

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

SERENA ROSSATO

Impacto da administração subcutânea de AMD3100 isolado ou em associação a agonista de receptor β 3 adrenérgico na regeneração endometrial, nos desfechos reprodutivos e na prole de modelo experimental murino de endométrio fino

Ribeirão Preto

2024

SERENA ROSSATO

Impacto da administração subcutânea de AMD3100 isolado ou em associação a agonista de receptor β 3 adrenérgico na regeneração endometrial, nos desfechos reprodutivos e na prole de modelo experimental murino de endométrio fino

Versão Corrigida

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Área de Concentração: Ginecologia e Obstetrícia

Orientadora: Profa. Dra. Ana Carolina Japur de Sá Rosa-e-Silva

Ribeirão Preto

2024

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

Rossato, Serena

Impacto da administração subcutânea de AMD 3100 isolado ou em associação a agonista de receptor β 3 adrenérgico na regeneração endometrial, nos desfechos reprodutivos e na prole de modelo experimental murino de endométrio fino/Serena Rossato; orientadora Ana Carolina Japur de Sá Rosa-e-Silva. Ribeirão Preto: FMRP, 2023.

63 p.: 13il.; 30 cm

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

1. Endométrio fino; 2. Célula tronco mesenquimal; 3. Infertilidade; 4. AMD3100; 5. CXCR4

Nome: ROSSATO, Serena

Título: Impacto da administração subcutânea de AMD 3100 isolado ou em associação a agonista de receptor β 3 adrenérgico na regeneração endometrial, nos desfechos reprodutivos e na prole de modelo experimental murino de endométrio fino

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

Aprovado em: 18/01/2024

Banca Examinadora:

Nome: Edson Guimarães Lo Turco

Instituição: UNIFESP

Julgamento: aprovada

Nome: Gustavo Arantes Rosa Maciel

Instituição: FM-USP

Julgamento: aprovada

Nome: Rui Alberto Ferriani

Instituição: FMRP-USP

Julgamento: aprovada

Dedico este trabalho à minha família,
por todo apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

À Deus, aos mestres e aos colaboradores, que tornaram este trabalho possível.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Dra. Ana Carolina Japur de Sá Rosa-e-Silva, pelos ensinamentos, pela oportunidade e por acreditar em meu potencial.

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

Resumo

ROSSATO, S. **Impacto da administração subcutânea de AMD 3100 isolado ou em associação a agonista de receptor β 3 adrenérgico na regeneração endometrial, nos desfechos reprodutivos e na prole de modelo experimental murino de endométrio fino.** 2023. Tese (Doutorado em Ciências) –Programa de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Objetivo: O endométrio fino (EF) representa um grande desafio na reprodução assistida, pois está relacionado à diminuição da receptividade endometrial e consequente falha na implantação, afetando negativamente os resultados reprodutivos. A aplicação de células-tronco mesenquimais (CTM) tem mostrado resultados promissores, pois suas propriedades regenerativas melhoram a espessura e a expressão de biomarcadores de receptividade no endométrio. No entanto, os custos e os processos complexos envolvidos nesses tratamentos dificultam o estabelecimento de um protocolo de rotina. Nesse contexto, há a necessidade de criar estratégias que estimulem o recrutamento e migração de células-tronco específicas para locais de lesão tecidual por meio de cascatas endógenas, promovendo um uso clínico viável. O AMD3100 é um antagonista do receptor CXCR4, que interrompe o eixo CXCL12-CXCR4 - o qual está diretamente relacionado à migração de células-tronco - e tem sido usado em estudos de regeneração de tecidos para aumentar o influxo de células-tronco para locais de injúria tecidual. Além disso, seu uso combinado com agonistas do receptor β 3 adrenérgico leva ao recrutamento seletivo de CTM com melhores resultados regenerativos comprovados em um artigo recente sobre consolidação de fraturas ósseas. Assim, o objetivo deste estudo é avaliar o potencial regenerativo de AMD3100 sozinho ou em associação com um agonista de receptor β 3 adrenérgico em um modelo animal murino de EF e seu impacto nos resultados reprodutivos. **Métodos:** Os experimentos foram realizados em camundongos fêmeas C57Bl/6 (9 semanas de idade; 20 g). O EF foi induzido por aplicação direta de etanol a 95% no útero exposto por meio de uma incisão abdominal, enquanto solução salina tamponada com fosfato (PBS) foi usada no procedimento sham (SH). Os camundongos de cada grupo foram divididos aleatoriamente em 3 subgrupos de tratamento (n = 8 para cada): (1) PBS (PL); (2) AMD 3100 (5 mg/kg sc) dose única imediatamente após a cirurgia (AMD); (3) BRL 37344 (agonista do receptor β 3 adrenérgico seletivo para roedores) (10 mg/kg sc) por 4 dias consecutivos antes da cirurgia mais AMD3100 (5 mg/kg sc) dose única (AMD/ β 3). Dois ciclos estrais após a modelagem e tratamento, todos os grupos foram colocados em acasalamento por 4 semanas com machos C57BL/6 de fertilidade comprovada. A taxa de gravidez, o tamanho e outros parâmetros de

desenvolvimento da ninhada foram analisados para estabelecer o impacto dos tratamentos nos desfechos reprodutivos. Além disso, uma análise anatômica macroscópica foi realizada na prole para avaliar possíveis efeitos teratogênicos. Imuno-histoquímica foi realizada para avaliar a expressão do receptor de progesterona e $\alpha\beta3$ integrina no útero pré e pós-gestacional após os tratamentos. **Resultados:** Em relação às taxas de gravidez, 23 dos 24 camundongos SH engravidaram (independente do tratamento recebido). O modelo de EF reproduziu os resultados da literatura, com menos de 30% de falha na indução de dano endometrial, representado por uma taxa de gravidez de 25% (2/8) no grupo EF+PL em comparação com todos os grupos SH ($p < 0,05$). O tratamento AMD/B3 restaurou completamente a função endometrial, promovendo taxas de gravidez semelhantes para todos os grupos SH ($p > 0,05$). Não houve diferença entre o grupo de tratamento EF+AMD e todos os outros grupos ($p > 0,05$) em termos de gravidez, embora tenha sido encontrada uma diferença clinicamente relevante entre os grupos EF+PL e EF+AMD (25% versus 62,5%, respectivamente). O tamanho da ninhada foi semelhante entre os grupos de tratamento, exceto para o grupo EF+AMD com menor número de recém-nascidos. Quanto ao potencial teratogênico das drogas testadas (AMD e β agonista), não observamos nenhuma malformação macroscópica relevante (interna e externa) nos grupos tratados. A análise imuno-histoquímica do útero pré-gestacional quanto à expressão de receptores de progesterona no endométrio mostrou redução nos grupos EF em relação ao grupo SH ($p < 0,05$). O tratamento com AMD3100 associado ao $\beta3$ agonista restaurou a expressão normal dos receptores de progesterona em comparação ao grupo EF+PL ($p > 0,05$), enquanto o grupo EF+AMD não apresentou tal efeito. Tais tratamentos também mostraram efeito pós gestacional prolongado em expressão de receptores de progesterona. Não houve diferença relevante na expressão de $\alpha\beta3$ integrina entre os grupos. **Conclusão:** Nossos achados indicam uma potencial opção terapêutica para casos de infertilidade relacionada ao fator endometrial. O tratamento combinado com AMD3100 e agonista do receptor $\beta3$ adrenérgico resultou em melhora expressiva nos resultados reprodutivos, sem prejuízo para o desenvolvimento e anatomia da prole. Além disso, este tratamento utiliza duas classes de medicamentos aprovados clinicamente, o que pode reduzir o tempo e o custo das aplicações terapêuticas translacionais no futuro.

Palavras chave: endométrio fino, célula tronco mesenquimal, infertilidade, AMD3100, CXCR4

Abstract

ROSSATO, S. **Impact of subcutaneous administration of AMD 3100 alone or in combination with a β 3-adrenergic receptor agonist on endometrial regeneration, reproductive outcomes and offspring in an experimental murine model of thin endometrium.** 2023. Thesis (Doctoral Degree in Sciences) – Graduate Program in Gynecology and Obstetrics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Objective: Thin endometrium (TE) represents a huge challenge in assisted reproduction, since it is related to decreased endometrial receptivity and consequent implantation failure, negatively affecting reproductive outcomes. The application of mesenchymal stem cells (MSE) has shown promising results, as its regenerative properties improves thickness and expression of receptivity biomarkers in the endometrium. However, the costs and complex processes involved in these treatments make it difficult to establish a routine protocol. In this context, there is a need to create strategies that stimulate specific stem cell recruitment and migration to tissue injury sites through endogenous cascades, promoting a feasible clinical use. AMD3100 is a CXCR4 antagonist receptor that disrupts the CXCL12-CXCR4 axis - which is directly related to stem cell migration - and has been used in tissue regeneration studies to increase the influx of stem cells to the site of injury. In addition, its combined use with β 3 adrenergic agonists receptors leads to selective recruitment of MSC with better regenerative results proved in a recent paper on bone fracture healing. Thus, the objective of this study is to evaluate the regenerative potential of AMD3100 alone or in association with a β 3 adrenergic agonist receptor in a murine animal model of TE and its impact on the reproductive outcomes. **Methods:** Experiments were carried out on female C57Bl/6 mice (age 9 weeks; 20 g). TE was induced by direct application of 95% ethanol in the exposed uterus through an abdominal incision, while Phosphate-buffered saline (PBS) was used in the sham procedure (SH). Mice in each group were randomly divided into 3 treatment subgroups (n = 8 for each): (1) PBS (PL); (2) AMD 3100 (5 mg/kg sc) single dose immediately after surgery (AMD); (3) BRL37344 (rodent-selective β 3 adrenergic receptor agonist) (10 mg/kg sc) for 4 consecutive days previous to surgery plus AMD 3100 (5 mg/kg sc) single dose (AMD/B3). Two estrous cycles after modeling and treatment, all the groups were mated with proven male C57BL/6 mice for four weeks. The pregnancy rate,

litter's size and other developmental parameters were analyzed in order to establish the impact on the reproductive outcomes. In addition, a macroscopic anatomic analysis was performed on the offspring to evaluate possible teratogenic effects. Immunohistochemistry was performed to evaluate progesterone receptor and $\alpha\beta3$ integrin expression in the pre and post gestational uterus after treatments. **Results:** In relation to pregnancy rates, 23 out of 24 sham mice got pregnant (despite the treatment group). The TE model reproduced the literature results, with under 30% of failure in inducing endometrial damage, represented by a pregnancy rate of 25% (2/8) in the TE+PL group in comparison to all sham groups ($p<0,05$). The AMD/B3 treatment completely restored the endometrial function, promoting pregnancy rates similar to all sham groups ($p>0,05$). There was no difference between the TE+AMD treatment group and all the other groups ($p>0.05$) in terms of pregnancy, although a clinically relevant difference between TE+PL and TE+AMD groups was found (25% versus 62,5%, respectively). The litter size was similar between the treatment groups, except for the TE+AMD group with a smaller number of newborns. Regarding the teratogenic potential of the tested drugs (AMD and B3), we did not observe any relevant macroscopic malformations (internal and external) in the treated groups. The immunohistochemistry analysis of the pre gestational uterus regarding the expression of progesterone receptors in the endometrium showed a reduction in the thin endometrium groups compared to the sham group ($p<0.05$). Treatment with AMD3100 associated with a $\beta3$ agonist restored normal expression of progesterone receptors compared to the sham group ($p>0.05$), while the group with AMD3100 alone did not show such an effect. Post gestational uterus analysis showed a prolonged progesterone receptor expression in the treated groups. No significant difference was noted regarding $\alpha\beta3$ integrin expression among the treated groups. **Conclusion:** Our findings indicate a potential therapeutic option for infertility related to thin endometrium. The combination treatment with AMD3100 and $\beta3$ adrenergic agonist receptor resulted in an expressive improvement in reproductive outcomes, without a detrimental impact on the offspring development and anatomy. Moreover, this treatment utilizes two clinical approved classes of drugs, which could reduce the timeline and cost of translational therapeutic applications in the future.

Key Words: Thin endometrium, mesenchymal stem cell, infertility, AMD3100, CXCR-4

Lista de siglas

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

EF: Endométrio fino

FDA: Food and Drug Administration

G-CSF: fator estimulador de colônias de granulócitos

GnRH: Hormônio liberador de gonadotrofina

hCG: Gonadotrofina coriônica humana

HSPCs: células-tronco hematopoiéticas e células progenitoras

LIF: Leukemia inhibitory factor

MSC: Células tronco mesenquimais

PBS: Phosphate-Buffered Saline

PL: Placebo

RA: Reprodução Assistida

TE: Trofocodermia

VEGF: Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

Lista de símbolos

‰: Porcentagem

x: Vezes

N: Número

°C: Grau Celsius

<: Menor

>: Maior

≠: Diferente

g: Gramas

μl: Microlitros

mL: Mililitros

Lista de figuras

Figura 1: Resumo da eficácia das terapêuticas empregadas em estudos de endométrio refratário (fino).....	20
Figura 2: Possíveis esquemas para tratamento de dano endometrial com células tronco/progenitoras.....	21
Figura 3: Grupos do experimento 1.....	27
Figura 4: Grupos do experimento 2.....	27
Figura 5: Técnica de indução do endométrio fino.....	28
Figura 6: Protocolo de administração das drogas.....	29
Figura 7: Prole ao nascimento.....	30
Figura 8: Pesagem da prole.....	31
Figura 9: Análise da anatomia macroscópica.....	32
Figura 11: Resumo do experimento 1.....	35
Figura 12: Resumo do experimento 2.....	35
Figura 13: a: Comparação microscópica da marcação do receptor de progesterona nos grupos endométrio fino e sham pré e pós gestacional de acordo com o tratamento; b: Marcação de progesterona pré gestacional (%); c: Marcação de progesterona pós gestacional (%); d: Marcação de progesterona pré X pós gestacional (%).....	46
Figura 14: Proposta de uso translacional.....	54

Lista de tabelas

Tabela 1: Parâmetros anatômicos avaliados na prole.....	32
Tabela 2: Óbitos observados nos diferentes grupos de estudo ($p>0.05$).....	40
Tabela 3: Sexo dos filhotes observados nos diferentes grupos de estudo ($p>0.05$).....	40
Tabela 4: Achados anatômicos das proles nos diferentes grupos de estudo.....	45

Lista de gráficos

Gráfico 1: Taxa de gestação por grupo.....	37
Gráfico 2: Tempo para concepção nos diferentes grupos de estudo.....	38
Gráfico 3: Nascidos vivos nos diferentes grupos de estudo.....	39
Gráfico 4: Peso ao nascer por grupo (média em g dos filhotes).....	41
Gráfico 5: Peso com três semanas por grupo (média em g dos filhotes).....	41
Gráfico 6: Peso com seis semanas por grupo (média em g dos filhotes).....	42
Gráfico 7: Consumo de ração por grupos (filhotes machos e fêmeas).....	44
Gráfico 8: Consumo de água por grupos (filhotes machos e fêmeas).....	44
Gráfico 9: Marcação de $\alpha\beta 3$ integrina pré gestacional (em %).....	47

Sumário

Introdução	16
Regeneração e preparo endometrial.....	16
Avaliação clínica do endométrio em ciclos de Reprodução Assistida.....	18
Endométrio Refratário (Fino).....	19
O papel das células tronco na regeneração e preparo endometrial.....	21
Justificativa	24
Objetivos	25
Objetivo Primário.....	25
Objetivos Secundários.....	25
Materiais e Métodos	26
Animais e Desenho Experimental.....	26
Indução de endométrio fino.....	27
Administração de PBS/ PBS + AMD3100/ β 3 agonista (BRL 37344) + AMD3100.....	28
Acasalamento.....	29
Variáveis analisadas.....	30
1. Desfechos Reprodutivos.....	30
2. Desenvolvimento ponderal e consumo de água e ração da prole.....	30
3. Análise morfológica (macroscópica) da ninhada.....	31
Determinação do ciclo estral, eutanásia e coleta do útero.....	33
Avaliação dos marcadores de receptividade endometrial.....	34
Cálculo amostral	36
Análise estatística	36
Aspectos éticos	36
Resultados	37
Discussão	49
Conclusão	55
Referências	56
Anexo 1	62
Anexo 2	63

Introdução

A implantação embrionária consiste em um processo complexo de interação entre o embrião e o endométrio, sendo mediada por diversas estruturas moleculares. Para garantir uma implantação bem sucedida, além de um desenvolvimento embrionário adequado, é necessário um endométrio sincrônico, o qual é arquitetado pela ação primária dos hormônios esteroides sexuais estrogênio e progesterona, bem como de outros fatores endócrinos, sinalizações epigenéticas e células tronco.

O endométrio é um tecido que apresenta uma dinâmica cíclica de descamação, reparação, regeneração e remodelamento. [1,2] Na fase folicular, a atividade estrogênica é dominante, levando a proliferação glandular e crescimento das camadas endometriais. Após a ovulação, prevalece a secreção da progesterona, levando a diferenciação glandular, vascular e decidualização para acolher o blastocisto. Quando não ocorre a implantação, o endométrio descama e é reparado por ação estrogênica, a qual contribui com a migração celular epitelial das glândulas da camada basal para a área desnuda. [3]

A janela de implantação é definida como o período mais propício para ocorrer a interação trofoblasto-endometrial e se dá geralmente entre os dias 22 e 24 de um ciclo idealizado de 28 dias. A alteração de receptividade endometrial é considerada fator limitante para o sucesso na Reprodução Assistida (RA) em humanos, sendo considerada uma das principais razões para a falha de implantação, visto que - mesmo com a transferência de embriões de boa qualidade em ciclos de RA - os resultados gestacionais são limitados. [4,5] Por conta do fator endometrial, independentemente dos grandes avanços na área da medicina reprodutiva - os quais abrangem estratégias eficazes para seleção e criopreservação embrionárias - parte das pacientes ainda experienciam falhas repetidas de tratamento. Buscando melhores desfechos, métodos de avaliação do crescimento, qualidade e receptividade do endométrio têm sido empregados previamente ao início dos tratamentos nos protocolos de reprodução assistida. [6,7]

Regeneração e preparo endometrial

A promoção do crescimento e diferenciação celular endometriais cria um ambiente receptivo para a implantação embrionária, a qual pode ser dividida

basicamente em cinco fases: 1. Migração do blastocisto do oviduto para a cavidade uterina e descamação da zona pelúcida; 2. Aposição do blastocisto em região endometrial propícia; 3. Anexação das células do trofocotoderma (TE) do blastocisto ao epitélio endometrial; 4. Adesão das células do TE ao epitélio endometrial; e 5. Invasão do endométrio pelo blastocisto. [8,9]

A ação sincrônica dos hormônios esteróides estrogênio e progesterona durante a decidualização promove as mudanças funcionais e estruturais no endométrio que permitem a implantação do blastocisto. A expressão dos receptores esteróides no epitélio luminal endometrial varia durante o ciclo menstrual, com altos níveis de progesterona na fase proliferativa e perda seletiva da expressão desse hormônio na fase secretora. Essa mudança ocorre por volta do sexto dia após a ovulação, concomitante ao aparecimento da $\alpha\beta3$ integrina, expressa nas células epiteliais, marcando o início da janela de implantação. Já as células estromais, mantêm os mesmo níveis de expressão de progesterona durante todo o ciclo menstrual, desencadeando a ativação de mediadores parácrinos que interferem na expressão gênica local desencadeando um padrão receptivo nas células epiteliais, o que comprova que também há uma ação indireta da progesterona na receptividade do endométrio [10].

Condições clínicas em que a produção de estrogênio e/ou progesterona estão comprometidas podem levar ao prejuízo na implantação e no desenvolvimento embrionário, tais como endometriose e síndrome dos ovários policísticos. Diversos autores têm também descrito um efeito desses hormônios sobre a expressão gênica endometrial que está relacionada a liberação de quimiocinas, interferons, citocinas, fatores de crescimento, prostaglandinas, moléculas de sinalização intracelular, moduladores imunológicos, populações celulares específicas do sistema imune e inibidores de proteinases. [10,11]

Além da atividade marcante do estrogênio e da progesterona na interação endométrio-embrionária através de seus receptores, vários outros biomarcadores e mediadores têm sido considerados essenciais para a implantação. As moléculas de adesão celular são umas das principais responsáveis por alterações na receptividade endometrial durante a janela de implantação e incluem principalmente as integrinas, o CD44, a troponina e a caderina-11. [12] A $\alpha\beta3$ integrina é a mais estudada em humanos, sendo encontrada nos epitélios luminal e glandular durante a fase secretora e considerada o marcador com melhor valor preditivo da receptividade endometrial em pacientes com subfertilidade. Esta

consiste em um receptor de adesão presente no ápice das células epiteliais luminais do endométrio, aparecendo durante a “janela de implantação”, que facilita a fixação do embrião à superfície endometrial durante o processo de implantação.

A alteração na sua expressão está associada a infertilidade, falha de implantação e ao abortamento recorrente, comprovando seu papel na receptividade endometrial. [10,11]

Quanto às citocinas envolvidas na implantação, a LIF é a mais importante. Diversos estudos confirmaram o papel essencial da LIF ao demonstrar maiores taxas de falha de implantação associadas à sua deficiência ou inibição de sinalização, com melhora dos desfechos após sua suplementação. A LIF tem expressão bifásica - inicialmente nas glândulas endometriais e posteriormente nas células estromais que envolvem o blastocisto - mostrando ação tanto na fase de preparo endometrial, quanto na implantação embrionária. [11]

Ademais, há evidências da ação de células tronco/ progenitoras contribuindo para a regeneração de diferentes compartimentos celulares do endométrio e de que a medula óssea dê origem às células do estroma, epitélio e endotélio endometrial. Assim, as atividades distorcidas destas células-tronco também têm sido implicadas na alteração da receptividade endometrial, impactando na implantação e subsequente estabelecimento da gravidez. [2,13] Este tópico será abordado mais detalhadamente na sequência deste texto.

Avaliação clínica do endométrio em ciclos de Reprodução Assistida

Atualmente, o endométrio é avaliado pela ultrassonografia, método não invasivo e de fácil execução por operador habilitado. Os parâmetros endometriais comumente avaliados envolvem a espessura, o padrão ecogênico, o volume e o fluxo sanguíneo ao *doppler*. [7,14,15] Quanto a espessura, diferentes valores de *cut-off* são considerados nos estudos, porém a maioria considera uma espessura menor que 7 - 8mm no dia da administração da gonadotrofina coriônica humana (hCG) para maturação oocitária nos ciclos a fresco, ou início da progesterona nos ciclos de transferência de embriões criopreservados. A incidência de endométrio fino, considerando o *cut-off* de 7mm, varia de 1 a 2,5% nos estudos que avaliam apenas ciclos com transferência de embriões congelados [6]. Em ciclos de estimulação ovariana controlada no geral - tanto com agentes orais, quanto com

gonadotrofinas - a incidência parece ser maior e mais variável, com valores de 5,6 a 37,9%. [6,7] A incidência maior de endométrio fino nos estudos que abordam ciclos de estimulação ovariana comparada a de ciclos de transferência de embriões congelados pode ser resultante da maior chance de cancelamento dos últimos em casos de avaliação endometrial desfavorável. Parte dessas discrepâncias também podem ser devidas ao fato de o método ser operador dependente e ao equipamento utilizado não ser padronizado. [7]

Uma metanálise realizada em 2019 avaliou mais de 88 mil ciclos de fertilização *in vitro* de 9 estudos prospectivos e 21 retrospectivos, mostrando que o endométrio fino estava associado com menor taxa de implantação, de gravidez e de nascidos vivos. Além disso, pacientes portadoras dessa condição também tinham mais chances de evoluir com abortamento. [6] Estudo que avaliou a taxa de nascidos vivos em ciclos de transferência de embriões a fresco de acordo com a espessura endometrial mostrou relação direta entre as variáveis, com valores de 33.7%, 25.5%, 24.6% e 18.1% em pacientes com, respectivamente, ≥ 8 mm, 7–7.9 mm, 6–6.9 mm and 5–5.9 mm de espessura endometrial. [16]

Endométrio Refratário (Fino)

Como exposto acima, há condições clínicas que podem dificultar um adequado desenvolvimento endometrial. O endométrio fino pode ser causado por diversos insultos teciduais, hormonais, ou mesmo ser classificado como idiopático. Entre as etiologias comprovadamente relacionadas a essa condição, destacam-se a síndrome de Asherman, história de curetagem, história de radiação pélvica, uso de citrato de clomifeno, história de endometrite, malformações Mullerianas, hipogonadismo hipotalâmico e insuficiência ovariana precoce. [1,6,17]

No endométrio fino, há maior proximidade do sítio de implantação do embrião às artérias espiraladas, o que significa um maior fluxo sanguíneo que facilita o estresse oxidativo local (elevada produção de espécies reativas de oxigênio), impactando negativamente no desenvolvimento embrionário. Além disso, um desequilíbrio das respostas Th1-pró-inflamatória e Th2-anti-inflamatória associado a um efeito citotóxico exacerbado e a uma baixa resistência ao estresse oxidativo, também podem estar associados a falha de implantação nesses casos. [18-20]

As estratégias terapêuticas já aventadas para resolução do quadro de endométrio fino e consequente melhora dos índices reprodutivos incluem o uso de nitroglicerina, ácido acetilsalicílico, estradiol estendido, sildenafil, pentoxifilina, vitaminas/ suplementos, fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), agonista de GnRH e hCG, todas, porém, sem resultados prósperos ou achados conflitantes. Abordagens cirúrgicas como o transplante uterino e a histeroscopia para o tratamento de possível patologia uterina não identificada também foram utilizadas com melhores resultados gestacionais, porém envolvem os riscos inerentes aos procedimentos. [21-27] Pesquisas recentes que utilizaram plasma rico em plaquetas, células tronco e quimiocinas que atuam na regulação da migração de células tronco (como o CXCL12) apresentaram resultados promissores na regeneração endometrial, porém mais estudos controlados são necessários, dado que representam tratamentos mais invasivos, de alto custo e com benefício incerto. [27-34].

<i>Therapeutic option</i>	<i>Efficacy</i>
Endocrine strategies	
high doses of estradiol	●
long courses of estradiol	●
vaginal estradiol	●
systemic HCG	●
intrauterine PRP	●
intrauterine G-CSF	●
GnRH analogues	●
AAS, vitamins & supplements	
aspirin	●
nitroglicerine patches	●
vitamin E	●
L-arginine	●
pentoxifiline	●
sildenafil	●
Surgical strategies	
hysteroscopy	●
stem cells	●
uterine transplantation	●

Figura 1: Resumo da eficácia das terapêuticas empregadas em estudos de endométrio refratário (fino). Em vermelho: sem evidência de benefício; em amarelo: benefício incerto; em verde: benefício comprovado

Extraído de: Garcia-Velasco JA et al. Strategies to manage refractory endometrium: state of the art in 2016. Reproductive BioMedicine Online 2016; 32: 474–489.

O papel das células tronco na regeneração e preparo endometrial

A participação das células tronco no processo de regeneração endometrial tem sido amplamente descrita na literatura médica sobre o tema. Sendo assim, a falta ou desregulação de suas funções poderiam contribuir para a ocorrência do endométrio fino impactando sobre a fertilidade feminina. As células tronco derivadas da medula óssea, as células tronco mesenquimais e endoteliais circulam pela corrente sanguínea e são atraídas para sítios de injúria tecidual, contribuindo para a angiogênese e diferenciação celular órgão-específica com regeneração do tecido danificado. No endométrio, estas células dão origem aos tecidos epitelial, estromal e endotelial. [33]

Estudos que utilizaram terapias de células tronco, tanto por transplante autólogo, quanto através da estimulação de cascatas endógenas de recrutamento, mostraram-se promissores na regeneração endometrial em um contexto de lesão tecidual (por exemplo, em casos de endométrio fino e Síndrome de Asherman). Os mecanismos envolvidos neste processo regenerativo podem ser devido a migração de células tronco derivadas da medula óssea ou da própria ativação das células tronco/progenitoras de origem endometrial estimuladas pela injúria local. [33-37] Em teoria, aumentando a população de células tronco mesenquimais ocorreria aumento do recrutamento destas para áreas de lesão, acelerando o processo de regeneração tecidual, como já foi demonstrado em estudos que abordaram a cicatrização óssea e cutânea. [38-41]

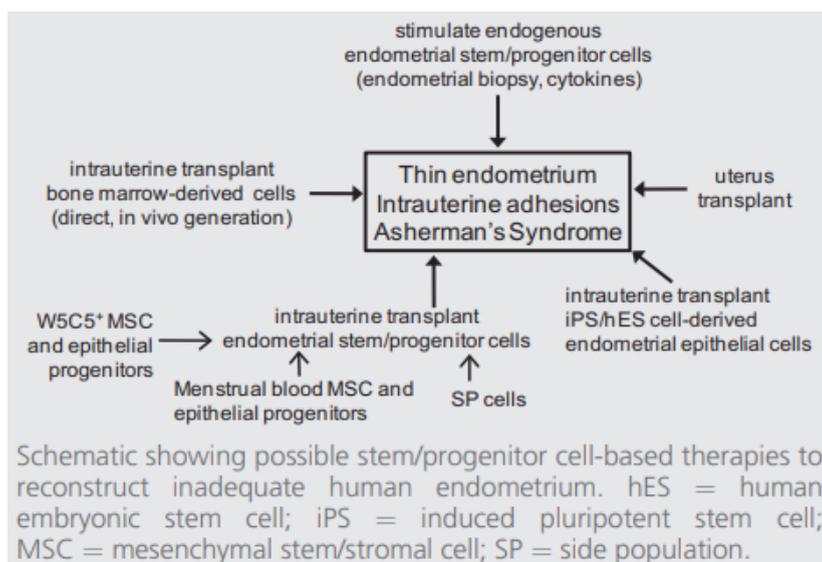


Figura 2: Possíveis esquemas para tratamento de dano endometrial com células tronco/progenitoras

Extraído de: Gargett CE, Ye L. Endometrial reconstruction from stem cells. *Fertility and Sterility* 2012; 98: 11-20.

Alguns trabalhos recentes têm usado culturas de células tronco mesenquimais injetadas sistemicamente via corrente sanguínea ou diretamente no sítio de lesão, visando a regeneração tecidual. [42] Da mesma forma, a investigação de meios pelos quais as células tronco mesenquimais poderiam - da mesma forma que as células-tronco hematopoiéticas e células progenitoras HSPCs) - ser mobilizadas da medula óssea para o sangue facilitaria os processos de coleta, expansão e administração empregados na terapia celular tradicional. Sabe-se que a mobilização diferencial de subconjuntos de células progenitoras depende das citocinas específicas que regulam a retenção e proliferação de cada tipo celular. [43]

A quimiocina CXCL12, também conhecida como SDF-1, é um fator quimiotático potente predominantemente produzido por células estromais da medula óssea e células endoteliais de outros órgãos, atuando através de seu receptor transmembrana, CXCR4. Sua ação se dá pela modulação do sistema imunológico, através do desenvolvimento, migração e sobrevivência linfocitários. Além disso, exerce o controle sobre o direcionamento e a mobilização das células tronco/progenitoras para sítios de injúria tecidual. Considerando as propriedades biológicas do CXCL12, postulou-se que este poderia exercer importante papel na regeneração e receptividade do endométrio nos casos de injúria endometrial, com resultados promissores em estudos recentes. [34,44,45,46]

O antagonista do receptor CXCR4 (AMD3100/ plerixafor) age mobilizando às células-tronco hematopoiéticas CD34 na circulação periférica, sendo empregado no tratamento de mieloma múltiplo e linfoma não-Hodgkin, em conjunto com o G-CSF. Através do bloqueio competitivo altamente seletivo e de alta afinidade do receptor CXCR4, ocorre deslocamento das células-tronco da medula óssea, ao interromper sua atração pelo SDF 1. [47]

No entanto, devido ao seu tamanho maior, sua forte adesão e seu número limitado no estroma da medula óssea, as células tronco mesenquimais (MSC) não são efetivamente mobilizadas pela combinação AMD3100/G-CSF. Pitchford et al (2015) realizou o estudo de diferentes protocolos de mobilização de células tronco em camundongos, demonstrando que o AMD3100 em combinação ao VEGF (Fator de Crescimento do Endotélio Vascular) mobiliza preferencialmente a população mesenquimal da medula óssea, já sendo demonstrada eficácia em mobilização e ação regenerativa em estudos murinos de fratura óssea. [43,48]

Trabalho recente e com resultados promissores na regeneração tecidual realizado em murinos, também para avaliar regeneração quanto a fratura ortopédica, empregou um novo protocolo de mobilização de MSC: antagonista de CXCR4 (AMD3100) associado a agonista de receptor β 3 adrenérgico (BRL 37344 - reconhecido como agonista '*rodent-selective*'). Dessa forma, foram demonstrados os mecanismos envolvidos na mobilização específica de MSC em duas etapas: 1) uso prévio de agonista de receptor β 3 adrenérgico (β 3 agonista) por 4 dias, que estimulou a produção de endocanabinoides e de N-aciletanolamidas localmente na medula óssea (comprovados como necessários para a seleção e mobilização específicas de MSC); e 2) uso em dose única de AMD3100, o qual levou a geração de gradiente de CXCL12 no endotélio sinusoidal da medula óssea promovendo a migração de MSC que expressam CXCR4 para o sangue periférico. Assim, torna-se possível a ativação de cascata endógena para mobilização de MSC visando seus efeitos regenerativos teciduais com o uso de droga segura e com poucos efeitos colaterais já aprovada pela FDA (AMD3100) e de um β 3 agonista, que poderia ser representado em humanos pelo Mirabegron - também já aprovado pelo FDA e usado atualmente para tratamento de bexiga hiperativa. [49-51]

Quanto à teratogenicidade, o AMD3100 ainda é considerado categoria D na gestação, devido a estudos em animais que revelaram malformações, perdas gestacionais e baixo peso ao nascer. Porém, os estudos escassos disponíveis utilizaram doses altas e seriadas com exposição dos indivíduos durante o período gestacional (dias 6-17 de gestação). Além disso, a toxicidade embriofetal foi observada em doses que também causaram toxicidade materna. Estudos em ratos mostram que o tempo de meia-vida plasmática do AMD3100 é em torno de 1h, com eliminação predominantemente urinária. [50,52]

Dessa forma, neste estudo propõe-se realizar a análise dos efeitos do AMD 3100 isolado ou em associação ao β 3 agonista sobre a regeneração endometrial e consequentes resultados reprodutivos em modelo murino de endométrio fino induzido. Visando documentar os resultados terapêuticos, serão avaliados marcadores de receptividade endometrial, desfechos reprodutivos e possíveis efeitos teratogênicos de dose única pré-gestacional do AMD3100 na prole.

Justificativa

Sabe-se que a terapia com células tronco apresenta resultados promissores na regeneração tecidual em patologias endometriais, tais como a Síndrome de Asherman e o Endométrio Fino. No entanto, os custos e dificuldades inerentes aos procedimentos necessários para esse tratamento reforçam a necessidade da pesquisa de estratégias de ativação endógena específica da migração de células tronco para sítios de injúria tecidual. Além disso, o uso de drogas ainda sem aprovação para uso em humanos dificulta e posterga a aplicabilidade das terapias propostas.

Estudos baseados nos efeitos do AMD3100 (plerixafor) demonstram que há aumento da mobilização de células tronco para a corrente sanguínea, contribuindo para a regeneração tecidual. O uso combinado com $\beta 3$ agonista demonstrou em estudos prévios com animais que esta estratégia aumenta a seletividade da mobilização de células tronco mesenquimais, com melhores resultados regenerativos em tecido ósseo. Tanto o AMD3100 quanto o $\beta 3$ agonista (com opção para humanos representada pelo Mirabegron) são drogas aprovadas pelo FDA, com segurança já comprovada para uso em humanos e com aplicabilidade em outras áreas da medicina.

Tendo em vista o grande desafio que o endométrio fino representa no campo da reprodução humana assistida atualmente e os efeitos já conhecidos e seguros dos compostos a serem utilizados, objetivamos aumentar a receptividade endometrial e as taxas de gestação, além de avaliar as possíveis repercussões na prole. A confirmação de um efeito do AMD3100 - isolado ou em associação com $\beta 3$ agonista - na regeneração endometrial em indivíduos com endométrio fino abre uma possibilidade de nova opção terapêutica para mulheres com infertilidade associada a este fator, com o objetivo de melhorar resultados reprodutivos, para aplicação translacional num curto espaço de tempo.

Objetivos

Objetivo Primário

Avaliação do impacto da administração do AMD3100 (plerixafor) - isolado ou em associação com $\beta 3$ agonista - nas taxas de gestação de camundongos fêmea C57BL/6 com endométrio fino induzido.

Objetivos Secundários

1. Avaliar comparativamente se há diferença na expressão de receptores de progesterona no endométrio de camundongos fêmea com endométrio fino induzido após a administração de AMD3100 isolado ou de AMD3100 combinado a $\beta 3$ agonista;
2. Avaliar possíveis efeitos de toxicidade do AMD3100 isolado ou em associação com $\beta 3$ agonista sobre a prole de camundongos fêmea.

Materiais e Métodos

Animais e Desenho Experimental

O estudo foi realizado no Departamento de Ginecologia e Obstetrícia e no Setor de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Ao todo foram utilizados 84 camundongos fêmeas selvagens C57BL/6J (com 8-10 semanas de vida), virgens e com aproximadamente 20g cada, provenientes do Serviço de Biotério da mesma instituição. Para fins de avaliação do desfecho reprodutivo, 8 murinos machos C57BL/6J também foram utilizados para acasalamento. Foram mantidos em gaiolas apropriadas, com 41 x 32 centímetros de perímetro e 17 centímetros de altura, com no máximo 4 animais por gaiola, sob controle de temperatura, umidade e luminosidade do ambiente (12 horas de ciclo claro/escuro - 7:00 às 19:00), sendo alimentados com água e ração para ratos a livre demanda. Todos os animais foram tratados seguindo os protocolos aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).

Os animais foram divididos em dois experimentos:

- Experimento 1: 6 grupos para avaliação dos desfechos reprodutivos/desfechos na prole (8 animais cada). Os animais do grupo de estudo foram submetidos à procedimento de indução alcoólica de endométrio fino e foi determinado um grupo controle – Sham (endométrio controle), o qual foi submetido ao mesmo procedimento com injeção de solução de PBS (veículo), para controle quanto aos efeitos relacionados ao procedimento. Cada um destes grupos foi subdividido para receber tratamento (AMD3100 isolado ou AMD3100 + β 3 agonista) ou placebo, sendo formados 6 subgrupos de estudo: i. Endométrio fino + placebo (PBS); ii. Endométrio fino + PBS (4 dias) + AMD3100; iii. Endométrio fino + β 3 agonista (4 dias) + AMD3100; iv. Endométrio controle + placebo (PBS); v. Endométrio controle + PBS (4 dias) + AMD3100; vi. Endométrio controle + β 3 agonista (4 dias) + AMD3100.

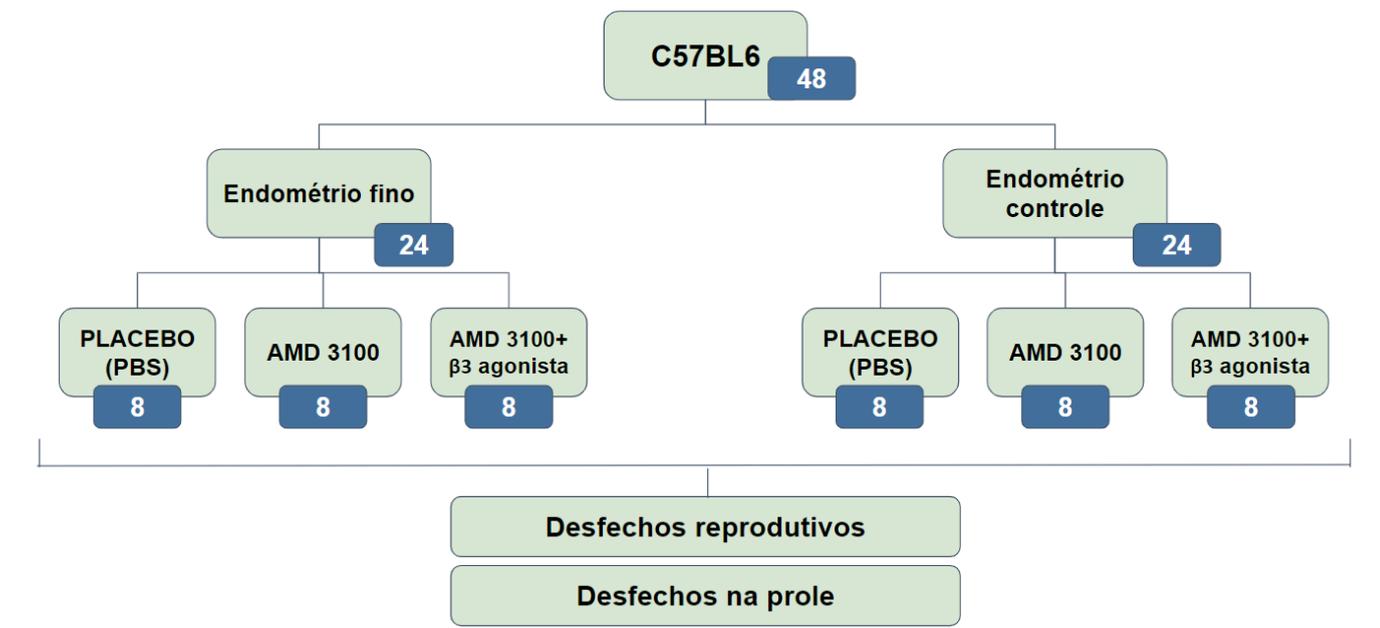


Figura 3: Grupos do experimento 1

- Experimento 2: Foram estabelecidos os mesmos 6 subgrupos (6 animais cada) para avaliação dos marcadores de receptividade endometrial.

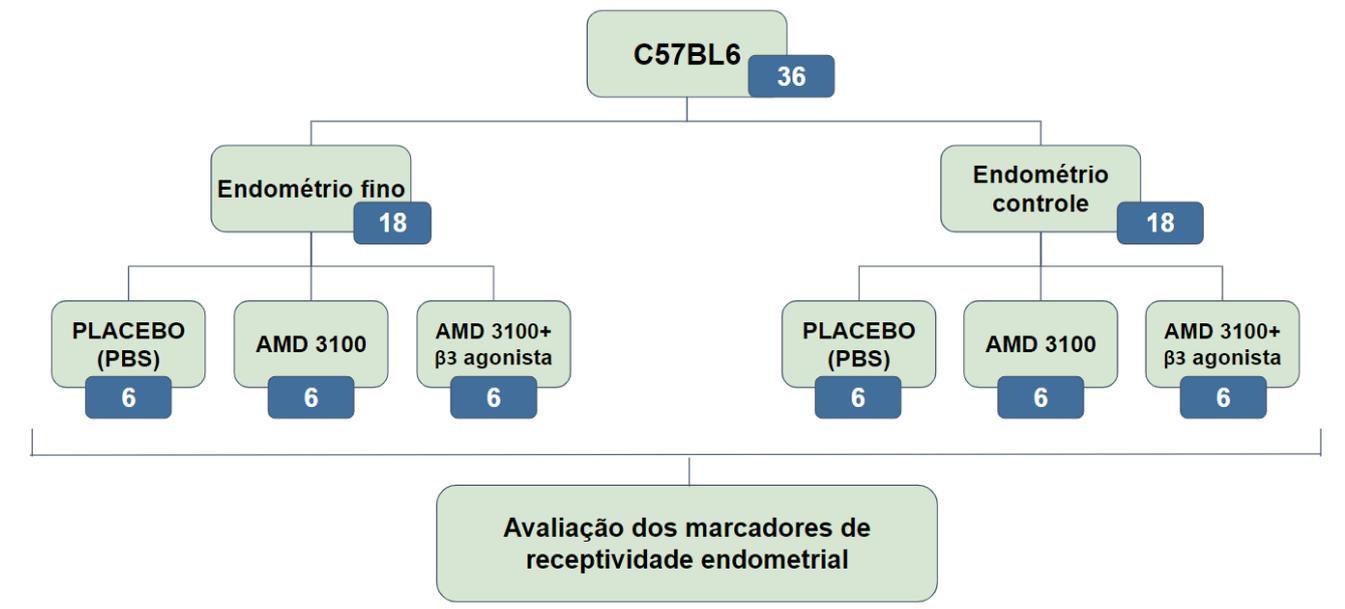


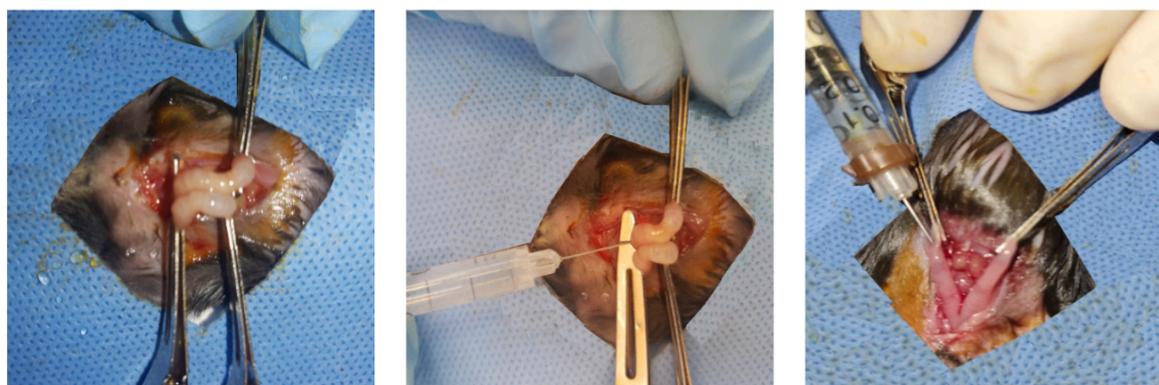
Figura 4: Grupos do experimento 2

Indução de endométrio fino

O endométrio fino foi induzido nos indivíduos através da instilação de etanol a 95% na cavidade uterina, conforme estudo realizado por Yi et al (2019). Após anestesia com Ketamina (100mg/Kg de peso do animal) e Xilazina (10

mg/Kg de peso do animal), foi realizada incisão abdominal para exposição dos cornos uterinos, que foram individualizados e fixados pelas extremidades distal e proximal bilateralmente através do uso de pinças atraumáticas. Após tais etapas, 50 μ L de etanol a 95% ou de PBS (phosphate-buffered saline - para os controles) foram injetados em ambos os cornos com agulha de 30G acoplada a seringa de 1mL contendo a solução.

Passados 5 minutos do procedimento, os cliques foram removidos e 0,5mL de solução de soro fisiológico a 0,9% foi aplicada em cada corno uterino para eliminação de qualquer conteúdo alcoólico remanescente. [34,55] Todos os animais foram submetidos previamente a tricotomia pélvica, sendo realizados os cuidados de antisepsia e a lavagem das luvas de látex com soro fisiológico pré-operatórios para reduzir a formação de aderências intra-abdominais.



Laparotomia, com exposição dos cornos uterinos

Injeção de 50 μ L/corno de Etanol a 95%

Lavagem com SF 0,9% após 5 min

Figura 5: Técnica de indução do endométrio fino

Administração de PBS/ PBS + AMD3100/ β 3 agonista (BRL 37344) + AMD3100

A administração do BRL 37344 (β 3 agonista seletivo) na dose 10 mg / kg ou de PBS em mesmo volume via subcutânea se deu por 4 dias consecutivos prévios à cirurgia, a qual ocorreu no intervalo entre a última dose de β 3 agonista e a dose única de AMD3100. A dose única de AMD3100 na dose 5 mg / kg ou PBS em mesmo volume foi administrada por via subcutânea imediatamente após o fechamento da cavidade abdominal.

Para determinar o tempo de administração do AMD3100, foi realizado estudo piloto com 16 fêmeas C57Bl6 (9 semanas de vida), às quais foram subdivididas em 4 grupos (EF + Placebo; EF + AMD3100 imediato pós operatório; EF + AMD3100 24h pós operatório; EF + AMD3100 1 ciclo estral pós operatório). Após avaliação histológica dos fragmentos de útero de tais animais, foi constatado efeito regenerativo tecidual (número de glândulas, espessura do epitélio) semelhante nos grupos de administração do AMD3100 imediato e após 24h da cirurgia, demonstrando efeito igualmente superior em relação aos demais grupos (EF + Placebo e EF + AMD3100 1 ciclo estral pós operatório).

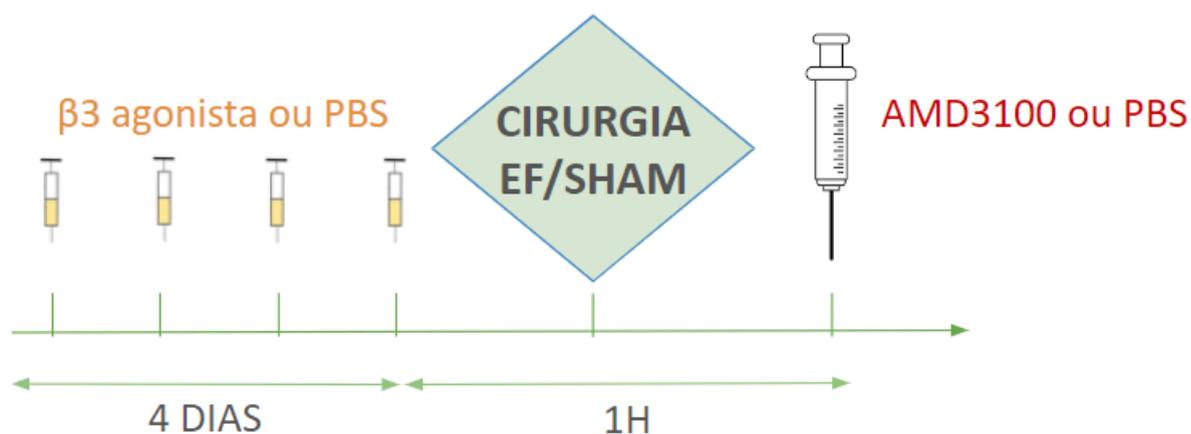


Figura 6: Protocolo de administração das drogas

Acasalamento

Dez dias após os procedimentos, os animais do experimento 1 (6 subgrupos destinados para avaliação dos desfechos reprodutivos / prole) foram colocados em gaiolas com machos férteis, por até quatro semanas, sendo 4 fêmeas e 1 macho por gaiola. Após 7 dias do início do período de acasalamento, as fêmeas foram pesadas a cada 3 dias, sendo um ganho ponderal igual ou superior a 6g considerado diagnóstico de gestação; as fêmeas grávidas foram alocadas em gaiolas separadas até o nascimento e posterior desmame dos filhotes. As fêmeas que não apresentaram sinais de gravidez após 4 semanas de acasalamento foram retiradas da presença do macho, e antes de considerá-la infértil foi aguardado um período de 7 dias para os casos de gestação iniciada nos últimos dias de contato com o macho. As taxas de gestação foram calculadas

dividindo-se o número de camundongos que engravidaram pelo número total de animais do mesmo grupo colocados para acasalar, por 28 dias mais uma semana.

Variáveis analisadas

Após o nascimento dos recém-nascidos, foram avaliados os seguintes parâmetros para estabelecer possíveis efeitos tóxicos na prole dos indivíduos que receberam AMD3100.

1. Desfechos Reprodutivos



Foi computada a taxa de nascidos vivos (N de nascidos vivos/ Total de filhotes \times 100) e taxa de óbitos precoces que vierem a ocorrer em até 6 semanas (N de óbitos precoces/ Total de filhotes \times 100). As taxas foram expressas em porcentagem. Como não é possível precisar a data da concepção, a avaliação referente ao tempo para concepção será indiretamente estimada calculando-se o total de dias entre o início do acasalamento e o nascimento dos filhotes, considerando o tempo médio de gestação da camundonga de 21 dias. [53,54]

Figura 7: Prole ao nascimento

2. Desenvolvimento ponderal e consumo de água e ração da prole

Os filhotes foram pesados ao nascer, com 3 semanas (período em que ocorreu o desmame) e 6 semanas (início da idade reprodutiva) de vida, utilizando balança de alta precisão (0,1 g). O consumo de água e ração dos filhotes após desmame foi mensurado diariamente, entre 3 e 6 semanas de vida, utilizando-se

proveta e balança, respectivamente. Foi oferecido, inicialmente, 50g de ração por filhote e 450 mL de água por grupo de 5 indivíduos com reposição monitorada de acordo com a demanda de consumo. [54]



Figura 8: Pesagem da prole

3. Análise morfológica (macroscópica) da ninhada

Segundo as metodologias de análise morfológica descritas por Barrow & Taylor (1969) e Wilson & Warkany (1965), avaliamos minuciosamente a morfologia externa dos filhotes, de acordo com a tabela abaixo. [56, 57]

PARÂMETROS AVALIADOS NA ANATOMIA MACROSCÓPICA	
CABEÇA	CÉREBRO - CONFORMAÇÃO E HEMISFÉRIOS
	CEREBELO - CONFORMAÇÃO E HEMISFÉRIOS
	ORELHAS - CONFORMAÇÃO, IMPLANTAÇÃO, SIMETRIA
	OLHOS - CONFORMAÇÃO, PÁLPEBRAS, TOPOGRAFIA E SIMETRIA
	NARIZ - CONFORMAÇÃO, NARINAS, COR, VIBRISSAS
	BOCA - DENTES, PALATO, LÍNGUA, ABERTURA
TÓRAX	CAIXA TORÁCICA - ESTERNO, COSTELAS
	TIMO
	CORAÇÃO - CÂMARAS, TOPOGRAFIA, SAÍDA GRANDES VASOS
	PULMÕES - TOPOGRAFIA, CONFORMAÇÃO, LOBOS, TRAQUEIA/BRÔNQUIOS, DIAFRAGMA
	LINHA MAMILAR
ABDOME	ESÔFAGO - TAMANHO, TOPOGRAFIA
	ESTÔMAGO - TAMANHO, TOPOGRAFIA, CONFORMAÇÃO
	INTESTINOS GROSSO/DELGADO/RETO - TAMANHO, CONFORMAÇÃO
	FÍGADO - CONFORMAÇÃO, LOBOS, TOPOGRAFIA, VESÍCULA BILIAR
	BAÇO - CONFORMAÇÃO, TOPOGRAFIA
	PÂNCREAS - CONFORMAÇÃO, TOPOGRAFIA
	RINS - TAMANHO, CONFORMAÇÃO, TOPOGRAFIA, ADRENALIS
PELVE	TESTÍCULOS, VESÍCULAS SEMINAIS, PRÓSTATA
	ÚTERO - CORNOS, OVIDUTOS, OVÁRIOS
	BEXIGA - TAMANHO, CONFORMAÇÃO, TOPOGRAFIA
	PERÍNEO - CONFORMAÇÃO, VAGINA/PÊNIS, ÂNUS
MEMBROS	CONFORMAÇÃO, PATAS (DEDOS, UNHAS)
PÊLO	COLORAÇÃO, DISTRIBUIÇÃO, ASPECTO

Tabela 1: Parâmetros anatômicos avaliados na prole

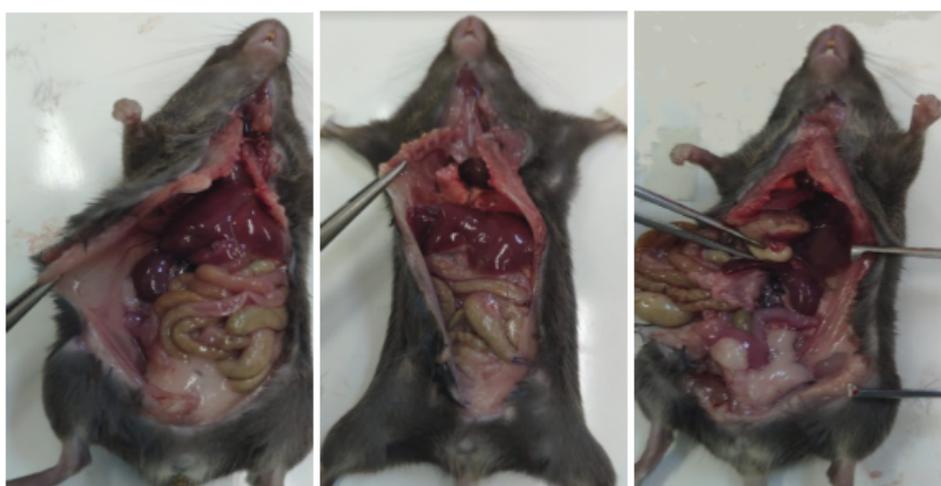


Figura 9: Análise da anatomia macroscópica

Determinação do ciclo estral, eutanásia e coleta do útero

Finalizadas as análises do experimento 1, as matrizes foram eutanasiadas após 3 semanas do nascimento dos filhotes (tempo para desmame), com a administração, por via intraperitoneal de sobredosagem de Ketamina (300 mg/ kg) + Xilazina (30 mg/ kg); após alguns minutos, confirmou-se a perda de consciência e morte. Foi realizada, então, histerectomia de tais animais e separação dos dois cornos (um corno para fixação em paraformaldeído 4% por 24 horas e após estocado em álcool 70% e outro corno para congelamento a - 80°C após três dias conservado em temperatura de 2°C em solução RNAlater.

A eutanásia da prole se deu após os animais completarem 6 semanas de vida, findadas as análises, seguindo o mesmo protocolo de sobredose anestésica.

No experimento 2, após 2 semanas da indução de endométrio fino e aplicação do tratamento (ou placebo), os animais foram submetidos a citologia vaginal para determinar a fase do ciclo estral e sacrificados em diestro, também pelo mesmo protocolo de eutanásia descrito acima. Para isso, foi obtido um lavado vaginal por instilação direta de soro fisiológico 0,9% com pipeta; em seguida, foi realizado um esfregaço com as células coletadas em uma lâmina coberta com lamínula e examinada com microscópio óptico. Imediatamente após a eutanásia foi realizada histerectomia com conservação dos cornos conforme realizado no experimento 1.

Todos os procedimentos descritos acima foram realizados pela autora e nenhuma suplementação hormonal ou antibiótica foi administrada antes ou após cada etapa.

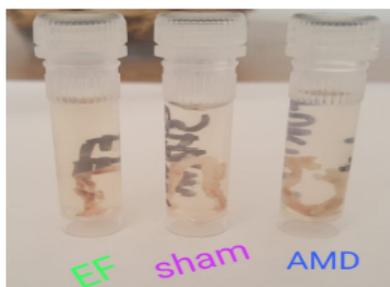


Figura 10: Coleta das amostras pós histerectomia

Avaliação dos marcadores de receptividade endometrial

No experimento 2, a expressão endometrial dos receptores de progesterona e $\alpha\beta3$ integrina foram avaliados comparativamente entre os subgrupos por imunohistoquímica. Os cortes de tecido foram desparafinizadas por 3 passagens em xileno por 10 minutos cada e reidratação com álcool graduado, seguido pelo tratamento com cloreto de amônio (pH 8) contra a auto-fluorescência por 10 minutos e lavado em água corrente por 5 min, em seguida o material foi fervido em um buffer de citrato de sódio a 95°C por 15 min em um vaporizador para o recrutamento de antígenos e bloqueado por um 10% de soro equino por 1 hora para antígenos inespecíficos. Os cortes longitudinais de 5 micrômetros com 4 amostras em cada de tecido uterino já bloqueados foram incubados overnight a 4°C, com os anticorpos primários de coelho para identificar as moléculas de adesão no endométrio, como biomarcadores de receptividade endometrial. Após, os cortes de tecido receberam o anticorpo secundário de cabra anti-coelho por 1 hora em temperatura ambiente. Os cortes foram lavados em PBS e montados em lâmina coberta com Vectashield HardSet Mounting Medium com DAPI (Vector Laboratories®). Tecido placentário foi usado como controle positivo e imunorreação com amplificação sem o anticorpo primário foi utilizada como controle negativo.

Todas as lâminas examinadas foram lidas com auxílio de um microscópio confocal (LSM710; Zeiss) utilizando-se o Software ZEN (Carl Zeiss) e dez campos de cada lâmina foram contados. A marcação dos componentes do endométrio foi avaliada por porcentagem de células epiteliais luminiais e glandulares marcadas (0-100%). Os anticorpos primários utilizados foram o Integrin Alpha V + Beta 3 Polyclonal Antibody (Bioss, BS-1310R) e o Progesterone Receptor Polyclonal Antibody (Bioss, BS-23376R) na diluição de 1:400, conforme orientações e especificações do fabricante; já o anticorpo secundário utilizado foi o Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP (Invitrogen, 31460) na diluição de 1:10000.

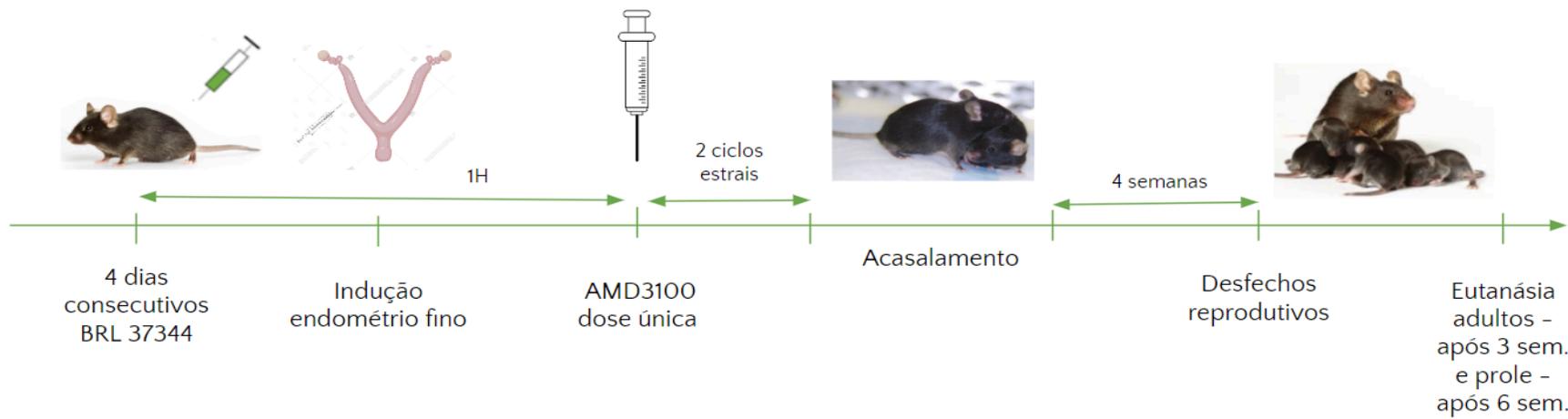


Figura 11: Resumo do experimento 1

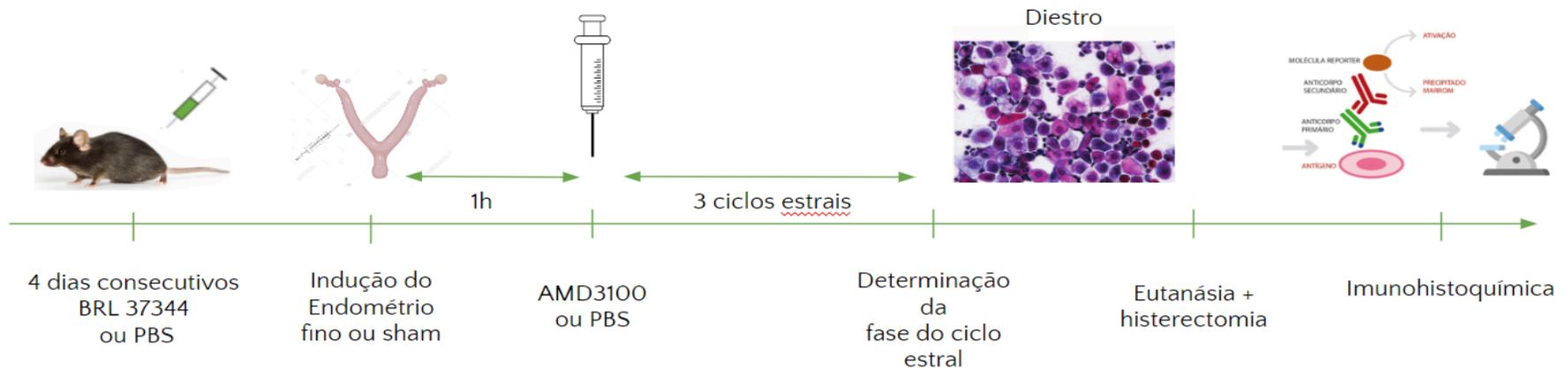


Figura 12: Resumo do experimento 2

Cálculo amostral

Trata-se de estudo exploratório e, uma vez que não há dados na literatura que embase um cálculo específico de “N” amostral e considerando as diretrizes do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) e os princípios de Russell-Burch (1959) - que orientam o uso do menor número possível de animais para atingir os objetivos do estudo - definimos um número inicial de oito animais por subgrupo no experimento 1 e 6 por subgrupo no experimento 2. Foi considerado como clinicamente relevante uma diferença com poder do teste de 90% e nível de significância de 5%.

Análise estatística

Os dados disponíveis para análise são provenientes do experimento 1. Para comparar os grupos em relação às variáveis qualitativas foi aplicado o teste qui quadrado. Este teste foi implementado no programa SAS versão 9.4. O teste não paramétrico de Kruskal Wallis seguido do pós teste de Dunn foi aplicado para comparar as variáveis quantitativas em relação aos grupos de estudo. Este teste foi implementado no programa R versão 3.6.1. Os dados numéricos foram apresentados na forma de média \pm desvio padrão ou mediana e variação, de acordo com a distribuição. Foi considerado nível de significância de $p < 5\%$.

Aspectos éticos

Este projeto foi submetido à comissão de Pesquisa do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia e, após sua aprovação, ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, recebendo autorização para sua realização (protocolo CEUA 79/2020).

Resultados

Em relação às taxas de gravidez, 23 das 24 camundongas sham engravidaram (apesar do grupo de tratamento), como esperado, com base na literatura e em outros experimentos do grupo. Já o modelo de endométrio fino reproduziu os resultados da literatura, com menos de 30% de falha na indução de lesão endometrial, representada por uma taxa de gravidez de 25% (2/8) e tempo de concepção reduzido no grupo endométrio fino placebo em comparação com todos os grupos ($p < 0.05$).

O tratamento AMD 3100 + $\beta 3$ agonista restaurou completamente a função endometrial, promovendo taxas de gravidez semelhantes a todos os grupos sham ($p > 0.05$). Não houve diferença entre o grupo de tratamento com AMD 3100 isolado e o placebo ($p > 0.05$) em termos de gravidez, embora uma diferença clinicamente relevante entre os grupos endométrio fino placebo e endométrio fino AMD3100 tenha sido encontrada (25% versus 62,5%, respectivamente).

Também não houve diferença entre o grupo de tratamento com AMD3100 isolado e os grupos sham ($p > 0.05$) ou em relação ao grupo AMD3100 + $\beta 3$ agonista endométrio fino (62,5% versus 87,5%, respectivamente - $p > 0.05$). Consideramos, portanto, que o AMD3100 usado isoladamente promove melhora nos resultados de gestação, porém de forma menos eficiente do que esta mesma droga associada ao $\beta 3$ agonista (Gráfico 1).

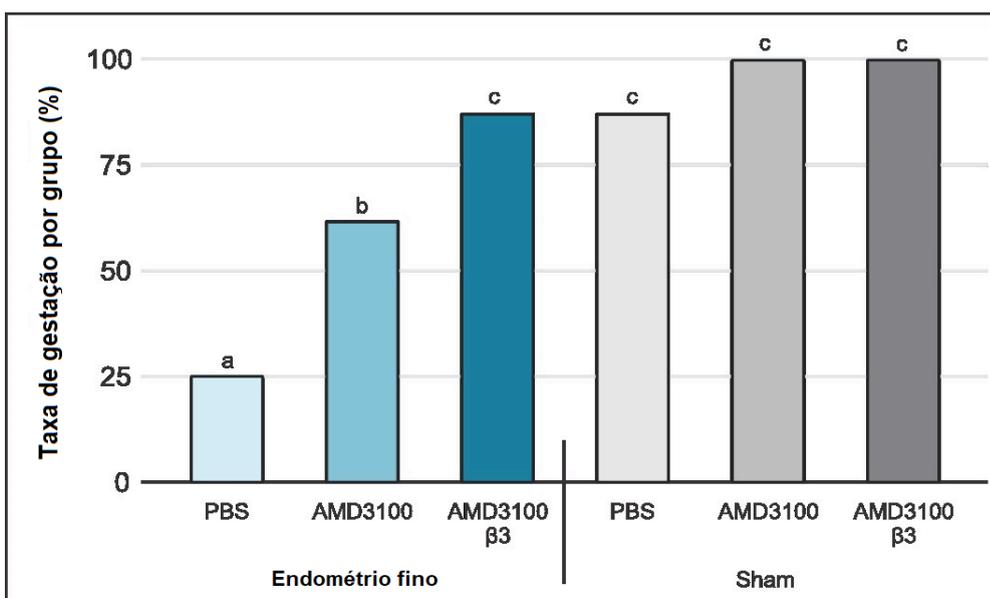


Gráfico 1: Taxa de gestação por grupo

($a \neq c$, $p < 0.05$)

O tempo para concepção foi menor no grupo endométrio fino em relação a todos os demais grupos, uma vez que nos dois casos de gestação neste grupo houve provavelmente falha de indução do modelo, tendo a concepção ocorrido já no primeiro dia de acasalamento. Vale ressaltar aqui que, o tempo para concepção foi calculado com base na data do nascimento menos 21 dias, que é o tempo de duração da gestação no camundongo. Não houve diferença no tempo para concepção entre os grupos endométrio fino tratados e os grupos sham. Entretanto, houve um maior tempo para concepção entre o grupo endométrio controle (sham) que recebeu AMD3100 isolado e os grupos sham sem tratamento ($p=0.03$) e sham tratado com AMD3100 + $\beta 3$ agonista ($p=0.03$) (Gráfico 2).

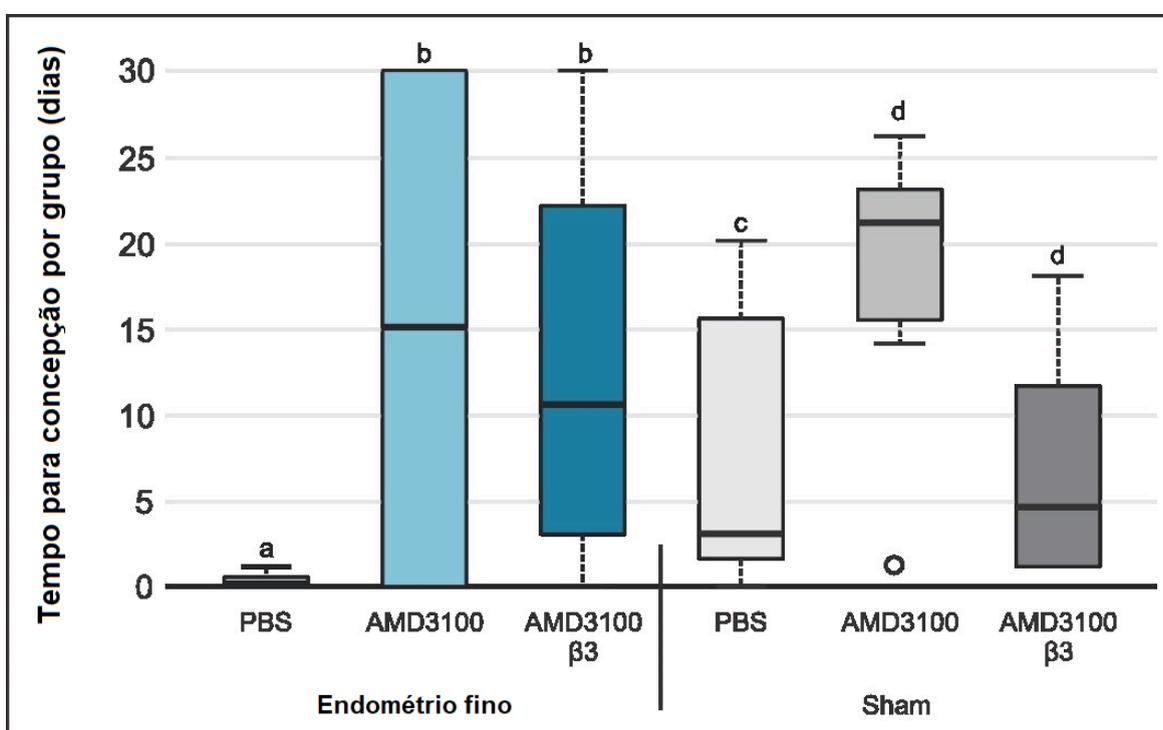


Gráfico 2: Tempo para concepção nos diferentes grupos de estudo ($a \neq b$ e $c \neq d$, $p < 0.05$).

Já em relação ao número de nascidos vivos, o grupo EF não tratado foi igual ao grupo EF tratado apenas com AMD3100, sendo ambos menores que todos os outros grupos (EF tratado com AMD3100 + $\beta 3$ agonista e os 3 grupos sham), com $p < 0.05$ em todas estas comparações. Na comparação entre o grupo EF tratado com AMD3100 + $\beta 3$ agonista e os grupos sham, apenas o sham tratado com AMD3100 + $\beta 3$ agonista apresentou maior número de nascidos vivos ($p=0.02$), inclusive este Sham teve ninhada maior que o sham sem tratamento ($p=0.006$) (Gráfico 3).

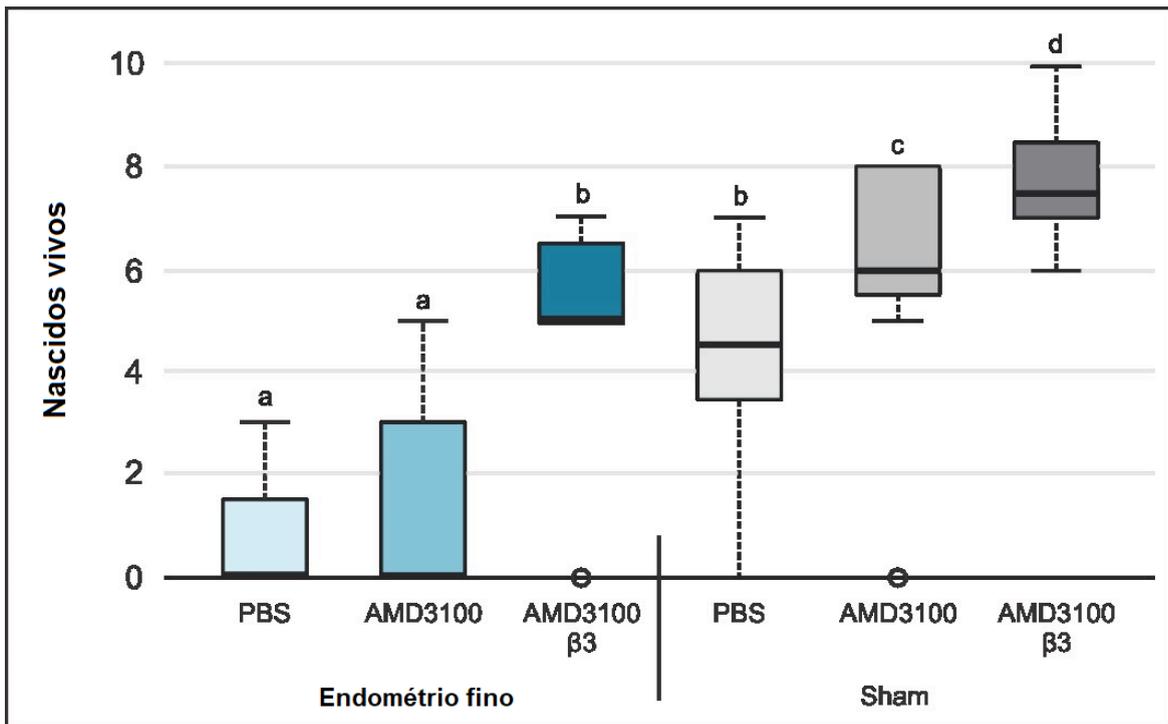


Gráfico 3: Nascidos vivos nos diferentes grupos de estudo (a≠b, a≠c, a≠d e b≠d, p<0.05).

Quanto aos óbitos até 6 semanas de vida, observamos apenas 3 no total (correspondendo a 6,25% dos filhotes) que ocorreram nos grupos EF+AMD3100 (total de 2, correspondendo a 25% dos filhotes deste grupo) e Sham+AMD3100 (total de 1, correspondendo a 12,5% dos filhotes deste grupo). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (p>0.05) (Tabela 2).

Em relação ao sexo dos filhotes, não houve diferença entre os grupos. Foi observada proporção praticamente igualitária entre filhotes machos e fêmeas (48,9% versus 51,1%, respectivamente), semelhante ao que consta para camundongos não submetidos a experimentação laboratorial (Tabela 3).

Óbitos	EF	EF + AMD3100	EF + AMD3100/ β 3	Sham	Sham + AMD3100	Sham + AMD3100/ β 3	Total
Sim	0	2	0	0	1	0	3
%	0	25	0	0	12.5	0	6.25
Não	8	6	8	8	7	8	45
%	100	75	100	100	87.5	100	93.75
Total	6	10	39	33	41	61	48

Tabela 2: Óbitos observados nos diferentes grupos de estudo ($p > 0.05$).

Sexo	EF	EF + AMD3100	EF + AMD3100/ β 3	Sham	Sham + AMD3100	Sham + AMD3100/ β 3	Total
Macho	3	7	21	11	16	35	93
%	50	70	53.85	33.33	39.02	57.38	48.94
Fêmea	3	3	18	22	25	26	97
%	50	30	46.15	66.67	60.98	42.62	51.05
Total	6	10	39	33	41	61	190

Tabela 3: Sexo dos filhotes observados nos diferentes grupos de estudo ($p > 0.05$).

Considerando o peso ao nascer dos filhotes, os provenientes dos grupos sham apresentaram peso em gramas inferior em relação aos dos grupos endométrio fino, não havendo relação com os tratamentos administrados (Gráfico 4).

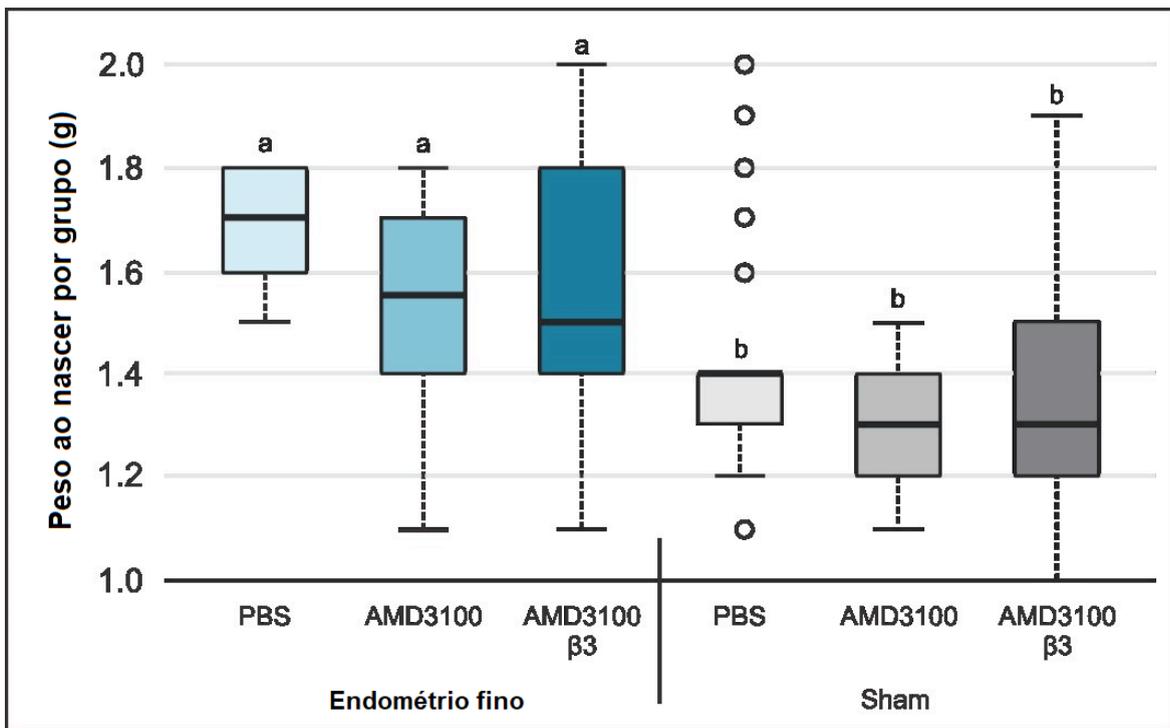


Gráfico 4: Peso ao nascer por grupo (média em g dos filhotes) ($a \neq b$, $p < 0.05$).

Quanto à evolução ponderal dos filhotes avaliadas às 3 semanas de vida, observamos padrão variável de peso entre os grupos, não sendo possível estabelecer um padrão ou associação com uso de alguma das drogas (Gráfico 5).

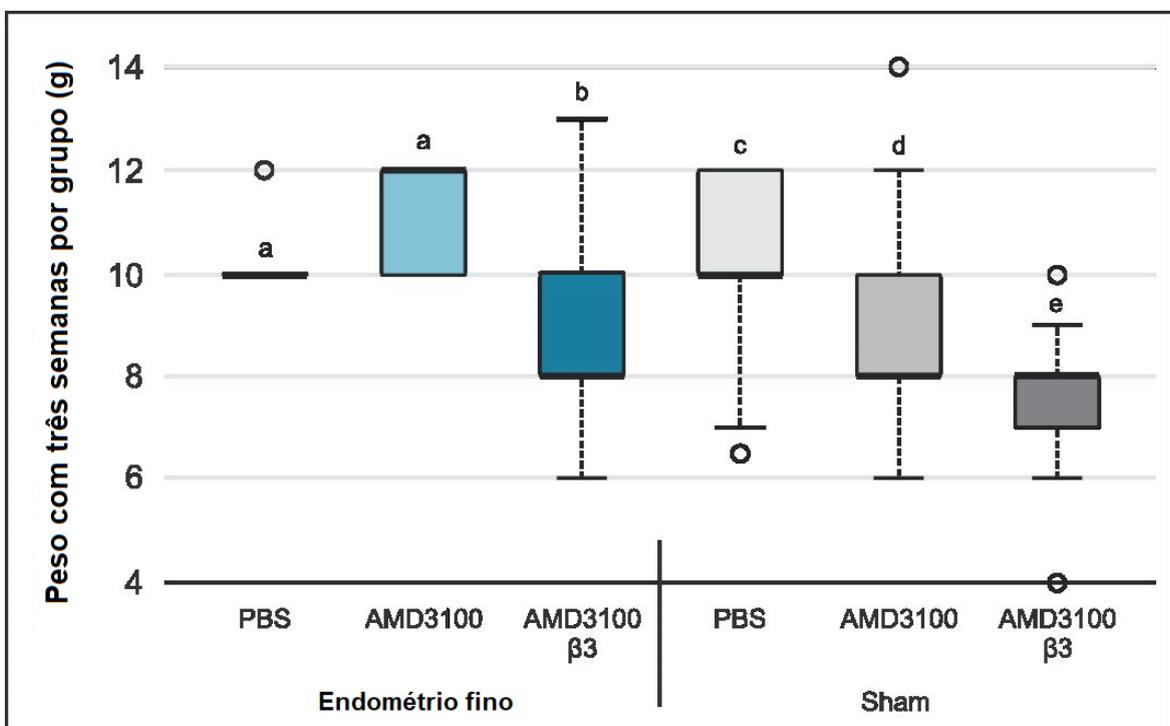


Gráfico 5: Peso com três semanas por grupo (média em g dos filhotes) ($c \neq d$, $a \neq d$, $a \neq e$, $b \neq c$, $b \neq e$ e $d \neq e$, $p < 0.05$).

Às 6 semanas de vida, os filhotes provenientes das matrizes dos grupos endométrio fino e do grupo sham-placebo apresentaram peso em grama semelhantes entre si ($p>0,05$) e superior em relação aos grupos Sham tratados (Gráfico 6).

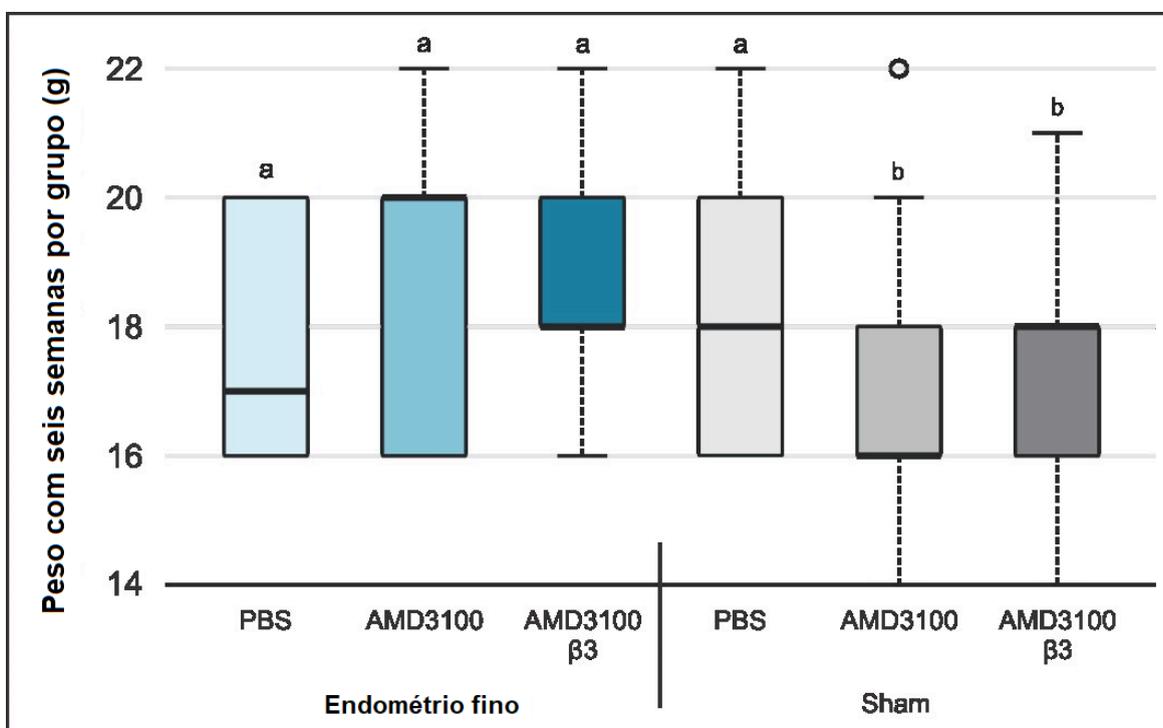


Gráfico 6: Peso com seis semanas por grupo (média em g dos filhotes) ($a \neq b$, $p < 0,05$).

Apesar das variações entre os grupos observadas quanto ao peso dos filhotes até atingirem a maturidade, o peso de todos os filhotes, independentemente do grupo de estudo, nas 3 avaliações realizadas (0, 3 e 6 semanas de vida) é considerado dentro do esperado para camundongos C57/Bl6. [58]

Ao avaliar o consumo de ração em gramas, observamos um maior consumo pelos filhotes provenientes das matrizes dos grupos endométrio fino tratados, tanto com AMD3100 isolado, quanto com AMD3100 + $\beta 3$ agonista e superior ao EF + Placebo. Já os filhotes dos grupos sham, apresentaram consumo igual, independentemente do tratamento recebido. Tais achados estavam presentes em filhotes de ambos os sexos dos grupos avaliados (Gráfico 7).

Já o consumo de água pelos filhotes dos diferentes grupos de estudos foi variável, não sendo possível estabelecer um padrão ou associação com uso de alguma das drogas e nem com a presença da doença (endométrio fino), sendo variável entre os grupos e similar entre machos e fêmeas (Gráfico 8).

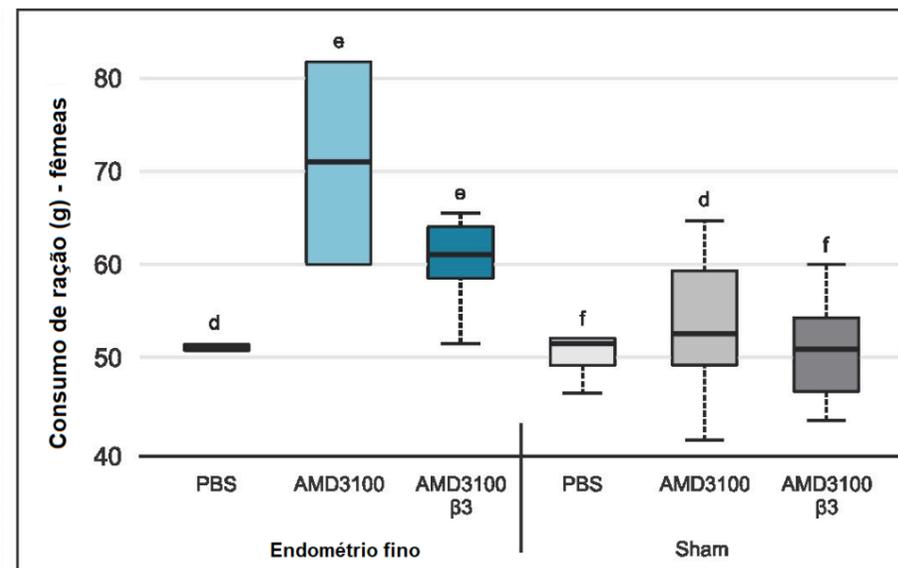
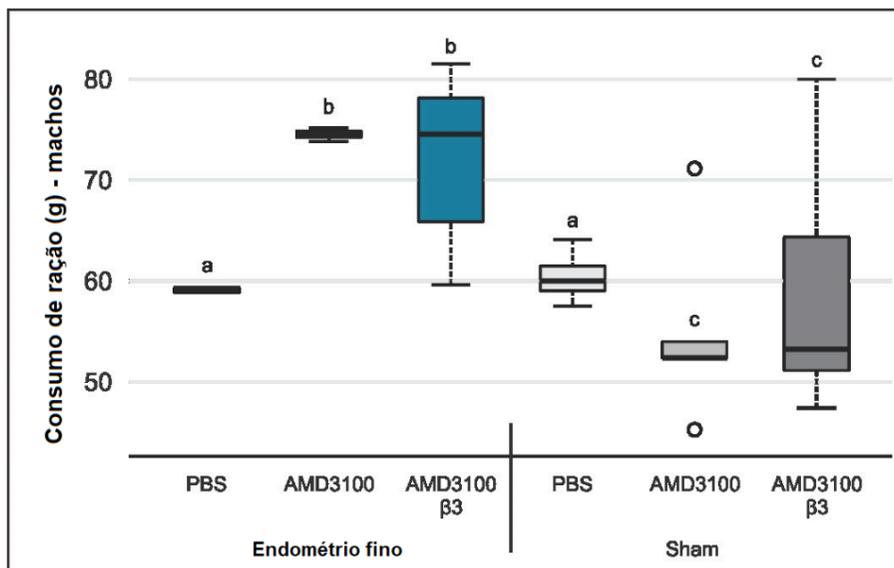


Gráfico 7: Consumo de ração por grupos (filhotes machos e fêmeas). ($b \neq c$ e $e \neq f$, $p < 0.05$).

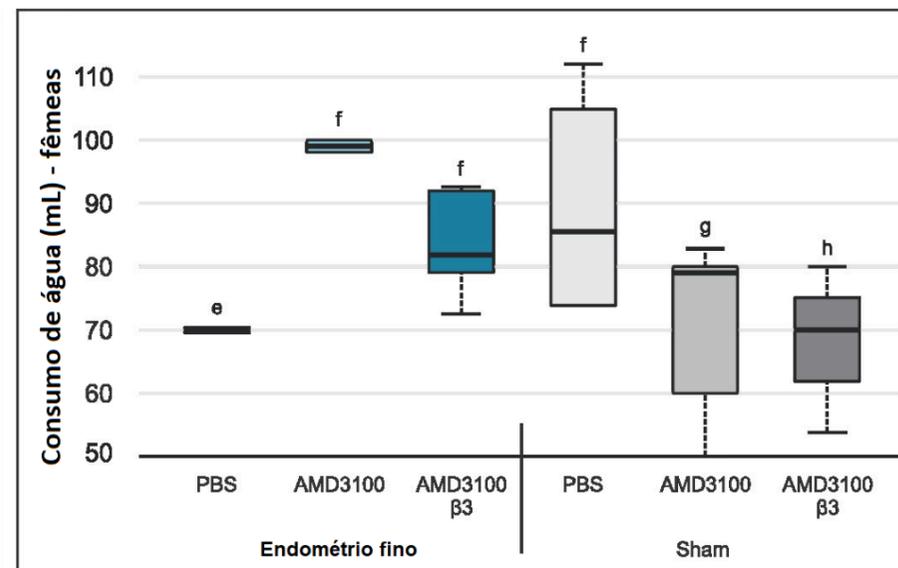
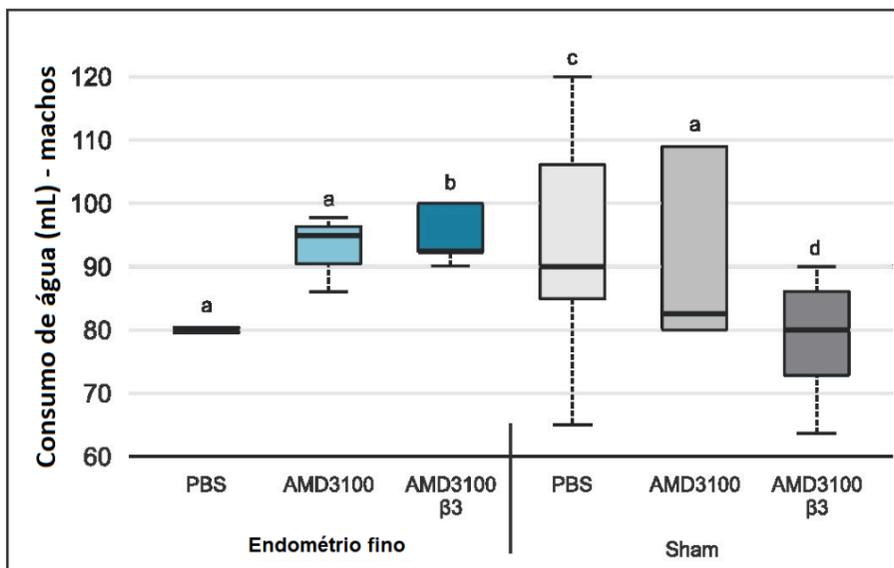


Gráfico 8: Consumo de água por grupos (filhotes machos e fêmeas). ($c \neq d$, $e \neq f$ e $g \neq h$, $p < 0.05$).

Em relação ao potencial teratogênico dos fármacos testados (AMD3100 e β agonista), não observamos malformações macroscópicas relevantes (internas e externas) nos grupos tratados e não houve diferença estatística entre os grupos. ($p > 0.05$). As raras alterações encontradas em 3 dos 190 animais (correspondendo a 1,58% dos filhotes) foram cauda curta, dentes proeminentes e dextrocardia, compatíveis com variações anatômicas. Tais alterações não tiveram relação com o tipo de tratamento administrado ou com a indução alcoólica de endométrio fino (Tabela 4).

Anatomia	EF	EF + AMD3100	EF + AMD3100/ β 3	Sham	Sham + AMD3100	Sham + AMD3100/ β 3	Total
Normal	5	10	38	33	41	60	187
%	83.33	100	97.44	100	100	98.36	98.42
Alterado	1	0	1	0	0	1	3
%	16.67	0	2.56	0	0	1.64	1.58
Total	6	10	39	33	41	61	190

Tabela 4: Achados anatômicos das proles nos diferentes grupos de estudo.

No experimento 2, foram avaliadas as expressões dos receptores de progesterona e $\alpha\beta$ 3 integrina nos úteros dos indivíduos dos diferentes grupos de tratamento de ambos os experimentos, obtendo amostras pré e pós gestacionais (Figura 13a).

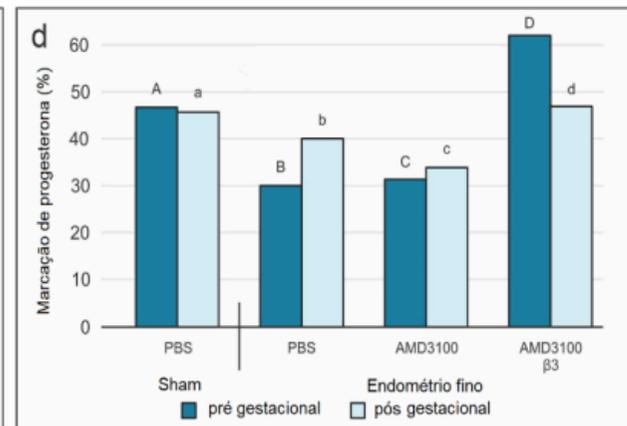
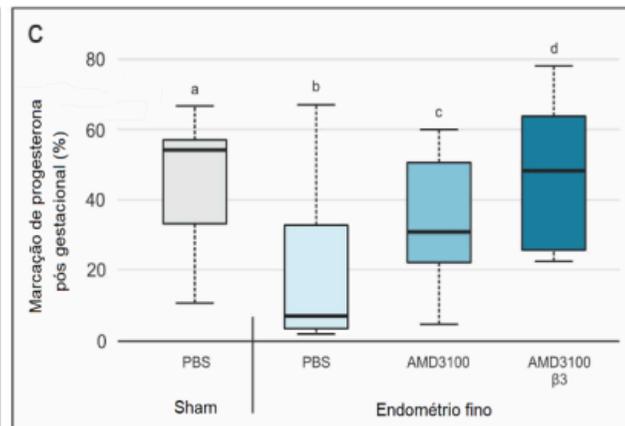
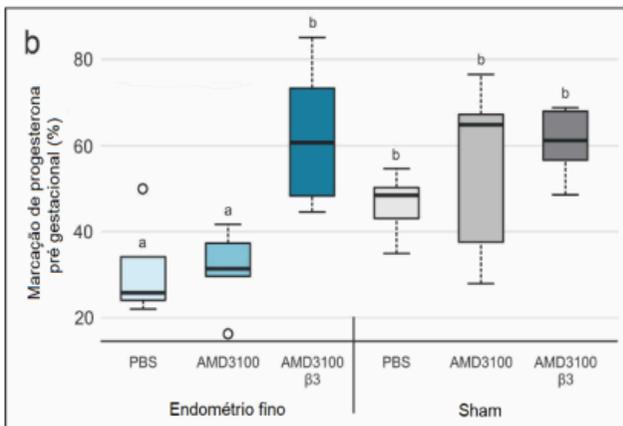
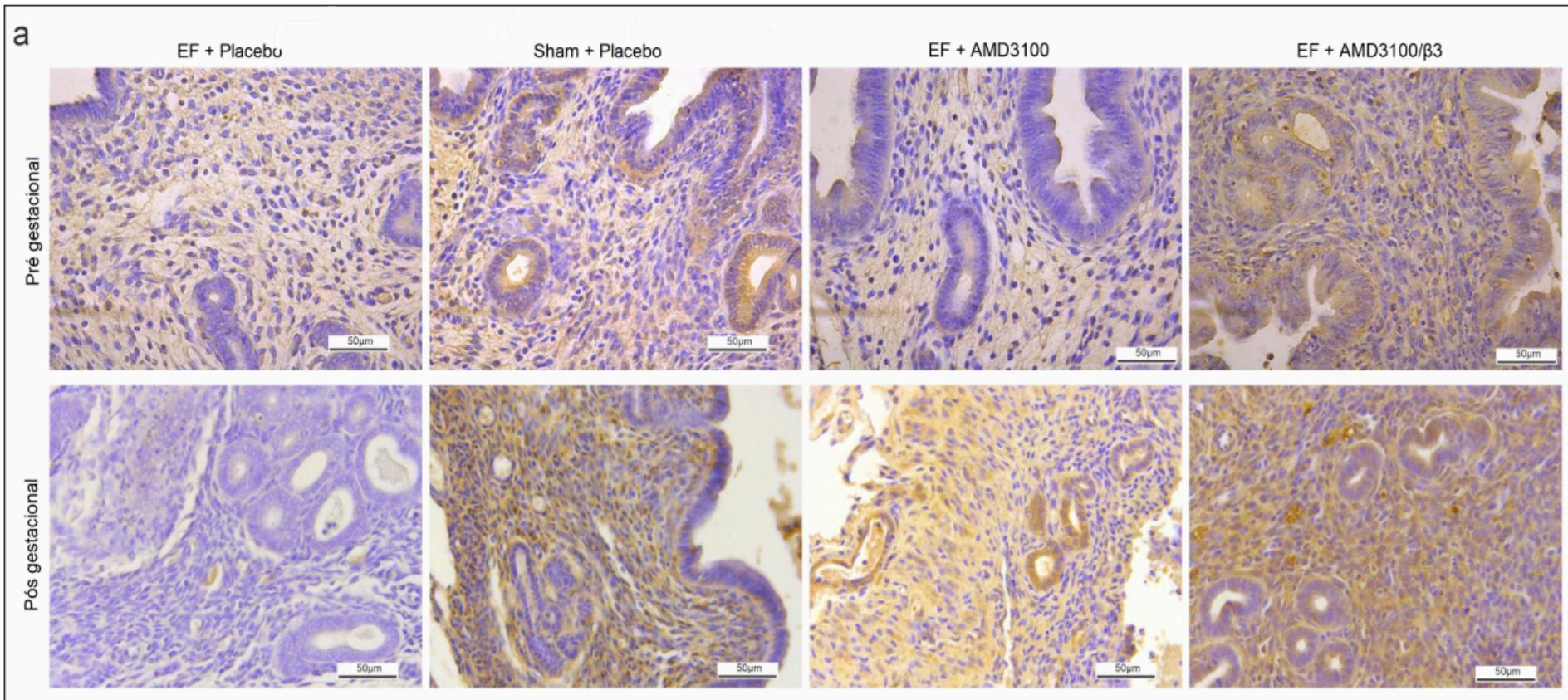


Figura 13: a: Comparação microscópica da marcação do receptor de progesterona nos grupos endométrio fino e sham pré e pós gestacional de acordo com o tratamento; **b:** Marcação de progesterona pré gestacional (%), ($a \neq b$, $p < 0.05$); **c:** Marcação de progesterona pós gestacional (%), ($a \neq b$ e $b \neq d$, $p < 0.05$); **d:** Marcação de progesterona pré X pós gestacional (%), ($B \neq b$ e $D \neq d$, $p < 0.05$).

A análise imuno-histoquímica do útero pré-gestacional quanto à expressão de receptores de progesterona no endométrio mostrou redução no grupo EF+PL em relação aos grupos sham tratados ($p < 0.05$). O tratamento com AMD3100 associado ao $\beta 3$ agonista restaurou a expressão normal dos receptores de progesterona em comparação ao grupo EF+PL ($p > 0.05$), se igualando aos achados dos grupos sham. Já o grupo EF+AMD3100 isolado apresentou efeito intermediário não demonstrando porém diferença significativa em relação aos grupos EF+PL ou Sham ($p > 0.05$) e com menor expressão de tal receptor em relação aos grupos sham tratados e ao que recebeu o tratamento combinado (AMD3100+ $\beta 3$ agonista) (Figura 13b).

Não foi possível estabelecer correlação entre a marcação de $\alpha \beta 3$ integrina e os tratamentos recebidos. O grupo EF que recebeu tratamento combinado (AMD3100+ $\beta 3$ agonista) apresentou proporção de células marcadas para tal integrina inferior aos grupos EF e Sham que receberam PL e o grupo Sham+AMD3100. O grupo EF+AMD3100 também apresentou marcação inferior ao grupo Sham+AMD3100+ $\beta 3$ agonista. Os demais grupos não apresentaram diferença estatística significativa entre si (Gráfico 10).

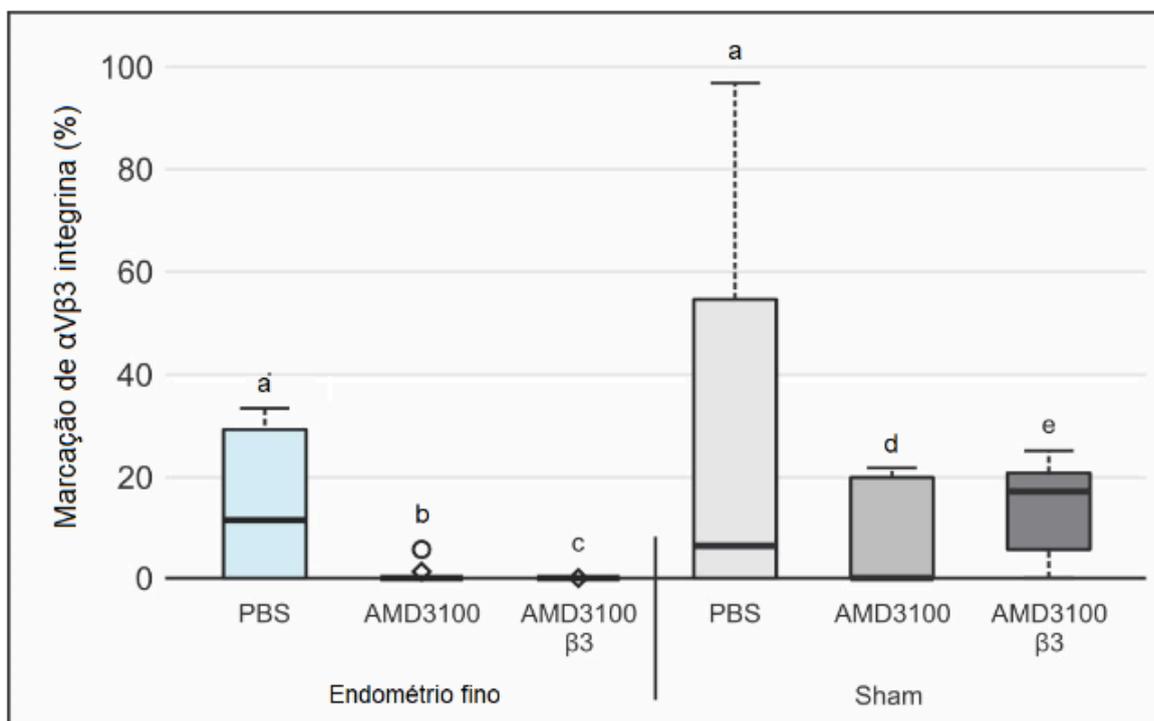


Gráfico 9: Marcação de $\alpha \beta 3$ integrina pré gestacional (em %).

($b \neq e$, $a \neq b$ e $c \neq e$, $p < 0.05$)

Foi também realizada análise imuno-histoquímica comparativa das amostras de tecido uterino obtidas no experimento 1 (produto de histerectomia pós gestação e parto) para avaliação da durabilidade do efeito regenerativo endometrial com os tratamentos. Tanto o grupo Sham, quanto o grupo EF tratado com AMD3100+ β 3 agonista apresentaram maior marcação dos receptores de progesterona em relação ao grupo EF sem tratamento ($p < 0.05$). A marcação do grupo com tratamento combinado (AMD3100+ β 3 agonista) foi semelhante à encontrada no grupo Sham e também sem diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo que recebeu tratamento isolado com AMD3100 ($p > 0.05$). O grupo EF+AMD3100, por sua vez, apresentou marcação estatisticamente equivalente tanto em relação ao grupo Sham, quanto ao grupo EF ($p > 0.05$) (Figura 13c).

Ao avaliar os receptores de progesterona dos úteros provenientes de histerectomia dos indivíduos antes (Experimento 2) e após a gestação (Experimento 1), observamos número ligeiramente inferior de marcação imunohistoquímica após gestação no grupo EF+AMD3100+ β 3 agonista - porém ainda semelhante ao padrão endometrial observado no grupo Sham+PL - e equivalência estatística pré e pós gestacional no grupo tratado com AMD3100 isolado ($p > 0.05$). O grupo Sham+PL não apresentou diferença de marcação ao pré versus pós gestacional ($p > 0.05$); por outro lado, o grupo EF+PL mostrou piora da expressão de receptores de progesterona endometrial ao longo do tempo ($p < 0.05$) (Figura 13d).

Discussão

Este estudo propôs um protocolo de tratamento para o endométrio fino, condição atualmente sem terapêutica efetiva na Reprodução Assistida e responsável por desfechos clínicos desfavoráveis ao impactar a implantação embrionária. O modelo experimental de endométrio fino utilizado reproduziu os achados da literatura [55], com taxa de sucesso superior a 70% na indução de dano endometrial que se manteve a longo prazo com piora gradativa da receptividade endometrial, fazendo paralelo à condição crônica que o endométrio fino representa na prática clínica.

O tratamento combinado com AMD3100 e $\beta 3$ agonista mostrou recuperação da função endometrial, ao equiparar os resultados clínicos reprodutivos do grupo que recebeu tal protocolo com o grupo controle. Houve ainda melhora de tais resultados nos grupos Sham que receberam o mesmo tratamento em relação ao placebo, mostrando um efeito benéfico de tais drogas no desempenho endometrial relacionado a implantação e desenvolvimento gestacional. Quanto ao desenvolvimento da prole, não houve alteração em relação ao ganho de peso, consumo de água e ração e anatomia dos animais provenientes das matrizes que receberam o protocolo de tratamento, demonstrando, pelo menos em nível macroscópico não existir impacto teratogênico nos filhotes até a vida adulta.

Na tentativa de explicar a melhora clínica reprodutiva de tal tratamento, análise imunohistoquímica da expressão dos receptores de progesterona e $\alpha\beta 3$ integrina (marcadores de receptividade endometrial) foram realizadas. Notamos aumento da expressão dos receptores de progesterona no grupo que recebeu o tratamento com AMD3100 e $\beta 3$ agonista, se igualando aos grupos Sham, corroborando nossos achados clínicos e comprovando a recuperação funcional endometrial com tal protocolo. Não foi possível estabelecer correlação estatística da marcação imunohistoquímica de $\alpha\beta 3$ integrina com os tratamentos recebidos, mostrando que, provavelmente, o mecanismo pelo qual a terapêutica proposta funciona não está relacionado às vias de tal marcador de receptividade endometrial.

No experimento conduzido para avaliar de forma comparativa a marcação imunohistoquímica de progesterona no endométrio pré e pós gestacional, constatamos que, apesar de uma pequena redução na expressão de tal marcador

de receptividade pós gestacional no grupo tratado com AMD3100 e β 3 agonista, ainda houve equivalência estatística com o grupo Sham, o qual não mostrou alteração da expressão de progesterona endometrial a longo prazo. Assim, os achados imunohistoquímicos mostram uma permanência a longo prazo do efeito endometrial de tal tratamento.

Há uma dificuldade em se estabelecer um tratamento seguro e custo-efetivo para o fator endometrial associado a infertilidade, sendo as estratégias disponíveis atualmente ainda sem benefício comprovado para a aplicação clínica rotineira. [27] A terapia com células tronco vem se mostrando promissora em diversas áreas da medicina, com sua capacidade regenerativa sítio-específica, inclusive na reprodução assistida, como opção terapêutica para o endométrio fino e a Síndrome de Asherman. [59]

As células tronco mesenquimais têm características biológicas específicas que possibilitam seus efeitos terapêuticos, sendo os principais: funções imunomodulatórias com inibição da atividade inflamatória, ausência de imunogenicidade, habilidade de diferenciação celular sítio específica ampla, capacidade migratória direcionada para o sítio de injúria através da corrente sanguínea e secreção de moléculas relacionadas a regeneração tecidual (VEGF, interleucinas, prostaglandinas, etc). [60] Porém, os altos custos envolvidos, a tecnologia e expertise necessárias para viabilizar seu uso e os procedimentos invasivos associados a sua aplicação, tornam difícil sua aplicação na prática.

Nesse contexto, surge a necessidade de encontrar estratégias que viabilizem a aplicabilidade clínica das células tronco, como aqueles no qual ocorre seleção e migração endógena de tais células ao sítio de interesse, proporcionando menores risco, custo e complexidade.

O protocolo medicamentoso utilizado neste estudo foi o mesmo aplicado em um trabalho que abordou a regeneração óssea de camundongos após fratura induzida cirurgicamente. Os animais foram divididos em 4 grupos de tratamento, sendo placebo, AMD3100 isolado, AMD3100 associado a fator estimulador de colônias granulocitárias e AMD3100 associado a β 3 agonista. Este último demonstrou remodelamento ósseo superior comprovado através de imagem de fluorescência infravermelha e tomografia computadorizada do sítio de injúria. A nível molecular, foi comprovado que tal protocolo de drogas combinado leva a seleção e migração específica de células tronco mesenquimais para a corrente sanguínea, guiada para o sítio de injúria, através de dois mecanismos principais:

1) agonista de receptor β_3 adrenérgico (β_3 agonista) estimula a produção de endocanabinoides e de N-aciletanolamidas localmente na medula óssea (comprovados como necessários para a seleção e mobilização específicas de MSC); e 2) AMD3100 (antagonista do receptor CXCR4) leva a geração de gradiente de CXCL12 no endotélio sinusoidal da medula óssea promovendo a migração de MSC que expressam CXCR4 para o sangue periférico. [49]

Em nosso estudo, encontramos resultados semelhantes, com melhora significativa dos desfechos reprodutivos ao uso do AMD3100 associado ao β_3 agonista, demonstrando a aplicabilidade de tal protocolo para a recuperação tecidual e funcional também do endométrio, além do tecido ósseo.

O endométrio é um tecido caracterizado pela sua alta plasticidade, visto sua capacidade modeladora e regenerativa observada ao longo de cada ciclo menstrual. Tal habilidade está relacionada a presença de células tronco progenitoras em sua membrana basal, que - associadas a diversos biomarcadores de receptividade, tais como citocinas, integrinas e hormônios - tornam o endométrio receptivo a implantação embrionária e promovem a nutrição e manutenção de um ambiente imunológico e estrutural adequados para o desenvolvimento da gravidez. Dessa forma, as células tronco desempenham importante papel no processo de implantação embrionária e manutenção da gestação, embasando os achados de que sua maior disponibilidade endometrial poderia melhorar o endométrio a nível estrutural, impactando positivamente nos desfechos reprodutivos. [61, 62]

Quanto à progesterona, sabe-se que esta exerce importante papel para garantir um endométrio receptivo na janela de implantação embrionária; a progesterona, que desempenha seus efeitos através de seus receptores no epitélio endometrial, está diretamente relacionada também a manutenção da gestação, sendo que estudos já mostraram que sua deficiência está diretamente implicada tanto em falha da implantação, quanto em abortamento. [63] A progesterona, produzida pelo corpo lúteo, atua no endométrio de diferentes formas para garantir o desenvolvimento embrionário adequado, sendo suas principais funções já estudadas: promover a proliferação e diferenciação do estroma endometrial e células epiteliais, promover a modulação bioquímica de fatores relacionados à implantação (citocinas, integrinas, fatores de crescimento), regular a produção de prostaglandinas, regular a expressão de moléculas de adesão e integrinas. [64] Assim, fica claro o papel essencial da progesterona

como um dos principais moduladores estruturais e funcionais do endométrio, estando diretamente relacionada ao sucesso reprodutivo.

Postulamos que os efeitos benéficos observados na regeneração endometrial com repercussão clínica favorável promovida pelo uso do tratamento AMD3100 combinado ao $\beta 3$ agonista foi mediado por dois possíveis mecanismos. O primeiro envolveria a ação direta das células tronco que migraram ao endométrio, se diferenciando em células endometriais e reparando sua estrutura de forma a aumentar a expressão dos receptores de progesterona no tecido revitalizado e melhorar a receptividade endometrial de forma direta. Alternativamente, as células tronco podem ter induzido a recuperação endometrial através de seus efeitos imunomodulatórios e bioquímicos, podendo resultar no aumento da expressão dos receptores de progesterona e restaurar a funcionalidade endometrial de forma indireta. Tornam-se necessários outros estudos para explicar tal mecanismo de restauração endometrial do ponto de vista bioquímico e genético e estabelecer a relação com a ação das células tronco mesenquimais de forma precisa.

Independentemente do mecanismo implicado em tais efeitos, este estudo demonstrou efeito reprodutivo promissor do tratamento com AMD3100 associado ao $\beta 3$ agonista para o fator endometrial associado a infertilidade. Apesar de nosso estudo inicial abordar apenas casos de endométrio fino, tal terapia proposta poderia ser benéfica também nos casos de Síndrome de Asherman, falhas repetidas de implantação e endometriose, levando em conta os mecanismos postulados que estariam implicados na regeneração endometrial e os resultados apresentados.

Através de mecanismos endógenos, não demandando procedimentos invasivos, de custo elevado e que necessitam de centros especializados em terapia celular para sua execução - regeneração tecidual do endométrio foi alcançada com comprovação clínica de melhora nos desfechos reprodutivos em modelo animal. O tratamento ainda envolve protocolo simples e seguro de administração das drogas e sem efeitos teratogênicos observados com o regime de dose única pré gestacional. As drogas utilizadas também já tem aprovação de uso pela ANVISA em outras áreas da medicina, sendo o AMD3100 aprovado para uso em tratamentos hematológicos e o $\beta 3$ agonista (Mirabegron para uso humano) para tratamentos relacionados à incontinência urinária. Além disso, nossos achados sugerem que apenas um ciclo de tratamento seja suficiente para

a recuperação endometrial, inclusive em longo prazo. Mesmo com o preço médio do frasco de AMD3100 a cerca de R\$26.000,00 (consulta em Abril/2024), por tratar-se de um tratamento não invasivo, ambulatorial e com potencial de ciclo único garantindo bons resultados a longo prazo, nosso protocolo ainda seria interessante e viável no contexto de pacientes submetidas a tratamento de Reprodução Assistida; o custo e complexidade de tal protocolo ainda seria significativamente menor que os tratamentos tradicionais com células tronco e outros recentemente aplicados ainda sem evidências científicas robustas sobre o sucesso clínico/terapêutico [27].

Para a aplicação em humanos, após estudo piloto, o protocolo de tratamento idealizado às pacientes se iniciaria no primeiro dia do ciclo menstrual. Primeiramente, seria prescrito o uso por 4 dias consecutivos de Mirabegron ($\beta 3$ agonista de uso humano), 1 comprimido de 50mg, via oral, 1 vez ao dia. Ao quarto dia do ciclo, seria programada uma injúria aguda ao endométrio em contexto ambulatorial, como um “*endometrial scratching*”, com o uso de cânula de Pipelle ou cureta, sem necessidade de anestesia, para direcionar a migração das células tronco ao sítio desejado antes da administração do AMD3100. Obviamente seria necessário o ajuste de dose para o uso em humanos, mas considerando que tal droga já é utilizada em humanos com dose definida pelo peso da paciente, inicialmente esta seria a dose sugerida, mantendo o protocolo de aplicação única após injúria local. No dia seguinte, ao quinto dia do ciclo menstrual, o preparo endometrial padrão poderia ser iniciado. A princípio, não haveria recomendação de uma modalidade de preparo específica, podendo ser realizado preparo artificial ou natural a depender do caso de cada paciente. Porém, tratando-se de um estudo piloto, levando em conta que o preparo artificial com uso de estrogênio exógeno pode ser utilizado na maior parte dos casos e tem menor variação e melhor previsibilidade quanto ao acompanhamento e desfecho, este seria preferível num primeiro momento. Monitorização endometrial seria realizada da forma convencional, utilizando a ultrassonografia transvaginal, sendo o endométrio de aspecto trilaminar e com espessura maior ou igual a 7mm, considerado apto a prosseguir para a transferência após uso da progesterona.

Desta forma, poderíamos propor uma nova estratégia terapêutica para o tratamento do endométrio fino, condição atualmente sem tratamento efetivo e aplicável na reprodução assistida. Com enfoque inicialmente na recuperação da funcionalidade endometrial, considerando os possíveis mecanismos envolvidos

na regeneração tecidual, novos estudos podem também abordar tal protocolo medicamentoso em outros fatores desafiadores de infertilidade, como a falha de implantação e baixa reserva ovariana. Novos estudos também são necessários para esclarecer, do ponto de vista bioquímico e genético, as vias envolvidas no processo de regeneração induzido pelas drogas aqui utilizadas. Pelo fato de usar drogas já liberadas para uso humano, com aplicação simples e ambulatorial, o uso translacional em curto a médio prazo torna-se promissor.

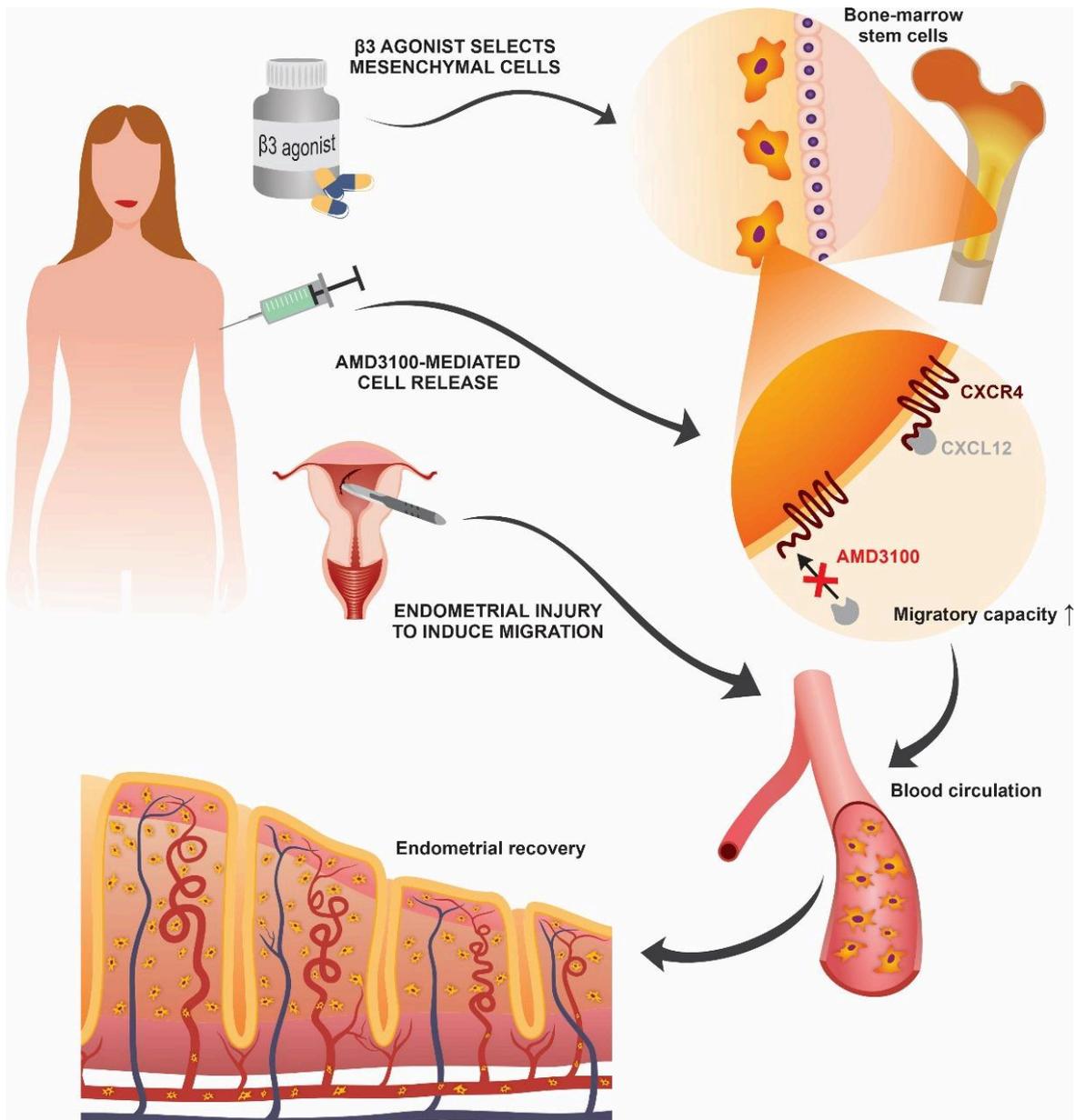


Figura 14: Proposta de uso translacional

Conclusão

O modelo experimental de endométrio fino utilizado em nosso estudo foi eficiente e compatível com a literatura, com taxa de sucesso superior a 70% na indução de injúria endometrial.

Nossos achados indicam uma potencial opção terapêutica para infertilidade relacionada ao endométrio fino. O tratamento combinado com AMD3100 e agonista do receptor β_3 adrenérgico resultou em melhora expressiva nos resultados clínicos reprodutivos, indicando recuperação da funcionalidade endometrial, com melhora relevante na expressão dos receptores de progesterona do endométrio. Análise imuno-histoquímica comparativa a longo prazo mostrou efeito prolongado de tal combinação terapêutica na recuperação do endométrio. Também não houve prejuízo para o desenvolvimento e anatomia da prole.

O tratamento proposto utiliza duas classes de medicamentos aprovados clinicamente pela ANVISA e FDA para uso humano em outras áreas da Medicina, o que pode reduzir o cronograma e o custo das aplicações terapêuticas translacionais no futuro.

Referências

1. Lebovitz O, Orvieto R. Treating patients with “thin” endometrium – an ongoing challenge. *Gynecological Endocrinology* 2014; 30(6): 409–14.
2. Evans J et al. Fertile ground: human endometrial programming and lessons in health and disease. *Nat Rev Endocrinol* 2016; 12(11): 654-67.
3. Gargett CE, Nguyen HP, Ye L. Endometrial regeneration and endometrial stem/progenitor cells. *Rev Endocr Metab Disord* 2012; 13(4): 235-51.
4. Atwood, CS, Vadakkadath Meethal S. The spatiotemporal hormonal orchestration of human folliculogenesis, early embryogenesis and blastocyst implantation. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2016; 430: 33–48.
5. Altmäe S, Aghajanova, L. Growth Hormone and Endometrial Receptivity. *Frontiers in Endocrinology* 2019; 10: 1-11.
6. Gao G, Cui X, Li S, Ding P, Zhang S, Zhang Y. Endometrial thickness with in-vitro fertilization: a meta-analysis. *Reproductive BioMedicine Online* 2020; 40(1): 124-33.
7. Liu KE, Hartman M, Hartman a. Management of thin endometrium in assisted reproduction: a clinical practice guideline from the Canadian Fertility and Andrology Society). *Reproductive BioMedicine Online* 2019; 39(1): 49-62.
8. Bazer FW, Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC, Wu G. Comparative aspects of implantation. *Reproduction* 2009;138(2): 195-209.
9. Casper RF, Yanushpolsky EH. Optimal endometrial preparation for frozen embryo transfer cycles: window of implantation and progesterone support. *Fertil Steril* 2016; 105(4): 867-72.
10. Fraser R, Smith R, Lin C-J. A 3D endometrial organotypic model simulating the acute inflammatory decidualization initiation phase with epithelial induction of the key endometrial receptivity marker, integrin α v β 3. *Human Reproduction* 2021; 2021(4): 1-13.

11. Zhang S et al. Physiological and molecular determinants of embryo implantation. *Mol Aspects Med* 2013; 34(5): 939–80.
12. Fox C, Morin S, Jeong JW, Scott RT Jr, Lessey BA. Local and systemic factors and implantation: what is the evidence? *Fertil Steril* 2016; 105(4): 873-84.
13. Gargett CE, Schwab KE, Deane JA. Endometrial stem/progenitor cells: the first 10 years. *Hum Reprod Update* 2016; 22(2): 137-63.
14. Fanchin R et al. Assessing Uterine Receptivity in 2001. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006; 943(1), 185–202.
15. Wang L, Qiao J, Li R, Zhen X, Liu Z. Role of endometrial blood flow assessment with color Doppler energy in predicting pregnancy outcome of IVF-ET cycles. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2010; 8(1): 1-7.
16. Liu KE, Hartman M, Hartman A, Luo Z-C, Mahutte N. The impact of a thin endometrial lining on fresh and frozen–thaw IVF outcomes: an analysis of over 40 000 embryo transfers. *Human Reproduction* 2018; 33(10): 1883–8.
17. Gao M, Cao C, Zhang X, Tang F, Zhao L, Luo S, Li L. Abnormal expression of estrogen receptor is associated with thin endometrium. *Gynecol Endocrinol* 2019; 35(6): 544-7.
18. Yang HW, Hwang KJ, Kwon HC, et al. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Hum Reprod* 1998; 13: 998–1002.
19. Catt JW, Henman M. Toxic effects of oxygen on human embryo development. *Hum Reprod* 2000;15:199–206.
20. Maekawa R et al. Thin endometrium transcriptome analysis reveals a potential mechanism of implantation failure. *Reproductive Medicine and Biology* 2017; 16(2): 206–27.
21. Weckstein LN, Jacobson A, Galen D, Hampton K, Hammel J. Low-dose aspirin for oocyte donation recipients with a thin endometrium: prospective, randomized study. *Fertil Steril* 1997; 68: 927–30.

22. Chen MJ, Yang JH, Peng FH, Chen SU, Ho HN, Yang YS. Extended estrogen administration for women with thin endometrium in frozen-thawed in-vitro fertilization programs. *J Assist Reprod Genet* 2006; 23: 337–42.
23. Sher G, Fisch JD. Effect of vaginal sildenafil on the outcome of in vitro fertilization (IVF) after multiple IVF failures attributed to poor endometrial development. *Fertil Steril* 2002; 78:1073–6.
24. Ledee-Bataille N, Olivennes F, Lefaix JL, Chaouat G, Frydman R, Delanian S. Combined treatment by pentoxifylline and tocopherol for recipient women with a thin endometrium enrolled in an oocyte donation programme. *Hum Reprod* 2002; 17: 1249–53.
25. Qublan H, Amarin Z, Al-Qudah M, Diab F, Nawasreh M, Malkawi S et al. Luteal phase support with GnRH-a improves implantation and pregnancy rates in IVF cycles with endometrium of ≤ 7 mm on day of egg retrieval. *Hum Fertil* 2008; 11: 43–7.
26. Tesarik J, Hazout A, Mendoza C. Luteinizing hormone affects uterine receptivity independently of ovarian function. *Reprod Biomed Online* 2003; 7: 59–64.
27. Garcia-Velasco JA et al. Strategies to manage refractory endometrium: state of the art in 2016. *Reproductive BioMedicine Online* 2016; 32: 474–89.
28. Gir P, Oni G, Brown SA, Mojallal A, Rohrich RJ. Human adipose stem cells: current clinical applications. *Plast Reconstr Surg* 2012; 129:1277–90.
29. Zhao J, Zhang Q, Wang Y, Li Y. Uterine infusion with bone marrow mesenchymal stem cells improves endometrium thickness in a rat model of thin endometrium. *Reprod Sci* 2015; (2): 181-8.
30. Du J, Lu H, Yu X, Lü Z, Mi L, Zhang X. Efficacy and safety of platelet-rich plasma for the treatment of thin endometrium: A protocol for systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 2020; 99(3): e18848.
31. Gleicher N, Kim A, Michaeli T, Lee HJ, Shohat-Tal A, Lazzaroni E, Barad DH. A pilot cohort study of granulocyte colony-stimulating factor in the treatment of

unresponsive thin endometrium resistant to standard therapies. *Hum Reprod* 2013; 1: 172-7.

32. Jing Z, Qiong Z, Yonggang W, Yanping L. Rat bone marrow mesenchymal stem cells improve regeneration of thin endometrium in rat. *Fertil Steril* 2014; 101(2): 587-94.

33. Gargett CE, Ye L. Endometrial reconstruction from stem cells. *Fertility and Sterility* 2012; 98(1): 11-20.

34. Yi KW et al. Bone marrow-derived cells or C-X-C motif chemokine 12 (CXCL12) treatment improve thin endometrium in a mouse model. *Biology of Reproduction* 2019, 100(1): 61–70.

35. Keyhanvar N et al. Cell-based endometrial regeneration: current status and future perspectives. *Cell and Tissue Research* 2021; 384:241–254.

36. Tersoglio AE et al. Regenerative therapy by endometrial mesenchymal stem cells in thin endometrium with repeated implantation failure. A novel strategy. *JBRA Assisted Reproduction* 2020;24(2):118-127.

37. Alawadh F, Du H, Cakmak H, Taylor HS. Bone Marrow-Derived Stem Cell (BMDSC) Transplantation Improves Fertility in a Murine Model of Asherman's Syndrome. *PLoS ONE* 2014; 9(5): e96662.

38. Hong H, Son Y. Substance-p-mobilized mesenchymal stem cells accelerate skin wound healing. *Tissue Eng Regen Med* 2014; 11: 483–91.

39. Agnieszka A, Gronthos S. Clinical Application of Bone Marrow Mesenchymal Stem/Stromal Cells to Repair Skeletal Tissue. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(9759): 1-28.

40. Lin X, Wang H, Xiaolan L. Mobilization of endothelial progenitor cells promotes angiogenesis after full thickness excision by AMD3100 combined with G-CSF in diabetic mice by SDF-1/CXCR4 axis. *Diabetes & Vascular Disease Research* 2021: 1–10.

41. Meeson R, Sanghani-Keri A, Coathup M, Blunn G. VEGF with AMD3100 endogenously mobilizes mesenchymal stem cells and improves fracture healing. *J Orthop Res* 2018; 37: 1294–302.

42. Trounson A, McDonald C. Stem cell therapies in clinical trials: progress and challenges. *Cell Stem Cell* 2015; 17: 11–22.

43. Pitchford SC, Furze RC, Jones CP, Wengner AM, Rankin SM. Differential Mobilization of Subsets of Progenitor Cells from the Bone Marrow. *Cell Stem Cell* 2009; 4: 62–72.
44. Kortesisidis A, Zannettino A, Isenmann S, Shi S, Lapidot T, Gronthos S. Stromal-derived factor-1 promotes the growth, survival, and development of human bone marrow stromal stem cells. *Blood* 2005; 105(10): 3793-801.
45. Sahin Ersoy G, Zolbin MM, Cosar E, Moridi I, Mamillapalli R, Taylor HS. CXCL12 Promotes Stem Cell Recruitment and Uterine Repair after Injury in Asherman's Syndrome. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2017; 4: 169-77.
46. Rosa-e-Silva ACJS, Rosa-e-Silva JC, Mamillapalli R and Taylor HS. Uterine administration of CXCL12 (SDF-1) increases pregnancy rates in mice with induced endometriosis. Unpublished data.
47. De Clercq E. The AMD3100 story: the path to the discovery of a stem cell mobilizer (Mozobil). *Biochem Pharmacol* 2009; 77: 1655–64.
48. Meeson R, Sanghani-Keri A, Coathup M, Blunn G. VEGF With AMD3100 Endogenously Mobilizes Mesenchymal Stem Cells and Improves Fracture Healing. *J Orthop Res* 2019; 37: 1294–302.
49. Fellous TG et al. Pharmacological tools to mobilize mesenchymal stromal cells into the blood promote bone formation after surgery. *npj Regenerative Medicine* 2020; 5 (3): 1-11.
50. Hendrix CW. Pharmacokinetics and Safety of AMD-3100, a Novel Antagonist of the CXCR-4 Chemokine Receptor, in Human Volunteers. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2000; 44 (6): 1667– 73.
51. De Clercq E. MozobilVR (Plerixafor, AMD3100), 10 years after its approval by the US Food and Drug Administration. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 2019; 27: 1–8.
52. Food and Drug Administration. Pharmacology/toxicology review and evaluation: Mozobil (plerixafor) subcutaneous injection. Center for drug evaluation and research 2008. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2008/022311s000_PharmR.pdf> Acesso em: 21 abril 2020.

53. Deb K, Reese J, Paria BC. Methodologies to Study Implantation in Mice. *Methods Mol Med* 2006; 121: 9-34.
54. NEVES SMP et al. Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do biotério de produção e experimentação da FCF-IQ/USP. São Paulo: Ed. FCF-IQ/USP; 2013. 216 p.
55. Jing Z, Hong G, Yanping L. Development of an Animal Model for Thin Endometrium Using 95% Ethanol. *J Fert In Vitro* 2012; 2:109.
56. Barrow MV, Taylor WJ. A rapid method for detecting malformations in rat fetuses. *Journal of Morphology* 1969; 127: 291-306.
57. Wilson JG. Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animals. In: Wilson JG, Warkany J. *Teratology: principle and techniques*. Chicago: University Chicago Press; 1965. p.262-77.
58. Charles River Laboratories International. Research models: C57BL/6 Mice. In:<https://www.criver.com/sites/default/files/resources/C57BL6MouseModelInformationSheet.pdf> (2019).
59. Azizi R et al. Stem cell therapy in Asherman syndrome and thin endometrium: Stem cell-based therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2018; 102: 333-43.
60. Wang et al. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *Journal of Hematology & Oncology* 2012; 5:19.
61. Gellersen B, Brosens JJ. Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure. *Endocrine reviews* 2014; 35(6): 851-905.
62. Ojosnegros S et al. Embryo implantation in the laboratory: an update on current techniques. *Human Reproduction Update* 2021; 27(3): 501-30.
63. Devall AJ, Coosmarasamy A. Sporadic pregnancy loss and recurrent miscarriage. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2020; 69: 30-9.
64. Rosario G et al. Role of progesterone in structural and biochemical remodeling of endometrium. *Frontiers in Bioscience* 2003; 8(6): s924-35.



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



AUTORIZAÇÃO

A CEUA-FMRP autoriza a execução do projeto intitulado: ***“Impacto da administração subcutânea de AMD3100 isolado ou em associação a agonista de receptor b3 adrenérgico na regeneração endometrial, nos desfechos reprodutivos e na prole de modelo experimental murino de endométrio fino”***, registrado com o número do protocolo **079/2020**, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O Protocolo foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em reunião de 30 de novembro de 2020.

Colaboradores: Prof. Dr. Julio Cesar Rosa e Silva
Serena Rossato
Renato Luiz Guerino Cunha

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

Finalidade			() Ensino (X) Pesquisa Científica	
Vigência da autorização			30/11/2020 a 10/01/2023	
Espécie/Linhagem	Nº de Animais	Peso/Idade	Sexo	Origem
Camundongo / C57Bl 6	96	20g / 56 dias	Fêmea	Serviço de Biotério
	12	20g / 56 dias	Macho	
	72	02g / 01 dia	Fêmea	Laboratório do Prédio da Cirurgia Experimental e Técnica Cirúrgica
	72	02g / 01 dia	Macho	

Ribeirão Preto, 30 de novembro de 2020


Profa. Dra. Katiuchia Uzzun Sales
Coordenadora da CEUA-FMRP-USP

Anexo 2

Gráfico com peso médio esperado para idade e sexo de camundongos C57Bl6.

Extraído e adaptado de: Charles River Laboratories International. Research models: C57BL/6 Mice.

In: <https://www.criver.com/sites/default/files/resources/C57BL6MouseModelInformationSheet.pdf> (2019).

