**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

ANA CAROLINA TAGLIATTI ZANI

Influência do agente antiangiogênico Bevacizumab em endometriose
experimentalmente induzida em ratas

Ribeirão Preto

2017

ANA CAROLINA TAGLIATTI ZANI

**Influência do agente antiangiogênico Bevacizumab em endometriose
experimentalmente induzida em ratas**

Versão Original

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto para obtenção
do título de Mestre em Medicina**

**Locais de execução: Departamento de
Ginecologia e Obstetrícia e Departamento
de Patologia e Medicina Legal**

**Orientador: Prof. Dr. Júlio César Rosa e
Silva**

**Ribeirão Preto
2017**

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.

Zani, Ana Carolina Tagliatti

Influência do agente antiangiogênico Bevacizumab em endometriose experimentalmente induzida em ratas. / Ana Carolina Tagliatti Zani ; orientador, Júlio César Rosa e Silva. Ribeirão Preto, 2017.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina da Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2017.

1. Endometriose. 2. Angiogênese. 3. Bevacizumab. 4. VEGF. 5. Proliferação Celular. 6. Invasão Tecidual. 7. Ratas

Nome: ZANI, Ana Carolina Tagliatti

Título: Influência do agente antiangiogênico Bevacizumab em endometriose experimentalmente induzida em ratas

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Julgamento: _____

Agradecimentos

Agradeço, em primeiro lugar, a meu pai, João Luís, e minha mãe, Rosilei, por sempre acreditarem em minha capacidade e me apoiarem em todas as decisões que tomei em minha vida pessoal e profissional. Agradeço, também, a meus irmãos, Vinícius e Vítor. Sem essas quatro pessoas não seria metade do que sou hoje, sem o apoio, mesmo a distância, não teria metade das conquistas que tenho hoje.

A Demetrio agradeço a persistência que teve em não me deixar perder minha própria persistência, o suporte emocional que tem me dado no dia a dia.

Amizades são sempre especiais e cada uma delas colabora um pouquinho em nossas vidas. Um agradecimento especial ao José Vitor, que me incentivou na especialidade, me despertou no assunto, e a Julia, por toda a colaboração na confecção dessa dissertação, nos prazos e burocracias. E obrigada aos dois pela amizade.

Agradeço todos os que me ajudaram no trabalho braçal: à equipe do laboratório de cirurgia experimental da FMRP-USP (especialmente o Carlinhos), à equipe do laboratório de Ginecologia e Obstetrícia (Juliana, Cristiana e Lilian) e do laboratório de patologia (Laura e Professor Alfredo).

Um obrigada especial ao Professor Júlio, meu orientador, pela paciência, pelas dúvidas sanadas, pelos incentivos, por não ter desistido de mim e pela compreensão nos últimos meses.

Agradeço a todas as pacientes, que me ensinam a cada dia mais.

E, acima de tudo, agradeço a Deus, pela capacidade me dada para concluir mais esse projeto em minha vida!

ZANI, A. C. T. Influência do agente antiangiogênico Bevacizumab em endometriose experimentalmente induzida em ratas. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto, 2017.

Resumo

A endometriose, caracterizada por crescimento de tecido endometrial fora da cavidade uterina, é responsável por sintomas algícos com grande impacto na qualidade de vida da paciente. Várias linhas de medicações têm sido estudadas para essa o tratamento da endometriose, já que a cirurgia não é o tratamento de escolha sempre e, quando realizado, não é um tratamento definitivo. O conhecimento da patogenia da endometriose é fundamental para o estudo de novas classes de medicações. Uma delas, os fatores inibitórios da angiogênese, tem papel fundamental no estabelecimento e crescimento de lesões de endometriose. Neste estudo, buscamos a influência da Bevacizumab, droga anti-fator de crescimento endotelial (anti-VEGF), utilizada em duas dosagens diferentes, em endometriose peritoneal induzida em ratas, modelo animal já bem estabelecido para o estudo de endometriose. As ratas permaneceram sob tratamento durante 4 semanas, após as quais foram sacrificadas, sendo as lesões e o corno uterino remanescente retirados para posterior avaliação. Foi realizada avaliação da área das lesões de cada rata, da presença de tecido endometrial à microscopia, da positividade para o anticorpo anti-VEGF na imunohistoquímica e da expressão gênica de PCNA, MMP9, Tp63 e VEGFA. O bevacizumab atuou reduzindo a área das lesões nos grupos que receberam medicação ($p=0,002$) e reduzindo a expressão gênica para Tp63 nas lesões ($p=0,04$). Não houve resultado significativo nas outras avaliações

Palavras-chave: Endometriose. Angiogênese. Bevacizumab. VEGF. Proliferação Celular. Invasão Tecidual. Ratas. Diferenciação Celular.

ZANI, A. C. T. Influence of antiangiogenic agent bevacizumab on endometriosis experimentally induced in rats. Dissertation (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto, 2017.

Abstract

Endometriosis, characterized by growth of endometrial tissue outside the uterine cavity, is responsible for painful symptoms with great impact on the quality of life of women. Several lines of medications have been studied for endometriosis's treatment, since surgery is not always the treatment of choice and, when done, it is not a definitive treatment. Knowing the pathogenesis of this disease is fundamental for the study of new classes of medications. One of them, the inhibitory factors of angiogenesis, plays a fundamental role in the establishment and growth of endometriosis lesions. In this study, we sought the influence of Bevacizumab, an anti-endothelial growth factor (anti-VEGF) drug, used in two different dosages, in peritoneal endometriosis induced in rats, an animal model well established for the study of endometriosis. The rats remained under treatment for 4 weeks, after which they were sacrificed, with the remaining lesions and uterine horn being removed for further evaluation. An evaluation of the lesion area of each rat, the presence of endometrial tissue under microscopy, the positivity of the anti-VEGF antibody in immunohistochemistry and the gene expression of PCNA, MMP9, Tp63 and VEGFA were performed. Bevacizumab worked by reducing the area of the lesions in the groups receiving medication ($p = 0.002$) and reducing the gene expression for Tp63 in the lesions ($p = 0.04$). There was no significant result in the other evaluations

Key words: Endometriosis. Angiogenesis. Bevacizumab. VEGF. Cell Proliferation. Tissue Invasion. Rats. Cell Differentiation.

Lista de Tabelas

Tabela 1:	Peso inicial e final das ratas.	13
Tabela 2:	Área final das lesões nos diferentes grupos.	14
Tabela 3:	Avaliação da positividade para VEGF na imunohistoquímica do endométrio tópico (uterino) nos diferentes grupos.	15
Tabela 4:	Avaliação da positividade para VEGF na imunohistoquímica das lesões (endometriose induzida) entre os diferentes grupos.	15
Tabela 5:	Comparação entre os grupos para a expressão gênica de cada tipo de gene. P-valor referente ao teste de Kruskal Wallis.	18
Tabela 6:	Pós-teste de Dunn para a expressão do gene TP63	18

Lista de Figuras

Figura 1:	Identificação do corno uterino esquerdo	8
Figura 2 e 3:	Aspecto macroscópico das lesões peritoneais no momento da segunda abordagem cirúrgica.	9
Figura 4:	Coloração para HE (aumento 100x) confirmando a presença de tecido endometrial nas lesões do grupo controle (A), Baixa Dose (B) e Alta Dose (C)	14
Figura 5:	Imunohistoquímica para VEGF em lesão do grupo controle mostrando positividade forte (Microscopia, aumento 100x)...15	
Figuras 6 e 7:	Exemplos de reação forte (à esquerda) e fraca a moderada (à direita) em rata do grupo de baixa dose (Microscopia, aumento de 100x)	16
Figuras 8 e 9:	Exemplos de reação forte (à esquerda) e fraca (à direita) em rata do grupo de alta dose (Microscopia, aumento 100x)	16
Figuras 10 e 11:	Exemplos de lesão sem representatitvidade endometrial à HE (à esquerda) e sem marcação de VEGF na imunohistoquímica (à direita). Microscopia, aumento	17

Lista de Abreviaturas

MMPs	Metaloproteinases de Matriz
MMP9	Metaloproteinase de Matriz 9
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
VEGFR2	Receptor 2 do VEGF
PCNA	Antígeno Nuclear de Proliferação Celular
Tp63	Gene Supressor de Tumor p63
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
RNA	Ácido Ribonucleico
HE	Hematoxilina e Eosina
pH	Potencial hidrogeniônico
PBS	Tampão de Solução Salina
TBST	Tris buffered saline e Polissorbato 20
HRP	Enzima Peroxidase
DAB	Diaminobenzina
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico Complementar
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
TIMP	Inibidor tecidual da Matriz de Metaloproteinase

Lista de Símbolos

%	Porcentagem
g	gramas
cm	centímetros
°C	graus Celsius
®	Marca Registrada
ml	mililitro
mg	miligrama
kg	quilograma
µl	microlitro

Sumário

1. Introdução	1
2. Justificativa	5
3. Objetivos	6
3.1. Objetivos Gerais	6
3.2. Objetivos Específicos	6
4. Metodologia	7
4.1. Animais e Procedimentos para modelo experimental	7
4.2. Processamento do material para Coloração e imunohistoquímica...	10
4.3. Extração do RNA total e síntese do cDNA, quantificação por PCR em tempo real	11
4.4. Análise estatística	12
5. Resultados	13
5.1. Do preparo e coleta do material	13
5.2. Da avaliação histopatológica e imunohistoquímica	14
5.3. Da avaliação genética	17
6. Discussão	19
6.1. Avaliação macroscópica	19
6.2. Avaliação imunohistoquímica	19
6.3. Avaliação em biologia molecular	20
6.3.1. Metaloproteinase de Matriz 9 (MMP9)	20
6.3.2. Antígeno de Proliferação Nuclear (PCNA)	21
6.3.3. Proteína tumoral P63(Tp63)	22
6.3.4. Fator de Crescimento Endotelial Vascular A (VEGFA)	23
7. Conclusões	24

Referências Bibliográficas	25
Anexo	29

1. Introdução

Endometriose é uma doença caracterizada pelo crescimento de glândula e estroma endometriais fora da cavidade uterina. É uma doença benigna, dependente do status hormonal da mulher (estrógeno-dependente), que ocorre em 5 a 10% das mulheres em idade reprodutiva (Worley *et al.*, 2013), podendo chegar de 40 a 60% entre as mulheres com dismenorreia (Farquhar, 2007).

Os principais sintomas de endometriose são dismenorreia, dor pélvica não relacionada à menstruação e infertilidade (Catenacci, Sastry e Falcone, 2009). Tais sintomas tem grande impacto no bem estar físico, mental e social da mulher (Dunselman *et al.*, 2014) e configuram, por isso, um problema de saúde pública, tornando fundamental o seu correto tratamento.

Para que o tratamento da endometriose seja eficaz, faz-se necessário conhecer a sua patogenia. Várias teorias tentam explicá-la. A mais aceita, a teoria de Sampson, propõe que lesões endometrióticas se originam de fragmentos endometriais que, durante a menstruação, caem de forma retrógrada (via tubas uterinas) na cavidade peritoneal (Sampson, 1927). Se levarmos em consideração que a menstruação retrógrada ocorre em 76 a 90% das mulheres no menacme, incidência maior que a da própria endometriose, a teoria da menstruação retrógrada não é suficiente para justificá-la.

Outras teorias surgiram para dar essa explicação, como as que relacionam fatores imunológicos, fatores de adesão celular e a metaplasia celômica à gênese da endometriose (Gazvani, Rafet e Templeton, 2002; Gazvani, R. e Templeton, 2002; Kruitwagen *et al.*, 1991; Suginami, 1991). A teoria da metaplasia celômica explica a ocorrência de endometriose em localizações extra-pélvicas, como cavidade pleural e em mulheres que nunca menstruaram. Está embasada na diferenciação de células celômicas primitivas em células endometriais (Suginami, 1991).

O conhecimento da composição do fluido peritoneal (fatores imunológicos e os fatores de adesão celular) ajudou a explicar o motivo da endometriose não ter uma incidência maior, dada a incidência de menstruação retrógrada na população e a presença de tecido celômico em todas as mulheres.

O fluido peritoneal nas pacientes com endometriose contém maior número de macrófagos, que se encontram mais ativados. Após a adesão das células endometriais ao peritônio, os macrófagos locais, através da produção de interleucinas 1 e 8, estimulam a produção de metaloproteinases de matriz (MMPs). Entre as MMPs, a MMP9 está sabidamente envolvida na invasão tecidual de vários tumores e tem sido relacionada à patogenia da endometriose, com demonstrações de elevados níveis tanto no líquido peritoneal como no plasma sanguíneo de pacientes com diferentes graus de endometriose (Liu *et al.*, 2015).

Seguindo a adesão e invasão tecidual, ocorre o estímulo à angiogênese, através, principalmente, do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), produzido tanto pelas células endometriais em hipóxia como pelos macrófagos peritoneais (Groothuis *et al.*, 2005). As lesões endometrióticas são ricamente vascularizadas e estudos já comprovaram que o surgimento de novos vasos tem importância central, seja através de vasos já existentes na proximidade ou através do recrutamento de células precursoras endoteliais (Bourlev *et al.*, 2006; Laschke *et al.*, 2011; Laschke, Giebels e Menger, 2011; Nisolle *et al.*, 1993). O VEGF estimula a migração e a proliferação de células endoteliais e aumenta a permeabilidade vascular, com maior ou menor expressão proteica sendo encontrada a depender do grau da doença: quanto maior a invasão tecidual, maior o nível proteico do VEGF (Song *et al.*, 2014)(Machado *et al.*, 2008). Sem uma angiogênese adequada, não são possíveis a manutenção das lesões e o seu crescimento local, o que nos leva à hipótese de que uma medicação que atue na cascata da angiogênese possa ser uma boa aposta para o tratamento da endometriose (Becker e D'Amato, 2007; Hull *et al.*, 2003; Laschke e Menger, 2012; Nap *et al.*, 2004; Taylor, Lebovic e Mueller, 2002).

O padrão ouro de diagnóstico da endometriose é a visualização direta das lesões via laparoscópica com confirmação histológica através do achado de macrófagos com hemossiderina ou tecido endometrial, glândulas ou estroma (ACOG Committee on Practice Bulletins--Gynecology, 1999). O tratamento cirúrgico tem a intenção de reduzir a dor e aumentar as taxas de fertilidade. Para tanto, é necessário remover todas as lesões visíveis e restaurar a anatomia pélvica, o que torna a laparoscopia um procedimento diagnóstico e terapêutico.

Basear todo o tratamento da endometriose na cirurgia não é adequado, pois a endometriose apresenta-se em diferentes formas micro e macroscopicamente, em alguns casos, inclusive, não sendo possível identificá-las (Howard, 2011). Além disso, nem sempre a opção cirúrgica é o melhor tratamento para uma determinada paciente, como quando lidamos com infertilidade, tornando o tratamento medicamentoso essencial para controle da dor e da progressão das lesões (Petta *et al.*, 2009). Nesse ponto, faz-se necessária a associação de medicamentos que reduzam o crescimento das lesões, bem como o aparecimento de novas.

As opções medicamentosas são vastas, algumas delas já bem estabelecidas e em uso, como os anticoncepcionais hormonais, os análogos do GnRH, os inibidores da aromatase. Tais classes de medicamentos possuem uma limitação importante na prática clínica: por atuarem através da modulação hormonal, podem inibir a ovulação, não sendo uma opção adequada para as pacientes que desejam engravidar (Streuli *et al.*, 2013).

O foco deste estudo é um agente antagonista do fator de crescimento endotelial vascular (anti-VEGF), o bevacizumabe, comparando-o em duas dosagens no que diz respeito à redução de lesões endometrióticas induzidas em ratas.

Bevacizumabe é um anticorpo monoclonal que se liga e neutraliza de forma seletiva a atividade biológica do fator de crescimento do endotélio vascular humano (VEGF), inibindo sua ligação aos seus receptores, principalmente VEGFR2, na superfície das células endoteliais, com consequente redução da vascularização. Sua ação antitumoral já está bem estabelecida no tratamento de tumores sólidos, como em câncer de colon, mama, pâncreas e próstata, quando associado a outros quimioterápicos (Shih e Lindley, 2006). O bevacizumab tem se mostrado eficaz também no tratamento de doenças vasculares retinianas, com resultados comparáveis à foto coagulação (Ollendorf, Colby e Pearson, 2013). Mais recentemente, estudos com bevacizumab já tem demonstrado resultados melhores em endometriose quando comparado com outras classes de drogas (Soysal *et al.*, 2014).

Assim como o estudo de qualquer nova droga para determinada doença, ou mesmo novos usos para drogas já utilizadas, o estudo de novas classes de medicamentos para endometriose encontra uma barreira ética importante, não

devendo ser testadas diretamente em humanos. Por isso, modelos animais tem se mostrado uma ótima opção para o estudo experimental. Modelos utilizando ratas (Uchiide, Ihara e Sugamata, 2002) e coelhas (Silva *et al.*, 2004) se mostraram eficazes na indução da lesão endometriótica e similaridades importantes com endometriose humana, permitindo a extrapolação dos resultados de estudos com animais para a patogenia da doença humana. A escolha do modelo em ratas para o estudo experimental baseou-se no fato de apresentar técnica cirúrgica simples, ter altas taxas de sucesso na indução da endometriose e ser altamente reprodutível (Jones, 1984).

2. Justificativa

Endometriose é uma doença de grande impacto na saúde pública. A angiogênese é de fundamental importância para a implantação e o crescimento da endometriose. Fatores angiogênicos atuam através do recrutamento de células endoteliais, organização da microvascularização e aumento da permeabilidade vascular. Medicamentos que atuam inibindo a angiogênese constituem uma classe promissora de drogas para tratamento primário ou adjuvante da endometriose, sem ação hormonal concomitante.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito do bevacizumab sobre endometriose experimentalmente induzida em ratas.

3.2. Objetivos específicos

Avaliar a influência do agente anti-angiogênico bevacizumab sobre lesões de endometriose através da análise objetiva do tamanho final das lesões e da expressão proteica de VEGF na imunohistoquímica, assim como sua expressão gênica. Adicionalmente, quantificar a expressão gênica de marcadores de adesão – Metaloproteinase de Matriz 9 (MMP9), proliferação – Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA) e apoptose celular – Gene Supressor de Tumor p63 (Tp63).

4. Metodologia

O presente estudo foi realizado nos Departamentos de Ginecologia e Obstetrícia e de Patologia e Medicina Legal, além do Setor de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e foi aprovado no Comitê de Ética no uso de animais (CEUA) desta Instituição (Anexo 1).

4.1. Animais e Procedimentos para Modelo experimental

Foram utilizadas 30 ratas Wistar virgens, com aproximadamente 200g no início do experimento, provenientes do Serviço de Biotério do Campus Universitário de Ribeirão Preto. Para aclimação, antes do início do experimento, as ratas foram mantidas em gaiolas com 41x32 centímetros de perímetro e 17 cm de altura, com no máximo quatro animais por gaiola, sob controle ambiental de temperatura e umidade (22 a 25°C) e luminosidade, com ciclo claro-escuro de 12 em 12 horas, por sete dias e alimentadas com água e ração Purina® para ratos a livre demanda, condições estas que permaneceram as mesmas durante todo o experimento.

Inicialmente, todas as ratas foram submetidas a laparotomia para indução da lesão de endometriose. A indução foi realizada após anestesia dos animais com a injeção intraperitoneal com 0,3ml de cloridrato de quetamina a 10% (Ketamina Agener, União Química Farmacêutica Nacional AS, Uso veterinário) associado a 0,2ml de xilasina a 2mg/ml (Dopaser, Hertape Calier). A seguir, foram procedidos a tricotomia pélvica, os cuidados de antisepsia e a lavagem das luvas de látex utilizadas com soro fisiológico para reduzir a formação de aderências. A cavidade pélvica foi aberta através de incisão longitudinal mediana de cerca de dois centímetros, a dois centímetros do púbis do roedor. Aberta a cavidade, foram ressecados quatro centímetros do corno uterino esquerdo, sendo o coto uterino fechado na sequência (Figura 1). A porção uterina dissecada foi incisada longitudinalmente para retirada de dois fragmentos de 5x5 milímetros. Esses fragmentos de tecido endometrial foram suturados no peritônio próximo ao trato

reprodutivo da rata, usando o fio Vicryl 6-0 (Ethicon, Inc., New Jersey, EUA), com a face endometrial voltada para a cavidade pélvica, sendo um fragmento à direita e o outro à esquerda. Posteriormente, a cavidade pélvica foi fechada através de sutura contínua da musculatura e da pele com Nylon 4-0 (Mononylon 3-0, Ethicon, Inc. New Jersey, EUA). Todos os procedimentos descritos foram realizados pelo mesmo pesquisador e nenhuma suplementação hormonal foi administrada antes ou após a laparotomia, nem uso de antibioticoterapia ou profilática. Como droga analgésica pós-operatória foi utilizada dipirona na dose de 100mg/kg por sete dias (Abbott e Hellemans, 2000).

Figura 1: Identificação do corno uterino esquerdo.

Após a primeira cirurgia, as ratas foram alocadas em três grupos de 10 animais cada: um grupo controle (grupo Controle), em que não foi utilizada droga alguma no pós-operatório; um grupo que recebeu a droga bevacizumab (2,5mg/kg) a cada 14 dias (grupo Baixa Dose) (Ozer *et al.*, 2013); e um terceiro grupo que recebeu a mesma droga, na mesma dose, porém a cada 3 dias (grupo Alta Dose). A droga foi administrada após quatro semanas da cirurgia, período necessário para implantação e consolidação da lesão (Novella-Maestre *et al.*, 2009) e durante um período de quatro semanas.

Finalizadas as quatro semanas de tratamento, as ratas foram submetidas à eutanásia através da sobredosagem de anestésicos (xilasina + quetamina), no dobro

da dose utilizada anteriormente para a anestesia, e foi realizada a inspeção da cavidade abdomino-pélvica, com identificação e documentação das lesões, sendo medida as lesões nos dois maiores diâmetros e documentada através de fotografia macroscópica das lesões (Figuras 2 e 3).

Figuras 2 e 3: Aspecto macroscópico das lesões peritoneais no momento da segunda abordagem cirúrgica.

O corno uterino direito e as lesões de endometriose foram excisados para análise, sendo os tecidos retirados divididos ao meio e processados da seguinte

forma: uma metade fixada em formol para processamento para inclusão em parafina e coloração por hematoxilina e eosina para documentação da presença ou não de tecido endometrial e reação de imunohistoquímica anti-VEGF.; e a outra metade armazenada com RNAlater e congelada em freezer -80°C para posterior análise de biologia molecular.

4.2. Processamento do material para Coloração e imunohistoquímica

Os tecidos retirados foram divididos ao meio, sendo uma parte fixada em formol 10%, processada para inclusão em parafina e corada por hematoxilina e eosina (HE) com objetivo de identificar a presença de lesões compatíveis com endometriose e posterior realização de imunohistoquímica. Foram realizados cortes histológicos com 4µm.

Para o preparo da imunohistoquímica foi utilizado o kit Revel (Biogen): os cortes foram desparafinizados em xileno e hidratados em uma série de álcoois em ordem decrescente e água destilada. Em seguida, foram submetidos à recuperação antigênica com tampão de citrato (pH 6,0) em panela a vapor por 40 minutos e, logo após, as amostras foram resfriadas por 30 minutos em temperatura ambiente.

Após o resfriamento, os cortes foram lavados em PBS para bloqueio da peroxidase endógena por 15 minutos, em TBST por 5 minutos e foi realizado o bloqueio da proteína com Protein Block por 10 minutos.

Então, as amostras foram incubadas no anticorpo primário (VEGF na diluição de 1:100) por 1 hora em temperatura ambiente. O processo para preparo das lâminas após foi o seguinte: lavagem em TBST por 1 minuto, aplicação de Revel Complemento por 10 minutos, aspiração, aplicação de HRP conjugado por 15 minutos, lavagem em TBST por 5 minutos, aplicação de DAB (3,3 diaminobenzina) por 105 segundos, lavagem em água destilada. A coloração foi realizada com Hematoxilina de Harris e azulada em amônia a 5%. Foi realizada a desidratação na ordem crescente de álcoois e xilol, com montagem das lâminas com Entellan (Merck).

As lâminas foram avaliadas por dois examinadores independentes e a reatividade para VEGF no citoplasma celular foi avaliada de forma qualitativa e classificada em ausente, fraca a moderada (marrom claro a escuro) e forte (marrom escuro a preta, obscurecendo a cromatina nuclear).

4.3. Extração do RNA total e síntese do cDNA, quantificação por PCR em tempo real

As amostras de tecidos coletadas foram lavadas em PBS 1X e armazenadas em um microtubo contendo 200 uL de RNA later Solution (Ambion) . Esses microtubos foram estocados na geladeira por 24 horas e, após esse período, armazenados no freezer -80°C até o isolamento do RNA total. Todos os procedimentos foram realizados em condições isentas de RNase, evitando a contaminação com RNase exógena.

O RNA total, extraído utilizando Trizol Plus RNA Purification Kit (Ambion) de acordo com as instruções do fabricante, foi tratado com DNA-free Kit (Invitrogen) para a remoção de possíveis contaminações com DNA genômico e em seguida foi quantificado por espectrofotometria à OD 260/280 (NanoDrop2000c, Thermo Scientific). Em seguida, o cDNA foi sintetizado a partir de 500 ng de RNA total utilizando High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (Invitrogen).

A PCR em tempo real foi realizado utilizando-se o equipamento 7500 Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems). As seguintes sondas de hidrólise do tipo TaqMan (Applied Biosystems) foram utilizadas neste estudo: Rn01511602_m1 (Vegfa), Rn01404783_m1 (Tp63), Rn01514538_g1 (Pcna), Rn00579162_m1 (Mmp9), Rn00667869_m1 (Actb) e Rn00560865_m1 (B2m). Os ciclos de PCR foram os seguintes: um ciclo de 95°C durante 20 segundos, 40 ciclos de 95°C por 3 segundos e a 60°C por 30 minutos. Cada reação de PCR foi realizada em triplicata. Os genes beta actina (Rn00667869_m1) e B2M (Rn 00560865_m1) foram utilizados como gene de referência para normalizar as reações. Como amostra calibradora nos cálculos foi usado um *pool* de cDNA das amostras controles. As eficiências das

sondas e primers foram testadas na reação de amplificação dos genes selecionados. Para esse estudo, foram consideradas ideais as eficiências na faixa de 90 a 110%. As reações de PCR em tempo real foram realizadas na diluição de 1:4 de cDNA. A expressão relativa para os genes analisados foi calculada para cada amostra de acordo com o método de $2^{-\Delta\Delta CT}$.

4.4. Análise estatística

O teste qui-quadrado foi utilizado para verificar se existe associação entre os grupos (alta, baixa ou controle) em relação à expressão de VEGF na imunohistoquímica.

O teste não paramétrico de Kruskal Wallis foi utilizado para comparar os grupos quando a distribuição da variável resposta não tem uma distribuição normal. Para as variáveis com p-valor menor que 0,05 no teste de Kruskal Wallis foi realizado o pós-teste de Dunn.

As análises foram realizadas no programa SAS versão 9.3. Somente o pós-teste de Dunn que foi implementado no programa R versão 3.2.5. Foi considerado um nível de significância de teste de 5%.

5. Resultados

5.1. Do preparo e coleta do material

A média do peso inicial das ratas em cada grupo foi de 215,1g (grupo Controle), 226g (grupo Baixa Dose) e 206g (grupo Alta Dose). Ao final do experimento, ou seja, no dia da eutanásia e da exérese das lesões, a média de peso entre os grupos era de: 387g (Controle), 394g (Baixa Dose) e 381g (Alta Dose), sem diferença estatística entre eles. (tabela 1)

Tabela 1: Peso inicial e final das ratas

Rata	Controle		Baixa Dose		Alta Dose		p
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	
1	216	378	228	360	210	368	
2	208	426	236	456	206	320	
3	228	386	234	378	204	364	
4	214	388	228	372	206	416	
5	202	392	238	439	204	418	
6	220	412	228	378	214	446	
7	208	388	240	356	206	382	
8	218	380	218	418	194	350	
9	222	386	202	409	220	364	
10	215	330	216	382	200	Óbito	
Média	215,1	387	226,8	394	206,4	381	p<0,05

A primeira cirurgia foi realizada nas 30 ratas da maneira inicialmente descrita, não havendo nenhuma perda nesse momento. Após o início da medicação, houve o óbito de uma rata do grupo Alta Dose, com causa provável infecção pós-cirúrgica.

Foram anotadas as duas maiores medidas das lesões e calculadas suas áreas, evidenciando diferença estatística entre os grupos Alta e Baixa Dose quando comparados ao grupo Controle (tabela 2).

Tabela 2: Área final das lesões nos diferentes grupos

Variáveis	Controle	Baixa dose	Alta dose	p
Diâmetro 1	0,99	0,45	0,56	0,02
Diâmetro 2	0,82	0,50	0,46	0,01
Área de lesão	1,16	0,23	0,35	0,002

5.2. Da avaliação histopatológica e imunohistoquímica

Todos os úteros apresentavam endométrio ativo na avaliação histopatológica com coloração de Hematoxilina e Eosina, comprovando que o estímulo para a indução da endometriose peritoneal foi igual em todas as ratas. A avaliação da HE (Figura 4) das lesões demonstrou a presença de endométrio em 9 ratas no grupo Controle(A), 9 ratas no grupo Baixa Dose (B) e 7 ratas no grupo Alta Dose (C).

Figura 4: Coloração para HE (Aumento 100x) confirmando a presença de tecido endometrial nas lesões do grupo controle (A), Baixa Dose (B) e Alta Dose (C)

A imunohistoquímica para VEGF no endométrio tópico das ratas mostrou positividade em todas as ratas. (tabela 3). A avaliação da imunohistoquímica nas lesões endometrióticas está representada na tabela 4.

Tabela 3: Avaliação da positividade para VEGF na imunohistoquímica do endométrio tópico (uterino) nos diferentes grupos

	Ausente	Fraco-Moderado	Forte	p
Alta Dose	0 (0)	0 (0)	9 (100)	
Baixa Dose	0 (0)	0 (0)	10 (100)	
Controle	0 (0)	5 (50)	5 (50)	p =0,003

Tabela 4: Avaliação da positividade para VEGF na imunohistoquímica das lesões (endometriose induzida) entre os diferentes grupos

	Ausente	Fraco-Moderado	Forte	p
Alta Dose	2 (22)	3 (33)	4 (44)	
Baixa Dose	1 (10)	6 (60)	3(30)	
Controle	1 (10)	5 (50)	4 (40)	p =0,79

No Grupo controle, cinco ratas apresentaram positividade fraca a moderada para VEGF no tecido endometriótico e 4 com positividade forte (Figura 5).

Figura 5: Imunohistoquímica para VEGF em lesão do grupo controle mostrando positividade forte (Microscopia, aumento 100x).

No grupo de Baixa Dose, três ratas apresentaram lesões com reatividade forte e 6 ratas lesões com reatividade fraca a moderada. (Figura 6 e 7)

Figuras 6 e 7: Exemplos de reação forte (à esquerda) e fraca a moderada (à direita) em rata do grupo de baixa dose (Microscopia, aumento de 100x)

Por fim, no grupo de Alta Dose, quatro ratas apresentaram positividade forte e 3 ratas, fraca a moderada. (Figuras 8 e 9)

Figuras 8 e 9: Exemplos de reação forte (à esquerda) e fraca (à direita) em rata do grupo de alta dose (Microscopia, aumento de 100x)

Todas as ratas que não apresentaram positividade para VEGF, nos três grupos, corresponderam às mesmas ratas em que não foi encontrado tecido endometrial na lesão à coloração com HE (Figuras 10 e 11).

Figuras 10 e 11: Exemplos de lesão sem representatividade endometrial à HE (à esquerda) e sem marcação de VEGF na imunohistoquímica (à direita).

Não houve diferença estatística entre os grupos na imunohistoquímica para VEGF ($p=0,79$).

5.3. Da avaliação genética

Não houve diferença estatística entre os grupos na expressão gênica do MMP9, tanto no útero ($p=0,33$) como nas lesões ($p=0,24$), assim como também não foi encontrada diferença na expressão do PCNA ($p=0,06$ para o útero e $p=0,7$ para lesão).

Não houve diferença na expressão gênica do VEGF nas lesões, com $p=0,07$. Com relação ao TP63, foi encontrada diferença estatística entre os grupos tanto nos úteros ($p=0,03$) como nas lesões ($p=0,04$).

Os dados encontram-se resumidos na tabela 5.

Tabela 5: Comparação entre os grupos para a expressão gênica de cada tipo de gene. P-valor referente ao teste de Kruskal Wallis.

Variável	Grupo	N	Média	D.P.	Mediana	Q1	Q3	Mínimo	Máximo	P
Útero MMP9	altadose	9	0,60	1,04	0,05	0,04	0,33	0,02	2,48	0,33
	baixadose	8	0,13	0,26	0,03	0,02	0,08	0,01	0,76	
	controle	10	0,36	0,62	0,06	0,04	0,43	0,02	1,89	
Lesão MMP9	altadose	7	0,99	1,02	0,61	0,22	1,95	0,16	2,83	0,24
	baixadose	10	0,88	1,24	0,38	0,14	1,17	0,03	4,17	
	controle	10	0,27	0,20	0,24	0,14	0,38	0,04	0,69	
Útero PCNA	altadose	9	0,82	0,77	0,72	0,43	0,74	0,09	2,69	0,06
	baixadose	8	1,40	1,21	0,91	0,55	2,24	0,27	3,53	
	controle	10	9,26	24,6	1,34	1,16	2,40	0,45	79,20	
Lesão PCNA	altadose	7	0,79	0,73	0,56	0,36	1,36	0,04	2,18	0,70
	baixadose	10	0,92	0,57	0,97	0,47	1,24	0,23	1,99	
	controle	10	0,91	0,51	0,81	0,65	1,39	0,21	1,84	
Útero TP63	altadose	9	0,23	0,22	0,20	0,09	0,25	0,03	0,74	0,03
	baixadose	8	0,28	0,23	0,21	0,13	0,41	0,05	0,71	
	controle	10	1,42	1,34	0,87	0,20	2,72	0,10	3,45	
Lesão TP63	altadose	7	0,42	0,59	0,20	0,04	0,46	0,02	1,69	0,04
	baixadose	10	2,12	2,94	1,34	0,41	2,19	0,07	10,00	
	controle	10	2,91	3,06	2,02	0,68	4,97	0,03	9,43	
Útero VEGFA	altadose	9	1,58	1,48	1,16	0,95	1,28	0,37	5,06	0,42
	baixadose	8	2,07	1,38	1,71	1,26	2,47	0,59	5,06	
	controle	10	1,61	0,73	1,27	1,11	2,01	0,82	2,86	
Lesão VEGFA	altadose	7	0,98	0,64	0,95	0,41	1,65	0,05	1,88	0,07
	baixadose	10	1,42	1,01	1,11	0,94	1,57	0,33	4,00	
	controle	10	1,82	0,69	1,76	1,27	2,25	0,83	3,04	

O pós-teste de Dunn confirmou a diferença na expressão gênica do TP63 nas lesões apenas quando comparado o Grupo de Alta Dose com o de Baixa Dose e com o grupo controle, não havendo diferença quando comparou grupo de Baixa Dose com grupo controle. (Tabela 6)

Tabela 6: Pós-teste de Dunn para expressão do gene TP63

	Baixo X Alta	Baixo X Contr	Contr X Alta
ÚteroTP63	0,3341	0,0275	0,0075
LesãoTP63	0,0227	0,316	0,0074

6. Discussão

Como já previamente bem estabelecido, após ocorrer a adesão das células endometriais ao peritônio, as lesões endometrióticas precisam da neovascularização para se manter e crescer, estando isso diretamente relacionado com a invasão tecidual (Bourlev *et al.*, 2006; Laschke *et al.*, 2011; Laschke, Giebels e Menger, 2011; Nisolle *et al.*, 1993).

Drogas antiangiogênicas vem sendo estudadas como uma boa opção terapêutica para o tratamento da endometriose, o que foi possível comprovar, nesse estudo, através de análise macroscópica, imunohistoquímica e de biologia molecular das lesões.

6.1. Avaliação macroscópica

O uso do bevacizumab representou em redução da área das lesões ($p=0,002$) nos grupos de alta e de baixa dose quando comparados ao grupo controle, confirmando a informação já conhecida de que inibidores da angiogênese atuem diretamente inibindo o crescimento da lesão. Na literatura, Soysal *et al.* (Liu *et al.*, 2016; Soysal *et al.*, 2014) demonstrou resultados que corroboram os desse estudo, com comprovação de redução na taxa de adesão celular e aumento na taxa de apoptose com o uso de Bevacizumab, efeitos que comprovou serem iguais àqueles encontrados com o uso de análogos de GnRH. Ricci *et al.* (Ricci *et al.*, 2011) e Ozer *et al.* (Ozer *et al.*, 2013) também encontraram em seus estudos reduções significativas no volume das lesões após o uso do bevacizumab em comparação com grupos controles.

6.2. Avaliação Imunohistoquímica

Em nosso estudo, a imunohistoquímica para VEGF no endométrio tópico (uterino) demonstrou que o bevacizumab não apresenta efeito nesse local ($p=0,003$).

Sendo a endometriose uma patologia comum entre mulheres inférteis, com prevalência chegando a 50% entre esse grupo específico (Bulletti *et al.*, 2010), existir uma medicação que controle a doença sem afetar o endométrio tópico é um importante ponto. A ausência de ação no endométrio uterino encontrada no estudo permite inferir que o bevacizumab tenha essa característica, preservando a funcionalidade do endométrio tópico e não prejudicando, futuramente, a ocorrência de uma gestação. As drogas que são utilizadas para tratamento da endometriose atualmente carecem desse perfil de ação

Em relação à expressão proteica do VEGF nas lesões, o estudo não demonstrou diferença estatística entre os grupos. Entretanto, podemos observar que houve um desvio da intensidade da positividade, sendo encontrado mais positividade fraca a moderada do que positividade forte. Ozer *et al.* (Ozer *et al.*, 2013) comparou o efeito do Bevacizumab em dosagem intermediária à utilizada no presente estudo (30mg/kg, dose total) com duas outras drogas (Sorafenib e Ácido Retinóico) e com controle (nenhuma medicação) na expressão de VEGF na imunohistoquímica e na microvascularização e no volume das lesões endometrióticas, obtendo resultados significativamente melhores com o bevacizumab em relação às outras duas drogas e em relação ao grupo controle.. Ozer também comparou o efeito das drogas utilizadas na reserva ovariana das ratas, não encontrando redução da mesma.

6.3. Avaliação em Biologia Molecular

6.3.1. Metaloproteinase de Matriz 9 (MMP9)

A MMP9 está envolvida na decomposição da matriz extracelular em processos fisiológicos normais, como desenvolvimento embrionário, reprodução e remodelação de tecidos, e em processos patológicos, como artrite, metástases e endometriose. A MMP9, assim como outras MMPs, tem demonstrado ser um fator importante na progressão e invasão de tumores de endométrio (Graesslin *et al.*, 2006). O mecanismo patogênico da endometriose inclui, além de proliferação e invasão, degradação da matriz extracelular, com facilitação na penetração da

camada basal pelas células endometriais, já tendo sido demonstrado níveis elevados de MMP9 no líquido peritoneal e no plasma em pacientes com endometriose (Liu *et al.*, 2015).

A inibição das MMPs ocorre por genes da família *TIMP* (Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase). Mulheres com endometriose possuem uma expressão diferente de MMP9 e TIMP2 no endométrio tópico e no ectópico, sendo que baixos níveis de TIMP2 no fluido peritoneal levam a um aumento na MMP9 e tal desequilíbrio favorece a degradação da matriz extracelular e a invasão tecidual, promovendo a implantação de tecido endometrial ectópico (Londero *et al.*, 2012).

Com base em tudo o que já se sabe, esperávamos que houvesse uma redução na expressão gênica da MMP9 com o uso do bevacizumab, já que a medicação reduziu o tamanho das lesões. Porém, o estudo não demonstrou esta diferença esperada entre os grupos, tanto na avaliação das lesões quanto do útero.

6.3.2. Antígeno de Proliferação Nuclear (PCNA)

O PCNA é um gene que codifica uma proteína encontrada no núcleo celular, cofator da DNA polimerase, expressa durante a fase de síntese de DNA, sendo então, um marcador de proliferação celular.

Além de ser utilizado para avaliação de proliferação celular em determinados tumores malignos, o PCNA vem mostrando uma correlação entre o nível de expressão e o grau de invasão da endometriose, com as maiores taxas de proliferação celular sendo encontradas em endometriose colorretal e menores em endometriose peritoneal (Weigel *et al.*, 2012).

Ricci *et al.* (Ricci *et al.*, 2011), em 2011, comparou a quantificação de VEGF no lavado peritoneal e a expressão de PCNA na imunohistoquímica das lesões de endometriose induzidas experimentalmente em ratas entre grupo controle e grupo que recebeu bevacizumab na dosagem de 5mg/kg a cada 3 dias (o dobro da dose utilizada no grupo Alta Dose neste estudo). Foi demonstrado redução nos dois parâmetros, com significância estatística, favorecendo o uso do bevacizumab.

No presente estudo, a avaliação da expressão gênica do PCNA não encontrou diferença estatística entre os grupos, o que pode significar, baseado no estudo citado, que a dose utilizada no estudo ou foi insuficiente para afetar a expressão do gene, embora tenha levado à redução objetiva nas áreas das lesões, conforme já mencionado, mas que a dose utilizada possa atuar na expressão proteica, que não foi avaliada no presente estudo.

6.3.3. Proteína tumoral p63 (Tp63)

A proteína de membrana p63 é um homólogo do gene supressor de tumor p53. É expresso em células escamosas basais do colo uterino, mama, glândula salivar e próstata e tem papel na regulação da proliferação e diferenciação epitelial, demonstrando ser um bom marcador de diferenciação celular (Di Como *et al.*, 2002).

Poli Neto *et al.* (Poli Neto *et al.*, 2007), em 2007, demonstrou que células com marcação para p63 na imunohistoquímica se concentram principalmente em endometriose peritoneal e endometrioma, não havendo marcação na maior parte dos casos de adenomiose, endometriose retovaginal e endometriose de parede abdominal. Esses dados sugerem que a patogenia das lesões peritoneais seja diferente das lesões profundas. O nível de positividade para p63 não está correlacionado ao grau da endometriose.

Os resultados do presente estudo demonstraram redução significativa na expressão gênica do Tp63 tanto na lesão quanto no útero, sugerindo que o bevacizumab tenha, de fato, agido na diferenciação celular dos implantes endometrióticos. Quando comparados de forma separada, notamos que a baixa dose foi suficiente para apresentar efeito no endométrio eutópico ($p=0,02$), entretanto foi necessária uma alta dose para haver efeito na lesão ($p=0,31$ na comparação entre Baixa Dose e Controle, versus $p=0,007$ na comparação entre Alta Dose e Controle).

6.3.4. Fator de Crescimento Endotelial Vascular A (VEGFA)

O VEGFA codifica uma proteína de ligação à heparina que induz a proliferação e migração de células endoteliais vasculares, sendo essencial para angiogênese. A regulação desse gene encontra-se alterada em muitos tumores, correlacionando-se com o estágio tumoral e a progressão.

Como já mencionado, a angiogênese tem papel central no estabelecimento das lesões endometrióticas, sendo que a disrupção desse processo culmina na redução das lesões, conforme demonstrado em estudos prévios que avaliaram a expressão proteica do VEGF (Ozer *et al.*, 2013).

Não foi encontrada diferença estatística na expressão gênica uterina do VEGFA nos grupos avaliados nesse estudo, o que demonstra que o bevacizumab não age nas células endometriais tópicas. Também não houve diferença estatística na análise da expressão nas lesões ($p=0,07$), embora a avaliação pormenorizada dos resultados permita inferir que haja uma tendência a diferença estatística, que talvez possa ser obtida com um aumento do número amostral.

7. Conclusões

No presente estudo da ação do bevacizumab nas lesões endometrióticas experimentalmente induzidas em ratas, observamos que:

1. Houve redução significativa da área das lesões entre os grupos, sugerindo que o bevacizumab tenha um efeito positivo no controle da doença.
2. Não houve alteração na expressão proteica do VEGF no útero das ratas, independentemente do uso do bevacizumab e da dose empregada, sugerindo que a ação da droga é maior do tecido endometrial ectópico do que no endométrio tópico.
3. A expressão gênica do Tp63 foi significativamente menor no grupo Alta Dose quando comparado aos outros dois grupos, do que concluímos que o bevacizumab atue reduzindo a diferenciação celular nas lesões.
4. A avaliação da expressão gênica do VEGFA nas lesões demonstra uma tendência a redução para os grupos que usaram a medicação quando comparados ao grupo controle.

Esses achados permitem concluir que inibidores da angiogênese sejam opções reais para o tratamento da endometriose, com grandes perspectivas de ação seletiva na lesão, sem prejuízo da função reprodutiva da paciente.

Estudos futuros devem ser focados na ação da droga na expressão proteica de fatores envolvidos na adesão e diferenciação celular, com aprofundamento no estudo de seu efeito tanto no endométrio tópico como nos ovários.

Tais descobertas poderão otimizar o tratamento das pacientes com endometriose, reduzindo o grande impacto que tem hoje essa doença na saúde pública.

Referências Bibliográficas

ABBOTT, F. V.; HELLEMANS, K. G. Phenacetin, acetaminophen and dipyrrone: analgesic and rewarding effects. **Behavioural Brain Research**, v. 112, n. 1–2, p. 177–186, jul. 2000.

ACOG COMMITTEE ON PRACTICE BULLETINS--GYNECOLOGY. ACOG Practice Bulletin No. 11: Medical management of endometriosis. **Obstetrics and Gynecology**, v. 94, n. 6, p. 1–14, dez. 1999.

BECKER, C. M.; D'AMATO, R. J. Angiogenesis and antiangiogenic therapy in endometriosis. **Microvascular Research**, v. 74, n. 2–3, p. 121–130, nov. 2007.

BOURLEV, V. *et al.* The relationship between microvessel density, proliferative activity and expression of vascular endothelial growth factor-A and its receptors in eutopic endometrium and endometriotic lesions. **Reproduction**, v. 132, n. 3, p. 501–509, 1 set. 2006.

BULLETTI, C. *et al.* Endometriosis and infertility. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 27, n. 8, p. 441–447, ago. 2010.

CATENACCI, M.; SASTRY, S.; FALCONE, T. Laparoscopic surgery for endometriosis. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 52, n. 3, p. 351–361, set. 2009.

DI COMO, C. J. *et al.* p63 expression profiles in human normal and tumor tissues. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 8, n. 2, p. 494–501, fev. 2002.

DUNSELMAN, G. A. J. *et al.* ESHRE guideline: management of women with endometriosis. **Human Reproduction (Oxford, England)**, v. 29, n. 3, p. 400–412, mar. 2014.

FARQUHAR, C. Endometriosis. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 334, n. 7587, p. 249–253, 3 fev. 2007.

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

GAZVANI, R.; TEMPLETON, A. New considerations for the pathogenesis of endometriosis. **International Journal of Gynaecology and Obstetrics: The Official Organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics**, v. 76, n. 2, p. 117–126, fev. 2002.

GRAESSLIN, O. *et al.* Endometrial tumor invasiveness is related to metalloproteinase 2 and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 expressions.

International Journal of Gynecological Cancer: Official Journal of the International Gynecological Cancer Society, v. 16, n. 5, p. 1911–1917, out. 2006.

GROOTHUIS, P. G. *et al.* Vascular development in endometriosis. **Angiogenesis**, v. 8, n. 2, p. 147–156, abr. 2005.

HOWARD, F. M. Surgical treatment of endometriosis. **Obstetrics and Gynecology Clinics of North America**, v. 38, n. 4, p. 677–686, dez. 2011.

HULL, M. L. *et al.* Antiangiogenic agents are effective inhibitors of endometriosis. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 88, n. 6, p. 2889–2899, jun. 2003.

JONES, R. C. The effect of a luteinizing hormone releasing hormone (LRH) agonist (Wy-40,972), levonorgestrel, danazol and ovariectomy on experimental endometriosis in the rat. **Acta Endocrinologica**, v. 106, n. 2, p. 282–288, jun. 1984.

KRUITWAGEN, R. F. *et al.* Endometrial epithelial cells in peritoneal fluid during the early follicular phase. **Fertility and Sterility**, v. 55, n. 2, p. 297–303, fev. 1991.

LASCHKE, M. W. *et al.* Endothelial progenitor cells contribute to the vascularization of endometriotic lesions. **The American Journal of Pathology**, v. 178, n. 1, p. 442–450, jan. 2011.

LASCHKE, M. W.; GIEBELS, C.; MENDER, M. D. Vasculogenesis: a new piece of the endometriosis puzzle. **Human Reproduction Update**, v. 17, n. 5, p. 628–636, out. 2011.

LASCHKE, M. W.; MENDER, M. D. Anti-angiogenic treatment strategies for the therapy of endometriosis. **Human Reproduction Update**, v. 18, n. 6, p. 682–702, dez. 2012.

LIU, H. *et al.* Correlation between matrix metalloproteinase-9 and endometriosis. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n. 10, p. 13399–13404, 1 out. 2015.

LIU, S. *et al.* Efficacy of Anti-VEGF/VEGFR Agents on Animal Models of Endometriosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PloS One**, v. 11, n. 11, p. e0166658, 2016.

LONDERO, A. P. *et al.* Survivin, MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2: their impact on survival, implantation, and proliferation of endometriotic tissues. **Virchows Archiv: An International Journal of Pathology**, v. 461, n. 5, p. 589–599, nov. 2012.

MACHADO, D. E. *et al.* Vascular density and distribution of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 (Flk-1) are significantly higher in patients with deeply infiltrating endometriosis affecting the rectum. **Fertility and Sterility**, v. 90, n. 1, p. 148–155, jul. 2008.

NAP, A. W. *et al.* Antiangiogenesis therapy for endometriosis. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 89, n. 3, p. 1089–1095, mar. 2004.

NISOLLE, M. *et al.* Morphometric study of the stromal vascularization in peritoneal endometriosis. **Fertility and Sterility**, v. 59, n. 3, p. 681–684, mar. 1993.

NOVELLA-MAESTRE, E. *et al.* Dopamine agonist administration causes a reduction in endometrial implants through modulation of angiogenesis in experimentally induced endometriosis. **Human Reproduction (Oxford, England)**, v. 24, n. 5, p. 1025–1035, maio 2009.

OLLENDORF, D. A.; COLBY, J. A.; PEARSON, S. D. Comparative effectiveness of anti-VEGF agents for diabetic macular edema. **International Journal of Technology Assessment in Health Care**, v. 29, n. 4, p. 392–401, out. 2013.

OZER, H. *et al.* The efficacy of bevacizumab, sorafenib, and retinoic acid on rat endometriosis model. **Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)**, v. 20, n. 1, p. 26–32, jan. 2013.

PETTA, C. A. *et al.* A 3-year follow-up of women with endometriosis and pelvic pain users of the levonorgestrel-releasing intrauterine system. **European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology**, v. 143, n. 2, p. 128–129, abr. 2009.

POLI NETO, O. B. *et al.* Expression of p63 differs in peritoneal endometriosis, endometriomas, adenomyosis, rectovaginal septum endometriosis, and abdominal wall endometriosis. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 131, n. 7, p. 1099–1102, jul. 2007.

RICCI, A. G. *et al.* Effect of vascular endothelial growth factor inhibition on endometrial implant development in a murine model of endometriosis. **Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)**, v. 18, n. 7, p. 614–622, jul. 2011.

SAMPSON, J. A. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 14, n. 4, p. 422–469, 1 jan. 1927.

SHIH, T.; LINDLEY, C. Bevacizumab: an angiogenesis inhibitor for the treatment of solid malignancies. **Clinical Therapeutics**, v. 28, n. 11, p. 1779–1802, nov. 2006.

SILVA, J. C. R. E *et al.* Experimental endometriosis model in rabbits with follow-up of the lesions. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 26, n. 9, p. 715–719, out. 2004.

SONG, W.-W. *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor C and anti-angiogenesis therapy in endometriosis. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 7, n. 11, p. 7752–7759, 2014.

SOYSAL, D. *et al.* A novel angiogenesis inhibitor bevacizumab induces apoptosis in the rat endometriosis model. **Balkan journal of medical genetics: BJMG**, v. 17, n. 2, p. 73–80, dez. 2014.

STREULI, I. *et al.* An update on the pharmacological management of endometriosis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 14, n. 3, p. 291–305, fev. 2013.

SUGINAMI, H. A reappraisal of the coelomic metaplasia theory by reviewing endometriosis occurring in unusual sites and instances. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 165, n. 1, p. 214–218, jul. 1991.

TAYLOR, R. N.; LEBOVIC, D. I.; MUELLER, M. D. Angiogenic factors in endometriosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 955, p. 89-100, 396–406, mar. 2002.

UCHIIDE, I.; IHARA, T.; SUGAMATA, M. Pathological evaluation of the rat endometriosis model. **Fertility and Sterility**, v. 78, n. 4, p. 782–786, out. 2002.

WEIGEL, M. T. *et al.* Differential expression of MMP-2, MMP-9 and PCNA in endometriosis and endometrial carcinoma. **European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology**, v. 160, n. 1, p. 74–78, jan. 2012.

WORLEY, M. J. *et al.* Endometriosis-associated ovarian cancer: a review of pathogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 3, p. 5367–5379, 6 mar. 2013.

Anexo

Carta de Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética no Uso de Animais —
(16)3315-3301

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 078/2014, sobre o projeto intitulado “*Influência de agentes antiangiogênicos (Bevacizumab e Pegaptanib) em endometriose experimentalmente induzida em ratas*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Julio Cesar Rosa e Silva** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 17 de dezembro de 2014.

We certify that the protocol n° 078/2014, entitled “*Effect of antiangiogenics drugs (Bevacizumab and Pegaptanib) in experimental endometriosis in female rats*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 12/17/2014.

Ribeirão Preto, 17 de dezembro de 2014.

Prof. Dr. Omero Benedito Poli-Neto
Presidente da CEUA – FMRP - USP