

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA MULHER

**ENDOMETRIOSE EXPERIMENTAL HETERÓLOGA:
ESTUDOS COM *RECONSTITUIÇÃO* LEUCOCITÁRIA
OU INJÚRIA PERITONEAL AGUDA, EM
CAMUNDONGOS IMUNODEFICIENTES**

Alessandra Costa Carvalho Macedo

Belo Horizonte

2010

ALESSANDRA COSTA CARVALHO MACEDO

**ENDOMETRIOSE EXPERIMENTAL HETERÓLOGA:
ESTUDOS COM *RECONSTITUIÇÃO* LEUCOCITÁRIA
OU INJÚRIA PERITONEAL AGUDA, EM
CAMUNDONGOS IMUNODEFICIENTES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher, da
Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais,
como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ciências da Reprodução

Orientador brasileiro: Prof. Dr. Aroldo Fernando Camargos

Co-orientadora estrangeira: Prof. Dra. Kaylon L. Bruner-Tran

**Belo Horizonte
Faculdade de Medicina – UFMG
2010**

M141e Macedo, Alessandra Costa Carvalho.
Endometriose Experimental Heteróloga [recurso eletrônico]: estudos com Reconstituição Leucocitária ou Injúria Peritoneal Aguda, em camundongos imunodeficientes. / Alessandra Costa Carvalho Macedo. - - Belo Horizonte: 2010.

62f.: il.

Formato: PDF.

Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Aroldo Fernando Camargos.

Área de concentração: Saúde da Mulher.

Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Endometriose. 2. Camundongos. 3. Ferimentos e Lesões. 4. Procedimentos Cirúrgicos Operatórios. 5. Progressão da Doença. 6. Dissertação Acadêmica. I. Camargos, Aroldo Fernando. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM: WP 390

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640
cpg@medicina.ufmg.br



UFMG

ATA DA DEFESA DE _____ TESE DE DOUTORADO de **ALESSANDRA COSTA CARVALHO MACEDO**, nº de registro 2005205359. No dia **trinta de março de dois mil e dez**, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG a Comissão Examinadora de tese indicada pelo Colegiado do Programa para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **“ENDOMETRIOSE EXPERIMENTAL HETERÓLOGA: ESTUDOS COM “RECONSTITUIÇÃO” LEUCOCITÁRIA OU INJÚRIA PERITONEAL AGUDA, EM CAMUNDONGOS IMUNODEFICIENTES”**, requisito final para a obtenção do Grau de Doutor em Saúde da Mulher, pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher - Área de Concentração em Ciências da Reprodução. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Aroldo Fernando Camargos, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho final, passou a palavra a candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof. Aroldo Fernando Camargos/ Orientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Apta</u>
Prof. Fernando Marcos dos Reis	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APTA</u>
Profa. Andrezza Vilaça Belo Lopes	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APTA</u>
Prof. Paulo Henrique Boy Torres	Instituição: UNIFENAS	Indicação: <u>apta</u>
Profa. Márcia Cristina França Ferreira - UFOP	Instituição: UFOP	Indicação: <u>APTA</u>

Pelas indicações a candidata foi considerada APROVADA.

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 30 de março de 2010.

Prof. Aroldo Fernando Camargos/ Orientador Aroldo Fernando Camargos

Prof. Fernando Marcos dos Reis Fernando Marcos dos Reis

Profa. Andrezza Vilaça Belo Lopes Andrezza Vilaça Belo Lopes

Prof. Paulo Henrique Boy Torres Paulo Henrique Boy Torres

Profa. Márcia Cristina França Ferreira Márcia Cristina França Ferreira

Prof. Antônio Carlos Vieira Cabral/Coordenador Antônio Carlos Vieira Cabral

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.

PROF. ANTÔNIO CARLOS VIEIRA CABRAL
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher
Faculdade de Medicina/UFMG

Resumo

Vários estudos prévios demonstraram alterações específicas da função imunitária em mulheres portadoras de endometriose, incluindo uma diminuição da citotoxicidade mediada pelas células *natural killer* (NK) e um estado de ativação exacerbado em monócitos e macrófagos peritoneais. A adesão de tecido endometrial ectópico associa-se muito provavelmente com uma resposta inflamatória que pode influenciar no estabelecimento e progressão da doença, uma vez que citocinas, liberadas por leucócitos ativados, podem ter papel importante na proliferação celular, diferenciação, apoptose e angiogênese. Para abordar essas questões, foi desenvolvido um novo modelo experimental de endometrioses, utilizando camundongos Rag2 γ (c), que permitem estudos xenográficos de maior duração e a introdução de elementos do sistema imune humano, o que não pode ser realizado em camundongos nude.

No presente estudo, o impacto da presença ou ausência de células imunitárias humana no estabelecimento inicial da endometriose experimental foi examinado. Paralelamente, considerando que a IL-1 α pode estimular o sistema MMP e a produção de VEGF no processo de reparação tecidual, a injúria peritoneal aguda, como a ooforectomia, poderia afetar o desenvolvimento da endometriose experimental, foi também estudado o efeito de um microambiente inflamatório provocado por procedimento cirúrgico recente, na ocorrência e localização de adesões, na neoangiogênese e no crescimento do tecido endometrial humano, no modelo experimental heterólogo de endometriose em camundongos imunodeficientes. Adicionalmente, foi estudado o provável efeito da pioglitazona (PIO), uma tiazolidinediona com potentes efeitos anti-inflamatório e anti-angiogênico, em prevenir ou reduzir a formação de adesões relacionadas à endometriose experimental induzida em pós-operatório.

Foi observada uma redução estatisticamente significativa na gravidade na doença peritoneal em camundongos Rag2 γ (c) submetidos à reconstituição leucocitária, em comparação com os animais que não receberam as células. Em relação aos estudos em pós-operatório recente, o microambiente inflamatório pós-ooforectomia influencia a localização de adesões, a neoangiogênese e o crescimento do tecido endometrial humano nesse modelo. E ainda, 50% dos camundongos que receberam tratamento com PIO estavam completamente livres de adesões; os animais restantes exibiram uma atenuação do grau das adesões. O pré e pós tratamento com PIO provocou uma redução adicional do desenvolvimento de adesões (75% sem adesões).

Nossos estudos mostraram que os leucócitos humanos podem se associar às lesões ectópicas estabelecidas em camundongos, sugerindo que um sistema imune patente é fator protetor contra o desenvolvimento da endometriose. Além disso, a injúria peritoneal cirúrgica aumentou significativamente a invasão inicial e a vascularização do tecido endometrial humano no modelo experimental quimérico utilizado. E mais, a utilização da PIO para atingir a inflamação pode ser uma abordagem terapêutica efetiva para reduzir as adesões pós-cirúrgicas relacionadas à endometriose.

Palavras-chave: Endometriose, leucócitos, camundongos imunodeficientes, endometrioses pós-cirúrgica, adesões, pioglitazona

Abstract

Several previous studies have demonstrated specific alterations in immune cell function in women with endometriosis, including a decrease in natural killer (NK) cell cytotoxicity and an enhanced activation state of monocytes and peritoneal macrophages. Certainly, ectopic attachment of endometrial tissue is likely associated with an inflammatory response that may aid in the establishment and progression of this disease, as cytokines, released by activated leukocytes, can dramatically affect endometrial cell proliferation, differentiation, apoptosis, and angiogenesis. To address these issues, we have developed a new model system using Rag2 γ (c) mice allowing for xenographic studies of much longer duration and for the introduction of elements of a human immune system, what cannot be conducted in nude mice.

In our study, we have examined the impact of the presence and absence of human immune cells on the initial establishment and early growth of experimental endometriosis. Paralelly, since IL-1 α can stimulate the MMP system and VEGF production in normal wound repair, acute peritoneal injury, such as oophorectomy, may affect the establishment of experimental endometriosis, we have also studied the effect of an inflammatory-like microenvironment of a recent surgical procedure in attachment location, neoangiogenesis and growth of human endometrial tissue in the heterologous model of experimental endometriosis in immunodeficient mice. Indeed, we have examined the potential role of pioglitazone (PIO), a thiazolidinedione with potent anti-inflammatory and anti-angiogenic effects, to prevent or reduce adhesion formation related to post-surgical- induced experimental endometriosis.

We found a statistically significant reduction in the severity of peritoneal disease in Rag2 γ (c) mice which also received adoptive transfer of human immune cells compared with mice that did not receive immune cells. In respect of recent post-operative studies, the inflammatory-like microenvironment of a recent surgical procedure affects the attachment location, neoangiogenesis and growth of human endometrial tissue in this model. Moreover, 50% of mice receiving human tissue and PIO therapy were completely free of adhesions. Remaining mice in the PIO group exhibited a reduction in the extent of adhesions. PIO treatment of both mice and human endometrial tissues exhibited a further reduction in adhesion development (75% adhesion free).

Our studies indicate that human immune cells readily track into the ectopic lesions established in mice, suggesting that a robust immune system is protective against the development of endometriosis. Indeed, surgical injury within the peritoneal cavity can significantly enhance the early invasion and vascularization of human tissues in an experimental chimeric model of endometriosis. Targeting inflammation with PIO may be an effective therapeutic approach to reduce post-surgical adhesions related to endometriosis.

Key Words: Endometriosis, immune cells, immunocompromised mice, post-surgical-induced endometriosis, endometriotic adhesions, pioglitazone

Lista de figuras, quadros e tabelas

Figura 3.1 – Modelo básico de endometriose experimental heteróloga, com xenotransplante de endométrio humano em camundongos duplamente imunodeficientes – RAG

Figura 3.2 – Modelo de endometriose experimental heteróloga, com injeção prévia, i.p., de leucócitos humanos circulantes isolados, seguindo com xenotransplante de endométrio humano autólogo aos leucócitos, por injeção de endométrio pré-cultivado por vias i.p. ou s.c., em camundongos duplamente imunodeficientes – RAG

Figura 3.3 – Série experimental extra utilizando camundongos RAG machos, que foram submetidos à injeção i.p. de leucócitos humanos circulantes isolados para imunodeteção dessas células no sangue periférico e em órgãos linfóides

Figura 3.4 – Esquema mostrando destino das amostras biológicas coletadas, em modelo de endometriose experimental heteróloga, com injeção prévia, i.p., de leucócitos humanos circulantes isolados, seguindo com xenotransplante de endométrio humano autólogo aos leucócitos, em camundongos duplamente imunodeficientes – RAG

Figura 3.5 – Modelo com indução de endometriose experimental heteróloga, com xenotransplante de endométrio humano pré-cultivado por via i.p., em camundongos duplamente imunodeficientes – RAG – em diferentes tempos do pós-operatório recente de ooforectomia bilateral

Figura 3.6 – Indução de endometriose experimental heteróloga, com xenotransplante de endométrio humano pré-cultivado por via i.p., em camundongos duplamente imunodeficientes – RAG – em pós-operatório imediato de ooforectomia, associada a pré (in vitro) e pós-tratamentos (via oral à partir da indução) com pioglitazona

Figura 4.1 - Análises macro (A-B) e microscópica (C-F) de lesões semelhantes à endometriose induzidas em camundongos RAG. Endométrio humano em fase proliferativa foi injetado na cavidade peritoneal dos animais na presença (A, C, E) ou ausência (B, D, F) de leucócitos humanos autólogos ao endométrio. Os cortes em C e D foram corados com HE. E e F representam os estudos imunohistoquímicos com anticorpo anti-vWF humano. A-B 15x; C-F 100x.

Figura 4.2 – Imunolocalização de leucócitos humanos em lesões endometrióticas experimentais congeladas. A – Imagem imunofluorescente dos leucócitos humanos marcados com CFSE (em verde) no tecido endometrial humano crescendo em meio a tecido murino (os tecidos humano e murino – não marcados com CFSE - foram contra-corados com DAPI, em azul). B – Coloração em HE de “corte-irmão” do corte apresentado em A. As linhas pontilhadas, em A e em B, marca a interface entre tecido humano (h) e tecido murino (m). 200x.

Figura 4.3 – Lesões representativas, semelhantes à endometriose induzidas em microambiente inflamatório, em diferentes tempos pós-ooforectomia, 4 horas (A) e 5 dias (B), com formação de adesões no sítio operatório (extremidade do corno uterino esquerdo). C: corno uterino esquerdo intacto. 15x

Figura 4.4 – Adesões significativas na cavidade abdominal de camundongos RAG com indução de endometriose em pós-operatório recente; A: cólon aderido ao intestino delgado; B: Omento aderido ao cólon. 15x

Figura 4.5 – Evidências de neoangiogênese em lesões semelhantes à endometriose induzidas em microambiente inflamatório agudo, 4 horas pós-ooforectomia (extremidade do corno uterino esquerdo). A: análise macroscópica, 15x; B: análise imunohistoquímica da microvascularização; anticorpo anti-vWF humano (anti-fator de vonWillebrand) como marcador de neoangiogênese. 100x

Figura 4.6 – Intensidade da microvascularização em lesões semelhantes à endometriose induzidas em microambiente inflamatório agudo, em diferentes tempos pós-operatórios: 4 horas (A) e 5 dias (B); análise imunohistoquímica da microvascularização; anticorpo anti-vWF humano (anti-fator de vonWillebrand) como marcador de neoangiogênese. 100x

Figura 4.7 – Lesões semelhantes à endometriose induzidas em microambiente inflamatório, com formação de adesões no sítio operatório (extremidade do corno uterino esquerdo). A: imagem representativa das lesões e adesões obtidas no grupo controle (sem pioglitazona); B: lesão representativa da indução de endometriose em animais que receberam pré (in vitro, na cultura endometrial) e pós (via oral, após injeção do endométrio) tratamentos com pioglitazona; apesar desta lesão estar no sítio de injúria tecidual, houve uma atenuação significativa do grau de adesão. 15x

Tabela 4.1 - Endometriose experimental em camundongos com injeção subcutânea (s.c.) ou intraperitoneal (i.p.) de endométrio humano, na presença (+) ou ausência (-) de leucócitos. Um grupo de animais recebeu injeção de leucócitos humanos autólogos ao endométrio, 24 horas antes da injeção de endométrio

Tabela 4.2 – Endometriose experimental em camundongos RAG com injeção intraperitoneal de endométrio humano, na presença (com) ou ausência (sem) de leucócitos humanos, autólogos ao endométrio

Tabela 4.3 – Identificação de leucócitos humanos marcados com PKH26 no sangue periférico e tecidos hematopoiéticos (baço e linfonodos mesentéricos) obtidos de camundongos RAG machos, por citometria de fluxo

Tabela 4.4 – Impacto do tempo pós-ooforectomia na formação de lesões e adesões e sua localização, na endometriose experimental heteróloga

Tabela 4.5 – Quantificação da vascularização nas lesões nos diferentes tempos do pós-operatório, através de densidade microvascular (MVD)

Lista de siglas e abreviaturas

β -HCG – gonadotrofina coriônica humana

CAM – membrana cório-alantóica

COX-2 – ciclooxigenase-2

DME/F12 - *phenol-red free Dulbecco's Eagles Medium / Ham's F-12 medium*

E2 – estrogênio, estradiol

ER– receptor estrogênico

FIV - fertilização in vitro

GnRH – hormônio liberador de gonadotrofinas

HBP – hiperplasia benigna da próstata

HE – hematoxilina-eosina

IAUC – *Vanderbilt University Institutional Animal Care and Use Committee*

IHC - imunistoquímica

IL - interleucina

IRB – *Vanderbilt University's Institutional Review Board and Committee for the Protection of Human Subjects*

ITS – *Insulin-Transferrin-Selenium*

LDL – lipoproteína de baixa densidade

MMP – metaloproteinase de matriz

MONO – leucócito mononuclear

MVD – densidade microvascular

NIH – *The National Institutes of Health*

NK – leucócitos *natural killer*

P4 – progesterona

P450 – sistema enzimático citocromo P450

PBS – *phosphate buffered saline*

PG - prostaglandina

PDEE – Programa de Estágio de Doutorando no Exterior (CAPES)

PIO – pioglitazona

POLI – leucócito polimorfonuclear

PR – receptor progestagênico

RAG – camundongo RAG2 γ (c)

SCID – *Severe Combined ImmunoDeficiency*

SPF – *Specific pathogen free*

TN - Tennessee

TNF – fator de necrose tumoral

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

VEGF –Fator de crescimento do endotélio vascular

vWF – fator de vonWillebrand

WRHRC – *Women's Reproductive Health Research Center (Vanderbilt University Medical School, Department of Obstetrics and Gynecology)*

Sumário

1. Introdução e revisão da literatura	13
1.1. ENDOMETRIOSE	13
1.1.1. <i>Importância Clínica</i>	13
1.1.2. <i>Etiologia e Fisiopatologia</i>	17
1.1.2.1. <u>Teorias etiopatogênicas</u>	17
1.1.2.2. <u>Mecanismos moleculares – fisiopatologias endócrina e imunológica e sua interdependência</u>	19
1.1.2.3. <u>Outros fatores</u>	24
1.2. MODELOS EXPERIMENTAIS DE ENDOMETRIOSE	25
1.2.1. <i>Modelos in vitro</i>	25
1.2.2. <i>Modelo intermediário in vitro/animal – CAM</i>	26
1.2.3. <i>Modelos in vivo</i>	26
1.2.3.1. <u>Homólogos</u>	26
1.2.3.2. <u>Heterólogos</u>	27
1.2.4. <i>Reconstituição leucocitária em camundongos imunodeficientes</i>	30
2. Objetivos	31
2.1. OBJETIVO GERAL	31
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3. Metodologia	33
3.1. ANIMAIS	33
3.1.1. <i>Linhagens utilizadas</i>	33
3.1.2. <i>Estrogenização</i>	33
3.1.3. <i>Procedimentos gerais</i>	33

3.2. MODELO EXPERIMENTAL DE ENDOMETRIOSE COM XENOTRANSPLANTE DE ENDOMÉTRIO HUMANO 22	
3.2.1. <i>Modelo experimental básico</i>	34
3.2.1.1. <u>Aquisição e preparo do tecido endometrial humano</u>	34
3.2.1.2. <u>Cultivo do tecido endometrial humano</u>	35
3.2.1.3. <u>Injeção do tecido endometrial humano nos animais</u>	35
3.2.1.4. <u>Coleta e destinação de amostras biológicas</u>	35
3.2.1.5. <u>Mensuração das lesões semelhantes à endometriose</u>	36
3.2.2. <i>Endometriose experimental com xenotransplante de endométrio humano, induzida em camundongos duplamente imunocomprometidos – RAG - previamente tratados com leucócitos autólogos ao endométrio</i>	37
3.2.2.1. <u>Isolamento de leucócitos humanos</u>	37
3.2.2.2. <u>Injeção de leucócitos prévia à injeção de tecido endometrial</u>	39
3.2.2.3. <u>Marcação fluorescente dos leucócitos e análises específicas</u>	39
3.2.3. <i>Endometriose experimental com xenotransplante de endométrio humano, em camundongos nude, imediatamente após ou em diferentes tempos do pós-operatório da ooforectomia; e efeito do pré e pós-tratamento com pioglitazona</i>	41
3.3. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	43
4. Resultados	44
4.1. IMPACTO DOS LEUCÓCITOS; DETECÇÃO IMUNOFLUORESCENTE DOS LEUCÓCITOS HUMANOS EM TECIDOS MURINOS E NAS LESÕES SEMELHANTES À ENDOMETRIOSE	44
4.1.1. <u>Análise das lesões quanto à vascularização</u>	44
4.1.2. <u>Deteção imunofluorescente dos leucócitos em tecidos humanos e nas lesões</u>	46
4.2. LESÕES, ADESÕES E ADERÊNCIAS INDUZIDAS EM MICROAMBIENTE INFLAMATÓRIO (PÓS-OOFORECTOMIA)	49

4.3. EFEITO DA PIOGLITAZONA NA FORMAÇÃO DAS LESÕES E ADESÕES INDUZIDAS NO PÓS-OPERATÓRIO IMEDIATO	52
5. Discussão	54
6. Conclusões	59
7. Referências Bibliográficas	60

1. Introdução e revisão da literatura

1.1 ENDOMETRIOSE

1.1.1 *Importância Clínica*

A endometriose é uma doença da mulher definida pela presença de tecido endometrial – estroma e/ou epitélio - ou de tecido “semelhante ao endométrio” (*endometrial-like*) em sítios extra-cavidade uterina, ocorrendo principalmente no peritônio pélvico e na superfície ovariana. O desenvolvimento da endometriose resulta possivelmente de diversos fatores anatômicos e/ou bioquímicos e moleculares, sendo considerada hoje uma doença de origem multicausal, basicamente esteróide e inflamatório-dependente.

A prevalência da endometriose tem relevância mundial; os dados absolutos de incidência não são claros na literatura, pela necessidade de procedimento invasivo para o diagnóstico, mas certamente ascendentes nas últimas décadas, sendo uma das principais causas da infertilidade feminina da atualidade. FARQUHAR (2000) descreveu prevalências de 2-22% em mulheres assintomáticas, 40-60% das mulheres com dismenorréia e 20-30% das mulheres sob investigação de subfertilidade. Estudos mais recentes indicam que a endometriose atinge 5 a 10% das mulheres em menacme e 25-35% das mulheres inférteis (PELLICER et al, 2001; MISSMER & CRAMER, 2003; GIUDICE & KAO, 2004; VIGANO et al, 2004).

Os fatores de risco relacionados à endometriose incluem os seguintes: adiamento da procriação, prolongamento da menacme (menarcas cada vez mais precoces e menopausas cada vez mais tardias), maior exposição à menstruação associados a ciclos menstruais curtos (polimenorréia), maior duração do período menstrual ou intensidade do fluxo (hipermenorréia), menor paridade e aumento da gordura corporal periférica com possibilidade de níveis maiores e flutuantes de estrogênio circulante. É sabido que a endometriose é rara após a menopausa e que durante a gravidez as lesões endometrióticas podem sofrer involução (GAZVANI et al, 2002), apesar dos níveis aumentados de fatores pró-angiogênicos, como o VEGF, na gestação. Fatores ou hábitos que tendem a diminuir os níveis

estrogênicos, como atividade física e tabagismo, apresentam relação inversa com o desenvolvimento da doença (ESKENAZI & WARNER, 1997).

Além da infertilidade, a endometriose está relacionada a várias queixas ginecológicas, como dor ou desconforto pélvicos, não necessariamente cíclicos, dismenorréia, dispareunia, lombalgia cíclica, sintomas urinários e intestinais cíclicos, além de irregularidades menstruais (amenorréia ou hipermenorréia) e perdas sanguíneas não menstruais. As manifestações clínicas são geralmente progressivas. A dor pode ser atribuída à inflamação envolvida na fisiopatologia da doença, o que pode determinar a estimulação de terminações nervosas pélvicas (BERKLEY et al, 2004). A inflamação parece estar envolvida também com fatores que levam à infertilidade, como receptividade endometrial reduzida e desenvolvimento inadequado de oócitos e embriões (BARNHART et al, 2002). Entretanto, a doença pode ter um curso sub-clínico; não é raro o achado casual de lesões endometrióticas em pacientes submetidas à laparoscopia por outro motivo (laqueadura tubária, por exemplo); isso traz o questionamento sobre a possibilidade da endometriose ser um evento intermitente e autolimitado, pelo menos em alguns casos (KONINCKX, 1996).

O diagnóstico definitivo é laparoscópico, e sempre deve ser confirmado por biópsia. O diagnóstico de endometriose à laparoscopia é muito mais frequente em mulheres inférteis do que nas férteis (SPEROFF et al, 1999; SPEROFF & FRITZ, 2005; ASRM, 2006a). O uso do marcador tumoral CA-125 vem sendo preconizado há anos na investigação da endometriose, entretanto, os ensaios são de baixa sensibilidade e especificidade, diminuindo seu valor preditivo, principalmente nos estádios iniciais. Mesmo os ensaios de segunda geração para o CA-125, apesar de maior sensibilidade, seus resultados não exibem correlação com melhor diagnóstico e tratamento (HORNSTEIN et al, 1995).

Os sítios mais comumente envolvidos com lesões endometrióticas são os ovários, fundo de saco posterior e anterior, folheto posterior do ligamento largo, ligamentos uterossacros, útero, tubas uterinas, cólon sigmóide, apêndice e ligamentos redondos (SCHENKEN, 2001; REDWINE, 2000). Estudos anátomo-patológicos classificam a doença como endometriose peritoneal – quando são encontrados implantes endometrióticos na superfície peritoneal pélvica e ovariana; endometrioma – presença de cistos ovarianos com mucosa endometrióide; e

endometriose do septo retovaginal – caracterizada por nódulo ou massa sólida de tecido endometrial, em meio a tecido adiposo e fibromuscular, entre o reto e a vagina.

Do ponto de vista anátomo-patológico macroscópico, são encontradas diversas formas de lesões. O aspecto das lesões depende da sua idade, a fase do ciclo menstrual e a extensão da doença. Lesões ativas são comumente avermelhadas ou com aparência de vesículas translúcidas, enquanto lesões em estado de menor atividade geralmente são negras, ou em placas castanhas, ou têm aspecto de cicatriz e fibrose, quando brancas. Na doença mais evoluída, são comuns as adesões, cistos ovarianos tipo “chocolate” (endometriomas), que contêm “sangue velho” em seu interior. Correlacionando a macroscopia com o sítio da lesão, no peritônio, observam-se lesões vesiculares (brancas, vermelhas e “achocolatadas”, lesões negras, lesões brancas fibróticas, lesões tipo “café com leite”, falhas peritoneais (*pockets*) e até mesmo hipervascularização e aderências frouxas. Quanto à endometriose ovariana, aderências firmes dos ovários em fossetas ovarianas são freqüentes e podem esconder um endometrioma em formação. Em estádios mais avançados, as aderências anexiais na face posterior uterina podem provocar distorção das tubas e endometriomas ovarianos, obstruindo parcial ou completamente o fundo de saco de Douglas, o que exige uma dissecação ampla para a restauração anatômica.

Há controvérsias a respeito de haver o(s) mesmo(s) mecanismo(s) etiopatogênico(s) para essas três principais formas de endometriose – peritoneal, endometrioma e retovaginal - ou se haveria mecanismos distintos para cada tipo (SANGI et al, 1995; NISOLLE et al, 1997). De uma forma ou de outra, apresentam características histopatológicas comuns, como a presença de estroma e epitélio endometrial nas lesões, hemorragia focal crônica e reação inflamatória. Além disso, as três formas podem co-existir numa só paciente, simultaneamente ou não, e todas estão associadas com o risco aumentado de infertilidade e dor pélvica crônica incapacitante (GUZICK et al, 1997; STOVALL et al, 1998).

De acordo com a última revisão da ASRM - *American Society for Reproductive Medicine* - a endometriose é classificada clinicamente- estágios de I a IV - não só quanto à topografia e aspecto das lesões, mas também quanto à gravidade e à morbidade relacionadas á instalação e evolução da doença e, principalmente,

correlacionar o grau e a extensão da doença e as chances de gestação. (ASRM, 1996). Essa classificação é baseada em observações videolaparoscópicas, porém, alguns autores vêm questionando sua reprodutibilidade em comparação com achados de laparotomias; vários estudos têm proposto novas classificações ou adaptações da versão da ASRM, justificando pela necessidade de uma maior correlação entre o estágio da doença e a conduta terapêutica e o prognóstico (BROSENS & BROSENS, 2000b; ABRAO et al, 2003; ASRM, 2006b).

Atualmente, as principais intervenções terapêuticas para a doença são a supressão farmacológica da ovulação através de contraceptivos orais combinados, de progestagênicos (orais, injetáveis, implantes ou sistema intra-uterino), de análogos do hormônio de liberação de gonadotrofinas (GnRH) e do danazol, pela supressão da hipófise anterior, e/ou ressecção cirúrgica das lesões, usualmente por via videolaparoscópica. Além de técnicas de reprodução assistida, quando a gravidez for desejada. A escolha do método terapêutico depende da sintomatologia mais evidente – dor ou subfertilidade – da gravidade da doença, e da idade da paciente. Dentre pacientes com sintomatologia algica, a grande maioria apresenta melhora temporária após tratamento clínico com análogos do GnRH, mas não influenciam significativamente a fertilidade. Há que se considerar também os efeitos adversos secundários ao uso desses fármacos: sintomas de hipoestrogenismo, como fogachos, secura vaginal e perda de libido (RICE, 2002). A ressecção das lesões profundas e a cauterização das lesões superficiais permitem menor recidiva e melhora sintomática. Entretanto, além de paliativas ou cruentas, tais intervenções podem amenizar a sintomatologia e/ou melhorar a fertilidade, mas não impedem que novas lesões surjam, curiosamente até mesmo após uma histerectomia, ou em mulheres com agenesia uterina; podendo a dor também persistir, mesmo na ausência de lesões videolaparoscopicamente detectáveis. Os procedimentos cirúrgicos, mesmo os mais modernos e menos invasivos, não são isentos de riscos e complicações, como o dano a outras estruturas pélvicas e a formação de adesões (FARQUHAR, 2000).

Como já suspeitado por Sampson, em 1921, especificamente para a endometriose ovariana, a incidência de atipias em cistos endometrióides varia entre 1,7 e 12,2% (VERCELLINI et al, 2003 e FUKUNAGA et al, 1997, respectivamente), o que justifica a confirmação anátomo-patológica. Entretanto, a abordagem cirúrgica

de endometriomas pode prejudicar a reserva folicular e os resultados da reprodução assistida. A abordagem conservadora, por sua vez, implicaria em maior risco de recorrência (NISHIDA et al, 2000). Considerando o modelo etiopatogênico que descreve a metaplasia celômica da superfície ovariana ou a invaginação do foco superficial, pode-se considerar que a cápsula do endometrioma, seria, por vezes, a própria córtex ovariana – o pseudo-endometrioma (DONNEZ et al, 1996). Sabe-se também que alguns endometriomas resultam da infiltração de cistos ovarianos funcionais, ou tumorais, pelas células endometrióides, sendo assim, geralmente a conduta a ser tomada leva em consideração o tipo de endometrioma, o volume ovariano e a idade da paciente (ALBORZI et al, 2004). Dados epidemiológicos e experimentais sugerem uma relação entre a endometriose ovariana e alguns tipos de câncer de ovário (DINULESCU et al, 2005; SOMIGLIANA et al, 2002).

1.1.2 *Etiologia e Fisiopatologia*

A etiologia e a fisiopatologia da endometriose não foram bem esclarecidas até o momento; estudos nesse sentido são de extrema importância para o melhor entendimento da doença e para o desenvolvimento de novas alternativas diagnósticas e/ou terapêuticas, e consequente diminuição do sofrimento das mulheres afetadas.

1.1.2.1 Teorias etiopatogênicas

Embora existam várias teorias etiopatogênicas, a teoria do fluxo menstrual retrógrado ou teoria da implantação – originalmente descrita por SAMPSON, em 1927 - é aceita até os dias de hoje como a principal via mecânica de origem das lesões endometrióticas. Essa teoria presume o transporte de células endometriais viáveis, no período menstrual, adesão dessas células no peritônio e subseqüentes implantação e proliferação. Há muito, trabalhos mostram a viabilidade do endométrio menstrual em relação à sua capacidade de implantação peritoneal (SAMPSON, 1940; TELINDE & SCOTT, 1950; RIDLEY & EDWARDS, 1958). KRUITWAGEN et al, em 1991, demonstraram a presença de células endometriais viáveis no fluido peritoneal. Além disso, há uma alta incidência de endometriose em pacientes com

obstrução congênita do trato reprodutivo, como, por exemplo, a agenesia de colo uterino (SANFILIPPO et al, 1986); além da maior incidência da doença em mulheres com menstruações mais frequentes (ciclo menstrual curto ou polimenorréia), o que possivelmente aumenta a frequência de menstruação retrógrada (HALME et al, 1984a). VAN DER LINDEN et al (1995) observaram a contenção de conteúdo uterino menstrual para a cavidade peritoneal em mulheres, mesmo com com tubas uterinas patentes, enquanto que DARROW et al (1993; em mulheres) e D'HOOGHE et al (1994; em macacas babuínas) observaram a associação de volumes importantes de refluxo menstrual para a cavidade peritoneal com um maior risco de desenvolvimento de endometriose. Contudo, definitivamente, a menstruação retrógrada não deve ser a única via ou condição fisiopatológica necessária para a instalação da doença, considerando que praticamente toda mulher em menacme pode apresentar refluxo do conteúdo uterino menstrual na cavidade peritoneal (HALME et al, 1984a), mas apenas cerca de 10% da população feminina mundial em fase reprodutiva desenvolvem endometriose. A quantidade de células endometriais que refluem através das fímbrias tubárias parece ser maior em pacientes com endometriose (SPEROFF et al, 1999; BROSENS & BROSENS, 2000a; MURPHY, 2002; GAZVANI et al, 2002; SPEROFF & FRITZ, 2005) .

Outras teorias defendem o fenômeno através de defeitos na embriogênese genital: a partir de restos embrionários - teoria da origem mülleriana; ou por transformação do epitélio celômico - teoria da metaplasia celômica. Esta última explicaria a possibilidade de metaplasia do mesotélio peritoneal, com transformação desse tecido em endométrio (VINATIER et al, 2001), o que poderia acontecer em resposta a processos inflamatórios e/ou hormonais locais. Outros dados da literatura, com utilização de método *in vitro* de implantação de tecido endometrial humano, demonstraram que a adesão de fragmentos endometriais é prevenida no caso de o mesotélio estar intacto (GROOTHUIS et al, 1999; KOKS et al, 1999). Ambas as teorias poderiam justificar a ocorrência, rara, de endometriose em sítios extraperitoneais, como tórax, globo ocular e espaço articular (FUJJI, 1991) ou até, inusitadamente, em homens, já sendo descrito casos de endometriose vesicular em homens submetidos à terapia estrogênica para hiperplasia benigna da próstata (HBP) (SUGINAMI, 1991; GAZVANI et al, 2002).

A teoria da disseminação linfática ou hematogênica é também citada, podendo explicar também a existência de focos extra-pélvicos e até ovarianos (SPEROFF et al, 1999; GAZVANI et al, 2002; SPEROFF & FRITZ, 2005). Menos citada é a teoria iatrogênica, justificada pelo carreamento inadvertido de pequenas porções de endométrio para a cavidade peritoneal, durante procedimento cirúrgico ginecológico ou obstétrico (LIU, 1986; SORENSEN et al, 1994), o que gera algumas controvérsias. Mais recentemente, SASSON & TAYLOR (2008) descreveram uma nova teoria, baseada na possibilidade de células sanguíneas circulantes, de origem na medula óssea, sofrerem diferenciação em tecido endometriótico, em vários sítios.

Todas essas teorias podem ser complementares e podem ser, ainda, moduladas por aspectos imunológicos, genéticos e ambientais (BROSENS & BROSENS, 2000a; GAZVANI et al, 2002).

1.1.2.2 Mecanismos moleculares – fisiopatologias endócrina e imunológica e sua interdependência

Várias distinções entre o tecido endometriótico e o endométrio eutópico normal, como hiperprodução de estrogênio, prostaglandinas e citocinas, além de peculiaridades do endométrio eutópico das mulheres com endometriose tem sido identificadas (TSENG et al, 1996; NOBLE et al, 1996 e 1997).

O papel dos esteróides no desenvolvimento da endometriose é bastante discutido e muito relevante. Várias pesquisas clínicas evidenciaram o efeito benéfico da utilização de inibidores da aromatase, bloqueando a gênese do estrógeno ativo, no controle das lesões endometrióticas (ATTAR & BULUN, 2006). O mesmo tem sido observado em estudos com agonistas da progesterona ou antiprogestagênicos, análogos do GnRH e contraceptivos orais, para a redução das lesões e efeito antálgico (MURPHY & CASTELANO, 1994; KETTEL et al, 1996 OLIVE & PRITTS, 2001). Os níveis de receptores nucleares para estrógeno e progesterona são bastante alterados no tecido endometriótico, em comparação ao endométrio normal (BRANDENBERGER et al, 1999; ATTIA et al, 2000; XUE et al, 2007).

Três vias metabólicas de esteroidogênese contribuem para o excesso de E2 em mulheres com endometriose: primeiramente, por mecanismo endócrino, através da secreção ovariana de estradiol na circulação e posterior ação nas lesões. Na

verdade, ocorre também mecanismo parácrino em relação ao estradiol ovariano, quando este é diretamente liberado na cavidade peritoneal, em grandes quantidades, na ocasião de rupturas foliculares. Em segundo lugar, pelo fato de a aromatase dos tecidos adiposo e subcutâneo catalisar a conversão de androstenodiona circulante em estrona, que é subseqüentemente convertida em estradiol; ambos metabólitos podem ganhar a circulação e também os sítios de tecido endometriótico. Uma terceira fonte de E2 encontra-se na esteroidogênese na própria lesão, portanto uma via autócrina, a partir do colesterol, considerando também a expressão de genes esteroidogênicos, como o STAR, citocromo p450 e aromatase, no tecido endometriótico (DHEENADAYALU et al, 2002; BULUN et al, 2005). Um efeito superior, através da estratégia terapêutica de combinação de agonistas de GnRH e de aromatase, no controle da dor pélvica a longo prazo, evidencia a idéia de que tanto a aromatase periférica, quanto a local são importantes para a persistência da doença (SOYSAL et al, 2004). Estudos mostram expressão reduzida da 17-hidroxiesteróide desidrogenase tipo 2 (HSD17B2), responsável pela conversão de estradiol em estrona (ZEITOUN et al, 1998); ao contrário, CARNEIRO et al (2007) observaram aumento da expressão dessa enzima em lesões endometrióticas peritoneais e endometriomas. Há evidências de alterações na síntese e no metabolismo do estrogênio (E₂) em associação com endometriose, no sentido de aumentar a disponibilidade desse hormônio (ATTIA et al, 2000), e até mesmo de redução das lesões endometrióticas em modelo experimental heterólogo com o uso de agonista do receptor estrogênico β (ER β), apontando para uma possível alteração da distribuição de receptores estrogênicos - ER α e ER β - em comparação com a distribuição fisiológica no endométrio humano, ao longo do ciclo menstrual (LECCE et al, 2001; HARRIS et al, 2005).

Estudos recentes indicam alterações da resposta endometrial à progesterona (P₄), no endométrio de mulheres com endometriose, sugerindo uma resistência à ação progestagênica (OSTEEN et al, 2005). Embora haja controvérsias, a resistência à P₄ na endometriose tem sido associada com um desequilíbrio dos efeitos dos receptores estrogênicos (PRs). ATTIA et al (2000) descreveram um predomínio do efeito dos receptores repressores tipo A (PRA) em relação aos PRB (ativadores dos genes-alvo da P₄) na endometriose, embora os níveis de receptores sejam bem diminuídos no tecido endometriótico, onde PRB é praticamente

indetectável e os níveis de PRA são bastante reduzidos, em comparação ao endométrio fisiológico, apesar dos altos níveis de progesterona (ATTIA et al, 2000; TSAI et al, 2001). Uma deficiência da proteína de ligação/*chaperone* FK506, enzima necessária para a função dos receptores progestagênicos, foi descrita para o endométrio de macacas babuínas com endometriose (JACKSON et al, 2007). Marcadores moleculares da ação progestagênica, como a glicodelina (epitélio secretório) e a prolactina (decidualização do estroma), apresentam níveis reduzidos em células endometrióticas, o que está de acordo com a idéia de *down-regulation* de receptores (KAO et al, 2003; OSTEEEN et al, 2005; BULUN et al, 2006). Entretanto, segundo opinião de alguns autores, o papel da P4 na fisiopatologia da endometriose permanece ambíguo, por três motivos (VERCELLINI et al, 1997; CHWALISZ et al, 2005; SURREY, 2006; MADAUSS et al, 2007): primeiro, a atribuição da progesterona como fator protetor na endometriose, à semelhança do câncer endometrial, parece inadequada, uma vez que na situação maligna a proliferação celular ocorre seletivamente no epitélio, enquanto que na endometriose, o tecido ectópico é preferencialmente constituído por estroma, cujas células apresentam uma taxa de apoptose diminuída, e pouca diferenciação; porém é bom lembrar que fisiologicamente a P4 está mais envolvida com a proliferação do estroma endometrial durante a fase secretória e na janela de implantação. Segundo, pela eficácia do tratamento da dor secundária à endometriose com drogas progestagênicas; contudo o efeito antálgico da progesterona pode ser explicado pela supressão ou atenuação da ovulação. E por último, uma gama de anti-progestagênicos com propriedades mistas (agonista e antagonista) – os *selective progesterone-receptor modulators* - podem ser mais eficazes do que a P4 no controle da dor pélvica associada à endometriose. Outra evidência da ocorrência de resistência aos receptores progestagênicos clássicos é a diminuição dos níveis da HSD17B2, através da qual a P4 exerce, pelo menos em parte, seu efeito anti-estrogênico. Adicionalmente, parece haver uma falha da ação do ácido retinóico no epitélio endometriótico, evento intermediário da indução da expressão da HSD17B2 mediada pela resposta estromal à P4 (mecanismo parácrino epitélio-estroma) (ZEITOUN et al, 1998; CHENG et al, 2007).

De fato, parece haver alterações hormonais locais importantes, com desequilíbrio entre as ações estrogênicas e progestagênicas, contribuindo para a manutenção dos implantes endometrióticos (GIUDICE & KAO, 2004).

DMOWSKI et al (1994) demonstraram que mecanismos de imunidade celular fisiológica poderiam ser também responsáveis pela eliminação de células autólogas, mal-localizadas ou aberrantes. Sendo assim, é razoável considerarmos que fragmentos endometriais presentes na cavidade peritoneal possam ser eliminados por efetores da imunidade celular, como macrófagos e linfócitos (DMOWSKI et al, 1989; GIUDICE & KAO, 2004), e que alterações dessa função possam estar associadas com o desenvolvimento da endometriose (OSTEEN & SIERRA-RIVERA, 1997). Defeitos moleculares e/ou alterações imunológicas seriam mecanismos relevantes para o sucesso da implantação do endométrio refluído na superfície peritoneal (LUCIDI et al, 2005).

De fato, a relação entre o estabelecimento da doença em mulheres e a concomitância de defeitos da imunidade celular já foi observada em vários estudos (STEELE et al, 1984; VIGANO et al, 1991; OOSTERLYNCK et al, 1991 e 1992). Além disso, DMOWSKI et al (1981) já haviam evidenciado alterações da resposta imune a antígenos autólogos em macacas *rhesus*, com endometriose espontânea, embora imunocompetentes. Quando um estado de imunodeficiência foi induzido nesses animais, física ou quimicamente, houve um aumento significativo da freqüência, gravidade e morbidade da doença (FANTON & GORDON, 1991; PRESL, 1993; RIER et al, 1993).

Alguns investigadores observaram que monócitos circulantes de mulheres com endometriose são capazes de estimular a proliferação de células endometriais normais e, adicionalmente, que as células endometriais das mulheres com endometriose são mais sensíveis a tal efeito (BRAUN et al, 1994). A presença de macrófagos ativados no líquido peritoneal, com aumento da produção de VEGF e citocinas pró-inflamatórias e seus efeitos pró-angiogênicos, bem como alterações na resposta fibrinolítica peritoneal, predispõem à implantação e progressão dos implantes endometrióticos e o surgimento de aderências. A inflamação típica do tecido endometriótico está associada a uma superprodução de prostaglandinas, metaloproteinases de matriz (MMPs), citocinas e quimiocinas. As PGs E2 e F2 α , em

particular, hormônios locais envolvidos na gênese de inflamação e dor, são importantes na patogênese da endometriose, ambas são produzidas em excesso no endométrio eutópico e nas lesões endometrióticas de mulheres com endometriose. A $\text{PGF2}\alpha$ está também associada à dismenorréia, pelo seu efeito contrátil no miométrio. Níveis aumentados de citocinas da inflamação aguda, como $\text{IL-1}\alpha$, IL-6 e TNF , provavelmente incrementam a adesão do tecido endometrial em superfícies peritoneais, enquanto que as MMPs e seus inibidores (TIMP) modulam a invasão e penetração dos implantes endometrióticos. A proteína de quimiotaxia de monócitos tipo 1, IL-8 e RANTES (*regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted*, quimiocina), são todos capazes de atrair e/ou ativar granulócitos, células NK e macrófagos nos focos endometrióticos (OSTEEN et al, 1996; TSENG et al, 1996; HORNUNG et al, 1997; AKOUM et al, 2000; SHARPE-TIMMS & COX, 2002; KAO et al, 2003; GIUDICE & KAO, 2004; ULUKUS et al, 2005; JABBOUR et al, 2006; e WU et al, 2006).

Enquanto o estrogênio favorece a sobrevivência das lesões, as prostaglandinas e as citocinas modulam a dor, a inflamação e a infertilidade. Como retroalimentação positiva, a PGE2 estimula a expressão de todos os genes necessários para a esteroidogênese, como por exemplo os genes *STAR* (*Steroidogenic acute regulatory protein*) e o *CYP11A1* (gene codificador da aromatase); a ativação do receptor EP2 da PGE2 aumenta os níveis de cAMP, que por sua vez induz a expressão de *STAR* e *CYP11A1* em células endometrióticas estromais, cujo fator de transcrição chave é o receptor nuclear SF1 (*Steroidogenic Factor 1*) – presente no tecido endometriótico, porém ausente no endométrio eutópico normal. Há também evidências de uma *up-regulation* da COX-2 nas células endometrióticas estromais, em comparação ao estroma eutópico. A exemplo das hiperplasias e malignidades endometriais, a enzima microssomal PGE2 -sintase também poderia ser superexpressa, incrementando ainda mais a superprodução de PGs. Por sua vez, a própria PGE2 e a $\text{IL-1}\beta$, por via de retroalimentação positiva autócrina, induzem a expressão de COX-2 em células estromais endometriais e endometrióticas, enquanto que o VEGF e o estradiol, via $\text{ER}\beta$, também induzem a mesma superexpressão em células endoteliais e no estroma endometriótico (ZEITOUN & BULUN, 1999; JABBOUR et al, 2001; OTA et al, 2001; NI et al, 2002; TAMURA et al, 2002; SUN et al, 2003 e 2004; BULUN et al, 2005 e WU et al, 2005).

Por tudo isso, o excesso de E2 e de PGs, e o desenvolvimento de resistência à P4 tem emergido como alvos úteis em estudos farmacológicos; as abordagens terapêuticas com alvo na aromatase, na ciclooxigenase-2 (COX-2) e nos receptores progestagênicos podem proporcionar a redução da dor pélvica e/ou do tamanho das lesões endometrióticas laparoscopicamente visíveis (VERCELLINI et al, 1993; KETTEL et al, 1996; BRUNER et al, 1997; GUZICK DS et al, 1997; NOBLE et al, 1997; RYAN & TAYLOR, 1997; BULUN et al, 2001; TSAI et al, 2001; HAYES & ROCK, 2002; e SUN et al, 2003; ATTAR & BULUN, 2006).

Além de alterações da resposta imuno-inflamatória em pacientes com endometriose, há evidências de que outros mecanismos fisiopatológicos, como alterações nos processos de apoptose e angiogênese, favorecem a sobrevivência e a manutenção do tecido endometriótico (DMOWSKI et al, 1989; OSTEEEN & SIERRA-RIVERA, 1997; DMOWSKI et al, 2001; TAYLOR et al, 2002; HULL et al, 2003; BÉLIARD et al, 2004). Esses processos patológicos são parcialmente dependentes das ações estrogênica e progestagênica.

Tudo isso corrobora a hipótese de que leucócitos periféricos e leucócitos/células inflamatórias residentes do microambiente peritoneal poderiam ter um papel importante no estabelecimento e desenvolvimento da doença, através da liberação, direta ou indireta, de citocinas e fatores de crescimento, que, por sua vez, poderiam contribuir para a proliferação e/ou a manutenção do tecido ectópico. A revisão de LEBOVIC et al (2001) aponta para a existência de alças de *feedback* positivo autorregulatórias, que assegurariam o acúmulo de células imunitárias, citocinas e quimiocinas em lesões endometrióticas estabelecidas.

1.1.2.3 Outros fatores

Há também fatores genéticos envolvidos na patogênese da endometriose, evidenciados pela alta concordância entre gêmeas monozigóticas e a prevalência da endometriose, que é seis a sete vezes mais alta em parentes de primeiro grau das mulheres afetadas, em comparação com a população em geral (SIMPSON et al, 1980; SPEROFF & FRITZ, 2005). Há evidências de uma herança ligada aos cromossomos 7 e 10 na endometriose, mas genes relevantes ainda não foram identificados nessas regiões (TRELOAR et al, 2005; MONTGOMERY et al, 2008).

A incidência da endometriose também é aumentada em mulheres que foram expostas a toxinas ambientais, como a dioxina, ou a estrógenos potentes, como o dietilbestrol, ainda na vida intra-uterina (MISSMER et al, 2004). OSTEEEN et al (2005) discutiram a relação entre a exposição a toxinas ambientais e os distúrbios imunes e endócrinos já descritos para a patogênese da endometriose. Além disso, perfis de expressão gênica do endométrio eutópico de mulheres com endometriose têm revelado genes candidatos relacionados com falência de implantação, infertilidade e resistência à progesterona, o que o difere do endométrio de mulheres saudáveis (KAO et al, 2003; BURNEY et al, 2007).

Os três alvos terapêuticos críticos – aromatase, COX-2 e receptores da P4 – teriam correlação com marcadores epigenéticos específicos, de hipometilação, o que causa superprodução do fator esteroideogênico-1 (SF-1) e de ER- β (XUE et al, 2007a e 2007b; para revisão ver BULUN et al, 2009).

Em suma, cada vez mais a endometriose é vista como uma doença complexa, crônica e sistêmica, além de poligênica (para revisão ver BULUN, 2009).

1.2 MODELOS EXPERIMENTAIS DE ENDOMETRIOSE

Vários modelos experimentais de endometriose têm descritos na literatura REF MÁRCIA. A teoria de Sampson foi comprovada experimentalmente há várias décadas, através da indução de lesões endometriais ectópicas em macacas com menstruação retrógrada provocada cirurgicamente (TE LINDE & SCOTT, 1950). RIDLEY e EDWARDS, em 1958, também obtiveram sucesso, mesmo que totalmente incoerentes com os padrões éticos da nossa atualidade, na indução de endometriose em duas de quinze mulheres voluntárias, submetidas à injeção intraperitoneal de conteúdo menstrual autólogo.

1.2.1 Modelos *in vitro*

Alguns modelos experimentais de endometriose *in vitro* já foram confeccionados, com o uso de células (epiteliais e/ou estromais) ou tecido endometriais (eutópico ou ectópico) em cultura, submetidos a várias situações do

ambiente do cultivo – técnicas de estudo de adesão e proliferação e ensaios com provocação inflamatório/imunológica e/ou farmacológica.

1.2.2 Modelo intermediário *in vitro/animal* – CAM

Há um modelo intermediário heterólogo, originalmente utilizado para o estudo da implantação e invasão de tumores (MURPHY, 1912; LEIGHTON, 1964; SCHER et al, 1976), feito através da implantação de células ou tecido endometriais humanos em preparação de membrana coroalantóica de embrião de galinha (CAM). Esse modelo permitiu estudos da fase inicial da patogênese da endometriose e a presença de células estromais e glandulares humanas nas lesões semelhantes à endometriose (MAAS et al, 2001). Foi também evidenciado, através do modelo em CAM, que a integridade da arquitetura tecidual do endométrio é determinante para o sucesso da implantação em sítios ectópicos (NAP et al, 2003).

1.2.3 Modelos *in vivo*

Os modelos *in vivo* podem ser divididos em homólogos (autólogos ou alogênicos) e heterólogos.

1.2.3.1 Homólogos

Quanto aos modelos homólogos - aqueles com indução de lesões endometrióticas em espécies de mamíferos, utilizando tecido endometrial do mesmo animal ou da mesma espécie - vários já foram descritos e estudados nas últimas décadas, com utilização de espécies de macacas que menstruam, modelos esses espontâneos ou provocados. Estudos em macacas babuínas demonstraram a associação entre grande volume de tecido endometrial refluído para a cavidade abdominal e maior risco de desenvolvimento de endometriose (D'HOOGUE et al, 1994); SILLEM et al (1996) demonstraram, em modelo experimental com macacas *cynomolgus*, que a digestão dos fragmentos de tecido endometrial com colagenase, previamente à implantação, reduz a viabilidade do implante.

O uso de primatas – animais com maior semelhança genética e estrutural com o homem - é uma prática complexa, pelo alto custo e difícil manejo físico e sanitário em biotérios e laboratórios especializados. Além de espécies de primatas que menstruam (fêmeas de primatas mais evoluídos), os únicos mamíferos que menstruam são as fêmeas de determinada espécie de morcego e de um mamífero exótico africano, da super-ordem *Afrotheria*, incomum nas Américas, o *elephant-screw* (pelo menos a espécie *Elephantulus myurus jamesoni*; HORST & GILMAN, 1941). Sendo assim, vários estudos foram realizados utilizando fêmeas de mamíferos não-primatas, de manejo mais prático, como coelhas, ratas e camundongas, com indução de lesões semelhantes à endometriose, a partir de endométrio alogênico.

1.2.3.2 Heterólogos

Na década de 80, surgiu o modelo experimental heterólogo (ou quimérico) de endometriose - com xenotransplante de endométrio humano na cavidade abdominal e/ou no tecido subcutâneo de camundongas - que implica na utilização de animais imunocomprometidos, para que as reações de rejeição do organismo receptor contra o xeno-implante sejam evitadas, ou pelo menos minimizadas. Este vem obtendo grande destaque nas pesquisas sobre endometriose, visto que estudos experimentais prospectivos em humanos são praticamente impossíveis, por motivos éticos, e levando em consideração as dificuldades para estudos em primatas e nas raras espécies de mamíferos cuja fêmea menstrua. Um modelo que utiliza endométrio humano, tendo como substrato biológico um organismo vivo, pequeno, de fácil manejo e controle, onde não haja rejeição do implante heterólogo pela ausência ou insuficiência do sistema imunológico do animal experimental, seria mesmo relevante, uma vez que os estudos com implante de endométrio alogênicos em camundongas ou ratas imunocompetentes não correspondem a uma reprodução fidedigna da patologia, pois estes animais não menstruam e muito menos apresentam endometriose espontânea.

Os camundongos imunocomprometidos inicialmente utilizados para a confecção de modelos heterólogos foram os *nude* (naturalmente atímicos, nu/nu) e os *SCID* (imunodeficiência primária, scid/scid). Existem várias linhagens de

camundongos *nude* (swiss, Balb-C-nu/nu), que são animais com alteração genética espontânea, apresentando fenótipos característicos como a ausência de pêlos e imunocomprometimento por agenesia tímica, com ausência de linfócitos T maduros e deficiência de algumas imunoglobulinas, além de alterações da fertilidade para ambos os sexos. Já os camundongos *SCID* (*Severe combined immunodeficiency*), também com alteração genética espontânea, apresentam deficiência de linfócitos T e B e hipoatividade de linfócitos NK (*natural killer*). REF

O primeiro modelo heterólogo de endometriose foi descrito por ZAMAH et al (1984). Esses autores obtiveram sucesso com implantes de endométrio humano e de lesões ectópicas, frescos, na cavidade abdominal e no tecido subcutâneo de camundongos NUDE, previamente tratados com estradiol subcutâneo, com a preservação das características morfológicas básicas do tecido original. Esses autores também demonstraram que implantes utilizando preparações de células endometriais em suspensão não foram capazes de determinar lesões endometrióticas, macro ou microscopicamente, evidenciando também a necessidade da integridade tecidual do implante. Outros estudiosos foram aprimorando esse modelo: NISOLLE et al (.2000); BRUNER et al (1997); BRUNER-TRAN et al (2000); HULL et al (2003); GROOTHUIS et al (2004). Esses modelos têm sido eficazes na investigação fisiopatológica da endometriose, em vários aspectos, dentre eles, principalmente o angio e o imunogênico.

O laboratório de endometriose do *Women's Reproductive Health Research Center*, do *Vanderbilt University Medical Center*, em Nashville, TN, EUA, tem trabalhado intensamente com o modelo de endometriose experimental com xenotransplante em camundongos NUDE previamente ooforectomizadas e estrogenizadas, desde a década de 90, no sentido de investigar melhor os possíveis mecanismos que levam à adesão e a sobrevivência de endométrio ectópico. Inicialmente, usaram o modelo para investigar o impacto da pré-exposição *in vitro* do endométrio humano aos esteróides, na subsequente invasão inicial e estabelecimento de lesões semelhantes à endometriose, na cavidade abdominal dos camundongos receptores. Utilizando o mesmo modelo, esse grupo de pesquisadores observou que tanto as metaloproteinases (MMP; BRUNER et al, 1997) e o fator de crescimento endotelial (VEGF; HULL et al, 2003) são requisitos para o estabelecimento, crescimento e invasão tecidual do endométrio humano

ectópico, no peritônio dos animais imunocomprometidos. E ainda, a exposição aguda do tecido endometrial humano a interleucina-1 α (IL-1 α), uma citocina chave na resposta inflamatória aguda, também promove o desenvolvimento de lesões endometrióticas no modelo. É bom lembrar que a IL-1 α é capaz de estimular a produção de ambos, MMP e VEGF, durante o reparo de injúria tecidual. Tais dados da literatura apontam para a grande importância do modelo heterólogo para o estudo da fisiopatologia imuno-inflamatória da endometriose.

Entretanto, os modelos heterólogos com camundongos NUDE ou *SCID* apresentam algumas limitações, em virtude da dificuldade de imuno-identificação de fatores ou estruturas espécie-específicos na quimera – no tecido invasor humano e/ou no sítio peritoneal murino invadido – responsáveis pelo estabelecimento e perduração das lesões endometrióticas. Além disso, ocorre que o camundongo NUDE apresenta limitações em relação ao grau de imunocomprometimento; ao longo da vida, esses animais apresentam uma imunidade compensatória, com desenvolvimento, e até mesmo hiperatividade das linhagens linfocitárias que ainda persistem nesse modelo de imunodeficiência espontânea, como os linfócitos NK; além de apresentarem uma maior susceptibilidade a tumores como linfomas. Os camundongos *SCID*, por sua vez, parecem não apresentar imunidade compensatória ao longo da vida, mas são mais susceptíveis a tumores como timomas. Todas essas limitações dificultam estudos a longo prazo, e também a eficácia da experimentação, sob o ponto de vista imunopatológico. REF

Em 2004, GREENBERG & SLAYDEN descreveram sucesso na confecção de modelo experimental heterólogo de endometriose em camundongos geneticamente modificados e duplamente imunocomprometidos – da linhagem Rag2 γ -c, duplo *knockout* - resultante do cruzamento de duas linhagens imunocomprometidas, a Rag2 *knockout* e a γ -c *knockout*, com supressão de linfócitos T e B, deficiência de linfócitos NK, ausência do fenômeno de imunidade compensatória e sem susceptibilidade aumentada ao desenvolvimento de tumores ou de reações auto-imunes. A nova linhagem de camundongo poderia então suprir, pelo menos em parte, as limitações daquelas linhagens já utilizadas no estudo da endometriose, através do modelo experimental heterólogo, permitindo estudos mais prolongados.

1.2.4 Reconstituição leucocitária em camundongos imunodeficientes

Além de maior fidedignidade em termos de imunodeficiência, os Rag2 γ (c) poderiam permitir também estudos de imunofisiopatologia com reconstituição leucocitária autóloga ou heteróloga ao endométrio da doadora, o que é impraticável nas linhagens NUDE e SCID, que apresentam rejeição aos leucócitos humanos (GOLDMAN, 1998).

São vários, na literatura, os estudos, geralmente imunopatológicos ou imunoterápicos e oncológicos, que utilizam a técnica de reconstituição leucocitária, homo ou heteróloga, como ferramenta. Entretanto, essa técnica ainda não havia sido testada para a endometriose experimental.

2. Objetivos

2.1 OBJETIVO GERAL

Estabelecer e aprimorar modelos experimentais heterólogos para a endometriose, com xenotransplante de endométrio humano em camundongos imunocomprometidos, Rag2 γ /c ou nude, enfocando o efeito de leucócitos e eventos inflamatórios pós-operatórios na indução, no desenvolvimento e na manutenção das lesões endometrióticas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer modelo experimental heterólogo de endometriose, através da injeção, por vias intraperitoneal (i.p.) e subcutânea (s.c.), de tecido endometrial humano eutópico, em camundongos duplamente imunocomprometidos, bem como o efeito da prévia reconstituição com leucócitos autólogos ao endométrio, por via i.p., na indução, desenvolvimento e manutenção das lesões endometrióticas (semelhantes à endometriose) resultantes. Caracterizar essas lesões quanto à frequência, quantidade e volume, bem como quanto ao grau de neovascularização, comparando com animais controle que não receberam leucócitos. Comprovar a migração dos leucócitos e identificar os possíveis locais de instalação dos leucócitos humanos no organismo murino.
- Estabelecer modelo experimental de endometriose heterólogo, através da injeção de tecido endometrial humano eutópico, por via i.p., em diferentes tempos do pós-operatório da ooforectomia (imediate a tardio), em camundongos imunodeficientes. Avaliar a frequência, quantidade e volume das lesões, bem como a ocorrência de adesões no sítio operatório e associação das adesões com as lesões endometrióticas resultantes, comparando com o grupo de animais controle, submetidos à ooforectomia fictícia. Avaliar também o grau de vascularização das diferentes lesões.

- Avaliar os possíveis efeitos do pré e pós-tratamento com pioglitazona, um potente agente anti-inflamatório e anti-angiogênico, na prevenção e/ou redução do grau de adesões obtidas no modelo de endometriose experimental em camundongos imunodeficientes, com injeção precoce – no pós-operatório imediato da ooforectomia - de tecido endometrial humano eutópico. Caracterizar as lesões quanto à frequência, quantidade e volume, e associação com adesões pós-operatórias, comparando com animais controle não tratados com pioglitazona.

3. Metodologia

3.1 ANIMAIS

3.1.1 *Linhagem utilizada*

Foram utilizados camundongos da linhagem Rag2 γ (c) (RAG), duplamente imunocomprometidos. Para cada série experimental, fêmeas jovens (cerca de 5 a 8 semanas de idade) eram adquiridas da empresa *Taconic Farms, Inc. (Germantown, NY)*. Os animais eram mantidos por, pelo menos, uma semana no biotério do centro de pesquisa (*Vanderbilt Animal Care Center*), sob condições *SPF* (em estantes ventiladas com ar ultrafiltrado, composta de mini-isoladores, com no máximo cinco animais por mini-isolador), antes de qualquer procedimento experimental, para aclimatação. As fêmeas RAG eram, então, submetidas à ooforectomia bilateral, por via mediana dorsal.

3.1.2 *Estrogenização*

As fêmeas RAG, pelo menos cinco dias pós-ooforectomia, eram submetidas à implantação cirúrgica de cápsulas de estradiol em silastic, de liberação lenta, contendo cerca de 8mg de 17 β -estradiol (Sigma) em 2mg de colesterol, artesanalmente confeccionadas, no subcutâneo do membro posterior direito, o que garante uma concentração supra-fisiológica de estrogênio plasmático, por vários dias. A partir da implantação da cápsula de estrogênio, os animais eram alimentados com ração enriquecida com 17 β -estradiol. Dentro de um período médio de 24 horas após a estrogenização, os animais eram submetidos à injeção de células e/ou endométrio previamente preparados, de acordo com cada abordagem experimental específica.

3.1.3 *Procedimentos gerais*

Todos os procedimentos cirúrgicos e de injeção de células ou de fragmentos de endométrio eram realizados com assepsia rígida e sob fluxo laminar; a anestesia era inalatória com isoflurano em oxigênio (*Henry Schein, Inc., Melville, NY*); a analgesia era realizada com opióide, e a sutura externa com clips de prata. Todos os procedimentos aos quais os animais foram submetidos estavam de acordo com os

protocolos da IAUC (*Vanderbilt University Institutional Animal Care and Use Committee*), segundo o *Animal Welfare Act*.

3.2 MODELO EXPERIMENTAL DE ENDOMETRIOSE COM XENOTRANSPLANTE DE ENDOMÉTRIO HUMANO

O desenho básico do modelo experimental será descrito inicialmente em linhas gerais, com a metodologia comum a todas as abordagens, desde a aquisição do tecido endometrial humano, passando pelo seu preparo e injeção nos animais, até a necropsia e coleta das lesões encontradas, de outros tecidos ou órgãos, e de sangue; e o destino dos mesmos aos procedimentos analíticos utilizados (Figura 6.1). Posteriormente, serão feitas descrições das particularidades de cada abordagem experimental, separadamente.

3.2.1 Modelo Experimental Básico

3.2.1.1 Aquisição e preparo do tecido endometrial humano

Amostras de tecido endometrial eutópico de mulheres híginas – doadoras cadastradas no *Women's Reproductive Health Research Center's Tissue Repository*, sob protocolo de aprovação geral, IRB #030816 – entre 18 e 45 anos, em fase proliferativa do ciclo menstrual (D 9-12), eram obtidas através de biópsia endometrial com Pipelle® (*Unimar, Inc; Wilton, Connecticut, EUA*).

Os critérios de inclusão para as doadoras foram: ciclo menstrual fisiológico, ausência de história clínica ou sintomas de endometriose (dor, sangramento, etc.), espessura endometrial ultrassonográfica ≥ 9 mm, nível de progesterona sérica $\leq 1,5$ ng/mL, ausência de qualquer tratamento medicamentoso com fármacos hormonais e não-hormonais há pelo menos 3 meses, ausência de história clínica de infertilidade, além de ausência de desejo ou procura por gravidez, estado gestacional (negatividade para β -HCG urinário no dia da coleta) ou puerperal ou de nutriz. Consentimento informado, também aprovado pelo IRB, era obtido com assinatura de todas as doadoras, antes da biópsia.

As amostras de endométrio humano eram lavadas em meio de cultura pré-aquecido, à temperatura ambiente – *phenol-red free Dulbecco's Eagles Medium / Ham's F-12 medium* (DME/F-12; *Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA*) – para remover resíduos de sangue e muco antes do cultivo propriamente dito.

3.2.1.2 Cultivo do tecido endometrial humano

As amostras de endométrio humano eram, imediatamente após a biópsia, seccionadas em fragmentos ainda menores (1 a 2mm³), sob fluxo laminar, que eram lavados em PBS e, porções de 8-10 fragmentos, eram distribuídas em placa de cultivo com vários poços, em DME/F-12. A cultura endometrial era mantida sem complementação protéica (*serum-free*), em DME/F-12 suplementado com 1% de ITS (*Insulin-Transferrin-Selenium, Collaborative Biomedical; Bedford, Massachusetts, EUA*) e 0,1% de *Excyte* (lipoproteínas bovinas; *Miles Scientific; Kankakee, Illinois, EUA*); tratada com 17β-estradiol (*Sigma*) 1nM e mantida a 37°C, em incubadora umidificada, com 5% de CO₂, por 18 a 24 horas, antes de ser injetada nos camundongos.

3.2.1.3 Injeção do tecido endometrial humano nos animais

Após o período de cultivo do endométrio, o material era lavado com PBS (*phosphate buffered saline; Gibco*) e o conteúdo de cada poço da placa era acondicionado em seringa de 1mL, com os fragmentos de endométrio cultivados suspensos em PBS, em um volume total de 0,4mL. O conteúdo de cada seringa, por sua vez, era injetado intraperitonealmente (i.p.), na linha mediana infra-umbilical dos animais previamente ooforectomizados e estrogenizados, utilizando agulha de 18G. Em algumas abordagens a injeção de endométrio foi feita no subcutâneo abdominal.

3.2.1.4 Coleta e Destinação de Amostras Biológicas

Ao final do período estipulado para cada abordagem experimental, os animais, que eram mantidos no biotério já citado, previamente anestesiados, eram submetidos à eutanásia, por desconexão cervical. Quando necessária a coleta de amostras de sangue, essa era feita imediatamente após a eutanásia, por punção cardíaca percutânea, utilizando seringas de 1mL e agulhas 27G, previamente



Figura 3.1 – Modelo básico de endometriose experimental heteróloga, com xenotransplante de endométrio humano em camundongos duplamente imunodeficientes – RAG

heparinizadas. Logo em seguida, os animais eram submetidos à inspeção do abdome, laparotomia mediana xifopúbica, e necrópsia da cavidade abdominal, numa ordem padrão de avaliação das vísceras (crânio-caudal e ântero-posterior). Todas as lesões sugestivas de tecido endometriótico, aderidas ou não às estruturas abdominais, eram examinadas *in situ*, através de estereomicroscopia. A macroscopia de cada lesão (local e ou órgão associado, se aderida ou não, tamanho estimado, cor, aspecto) era documentada e, sempre que possível, as lesões eram fotografadas com magnitude padrão e as fotos arquivadas digitalmente. Feito isso, as lesões a serem submetidas à análise histológica e/ou imunohistoquímica, eram, então, colocadas em frascos contendo solução de formalina tamponada resfriada, para fixação. Os frascos eram mantidos a 4°C, até posterior processamento histológico. De acordo com cada abordagem experimental, outros tecidos ou órgãos eram também coletados, como baço, linfonodos mesentéricos e sangue periférico, e devidamente preparados e destinados às análises histológica, por citometria de fluxo ou microscopia confocal.

3.2.1.5 Mensuração das lesões semelhantes à endometriose

Além da caracterização macroscópica, cada lesão era também submetida à mensuração do volume, através da fotografia arquivada, com régua milimetrada superposta à imagem reproduzida em monitor de computador, sem modificação da magnitude original. Eram tomados o maior e o menor diâmetro, **a** e **b**, respectivamente, de cada lesão, e o volume total – **V** - era calculado por método padronizado, através da fórmula – $V = a \times b^2 \times 0,5$ – reportada por CARLSSON et al

(1983), em revisão de fórmulas para a medida do volume de pequenos tumores hepáticos, em ratos.

Os dados para as lesões serão apresentados, para cada grupo experimental, na forma de porcentagem de ocorrência de lesões nos animais que receberam o xenotransplante; número médio de lesões por animal; média dos volumes das lesões; e volume total das lesões por animal.

3.2.2 Endometriose experimental com xenotransplante de endométrio humano, induzida em camundongos duplamente imunocomprometidos – RAG - previamente tratados com leucócitos autólogos ao endométrio

Foram utilizadas oito amostras de endométrio para este estudo, e 39 fêmeas RAG, adquiridas e ooforectomizadas com 5 e 6 semanas de idade, respectivamente. As amostras de endométrio humano, bem como os animais, foram preparadas segundo descrição geral acima. Cerca de 24 horas antes da injeção do endométrio pré-cultivado, os animais receberam injeção de leucócitos humanos, autólogos ao endométrio, para cada série experimental (Figura 6.2). Segue abaixo a descrição da coleta de sangue, isolamento e injeção dos leucócitos.

3.2.2.1 Isolamento de leucócitos humanos

De maneira similar às descrições de GOLDMAN e al (1998) e BERNEY et al (2001), leucócitos humanos periféricos mononucleares e neutrófilos, os quais foram coletivamente denominados de leucócitos, eram isolados de amostras de sangue das mesmas doadoras do tecido endometrial e no mesmo dia da biópsia de endométrio.

Um volume de 50mL de sangue total era colhido de cada doadora, com heparina como anticoagulante, por flebotomia em antebraço, com processo a vácuo (tubos *Vacutainer*, *Becton Dickinson*, *Franklin Lakes, NJ*, EUA) e agulhas de 19G. Em seguida, o sangue heparinizado era diluído em PBS, na proporção de 1:2, homogeneizado e, então, redistribuído cuidadosamente em tubos cônicos de 50mL, envolvidos em papel alumínio (protegidos da luz), sobre camada de solução de separação por densidade *Ficoll-Hypaque* (Figura 6.2). Esses tubos eram

imediatamente centrifugados, à temperatura ambiente, depois do que eram obtidas camadas de componentes do sangue, de acordo com as diferentes densidades. A primeira camada – plasma diluído, contendo plaquetas – era desprezada. A segunda camada, de células mononucleares (“MONO”, com predomínio de linfócitos e monócitos), um anel branco nublado, era cuidadosamente transferida para novos tubos, refrigerados, cujos volumes eram completados com meio DME/F-12, homogeneizados e centrifugados, a 4°C. Depois disso, o sobrenadante era desprezado e as células MONO lavadas mais uma vez com o meio. Novamente, o sobrenadante era desprezado e o *pellet* celular era ressuscitado em 1 a 2 mL de PBS, e as células eram contadas em hematocítômetro, sendo aquelas não viáveis excluídas pelo método de azul de Trypan. A camada seguinte, de Ficol-Hypaque, era também desprezada. As duas últimas camadas, *pellet* de eritrócitos sob fina camada de polimorfonucleares (“POLI”, com predomínio de neutrófilos), eram cuidadosamente ressuscitadas em solução de Dextran previamente preparada e mantida à temperatura ambiente, sendo os tubos homogeneizados e a suspensão deixada à temperatura ambiente, por aproximadamente 60 a 90 min, para sedimentação. Após esse tempo, o sobrenadante era coletado em novos tubos, refrigerados, que eram completados com DME/F-12, homogeneizados e centrifugados a 4°C. Depois disso, o sobrenadante era desprezado, era feita hemólise com salina hipotônica gelada, e as células POLI lavadas mais uma vez com o meio. Novamente, o sobrenadante era desprezado e o *pellet* celular ressuscitado em 1 a 2 mL de PBS, e as células contadas em hematocítômetro, sendo as não viáveis excluídas pelo método de azul de Trypan.

Antes da inoculação nos animais, era feito *pool* de células MONO e POLI (50% cada), ressuscitados em PBS com a finalidade de deixar determinada proporção em milhões de células viáveis / mL, o que variava para cada método de marcação, e protegidos da luz. A suspensão de leucócitos era então marcada com substância fluorescente para posterior rastreamento e distinção dos leucócitos humanos intrínsecos ao endométrio implantado. Inicialmente era usado o *PKH26 Red Fluorescent Cell Linker* (PKH26, *Sigma*), sendo depois substituído pelo marcador *Carboxy Fluorescein Succinimidyl Ester* (CFSE, *Invitrogen/Molecular Probes, Eugene, OR, EUA*), seguindo o protocolo indicado pelos respectivos fabricantes.

3.2.2.2 Injeção de leucócitos prévia à injeção de tecido endometrial

Para a injeção das células previamente preparadas, o *pool* de leucócitos era, finalmente, ressuspendido em PBS, na proporção de $2,5 \times 10^7$ células viáveis / mL, mantido ao abrigo da luz e resfriado, e acondicionado em seringas de 1mL com agulha 21G, em um volume total de 100 μ L para cada animal tratado, ou seja, $2,5 \times 10^6$ células viáveis / 100 μ L / animal. A injeção era feita i.p., na região mediana infra-umbilical do abdome, 24 horas antes da injeção de endométrio.

3.2.2.3 Marcação fluorescente dos leucócitos e análises específicas

Na primeira série de quatro experimentos, os leucócitos humanos, autólogos ao endométrio, injetados nos animais (n=27), foram marcados previamente com PKH26, e, nos quatro últimos (n=12), foi utilizado como marcador fluorescente para os leucócitos, o CFSE. O tempo entre a injeção do endométrio e a necropsia dos animais foi de 10-12 dias para a primeira série, e de cinco dias para a segunda série experimental. Para cada experimento, pelo menos um animal era considerado controle, com injeção i.p. de 100 μ L do veículo PBS, em lugar dos leucócitos, seguindo normalmente com a injeção de endométrio.

Para a série experimental onde foi utilizado PKH26, as amostras biológicas – baço, linfonodos mesentéricos e sangue periférico – foram obtidas no momento da necropsia, e destinadas à detecção dos leucócitos humanos por citometria de fluxo. Para a série onde se utilizou o CFSE, foram coletadas as lesões endometrióticas encontradas, que foram imediatamente fixadas e preparadas para estudo histológico em coloração de hematoxilina e eosina (HE); estudo imunohistoquímico com análise quantitativa da densidade microvascular (MVD, *microvascular density*), utilizando o anticorpo anti-vWB (anti-fator de vonWillebrand) como marcador de neovascularização. Algumas lesões eram preparadas para microscopia confocal/fluorescente, utilizando fixação em acetona, montados com *ProLong AntiFade Gold* e *DAPI* como marcador de viabilidade celular (ambos *Invitrogen*), e visualizados em microscópio invertido para imunofluorescência (*AxioVert 200m*; *Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Alemanha*), sendo então, imediatamente

congeladas com OCT, acondicionadas em cassetes de plástico identificados, que eram armazenados em freezer a -80°C , até posterior processamento específico. Para a identificação dos leucócitos humanos em tecidos murinos, uma série experimental extra foi realizada, utilizando 16 machos RAG (Figura 6.3), os quais foram submetidos apenas à injeção i.p. de leucócitos humanos, de quatro doadoras diferentes, marcados com PKh26. Esses animais foram necropsiados em diferentes tempos após a injeção (4h; 72h; 5 dias; 10 dias; e 20 dias), quando foram coletados baço, linfonodos mesentéricos e sangue periférico. Os leucócitos humanos foram detectados nessas amostras, por citometria de fluxo (*BD FacsAria, Franklin Lakes, NJ, EUA*). Ver esquema em Figura 6.4.

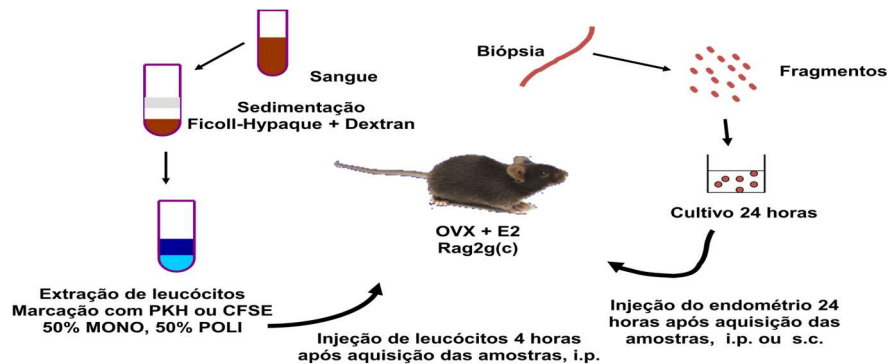


Figura 3.2 - Modelo de endometriose experimental heteróloga, com injeção prévia, i.p., de leucócitos humanos circulantes isolados, seguindo com xenotransplante de endométrio humano autólogo aos leucócitos, por injeção de endométrio pré-cultivado por vias i.p. ou s.c., em camundongos duplamente imunodeficientes – RAG

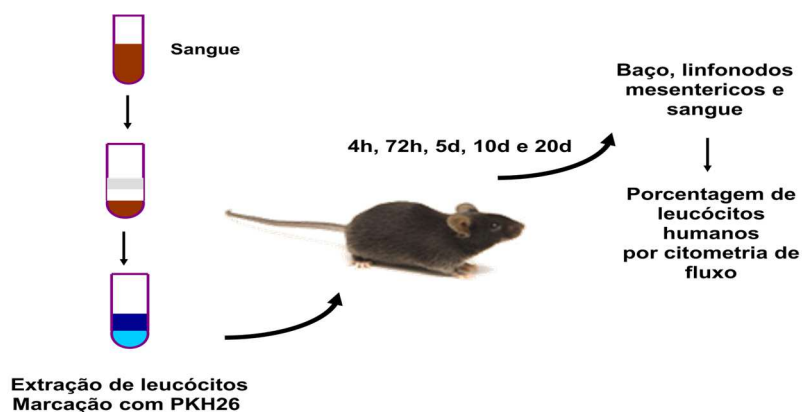


Figura 3.3 – Série experimental extra utilizando camundongos RAG machos, que foram submetidos à injeção i.p. de leucócitos humanos circulantes isolados para imunodeteção dessas células no sangue periférico e em órgãos linfóides

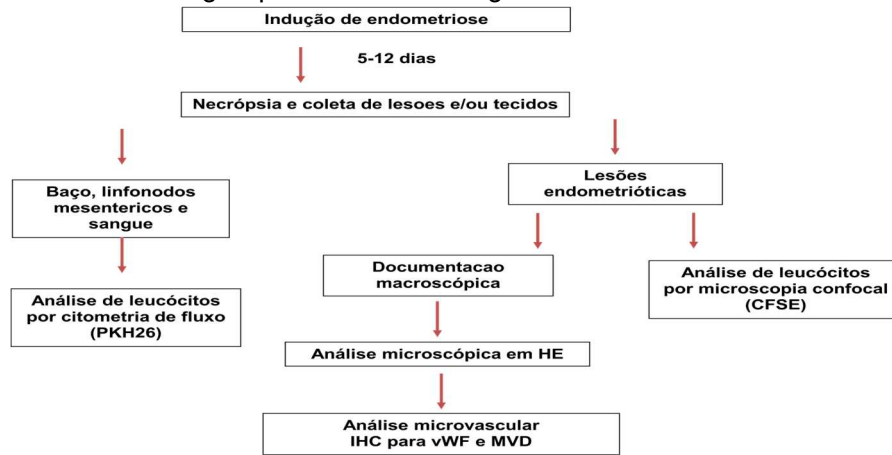


Figura 3.4 – Esquema mostrando destino das amostras biológicas coletadas, em modelo de endometriose experimental heteróloga, com injeção prévia, i.p., de leucócitos humanos circulantes isolados, seguindo com xenotransplante de endométrio humano autólogo aos leucócitos, em camundongos duplamente imunodeficientes – RAG

3.2.3 *Endometriose experimental com xenotransplante de endométrio humano, em camundongos nude, imediatamente após ou em diferentes tempos do pós-operatório da ooforectomia; e efeito do pré e pós-tratamento com pioglitazona*

Considerando que a IL-1 α exerce o papel de estimular a produção de MMP e VEGF no reparo tecidual, foi proposto que uma injúria peritoneal aguda, associada com o pós-operatório da ooforectomia, poderia influenciar o estabelecimento da endometriose experimental, o que estaria também de acordo com a teoria iatrogênica.

Neste estudo, de acordo com a Figura 6.5, foi estudada a influência do estado inflamatório abdominal pós-ooforectomia, na formação das lesões, bem como no grau e no local de adesão das mesmas e sua vascularização. Fêmeas RAG foram submetidas ao xenotransplante de endométrio humano, como na descrição geral, após tempos diferentes do pós-operatório da ooforectomia: 0h; 4h; 16h; 24h; 36h e 5 dias. O tempo entre a injeção do endométrio e a necropsia dos animais foi de cinco dias. Animais *sham-operated* (com cirurgia fictícia) foram utilizados como controle, para cada período do pós-operatório.

As lesões encontradas eram caracterizadas e documentadas, preparadas para a análise histológica, e algumas eram analisadas quanto à densidade microvascular por detecção imunohistoquímica do vWF.

Como nas séries já descritas, as lesões encontradas eram caracterizadas e documentadas, e preparadas para a análise histológica.



Figura 3.5 – Modelo com indução de endometriose experimental heteróloga, com xenotransplante de endométrio humano pré-cultivado por via i.p., em camundongos duplamente imunodeficientes – RAG – em diferentes tempos do pós-operatório recente de ooforectomia bilateral



Figura 3.6 - Indução de endometriose experimental heteróloga, com xenotransplante de endométrio humano pré-cultivado por via i.p., em camundongos duplamente imunodeficientes – RAG – em pós-operatório imediato de ooforectomia, associada a pré (in vitro) e pós-tratamentos (via oral à partir da indução) com pioglitazona

Em um segundo momento desse estudo, foi testado o efeito de uma droga originalmente utilizada como hipoglicemiante, mas com efeitos anti-inflamatórios e anti-angiogênicos, a pioglitazona REF, no desenvolvimento e grau de adesão de lesões endometrióticas, no modelo experimental com xenotransplante de endométrio humano em fêmeas RAG.

A indução de endometriose foi feita 16 horas após a ooforectomia, portanto, em pós-operatório imediato. Além dos suplementos comuns utilizados no meio de cultura para o preparo do endométrio pré-injeção, foi adicionada uma dose de 700ng/mL de pioglitazona no cultivo. Ademais, o grupo de animais experimentais recebeu dose diária intragástrica (por gavagem) de pioglitazona, de 1µg/kg, a partir de 2 dias antes da injeção do endométrio até o dia da necropsia, que foi realizada 5 dias após a injeção. Os animais controle receberam endométrio cultivado na ausência de pioglitazona e não foram submetidos à terapia com a droga. Ver Figura 6.6.

3.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Cada animal foi avaliado em relação a parâmetros documentados das lesões, associando quantidade e volume das mesmas. As comparações entre as médias foram realizadas utilizando a análise de variância – ANOVA – seguida de comparações das médias individuais com a correção de Bonferroni. Na ausência de normalidade na distribuição dos dados, era feita transformação logarítmica teste não-paramétrico (Kruskal-Wallis), considerando $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1 IMPACTO DOS LEUCÓCITOS; DETECÇÃO IMUNOFLUORESCENTE DOS LEUCÓCITOS HUMANOS EM TECIDOS MURINOS E NAS LESÕES SEMELHANTES À ENDOMETRIOSE

Com o objetivo de testar o efeito dos leucócitos humanos, células mediadoras da resposta imuno-inflamatória, no estabelecimento e no desenvolvimento inicial da endometriose experimental com xenotransplante, fêmeas RAG previamente ooforectomizadas e estrogenizadas, foram submetidas à injeção i.p. ou s.c. de endométrio humano, na presença ou na ausência de leucócitos autólogos ao endométrio, previamente administrados ($2,5 \times 10^6$ células viáveis / $100 \mu\text{L}$ / animal, i.p., ou veículo), como descrito na metodologia.

Na primeira série experimental, os animais foram necropsiados 10 a 12 dias após a injeção do endométrio. Como mostra a Tabela 7.1, para a frequência de lesões endometrióticas com indução i.p., 100% dos animais que não receberam leucócitos previamente à injeção de endométrio apresentaram sítios intraperitoneais da doença experimental (lesões semelhantes à endometriose); enquanto que nos animais tratados com leucócitos, esta frequência foi significativamente menor: 44% ($p = 0,016$). Para os animais que receberam leucócitos e apresentaram focos endometrióticos (56%), estes exibiram lesões com dimensões estatisticamente menores e em menor número – número de lesões por animal $0,5 \pm 0,1$ unidades; média de volume por lesão de $0,7 \pm 0,3 \text{ mm}^3$; e volume total de todas as lesões por animal de $0,3 \pm 0,3 \text{ mm}^3$ vs $1,3 \pm 0,2$ unidades; $2,2 \pm 0,3 \text{ mm}^3$; e $3,1 \pm 0,4 \text{ mm}^3$ no grupo controle, respectivamente (Tabela 7.2). O mesmo não foi observado nos animais com indução de endometriose por via s.c., não havendo diferença significativa do desenvolvimento de lesões no grupo que recebeu leucócitos, em relação ao grupo controle (Tabela 7.1).

4.1.1 Análise das lesões quanto à vascularização

Além de apresentarem menores frequência, número e volume das lesões semelhantes à endometriose, os animais que receberam leucócitos + endométrio humanos exibiram lesões com vascularização pobre, ao contrário das lesões do grupo controle, observação já visível macroscopicamente (Figura 7.1 A –D). Os dados de

imunolocalização do vWF humano nas lesões mostraram diminuição incontestável da densidade microvascular (MVD), em relação às lesões do grupo controle, que recebeu apenas endométrio (Figura 7.1 E e F).

Tabela 4.1: Endometriose experimental em camundongos com injeção subcutânea (s.c.) ou intraperitoneal (i.p.) de endométrio humano, na presença (+) ou ausência (-) de leucócitos. Um grupo de animais recebeu injeção de leucócitos humanos autólogos ao endométrio, 24 horas antes da injeção de endométrio

Parâmetro / Tratamento	Via de injeção do endométrio			
	s.c.	i.p.	s.c.	i.p.
Presença de leucócitos	Não	Não	Sim	Sim
Presença de lesão por grupo de animais	10/10 (100%)	9/9 (100%)	14/14 (100%)	8/18 (44%)
Média do número de lesões por animal	1,7 ± 0,3	1,3 ± 0,2	1,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1
Média do volume individual das lesões (mm ³)	2,4 ± 0,5	2,2 ± 0,3	2,0 ± 0,5	0,7 ± 0,3
Média do volume total das lesões por animal (mm ³)	4,1 ± 0,6	3,1 ± 0,4*	2,7 ± 0,6	0,3 ± 0,3**

Nota: Os animais foram necropsiados 10 a 12 dias após receberem a injeção s.c. ou i.p. de endométrio humano. dados expressos em média ± EPM, nível de significância $p < 0,05$. * $p=0,2$; ** $p=0,0002$, entre os grupos de camundongos que receberam endométrio s.c. versus i.p., na ausência ou na presença de leucócitos, respectivamente.

Tabela 4.2: Endometriose experimental em camundongos RAG com injeção intraperitoneal de endométrio humano, na presença (com) ou ausência (sem) de leucócitos humanos, autólogos ao endométrio

Tratamento / Parâmetro	SEM leucócitos	COM leucócitos	Valor p
<i>Presença de lesão por grupo de animais</i>	9/9 (100%)	8/18 (44%)	0,016
<i>Média do número de lesões por animal</i>	1,3 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,0003
<i>Média do volume individual das lesões (mm³)</i>	2,2 ± 0,3	0,7 ± 0,3	0,001
<i>Média do volume total das lesões por animal (mm³)</i>	3,1 ± 0,4	0,3 ± 0,3	0,0001

Nota: Os animais foram necropsiados 10 a 12 dias após receberem a injeção i.p. de endométrio humano; dados expressos em média ± EPM, nível de significância $p < 0,05$.

4.1.2 Detecção imunofluorescente dos leucócitos em tecidos murinos e nas lesões

Para a detecção dos leucócitos humanos em tecidos murinos ou nas lesões semelhantes à endometriose, dois métodos foram utilizados, com marcadores fluorescentes distintos: citometria de fluxo (marcador PKH26) e microscopia confocal (marcador CFSE).

Numa primeira série experimental, o PKH26 foi utilizado como marcador fluorescente para os leucócitos humanos, que foram identificados por citometria de fluxo. Foram obtidos baços, linfonodos mesentéricos e sangue periférico, além das lesões, quando encontradas à necrópsia. Contudo, os dados de citometria de fluxo para as lesões, entretanto, não foram conclusivos, visto que muitas vezes o número de células em um *pool* de lesões era não detectável, talvez pela quantidade mínima de leucócitos marcados com PKH26, concorrendo com a sensibilidade do método, em decorrência do menor volume das lesões encontradas e a presença de fibrose nas mesmas. Curiosamente, a maioria das lesões dos animais tratados com leucócitos exibia uma tonalidade azulada (Figura 7.1 A). Como esse achado não foi observado nas lesões dos animais controle, atribuímos a cor azulada à presença do marcador fluorescente, o PKH26, que é azul à luz visível e, portanto, evidenciando a adesão e o acúmulo dos leucócitos nas lesões.

Uma série extra foi, então, confeccionada, com injeção de leucócitos humanos, apenas, em camundongos RAG machos, e a análise citométrica dos leucócitos marcados com PK26 foi realizada em diferentes tempos pós-injeção (4h, 72h, 5d, 10d ou 20d). Os leucócitos humanos foram localizados nesses tecidos, após vários tempos pós-indução da endometriose experimental, sendo com maior intensidade nas amostras de baço, seguidas dos linfonodos e do sangue. Em todos os tecidos estudados, houve um declínio no número de leucócitos humanos detectados na medida em que o tempo entre a injeção do endométrio e a necropsia era maior, sendo ainda detectáveis no tempo de 20 dias. A Tabela 7.3 mostra a distribuição dos leucócitos humanos nos diferentes tecidos murinos (em porcentagem de células totais do tecido), em diferentes tempos pós-injeção dos leucócitos, identificados por citometria de fluxo. Os leucócitos foram detectados no sangue periférico, bem como em linfóides como o baço e linfonodos mesentéricos, evidenciando a migração dos leucócitos injetados, por via hematogênica e possível ação, à distância, em órgãos linfóides.

Uma segunda série experimental foi confeccionada, com o uso do CFSE como marcador fluorescente, a fim de confirmar a presença dos leucócitos marcados com fluorescência nas lesões, por microscopia confocal. De fato, 5 dias após a injeção do endométrio (portanto, 6 dias após a injeção dos leucócitos) as células haviam migrado para as lesões endometrióticas ectópicas, como mostra a Figura 7.2, com a presença de células com fluorescência verde (CFSE) em meio à lesão, representativa da série.

Tabela 4.3: Identificação de leucócitos humanos marcados com PKH26 no sangue periférico e tecidos hematopoiéticos (baço e linfonodos mesentéricos) obtidos de camundongos RAG machos, por citometria de fluxo

	4 horas	72 horas	5 dias	10 dias	20 dias
Sangue	1,5 ± 0,3	1,1 ± 0,5	0,6 ± 0,6	0,3 ± 0,2	0,1 ± 0,2
Baço	5,2 ± 1,5	4,7 ± 0,5	2,7 ± 0,2	1,9 ± 0,2	1,2 ± 1,0
Linfonodos	4,8 ± 0,3	4,5 ± 0,3	2,2 ± 0,2	1,1 ± 0,2	0,8 ± 0,1

Nota: Os animais foram necropsiados em vários tempos após a injeção de leucócitos humanos. Os valores representam a média das porcentagens (\pm EPM) de leucócitos humanos detectados por citometria de fluxo, em quatro experimentos distintos.

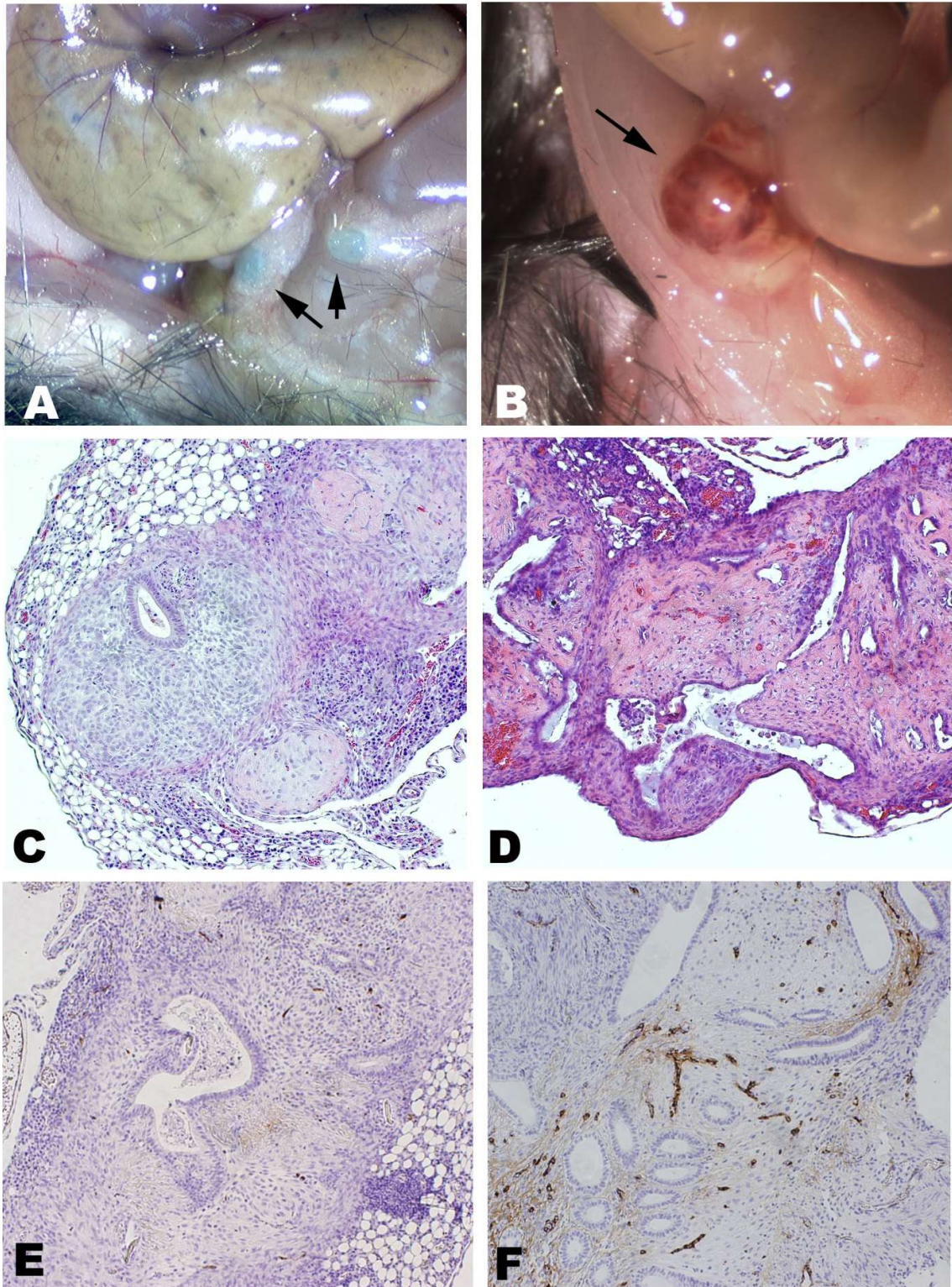


Figura 4.1: Análises macro (A-B) e microscópica (C-F) de lesões semelhantes à endometriose induzidas em camundongos RAG. Endométrio humano em fase proliferativa foi injetado na cavidade peritoneal dos animais na presença (A, C, E) ou ausência (B, D, F) de leucócitos humanos autólogos ao endométrio. Os cortes em C e D foram corados com HE. E e F representam os estudos imunohistoquímicos com anticorpo anti-vWF humano. A-B 15x; C-F 100x.

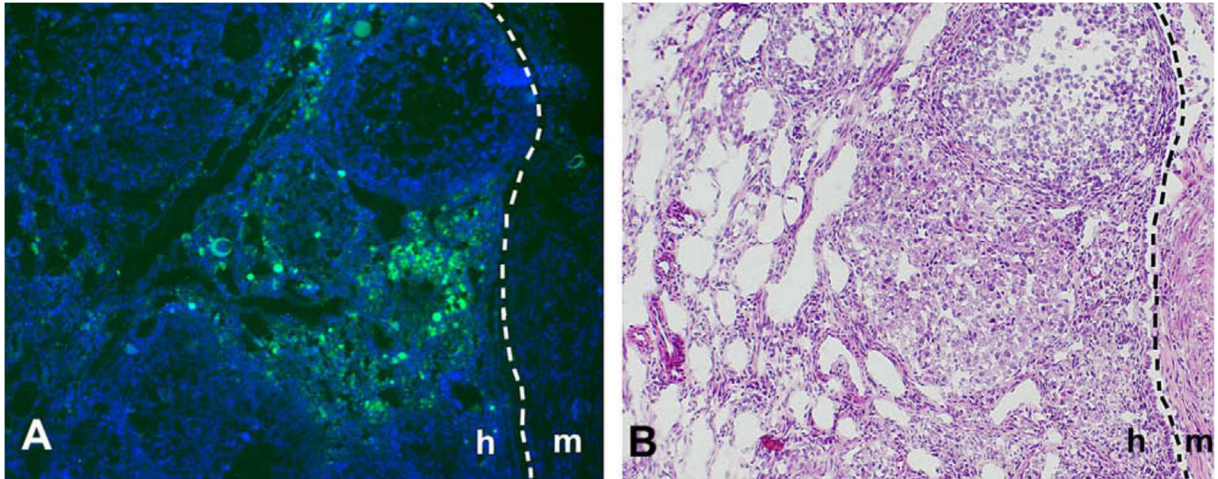


Figura 4.2: Imunolocalização de leucócitos humanos em lesões endometrióticas experimentais congeladas. A – Imagem imunofluorescente dos leucócitos humanos marcados com CFSE (em verde) no tecido endometrial humano crescendo em meio a tecido murino (os tecidos humano e murino – não marcados com CFSE - foram contra-corados com DAPI, em azul). B – Coloração em HE de “corte-irmão” do corte apresentado em A. As linhas pontilhadas, em A e em B, marca a interface entre tecido humano (h) e tecido murino (m). 200x.

4.2. LESÕES, ADESÕES E ADERÊNCIAS INDUZIDAS EM MICROAMBIENTE INFLAMATÓRIO (PÓS-OOFORECTOMIA)

Nos animais que receberam o endométrio humano até 16 horas após a ooforectomia, as lesões tiveram localização predominante no sítio de injúria peritoneal. Em contraste, os camundongos que receberam o endométrio 5 dias após a cirurgia apresentaram lesões menores, e essas não tiveram necessariamente localização no sítio da injúria (Figura 7.3; Tabela 7.4). Além disso, nos grupos com indução das lesões no pós-operatório imediato (até 16 horas) houve aumento relevante da neovascularização peritoneal (Figuras 7.5 e 7.6; Tabela 7.5), além da ocorrência de múltiplas adesões, resultando em aderência do corno uterino ao mesentério ou a outros pontos do peritônio (Figura 7.4).

Em suma, a injúria peritoneal pós-operatória pode aumentar significativamente a invasão precoce e a vascularização do endométrio injetado, em modelo experimental de endometriose quimérico.

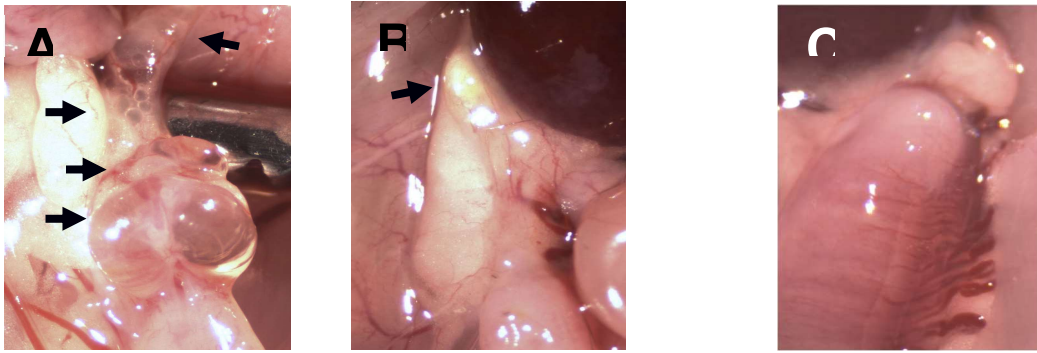


Figura 4.3 - Lesões representativas, semelhantes à endometriose induzidas em microambiente inflamatório, em diferentes tempos pós-ooforectomia, 4 horas (A) e 5 dias (B), com formação de adesões no sítio operatório (extremidade do corno uterino esquerdo). C: corno uterino esquerdo intacto. 15x

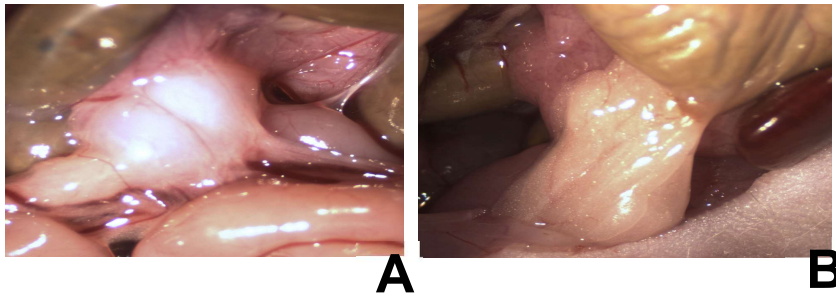


Figura 4.4 – Adesões significativas na cavidade abdominal de camundongos RAG com indução de endometriose em pós-operatório recente; A: cólon aderido ao intestino delgado; B: Omento aderido ao cólon. 15x

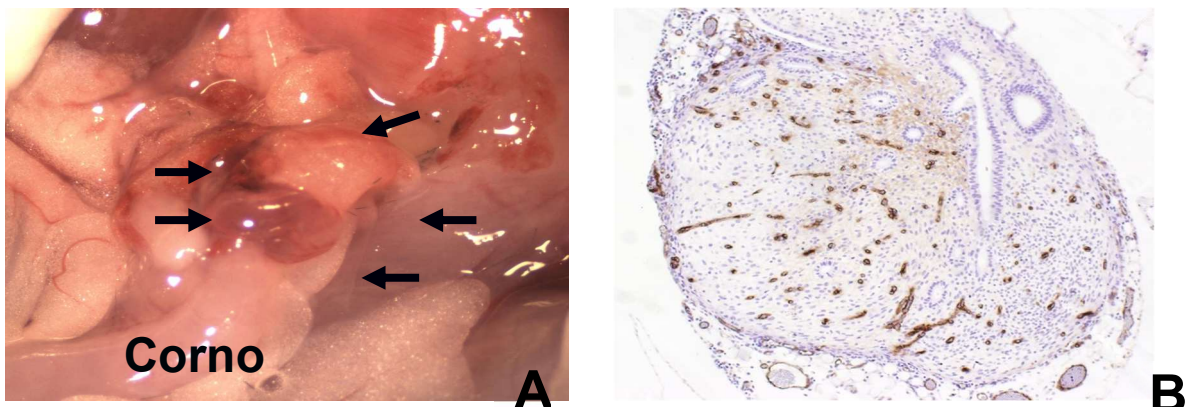


Figura 4.5 – Evidências de neoangiogênese em lesões semelhantes à endometriose induzidas em microambiente inflamatório agudo, 4 horas pós-ooforectomia (extremidade do corno uterino esquerdo). A: análise macroscópica, 15x; B: análise imunohistoquímica da microvascularização; anticorpo anti-vWF humano (anti-fator de vonWillebrand) como marcador de neoangiogênese. 100x

Tabela 4.4 Impacto do tempo pós-ooftectomia na formação de lesões e adesões e sua sua localização, na endometriose experimental heteróloga

Tempo pós-operatório	Presença de lesão por grupo de animais (%)	Frequência de lesões no sítio de injúria peritoneal (%)	Frequência de adesões (%)	Média do volume individual das lesões (mm³)
<i>Zero horas</i>	100	75	100	2,5
<i>4-6 horas</i>	100	100	100	2,8
<i>16 horas</i>	100	93	100	5,4
<i>24-36 horas</i>	100	40	44	2,0
<i>5 dias</i>	90	10	10	1,5
<i>Cirurgia fictícia</i>	100	0	0	1,4

Tabela 4.5 Quantificação da vascularização nas lesões nos diferentes tempos do pós-operatório, através de densidade microvascular (MVD)

Tempo pós-operatório	MVD média (vasos/mm²)
<i>4-6 horas</i>	73,8
<i>16-24 horas</i>	50,2
<i>5 dias</i>	14,8

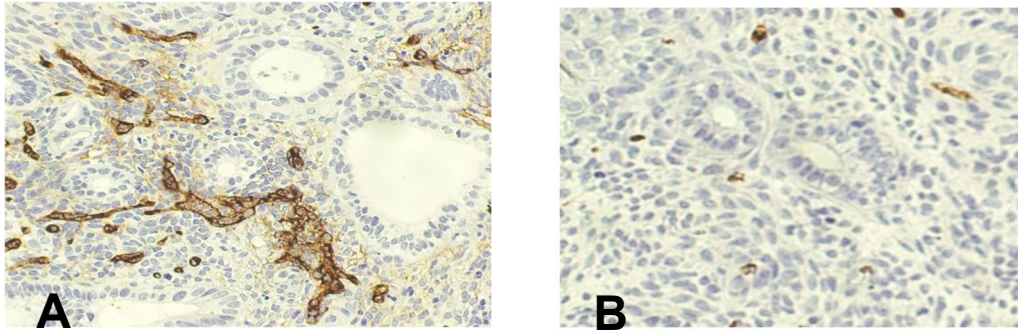


Figura 4.6 – Intensidade da microvascularização em lesões semelhantes à endometriose induzidas em microambiente inflamatório agudo, em diferentes tempos pós-operatórios: 4 horas (A) e 5 dias (B); análise imunohistoquímica da microvascularização; anticorpo anti-vWF humano (anti-fator de vonWillebrand) como marcador de neoangiogênese. 100x

4.3. EFEITO DA PIOGLITAZONA NA FORMAÇÃO DAS LESÕES E ADESÕES INDUZIDAS NO PÓS-OPERATÓRIO IMEDIATO

As lesões oriundas dos animais sem intervenção terapêutica com a pioglitazona foram encontradas predominantemente no sítio de injúria pós-cirúrgica, reproduzindo os resultados do estudo anterior, enquanto que as adesões tiveram diversas localizações.

Em contraste, 50% dos animais que receberam pioglitazona não apresentaram lesões. Também com o pré e o pós-tratamento, a pioglitazona diminuiu a frequência de adesões, sendo 75% dos animais livres de adesões; naqueles que apresentaram adesões, essas foram menores em extensão (Figura 7.7).

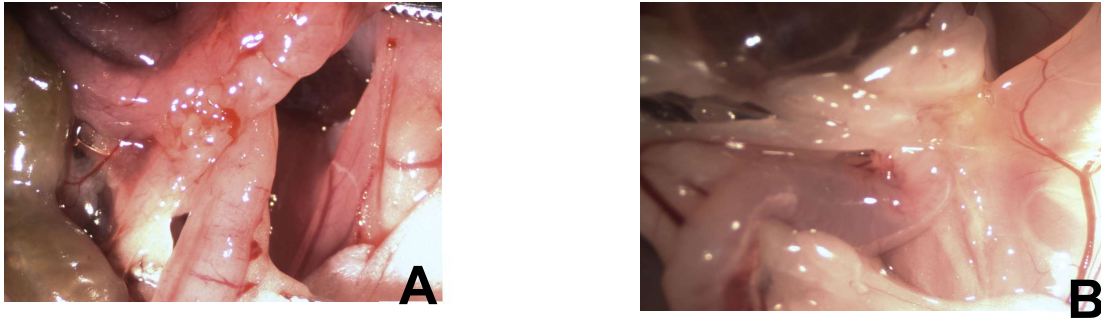


Figura 4.7 – Lesões semelhantes à endometriose induzidas em microambiente inflamatório, com formação de adesões no sítio operatório (extremidade do corno uterino esquerdo). A: imagem representativa das lesões e adesões obtidas no grupo controle (sem pioglitazona); B: lesão representativa da indução de endometriose em animais que receberam pré (in vitro, na cultura endometrial) e pós (via oral, após injeção do endométrio) tratamentos com pioglitazona; apesar desta lesão estar no sítio de injúria tecidual, houve uma atenuação significativa do grau de adesão. 15x

5. Discussão

A fisiopatologia da endometriose é algo realmente complexo, necessitando maiores elucidações, principalmente no que diz respeito aos mecanismos imuno-inflamatórios. Vários defeitos da imunidade já foram correlacionados com a endometriose, mas na verdade ainda não podemos afirmar se tais defeitos são a causa da doença ou o resultado de processos inflamatórios nos sítios ectópicos de endométrio.

Este estudo permitiu o desenvolvimento de modelos experimentais heterólogos e abordagens específicas com manipulação de leucócitos circulantes – importantes efetores da resposta imuno-inflamatória tecidual – confecção do modelo em pós-operatório recente, bem como a utilização de droga anti-inflamatória e anti-angiogênica, estabelecendo novas ferramentas ou estratégias para o estudo da fisiopatologia imuno-inflamatória da endometriose. Portanto, a utilização desses modelos e abordagens em estudos posteriores certamente poderá colaborar para o melhor entendimento da doença e para o desenvolvimento de novas estratégias diagnósticas, profiláticas e/ou terapêuticas, no intuito de se obter melhora da qualidade de vida das pacientes susceptíveis à endometriose, inclusive a manutenção da fertilidade.

Antes de obtermos os resultados desse estudo, o trabalho foi bastante árduo, no sentido de aprendizagem, padronização e aprimoramento do modelo experimental heterólogo de endometriose, com xenotransplante de endométrio humano em camundongos imunocomprometidos previamente tratados com leucócitos humanos autólogos ao endométrio injetado. Uma vez observada a diminuição da freqüência das lesões, além de menor número, volume e vascularização das mesmas, nos animais reconstituídos com leucócitos previamente à indução de endometriose, a nossa grande questão era: como isso poderia acontecer; qual(is) seria(m) os efeitos dos leucócitos, diretos ou indiretos, que influenciariam o estabelecimento, desenvolvimento e crescimento do tecido endometrial ectópico? Para tentar responder a essas questões, nos deparamos com o nosso maior desafio técnico-científico - a detecção dos leucócitos nos vários tecidos murinos, bem como nas lesões - passando pela padronização de vários

parâmetros metodológicos como o tempo entre a ooforectomia e a indução de endometriose, a via de injeção do endométrio (i.p. x s.c.), o número e o(s) tipo(s) de leucócitos a serem injetados, a via de injeção dos leucócitos (inicialmente, foi proposta a via endovenosa, porém foi tecnicamente inviável praticá-la), o tempo entre a injeção do endométrio e a necropsia dos animais, o marcador fluorescente ideal para citometria de fluxo e microscopia confocal (diferindo-os não só de células murinas, mas também dos leucócitos humanos já presentes no tecido endometrial), a possibilidade de migração dos leucócitos injetados e alcance dos mesmos à corrente sanguínea e aos órgãos linfóides murinos ou às lesões endometrióticas, quando presentes, bem como a determinação dos tecidos alvo prováveis de estabelecimento dos leucócitos migrados e o isolamento dos leucócitos marcados nesses tecidos e nas lesões semelhantes à endometriose. A imunodeteção específica de fatores murinos e humanos, independente do uso de leucócitos, por si só já é um desafio, visto que a maioria dos anticorpos comercializados para os ensaios de imunodeteção anti-estruturas humanas é produzida em camundongos, o que pode gerar reações inespecíficas e algum grau de confusão.

A metodologia de introdução de leucócitos ou células relacionadas em animais com imunocomprometimento grave não é novidade, e vem sendo útil para pesquisas sobre o papel dessas células em certas neoplasias e na doença “enxerto-versus-hospedeiro” (BERNEY et al, 2001; VAN RIJN et al, 2003). Porém, até o momento, essa técnica não havia sido utilizada na investigação do efeito de leucócitos no desenvolvimento e na progressão da endometriose experimental. Na maioria dos estudos de reconstituição leucocitária em animais imunodeficientes, esses são submetidos à irradiação, previamente à introdução dos leucócitos, com o intuito de anular qualquer resquício de função imunitária. A indisponibilidade de equipamentos de irradiação no presente estudo pode ter contribuído para as dificuldades técnicas encontradas.

Considerando as limitações encontradas no desenvolvimento do modelo do com injeção intraperitoneal de leucócitos humanos prévia à indução da endometriose com xenotransplante, um modelo alternativo foi idealizado (dados preliminares; não publicados). Como os camundongos NUDE não aceitam a inoculação dos leucócitos humanos e, por outro lado, o estudo com reconstituição leucocitária é muito mais complexo do que parece ser, principalmente em relação à

detecção dos leucócitos humanos em fluidos e tecidos murinos, além de altíssimo custo, foi proposto um estudo com indução de endometriose em camundongos NUDE, com xenotransplante de endométrio humano previamente co-cultivado com leucócitos autólogos ao endométrio. Os leucócitos humanos foram isolados como descrito para o estudo original; diferentes quantidades (5 a 10 milhões de células viáveis) e combinações de tipos de leucócitos – mononucleares (monócitos e linfócitos, MONO) e/ou polimorfonucleares (basicamente neutrófilos, POLI) foram utilizadas em co-cultura com endométrio autólogo, nas mesmas condições já descritas. Após cerca de 12-20 horas de co-cultivo, o endométrio era lavado da mesma forma e injetado, por via i.p., nos animais experimentais. Os animais controle receberam endométrio humano pré-cultivado na ausência de leucócitos. Os resultados deste estudo específico são de experimentos piloto não sendo suficientes para uma análise estatística adequada. Basicamente, houve uma tendência de diminuição da frequência e do volume das lesões, quanto maior a quantidade de leucócitos (MONO + POLI) co-cultivados com o endométrio; Linhagens diferentes de leucócitos – MONO e POLI – parecem exercer efeito distinto no desenvolvimento das lesões semelhantes à endometriose: as células MONO parecem diminuir a frequência das lesões, enquanto as POLI parecem diminuir o volume e aumentar a quantidade de lesões por animal. Por uma análise microscópica grosseira, podemos suspeitar de uma diferença na proporção ácinos/estroma de acordo com a linhagem de leucócitos utilizados – a maioria das lesões com MONO parecem conter mais estroma, enquanto que as com POLI parecem conter maior número de ácinos glandulares. Todavia, um aprimoramento desse modelo e um maior número de animais e células testadas são necessários para o esboço de alguma conclusão consistente.

O fato de todas as mulheres em menacme serem passíveis de desenvolver endometriose via menstruação retrógrada, e apenas uma minoria apresentar a doença franca, ainda é uma incógnita. O presente estudo (BRUNER-TRAN & CARVALHO-MACEDO et al, 2009) e estudos prévios (BRUNER et al, 1997), evidenciam a possibilidade de indução de endometriose em camundongos imunodeficientes através da injeção intraperitoneal de endométrio humano eutópico, sugerindo que o endométrio eutópico é intrinsecamente capaz de crescer em sítio ectópico. Acredita-se que nas mulheres livres de endometriose, a doença seria

prevenida, pelo menos em parte, através da ação imunitária celular local, patente na maioria das mulheres, sobre os fragmentos de endométrio refluídos para a cavidade abdominal (DMOWSKI & BRAUN, 2004). Com os nossos resultados, essa hipótese toma mais força, na medida em que a presença de leucócitos autólogos ao endométrio, oriundos de mulheres saudáveis, inibiram, pelo menos parcialmente, o desenvolvimento de focos endometrióticos ectópicos, indicando um possível papel preventivo, e quem sabe terapêutico, dessas células, para o estabelecimento da endometriose.

Ademais, nossos estudos demonstraram uma diminuição significativa da densidade microvascular (MVD) em lesões semelhantes à endometriose, cujos animais foram previamente tratados com leucócitos circulantes, em comparação aos animais não tratados. Vários estudos mostram um incremento da MVD em ambos endométrios, eutópico e ectópico, de mulheres com endometriose (KIM et al, 2001; LIU et al, 2003). O potencial angiogênico é de fato crítico para a sobrevivência de tecidos ectópicos, tanto que a MVD é um componente importante das neoplasias e a anti-angiogênese tem se mostrado alvo terapêutico eficiente em vários tipos de tumores (MCCARTHY et al, 2002; HANSEN et al, 2004).

A injúria peritoneal pode incrementar a fase inicial de invasão e a vascularização dos implantes de endométrio humano, além de favorecer a formação de conseqüências agravantes como as adesões, no modelo experimental quimérico de endometriose. Esses achados estão de acordo com a teoria iatrogênica – desenvolvimento de endometriose em mulheres em pós-operatório de procedimentos cirúrgicos vários da pelve – e o mais importante, evidencia a modulação de células e substâncias típicas da reação inflamatória aguda na implantação e manutenção dos focos ectópicos de endometriose.

No presente estudo, a pioglitazona apresentou um potente efeito inibitório no desenvolvimento da endometriose experimental em camundongos RAG. O tratamento da endometriose com drogas anti-inflamatórias e/ou anti-angiogênicas, como é o caso da pioglitazona (MARTENS et al, 2002; DUAN, 2008; ALJADA et al, 2008; e VIJAY et al, 2009) já vem sendo proposto. Desse modo, maiores estudos serão necessários para determinar a eficácia da pioglitazona como droga terapêutica ou adjuvante da terapia convencional da endometriose em mulheres. A pioglitazona

pertence à família das tiazolidinedionas, drogas originalmente hipoglicemiantes. Outros efeitos relatados na literatura são: melhoram a função endotelial (efeitos anti-aterogênicos), atenuam condições inflamatórias, diminuem níveis plasmáticos de ácidos graxos livres e a pressão arterial. (Para revisão, ver MARTENS et al, 2002 e DUAN, 2008). São também anti-angiogênicas; estudo de ALJADA et al (2008) evidencia inibição da angiogênese mediada por bFGF (fator de crescimento fibroblástico básico) e por VEGF em modelo de membrana coroalantóica., As tiazolidinedionas são também capazes de ativar o receptor PPAR- γ (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*), que é um fator de transcrição ativado por ligação e regula a expressão de genes de proteínas-chave, envolvidas no metabolismo de lipídeos, inflamação vascular e na proliferação celular (VIJAY et al, 2009).

Tomando junto os resultados dos estudos de endometriose experimental heteróloga com injeção prévia de leucócitos e os estudos de desenvolvimento do modelo com indução prévia de inflamação peritoneal aguda focal, na presença ou na ausência de droga sabidamente anti-inflamatória e anti-angiogênica, pode-se aventar a hipótese de que, dependendo do cenário de células e substâncias inflamatórias, já residentes ou atraídas para a cavidade abdominal, encontrado pelo endométrio eutópico refluído, ora o ambiente peritoneal resultante é propício para o desenvolvimento de lesões endometrióticas, ora ocorre o contrário, podendo ser a gravidade da doença também modulada por esse elenco. Além disso, pode-se ainda apontar para uma possível interação entre as células inflamatórias intrínsecas do tecido endometrial, mais abundantes nos períodos secretório tardio e menstrual, e o elenco do micro-ambiente peritoneal, facilitando ou não os mecanismos de implantação e crescimento de focos ectópicos de endométrio viável.

6. Conclusões

O presente estudo evidencia a possibilidade de indução de endometriose em fêmeas de camundongos duplamente imunodeficientes – RAG - através da injeção intraperitoneal de endométrio humano eutópico. As fêmeas RAG também aceitaram a injeção de leucócitos humanos, autólogos ao endométrio; a presença desses leucócitos, no modelo heterólogo, parece impedir a instalação e a sobrevivência do tecido endometrial ectópico.

Houve uma diminuição significativa da densidade microvascular (MVD) em lesões semelhantes à endometriose, cujos animais foram previamente tratados com leucócitos circulantes, em comparação aos animais não tratados. Os leucócitos xenoinplantados parecem ser capazes de migrar para as lesões endometrióticas induzidas e também para órgãos linfóides murinos intra e extra-peritoneais; há evidências de que esta migração ocorra por via hematogênica.

A presença de leucócitos autólogos ao endométrio, oriundos de mulheres saudáveis, na cavidade abdominal de camundongos imunodeficientes, inibiram, pelo menos em parte, o desenvolvimento de focos endometrióticos ectópicos, indicando um possível papel preventivo dessas células em conjunto (MONO + POLI), nas condições utilizadas, para o estabelecimento da endometriose.

A injúria peritoneal pós-ooforectomia pode incrementar significativamente a fase inicial de invasão e a vascularização dos implantes de endométrio humano no modelo utilizado, além de favorecer a formação de adesões, no modelo experimental quimérico de endometriose, o que evidencia a modulação de células e substâncias típicas da reação inflamatória aguda na implantação e manutenção dos focos ectópicos de endometriose.

A abordagem da endometriose experimental heteróloga, em microambiente peritoneal com injúria pós-ooforectomia, com droga sabidamente anti-inflamatória e anti-angiogênica - a pioglitazona – evidenciou um potente efeito inibitório no desenvolvimento das lesões semelhantes à endometriose, bem como na formação de adesões e aderências resultantes da inflamação aguda, em camundongos RAG. Esse achado reforça a idéia do uso dessa classe de drogas no tratamento da endometriose, pelo menos como adjuvante das terapias medicamentosa e cirúrgica convencionais.

Sumarizando, este estudo permitiu o desenvolvimento de modelos experimentais heterólogos e abordagens específicas como a adoção de leucócitos circulantes, importantes efetores da resposta imuno-inflamatória tecidual; a confecção do modelo experimental em situação de inflamação aguda da pós-ooforectomia recente, bem como a utilização de droga anti-inflamatória e anti-angiogênica, estabelecendo novas ferramentas ou estratégias para o estudo da fisiopatologia imuno-inflamatória da endometriose.

7. Referências bibliográficas

- Abrao MS, Neme RM, et al. Histological classification of endometriosis as a predictor of response to treatment. *Int J Gynaecol Obstet*, 2003; 82(1):31-40.
- Alborzi S, Momtahan M, Parsanezhad ME E Dehbashi S. A prospective, randomized study comparing laparoscopic ovarian cystectomy versus fenestration and coagulation in patients with endometriomas. *Fertil Steril* 2004; 82(6):1633-7.
- Akoum A, Jolicoeur C e Boucher A. Estradiol amplifies interleukin-1-induced monocyte chemotactic protein-1 expression by ectopic endometrial cells of women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000; 85:896-904.
- Akoum A, Lawson C, Herrmann-Lavoie C e Maheux R. Imbalance in the expression of the activating type I and the inhibitory type II interleukin 1 receptors in endometriosis. *Hum Reprod*. 2007;22(5):1464-73.
- Al-Zemi M, Bernal AL e Steele J. Ovarian response to repeated controlled stimulation in in vitro fertilization cycles in patients with ovarian endometriosis. *Hum Reprod* 2000; 15(1):72-5.
- Aljada A, O'Connor L, Fu YY e Mousa SA. PPAR γ ligands, rosiglitazone and pioglitazone, inhibit bFGF- and VEGF-mediated angiogenesis. *Angiogenesis*. 2008; 11:361-7.
- ASRM. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril* 1997; 67(5):817-21.
- ASRM, T. P. C. O. Endometriosis and infertility. *Fertil Steril*, 86, 5 Suppl, S156-60, Nov, 2006a.
- ASRM, T. P. C. O. Treatment of pelvic pain associated with endometriosis. *Fertil Steril*, 86, 5 Suppl, S18-27, Nov, 2006b.
- Attar E e Bulun SE. Aromatase inhibitors: the next generation of therapeutics for endometriosis? *Fertil Steril*, 2006; 85:1307-18.
- Attia GR, Zeitoun K, Edwards D, Johns A, Carr BR, Bulun SE. Progesterone receptor isoform A but not B is expressed in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000;85(8):2897-902.
- Awwad JT, Sayegh RA, Tao XJ, Hassan T, Awwad ST e Isaacson K. The SCID mouse : an experimental model for endometriosis. *Hum Reprod* 1999; 14(12):3107-11.
- Barnhart M, Kunsmoor-Su R, Coutifaris C. Effect of endometriosis on in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 2002; 77(6):1148-55.
- Berkley Kj, Dmitrieva N, Curtis KS, Papka RE. Innervation of ectopic endometrium in a rat model of endometriosis. *Proc Natl Sci USA*, 2004; 101:11094-8.
- Berkkanoglu M e Arici A. Immunology and endometriosis. *Am J Reprod Immunol*. 2003;50:48-59.

Berney T, Molano RD, Pileggi A, Cattani P, Li H, Ricordi C, et al. Patterns of engraftment in different strains of immunodeficient mice reconstituted with human peripheral blood lymphocytes. *Transplantation*. 2001; 72(1):133-40.

Brandenberger AW, Lebovic DI, Tee MK, et al. Oestrogen receptor (ER)-alpha and ER-beta isoforms in normal endometrial and endometriosis-derived stromal cells. *Mol Hum Reprod*, 1999; 5:651-5.

Braun DP, Gebel H, House R, Rana N, Dmowski NP. Spontaneous and induced synthesis of cytokines by peripheral blood monocytes in patients with endometriosis. *Fertil Steril* 1996; 65(6):1125-9.

Braun DP, Muriana A, Gebel H, Rotman C, Rana N e Dmowski, WP. Monocyte mediated enhancement of endometrial cell proliferation in women with endometriosis. *Fertil Steril*. 1994; 61:78-84.

Bricou A, Batt RE, Chapron C. Peritoneal fluid flow influences anatomical distribution of endometriotic lesions: Why Sampson seems to be right. *Eur J Obst Gynec Repr Biol*. 2008; 138:127-34.

Brosens IA & Brosens JJ. Endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2000a; 90(2): 159-64.

Brosens IA & Brosens JJ. Redefining endometriosis: is deep endometriosis a progressive disease? *Hum Reprod*, 2000b; 15(1):1-3.

Brosens I, Puttemans P, Campo R, Gordts S. Endometriosis: a uterine disease with extrauterine lesions? *Ver Gynaec Prac*. 2003; 3:115-19.

Bruner KL, Eisenberg E, Gorstein F, Osteen KG. Progesterone and transforming growth factor-beta coordinately regulate suppression of endometrial matrix metalloproteinases in a model of experimental endometriosis. *Steroids* 1999; 64(9):648-53.

Bruner KL, Matrisian LM, Rodgers WH, Gorstein F, Osteen KG. Suppression of matrix metalloproteinases inhibits establishment of ectopic lesions by human endometrium in nude mice. *J Clin Invest* 1997; 99(12):2851-7.

Bruner-Tran KL, Carvalho-Macedo AC, Duleba AJ, Crispens MA, Osteen KG. Experimental endometriosis in immunocompromised mice after adoptive transfer of human leukocytes. *Fertil Steril*. No prelo 2009.

Bruner-Tran KL, Lebovic DI, Hoek KL, Carvalho-Macedo AC e Osteen KG. Pioglitazone treatment reduces the development of inflammation-associated adhesions in a chimeric model of experimental endometriosis. In: *Proceedings of 56st Annual Meeting of the Society for Gynecologic Investigation (SGI); 2009 Mar 17-21; Glasgow, UK*.

Bruner-Tran KL, Eisenberg E, Yeaman GR, Anderson TA, McBean J, Osteen KG. Steroid and cytokine regulation of matrix metalloproteinase expression in endometriosis and the establishment of experimental endometriosis in nude mice. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(10):4782-91.

Bruner-Tran KL, Osteen KG e Duleba AJ. Simvastatin protects against the development of endometriosis in a nude mouse model. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94(7):2489-94.

- Bruner-Tran KL, Rier SE, Eisenberg E, Osteen KG. The potential role of environmental toxins in the pathophysiology of endometriosis. *Gynecol Obstet Invest* 1999; 48 Suppl 1:45-56.
- Bruner-Tran KL, Webster-Clair D, Osteen KG. Experimental endometriosis: the nude mouse as a xenographic host. *Ann N Y Acad Sci* 2002;955:328-39.
- Bruner-Tran KL, Zhang Z, Eisenberg E, Winneker RC, Osteen KG. Down-regulation of endometrial matrix metalloproteinase-3 and -7 expression in vitro and therapeutic regression of experimental endometriosis in vivo by a novel nonsteroidal progesterone receptor agonist, tanaproget. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(4):1554-60.
- Bulun SE. Mechanisms of disease: Endometriosis. *N Eng J Med* 2009; 360:268-79.
- Bulun SE, Cheng YH, Yin P, et al. Progesterone resistance in endometriosis: link to failure to metabolize estradiol. *Mol Cell Endocrinol*, 2006; 248:94-103.
- Bulun SE, Lin Z, Imir G, et al. Regulation of aromatase expression in estrogen-responsive breast and uterine disease: from bench to treatment. *Pharmacol Rev*, 2005; 57:359-83.
- Bulun SE, Tsunomiya H, Lina Z et al. Steroidogenic factor-1 and endometriosis. *Mol Cell Endocrinol*, 2009; 300:104-108.
- Bulun SE, Yang S, Fang S, Fang Z, et al. Role of aromatase in endometrial disease. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2001; 79:19-25.
- Burney RO, Talbi S, Hamilton AE, et al. Gene expression analysis of endometrium reveals progesterone resistance and candidate susceptibility genes in women with endometriosis. *Endocrinology*, 2007; 148:3814-26.
- Cao X, Shores EW, Hu-Li J, Anver MR, Kelsall BL, Russell SM, et al. Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor gamma chain. *Immunity* 1995; 2(3):223-38.
- Carlsson G, Gullberg B, Hafström L. Estimation of liver tumor volume using different formulas – an experimental study in rats. *J Cancer Res Clin Oncol* 1983; 105:20-3.
- CARNEIRO, M. M., MORSCH, D. M., et al. Expression of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in pelvic endometriosis. *Gynecol Endocrinol*, 23, 4, 188-92, Apr, 2007.
- Cassatella MA. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today* 1995; 16(1):21-6.
- Cheng YH, Imir A, Fenkci V, Yilmaz MB e Bulun SE. Stromal cells of endometriosis fail to produce paracrine factors that induce epithelial 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 gene and its transcriptional regulator Sp1: a mechanism for defective estradiol metabolism. *Am J Obstet Gynecol*, 2007; 196:391.
- Christodoulakos G, Augoulea A, Lambrinoudaki I, Sioulas V, Creatsas G. Pathogenesis of endometriosis: the role of defective “immunosurveillance”. *Eur J Contracept Reprod Health Care* 2007; 12(3):194-202.
- Chwalisz K, Perez MC, Demanno D, Winkel C, Schubert G e Elger W. Selective progesterone receptor modulator development and use in the treatment of leiomyomata and endometriosis. *Endocr Rev*, 2005; 26:423-38. [Erratum, *Endocr Rev*, 2005; 26:703.]

- D'Hooghe TM, Bambra CS, Suleman MA, Dunselman GAJ, Evers JLH e Koninckx PR. Development of a model of retrograde menstruation in baboons (*Papio anubis*). *Fertil Steril* 1994; 62:635-8.
- D'Hooghe TMD, Hill JA, Oosterlynck DJ, Koninckx PR e Bambra CS. Effect of endometriosis on white blood cell subpopulations in peripheral blood and peritoneal fluid of baboons. *Hum Reprod*. 1996;11(8):1736-40.
- Dabrosin C, Gyorffy S, Margetts P, Ross C e Gaudie J. Therapeutic effect of angiostatin gene transfer in a murine model of endometriosis. *Am J Pathol* 2002; 161(3):909-18.
- Darrow SL, Vena JE, Batt RE, Zielesny MA, Michalek AM e Selman S. Menstrual cycle characteristics and the risk of endometriosis. *Epidemiology* 1993; 4:135-42.
- Defrère S, Van Langendonck A, Ramos RG, Jouret M, Mettlen M e Donnez J. Quantification of endometriotic lesions in a murine model by fluorimetric and morphometric analysis. *Hum Reprod* 2006; 21(3):810-7.
- Dheenadayalu K, Mak I, et al. Aromatase P450 messenger RNA expression in eutopic endometrium is not a specific marker for pelvic endometriosis. *Fertil Steril*, 2002; 78(4):825-9.
- Dinulescu DM, Ince TA, Quade BJ, Shafer AS, Crowley D e Jacks T. Role of K-ras and Pten in the development of mouse models of endometriosis and endometrioid ovarian cancer. *Nat Med*, 2005; 11:63-70.
- Dmowski WP e Braun DP. Immunology of endometriosis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004; 18(2):245-63.
- Dmowski WP, King J, Shen J, Rana N, Fernandez BB e Braun DP. Apoptosis in endometrial glandular and stromal cells in women with and without endometriosis. *Hum Reprod*, 2001; 16:1802-8.
- Dmowski WP, Gebel HM e Rawlins RG. Immunologic aspects of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am*, 1989; 16:93-103.
- Dmowski WP, Steele RW e Baker GF. Deficient cellular immunity in endometriosis. *Am J Obstet Gynecol*. 1981; 141:377-83.
- Donnez J et al. Large ovarian Endometrioma. *Hum Reprod* 1996; 11:641-6.
- Duan SZ, Usher MG e Mortensen RM. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-mediated effects in the vasculature. *Circ Res*. 2008; 102:283-94.
- Dunk C, Smith S, Hazan A, Whittle W e Jones RL. Promotion of angiogenesis by human endometrial lymphocytes. *Immunol Investigat*. 2008;37:583-610.
- Eskenazi B e Warner ML. Epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin N Am* 1997; 24:235-58.
- Evers JL. Endometriosis does not exist; all women have endometriosis. *Hum Reprod* 1994; 9 (12):2206-9.
- Fainaru O, Adini A, Benny O, Adini I, Short S, Bazinet L et al. Dendritic cells support angiogenesis and promote lesion growth in a murine model of endometriosis. *FASEB J*. 2008;22:522-9.

- Fanton JW e Gordon JG. Radiation-induced endometriosis in *Macaca mulatta*. *Rad Res*. 1991; 126:141-6.
- Farquhar CM. Extracts from “*Clinical Evidence*”: Endometriosis. *BMJ* 2000; 320:1449-52.
- Ferreira MCF, Witz CA, Hammes LS, Kirma N, Petraglia F, e Reis FM. Activin A increases invasiveness of endometrial cells in an in-vitro model of human peritoneum. *Molecular Human Reproduction*, 2008; 14:301-307.
- Fortin M et al. Quantitative assessment of human endometriotic tissue maintenance and regression in a noninvasive mouse model of endometriosis. *Molec Ther* 2004; 9(4):540-7.
- Fujji S. Secondary mülleriana system and endometriosis. *Am J Obstet Gynecol*. 1991; 165:219-24.
- Fukunaga M et al. Ovarian atypical endometriosis: its close association with malignant epithelial tumors. *Histopathology* 1997; 30:249-55.
- Gargett CE, Lederman F, Heryanto B, Gambino LS e Rogers PAW. Focal vascular endothelial growth correlates with angiogenesis in human endometrium. Role of intravascular neutrophils. *Hum Reprod*. 2001;16(6):1065-75.
- Gazvani R & Templeton A. New considerations for the pathogenesis of endometriosis. *Int J Gynaecol Obstet*, 2002; 76(2):117-26.
- Giudice LC & Kao LC. Endometriosis. *Lancet*, 2004; 364:1789-99.
- Goldman JP, Blundell MP, Lopes L, Kinnon C, Di Santo JP, Thrasher AJ. Enhanced human cell engraftment in mice deficient in RAG2 and the common cytokine receptor gamma chain. *Br J Haematol* 1998; 103(2):335-42.
- Greenberg LH, Slayden OD. Human endometriotic xenografts in immunodeficient RAG-2/gamma(c) KO mice. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 190(6):1788-95.
- Groothuis PG et al. Adhesion of human endometrial fragments to peritoneum *in vitro*. *Fertil Steril* 1999; 71:1119-24.
- Groothuis PG, Koks CA, et al. Adhesion of human endometrium to the epithelial lining and extracellular matrix of amnion in vitro: an electron microscopic study. *Hum Reprod*, 1998; 13(8):2275-81.
- Grümmer R. Animal models in endometriosis research. *Hum Reprod Update* 2006; 12(5):641-9.
- Grümmer R et al. Peritoneal endometriosis: validation of an in-vivo model. *Hum Reprod* 2001; 16(8):1736-43.
- Guzick DS, Silliman NP, Adamson GD, et al. Prediction of pregnancy in infertile women based on the American Society for Reproductive Medicine’s revised classification of endometriosis. *Fertil Steril*, 1997; 67:822-9.
- Halme J, Becker S, Wing R. Accentuated cyclic activation of peritoneal macrophages in patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1984a; 148:85–90.
- Halme J, Hammond MG, Hulka JF, Raj SG e Talbert LM. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstet Gynecol* 1984b; 64:151-4.

- Hansen S, Sorensen FB, Vach W, Grabau DA, Bak M e Rose C. Microvessel density compared with the Chalkley count in a prognostic study o angiogenesis in breast cancer patients. *Histopathology* 2004; 44:428-36.
- Harris HA, Bruner-Tran KL, Zhang X, Osteen KG e Lyttle CR. A selective estrogen receptor- β agonist causes lesion regression in an experimentally induced model of endometriosis. *Hum Reprod*. 2005;20(4):936-41.
- Hayes EC e Rock JA. COX-2 inhibitors and their role in gynecology. *Obstet Gynecol Surv*, 2002; 57:768-80.
- Hever A, Roth RB, Hevezi P, Marin ME, Acosta JA, Acosta H et al. Human endometriosis is associated with plasma cells and overexpression of B lymphocyte stimulator. *PNAS*. 2007;104(30):12451-6.
- Hirata T, Osuga Y, Hamasaki K, Yoshino O, Ito M, Hasegawa A et al. Interleukin (IL)-17^a stimulates IL-8 secretion, cyclooxygenase-2 expression, and cell proliferation endometriotic stromal cells. *Endocrinol*. 2008;149(3):1260-7.
- Ho LS, Tsang LL, Chung YW e Chan HC. Establishment of a mouse primary co-culture of endometrial epithelial cells and peripheral blood leukocytes: Effect on epithelial barrier function and leukocyte survival. *Cell Biol Internat*. 2006;30:977-82.
- Hornstein MD, Harlow BL, Thomas PP e Check JH. Use of a new CA 125 assay in the diagnosis of endometriosis. *Hum Reprod* 1995; 10:932-4.
- Hornung D, Ryan IP, Chao VA, Vigne JL, Schriock ED, Taylor RN. Immunolocalization and regulation of the chemokine RANTES in human endometrial and endometriosis tissues and cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997; 82:1621-8.
- Horst CJ van den e Gilman J. The menstrual cycle in elephantulus. *S Afr J Med Sci* 1941; 6:27-47.
- Hughes E et al. Ovulation suppression for endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2003; (3):CD000155. Review.
- Hull ML, Charnock-Jones DS, Chan CL, Bruner-Tran KL, Osteen KG, Tom BD, et al. Antiangiogenic agents are effective inhibitors of endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(6):2889-99.
- Igarashi TM, Bruner-Tran KL, Yeaman GR, Lessey BA, Edwards DP, Eisenberg E, et al. Reduced expression of progesterone receptor-B in the endometrium of women with endometriosis and in cocultures of endometrial cells exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Fertil Steril* 2005; 84(1):67-74.
- Jabbour HN , Milne SA, Williams AR, Anderson RA e Boddy SC. Expression of COX-2 and PGE synthase and synthesis of PGE(2) in endometrial carcinoma: a possible autocrine/paracrine regulation of neoplastic cell function via EP2/EP4 receptors. *Br J Cancer*, 2001; 85:1023-31.
- Jabbour HN, Sales KJ, Smith OP, Battersby S e Boddy SC. Prostaglandin receptors are mediators of vascular function in endometrial pathologies. *Mol Cell Endocrinol*, 2006; 252:191-200.
- Jackson KS, Brudney A, Hastings JM, Mavrogianis PA, Kim JJ e Fazleabas AT. The altered distribution of the steroid hormone receptors and the chaperone immunophilin FKBP52 in a baboon model of endometriosis is associated with progesterone resistance during the window of uterine receptivity. *Reprod Sci*, 2007; 14:137-50.

- Kaitu'u-Lino TJ, Morison NB e Salamonsen LA. Neutrophil depletion retards endometrial retard in a mouse model. *Cell Tissue Res.* 2007;328:197-206.
- Kamiński K, Kotarski J, Gogacz M. Characterization of cellular components in the peritoneal fluid and in the endometrial tissue of women with endometriosis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 1995; 43(5-6):247-52.
- Kao LC, Germeyer A, Tulac S, et al. Expressing profiling of endometrium from women with endometriosis reveals candidate genes for disease-based implantation failure and infertility. *Endocrinology*, 2003; 144:2870-81.
- Kawashima M, Maeda N, Adachi Y, Takeuchi T, Yamamoto Y, Izumiya C et al. Human leukocyte antigen-G, a ligand for the natural killer receptor KIR2DL4, is expressed by eutopic endometrium only in the menstrual phase. *Fertil Steril.* 2009;91(2):343-9.
- Kettel LM, Murphy AA, Morales AJ, Ulmann A, Baulieu EE e Yen SS. Treatment of endometriosis with the antiprogestone mifepristone (RU486). *Fertil Steril*, 1996; 65:23-8.
- Khan KN, Kitajima M, Hiraki K, Fujishita A, Sekine I, Ishimaru T et al. Immunopathogenesis of pelvic endometriosis: Role of hepatocyte growth factor, macrophages and ovarian steroids. *Am J Reprod Immunol.* 2008;60:383-404.
- Kim SH, Cho YM, Chae HD, Kim DR, Kim CH e Kang BM. Increased expression of endoglin in the eutopic endometrium of women with endometriosis. *Fertil Steril* 2001; 76:918-22.
- Koks CAM et al. Adhesion of shed menstrual tissue in an in-vitro model using amnion and peritoneum : a light and electron microscopic study. *Hum Reprod* 1999; 14:816-22.
- Koninckx PR. Is mild endometriosis a condition occurring intermittently in all women? *Hum Reprod* 1996; 9:2202-5.
- Kosaka K, Fujiwara H, Tatsumi K, Yoshioka S, Higuchi T, Sato Y et al. Human peripheral blood mononuclear cells enhance cell-cell interaction between human endometrial epithelial cells and BeWo-cell spheroids. *Hum Reprod.* 2003;18(1):19-25.
- Krikun G, Hu Z, Osteen K, Bruner-Tran KL, Schatz F, Taylor HS et al. The immunoconjugate "Icon" targets aberrantly expressed endothelial tissue factor causing regression of endometriosis. *Am J Pathol.* 2010;176(2):1-7.
- Kruitwagen et al. Endometrial epithelial cells in peritoneal fluid during the early follicular phase. *Fertil Steril* 1991; 55:297-303.
- Laschke MW e Menger DM. In vitro and in vivo approaches to study angiogenesis in the pathophysiology and therapy of endometriosis. *Hum Reprod Update* 2007; 13(4):331-42.
- Lathbury LJ e Salamonsen LA. In-vitro studies of the potential role of neutrophils in the process of menstruation. *Molec Hum Reprod.* 2000;6(10):899-906.
- Lea RG, Sandra O. Immunoendocrine aspects of endometrial function and implantation. *Reproduction* 2007; 134(3):389-404.
- Lebovic DI, Mueller MD, Taylor RN. Immunology of endometriosis. *Fertil Steril*, 2001; 75:1–10.
- Lecce et al. *JCE&M.* 2001;86(3):138.....
- Leighton J. Invasion and metastasis of heterologous tumours in the chick embryo. *Progr Exp Tumour Res* 1964; 4:98-125.

- Lin YJ, Lai MD, Lei HY e Wing LYC. Neutrophils and macrophages promote angiogenesis in the early stage of endometriosis in a mouse model. *Endocrinol.* 2006;147(3):1278-86.
- Liu DTY. Endometriosis: Its association with retrograde menstruation, dysmenorrhea and tubal pathology. *Br J Obstet Gynec.* 1986; 93:859-64.
- Liu Y , Lü L e Zhu G. Angiogenesis of eutopic and ectopic endometria in endometriosis. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci* 2003; 23:190-1.
- Lousse JC, Van Langendonck A, González-Ramos R, Defrère S, Renkin E, Donnez J. Increased activation of nuclear factor-kappa B (NF-kappaB) in isolated peritoneal macrophages of patients with endometriosis. *Fertil Steril* 2008; 90(1):217-20.
- Lucidi RS, Witz CA, Chrisco M, Binkley PA, Shain SA e Schenken RS. A novel in vitro model of the early endometriotic lesion demonstrates that attachment of endometrial cells to mesothelial cells is dependent on the source of endometrial cells. *Fertil Steril*, 2005; 84:16-21.
- Lydon JP, DeMayo FJ, Funk CR, Mani SK, Hughes AR, Montgomery CA Jr, et al. Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev* 1995; 9(18):2266-78.
- Maas JWM, Groothuis PG, Dunselman GAJ, Goeij AEPM, Struijker-Boudier AJ e Evers LH. Development of endometriosis-like lesions after transplantation of human endometrial fragments onto the chick embryo chorioallantoic membrane. *Hum Reprod* 2001; 16(4):627-31.
- Madauss KP, Grigielko ET, Deng SJ, et al. A structural and in vitro characterization of asoprisnil: a selective progesterone receptor modulator. *Mol Endocrinol*, 2007; 21:1066-81.
- Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008; 454(7203):436-44.
- McCarthy NJ et al. Microvessel density, expression of estrogen receptor alpha, MIB-1, p53, an c-erbB-2 in inflammatory breast cancer. *Clin Cancer Res* 2002; 8:3857-62.
- McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, Millican SA, Müller KH, Sharkey AM et al. Vascular endothelial growth factor is produced by peritoneal fluid macrophages in endometriosis and is regulated by ovarian steroids. *J Clin Invest.* 1996;98:482-9.
- Marcoux S et al. Laparoscopic surgery in infertile women with minimal or mild endometriosis. Canadian Collaborative Group on Endometriosis. *N Eng J Med* 1997; 337(4):217-22.
- Martens FMAC, Visseren FLJ, Lemay J, de Koning JP e Rabelink TJ. Metabolic and additional vascular effects of thiazolidinediones. *Drugs.* 2002; 62:1463-80.
- Masuda H, Maruyama T, Hiratsu E, Yamane J, Iwanami A, Nagashima T et al. Noninvasive and real-time assesment of reconstructed functional human endometrium in NOD/SCID/ γ_c^{null} immunodeficient mice. *PNAS.* 2007;104(6):1925-30.
- Missmer SA e Cramer DW. The epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin N Am.* 2003; 30:1-19.
- Missmer SA, Hankinson SE, Spiegelman D, Barbieri RL, Michels KB e Hunter DJ. In utero exposures and the incidence of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol*, 2004; 82:1501-8.
- Montgomery GW, Nyholt DR, Zhao ZZ et al. The search for genes contributing to endometriosis risk. *Hum Reprod Update*, 2008; 14:447-57.

- Murphy AA Clinical aspects of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci*, 2002; 955:1-10; discussion 34(6):396-406.
- Murphy AA & Castellano PZ. RU486: pharmacology and potential use in the treatment of endometriosis and leiomyomata uteri. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 1994; 6:269-78.
- Murphy JB. Transplantability of malignant tumours to the embryos of foreign species. *J Am Med Assoc* 1912; 59:874-5.
- Nap AW et al. Tissue integrity is essential for ectopic implantation of human endometrium in the chicken chorioallantoic membrane. *Hum Reprod* 2003; 18(1):30-4.
- Nap AW et al. Antiangiogenesis therapy for endometriosis. *J Clin Endocrinol Metabol* 2004; 89:1089-95.
- Nasu K, Nishida M, Ueda T, Yuge A, Takai N e Narahara H. Application of the nuclear factor- κ B inhibitor BAY 11-7085 for the treatment of endometriosis: an in vitro study. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;293:E16-E23.
- Nayyar T, Bruner-Tran KL, Piestrzeniewicz-Ulanska D, Osteen KG. Developmental exposure of mice to TCDD elicits a similar uterine phenotype in adult animals as observed in women with endometriosis. *Reprod Toxicol* 2007; 23(3):326-36.
- Ni H, Sun T, King NZ, Ma XH e Yang ZM. Differential expression of microsomal prostaglandin E synthase at implantation sites and in decidual cells of mouse uterus. *Biol Reprod*, 2002; 67:351-8.
- Nishida M et al. Malignant transformation of ovarian endometriosis. *Gynecol Obstet Invest* 2000; 50:8-25.
- Nisolle M e Donnez J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertil Steril*. 1997;68:585-96.
- Nisolle M, Casanas-Roux F, Marbaix E, Jadoul P e Donnez J. Transplantation of cultured explants of human endometrium into nude mice. *Hum Reprod* 2000; 15(3):572-7.
- Noble LS, Simpson ER, Johns A e Bulun SE. Aromatase expression in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996; 81:174-9.
- Noble LS, Takayama k, Zeitoun KM, et al. Prostaglandin E₂ stimulates aromatase expression in endometriosis-derived stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997; 82:600-6.
- Nothnick WB. Treating endometriosis as an autoimmune disease. *Fertil Steril*, 2001;76(2):223-31.
- Olive DL e Pritts EA. Treatment of endometriosis, 2001; 345:266-75.
- Oosterlynck KJ, Cornilli FJ, Waer M, Vandeputte M e Koninckx PR. Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. *Fertil Steril*. 1991; 56:45-51.
- Oosterlynck DJ, Meuleman C, Waer M, Vandeputte M, Koninckx PR. The natural killer activity of peritoneal fluid lymphocytes is decreased in women with endometriosis. *Fertil Steril* 1992; 58(2):290-5.
- Oral E, Olive DL, Arici A, The peritoneal environment in endometriosis, *Hum Reprod Update* 1996; 2:385–398.

Osteen KG, Bruner KL, Sharp-Timms KL. Steroid and growth factor regulation of matrix metalloproteinase expression in endometriosis. *Semin Reprod Endocrinol*, 1996; 14:247-55.

Osteen KG, Bruner-Tran KL, Eisenberg E. Reduced progesterone action during endometrial maturation: a potential risk factor for the development of endometriosis. *Fertil Steril* 2005; 83(3):529-37.

Osteen KG, Carvalho-Macedo AC, Crispens AM e Bruner-Tran KL. The inflammatory-like microenvironment of a recent surgical procedure affects the attachment location, neoangiogenesis and growth of human endometrial tissue in a chimeric model of experimental endometriosis in mice. *In: Proceedings of PAX Meeting; 2008 Sep 18-20; Clermont-Ferrand, France.*

Osteen KG e Sierra-Rivera E. Does disruption of immune and endocrine systems by environmental toxins contribute to development of endometriosis? *Semin Reprod Endocrinol*, 1997; 15:301-8.

Ota H, Igarashi S, Sasaki M, e Tanaka T. Distribution of cyclooxygenase-2 in eutopic and ectopic endometrium in endometriosis and adenomyosis. *Hum Reprod*, 2001; 16:561-6.

Pellicer A et al. Endometrial quality in infertile women with endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 943:122-30.

Podgaec S, Abrao MS, Dias Jr JA, Rizzo LV, Oliveira RM de e Baracat EC. Endometriosis: na inflammatory disease with a Th2 immune response component. *Hum Reprod*. 2007;22(5):1373-79.

Presl J. Endometriosis in monkeys and its relation to radiation exposure. *Ceskolovenska Gyn*. 1993; 58:194-5.

Rana N, Braun DP, House R, Gebel H, Rotman C, Dmowski WP. Basal and stimulated secretion of cytokines by peritoneal macrophages in women with endometriosis. *Fertil Steril*. 1996; 65(5):925-30.

Redwine DB. All that chocolate — but where did it come from? *Fertil Steril*. 2000;73(6):1264-5.

Redwine DB. Does a “peritoneal circulation” really exist? *Am J Obstet Gynecol*. 2003;189(1):306.

Redwine DB. Was Sampson wrong? *Fertil Steril*. 2002;78(4):686-93.

Reis FM, Di Blasio AM, et al. Evidence for local production of inhibin A and activin A in patients with ovarian endometriosis. *Fertil Steril*, 2001; 75(2):367-73.

Rice VM. Conventional medical therapies for endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 955:343-52; discussion 389-93, 396-406.

Ridley JH e Edwards IK. Experimental endometriosis in the human. *Am J Obstet Gynec*. 1958; 76:783-90.

Rier SE, Martin DC, Bowman RE, Dmowski WP e Becker JL. Endometriosis in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) following chronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlordibenzo-p-dioxin. *Fund Appl Tox*. 1993; 21:433-41.

Ryan IP e Taylor RN. Endometriosis and infertility: new concepts. *Obstet Gynecol Surv*, 1997; 52:365-71.

- Salamonsen LA, Zhang J e Brasted M. Leukocyte networks and human endometrial remodelling. *J Reprod Immunol*. 2002;57:95-108.
- Sampson JA. Perforating hemorrhagic (chocolate) cysts of the ovary: Their relation to pelvic adenomas of endometrial type ("adenomyoma of the uterus, rectovaginal septum, sigmoid, etc.). *Arch Surg*. 1921; 3(2):245-323.
- Sampson, J. A. Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1927;14:422-69.
- Sampson JA. The development of the implantation theory for the origin of peritoneal endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1940; 40:549-57.
- Sanfilippo JS, Wakim NG, Shikler KN e Yussman MA. Endometriosis in association with uterine anomaly. *Am J Obstet Gynecol* 1986; 154:39-43.
- Sangi HH, Poindexter AN. Epidemiology of endometriosis among parous women. *Obstet Gynecol* 1995; 85(6):983-92.
- Sasson IE & Taylor HS. Stem cells and the pathogenesis of endometriosis. *Ann NY Acad Sci*, 2008; 1127:106-15.
- Scher CD, Haudenschild C e Klagsbrun M. The chick chorioallantoic membrane as a model system for the study of tissue invasion by viral transformed cells. *Cell*, 1976; 8:373-82.
- Sharpe-Timms KL e Cox KE. Paracrine regulation of matrix metalloproteinase expression in endometriosis. *Ann NY Acad Sci*, 2002; 955:147-56.
- Sillem M, Hahn U, Coddington CC, Gordon K, Runnebaum B e Hodgen GD. Ectopic growth of endometrium depends on its structural integrity and proteolytic activity in the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) model of endometriosis. *Fertil Steril*, 1996; 66:351-3.
- Simpson JL, Elias S, Malinak LR e Buttram VC Jr. Heritable aspects of endometriosis. I. Genetic studies. *Am J Obstet Gynecol*, 1980;137:327-31.
- Somigliana E, Viganó P, Rossi G, Carinelli S, Vignali M e Panina-Bordignon P. Endometrial ability to implant in ectopic sites can be prevented in a murine model of endometriosis. *Hum Reprod*, 1999;14(12):2944-50.
- Somigliana E, Viganó P, Parazzini F, Stopelli S, Giambattista E, Vercellini P. Association between endometriosis and cancer: a comprehensive review and a critical analysis of clinical and epidemiology. *Gynecol Oncol*, 2006;101:331-41.
- Sorensen SS, Andersen LF e Lose G. Endometriosis by implantation: a complication of endometrial ablation. *Lancet* 1994; 343:1226.
- Soudais C, Shino T, Sharara LI, Guy-Grand D, Taniguchi T, Fischer A et al. Stable and functional lymphoid reconstitution of common cytokine receptor γ chain deficient mice by retroviral-mediated gene transfer. *Blood*. 2000;95(10):3071-7.
- Soysal S, Soysal M, Ozer S, Gul N e Gezgin T. The effects of post-surgical administration of goserelin alone in patients with severe endometriosis: a prospective randomized trial. *Hum Reprod*, 2004; 19:160-7.
- Speroff L & Fritz M. Endometriosis. In: Speroff L & Kase N. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. 7ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. 1103-34.

- Speroff L, Glass R, et al. Endometriosis. In: Speroff L, Kase N. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. 6 ed. Baltimore, Maryland: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. 1057-73
- Steele RW, Dmowski WP e Marmer DJ. Immunologic aspects of human endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 1984; 3:33-6.
- Story L e Kennedy S. Animal studies in endometriosis: a review. *ILAR J* 2004; 45(2):132-8.
- Stovall DW, Bowser LM, Archer DF e Guzick DS. Endometriosis-associated pelvic pain: evidence for an association between the stage of disease and a history of chronic pelvic pain. *Fert Steril*, 1997; 68:13-8. [Erratum, *Fertil Steril*, 1998; 69:979.]
- Suginami H. A reappraisal of the celomic metaplasia theory by reviewing endometriosis occurring in unusual sites and instances. *Am J Obstet Gynecol*. 1991; 165:214-18.
- Sun HS, Hsiao KY, Hsu CC, Wu MH, Tsai SJ. Transactivation of steroidogenic acute regulatory protein in human endometriotic stromal cells is mediated by prostaglandin EP2 receptor. *Endocrinology*, 2003; 144:39-34-42.
- Sun T, Li SJ, Kiao HL, Teng CB, Wang HB e Yang ZM. Cyclooxygenases and prostaglandin E synthase in the endometrium of the rhesus monkey during the menstrual cycle. *Reproduction*, 2004; 127:465-73.
- Surrey ES. The role of progestins in treating the pain of endometriosis. *J Minim Invasive Gynecol*, 2006; 13:528-34.
- Szylo K, Tchorzewski H, Banasik M, Glowacka E, Lewkowicz P e Kamer-Bartosinska A. The involvement of T lymphocytes in the pathogenesis of endometriotic tissues overgrowth in women with endometriosis. *Mediators of Inflammation*. 2003;12(3):131-8.
- Tabibzadeh S, Miller S, Dodson WC e Satyaswaroop PG. An experimental model for the endometriosis in athymic mice. *Front Biosc* 1999; c4-9:4-9.
- Tamura M, Sebastian S, Gurates B, Yang S, Fang e Bulun SE. Vascular endothelial growth factor up-regulates cyclooxygenase-2 expression in human endothelial cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002; 87:3504-7.
- Tariverdian N, Siedentopf F, Rucke M, Blois SM, Klapp BF, Kentenich H, Arck PC. Intraperitoneal immune cell status in infertile women with and without endometriosis. *J Eur Repr Immunol*. 2009; 80:80-90.
- Tariverdian N, Theoharides TC, Siendentopf F, Gutiérrez G, Jeschke U, Rabinovich A et al. Neuroendocrine-immune disequilibrium and endometriosis: an interdisciplinary approach. *Semin Immunopathol*. 2007;29:193-209.
- Taylor RN, Lebovic DI e Mueller MD. Angiogenic factors in endometriosis. *Ann NY Acad Sci*, 2002; 955:89-100.
- Te Linde RW e Scott RB. Experimental endometriosis. *Am J Obstet Gynecol*. 1950; 60:1147-73.
- Tibbetts TA, Conneely OM, O'Malley BW. Progesterone via its receptor antagonizes the pro-inflammatory activity of estrogen in the mouse uterus. *Biol Reprod* 1999; 60(5):1158-65.
- Treloar SA, Wicks J, Nyholt DR et al. Genomewide linkage study in 1,176 affected sister pair families identifies a significant susceptibility locus for endometriosis in chromosome 10q26. *Am J Hum Gen*, 2005;77:365;76.

- Tsai SJ, Wu MH, Lin CC, Sun HS e Chen HM. Regulation of steroidogenic acute regulatory protein expression and progesterone production in endometriotic stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001; 86:5765-73.
- Tseng JF, Ryan IP, Milan TD, et al. Interleukin-6 secretion in-vitro is up-regulated in ectopic and eutopic endometrial stromal cells from women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996; 81:1118-22.
- Ulukus M, Ulukus EC, Seval Y, Zheng W e Arici A. Expression of interleukin-8 receptors in endometriosis. *Hum Reprod*, 2005; 20:794-801.
- Uygur D, Aytan H, Zergeroglu S e Batioglu S. Leflunomide – an immunomodulator – induces regression of endometrial explants in a rat model of endometriosis. *J Soc Gynecol Investig*. 2006;13:378-83.
- Van der Linden PJQ et al. Epithelial cells in peritoneal fluid: of endometrial origin? *Am J Obstet Gynecol*. 1995; 173:566-70.
- van Rijn RS, Simonetti ER, Hagenbeek A, Hogenes MC, de Weger RA, Canninga-van Dijk MR, et al. A new xenograft model for graft-versus-host disease by intravenous transfer of human peripheral blood mononuclear cells in RAG2^{-/-} gammac^{-/-} double-mutant mice. *Blood* 2003; 102(7):2522-31.
- Vercellini P, Chapron C, De Giorgio O e Crosignani PG. Coagulation or excision of ovarian endometriomas? *Am J Obstet Gynecol* 2003; 188:606-10.
- Vercellini P, Cortesi I, Crosignani PG. Progestins for symptomatic endometriosis: a critical analysis of the evidence. *Fertil Steril*, 1997; 68:393-401.
- Vercellini P, Trespidi L, Colombo P. A gonadotropin-releasing hormone agonist versus a low-dose oral contraceptive for pelvic pain associated with endometriosis. *Fertil Steril*, 1993; 60:75-9.
- Vigano P, Vercellini P, Di Blasio AM, Colombo A, Candiani GB e Vignali M. Deficient anti-endometrium lymphocyte mediated cytotoxicity in patients with endometriosis. *Fertil Steril*. 1991; 56:894-9.
- Vigano P, Parazzini F, Somigliana E e Vercellini P. Endometriosis: Epidemiology and aetiologic factors. *B Pract Res Cl Obstet Gynecol*. 2004; 18:177-200.
- Vijay SK, Mishra M, Kumar H e Tripathi K. Effect of pioglitazone and rosiglitazone on mediators of endothelium dysfunction, markers of angiogenesis and inflammatory cytokines in type-2 diabetes. *Acta Diabetol*. 2009; 46:27-33.
- Vinatier D, Cosson M, Dufour P. Is endometriosis an endometrial disease? *Eur J Obst Gynec Reprod Biol*. 2000; 91:113-25.
- Vinatier D, Cosson M, Dufour P. Endometriosis theories. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2001;96: 21-34.
- Vinatier D, Dufour P, Oosterlynck D. Immunological aspects of endometriosis. *Hum Reprod Update*. 1996;2(5):371-84.
- Wu MH, Wang CA, Lin CC, Chen LC, Chang WC. Distinct regulation of cyclooxygenase-2 by interleukin-1beta in normal and endometriotic stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005; 90:286-95.

Wu Y, Dajdacsy-Balla A, Strawn E, et al. Transcriptional characterizations of differences between eutopic and ectopic endometrium. *Endocrinology*, 2006; 147:232-46.

Xue Q, Lin Z, Cheng YH, et al. Promoter methylation regulates estrogen receptor 2 in human endometrium and endometriosis. *Biol Reprod*, 2007a; 77:681-7.

Xue Q, Lin Z, Yin P, et al. Transcriptional activation of steroidogenic factor-1 by hypomethylation of the 5' CpG island in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007b; 92:3261-7.

Zamah NM, Dodson MG, Stephens C, Buttram Jr. VC, Besch PK e Kaufman RH. Transplantation of normal and ectopic human endometrial tissue into athymic nude mice. *Am J Obstet Gynecol* 1984; 149(6):591-7.

Zeitoun KM e Bulun SE. Aromatase: a key molecule in the pathophysiology of endometriosis and a therapeutic target. *Fertil Steril*, 1999; 72:961-9.

Zeitoun K, Takayama K, et al. Deficient 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in endometriosis: failure to metabolize 17beta-estradiol. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998; 83(12):4474-80.

Zeller JM, Henig I, Radwanska E, Dmowski WP. Enhancement of human monocyte and peritoneal macrophage chemiluminescence activities in women with endometriosis. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1987; 13(3):78-82.

Zuber TJ. Endometrial biopsy. *Am Fam Physician*. 2001;63:1131-35.

Zumsteg A e Christofori G. Corrupt policemen: inflammatory cells promote tumor angiogenesis. *Curr Opin Oncol* 2009; 21:60-70.