a depleção de receptores VEGF (VEGFR-1 e VEGFR-2) que são expressos predominantemente nas células endoteliais, pela supressão de VEGF, do fator de crescimento de fibroblasto básico (*Basic Fibroblast Growth Factor* – bFGF) e das concentrações de citocinas e interleucinas como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$ .

Neste ponto, os resultados deste estudo, levam a confirmar que existe uma relação positiva entre expressão do VEGF e a endometriose pela via Anti-VEGF, contudo, a interferência da talidomida nessa via pode explicar os resultados do estudo. Ainda, o comportamento do tecido da endometriose é muito semelhante ao observado no crescimento tumoral devido as condições das estruturas teciduais, semelhante ao que foi relatado por Folkman (1971), que afirma o crescimento das neoplasias sólidas é sempre acompanhado do processo de neovascularização e dependem de fatores como: local de crescimento tumoral e ação de células endoteliais. O pesquisador afirmou ainda que, este mecanismo pelo qual os implantes tumorais estimulam a neovascularização deve ser compreendido antes de iniciar a terapia baseada na interferência da angiogênese, assim como realizamos neste estudo.

Bulun *et al.* (2010), confirmam em sua pesquisa, que a capacidade angiogênica e de neovascularização ocorrem durante o desenvolvimento da endometriose, associadas das alterações imunológicas na fisiologia da doença, já que perceberam aumento da expressão do VEGF e FCF $\beta$ , contribuindo para a formação de aderências, fibroses e produção de COX-2 que é elevada em células estromiais e no fluido peritoneal de mulheres com endometriose. Fato este constatado também por Belfort-Mattos *et al.* (2010) e Stepan *et al.*, (2012) quando observaram que a imunoexpressão do VEGF e a densidade de vasos aumentam de forma progressiva no processo de carcinogênese escamosa do colo uterino em mulheres. E salientam ainda que, o

VEGF tem potencial clínico como um preditor para a identificação de pacientes com câncer cervical uterino inicial e com alto risco de recidiva e piora do diagnóstico.

No que tange especificamente ao grupo tratado com a acetato de leuprolida que é um análogo do hormônio inibidor de gonadotrofina (GnRH), ressalta-se que a ação do medicamento pode ter provocado uma diminuição da expressão do VEGF, devido o mecanismo do medicamento que é capaz de inibir a ovulação, reduzindo os níveis séricos de estradiol e suprimindo o fluxo sanguíneo uterino, promovendo a suspensão do processo inflamatório da endometriose e conseqüentemente não havendo ação macrofágica e linfocitária (interleucinas e citocinas), onde que não foram ativados por não haver inflamação e tampouco descamação do endométrio (VERCELLINI *et al.*, 2014).

Esta é a razão pelo qual os inibidores de GnRH são medicamentos de primeira escolha para tratar da endometriose, justamente por promoverem uma ação central no hipotálamo e hipófise, inibindo a secreção de GnRH e conseqüentemente suprimindo os hormônios luteinizante (*Luteinizing Hormone* – LH) e folículo estimulante (*follicle-stimulating hormone* – FSH), promovendo a remissão da dor pélvica. Essa classe de fármaco é eficaz apenas no início das manifestações clínicas e não pode ser administrada a longo prazo por promoverem efeitos adversos como os decorrentes do estado de hipoestrogenismo induzido, perda de massa óssea e comprometimento cognitivo (OLIVE, 2008; ZONDERVAN *et al.*, 2020). Todavia, o tratamento com a talidomida não implica diretamente nesse bloqueio de função ovariana e suas conseqüências clínicas, o que configura certa vantagem terapêutica frente à leuprolida, apesar de exigir métodos contraceptivos em mulheres com idade fértil, devido seu alto potencial teratogênico (NASCIMENTO *et al.*, 2015).

Como a endometriose apresenta proliferação celular e neovascularização outro importante estimulador da angiogênese é o fator de crescimento de fibroblasto (FGF), outra molécula que motivou a realizar esta análise no presente estudo. A família do FGF é composta por nove membros, sendo que o FGF-1, ou FGF ácido (*Acidic Fibroblast Growth Factor* – aFGF), e o FGF-2, ou FGF básico (bFGF) são os de maior destaque. Eles interagem com receptores tirosina quinases na membrana plasmática (*Fibroblast Growth Factor Receptors* – FGFRs) resultando transduções de sinais em várias células. Esse mecanismo é complexo, sendo que para ativá-lo é necessária uma interação com proteoglicanos de heparan sulfato, onde o bFGF induz o aumento da proliferação, migração e diferenciação de células endoteliais, células da musculatura lisa e fibroblastos que expressam FGFRs (HYDER; STANCEL, 1999). Foi demonstrado também, que há um sinergismo entre FGF e VEGF, sendo que o FGF estimula a síntese de VEGF em linhagens de células tumorais (GOTO *et al.*, 1993).

Neste estudo, a expressão do FGF $\beta$  demonstrada pela presença de colágenos (tipo I e III) e fibrose nas camadas uterinas, por meio das coloração Tricômio de Gômori e Picrossirius Red, foi observada em todos grupos experimentais, porém, a intensidade de cor da expressão deste fator de crescimento, diminuiu conforme o aumento da dosagem de talidomida, resultado de perdas das estruturas de colágeno e fibrose nos implantes estudados. Du Gang-Ju *et al.* (2005) e Kastritis e Dimopoloulos (2007) apresentaram resultados semelhantes ao nosso estudo, dessa forma, assim como a talidomida atua inibindo da produção do VEGF, o mesmo faz com FGF $\beta$ . Pois, uma vez que o VEGF e o FGF $\beta$  são essenciais no processo de angiogênese, a talidomida tem a capacidade de inibir a formação de novos vasos sanguíneos, alterando o microambiente inflamatório e ainda existem evidências de que este fármaco tem capacidade de bloqueio do fator de crescimento epidermal (EGF), que também está associado a proliferação e diferenciação de vários tecidos (D'AMATO *et al.*, 1994).

Ainda, avaliou-se as possíveis alterações estruturais causadas pela talidomida, nos tecidos renais e hepáticas dos animais experimentados e não observamos alterações nas estruturas renais. Contudo, nas estruturas hepáticas, especificamente nos grupos tratados com 50 e 100mg/kg de talidomida e 1mg/kg de leuprolida, observou-se alterações indicativas de toxicidade como: degeneração hidrópica (caracterizada pelo acúmulo citoplasmático de água e eletrólitos, deixando as células com citoplasma claro à coloração histológica, com aspecto granuloso e alteração da proporção citoplasma/núcleo), mudança nas estruturas dos hepatócitos (formato de colmeia) e aumento da matriz extracelular, características típicas de lesões hepáticas induzidas por fármacos, vírus e doenças autoimunes, como referido por Ito *et al.* (2011), Vargesson (2013) e Yang *et al.* (2015).

Atualmente a talidomida é prescrita de forma controlada, por apresentar vários mecanismos terapêuticos como propriedade anti-inflamatórias, imunomoduladoras, antivasogênica e antitumoral, contudo, alguns efeitos indesejados do medicamento precisam ser melhor estudados. Takumi e Hiroshi (2020) referem que este fármaco além de ser capaz de bloquear a angiogênese, inibir atividade de bFGF, para ele ser metabolizado, é degradado pelo citocromo P450 (CYP450) no fígado, e o uso de forma não controlada pode induzir a bilirrubinemia, hepatite medicamentosa e insuficiência hepática.

Para Brasil (2014), a talidomida por ser um medicamento de uso controlado e restrito para humanos, está associada a poucos relatos de intoxicações, porém, os efeitos teratogênicos são relatos clássicos, além de efeito adverso com destaque para a neuropatia periférica, sonolência sedação, entre outros. Therapontos *et al.* (2009) e MC Farlane *et al.* (2017) relatam que a talidomida deve ser prescrita pelo médico de forma controlada e segura, atendendo as

recomendações dos órgãos de vigilância, mesmo que o paciente já faça uso para tratar várias doenças, principalmente crônicas como artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmicos (LES), mieloma múltiplo recidivo, até câncer de próstata avançado ou tumores cerebrais. Estes pacientes constantemente são avaliados clinicamente para evitar quaisquer iatrogenias causada pelo fármaco.

Também se verificou aspectos histomorfométricos dos tecidos com os implantes endometriais quanto as alterações volumétricas e identificou-se que o tratamento com talidomida inibiu o volume dos implantes endometrióticos, sendo mais expressivo nos grupos de animais tratados com 50 e 100 mg/kg de talidomida e 1 mg/kg de acetato de leuprolida, quando comparados aos demais grupos, resultado semelhantes a estudos de Nogueira Neto *et al.* (2011) utilizando composto *Uncaria tomentosa* (unha de gato) e Liu *et al.*, (2013) utilizando o fármaco pioglitazona, contudo em nenhum experimento foi relatado a extinção dos focos endometrióticos implantados.

Sikora *et al.* (2017) refere que a endometriose resulta em alterações morfológicas teciduais e o processo inflamatório que desencadeia a progressão da endometriose, alterando o volume, induzindo a dor e a infertilidade, causando a modulação ascendente de diferentes fatores inflamatórios como as interleucinas (IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8), fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), metaloproteinases, prostaglandinas, quimiocinas, expressão aumentada de ciclooxigenase 2 (COX-2), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), proteína quimiotática de monócitos tipo 1 (MCP-1). O uso da talidomida é capaz de reduzir o processo inflamatório devido as propriedades antivasogênicas e imunomoduladoras da talidomida (LEBOVIC *et al.*, 2004) e o acetato de leuprolida por ser hormônio inibidor de GnRH, sua ação é central e promove a suspensão do processo inflamatório da endometriose e conseqüentemente não há ação macrofágica e linfocitária (interleucinas e citocinas), por não haver inflamação e tampouco descamação do endométrio (VERCELLINI *et al.*, 2014).

Como pontos a serem melhorados em nossa pesquisa, elencamos uma maior variação nas doses ou dosagens da talidomida, para que se tenha um melhor controle do(s) efeito(s) terapêutico(s) e ação mais eficaz para evitar possíveis alterações nas estruturas hepáticas e processos de cicatrização. Outros limites metodológicos da pesquisa têm relação com o tempo único de tratamento até eutanásia dos animais, pois foi um fator que talvez pudesse ter um melhor desfecho quanto as reações adversas causadas pela talidomida. Um melhor controle e padronização das lâminas, a necessidade de escalas para avaliação de dados subjetivos na histologia para uma melhor avaliação e desfecho nos diagnósticos. Todavia, isso não desqualifica os nossos resultados e vislumbra-se potencial uso da talidomida para o tratamento

desta condição, considerando as recomendações e critérios dos serviços de vigilância e segurança técnica no uso do medicamento.

## 7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados do presente estudo, pode-se concluir que:

- a) O modelo experimental utilizado garantiu o estabelecimento da doença, permitiu o tratamento experimental e análises histológicas e de imuno-histoquímica;
- b) A expressão do anti-VEGF nos grupos de animais tratados com 25 e 50 mg/kg de talidomida foi positiva no endotélio vascular e nos grupos tratados com 100 mg/kg de talidomida e 1 mg/kg de acetato de leuprolida a expressão foi negativa, demonstrando que quanto maior a dosagem da talidomida maior é o efeito antivasogênico nos tecidos;
- c) A expressão do FCF $\beta$  (colágeno tipo I e III / fibroblastos) nos grupos de animais tratados com 25 e 50 mg/kg de talidomida e 1 mg/kg de acetato de leuprolida predominaram o colágeno tipo I, fibrose intensa e difusa pelo tecido. Já no grupo tratado com 100 mg/kg de talidomida apresentou estruturas teciduais com perdas de colágeno e fibroblasto (colágeno tipo III e fibrose moderada a fraca);
- d) Os grupos de animais tratados com 50 e 100 mg/kg de talidomida tiveram alterações no parênquima hepático, típicas de toxicidade medicamentosa;
- e) Na histomorfometria, a talidomida inibiu o volume dos implantes endometrióticos, sendo mais expressivo nos grupos de animais tratados com 50 (*p*valor 0,014) e 100 mg/kg de talidomida (*p*valor 0,017) e 1 mg/kg de acetato de leuprolida (*p*valor 0,047), contudo, nenhum dos medicamentos foi capaz de eliminar os focos de endometriose.

Sendo assim, para este modelo experimental, a talidomida produziu efeito antivasogênico e cicatrizante satisfatório e pode ser eficaz no tratamento da endometriose.

## REFERÊNCIAS

- AGOSTINIS, C. *et al.* The combination of N-acetyl cysteine, alpha-lipoic acid, and bromelain shows high antiinflammatory properties in novel in vivo and in vitro models of endometriosis. **Mediators of Inflammation**, Oxford, v. 2015, p. 918089, 2015.
- ANDRES, M. P.; BORRELLI, G. M.; ABRAO, M. S. Endometriosis classification according to pain symptoms: can the ASRM classification be improved? **Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology**, Amsterdam, v. 51, p. 111-118, 2018. Doi: <http://www.doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2018.06.003>. Epub 2018 Jun 15.
- ANTÔNIO, L. G. L. *et al.* Thalidomide reduces cell proliferation in endometriosis experimentally induced in rats. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 11, p. 668-672, Nov. 2019.
- AZIMIRAD, A. *et al.* Thalidomide affects experimental endometriosis: a randomized controlled study in the rat. **The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 40, n. 8, p. 1989-97, 2014.
- BAKACAK, M. *et al.* The effects of thalidomide in a rat model of surgically-induced endometriosis. **Turkish Journal of Obstetrics and Gynecology**, Fındıkzade-İstanbul, v. 12, n. 3, p. 125-131, 2015.
- BELFORT-MATTOS, P.N.; FOCCHI, G.R.A.; SPECK, N.M.G.; TAHA, N.S.A.; CARVALHO, C.R.N.; RIBALTA, J.C.L. Immunohistochemical expression. Of granzyme B and vascular endothelial growth factor (VEGF) in normal uterine cervixes and low and high grade squamous intraepithelial lesions. **Eur. J Gynaecol Oncol.** 2010 Jan;31(4):559-61
- BENAGIANO, G.; GIUSEPPE, B.; IVO, B. Who identified endometriosis. **Fertility and Sterility**, New York, v. 95, n. 1, p. 13-16, 2011.
- BERLANDA, N. *et al.* 'Money for nothing'. The role of robotic-assisted laparoscopy for the treatment of endometriosis. **Reproductive Biomedicine Online**, Cambridge, v. 35, n. 4, p. 435-444, 2017.
- BERLANDA, N. *et al.* Role of surgery in endometriosis-associated subfertility. **Seminars in Reproductive Medicine**, New York, v. 31, n. 2, p. 133-143, 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Talidomida: orientação para o uso controlado** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 879, de 12 de julho de 2016**. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Endometriose. Secretaria de Atenção à Saúde. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2016. Disponível em: [http://conitec.gov.br/images/Protocolos/pcdt\\_endometriose\\_2016.pdf](http://conitec.gov.br/images/Protocolos/pcdt_endometriose_2016.pdf). Acesso em: 2 mar. 2023.

BRUNER-TRAN, K. L. *et al.* Rodent models of experimental endometriosis: identifying mechanisms of disease and therapeutic targets. **Current Women's Health Reviews**, Saif Zone, v. 14, n. 2, p. 173-188, 2018.

BULUN, S. E. *et al.* Estrogen receptor-beta, estrogen receptor-alpha, and progesterone resistance in endometriosis. **Seminars in Reproductive Medicine**, New York, v. 28, n. 1, p. 36-43, 2010.

CACCIATORI, F. A.; MEDEIROS, J. P. F. Endometriose: uma revisão da literatura. **Revista de Iniciação Científica**, Criciúma, v. 13, n. 1, p. 56-66, 2015.

CAVKAYTAR, S. *et al.* Clarithromycin regresses endometriotic implants in rat endometriosis model. **Journal of Obstetrics and Gynaecology**, London, v. 35, n. 8, p. 844-847, 2015.

CHANTALAT, E. *et al.* Estrogen Receptors and Endometriosis. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 21, n. 8, p. 2815, 2020.

CHEN, J. Q. *et al.* Expression of heparanase gene, CD44v6, MMP-7 and nm23 protein and their relationship with the invasion and metastasis of gastric carcinomas. **World Journal of Gastroenterology**, Beijing, v. 10, n. 6, p. 776-782, 2004.

COHN, D. E. *et al.* A prospective, comparative study for the evaluation of postoperative pain and quality of recovery in patients undergoing robotic versus open hysterectomy for staging of endometrial cancer. **Journal of Minimally Invasive Gynecology**, Philadelphia, v. 23, n. 3, p. 429-434, 2016.

COOK, K. M.; FIGG, W. D. Angiogenesis inhibitors: current strategies and future prospects. **CA: a Cancer Journal for Clinicians**, Hoboken, v. 60, n. 4, p. 222-243, 2010.

CORRÊA, F. J. S. História da endometriose. *In*: PODGEAC, S. (ed.). **Coleção Febrasgo endometriose**. Rio de Janeiro: Elsevier Ireland, 2014. p. 1-11.

COSTA, L. D. *et al.* Identificação dos colágenos I, III, IV e  $\alpha$ -SMA e participação dos miofibroblastos no processo fibrótico das endometrioses equinas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 69, n. 6, p. 1398-1406, 2017.

D'AMATO, R. J. *et al.* Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 91, n. 9, p. 4082-4085, Apr. 1994.

DAVIS, C. J.; MCMILLAN, L. Pain in endometriosis: efficacy of clinical and surgical management. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, Philadelphia, v. 15, n. 6, p. 507-512, 2003.

DE CAPRIO, C.; ALFANO, A.; SENATORE, I.; ZARRELLA, L.; PASANISI, F.; CONTALDO, F. (2006). Severe acute liver damage in anorexia nervosa: two case reports. **Nutrition** 22: 572–575.

DIAMANTI, A. *et al.* The clinical implications of thalidomide in inflammatory bowel diseases. **Expert review of Clinical Immunology**, London, v. 11, n. 6, p. 1-10, 2015.



DU G.-J. *et al.* Thalidomide inhibits growth of tumours through COX-2 degradation independent of antiangiogenesis. **Vascular Pharmacology**, New York, v. 43, n. 2, p. 112-119, 2005.

DVORAK, H. F. *et al.* Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: an important mediator of angiogenesis in malignancy and inflammation. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 107, n. 1/3, p. 233-235, 1995.

FALCONE, T.; FLYCKT, R. Clinical management of endometriosis. **Obstetrics and Gynecology**, New York, v. 131, n. 3, p. 557-571, 2018.

FANFANI, F. *et al.* Robotic versus laparoscopic surgery in gynecology: which should we use? **Minerva Ginecologica**, Torino, v. 68, n. 4, p. 423-430, 2016.

FARKHAT, K. N. *et al.* The role of stem cells in the pathogenesis of endometriosis (areview). **Problemy Reproduktsii**, Izd-vo Media Sfera, v. 22, n. 1, p. 20, 2016.

FARSIMADAN, M. *et al.* MicroRNA variants in endometriosis and its severity. **British Journal of Biomedical Science**, London, v. 78, n. 4, p. 206-210, 2021.

FASSBENDER, A. *et al.* Update on biomarkers for the detection of endometriosis. **BioMed Research International**, New York, v. 2015, p. 130854, 2015.

FAVER, I. R. *et al.* Thalidomide for dermatology: a review of clinical uses and adverse effects. **International Journal of Dermatology**, Oxford, v. 44, n. 1, p. 61-67, 2005.

FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. **Endocrine Reviews**, Chevy Chase, v. 25, n. 4, p. 581-611, 2004.

FLECKNELL, P. **Laboratory animal anaesthesia**. 4. ed. [S. l.]: Elsevier, 2016.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 285, n. 21, p. 1182-1186, 1971.

FRANKS, M. E.; MACPHERSON, G. R.; FIGG, W. D. Thalidomide. **The Lancet**, London, v. 363, n. 9423, p. 1802-1811, 2004.

GAZVANI, R.; TEMPLETON, A. Peritoneal environment, cytokines and angiogenesis in the pathophysiology of endometriosis. **Reproduction**, Cambridge, v. 123, n. 2, p. 217-226, 2002.

GIUDICE, L. C. Clinical practice. Endometriosis. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 362, n. 25, p. 2389-2398, 2010.

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

GOENKA, L.; GEORGE, M.; SEN, M. A peek into the drug development scenario of endometriosis: a systematic review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, New York, v. 90, p. 575-585, 2017.

GOKTOLGA, U. *et al.* Effect of the non-specific matrix metalloproteinase inhibitor Doxycycline on endometriotic implants in an experimental rat model. **Experimental and Therapeutic Medicine**, Athens, v. 9, n. 5, p. 1813-1818, 2015.

GOTO, F. *et al.* Synergistic effects of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and cord formation of bovine capillary endothelial cells within collagen gels. **Laboratory Investigation**, Baltimore, v. 69, n. 5, p. 508-517, 1993.

GUERRIERO, S. *et al.* Deep infiltrating endometriosis: comparison between 2- dimensional ultrasonography (US), 3-dimensional US, and magnetic resonance imaging. **Journal of Ultrasound in Medicine**, Oxford, v. 37, n. 6, p. 1511-1521, 2018.

GUO, S. W.; EVERS, J. L. H. Lack of transparency in clinical trials. **Obstetrics and Gynecology**, New York, v. 121, n. 6, p. 1281-1290, 2013.

GUPTA, D. *et al.* Endometrial biomarkers for the non-invasive diagnosis of endometriosis. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, Oxford, v. 4, n. 4, p. CD012165, 2016.

HULL, M. *et al.* Host-derived TGFB1 deficiency suppresses lesion development in a mouse model of endometriosis. **The American Journal of Pathology**, [S. l.], v. 180, n. 3, p. 880-887, 2012.

HYDER, S. M.; STANCEL, G. M. Regulation of angiogenic growth factors in the female reproductive tract by estrogens and progestins. **Molecular Endocrinology**, Chevy Chase, v. 13, n. 5, p. 806-811, 1999.

INTERNATIONAL WORKING GROUP OF AAGL *et al.* An international terminology for endometriosis, 2021. **Human Reproduction Open**, Oxford, p. 1-10, 2021.

ITO, T.; ANDO, H.; HANDA, H. Teratogenic effects of thalidomide: molecular mechanisms. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 68, n.9, p. 1569-1579, 2011.

JANSEN, J. R.; CODDINGTON, C. C. Evolving spectrum: the pathogenesis of endometriosis. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, Hagerstown, v. 53, n. 2, p. 379-388, 2010.

JONES, R.C. The effect of a luteinizing hormone releasing hormone agonist (Wy-40, 972), levonorgestrel, danazol, and ovariectomy on experimental endometriosis in the rat. **Acta Endocrinol** 1984;106:282-8

JUNG, Y. J. *et al.* Neuroinflammation as a factor of neurodegenerative disease: thalidomide analogs as treatments. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, Lausanne, v. 7, n. 313, p. 7, 2019.

KASTRITIS EFASTATHIOS, M.D.; DIMOPOLOULOS MELETIOS A., M.D. Thalidomide in the treatment of multiple myeloma. **Best Practice & Research Clinical Hematology**, London, v. 20, n. 4, p. 681-699, 2007.

KAWAMATA, A. *et al.* Thalidomide suppresses melanoma growth by activating natural killer cells in mice. **Oncology Reports**, Athens, v. 16, n. 6, 1231-1236, 2006.

KENNEDY, S.; BERGQVIST, A.; CHAPRON, C.; D'HOOGHE, T. *et al.* ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. **Hum Reprod** 2005;20:2698-704.

KUMAR, S.; RAJKUMAR, S. V. Thalidomide and lenalidomide in the treatment of multiple myeloma. **European Journal of Cancer**, Oxford, v. 42, n. 11, p. 1612-1622, 2006.

KUPKER, W.; SCHULTZE-MOSGAU, A.; DIEDRICH, K. Paracrine changes in the peritoneal environment of women with endometriosis. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 4, n. 5, p. 719-723, 1998.

LAGANÀ, A. S. *et al.* Natural killer T cell subsets in eutopic and ectopic endometrium: A fresh look to a busy corner. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, München, v. 293, n. 5, p. 941-949, 2016.

LAGANÀ, A. S. *et al.* Unus pro omnibus, omnes pro uno: A novel, evidence-based, unifying theory for the pathogenesis of endometriosis. **Medical Hypotheses**, Penrith, v. 103, p. 10-20, 2017.

LAW, K.; BRUNT, E.M. (2010). Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Clin Liver Dis** 14: 591-604.

LEBOVIC, D. I.; KIR, M.; CASEY, C. L. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma induces regression of endometrial explants in a rat model of endometriosis. **Fertility and Sterility**, New York, v. 82, p. 1008-1013, 2004. Supplement 3.

LEBOVIC, D. I.; KIR, M.; CASEY, C. L. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma induces regression of endometrial explants in a rat model of endometriosis. **Fertility and Sterility**, New York, v. 82, p. 1008-1013, 2004. Supplement 3.

LIN, Y. J. *et al.* Neutrophils and macrophages promote angiogenesis in the early stage of endometriosis in a mouse model. **Endocrine Reviews**, Los Angeles, v. 147, n. 3, p. 1278-1286, 2006.

LIU, E. *et al.* Urinary biomarkers for the non-invasive diagnosis of endometriosis. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, Oxford, v. 2015, n. 12, p. CD012019, 2015.

LIU, J. H. Endometriosis. *In*: MSD Manual: professional version. Rahway: Merck, 2017. Disponível em: <https://www.msmanuals.com/professional/gynecology-and-obstetrics/endometriosis/endometriosis>. Acesso em: 10 set. 2022.

LOURENÇO, L. G. *et al.* Thalidomide reduces cell proliferation in endometriosis experimentally induced in rats. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 11, p. 668-672, 2019.

MACHADO, D. E. *et al.* Higher expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 (Flk-1) and metalloproteinase-9 (MMP-9) in a rat model of peritoneal

endometriosis is similar to cancer diseases. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, Roma, v. 29, n. 1, p. 4, 2010.

MAHNKE, J.; DAWOOD, M.; HUANG, J. Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in peritoneal fluid of women with endometriosis. **Fertility and Sterility**, New York, v. 73, n. 1, p. 166-170, 2000.

MALVEZZI, H. *et al.* Endometriosis: current challenges in modeling a multifactorial disease of unknown etiology. **Journal of Translational Medicine**, London, v. 18, n. 311, 2020.

MARUYAMA, T.; YOSHIMURA, Y. Stem cell theory for the pathogenesis of endometriosis. **Frontiers in Bioscience**, Pensacola, v. 4, p. 2854-2863, 2012.

MCBRIDE, W. G. Thalidomide and congenital malformations. **The Lancet**, London, v. 1, p. 358, 1961.

MCCREDIE, J. History, heresy and radiology in scientific discovery. **Journal of Medical Imaging and Radiation Oncology**, Carlton, v. 53, n. 5, p. 433-441, 2009.

MCFARLANE, M. *et al.* Emerging role of thalidomide in the treatment of gastrointestinal bleeding. **Frontline Gastroenterol**, London, v. 9, n. 2, p. 98-104, 2018.

MCLAREN, J. *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis. **Human Reproduction**, Oxford, v. 11, n. 1, p. 220-223, 1996.

MICHALANY J. **Técnica histológica em Anatomia Patológica**. Editora Michalany, 3ªEd., São Paulo, 1998.

MONTES, G.S. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. **Cell Biol Int**. 1996; 20(1):15-27.

MONTES, G.S.; JUNQUEIRA L.C.U. Histochemical localization of collagen and proteoglycans in tissues. In: Nimmi, M.E. (Ed). Collagen. Boca-Raton: **Clin Invest**. 1998; 101(2): 406-12.

MORO, A.; INVERNIZZI, N. A tragédia da talidomida: a luta pelos direitos das vítimas e por melhor regulação de medicamentos. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 3, p. 603-622, 2017.

MOROTTI, M.; VINCENT, K.; BECKER, C. M. Mechanisms of pain in endometriosis. **European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology**, Amsterdam, v. 209, p. 8-13, 2016.

NÁCUL, A. P.; SPRITZER, P. M. Aspectos atuais do diagnóstico e tratamento da endometriose. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 6, p. 298-307, jun. 2010.

NASCIMENTO, F. P. *et al.* Thalidomide reduces mechanical hyperalgesia and depressive-like behavior induced by peripheral nerve crush in mice. **Neuroscience**, Oxford, v. 303, p. 51-58, 2015.

NEIGER, B. L. The re-emergence of thalidomide: results of a scientific conference. **Teratology**, New York, v. 62, n. 6, p. 432-435, 2000.

NEVES, S. M. P. *et al.* **Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP**. São Paulo: FCF-IQ/USP, 2013.

NISENBLAT, V. *et al.* Imaging modalities for the non-invasive diagnosis of endometriosis. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, Oxford, v. 2, n. 2, p. CD009591, 2016.

NOGUEIRA NETO, J. *et al.* Experimental endometriosis reduction in rats treated with *Uncaria tomentosa* (cat's claw) extract. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, Amsterdam, v. 154, n. 2, p. 205-208, 2011.

OLIVE, D. L. Gonadotropin-releasing hormone agonists for endometriosis. **The New England Journal of Medicine**, Massachusetts, v. 359, p. 1136-1142, 2008.

OTHMAN, E. E.-D. R. *et al.* Serum cytokines as biomarkers for nonsurgical prediction of endometriosis. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, Amsterdam, v. 137, n. 2, p. 240-246, 2008.

PALUMBO, A.; ANDERSON, K. Multiple myeloma. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 364, n. 11, p. 1046-60, 2011.

PARKIN, K. L.; FAZLEABAS, A. T. Uterine leukocyte function and dysfunction: a hypothesis on the impact of endometriosis. **American Journal of Reproductive Immunology**, New York, v. 75, n. 3, p. 411-417, 2016.

PEREIRA, B. G. *et al.* Development of biodegradable devices loaded with thalidomide and evaluation of the effect on the inhibition of inflammation and angiogenesis after subcutaneous application. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, New York, v. 71, p. 21-28, 2015.

PEREIRA, F.A.L. (2006). Degenerações. Morte celular. Alterações do interstício 43-82 Brasileiro Filho G., Bogliolo, **Patologia Geral**. 7ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

PODGAEC, S. *et al.* **Endometriose**. São Paulo: Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia, 2018. (Protocolo FEBRASGO - Ginecologia, 32).

QUEREDA, F.; BARROSO, J.; ACIEN, P. Individual and combined effects of triptoreline and gestrinone on experimental endometriosis in rat. **European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology**, Amsterdam, v. 67, n. 1, p. 35-40, 1996.

REGAN, K.S.; CLINE, J.M.; CREASY, D.; DAVIS, B.; FOLEY, G.L.; LANNING, L.; LATENDRESSE, J.R.; MAKRIS, S.; MORTON, D.; REHM, S.; STEBBINS, K. STP Ovary

Evaluation Working Group. STP position paper: ovarian follicular counting in the assessment of rodent reproductive toxicity. **Toxicol Pathol.** 2005; 33(3):409-12.

ROSA-E-SILVA, J. C. *et al.* Effect of cabergoline in experimental endometriosis in rats. **Journal of Minimally Invasive Gynecology**, Philadelphia, v. 22, n. 6S, p. S168, 2015.

SAHA, S. K. *et al.* Differential expression of procollagen lysine 2-oxoglutarate 5-deoxygenase and matrix metalloproteinase isoforms in hypothyroid rat ovary and disintegration of extracellular matrix. **Endocrinology**, Los Angeles, v. 146, n. 7, p. 2963-2975, 2005.

SAKATA, M.; TERAOKAWA, N.; MIZUTANI, T.; TANIZAWA, O.; MATSUMOTO, K.; TERADA, N.; SUDO, K. Effects of danazol, gonadotropin releasing hormone agonist, and a combination of danazol and gonadotropin, releasing hormone agonist on experimental endometriosis. **Am J Obstet Gynecol.** 1990;163:1679-84.

SALOMÉ, D. G. M. *et al.* Endometriose: epidemiologia nacional dos últimos 5 anos. **Revista de Saúde**, Vassouras, v. 11, n. 2, p. 39-43, 2020.

SAMPSON, J. A. Metastatic or embolic endometriosis, due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the venous circulation. **The American Journal of Pathology**, Philadelphia, v. 3, n. 2, p. 93-110, 1927.

SÃO BENTO, P. A. S.; MOREIRA, M. C. N. A experiência de adoecimento de mulheres com endometriose: narrativas sobre violência institucional. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 9, p. 3023-3032, 2017.

SCHENKEN, R.S. Endometriosis: clinical features, evaluation, and diagnosis. *In*: WOLTERS KLUWER. **Uptodate**. [S. l.], 24 maio 2022. Disponível em: <https://www.uptodate.com/contents/endometriosis-clinical-features-evaluation-and-diagnosis/print?search=endometriosis-clinical-features-evalu>. Acesso em: 10 mar. 2023.

SHIBUYA, M.; CLAESSEON-WELSH, L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. **Experimental Cell Research**, Orlando, v. 312, n. 5, p. 549-560, 2006.

SIKORA, J. *et al.* Abnormal peritoneal regulation of chemokine activation— The role of IL-8 in pathogenesis of endometriosis. **American Journal of Reproductive Immunology**, New York, v. 77, n. 4, p. e12622, 2017.

SILVA, M. P. C.; MARQUI, A. B. T. Qualidade de vida em pacientes com endometriose: um estudo de revisão. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**, Fortaleza, v. 27, n. 3, p. 413-421, 2014.

STEPAN, D.; SIMIONESCU, C.; STEPAN, A.; MUNTEAN, M.; VOINEA, B. VEGF and CD105 immunoexpression in squamous cervical carcinomas and associated precancerous lesion. **Rom J Morphol Embryol.** 2012 Jan;53(3):585-9.

STEPHENS, T. D. The effect of thalidomide in chicken embryos. **Birth Defects Research. Part A, Clinical and Molecular Teratology**, Hoboken, v. 85, n. 8, p. 725-731, 2009.

STORY, L.; KENNEDY, S. Animal studies in endometriosis: a review. **ILAR Journal**, Washington, DC, v. 45, n. 2, p. 132-138, 2004.

STRATTON, P.; BERKLEY, J. Chronic pelvic pain and endometriosis: translational evidence of the relationship and implications. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 17, n. 3, p. 327-346, 2011.

TABOGA, S. R.; VILAMAIOR, P. S. L. Métodos de estudo da célula. *In*: CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL, S. M. **A célula**. 3. ed. Barueri: Manole, 2013.

TAKUMI, I.; HIROSHI, H. Molecular mechanisms of thalidomide and its derivatives. **Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences**, Ueno Park, v. 96, n. 6, p. 189-203, 2020.

TAVARES-BASTOS, L.; OLIVEIRA, L. Q. R. **Atlas de histologia básica**. Maceió: [s. n.], 2020.

TAYLOR, H.S.; KOTLYAR, A.M.; FLORES, V.A. Endometriosis is a chronic systemic disease: clinical challenges and novel innovations. **Lancet**. 2021 Feb 27;397(10276):839-852.

THERAPONTOS, C. *et al.* Thalidomide induces limb defects by preventing angiogenic growth during initial limb formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 106, n. 21, p. 8573-8578, 2009.

TSAI, Y. R. *et al.* Pomalidomide ameliorates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress injury and cell death in rat primary cortical neuronal cultures by inducing anti-oxidative and antiapoptosis effects. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 19, n. 10, p. 3252, 2018.

UHL, K. *et al.* 2006. Thalidomide use in the US: experience with pregnancy testing in the STEPS programme. **Drug Safety**, Auckland, v. 29, n. 4, p. 321-329, 2006.

URAL, U. M. *et al.* Serum YKL-40 levels as a novel marker of inflammation in patients with endometriosis. **Clinical and Experimental Obstetrics & Gynecology**, Padova, v. 42, n. 4, p. 495-497, 2015.

VARGESSON, N. Thalidomide embryopathy: an enigmatic challenge. **ISRN Developmental Biology**, [S. l.], v. 2013, p. 1-18, 2013.

VARGESSON, N. Thalidomide-induced limb defects: resolving a 50-year-old puzzle. **BioEssays**, Cambridge, v. 31, n. 12, p. 1327-1336, 2009.

VERCELLINI, P. *et al.* Endometriosis: pathogenesis and treatment. **Nature Reviews. Endocrinology**, London, v. 10, n. 5, p. 261-275, 2014.

VERNON, M.W.; WILSON, E.A. Studies on the surgical induction of endometriosis in the rat. **Fertil Steril** 1985;44:684-7.

VIGANÒ, P. *et al.* Endometriosis: epidemiology and aetiological factors. **Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology**, Amsterdam, v. 18, n. 2, p. 177-200, 2004.

VURAL, M. Pelvic pain rehabilitation. **Turkish Journal of Physical Medicine and Rehabilitation**, İstanbul, v. 64, n. 4, p. 291-299, 2018.

WASSON, M. N. Chronic pelvic pain due to postmenopausal endometriosis. **Journal of Minimally Invasive Gynecology**, Philadelphia, v. 27, n. 3, p. 561-563, 2019.

WEIGEL, M. T. *et al.* Differential expression of MMP-2, MMP-9 and PCNA in endometriosis and endometrial carcinoma. **European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology**, Amsterdam, v. n. 1, p. 74-78, 2012.

YAGYU, T. *et al.* Thalidomide inhibits tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-8 expression in endometriotic stromal cells, possibly through suppression of nuclear factor kappaB activation. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, New York, v. 90, n. 5, p. 3017-3021, 2005.

YANG, C. *et al.* Systematic review: thalidomide and thalidomide analogues for treatment of inflammatory bowel disease. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 41, n. 11, p. 1079-1093, 2015.

YOUNG, V. J. *et al.* Peritoneal VEGF-A expression is regulated by TGF- $\beta$ 1 through an ID1 pathway in women with endometriosis. **Scientific Reports**, London, v. 5, p. 16859, 2015.

YOUNG, V. J. *et al.* The role of TGF- $\beta$  in the pathophysiology of peritoneal endometriosis. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 23, n. 5, p. 548-559, 2017.


ZAFARI, N. *et al.* A panel of plasma miRNAs 199b-3p, 224-225p and Let-7d-3p as non-invasive diagnostic biomarkers for endometriosis. **Reproductive Sciences**, Thousand Oak, v. 28, p. 991-999, 2021.

ZONDERVAN, K. T. *et al.* Endometriosis. **Nature Reviews. Disease primers**, London, v. 4, n. 1, p. 9, 2018.



## **ANEXO**

## ANEXO A - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

	<b>UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO</b> <b>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA</b> <b>CIAEP: 01.0341.2014</b>		<small>Comissão de Ética no Uso de Animais</small>
<b>CERTIFICADO</b>			
<p>Certificamos que a proposta intitulada: "<b>AVALIAÇÃO DO EFEITO ANALGÉSICO E ANTIINFLAMATÓRIO DA TALIDOMIDA NA ENDOMETRIOSE EXPERIMENTAL</b>", <b>Processo nº 23115.016944/2019-25</b>, sob a responsabilidade do <b>Prof. Dr. João Batista Santos Garcia</b>, que envolve 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), e foi considerado <b>APROVADO</b> pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFMA) da Universidade Federal do Maranhão, na reunião realizada em 31/05/2019.</p>			
<p>We certify that the proposal: "<b>ANALGESIC AND ANTI-INFLAMMATORY EFFECT OF THALIDOMIDE IN EXPERIMENTAL ENDOMETRIOSIS</b>", <b>Process n. 23115.016944/2019-25</b>, under the responsibility of <b>Prof. Dr. João Batista Santos Garcia</b>, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, sub phylum Vertebrata (except humans beings) for scientific research purposes (or teaching) - is in accordance with Law No. 11,794, of October 8, 2008, Decree No. 6.899, of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was <b>APPROVED</b> by the Ethics Committee on Animals Use of the Federal University of Maranhão (CEUA - UFMA), in meeting of 05/31/2019.</p>			
<b>Finalidade da Proposta: Pesquisa</b>		<b>Área: Ciências da Saúde</b>	
<b>Vigência da Proposta: 13/09/2019 a 31/08/2020.</b>			
<b>Origem:</b>	Biotério Central da UFMA	<b>Amostra</b>	
<b>Espécie:</b>	<b>Ratos</b> ( <i>Rattus norvegicus</i> )	<b>Sexo:</b> Fêmeas	<b>Idade:</b> 2 meses <b>Peso:</b> 200 a 250 g
<b>Linhagem/Raça:</b>	<b>Wistar</b>		
<b>Local do experimento:</b> Biotério setorial da Pós-Graduação do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – CCBS/UFMA.			
São Luís, 12 de setembro de 2019.			
 <b>Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho</b> Presidente da Comissão de Ética no uso de Animais – CEUA/UFMA			
1			