

**BÁRBARA STEFANY DA SILVA SOUZA**

**Caracterização de células endometriais humanas em sistema 3D: o modelo e suas possibilidades de estudo**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

**São Paulo**

**2023**

**BÁRBARA STEFANY DA SILVA SOUZA**

**Caracterização de células endometriais humanas em sistema 3D: o modelo e suas possibilidades de estudo**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

**Área de concentração:** Biologia Celular, Tecidual e do Desenvolvimento

**Orientadora:** Profa. Dra. Estela Maris Andrade Forell Bevilacqua

Versão Corrigida

**São Paulo**

**2023**

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica  
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Stefany da Silva Souza, Bárbara  
Caracterização de células endometriais humanas em  
sistema 3D: o modelo e suas possibilidades de  
estudo / Bárbara Stefany da Silva Souza;  
orientadora Estela Maris Andrade Forell  
Bevilacqua. -- São Paulo, 2023.  
107 p.

Dissertação (Mestrado) ) -- Universidade de São  
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Endométrio. 2. epitélio uterino. 3. células  
estromais. 4. matriz extracelular. 5.  
trofoblasto. I. Maris Andrade Forell Bevilacqua,  
Estela, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Bárbara Stefany da Silva Souza

Titulo da Dissertação/Tese: Caracterização de células endometriais humanas em sistema 3D:  
o modelo e suas possibilidades de estudo

Orientador: Profa. Dra. Estela Maris Andrade Forell Bevilacqua

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de  
Doutorado, em sessão publica realizada a ...../...../....., considerou o(a) candidato(a):

(    ) **Aprovado(a)**            (    ) **Reprovado(a)**

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente:                              Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

COMISSÃO NACIONAL DE  
ÉTICA EM PESQUISA



**PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** CARACTERIZAÇÃO DE UM AMBIENTE ENDOMETRIAL 3D PARA ESTUDOS DA FISILOGIA UTERINA E INTERAÇÃO-MATerno FETAL

**Pesquisador:** Estela Bevilacqua

**Área Temática:** Reprodução Humana (pesquisas que se ocupam com o funcionamento do aparelho reprodutor, procriação e fatores que afetam a saúde reprodutiva de humanos, sendo que nessas pesquisas serão considerados "participantes da pesquisa" todos os que forem afetados pelos procedimentos delas);  
(Manipulação de gametas, pré-embriões, embriões e feto);

**Versão:** 1

**CAAE:** 72592823.0.0000.5467

**Instituição Proponente:** Universidade de São Paulo

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 6.342.104

**Apresentação do Projeto:**

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa (PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_2154873.pdf, gerado pela Plataforma Brasil em de 03/08/2023).

**INTRODUÇÃO**

O processo de implantação é uma etapa complexa e crucial do desenvolvimento humano e é regida por interações específicas entre o conceito e o endométrio materno. Quando comparada a outros mamíferos, a reprodução humana parece não ser um processo eficiente. Casais considerados jovens (idade materna/paterna 35 anos), saudáveis e férteis tem uma probabilidade ao redor de 25% de engravidar dentro de um ciclo menstrual, enquanto em alguns primatas pode chegar a 80% e em coelhos, 90%. Mesmo com os avanços nas tecnologias de fertilização in vitro e com os métodos de estimulação hormonal, falhas de implantação continuam a ser um problema recorrente, muitas vezes por defeitos endometriais desconhecidos. Estas situações enfatizam a necessidade de estudos que permitam abordar esta interface e compreender esta interação em

**Endereço:** SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.719-040

**UF:** DF

**Município:** BRASÍLIA

**Telefone:** (61)3315-5877

**E-mail:** conep@saude.gov.br

Continuação do Parecer: 6.342.104

seus múltiplos mecanismos de sinalização e desenvolvimento. Os principais componentes que atuam para o sucesso da implantação embrionária são: - o endométrio, que tem que estar em seu estado receptivo e, - o embrião, ativado e apto a interagir com o organismo materno. Apesar da vasta literatura sobre o processo de implantação em humanos, ainda existem muitos hiatos a serem preenchidos e compreendidos, aonde modelos de estudo in vitro, poderiam auxiliar de forma significativa. Neste projeto, pretendemos modelar in vitro cocultivos em 3D, para o estudo da fisiologia uterina e da interação entre células humanas endometriais e trofoblásticas, uma etapa de relevância para a implantação e ainda pouco estudada. Ainda, pretendemos estabelecer se esta interação desempenha algum papel na indução de morte das células dos vasos uterinos, o que poderia explicar a precoce circulação que se estabelece durante o processo de implantação embrionária.

#### HIPÓTESE

1. O ambiente 3D de tecido endometrial reconstituído a partir de células obtidas de biópsias uterinas pode ser um excelente modelo para o estudo da fisiologia uterina e das relações materno-embriônicas.
2. As células do trofotoderma induzem morte nas células endoteliais para que possam ocupar seus espaços e estabelecer uma superfície de contato com o sangue materno durante a implantação embrionária, o que pode ser de fundamental importância para o sucesso da gestação.

#### METODOLOGIA

As células endometriais serão obtidas de biópsias de mulheres de casais com fator masculino de infertilidade e com indicação de tratamento por fertilização in vitro. Todo material será coletado após consentimento das pacientes a partir da assinatura do termo de doação de material biológico para pesquisa. As biópsias serão realizadas em ambulatório com o uso de cateter Pipelle após assepsia do colo uterino. Parte da amostra seguirá rotina de análise na Clínica Huntington e parte imediatamente enviada ao Laboratório de Estudos no ICB-USP. As biópsias serão digeridas com colagenase II e DNase I, e filtradas em filtro de 70 µm para a retenção das glândulas endometriais. As células que passarem pelo filtro serão submetidas à seleção positiva em coluna imunomagnética MACS, com microbeads acoplados ao anticorpo anti-CD105, para a obtenção das células endoteliais e estromais. Brevemente, as células do filtrado serão incubadas com beads magnéticos aderidos ao anticorpo anti-endoglin - expresso em células endoteliais. Células ligadas ao anticorpo e presas magneticamente a parede do tubo - endoteliais - serão liberadas e

**Endereço:** SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.719-040

**UF:** DF

**Município:** BRASÍLIA

**Telefone:** (61)3315-5877

**E-mail:** conep@saude.gov.br

Continuação do Parecer: 6.342.104

coletadas assim como as demais que passaram pela coluna -células estromais. Todas as células estromais e endoteliais serão isoladamente cultivadas em meio DMEM/F12 suplementado (10% soro bovino fetal, antibióticos [50 U/mL penicilina/ 0,05 mg/mL estreptomicina] e uma mistura de - estradiol/progesterona), a 37°C, em atmosfera úmida, contendo 5% de CO<sub>2</sub>. O ambiente 3D será construído em placas Transwell. No compartimento superior será adicionada uma mistura de fibronectina-colágeno V-colágeno I-colágeno III (BD) nas concentrações 0,04 g/mL, 0,04 g/mL, 320 g/mL e 320 g/mL, respectivamente contendo 2X10<sup>4</sup> células estromais. Após 2 horas em incubadora a 37°C, para a polimerização dos componentes receberão meio DMEM/F12 suplementado contendo células endoteliais. O compartimento inferior do sistema receberá o mesmo meio de cultura, porém sem soro. O sistema será mantido a 37°C, com 5 % de CO<sub>2</sub> por adicionais 48 horas para a caracterização morfológica e de viabilidade das células cocultivadas. Células endoteliais cultivadas sobre matriz extracelular por 18 h, receberão em sua superfície blastocistos humanos aneuploides (n=2/placa), previamente descongelados. A avaliação morfológica incluirá análise ultraestrutural e imuno-histoquímica com biomarcadores de ambos os tipos celulares e avaliação da indução de morte celular na presença ou ausência do trofotoderma. Serão realizadas reações imuno-histoquímicas duplas com os anticorpos anti-Cdx2 (células indiferenciadas de trofotoderma) - hCG (gonadotrofina coriônica, células diferenciadas de trofoblasto); anti-CD105 (para a identificação de células endoteliais) - anti-vimentina (identificação de células de origem mesenquimal) e respectivos anticorpos secundários conjugados a FITC ou TRITC. Também serão realizadas imunoreações anti caspase 3 ativada para a identificação de células em processo de apoptose. Para a análise ultraestrutural, as coculturas seguirão procedimentos rotineiros para inclusão em resina Spurr.

#### CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

**Blastocistos aneuploides:** Casais utilizando gametas próprios que possuam embriões humanos inviáveis para a transferência uterina após serem diagnosticados como aneuploides, que possam ser doados para pesquisa de acordo com a Lei de Biossegurança de 2005; e a resolução CFM no 2.168/2017 e que tenham assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido deste estudo. Idade materna até 37 anos e idade paterna até 45 anos. Embriões que possuam classificação morfológica entre A e B (AA, AB, BA, BB e BC).  
**Biópsias uterinas:** Poderão ser incluídas no estudo mulheres saudáveis com idade 35 anos, com ambos os ovários, sem anomalia pélvica e/ou uterinas clinicamente significativas; com dosagens séricas hormonais dentro dos limites de normalidade (FSH, LH).

**Endereço:** SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.719-040

**UF:** DF

**Município:** BRASILIA

**Telefone:** (61)3315-5877

**E-mail:** conep@saude.gov.br

Continuação do Parecer: 6.342.104

#### CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Blastocistos aneuploides: Não assinatura do TCLE por casais com embriões doados para pesquisa. Pacientes com idade materna superior a 38 anos e idade paterna superior a 46 anos. Embriões que possuam classificação morfológica C (AC, BC, CA, CB, CC).

Biópsias uterinas: Serão excluídas do estudo mulheres que: apresentarem doenças crônicas, degenerativas, genéticas ou autoimunes ou ainda que estiverem reconhecidamente infectadas por HIV, HCV ou HBV; utilizarem medicamentos de forma crônica; apresentarem hidrossalpinge ou adeniose; portadoras de malformações uterinas; ou que tiverem realizado cirurgia prévia uterina, como miomectomia ou curetagem.

#### Objetivo da Pesquisa:

##### OBJETIVO PRIMÁRIO

Caracterizar um modelo de estudo 3D de ambiente endometrial para a análise da fisiologia uterina e das interações materno-embriônicas, aqui representadas pela interface células trofoblásticas-células endoteliais humanas cocultivadas.

##### OBJETIVO SECUNDÁRIO

Avaliar o papel do trofoblasto na indução de morte no endotélio vascular endometrial, o que poderia explicar o acesso do sangue materno à superfície trofoblástica durante a implantação embrionária e formação da placenta.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

##### RISCOS

Sobre possíveis riscos às doadoras das amostras:

1. Todos os dados das doadoras de embriões e biópsias serão mantidos em anonimato e armazenados em arquivos eletrônicos, sob a responsabilidade da Clínica Huntington. A identidade será mantida em sigilo e anonimato, em todos os momentos do estudo e na divulgação dos resultados. Apesar de todas as medidas disponíveis para a manutenção do anonimato dos dados serem tomadas pela equipe da pesquisa, existe risco de quebra acidental do anonimato dos dados.
2. Os embriões que serão utilizados nessa na pesquisa serão destruídos e não poderão mais ser utilizados para fins reprodutivos, contudo, por serem diagnosticados como aneuploides, esses embriões são considerados inviáveis para a transferência uterina. Por envolver a destruição de seus embriões concedidos para a pesquisa, a participação neste estudo envolve o risco de

**Endereço:** SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.719-040

**UF:** DF

**Município:** BRASÍLIA

**Telefone:** (61)3315-5877

**E-mail:** conep@saude.gov.br

## COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 6.342.104

arrependimento que pode acarretar em desconforto psicológico.

3. A obtenção das biópsias envolve procedimento ambulatorial por equipe médica competente, com acompanhamento clínico posterior; no entanto, pode provocar desconforto ou dor (cólicas) posteriores à coleta. Na eventualidade de ocorrência de qualquer dano ou prejuízo às doadoras de amostras/embrões em decorrência da participação deste estudo, a equipe de pesquisa responsável imediatamente garantirá acompanhamento e suporte gratuito, sejam eles diretos ou indiretos e imediatos ou tardios, pelo tempo necessário.

### BENEFÍCIOS

A participação neste estudo não traz benefícios diretos para as doadoras das amostras. Porém, indiretamente elas contribuirão para que novos conhecimentos sobre o processo de implantação do embrião humano no útero possam ser descobertos, e para que, no futuro, esse conhecimento possa auxiliar nos tratamentos de reprodução humana. Não haverá recompensa financeira para participar deste estudo, mas também não haverá qualquer despesa com a realização deste estudo. Todas as despesas com a pesquisa serão de total responsabilidade do pesquisador responsável. Isto quer dizer que a participante da pesquisa e seu acompanhante, não arcarão com nenhum custo referente a procedimentos e/ou exames envolvidos no desenvolvimento deste estudo.

### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo nacional e unicêntrico utilizando células isoladas de biópsias endometriais para a construção de sistemas 3D de cocultivo como suporte para a interação com a trofotoderme de embriões aneuploides. Este desenho experimental pretende caracterizar o sistema 3D contendo células endometriais e também, analisar as relações possíveis destas células com as células da trofotoderme embrionária, mimetizando em parte o processo de implantação embrionária. Além de poder suprir informações sobre a fisiologia endometrial e da interação materno-fetal, o sucesso deste modelo poderá ser de valia para estudos de atividade biológica e clínica no escopo da infertilidade feminina humana.

2 braços: (1) Doadoras de biópsia uterinas; (2) Doadoras de blastocistos aneuploides.

Orçamento: R\$ 19.000,00.

Número de participantes incluídos no Brasil: 15.

**Endereço:** SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar  
**Bairro:** Asa Norte **CEP:** 70.719-040  
**UF:** DF **Município:** BRASILIA  
**Telefone:** (61)3315-5877 **E-mail:** conepe@saude.gov.br

## COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 6.342.104

Previsão de início do estudo: 11/09/2023.

Previsão de encerramento do estudo: 10/09/2024.

### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

### Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram identificados óbices éticos neste protocolo.

### Considerações Finais a critério da CONEP:

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Conep, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Protocolo aprovado.

### Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2154873.pdf	03/08/2023 15:07:48		Aceito
Outros	Carta_resposta_jul23.pdf	03/08/2023 14:58:59	Estela Bevilacqua	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto2.pdf	03/08/2023 14:58:26	Estela Bevilacqua	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_pesquisador5.pdf	03/08/2023 14:57:28	Estela Bevilacqua	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_pesquisador4.pdf	03/08/2023 14:57:12	Estela Bevilacqua	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_pesquisador3.pdf	03/08/2023 14:56:56	Estela Bevilacqua	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_Pesquisador2.pdf	11/07/2023 17:28:12	Estela Bevilacqua	Aceito
Declaração de concordância	Termo_Compromisso_Huntington.pdf	11/07/2023 17:25:58	Estela Bevilacqua	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	TCLE2.docx	11/07/2023 17:24:47	Estela Bevilacqua	Aceito

**Endereço:** SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.719-040

**UF:** DF

**Município:** BRASÍLIA

**Telefone:** (61)3315-5877

**E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE  
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 6.342.104

Justificativa de Ausência	TCLE2.docx	11/07/2023 17:24:47	Estela Bevilacqua	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE1.docx	11/07/2023 17:24:33	Estela Bevilacqua	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_Pesquisador1.pdf	11/07/2023 17:22:52	Estela Bevilacqua	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_Infraestrutura2.pdf	11/07/2023 17:22:32	Estela Bevilacqua	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_Infraestrutura1.pdf	11/07/2023 17:22:05	Estela Bevilacqua	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado.docx	11/07/2023 17:21:40	Estela Bevilacqua	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

BRASILIA, 09 de Outubro de 2023

---

**Assinado por:**  
**Láís Alves de Souza Bonilha**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar  
**Bairro:** Asa Norte **CEP:** 70.719-040  
**UF:** DF **Município:** BRASILIA  
**Telefone:** (61)3315-5877 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE  
ÉTICA EM PESQUISA



**PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP**

**DADOS DA EMENDA**

**Título da Pesquisa:** PAPEL DAS CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS NA INDUÇÃO DE FATORES ANGIOGÊNICOS PELO EPITÉLIO GLANDULAR UTERINO. ANÁLISE EM SISTEMAS 3D DE CO-CULTIVO

**Pesquisador:** Estela Bevilacqua

**Área Temática:** Reprodução Humana (pesquisas que se ocupam com o funcionamento do aparelho reprodutor, procriação e fatores que afetam a saúde reprodutiva de humanos, sendo que nessas pesquisas serão considerados "participantes da pesquisa" todos os que forem afetados pelos procedimentos delas):  
(Manipulação de gametas, pré-embriões, embriões e feto;);

**Versão:** 7

**CAAE:** 31433520.1.0000.5467

**Instituição Proponente:** Universidade de São Paulo

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 6.265.408

**Apresentação do Projeto:**

As informações contidas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram obtidas dos documentos contendo as Informações Básicas sobre o Projeto de Pesquisa (PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_1919967\_E1.pdf de 11/07/2023) e do Projeto Detalhado.

**INTRODUÇÃO**

O processo de implantação é uma etapa complexa e crucial do desenvolvimento humano e é regida por interações específicas entre o conceito e o endométrio materno. Quando comparada a outros mamíferos, a reprodução humana parece não ser um processo eficiente. Casais considerados jovens (idade materna/paterna 35 anos), saudáveis e férteis tem uma probabilidade ao redor de 25% de engravidar dentro de um ciclo menstrual, enquanto em alguns primatas pode chegar a 80% e em coelhos, 90%. Mesmo com os avanços nas tecnologias de fertilização in vitro e com os métodos de estimulação hormonal, falhas de implantação continuam a ser um problema recorrente, muitas vezes por defeitos endometriais desconhecidos. Estas situações enfatizam a

**Endereço:** SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar  
**Bairro:** Asa Norte **CEP:** 70.719-040  
**UF:** DF **Município:** BRASILIA  
**Telefone:** (61)3315-5877 **E-mail:** conep@saude.gov.br

## COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 6.265.408

necessidade de estudos que permitam abordar esta interface e compreender esta interação em seus múltiplos mecanismos de sinalização e desenvolvimento. Os principais componentes que atuam para o sucesso da implantação embrionária são: - o endométrio, que tem que estar em seu estado receptivo e, - o embrião, ativado e apto a interagir com o organismo materno. Apesar da vasta literatura sobre o processo de implantação em humanos, ainda existem muitos hiatos a serem preenchidos e compreendidos, aonde modelos de estudo in vitro, poderiam auxiliar de forma significativa. Neste projeto, pretendemos modelar in vitro co-cultivos em 3D, para a interação entre células humanas de trofoblasto e glândulas uterinas endometriais, uma etapa de relevância para a implantação e ainda pouco estudada. Ainda, pretendemos estabelecer se esta interação desempenha algum papel na indução de expressão de VEGF pelas glândulas uterinas.

### HIPÓTESES

1. As células do trofotoderma modulam a expressão de fatores angiogênicos pelas células glandulares uterinas durante a implantação embrionária, o que pode ser de fundamental importância para o sucesso da gestação.
2. As células trofoblásticas induzem morte nas células vasculares endometriais para criar um acesso ao sangue materno.

### METODOLOGIA

Blastocistos - vinte blastocistos serão fornecidos pela Clínica Huntington, de casais em tratamento de infertilidade que possuem embriões congelados e inviáveis para transferência para o útero. Somente serão considerados embriões diagnosticados como aneuploides (desbalanço no número de cromossomos, após teste genético pré-implantacional, realizado pelo laboratório Igenomix, SP). A equipe de Embriologia - Grupo Huntington, informará os casais sobre o presente estudo, após o mesmo ser aprovado pelo Sistema CEP/CONEP. Os que aceitarem participar da pesquisa deverão assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Após consentimento, os embriões serão descongelados pela pesquisadora responsável e terão a sua massa celular interna separada da trofotoderma. As placas com trofotoderma serão transportadas para o Laboratório de Estudos da Biologia do Trofoblasto, ICB-USP para o protocolo de cocultivo. (Os embriões serão identificados apenas por números, a identidade dos pacientes será mantida em anonimato; os dados e documentos serão armazenados confidencialmente em arquivos eletrônicos com acesso restrito pelos pesquisadores do grupo). Células epiteliais e endoteliais – serão obtidas de biópsias (n=10) de mulheres de casais com fator masculino de infertilidade e com indicação de tratamento

**Endereço:** SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar  
**Bairro:** Asa Norte **CEP:** 70.719-040  
**UF:** DF **Município:** BRASÍLIA  
**Telefone:** (61)3315-5877 **E-mail:** conep@saude.gov.br

## COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 6.265.408

por fertilização in vitro. Todo material será coletado após consentimento das pacientes a partir da assinatura do termo de doação de material biológico para pesquisa. As biópsias serão realizadas em caráter ambulatorial com o uso do cateter Pipelle após adequada assepsia do colo uterino. Parte da amostra endometrial coletada seguirá rotina de análise na Clínica Huntington e parte será imediatamente colocada em meio DMEM/F12 (Sigma®-Aldrich) a 4°C e enviada ao Laboratório de Estudos da Biologia do Trofoblasto no ICB-USP. As biópsias serão lavadas e digeridas com colagenase II (1 mg/mL) e DNase I (0,1 mg/mL). Após, serão filtradas em filtro de 70 µm (Cell Strainer; BD) para a retenção das glândulas endometriais. Apenas glândulas com estrutura intacta serão coletadas e cuidadosamente acondicionadas em alíquotas e então congeladas em nitrogênio líquido, identificadas e mantidas em freezer -80°C. As células restantes da digestão enzimática serão passadas em uma coluna magnética para obtenção das células endoteliais. O ambiente 3D será inicialmente construído utilizando-se uma mistura de fibronectina-colágeno V-colágeno I-colágeno III (BD) nas concentrações 0,04 g/mL, 0,04 g/mL, 320 g/mL e 320 g/mL, respectivamente. Após a gelificação da matriz, o sistema receberá as alíquotas de células glandulares ou endoteliais em meio DMEM/F12 suplementado com 10% SBF. Células glandulares uterinas ou endoteliais cultivadas em matriz extracelular (n=10) por 18 h, receberão em sua superfície blastocistos humanos aneuploides (n=2), previamente descongelados. A avaliação morfológica posterior (n=10) incluirá análise ultraestrutural e imunohistoquímica com biomarcadores de ambos os tipos celulares e avaliação da expressão gênica de VEGF/sFLT1 pelas células glandulares na presença ou ausência de blastocistos (n=10). Para análises morfológicas, serão realizadas reações imunohistoquímicas duplas com os anticorpos primários IgG de camundongo anti-Cdx2 (SIGMA, células indiferenciadas de trofotoderma) ou hCG (SIGMA, células diferenciadas de trofoblasto, gonadotrofina coriônica), IgG de coelho anti-glicodelina (LSBio) para a identificação de células glandulares e IgG de coelho anti-CD-31 (Sigma) para identificação de células endoteliais e respectivos anticorpos secundários anti-IgG de camundongo-FITC (SIGMA) e anti-IgG de coelho-TRITC (SIGMA). Para a análise ultraestrutural, as co-culturas seguirão procedimentos rotineiros para inclusão em resina Spurr. A expressão dos fatores angiogênicos VEGF e sFLT1 será avaliada nas células glandulares uterinas sem ou com a interação com as células trofoblásticas (análises de expressão gênica por RT-PCR).

### CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Blastocistos aneuploides: Casais utilizando gametas próprios que possuam embriões humanos inviáveis para a transferência uterina após serem diagnosticados como aneuploides, que possam

**Endereço:** SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar  
**Bairro:** Asa Norte **CEP:** 70.719-040  
**UF:** DF **Município:** BRASÍLIA  
**Telefone:** (61)3315-5877 **E-mail:** conepe@saude.gov.br

## COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 6.265.408

ser doados para pesquisa de acordo com a Lei de Biossegurança de 2005; e a Resolução CFM n° 2.168/2017 e que tenham assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido deste estudo. Idade materna até 37 anos e idade paterna até 45 anos. Embriões que possuam classificação morfológica entre A e B (AA, AB, BA, BB e BC).

Biópsias uterinas: Poderão ser incluídas no estudo mulheres saudáveis com idade 35 anos, com ambos os ovários, sem anomalia pélvica e/ou uterinas clinicamente significativas; com dosagens séricas hormonais dentro dos limites de normalidade (FSH, LH).

### CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Blastocistos aneuploides: Não assinatura do TCLE por casais com embriões doados para pesquisa. Pacientes com idade materna superior a 38 anos e idade paterna superior a 46 anos. Embriões que possuam classificação morfológica C (AC, BC, CA, CB, CC).

Biópsias uterinas: Serão excluídas do estudo mulheres que: apresentem doenças crônicas, degenerativas, genéticas ou auto-imunes ou ainda que estiverem reconhecidamente infectadas por HIV, HCV ou HBV; utilizarem medicamentos de forma crônica; apresentem hidrossalpinge ou adenomiose; portadoras de malformações uterinas; ou que tiverem realizado cirurgia prévia uterina, como miomectomia ou curetagem.

### Objetivo da Pesquisa:

#### OBJETIVO PRIMÁRIO

Caracterizar um modelo de estudo 3D para a análise das interações materno-embrionárias, aqui representadas pela interface células trofoblásticas e células glândulares endometriais humanas co-cultivadas.

#### OBJETIVO SECUNDÁRIO

Avaliar o papel do trofoblasto na indução de expressão de fatores angiogênicos (VEGF, sFLT1) pelo epitélio glandular, o que é de vital importância para a compreensão da fisiologia da implantação embrionária.

### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

#### RISCOS

Sobre possíveis riscos às doadoras das amostras:

1. Todos os dados das doadoras de embriões e biópsias serão mantidos em anonimato e armazenados em arquivos eletrônicos, sob a responsabilidade da Clínica Huntington. A identidade será mantida em sigilo e anonimato, em todos os momentos do estudo e na divulgação dos

**Endereço:** SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar  
**Bairro:** Asa Norte **CEP:** 70.719-040  
**UF:** DF **Município:** BRASILIA  
**Telefone:** (61)3315-5877 **E-mail:** conep@saude.gov.br

## COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 6.265.408

resultados. Apesar de todas as medidas disponíveis para a manutenção do anonimato dos dados serem tomadas pela equipe da pesquisa, existe risco de quebra acidental do anonimato dos dados.

2. Os embriões que serão utilizados nessa na pesquisa serão destruídos e não poderão mais ser utilizados para fins reprodutivos, contudo, por serem diagnosticados como aneuploides, esses embriões são considerados inviáveis para a transferência uterina. Por envolver a destruição de seus embriões concedidos para a pesquisa, a participação neste estudo envolve o risco de arrependimento que pode acarretar em desconforto psicológico.

3. A obtenção das biópsias envolve procedimento ambulatorial por equipe médica competente, com acompanhamento clínico posterior; no entanto, pode provocar desconforto ou dor (cólicas) posteriores à coleta. Na eventualidade de ocorrência de qualquer dano ou prejuízo às doadoras de amostras/embriões em decorrência da participação deste estudo, a equipe de pesquisa responsável imediatamente garantirá acompanhamento e suporte gratuito, sejam eles diretos ou indiretos e imediatos ou tardios, pelo tempo necessário.

### BENEFÍCIOS

A participação neste estudo não traz benefícios diretos para as doadoras das amostras. Porém, indiretamente elas contribuirão para que novos conhecimentos sobre o processo de implantação do embrião humano no útero possam ser descobertos, e para que, no futuro, esse conhecimento possa auxiliar nos tratamentos de reprodução humana.

### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

#### EMENDA 1

Justificativa da emenda: Durante as etapas iniciais da implantação em humanos, células trofoblásticas interagem com células epiteliais e endoteliais uterinas. Esta interação se acredita incluir tanto o contato físico como uma sinalização funcional. Inicialmente propomos o estudo da interação e sinalização entre trofoblasto e células epiteliais glandulares obtidas de biópsias endometriais. Neste delineamento, as demais células não glandulares obtidas no mesmo processamento das biópsias deveriam ser descartadas. Neste contexto, cientes da preciosidade do material, incluímos o isolamento e procedimentos experimentais com as células que seriam descartadas sem a necessidade de alteração no número de experimentos ou de obtenção de novas coletas. Estas células – endoteliais e conjuntivas – seriam utilizadas nos sistemas 3D (à semelhança do proposto para células glandulares) para a análise da interação do trofoblasto com o endotélio, uma etapa crítica da implantação embrionária em humanos e sobre a qual não existem

**Endereço:** SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar  
**Bairro:** Asa Norte **CEP:** 70.719-040  
**UF:** DF **Município:** BRASÍLIA  
**Telefone:** (61)3315-5877 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE  
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 6.265.408

informações essenciais. Esta análise poderia nos dar informações de como ocorre a intrusão das células trofoblásticas nos vasos maternos e se esse processo envolve morte das células vasculares.

Os documentos alterados na presente emenda foram:

1.PROTOCOLO DETALHADO de 23/02/2023.

Principal Razão da alteração: Possibilidade de ampliação do projeto para que novas abordagens possam ser realizadas com o mesmo material de biópsias endometriais previamente aprovadas.

2.TERMOS DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO de 23/02/2023.

Principal Razão da alteração: A nova versão do termo de consentimento livre e esclarecido foi atualizada para incluir as novas informações da nova versão do projeto citadas na justificativa.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Análise das respostas ao Parecer Consubstanciado nº 6.070.873 emitido pela Conep em 21/05/2023.

1. Quanto ao arquivo "Detalhamento\_das\_emendas\_solicitadas.pdf" submetido na Plataforma Brasil em 23/02/2023: Na página 2 de 4 lê-se: "Exclusão do estudante Gustavo Henrique Doná Rodrigues Almeida e inclusão de alunas de iniciação científica (Helena Hae Jin Chi e Elisa Lie Martines Matsumura)". Solicita-se incluir os novos integrantes do projeto na Aba 1 - Informações Preliminares, da Plataforma Brasil.

RESPOSTA: Exclusão de Gustavo Henrique Doná Rodrigues Almeida foi realizada conforme indicado. Devido à proximidade de término do curso de Biomedicina da aluna Helena Hae Jin Chi, ela não participará mais do projeto. O sistema não reconheceu o CPF da aluna de iniciação científica Elisa Lie Martines Matsumura para sua inclusão. Para não atrasar o processo que é vital para as pós-graduandas envolvidas, optamos por retirar a inclusão da aluna deste projeto.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2. Quanto ao arquivo "Projeto2\_modificado\_com\_destaque.pdf" submetido na Plataforma Brasil em 23/02/2023: A presente emenda, apresenta novo desenho metodológico. A possibilidade de inserir as análises pretendidas (interação trofoblasto-endométrio-apoptose, utilizando o material

**Endereço:** SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar  
**Bairro:** Asa Norte **CEP:** 70.719-040  
**UF:** DF **Município:** BRASILIA  
**Telefone:** (61)3315-5877 **E-mail:** conep@saude.gov.br

## COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 6.265.408

vascular contido nas biópsias) caracteriza uma nova análise, ou seja, uma segunda nova etapa da pesquisa. Diante do exposto, informa-se que um novo projeto precisa ser submetido na Plataforma Brasil execução da análise da interação trofoblasto-endométrio-apoptose.

**RESPOSTA:** Conforme solicitado, foi adicionado à plataforma um novo projeto, que inclui ao original novo objetivo e metodologia referente à interação endométrio vascular-trofoblasto com ênfase na indução de apoptose. Reforçamos que o projeto visa utilizar o material vascular contido nas biópsias e que seria descartado (Projeto versão limpa e versão com destaques). Além disso, também foi adicionado novos Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) complementando a possibilidade de estudo das células vasculares neste estudo (versões com destaque – TCLE5a e TCLE5c e respectivas versões limpas TCLE5b e d). Carta da Instituição parceira confirmando sua anuência ao novo objetivo e métodos associados também foi incluída (Anuência3\_C.\_Hungtinton).

**ANÁLISE:** PENDÊNCIA NÃO ATENDIDA. Considerando que o pesquisador pretende incluir novos procedimentos com novos objetivos, o pesquisador deve submeter um novo projeto em separado deste protocolo atual, na Plataforma Brasil.

**RESPOSTA:** Histórico das modificações atuais

1. O projeto “O PAPEL DAS CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS NA INDUÇÃO DE FATORES ANGIOGÊNICOS PELO EPITÉLIO GLANDULAR UTERINO. ANÁLISE EM SISTEMAS 3D DE CO-CULTIVO” foi submetido em 2020 e aprovado pela CONEP após várias alterações solicitadas.

2. Recentemente, solicitamos um adendo a esse projeto com a introdução de estudos também das células endoteliais e vias apoptóticas além das glandulares – para isso, modificações foram realizadas no projeto assim como em seu título: (submetido como novo projeto/adendo) “PAPEL DAS CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS NA INDUÇÃO DE FATORES ANGIOGÊNICOS PELO EPITÉLIO GLANDULAR UTERINO E DE APOPTOSE NAS CÉLULAS ENDOTELIAIS. ANÁLISE EM SISTEMAS 3D DE CO-CULTIVO”

3. A análise da emenda determinou que a inclusão de novos experimentos caracterizava um novo projeto. Assim, entendemos que as emendas deveriam ser removidas (para retorno ao projeto original) e que a proposta para o estudo do endotélio fosse compilada e resubmetida como um novo projeto independente do atual. Atendendo à solicitação dos pareceristas da CONEP, estaremos submetendo novo e independente projeto.

4. As modificações atuais na plataforma Brasil referem-se, portanto, à reinserção do projeto originalmente aprovado em que todos os itens adicionados a posteriori foram removidos. As alterações realizadas para que o projeto retornasse ao seu conteúdo original estão destacadas –

**Endereço:** SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.719-040

**UF:** DF

**Município:** BRASILIA

**Telefone:** (61)3315-5877

**E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE  
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 6.265.408

Projeto\_com\_destaque e a versão original enviada como Projeto\_versao\_limpa, conforme solicitado.

5. Também foram reanexados os termos de consentimento livre e esclarecido previamente aceitos como adequados ao projeto.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

**Considerações Finais a critério da CONEP:**

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Conep, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação da emenda proposta ao projeto de pesquisa.

Situação: Emenda aprovada.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1919967_E1.pdf	11/07/2023 14:30:49		Aceito
Outros	Carta_resposta4.pdf	11/07/2023 14:27:03	Estela Bevilacqua	Aceito
Outros	Carta_resposta4.docx	11/07/2023 14:25:00	Estela Bevilacqua	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto1_versao_limpa.pdf	11/07/2023 13:57:37	Estela Bevilacqua	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto1_versao_limpa.docx	11/07/2023 13:57:14	Estela Bevilacqua	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_com_destaque.docx	11/07/2023 13:55:08	Estela Bevilacqua	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_com_destaque.pdf	11/07/2023 13:54:43	Estela Bevilacqua	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto1.pdf	11/07/2023 13:52:25	Estela Bevilacqua	Aceito
Outros	Carta_resposta2.pdf	10/07/2023 15:29:08	Estela Bevilacqua	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	TCLE2b_versao_limpa.docx	10/07/2023 14:40:36	Estela Bevilacqua	Aceito

**Endereço:** SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.719-040

**UF:** DF

**Município:** BRASÍLIA

**Telefone:** (61)3315-5877

**E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE  
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 6.265.408

Ausência	TCLE2b_versao_limpa.docx	10/07/2023 14:40:36	Estela Bevilacqua	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE2b_com_destaque.docx	10/07/2023 14:40:19	Estela Bevilacqua	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE1a_versao_limpa.docx	10/07/2023 14:38:31	Estela Bevilacqua	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE1a_com_destaque.docx	10/07/2023 14:37:55	Estela Bevilacqua	Aceito
Declaração de concordância	Anuencia2_C_Huntington.pdf	25/04/2023 15:28:20	Estela Bevilacqua	Aceito
Outros	Anexoll_com_destaque.pdf	15/12/2020 13:15:24	Estela Bevilacqua	Aceito
Outros	Anexoll_v_limpa.pdf	15/12/2020 13:08:23	Estela Bevilacqua	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	ANEXO_IV_Biorrepositorio_uso_futuro.pdf	04/05/2020 20:48:17	Estela Bevilacqua	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Regulamento_biorepositorio.pdf	04/05/2020 20:47:35	Estela Bevilacqua	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Justificativa_Biorrep.pdf	04/05/2020 20:47:16	Estela Bevilacqua	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	ANEXO_III_Biorrep_parceira.pdf	04/05/2020 20:46:56	Estela Bevilacqua	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	ANEXO_II_Biorrepositorio.pdf	04/05/2020 20:45:29	Estela Bevilacqua	Aceito
Declaração de Instituição e	Declaracao_Infraestrutura1.pdf	04/05/2020 20:41:33	Estela Bevilacqua	Aceito

**Endereço:** SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.719-040

**UF:** DF

**Município:** BRASÍLIA

**Telefone:** (61)3315-5877

**E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE  
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 6.265.408

Infraestrutura	Declaracao_Infraestrutura1.pdf	04/05/2020 20:41:33	Estela Bevilacqua	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_Infraestrutura2.pdf	04/05/2020 20:40:36	Estela Bevilacqua	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_pesquisador2.pdf	04/05/2020 20:40:06	Estela Bevilacqua	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_pesquisador1.pdf	04/05/2020 20:39:54	Estela Bevilacqua	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

BRASILIA, 29 de Agosto de 2023

---

**Assinado por:**  
**Lais Alves de Souza Bonilha**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar  
**Bairro:** Asa Norte **CEP:** 70.719-040  
**UF:** DF **Município:** BRASILIA  
**Telefone:** (61)3315-5877 **E-mail:** conep@saude.gov.br

Dedico este trabalho aos meus pais Jairo e Ednalva e ao meu noivo Augusto, fontes de suporte afável e amor imensurável.

## AGRADECIMENTOS

Costumo dizer que ninguém caminha sozinho e que juntos somos mais fortes. Então, gostaria de dedicar esse espaço para agradecer à minha equipe de caminhada (não só do trabalho, mas também da vida), essa conquista é nossa!

Primeiramente e especialmente à minha orientadora Estela Bevilacqua. Esse sonho não seria possível sem você. Obrigada pela oportunidade, pelo acolhimento, pela dedicação, pelas orientações e por todos os aprendizados proporcionados. Serei eternamente grata;

Aos meus pais, Jairo Honório e Ednalva da Silva, por serem as pessoas que mais desejam o meu bem nessa vida: vocês me motivam, me apoiam, acreditam em mim, investem em mim, me impulsionam e eu devo tudo o que sou a vocês;

Ao meu noivo, Augusto Dantas, por largar tudo em Recife e vim morar comigo em São Paulo por dois anos, por topa esse desafio e enfrentar tudo lado a lado, por ser meu companheiro de vida há quase doze anos e por cuidar tão perfeitamente do nosso amor;

À minha melhor amiga, Helena Chi, que, sem dúvidas, foi/é o melhor e maior presente que São Paulo me proporcionou. Minha companheira de laboratório (minha dupla) que enfrentou todos os obstáculos junto comigo e também, juntas, encontramos muitas soluções. Para além disso, você se tornou minha companheira de vida, que nossa amizade seja eterna e continue sempre viva, apesar da distância;

A Clayson, meu amigo querido, que, mesmo estando em Recife, se fez presente a cada momento, me dando todo o apoio que eu precisava e sem medir esforços. Que nossa amizade seja eterna;

Ao meu amigo Erikles, no qual construímos uma parceria tão inesperada e tão incrivelmente especial. Você chegou quando precisávamos de alguém exatamente como você para iluminar e somar ao nosso time. Que bom que nossa amizade foi além, que seja eterna;

8

À Franciele e à Júlia que me ensinaram muito do que eu sei hoje em relação ao laboratório e foram essenciais durante toda essa jornada. Vocês foram o meu apoio desde o início e eu serei eternamente grata;

Aos meus demais amigos de laboratório: Lari, Bia, minha turminha de Iniciação Científica (Elisa, Maria Alice, João, Ricardo, Jenifer e Amanda), Thaís e Lígia, com vocês eu aprendi muito e ficarão para sempre na minha memória e no coração;

À toda minha família, especialmente às minhas tias Cida e Mari, tio Dedé, às minhas primas Bia e Bruna e à Tais: vocês são a minha base, obrigada por tudo;

Às minhas crianças, Pedrinho, Ísis, Elisa e Otávio, por existirem e iluminarem a minha vida, despertando a minha criança interior;

À família do meu noivo que me acolheu tão bem, hoje me sinto parte da família também;

À Itana e família por acolherem a mim e ao meu noivo em São Paulo, por muitos momentos vocês foram nosso porto seguro nesses dois anos longe da nossa família;

Às minhas amigas Ilvya, Alicia, Yasmin, Juliana, Andreza, Rayssa, Gabi e Bia: nossa amizade resistiu ao tempo e a distância e eu serei eternamente grata por todo esse companheirismo;

Aos técnicos do laboratório de técnicas histológicas (Júnior, Gisela e Gaspar): a colaboração e dedicação de vocês foi essencial para o sucesso do projeto;

À Universidade de São Paulo, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas;

A todos os funcionários e docentes do Departamento de Biologia Celular e Tecidual, em especial às secretárias Patrícia e Tânia, pela atenção e dedicação com os pós-graduandos;

Aos funcionários da Clínica Huntington, em especial ao Dr. Eduardo Motta e Dra. Aline Lorenzon pela colaboração com o projeto.

E por fim, e não menos importante, à presente banca por ter aceitado nosso convite, me sinto honrada em poder contar com suas contribuições nesse momento tão importante para mim;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, 2023, nº 2020/14982-3

## RESUMO

**Introdução:** A modelagem in vitro de um sistema de cocultivo tridimensional (3D), utilizando células endometriais humanas e eventualmente células embrionárias é uma área inovadora que surge com a possibilidade de aumentar o conhecimento da fisiologia endometrial e da implantação embrionária. **Objetivos:** Caracterizar um modelo de estudo 3D com células endometriais que permita estudos da fisiologia uterina. **Material e métodos:** Células endometriais foram isoladas de biópsias uterinas femininas (n=3), coletadas de acordo com protocolos de ética em pesquisa humana (IC-USP, CONEP). As biópsias foram digeridas com colagenase II/DNAse I e filtradas para retenção das glândulas endometriais. Estas foram tripsinizadas para obtenção de células epiteliais isoladas. Esferas magnéticas anti-CD105 (MACS) foram usadas para a seleção positiva e negativa de células endoteliais e estromais, respectivamente. A pureza das amostras uterinas foi avaliada por imunofluorescência/ imunohistoquímica para as seguintes proteínas: vimentina, citoqueratina, IGFBP1 e CD105/VEGFR2. O sistema de cocultura 3D incluiu a preparação de uma matriz extracelular composta por uma mistura de fibronectina, ácido hialurônico, colágeno V, colágeno I e colágeno III em um sistema *Transwell* contendo células estromais, sobre a qual as células endoteliais e epiteliais foram plaqueadas. Como um ensaio preliminar, trofotoderma de embriões aneuploides (n=3) foram coletados e inseridos sobre as células endometriais cultivadas em sistema 3D, onde permaneceram por 48 horas e então foram processados para análise histológica. **Resultados:** O isolamento, cultivo e preparo da matriz de suporte foram padronizados e as culturas caracterizadas. O endométrio reconstituído foi caracterizado morfológicamente por coloração H&E e imunohistoquímica mostrando uma organização típica em que células vimentina-positivas se mantinham viáveis e embebidas pela matriz extracelular. Células endoteliais e epiteliais depositadas sobre essa matriz se organizaram sob a forma de uma monocamada. Apenas um fragmento embrionário constituído por trofotoderma apresentou aderência às células endometriais. **Conclusão:** O sistema de cocultivo apresentou células endoteliais, epiteliais e estromais viáveis, com características semelhantes às observadas in vivo, no que tange a sua organização tecidual e a expressão de biomarcadores típicos. A adesão do trofotoderma a esta camada sugere que mecanismos associados à implantação embrionária podem ser estudados neste modelo.

**Palavras-chave:** Endométrio, epitélio uterino, células estromais, matriz extracelular, trofotoderma.

## ABSTRACT

Characterization of human endometrial cells in a 3D system: the model and its study possibilities

**Introduction:** The in vitro modeling of a three-dimensional (3D) coculture system, using human endometrial cells and eventually embryonic cells, is an innovative area that can increase knowledge of endometrial physiology and embryo implantation. **Objectives:** Characterize a 3D study model with endometrial cells that allows studies of uterine physiology. **Material and methods:** Endometrial cells were isolated from uterine biopsies (n=3) collected according to human research ethics protocols (IC-USP, CONEP). Biopsies were digested with collagenase II/DNAse I and filtered to retain trypsinized endometrial glands to obtain isolated epithelial cells. Anti-CD105 magnetic beads (MACS) were used for the positive and negative selection of endothelial and stromal cells, respectively. The purity of uterine samples was assessed by immunofluorescence/immunohistochemistry for the following proteins: vimentin, cytokeratin, glycodelin, IGFBP1 and CD105/VEGFR2. The 3D coculture system included the preparation of an extracellular matrix composed of a mixture of fibronectin, hyaluronic acid, collagen V, collagen I and collagen III in a Transwell system containing stromal cells, onto which endothelial and epithelial cells were plated. As a preliminary test, trophoctoderm from aneuploid embryos (n=3) were collected and inserted into endometrial cells cultured in a 3D system, where they remained for 48 hours and were then processed for histological analysis. The support matrix's isolation, cultivation and preparation were standardized, and the cultures were characterized. **Results:** The reconstituted endometrium was characterized morphologically by H&E staining and immunohistochemistry, showing a typical organization in which vimentin-positive cells remained viable and embedded in the extracellular matrix. Endothelial and epithelial cells deposited on this matrix organized themselves as a monolayer. Only one embryonic fragment made up of trophoctoderm showed adherence to endometrial cells. **Conclusion:** The results show a coculture system with viable endothelial, epithelial and stromal cells, with characteristics similar to those observed in vivo, regarding their tissue organization and the expression of typical biomarkers. The adhesion of the trophoctoderm to this layer suggests that mechanisms associated with embryonic implantation can be studied in this model.

**Keywords:** Endometrium, uterine epithelium, stromal cells, extracellular matrix, trophoctoderm.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Figura ilustrativa do preparo do cultivo 3D de células endometriais em <i>Transwell</i> .....	55
<b>Figura 2:</b> Diagrama esquemático representando a preparação do sistema 3D para processamento histológico .....	57
<b>Figura 3:</b> Caracterização das células retidas no filtro, tripsinizadas e cultivadas por 48 h em sistema 2D .....	59
<b>Figura 4:</b> Caracterização das células selecionadas pelo CD105 (endoteliais) isoladas de biópsias endometriais e cultivadas por 48 h em sistema 2D .....	61
<b>Figura 5:</b> Caracterização das células estromais isoladas de biópsias endometriais e obtidas por seleção negativa com os <i>beads</i> associados a CD105.....	63
<b>Figura 6:</b> Morfologia das células estromais cultivadas em matriz 3D .....	64
<b>Figura 7:</b> Caracterização das células estromais cultivadas em matriz 3D .....	65
<b>Figura 8:</b> Morfologia das células endoteliais cultivadas em diferentes densidades sobre matrigel em diferentes concentrações .....	67
<b>Figura 9:</b> Caracterização das células endoteliais cultivadas sobre matriz 3D .....	68
<b>Figura 10:</b> Morfologia das coculturas de células estromais e endoteliais em sistema 3D .....	70
<b>Figura 11:</b> Cocultivo células endometriais-trofectodérmicas .....	71

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Anticorpos primários.....	54
--	----

## LISTA DAS PRINCIPAIS ABREVIATURAS E SIGLAS

2D – Bidimensional

3D – Tridimensional

BSA – Albumina Sérica Bovina  
CD105 – Endoglina

CK – Citoqueratina

DMEM/F12 – *Dulbecco's modified Eagle's/F12 medium*

DMSO – Dimetilsulfóxido

EGF – Fator de crescimento epidérmico

EGF-R – Receptor do fator de crescimento epidérmico

FITC – Isotiocianato de fluoresceína

FSH – Hormônio folículo estimulante

HB-EGF – Fator de crescimento epidérmico ligado à heparina

HBV – Vírus da hepatite B

HCV – Vírus da hepatite C

HE – Hematoxilina-eosina

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

HUVEC – Células endoteliais da veia do cordão umbilical humano

ICB-USP – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

IFN- $\gamma$  – Interferon-gama

IGFBP1 – Proteína I de ligação ao fator de crescimento semelhante a insulina

IGF-I – Fator de crescimento semelhante a insulina

IL-15 – Interleucina 15

LH – Hormônio luteinizante

LIF – Fator inibidor de leucemia

MACS – *Magnetic-activated cell sorting*

MEC – Matriz extracelular

NK – *Natural Killer*

PBS – *Phosphate Buffered Saline*

PRL – Prolactina

SBF – Soro Bovino Fetal

TE – Trofectorma

TGF- $\beta$  – Fator de crescimento transformante beta

– *Uterine natural killer*

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

VIM – Vimentina

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>32</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>35</b>
2.1 O endométrio e suas funções reprodutivas .....	36
2.2. As relações precoces entre o concepto e endométrio .....	40
2.3 O papel da matriz extracelular endometrial .....	40
2.4. A vascularização endometrial e seu papel na manutenção do concepto .....	42
2.5. Disfunções endometriais e infertilidade.....	43
2.6. Estudando sistemas biológicos.....	43
2.7. Sistemas de culturas tridimensionais .....	44
2.8. Uso de modelos 3D em reprodução.....	45
<b>3. HIPÓTESE E OBJETIVOS .....</b>	<b>47</b>
3.1 Hipótese.....	48
3.2 Objetivo Geral .....	48
3.2.1 Objetivos específicos .....	48
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>49</b>
4.1. Obtenção das biópsias endometriais .....	50
4.2. Isolamento das células endometriais .....	51
4.3. Seleção e cultura das células presente no estroma endometrial .....	51
4.4. Crescimento das células obtidas em condições de cultivo.....	52
4.5. Caracterização das células isoladas .....	53
4.6. Construção do ambiente 3D.....	54
4.7. Trofocodermia no sistema 3D de células endometriais.....	55
4.8. Preparação das amostras em 3D para análise morfológica.....	56
4.9. Caracterização das células cocultivadas.....	57
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>58</b>
5.1. Caracterização das células isoladas em sistema 2D .....	59
5.2. Células estromais imersas em matriz 3D .....	64
5.3. Caracterização das células endoteliais sobre matrigel e matriz 3D.....	66
5.4. Caracterização morfológica do cocultivo em sistema 3D.....	69
5.5. Cocultivo das células trofocodérmicas e endometriais.....	69
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>72</b>

6.1.	Sobre a caracterização das células endometriais.....	73
6.2.	Estratificação dos tecidos endometriais no sistema 3D.....	76
6.3.	Possibilidade de cocultivo de células trofodérmicas e endometriais humanas para estudo da implantação embrionária .	77
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>80</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>82</b>
	<b>APÊNDICES.....</b>	<b>92</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

As características celulares e moleculares da mucosa uterina, ou endométrio, estão intrinsecamente associadas à sua capacidade de manter o conceito em seu interior. Em humanos e roedores, este processo é ainda mais crítico, na medida em que o embrião se aloja completamente no interstício deste tecido, que lhe propicia não só alojamento, mas proteção, nutrição e condições adequadas ao seu desenvolvimento.

A inserção do embrião neste tecido se inicia com o processo dinâmico e complexo denominado de implantação embrionária. Durante as etapas deste processo, o conceito precisa estar adequadamente preparado, adotando estratégias diversas para garantir sua sobrevivência (ASHARY; TIWARI; MODI, 2018). Simultaneamente, o ambiente uterino também deve propiciar um ambiente adequado para permitir a intrusão e a sobrevivência embrionária. Esta é uma etapa crítica, uma vez que falhas nesse processo representam 75% das perdas gestacionais (WILCOX *et al.*, 1988). Vale ressaltar também, que apenas 30% dos casais férteis saudáveis engravidam espontaneamente na primeira tentativa (ZINAMAN *et al.*, 1996) indicando a complexidade da reprodução humana. A fertilização *in vitro* e técnicas de transferência embrionária têm ajudado no tratamento da infertilidade humana. No entanto, as taxas de implantação permanecem baixas, o que mostra, inevitavelmente, a necessidade de maiores estudos sobre os tecidos envolvidos na interação embrião-organismo materno e que garantam o sucesso gestacional (WANG; DEY, 2006).

Questões éticas limitam a obtenção de novos conhecimentos sobre a implantação em humanos e, conseqüentemente, o nosso conhecimento sobre vários aspectos dos tecidos envolvidos nesse processo. Modelos utilizando roedores tem auxiliado a responder lacunas nestas interações, no entanto, nem todas as informações obtidas por essa via podem ser utilizadas quando se trata das específicas condições que se estabelecem em humanos. Estes trabalhos, entretanto, têm fornecido novos caminhos de estudo para a reprodução humana, na medida em que permitem por meio da manipulação gênica específica (deleção ou expressão aumentada de alguns genes) desvendar vias possíveis e mecanismos de sinalização molecular coordenada entre o endométrio e o blastocisto (EGASHIRA; HIROTA, 2013). Mesmo assim, a literatura é unânime em admitir a necessidade de estudos complementares, utilizando modelos alternativos, para fornecer um conhecimento

específico à reprodução humana (WANG et al., 2012).

Evidências apoiam firmemente a hipótese de que a implantação embrionária envolve uma multiplicidade de interações cruciais organizadas em cascata e que os papéis individuais e integradores dos componentes dos tecidos envolvidos têm que ser determinados para que se compreenda o fenômeno de forma globalizada.

Neste estudo, focamos na caracterização de um modelo de reconstrução parcial do endométrio, para ampliar a possibilidade metodológica de estudos funcionais deste tecido, focando principalmente nas suas possibilidades de interação com o conceito ao longo da gestação.

Entretanto, em que pese a relevância do conhecimento detalhado da fisiologia endometrial para os processos reprodutivos, a possibilidade de estudar seus mecanismos funcionais também pode propiciar novas abordagens na compreensão de sua senescência, patologias associadas e terapias possíveis. Neste contexto, modelos que permitam o estudo dessas abordagens incorporam novas dimensões e novas perspectivas na compreensão de processos fundamentais para a saúde feminina.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

## 2.1 O endométrio e suas funções reprodutivas

Estrutural e funcionalmente, a mucosa uterina, ou o endométrio, é dividida nas camadas funcional e basal. A camada funcional compreende seus dois terços superiores (distais ao miométrio) e é caracterizada por respostas específicas aos hormônios ovarianos e por se desprender na ausência destes hormônios (menstruação). Já a camada mais profunda, a basal, é responsável por regenerar a população celular da zona funcional após a menstruação (NGUYEN; SPRUNG; GARGETT, 2012).

Histologicamente, o endométrio está revestido por um epitélio simples colunar, que invagina em direção ao tecido conjuntivo subjacente (estroma endometrial) para formar as glândulas uterinas (DEVI; DAMAYANTI; MATUM, 2018). Tanto o epitélio como as glândulas uterinas assumem diferentes funções durante a implantação e a manutenção do embrião no endométrio (DEMIR *et al.*, 2002).

Sob ação dos hormônios esteroides, alterações moleculares e funcionais ocorrem nos componentes epiteliais endometriais (PLAISIER *et al.*, 2007; GARRIDO-GOMEZ *et al.*, 2011; VINKETOVA *et al.*, 2016). Principalmente sob a ação da progesterona, ocorre a indução da atividade secretora glandular, que passa a secretar uma ampla variedade de produtos, além de moléculas de caráter energético como a glicose (indispensável como fonte de energia para a placenta em desenvolvimento, [FLANNERY *et al.*, 2018]) e o colesterol (essencial para a formação de membranas celulares e organelas, síntese de esteroides e regulação da transdução de sinais, [LONG *et al.*, 2015; HEMPSTOCK *et al.*, 2004]). Estas secreções também incluem glicoproteínas como a osteopontina, a uteroglobina e principalmente a glicodelina A, sendo essa última importante para o processo de implantação, na medida em que atua sobre células imunes e trofoblásticas (TOTH *et al.*, 2008). As glândulas uterinas também sintetizam e liberam fatores de crescimento, como o fator de crescimento epidérmico (EGF), o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator inibidor de leucemia (LIF) (HEMPSTOCK, 2004).

No epitélio superficial do endométrio também ocorrem modificações relevantes induzidas em grande parte pelos hormônios esteroides. De crucial importância, é a alteração no padrão de expressão de moléculas de adesão, o que determina a possibilidade de adesão do trofoblasto a este tecido. Dentre as muitas moléculas que participam deste processo se destacam as caderinas, selectinas e o CD98. As caderinas pertencem a uma família de glicoproteínas que participam de mecanismos de adesão celular dependente de  $Ca^{2+}$  (TAKEICHI, 1988). Em camundongos, a E-caderina é encontrada nas células do trofoblasto e no epitélio luminal uterino, durante o período de peri-implantação, indicando um papel no processo inicial de adesão (KADOKAWA *et al.*, 1989; ROWLANDS *et al.*, 2000). Selectinas (grupo de proteínas de ligação ao carboidrato) também estão envolvidas na adesão blastocisto-epitélio uterino. Evidências experimentais mostram que o bloqueio de L-selectina prejudica a ligação do trofoblasto no epitélio endometrial (GENBACEV *et al.*, 2003). O CD98, uma glicoproteína multifuncional localizada na superfície apical do epitélio uterino, também é expressa durante a janela de implantação, o que sugere sua participação na adesão do blastocisto (DOMINGUEZ *et al.*, 2010).

A produção e funcionalidade dos esteroides ovarianos sobre o útero é primordial para suas funções reprodutivas e deve ser mantida durante toda a gestação, para que não haja descamação do endométrio funcional e, conseqüentemente, um aborto. A produção destes hormônios pelo corpo lúteo é mantida durante a primeira metade da gestação pelo trofoblasto, por meio de sua produção de gonadotrofina coriônica, de ação luteotrófica e, após esse período pela própria unidade materno-fetal (HANDSCHUH *et al.*, 2007).

O tecido conjuntivo endometrial (estroma endometrial) subjacente ao epitélio, é altamente especializado e capaz de transformar sua estrutura e funções sob a ação dos hormônios esteroides (UJVARI; GRAELLS BRUGALLA; HIRSCHBERG, 2020). Particularmente a presença da progesterona é fundamental para induzir complexas e essenciais alterações celulares e moleculares no endométrio, como por exemplo, o processo de decidualização, preparando o acesso e manutenção do embrião durante e após sua implantação (MURAKAMI *et al.*, 2014; CRITCHLEY *et al.*, 2020).

Durante este processo, o estroma endometrial passa a ser denominado de decídua, um tecido adaptado para receber o embrião (KREGGE *et al.*, 1998; GELLERSEN; BROSENS, 2014). Embora a decidualização se inicie a cada ciclo menstrual, quando a gestação se inicia, ela evolui para etapas mais complexas desta

preparação (GARGETT; CHAN; SCHWAB, 2008). As principais funções desse tecido especializado são: controle da invasão trofoblástica (SHARMA; GODBOLE; MODI, 2016), formação de um microambiente de regulação imunológica para aceitação do feto alogênico (MURATA; TANAKA; OKADA, 2021), produção de hormônios (CHEUNG *et al.*, 2021), vascularização para a manutenção fetal (ROBSON *et al.*, 2019), resistência ao estresse oxidativo (ZHENG *et al.*, 2020) e mecanismos de regulação hemodinâmica para a chegada de sangue arterial à placenta fetal (GNECCO *et al.*, 2019).

Do ponto de vista morfológico, o processo de decidualização inclui a transdiferenciação das células estromais endometriais que perdem suas características fibroblásticas (células fusiformes) e se transformam em células epitelióides, grandes, poligonais, por vezes multinucleadas e altamente especializadas (PAN-CASTILLO *et al.*, 2018). Demais alterações nessas células que passam a ser denominadas de **deciduais**, incluem: acúmulo de glicogênio e lipídios no citoplasma (MORI *et al.*, 2016), estabelecimento de complexos juncionais entre células vizinhas (ENDERS; SCHLAFKE, 1967; FINN; LAWN, 1967), expansão do conteúdo organelar, aumento da expressão de proteínas de matriz extracelular e produção de hormônios (PAN-CASTILLO *et al.*, 2018).

Os principais produtos das células deciduais são a prolactina (PRL) e a proteína I de ligação ao fator de crescimento semelhante a insulina (IGFBP1), comumente utilizados como marcadores do processo de decidualização (MASLAR; RIDDICK, 1979; GIUDICE; DSUPIN; IRWIN, 1992). Essas proteínas estimulam o crescimento e invasão do trofoblasto, previnem a rejeição imunológica, modulam a sobrevivência das células uNKs e promovem angiogênese local (IRWIN *et al.*, 1993). Além disso, essas células também produzem relaxina e componentes da matriz extracelular (QIN *et al.*, 1997).

Durante a decidualização, é possível notar um influxo de células imunes para a decídua. Estas células são principalmente células *natural killer* uterinas (uNKs, perfazendo cerca 70% dos leucócitos endometriais), macrófagos (cerca de 20%), e células T reguladoras (KING *et al.*, 1989; LOKE; KING; BURROWS, 1995). Este repertório de leucócitos têm uma ativa participação em mecanismos de tolerância imunológica ao feto (MURATA; TANAKA; OKADA, 2021), remodelação vascular (HARRIS, 2010), angiogênese (QUENBY *et al.*, 2009) e facilitação da migração trofoblástica (HANNA *et al.*, 2006). Evidências mostram que as células deciduais participam do recrutamento destas células imunes, bem como da sua distribuição e

funções (PARK *et al.*, 2010).

Diferente das demais células NKs que existem no nosso organismo, as uNKs parecem não exibir funções citotóxicas (KALKUNTE *et al.*, 2008). Quando estimuladas por citocinas, como a interleucina 15 (IL-15) e outros fatores solúveis (produzidos por células decíduais, células do sistema imune [VERMA *et al.*, 2000] e células vasculares [CASTRO-RENDÓN *et al.*, 2006]), secretam interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e angiopoetinas, dentre outros fatores biologicamente ativos, que vão atuar na formação de novos vasos e na remodelação dos vasos arteriais (HANNA *et al.*, 2006). Células decíduais e trofoblásticas também secretam fatores pró-angiogênicos, destacando a importância destes fatores na fisiologia da gestação (SMITH, 2001). Dentre estes, se destaca o papel desempenhado pelo VEGF induzindo também a proliferação das células endoteliais uterinas. Camundongos *knockout* para VEGF apresentam fraco desenvolvimento da rede vascular, falhas no processo de implantação e abortos recorrentes, o que enfatiza a condição *sine qua non* de uma rede vascular adequadamente adaptada para a implantação e placentação (FERRARA, 2004).

Nesse contexto, a decidualização tem sido descrita como uma reprogramação do estroma endometrial que inclui organização de matriz extracelular, adesão celular, transdução de sinais, alterações metabólicas, respostas específicas ao estresse e aos processos inflamatórios e modulação da apoptose. Tudo isso garante propriedades bioquímicas e celulares únicas ao estroma endometrial permitindo a implantação do blastocisto de forma segura (NG *et al.*, 2020).

A relevância do tecido decidual tem sido apontada em casos de infertilidade feminina, como por exemplo a Falha Recorrente de Implantação (RIF). Nesta condição, mulheres submetidas ao procedimento de Fertilização In Vitro (FIV) com embriões de boa qualidade, repetidamente não obtiveram sucesso na fertilização (TICCONI *et al.*, 2021). Quando comparado com mulheres férteis, o endométrio destas pacientes apresentou alterações na sinalização da prostaglandina que é um importante indutor da decidualização, sugerindo uma possível falha nesse processo (ACHACHE *et al.*, 2010). A proliferação e diferenciação excessiva das células decíduais também está associado ao prejuízo da implantação embrionária (PLAKS *et al.*, 2008), bem como a “resistência à decidualização”, que é a incapacidade do endométrio de decidualizar (NG *et al.*, 2020).

## 2.2 As relações precoces entre o conceito e endométrio

Em primatas e roedores, o embrião inicialmente adere à superfície endometrial, e em seguida invade o epitélio e seu tecido conjuntivo subjacente para alcançar os vasos uterinos, afim de formar a placenta (KIM; KIM, 2017). Este processo é definido como implantação embrionária, é responsável pela ancoragem do conceito ao endométrio e determina o início do desenvolvimento placentário.

Ao chegar na cavidade uterina, o embrião, na fase de blastocisto, se posiciona no sítio de implantação e inicia um diálogo materno-embriônico de fundamental importância. Esta fase conhecida como fase de aposição, tem se mostrado um período de expressão de múltiplos genes e proteínas em ambos os organismos materno e embriônico e essencial para que a adesão subsequente ocorra (RAMATHAL *et al.*, 2010).

Na medida em que a adesão embrião-epitélio endometrial prossegue, mediada pela expressão de moléculas de adesão (integrinas, caderinas, selectinas e imunoglobulinas (UCHIDA *et al.*, 2012; APLIN; RUANE, 2017), ocorre a diferenciação das suas células periféricas – o trofoblasto – em citotrofoblasto, uma camada de células individualizadas e alta atividade proliferativa. As células oriundas desta proliferação se fusionam e formam uma camada externa sincicial em contato com o epitélio, o sinciciotrofoblasto (RUANE *et al.*, 2020).

Em estudos utilizando modelos primatas não humanos e células humanas em sistemas de cocultivo, foi possível identificar a penetração de projeções do sinciciotrofoblasto no epitélio endometrial até a sua lâmina basal, e o estabelecimento de junções intercelulares entre estas duas populações celulares (ENDERS *et al.*, 1983; SMITH *et al.*, 1987; RUANE *et al.*, 2022). Após a degradação da lâmina basal o sinciciotrofoblasto alcança e se espalha no estroma endometrial. Esta invasão do estroma endometrial inclui também a abertura de capilares uterinos subepiteliais (CROSS; WERB; FISHER, 1994; TORRY *et al.*, 2007). Muitos estudos tentam explicar esse processo invasivo inicial do trofoblasto, mas com as óbvias limitações experimentais este mecanismo acaba permanecendo no campo especulativo.

## 2.3 O papel da matriz extracelular endometrial

Um ponto importante na interação endométrio-blastocisto é o suporte fornecido no tecido decidual pelos diferentes componentes da matriz extracelular (MEC).

Evidências experimentais mostram que esta MEC não é apenas um substrato estrutural passivo (STREULI, 1999). Papéis específicos atribuídos a estes componentes incluem a regulação da intrusão do blastocisto, o controle da invasão trofoblástica e a formação de uma placenta eficiente e funcional (DAMSKY; SUTHERLAND; FISHER, 1993; TURPEENNIEMI-HUJANEN *et al.*, 1995).

A MEC endometrial é rica em proteínas fibrosas e proteoglicanos, com funções de suporte, integração entre as células locais e sinalização bioquímica (IOZZO, 1998). A interação células - MEC se dá por meio de moléculas de adesão presentes na superfície das células, tais como integrinas e selectinas, através das quais há indução de sinalizações celulares específicas que regulam o fenótipo e o comportamento dessas células (KIM; TURNBULL; GUIMOND, 2011). No endométrio, esse arcabouço é dinâmico, em constante remodelação, o que é essencial para manter a homeostase endometrial (O'CONNOR *et al.*, 2020).

Durante as fases do ciclo menstrual, e sob regulação hormonal, a deposição de componentes da MEC endometrial sofre variações importantes. Sob a ação da progesterona, o colágeno tipo VI e a fibronectina são encontrados apenas nas paredes dos vasos sanguíneos, enquanto colágeno tipo V, torna-se abundante durante toda a fase de decidualização. Células decidualizadas também contribuem com a síntese de colágeno tipo IV, laminina e proteoglicanos de heparan sulfato (APLIN; CHARLTON; AYAD, 1988).

Evidências mostram que componentes da MEC também são vitais para a regulação da invasão trofoblástica, no entanto, muitos desses estudos evidenciam apenas o papel desses componentes na invasão embrionária mais tardia após a implantação embrionária (LALA *et al.*, 2021). Com um processo invasivo que se assemelha ao de células tumorais, a invasão de células trofoblásticas no endométrio requer a ligação a componentes da MEC, alterações no citoesqueleto que levem ao movimento direcionado e degradação pontual da MEC para o avanço pelos espaços degradados. Nestas interações, um papel crucial tem sido atribuído à laminina e a fibronectina, nas fases iniciais de fixação/ancoragem do trofoblasto. Um aspecto regulatório importante neste processo é a capacidade de produção de enzimas que degradam a matriz (exemplo: metaloproteinases) por parte do trofoblasto e a de inibidores dessas enzimas produzidos pela decídua (IRVING; LALA, 1995; LALA *et al.*, 2021).

Disfunções de elementos da MEC tem sido relacionados a falhas no processo de implantação. Estudos mostraram que níveis de colágeno tipo IV, fibronectina e

laminina foram encontrados reduzidos ou ausentes na fase secretora de mulheres inférteis (BILALIS; KLENTZERIS; FLEMING, 1996). Nestes casos, a ausência ou redução no suporte estrutural necessário para a invasão trofoblástica parece ser um fator chave para o insucesso do processo de implantação embrionária.

## **2.4 A vascularização endometrial e seu papel na manutenção do concepto**

Ramificações da artéria uterina adentram o miométrio e dão origem às artérias espiraladas no endométrio, que formam uma densa rede de capilares (sinusoidais) na região subepitelial. Os componentes celulares destes vasos arteriais são responsivos a hormônios (ROBERTSON, 1976; PEEK; LANDGREN; JOHANNISSON, 1992). Sob ação estrogênica, há crescimento das artérias espiraladas na camada funcional (DEANS; ABBOTT, 2010; CHEN; CHANG; YAO, 2013), enquanto sob a ação da progesterona (fase secretora do ciclo menstrual) essa rede de vasos se remodela e amadurece para aumentar a resistência vascular e se preparar para implantação embrionária (AMER *et al.*, 2010; CHEN; CHANG; YAO, 2013).

Durante a implantação, as imagens obtidas de embriões humanos sugerem que o trofoblasto abre os capilares endometriais subepiteliais estabelecendo uma continuidade vascular com esses componentes, possivelmente por meio de junções intercelulares com estas estruturas. Este acesso ao plexo venoso subepitelial e conseqüentemente ao sangue materno, permite a liberação de gonadotrofina coriônica na circulação periférica para alcançar o corpo lúteo e mantê-lo ativo produzindo progesterona para a manutenção do endométrio funcional (ENDERS, 2007). Além disso, provê níveis de oxigênio e nutrientes para as primeiras etapas de diferenciação embrionária, antes que a placenta esteja plenamente formada e sem a qual não há manutenção do metabolismo embrionário (PIJNENBORG, 1998; BENIRSCHKE; KAUFMANN, 2006). O fato deste sangue ser obtido via circulação venosa, permite ainda, o desenvolvimento de um ambiente de fluxo mais lento e adequado às trocas moleculares (PATEL *et al.*, 2010). Apesar da extrema importância deste processo, não há dados que indiquem que mecanismos de invasão e controle estão envolvidos nesta etapa da gestação em humanos.

Devido às propriedades exclusivas de diferenciação, invasão e sinalização que ocorrem na implantação humana, o estudo advindo de outros animais não pode, até o momento, ser diretamente extrapolado (ZAMBUTO; GLANCY; HARLEY, 2019). Estudos em macacos e babuínos, entretanto, mostram caminhos possíveis para essa

etapa em humanos (CARTER *et al.*, 2015). No entanto, detalhes deste processo também não foram estudados nestes animais.

## 2.5 Disfunções endometriais e infertilidade

Relatório recente publicado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), relata a alta incidência de infertilidade (1 em cada 6 pessoas em todo o mundo), incluindo a infertilidade como um grave problema de saúde pública que inclui diferentes patologias associadas além de afetar o bem-estar mental e psicossocial das pessoas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2023). Nesse universo, grande parte envolve disfunções uterinas e, particularmente, falhas de implantação. Acredita-se que cerca de um terço destas falhas estejam associadas à receptividade endometrial prejudicada (ALTMÄE *et al.*, 2017; TOMARI *et al.*, 2020). São alguns exemplos de patologias conhecidas que incluem disfunções endometriais e que estão associadas à infertilidade: endometrite (SINGH; SETHI, 2022), endometriose (KOLANSKA *et al.*, 2021), adeniose (SZUBERT *et al.*, 2021), pólipos endometriais (RSHOUD *et al.*, 2022), hiperplasia e câncer endometrial (TIAN *et al.*, 2020). Além disso, fatores como desregulação das células imunes do endométrio, também parecem estar envolvidos com perdas gestacionais (PARVANOV *et al.*, 2023). Nestas patologias ocorre um desbalanço entre os componentes endometriais e o desvio total ou parcial de suas funções o que centraliza na incapacidade do endométrio em sustentar a implantação ou a manutenção do concepto em seu interior. Os mecanismos moleculares envolvidos em cada uma destas patologias tem sido alvo de inúmeros estudos, mas infelizmente, ainda não completamente associados a terapias que permitam o retorno à fertilidade.

Neste contexto, direcionar estudos que possam contribuir para minimizar este problema social e de saúde, que gera um devastador ônus econômico e pessoal aos casais e aos serviços de saúde pública é, desta forma, central e primordial.

## 2.6 Estudando sistemas biológicos

O estudo dos processos biológicos (fisiológicos ou patológicos) exige o uso de ferramentas apropriadas e diversas, que permitam responder questões em diferentes níveis (molecular, celular e tecidual). Estes estudos incluem desde a análise de processos e moléculas em indivíduos desafiados ou não a diferentes condições experimentais (estudos *in vivo*), até análises de mecanismos biológicos, também em diferentes níveis, em sistemas *in vitro*.

No sistema *in vitro*, a cultura de células e tecidos tem contribuído de maneira

crucial na compreensão de mecanismos vitais e suas alterações e respostas mediante estímulos específicos de diferentes naturezas. Recentemente, a engenharia de tecidos trouxe também a possibilidade de criação de tecidos artificiais para substituir ou reparar tecidos danificados, abrindo novos horizontes às técnicas de cultura de células em estruturas tridimensionais para a regeneração tecidual.

## 2.7 Sistemas de culturas tridimensionais

A estrutura celular, a disposição espacial e o diálogo célula-célula e célula-microambiente estão interligados e são essenciais em várias dinâmicas celulares, tais como: migração, crescimento, proliferação, diferenciação e morte e padrão distinto de expressões gênicas. Os modelos experimentais *in vitro* têm como objetivo imitar as condições *in vivo* da melhor forma possível, o que nem sempre pode ser alcançado.

Estudos envolvendo culturas 2D trouxeram uma grande contribuição para um maior entendimento de diversos funcionamentos biológicos. No entanto, as simulações de caráter fisiopatológico encontrado em sistemas orgânicos complexos *in vivo* demarcam a fronteira desse modelo (VIDI *et al.*, 2013). Dentre essas limitações, destaca-se a incapacidade de organização espacial das células em tecidos e suas interações com células de outros compartimentos teciduais. Mais recentemente, a possibilidade e eficácia de modelos 3D, permitindo essas interações, ultrapassando algumas das limitações do sistema 2D, tem mostrado novas oportunidades de estudo (SCHUTTE *et al.*, 2012). O sistema de cultura 3D permite a criação de complexos teciduais e uma maior riqueza de detalhes quanto a sua configuração espacial e funcional. Além disso, também pode propiciar um microambiente que favoreça a comunicação de diferentes tipos celulares e entre estes tipos celulares com os componentes da matriz extracelular (VIDI *et al.*, 2013).

Atualmente existe uma grande variedade de métodos de cultivo tridimensional. Basicamente, estes modelos tentam mimetizar os constituintes da matriz extracelular através de hidrogéis à base de biopolímeros naturais/sintéticos como *scaffolds* para a incorporação de diferentes tipos celulares. Estes modelos trazem a vantagem de reconstruir a integridade morfológica e funcional do tecido e não de células isoladas (DUVAL *et al.*, 2017). Na medida em que mimetizam as características de órgãos ou tecidos específicos, estes modelos – organoides - têm sido uma ferramenta inovadora no estudo do desenvolvimento, função e patologias de órgãos humanos. Também, tem se mostrado ferramentas essenciais na avaliação da eficácia e toxicidade de

medicamentos, mecanismos de infecções e terapias específicas.

## 2.8 Uso de modelos 3D em reprodução

Recentemente, estudos tem mostrado a construção de modelos tridimensionais para mimetizar o endométrio e abordar diferentes problemas reprodutivos. Abbas e colaboradores (2020) utilizaram amostras de tecido endometrial retiradas de abortos humanos (6 a 12 semanas de gestação). Estes autores mostraram o isolamento e cocultivo de células estromais e epiteliais em uma matriz 3D de colágeno tipo I. Outro estudo, utilizou células estromais e epiteliais de útero bovino na fase lútea inicial. As células estromais foram cultivadas até que produzissem sua própria matriz extracelular, sobre a qual, o epitélio foi adicionado (DÍEZ *et al.*, 2023).

No que tange à invasão trofoblástica, You e colaboradores (2019) utilizaram um sistema 3D complexo envolvendo células estromais e esferoides compostos de células da linhagem trofoblásticas Sw.71. A invasão trofoblástica também foi estudada em um modelo utilizando linhagens de células de citotrofoblasto extraviloso automontadas em esferoides 3D (WONG *et al.*, 2019). Nishiguchi e colaboradores (2019), também optaram por um sistema complexo de cocultura 3D, utilizado células citotrofoblásticas vilosas primárias, cultivadas sobre tecido uma matriz contendo linhagens de células endometriais, afim de mimetizar a barreira placentária. (NISHIGUCHI *et al.*, 2019). Este sistema tridimensional também foi utilizado para estudos sobre a diferenciação de células tronco embrionárias humanas em trofoblasto (HORII *et al.*, 2020).

Utilizando um complexo e dinâmico modelo 3D utilizando câmara de biorreator para hospedar a placenta bioimpressa e integrada a uma bomba peristáltica, Kuo e colaboradores (2019) mostraram que células da linhagem trofoblástica HTR8-Sv-neo podem induzir apoptose em células endoteliais obtidas de cordão umbilical através da regulação positiva de fosfatidilserina e CASP3 e CASP9.

Recentemente, PARK e colaboradores (2022), através de implante em chip, reconstruíram a organização estrutural tridimensional da interface materno-fetal para avaliar a invasão do trofoblasto extraviloso no endométrio. Esses autores utilizaram células primárias obtidas de placentas humanas de primeiro trimestre, e mostraram que as artérias endometriais sofreram apoptose induzida pelo trofoblasto extraviloso, durante o processo de remodelação vascular. Esse processo foi avaliado pelo aumento da expressão de caspase 3 (PARK *et al.*, 2022).

Apesar do notável avanço das técnicas empregadas para análise da interface blastocisto-endométrio, ainda há hiatos a serem preenchidos no que diz respeito aos processos envolvidos. Diferente das interações tardias do processo gestacional utilizando citotrofoblasto extraviloso e endotélio vascular arterial, que têm recebido maior atenção científica, as fases iniciais do processo de implantação embrionária humana e que compreende as relações diretas entre as células trofoblásticas e endometriais, ainda são muito pouco exploradas e conhecidas. Neste contexto, modelos que permitam esses estudos podem ter grande valia para a ampliação do conhecimento dos processos envolvidos na fisiologia uterina e reprodutiva.

### **3. HIPÓTESE E OBJETIVOS**

### **3.1 Hipótese**

Nossa hipótese é que a reconstrução parcial de endométrio em um sistema de cocultivo 3D é um método viável para estudos da fisiologia endometrial.

### **3.2 Objetivo Geral**

Este estudo tem como objetivo caracterizar um modelo de estudo 3D que sirva de base para estudos da fisiologia endometrial e implantação embrionária.

#### **3.2.1 Objetivos específicos**

- Isolar e caracterizar células uterinas oriundas de biópsias endometriais humanas.
- Manter as células endometriais estromais em uma matriz extracelular capaz de sustentá-las em um arranjo tridimensional.
- Caracterizar morfológicamente o sistema de cocultivo nas quais células endometriais (endoteliais) revistam um tecido conjuntivo reconstituído contendo células estromais em matriz extracelular.

#### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

#### 4.1. Obtenção das biópsias endometriais

As células endometriais foram isoladas e congeladas a partir de fragmentos de biópsias de endométrio de mulheres de casais com fator masculino de infertilidade e com indicação de tratamento por fertilização in vitro. As amostras foram obtidas na Clínica Huntington de Reprodução Humana, por pessoal clínico especializado (n=3). Como parte de suas análises clínicas, essas mulheres foram submetidas a biópsias endometriais para análises gênicas específicas e concordaram em doar um fragmento da biópsia para esse estudo. O delineamento experimental recebeu a aprovação do Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (Plataforma Brasil, CAAE: 31433520.1.0000.5467; 72592823.0.0000.5467) e da Comissão de Ética para Estudos em Humanos. Todo material foi coletado após o consentimento das pacientes a partir da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para doação de material biológico para pesquisa.

***Critérios de inclusão:*** Foram incluídas no estudo mulheres saudáveis com idade  $\leq 35$  anos, com ambos os ovários, sem anomalia pélvica e/ou uterinas clinicamente significativas; com dosagens séricas hormonais dentro dos limites de normalidade (FSH, LH).

***Critérios de exclusão:*** Foram excluídas do estudo mulheres que: apresentaram doenças crônicas, degenerativas, genéticas ou autoimunes ou ainda que estiverem reconhecidamente infectadas por HIV, HCV ou HBV; utilizaram medicamentos de forma crônica; apresentaram hidrossalpinge ou adenomiose; portadoras de malformações uterinas; ou que realizaram cirurgia prévia uterina, como miomectomia ou curetagem.

O fragmento destinado a experimentação foi inserido em meio de transporte estéril (meio de cultura DMEM/F12 [Dulbecco's modified Eagle's/F12 medium, Sigma®-Aldrich] e 1% de solução de antibióticos [50 U/mL penicilina; 0,05 mg/mL estreptomicina, Gibco]) imediatamente após a sua coleta e transportado em gelo para o Laboratório de Estudos da Interação Materno- Fetal do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do ICB-USP.

## 4.2. Isolamento das células endometriais

O protocolo de isolamento das células endometriais foi iniciado com a digestão enzimática dos fragmentos das biópsias uterinas. Parte das células obtidas foram utilizadas para caracterização da população e parte congeladas para serem utilizadas durante as fases experimentais.

O procedimento de isolamento incluiu as seguintes etapas:

- 1) Lavagem das biópsias em meio Hank salino balanceado e livre de íons cálcio e magnésio (HBSS, *Hanks' balanced salt solution*, Sigma).
- 2) Dissociação celular por meio de digestão enzimática com colagenase II (1mg/mL, Sigma) e DNase I (0,1 mg/mL, Sigma) em HBSS, seguida de adição de meio contendo 20% de soro bovino fetal (SBF, Cultilab).
- 3) Filtragem em filtro de 70  $\mu$ m (Cell Strainer; BD) para retenção das glândulas endometriais.
- 4) As estruturas retidas foram tratadas com tripsina (0,05%, Gibco) por 30 min, seguida de adição de meio contendo 20 % SBF, para neutralização da atividade enzimática. Estas células foram designadas epiteliais e foram centrifugadas a 800 rpm por 4 min e ressuspendidas em meio DMEM/F12 suplementado com 10% SBF e antibióticos (50 U/mL penicilina/0,05 mg/mL estreptomicina) para cultivo em placas de 24 poços. Após a confluência estas células foram expandidas por duas passagens seguidas, após o que foram ou congeladas a -80°C para uso nos experimentos futuros ou replaqueadas para determinação de curvas de crescimento e caracterização imunohistoquímica para avaliação dos tipos celulares presentes na cultura.
- 5) As células que ultrapassaram o filtro (item 3) receberam meio DMEM/F12 contendo 20 % SBF, para neutralização da atividade enzimática e foram submetidas a seleção por meio de *beads* magnéticos para separação dos componentes celulares presentes no estroma endometrial.

## 4.3. Seleção e cultura das células presente no estroma endometrial

As células obtidas após a digestão enzimática das biópsias foram submetidas a seleção positiva em coluna imunomagnética MACS, com microbeads magnéticos acoplados ao anticorpo primário anti-CD105 (Milteny, Biotec Inc.). A seleção obedeceu às instruções do fabricante, que brevemente incluíram:

- 1) Incubação por 15 min para a ligação antígeno-anticorpo das células com *beads*

magnéticos aderidos ao anticorpo anti endogлина (CD105): componente do receptor para TGF- $\beta$ , altamente expresso em células endoteliais.

- 2) Adesão das células aderidas ao anticorpo à parede do tubo com o auxílio de um imã (sistema magnético MACS - Milteny Biotec Inc.).
- 3) Lavagem das células não aderidas à parede do tubo (seleção negativa) com meio de cultura e coleta destas células que foram designadas células estromais.
- 4) Liberação e coleta das células aderidas aos *beads* (seleção positiva) por pressão aplicada ao tubo, compondo a população de células positivamente selecionadas pelo anticorpo anti-CD105: aqui denominadas de células endoteliais.

Todas as células foram ressuspendidas em meio DMEM/F12 suplementado (10% SBF, 0,05 mg/mL piruvato de sódio, 0,5 mg/mL lactato de cálcio, 1% aminoácidos não essenciais, 0,2  $\mu$ g/mL insulina, 4 mg/mL albumina sérica bovina, 300 pg/mL  $\beta$ -estradiol, 20 ng/mL progesterona e antibióticos [50 U/mL penicilina/ 0,05 mg/mL estreptomicina, Gibco®], plaqueadas isoladamente em placas de 24 poços (Corning) e mantidas em cultura a 37°C, em atmosfera úmida, contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Assim como as células epiteliais, após a confluência as células foram expandidas por duas passagens seguidas e, congeladas a -80°C para experimentos futuros ou replaqueadas para determinação de curvas de crescimento e caracterização celular.

#### **4.4. Crescimento das células obtidas em condições de cultivo**

Para determinação das características de crescimento, as células epiteliais, estromais e endoteliais foram plaqueadas em placas de 24 poços na concentração inicial de  $2 \times 10^4$  células/poço. A cada 24 horas, as células viáveis e inviáveis foram contadas utilizando-se a técnica de exclusão de células não vitais coradas pelo azul de Trypan (Sigma Co., EUA). Para essas contagens, as células eram incubadas com tripsina 0,25%, (Instituto Adolfo Lutz, SP) por 5 minutos, coletadas e centrifugadas (800 rpm, 5 min), incubadas em meio contendo 10 % de SBF e contadas no equipamento Countess™ Automated Cell Counter (Invitrogen). As contagens foram realizadas em triplicatas e realizadas após 24, 48 e 72 horas do plaqueamento inicial e utilizadas para a preparação de curvas de crescimento.

#### 4.5. Caracterização das células isoladas

Para caracterizar o isolamento, células epiteliais, endoteliais e estromais foram submetidas a imunorreações (imunofluorescência ou imunohistoquímica) para a localização de biomarcadores destas três populações celulares, como se segue:

– **Para células estromais – vimentina** (filamentos intermediários presentes em células de origem mesenquimal) e presentes em fibroblastos, células decíduais, células endoteliais e células imunes.

– **Para células decíduais – IGFBP1** (Proteína 1 de ligação do fator de crescimento semelhante a insulina).

– **Para células endoteliais - endogлина [CD105]** ou receptor 2 do fator de crescimento vascular endotelial [VEGFR2].

– **Para células epiteliais – citoqueratina** (filamento intermediário presente nos epitélios).

O protocolo de caracterização por imunorreações incluiu: i) fixação das células com 2% paraformaldeído em 0,1 M tampão fosfato-salina pH 7,2 (PBS, Sigma) por 1 h e em seguida lavadas com este mesmo tampão; ii) bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos (BSA a 1% em PBS por 20 minutos); iii) incubação com os anticorpos primários (conforme **Tabela 1**); iv) incubação com anticorpos secundários por 1 h em câmara úmida, a 37°C.

Para as reações de imunofluorescência, as amostras foram montadas com o meio de montagem DAPI (4',6 diamidino-2-fenilindole dihidroclorídrico, Vectashield®, Vector Lab.) e analisadas no microscópio de fluorescência Axioskop2 (Carl Zeiss, Alemanha).

Para reações de imuno-histoquímica, as células foram antes dos procedimentos acima mencionados, submetidas ao bloqueio da peroxidase endógena (peróxido de hidrogênio a 3% em PBS). Ao final, a peroxidase foi revelada utilizando-se o kit Fast-DAB (Sigma-Aldrich) por 5 minutos e as células contracoradas com Hematoxilina de Mayer por 3 minutos. Reações controle tiveram os anticorpos primários omitidos das reações de imunofluorescência e imunohistoquímica.

O número de células reativas e de núcleos DAPI-positivos ou Hematoxilina-positivos foram contados em 6 campos microscópicos (×400) distintos e randomicamente obtidos, de três culturas realizadas em diferentes ocasiões para cada

um dos marcadores utilizados. A relação entre o total de células reativas pelo total de núcleos foi obtida para o cálculo percentual de cada tipo celular presente nos três grupos de amostras (células epiteliais, endoteliais e estromais). Os resultados foram mostrados como média  $\pm$  desvio padrão ou erro padrão da média conforme identificado nas legendas.

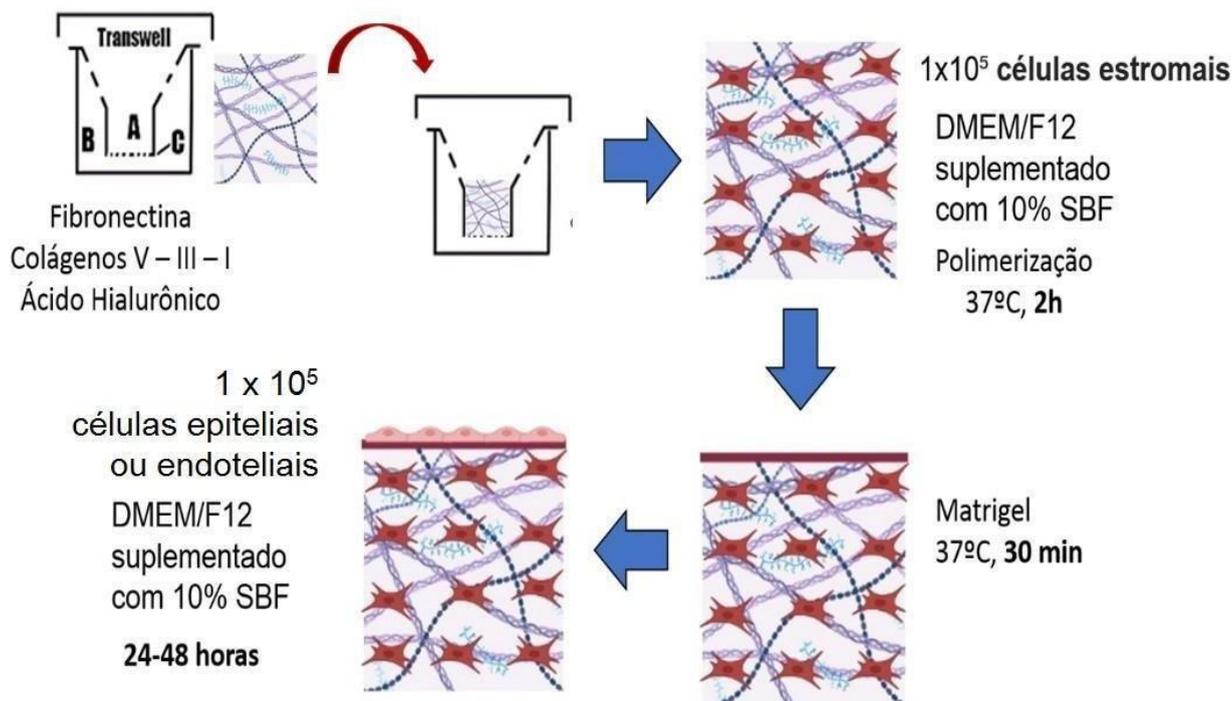
**Tabela 1 – Anticorpos primários**

<b>Proteína/ biomarcador alvo</b>	<b>Anticorpos primários/secundários</b>
Citoqueratina (CK) Células epiteliais	Anti-citoqueratina 7 humana, produzida em rato ( <i>Dako</i> )
	Anti-IgG de rato, produzido em coelho conjugada a peroxidase ( <i>Dako</i> ) ou FITC ( <i>Sigma</i> )
Vimentina (Vim) Células de origem mesenquimal	Anti- vimentina produzida em rato ( <i>Biogenex</i> )
	Anti-IgG de rato, produzido em coelho conjugada a peroxidase ( <i>Dako</i> ) ou FITC ( <i>Sigma</i> )
CD105 Células endoteliais	Anti-CD105 humano, produzido em camundongo ( <i>Abcam®</i> )
	Anti-IgG de camundongo produzido em cabra conjugada a peroxidase ( <i>Dako</i> ) ou FITC ( <i>Sigma</i> )
IGFBP1 Células deciduais	Anti-IGFBP1 produzido em camundongo
	Anti-IgG de camundongo produzido em cabra conjugada a peroxidase ( <i>Dako</i> ) ou FITC ( <i>Sigma</i> )

#### 4.6. Construção do ambiente 3D

O ambiente 3D (**Figura 1**) foi construído utilizando-se uma mistura de fibronectina, colágeno V, colágeno I, colágeno III e ácido hialurônico (todos obtidos da BD) nas concentrações finais de 0,04  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 0,04  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 320  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 320  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectivamente, preparados conforme previamente descrito (CHEN *et al.*, 2008) em um volume final de 180  $\mu\text{L}$ . A essa mistura era então adicionado 20  $\mu\text{L}$  de DMEM/F12 suplementado contendo  $1 \times 10^5$  células estromais. Essa mistura foi adicionada ao compartimento superior de placas de 24 poços do tipo *Transwell* (*Transwell* Membrana PC de 5,0  $\mu\text{m}$ , Corning). A matriz contendo as células foi mantida em incubadora a 37°C, por 2 horas para a polimerização dos seus

componentes. Após sua gelificação, 10  $\mu$ L de Matrigel (1:4, v/v em meio de cultivo suplementado, BD) foi acondicionado sobre a matriz gelificada. O sistema permaneceu por 30 minutos a 37°C, após o que recebeu  $1 \times 10^5$  células epiteliais ou endoteliais em meio DMEM/F12 suplementado. O compartimento inferior do sistema recebeu o mesmo meio de cultura. O sistema de cultivo foi mantido em incubadora a 37°C, com 5 % de CO<sub>2</sub> por adicionais 48 horas, para a caracterização morfológica do modelo.



**Figura 1:** Figura ilustrativa do preparo do cultivo 3D de células endometriais em *Transwell*. Após o preparo da matriz-suporte uma fina camada de matrigel será adicionada na superfície da matriz gelificada. As células epiteliais/endoteliais serão então inseridas sobre esta camada, onde permanecerão por 24 – 48 h.

#### 4.7 Trofotoderma no sistema 3D de células endometriais

Trofotoderma de 3 blastocistos aneuploides foram dissecados da massa celular interna na Clínica Huntington Medicina Reprodutiva por meio de micromanipuladores e transportados em Meio G-MOPS plus (Vitrolife, Denver, USA), para o Laboratório para seguir ensaios de adesão e invasão sobre células endometriais.

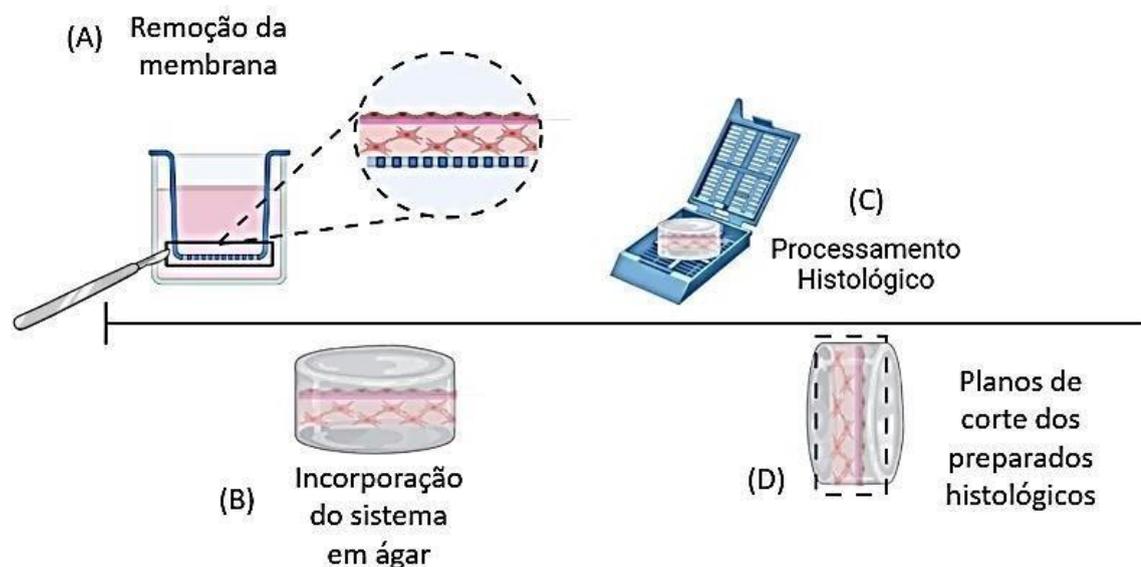
Os fragmentos de trofotoderma foram então incubados em uma mistura de meio de cultura DMEM/F12-GMOPS (1:1, v/v) por 30 minutos a 37°C em condições

estéreis. Após este período, sob estereomicroscópio, foram transferidos para o compartimento superior de 2 *Transwells* contendo matriz extracelular e células endometriais. As células endometriais foram acondicionadas sobre a matriz 24 horas antes de terem recebido o trofocotoderma. O sistema contendo matriz extracelular, células endometriais e trofocotoderma foi mantido por 48 h em meio DMEM/F12 suplementado contendo estradiol e progesterona, a 37°C, em ambiente úmido com 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, o sistema foi fixado em 2% paraformaldeído em PBS por 30 min e seguiu procedimentos histológicos rotineiros para a obtenção e análise de cortes de 5 µm de espessura, conforme descrito a seguir.

#### **4.8 Preparação das amostras em 3D para análise morfológica**

Antes do processamento histológico dos cocultivos montados em *Transwell* foi utilizado um procedimento para manter sua estrutura tridimensional. Para isso, o sistema foi inicialmente lavado em PBS a 37°C, e em seguida fixado em 2% paraformaldeído em 0,1 M PBS, pH 7,2, por 10 minutos. Após novas lavagens em PBS, o filtro inferior do sistema *Transwell* foi delicadamente retirado com o auxílio de bisturis e o sistema introduzido em ágar a 5% em água destilada, para preparar um bloco completamente revestido pelo ágar (**Figura 2**). Este bloco foi novamente fixado no paraformaldeído por adicional 10 minutos para endurecimento do ágar. Este procedimento permitiu a manipulação do material evitando a perda do tecido durante as etapas do processamento histológico, além de uma orientação mais eficaz das amostras no momento dos cortes em micrótopo (YE; DAWSON; LYNCH, 2015).

As culturas foram rotineiramente processadas para inclusão em Paraplast (Sigma). Cortes de 5 µm foram obtidos e corados pela Hematoxilina e Eosina para análises morfológicas em microscopia de luz convencional ou submetidos a imunorreações para a determinação espacial dos componentes celulares



**Figura 2.** Diagrama esquemático representando a preparação do sistema 3D para processamento histológico – A membrana foi removida do *Transwell* com ajuda de um bisturi (A) e depositada, de forma horizontal, entre duas gotas de ágar, formando um “sanduíche” (B). Em seguida o material foi colocado em cassete, onde foi feito o processamento histológico (C). Em D, notar que o material foi incluído em parafina de forma vertical, para que tenhamos o plano de corte contendo todas as camadas preparadas (endotélio/epitélio – matriz com células estromais).

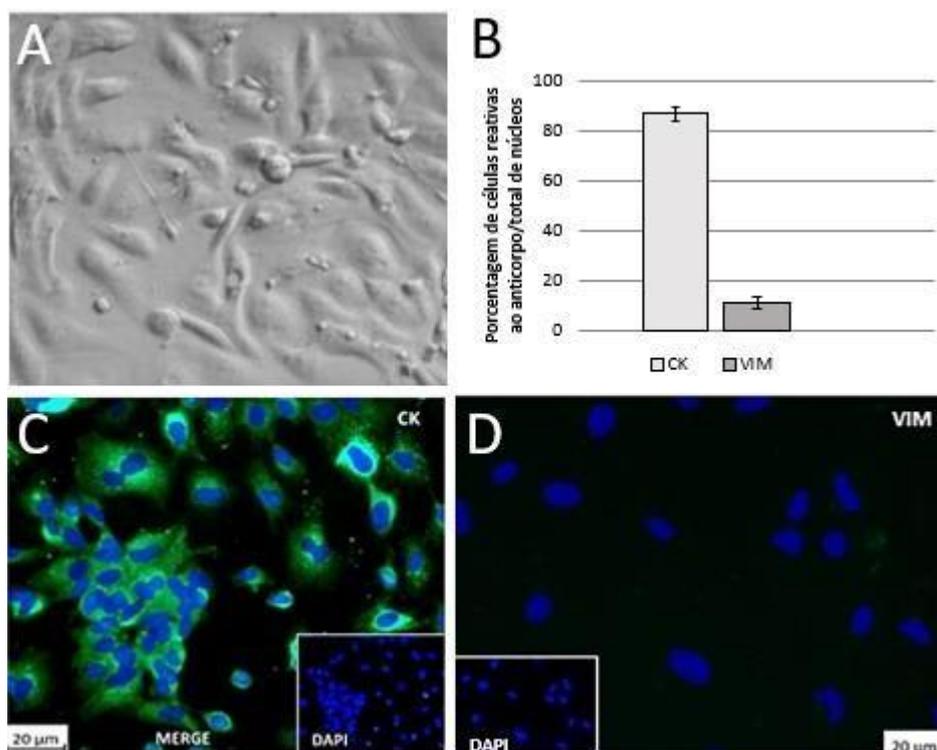
#### 4.9 Caracterização das células cocultivadas

A organização no sistema de cultivo 3D foi analisada por microscopia de luz convencional e reações de imunofluorescência para a localização do CD105 e vimentina. Cortes de 5  $\mu\text{m}$  foram desparafinizados e hidratados e submetidos a reações de imunofluorescência conforme descrito no item 4.4, utilizando os anticorpos primários anti vimentina (*Biogenex*) e anti-CD105 (*Abcam*) e seus respectivos anticorpos secundários conforme descrito na **Tabela 1**.

## **5. RESULTADOS**

### 5.1. Caracterização das células isoladas em sistema 2D

As células epiteliais provenientes das glândulas endometriais tripsinizadas e isoladas como epiteliais apresentaram crescimento em ritmo rápido e crescente, atingindo confluência e formando monocamadas após 48 h de cultivo (**Figura 3A**). Essas células apresentavam formas poligonais e quando confluentes formavam uma monocamada típica de células epitelíoides.



**Figura 3:** Caracterização das células retidas no filtro, tripsinizadas e cultivadas por 48 h em sistema 2D **(A)** Cultura de células epiteliais observadas sob microscopia de luz invertida após 48 h de cultivo. **(C-D):** Imagens representativas de reações de imunofluorescência para a caracterização das células isoladas de biópsias endometriais e designadas como epiteliais. **(C)** A grande maioria das células apresentaram reatividade para citoqueratina – biomarcador de células epiteliais. **(D)** Um menor número de células foi reativo à vimentina. As imagens representam a sobreposição da imunorreatividade em verde (FITC) e da coloração nuclear com DAPI, em azul (no detalhe da imagem, apenas DAPI). **(B)** O gráfico evidencia esses resultados (média  $\pm$  DP,  $n=3$ ), expressando a natureza das células cultivadas em porcentagem.

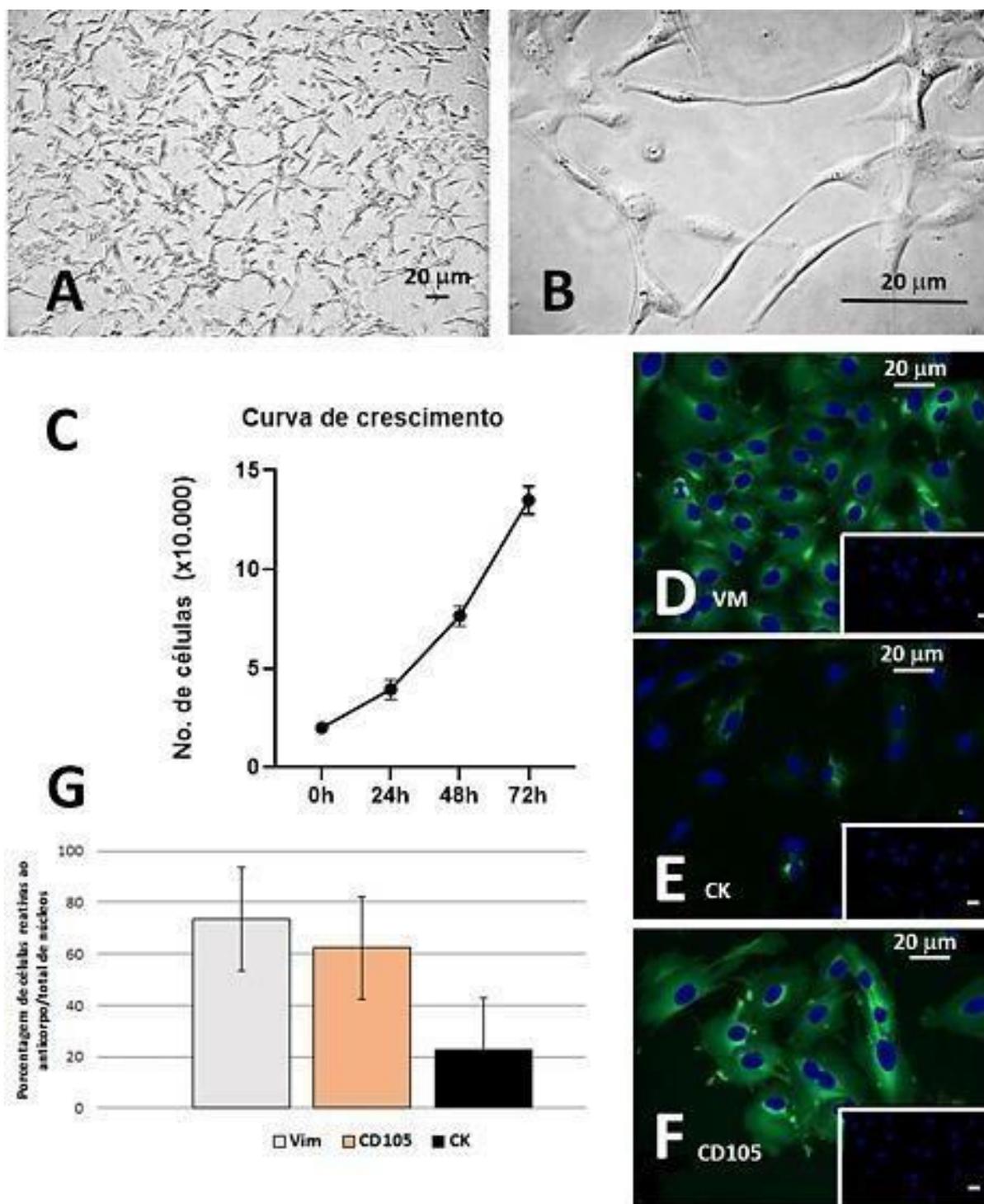
A caracterização destas células mostrou  $87 \pm 2,6$  % de células reativas à citoqueratina nas culturas realizadas com o protocolo estabelecido (**Figura 3C**), revelando a prevalência de células epiteliais. Além disso, apenas cerca de  $11 \pm 2,2$  % das células isoladas foi reativo à vimentina (**Figura 3D**), configurando a presença de

outros tipos celulares, embora em menor proporção.

Após 48 h de cultura, as células denominadas **endoteliais** (selecionadas pelo anticorpo anti- CD105) apresentaram forma estrelada e com duas a três longas projeções que se comunicavam com as células vizinhas (**Figura 4A-B**). Estas células mostraram crescimento crescente nas 72 h que se mantiveram em cultivo nas condições anteriormente descritas (**Figura 4C**), formando monocamadas que cobriam grande parte das placas de cultura (dados não mostrados).

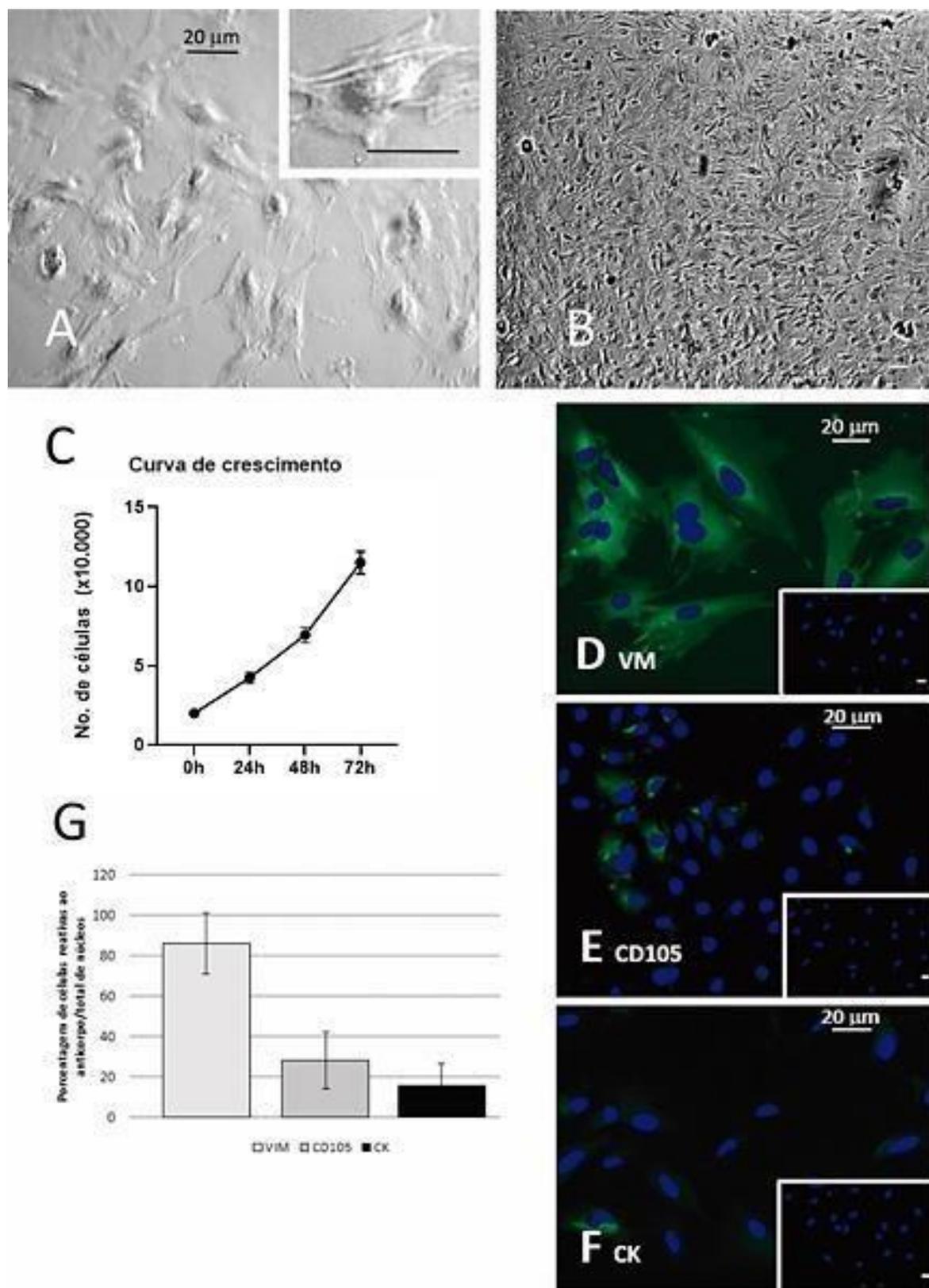
A caracterização por imunorreações mostrou que nas células cultivadas por 48 horas,  $73,5 \pm 19,3$  % das células foram reativas à vimentina (**Figura 4D**) e  $22,9 \pm 14,3$  % a citoqueratina (**Figura 4E**). Ainda,  $62,33 \pm 19,5$  % foram positivas ao CD105 (**Figura 4F**).

Os controles negativos, em que os anticorpos primários (anti-vimentina, anti-CD105, e anti-citoqueratina) foram omitidos, não se observou qualquer reatividade (**Figura 4D-F**, detalhes).



**Figura 4.** Caracterização das células selecionadas pelo CD105 (endoteliais) isoladas de biópsias endometriais e cultivadas por 48 h em sistema 2D. (A-B) Notar a morfologia alongada destas células. (C) Gráfico representando a curva de crescimento destas células (média  $\pm$  DP de duas contagens independentes). Observar o crescimento contínuo das células. (D-F) Parte significativa destas células foi reativa a vimentina (VM, D) e ao CD105 (F). Poucas células foram reativas à citoqueratina (CK, E). Os destaques em cada figura mostram os controles negativos das imunorreações (anticorpo primário omitido). Todas as imagens foram obtidas no microscópio de fluorescência Axioskop2. (G) O gráfico evidencia os resultados (média  $\pm$  DP, n=3) obtidos para cada biomarcador nas células cultivadas, expressando a natureza das células cultivadas em porcentagem  $\pm$  desvio padrão.

As células denominadas estromais (seleção negativa ao CD105), apresentaram-se fusiformes, com curtos prolongamentos e em geral eram mononucleadas (**Figuras 5 A-B**). Estas células apresentaram crescimento contínuo por 72 horas nas condições utilizadas (**Figura 5C**). Cerca de  $86,1 \pm 14,9$  % dessas células foram reativas a vimentina (**Figura 5D**),  $28,3 \pm 14$  % para o CD105 (**Figura 5E**) e  $15,9 \pm 10,5$  % à citoqueratina (**Figura 5F**). Estes resultados estão plotados no gráfico como média e desvio padrão de 3 experimentos realizados independentemente (**Figura 5G**).

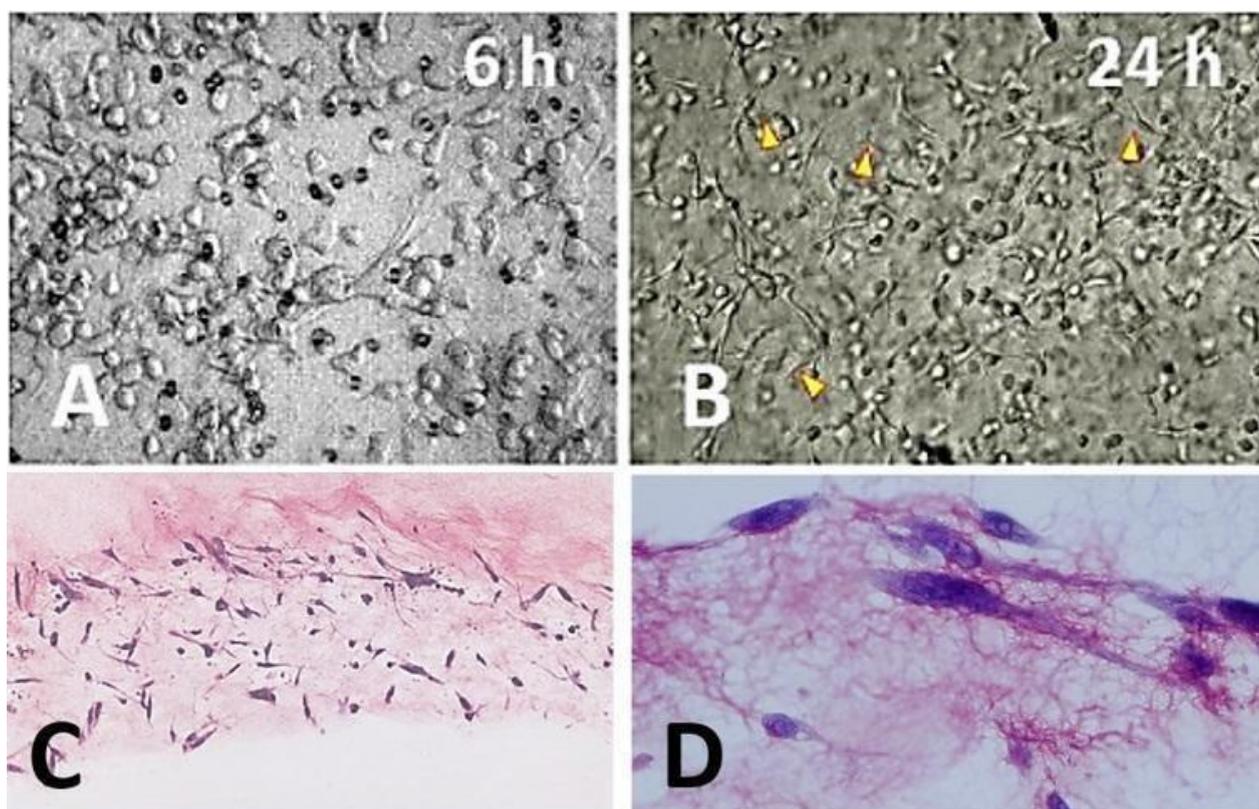


**Figura 5.** Caracterização das células estromais isoladas de biópsias endometriais e obtidas por seleção negativa com os *beads* associados a CD105. (A-B) Notar a forma fusiforme destas células. (C) Gráfico representando a curva de crescimento com crescimento contínuo das células (média  $\pm$  DP de três contagens independentes). (D-F) Parte dessas células foram reativas a vimentina (VM, D) e poucas ao CD105 (E) e a citoqueratina (CK, F). (G) O gráfico evidencia esses resultados (média  $\pm$  DP, n=3), expressando a natureza das células cultivadas

em porcentagem. Os destaques em cada figura mostram os controles negativos (anticorpo primário omitido).

## 5.2. Células estromais imersas em matriz 3D

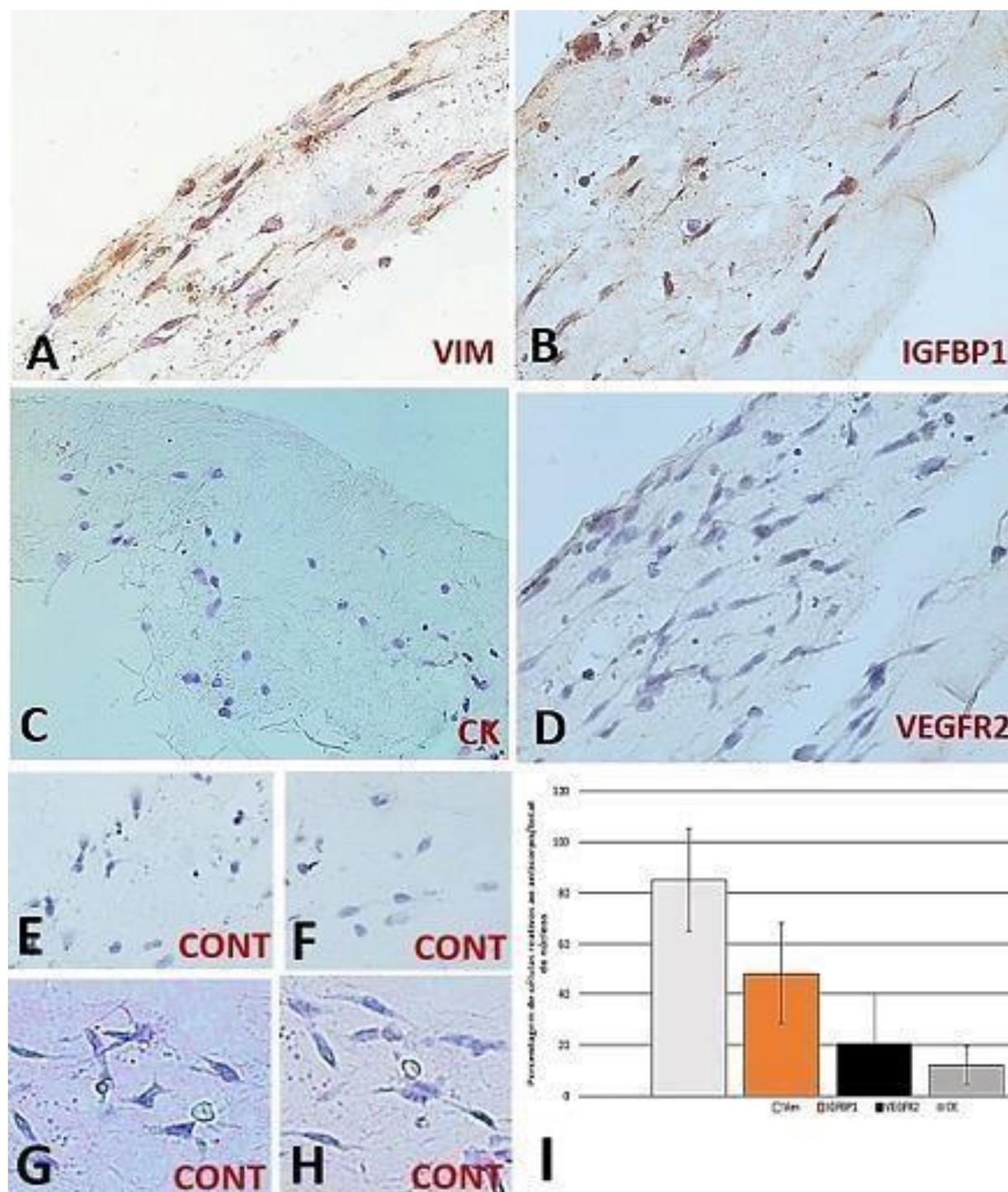
Ao longo de 24 h de cultivo, as células estromais embebidas na matriz de colágeno apresentavam formas alongadas com prolongamentos (**Figuras 6A-D**), densamente organizadas.



**Figura 6:** Morfologia das células estromais cultivadas em matriz 3D; observadas em microscópio invertido (A-B) e cortes histológicos corado com picosirius e contracorado com hematoxilina (C-D). A-B: 6 e 24 horas de cultivo, respectivamente. A: x 200; B: x40; C: x400; D: x1000.

Cerca de  $85,07 \pm 7,4$  % dessas células foram reativas a vimentina (**Figura 7A**), sendo  $48,31 \pm 13,24$  % também reativas ao IGFBP1 (**Figura 7B**). Além disso,  $20,3 \pm 8,1$  % dessa população apresentou reatividade ao VEGFR2 (**Figura 7D**) e  $12,3 \pm 7,5$  % a citoqueratina (**Figura 7C**), mostrando um caráter misto da cultura obtida que além das células estromais/deciduais deve conter também elementos epiteliais e endoteliais. Estes resultados estão plotados no gráfico como média e desvio padrão

de 3 experimentos realizados independentemente (**Figura 7I**).



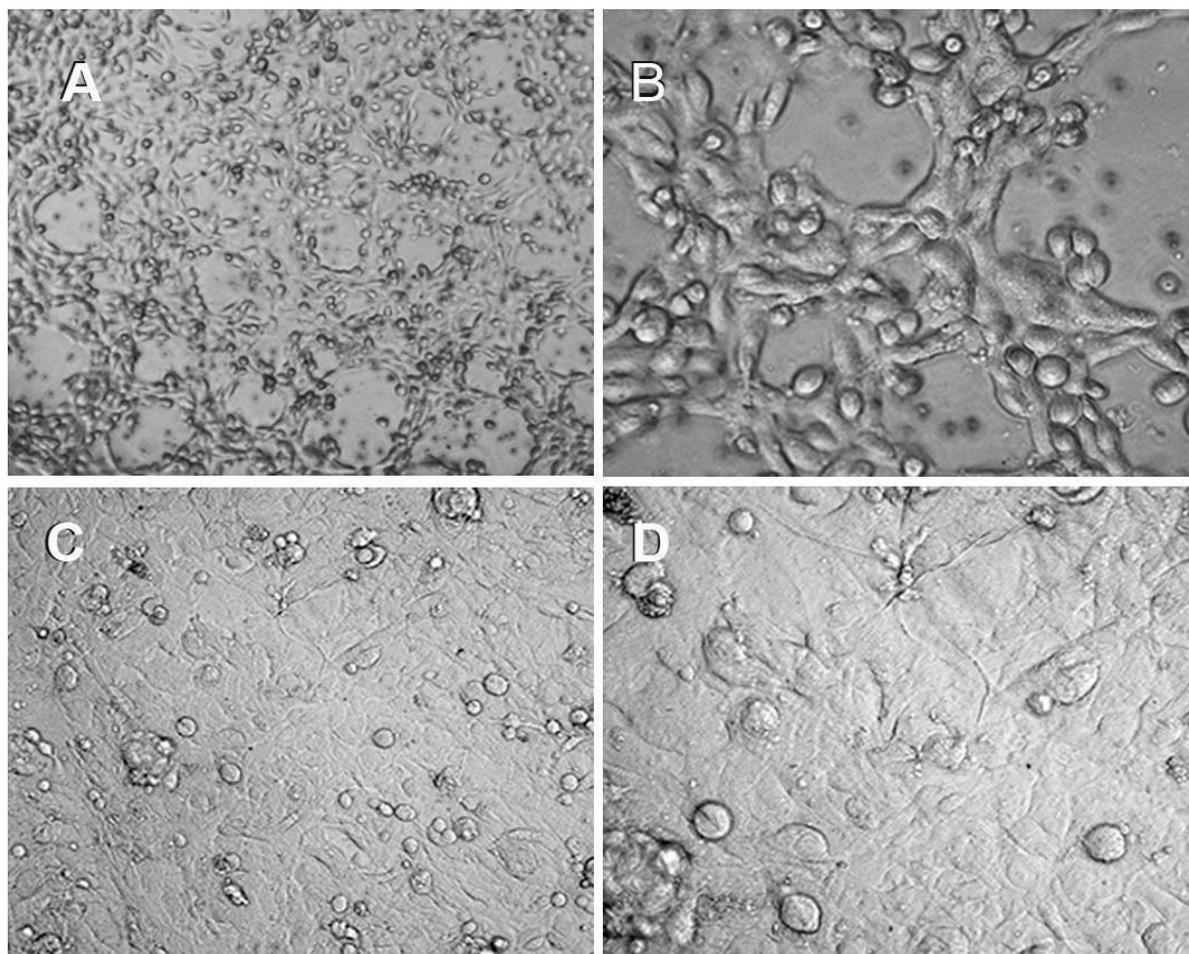
**Figura 7.** Caracterização das células estromais cultivadas em matriz 3D. Parte dessas células foram reativas a vimentina (VIM, **A**) e a proteína de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGFBP1, **B**) e poucas a citoqueratina (CK, **C**) e ao receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR2, **D**). **E- H** mostram os controles negativos (anticorpo primário omitido). O gráfico (**I**) evidencia esses resultados (média  $\pm$  desvio padrão,  $n=3$ ), expressando a natureza das células cultivadas em porcentagem. **A:** x 200; **B:** x 400; **C:** x 200; **D:** x 400; **E-F:** x 200; **G-H:** x 400.

Nas preparações histológicas, a matriz utilizada se mostrou homogênea e interposta por células estromais. No entanto, imediatamente ao redor destas células a matriz mostrou uma condensação de coloração diferente do restante (**Figura 6D**), sugerindo a deposição de novos componentes, o que pode indicar a funcionalidade destas células no sistema utilizado.

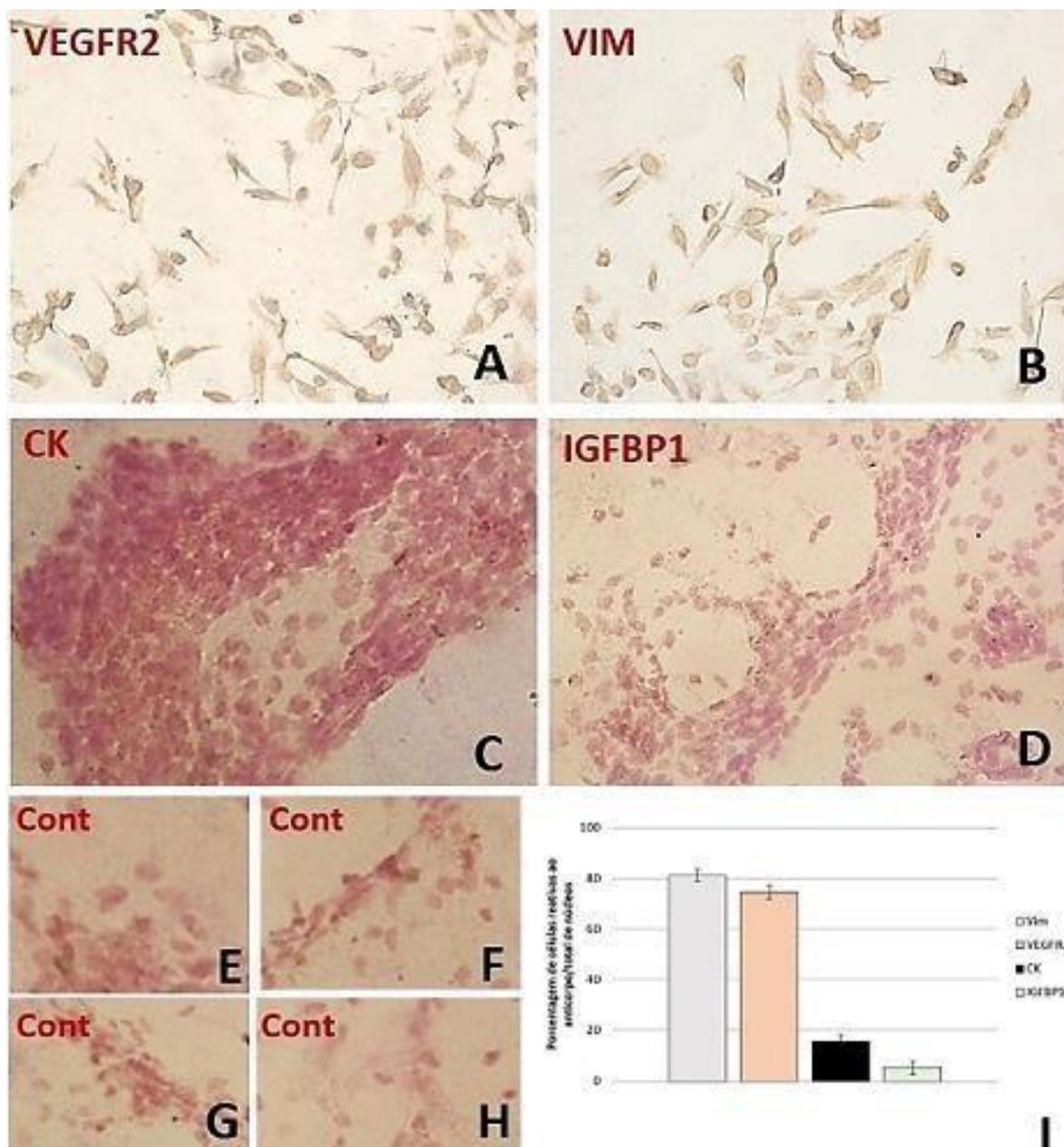
### 5.3. Caracterização das células endoteliais sobre matrigel e matriz 3D

Quando cultivamos  $1 \times 10^5$  de células endoteliais sobre matrigel diluído em meio na concentração 1:2 v/v, notamos que células organizadas em redes interligadas (**Figura 8A-B**) predominavam ao contrário do observado quando a densidade de células cultivadas era maior ( $2 \times 10^5$ ) e a concentração de matrigel menor (1:4 v/v). Nesse caso, grande parte da área de cultivo era preenchida por monocamada tipo “*cobblestone*” (**Figura 8C-D**).

Cerca de  $81,13 \pm 2,4$  % dessas células foram reativas a vimentina (**Figura 9B**), sendo  $74,5 \pm 2,6$ % também reativas ao VEGFR2 (**Figura 9A**), mostrando um predomínio de células de natureza endotelial. Além disso, apenas  $15,67 \pm 2,8$  % dessa população apresentou a citoqueratina (**Figura 9C**) e  $5,3 \pm 2,6$  % à proteína de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGFBP1) (**Figura 9D**), mostrando um caráter misto da cultura obtida que além das células endoteliais deve conter também elementos epiteliais e outros tipos de células mesenquimais. Estes resultados estão plotados no gráfico como média e desvio padrão de 3 experimentos realizados independentemente (**Figura 9I**).



**Figura 8:** Morfologia das células endoteliais cultivadas em diferentes densidades sobre matrigel em diferentes concentrações. **A-B:**  $1 \times 10^5$  de células sobre matrigel diluído em meio na concentração 1:2 v/v. **C-D:**  $2 \times 10^5$  sobre matrigel diluído em meio na concentração 1:4 v/v. Notar que baixa concentração de matrigel e alta densidade de células tendem a favorecer a formação de áreas preenchidas por monocamadas (**C-D**) enquanto alta concentração de matrigel e baixa densidade de células tendem a favorecer a formação de redes celulares intercomunicantes (**A-B**). A: x40, B: x200, C: x100; D: x200.



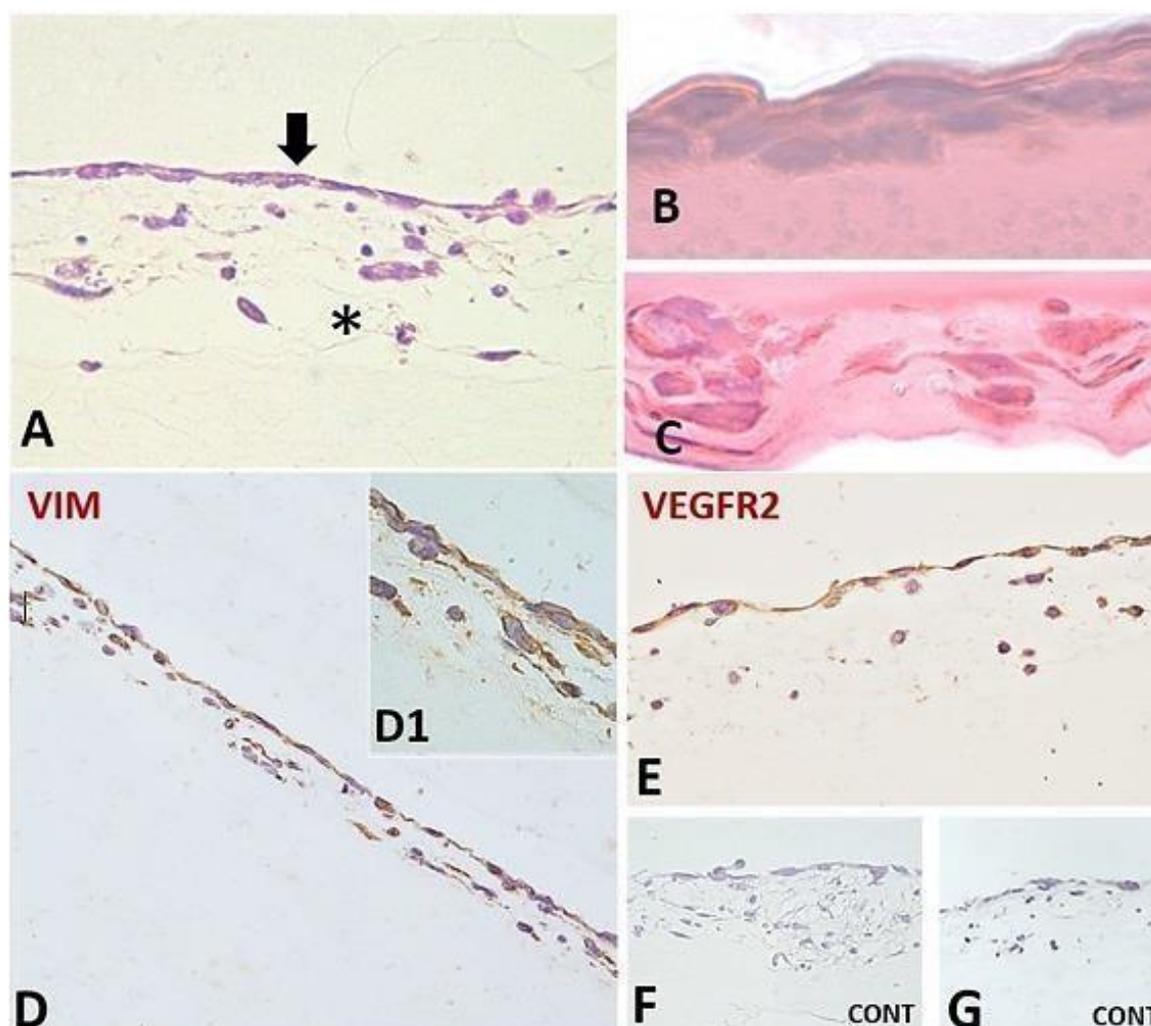
**Figura 9:** Caracterização das células endoteliais cultivadas sobre matriz 3D. Parte dessas células foram reativas a vimentina (VIM, **B**) e ao receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR2, **A**) e poucas a citoqueratina (CK, **C**) e a proteína de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGFBP1 **D**). **E-H** mostram os controles negativos (anticorpo primário omitido). O gráfico (**I**) evidencia esses resultados (média  $\pm$  desvio padrão,  $n=3$ ), expressando a natureza das células cultivadas em porcentagem. **A- H:** x 200.

#### 5.4 Caracterização morfológica do cocultivo em sistema 3D

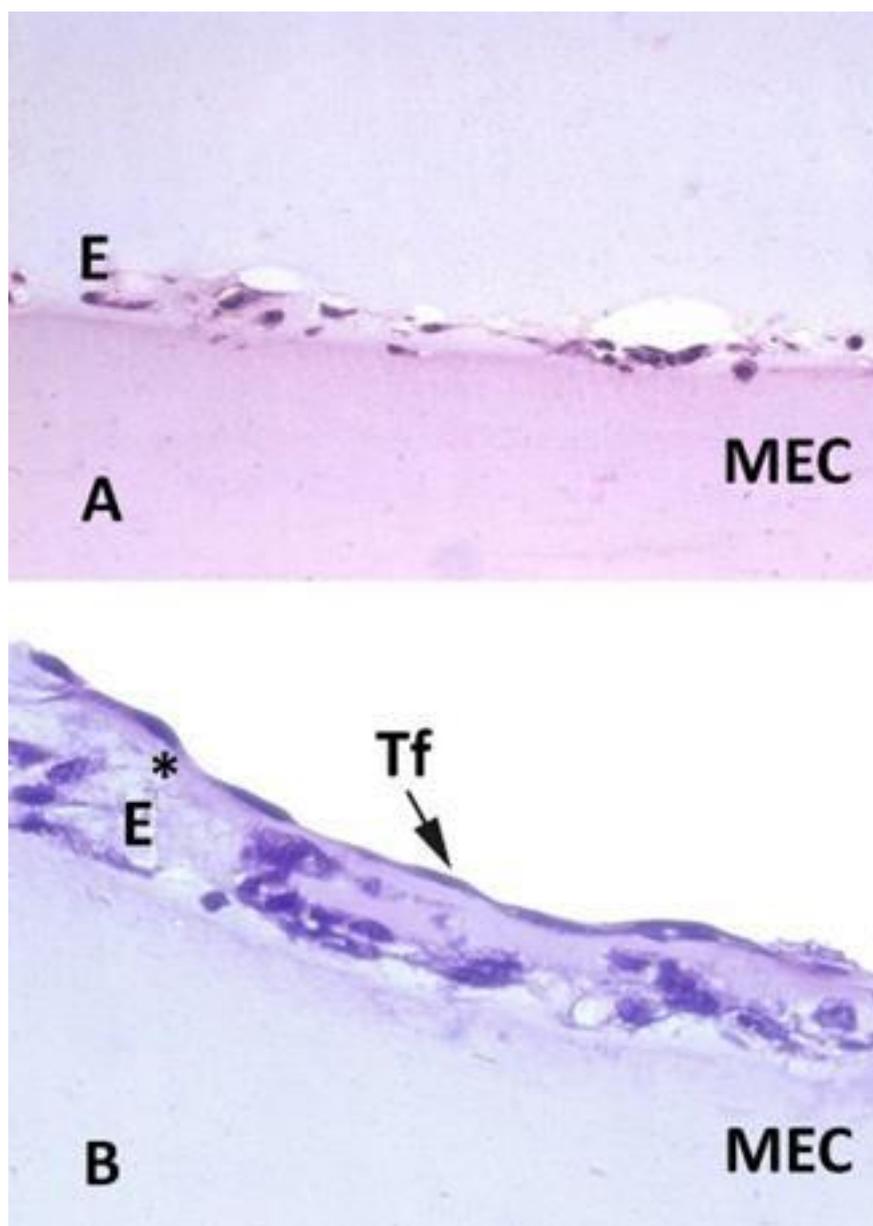
Quando as células endoteliais e estromais foram cocultivadas (sistema 3D) e processadas para obtenção de cortes histológicos corados pela HE (**Figura 10 A-C**) foi possível observar a organização e estratificação das células no sistema. As células endoteliais se organizaram como uma camada aparentemente contínua sobre o matrigel. À semelhança das membranas basais, em nossos ensaios, o matrigel parece ter funcionado como uma barreira mantendo as células endoteliais dispostas em camada sobre o sistema 3D. Essas células mostravam-se alongadas e achatadas, assemelhando-se a um epitélio pavimentoso (**Figura 10 A [seta] - B**). Completamente separadas pelo matrigel, as células estromais se mostraram compartimentalizadas na matriz, apresentando-se alongadas, fusiformes e distantes entre si. As reações de imunohistoquímica no sistema 3D de cocultivo, mostraram células VIM+ VEGFR2- (**Figura 10D-E**), confirmando sua natureza mesenquimal, enquanto apenas as células presentes na superfície do modelo foram reativas ao VEGFR2, confirmando sua natureza endotelial (**Figura10E**).

#### 5.5 Cocultivo das células trofocodérmicas e endometriais

Dos 3 fragmentos de células trofocodérmicas introduzidos ao sistema endometrial 3D, apenas 1 aderiu sobreviveu e aderiu às células endometriais. Os demais possivelmente por não terem aderido ao sistema foram lavados e perdidos nos procedimentos para fixação e inclusão em parafina. No curto intervalo em que estas coculturas foram mantidas, observamos adesão do trofocodérma (**Figura 11**).



**Figura 10:** Morfologia das coculturas de células estromais e endoteliais em sistema 3D. (A-C) Células endoteliais (setas) organizadas em camada sobre o matrigel e sobre a camada de estromais dispersas na matriz extracelular (\*). (D-G) Reações de imunohistoquímica detectando VIM (D-D1) e VEGFR2 (E). Notar a reatividade para vimentina e VEGFR2 nas células superficiais do sistema (endoteliais) e a VIM nas células estromais, dispostas na camada mais profunda do sistema. F e G mostram os controles negativos (anticorpo primário omitido). (A: x 400; B-C: x 630; D: x 200, D1: x 1000; E: x 400; F: x 400, G: x 200).



**Figura 11:** Cocultivo células endometriais-trofoctodérmicas. Notar na figura A, uma imagem representativa do sistema montado para receber o trofoctoderma, onde temos a camada de células epiteliais (E) cultivadas por 24 horas sobre uma matriz composta principalmente por colágeno III (MEC) sem células estromais. Na figura B, observar a presença de células do trofoctoderma (Tf) sobre estas células. Entre as duas populações celulares há um depósito de material amorfo semelhante a uma membrana basal (\*), possivelmente a membrana sobre a qual repousa o trofoctoderma no blastocisto. Notar também que após 24 h de cocultivo, o trofoctoderma não invadiu as células epiteliais. Hematoxilina, A, 200X, B, 400X.

## 6. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo mostraram a possibilidade de manutenção de células obtidas de biópsias uterinas e sua utilização para a montagem de sistemas de cocultivos endometriais em 3D.

Esse estudo mostrou a possibilidade de expansão das células isoladas da biópsia por até 3 passagens, com a manutenção de suas características básicas, o que permite, apesar de se tratar de uma cultura primária e não imortalizada, que múltiplos estudos possam utilizar o mesmo repertório de origem. Supondo que o modelo possa ser aplicado para estudos que necessitem de acompanhamento temporal, esta vantagem é crucial para definir o sucesso ou insucesso de um procedimento, seja experimental ou com intenções terapêuticas.

Este estudo também mostrou a possibilidade de construção de um sistema 3D para o análises interativas entre células endometriais estromais e principalmente entre estas células e células endoteliais. Essas interfaces são de extrema importância na fisiologia uterina e constituem um ponto estratégico para o estudo da implantação embrionária.

### **6.1. Sobre a caracterização das células endometriais**

As células epiteliais isoladas a partir de fragmentos de glândulas endometriais apresentaram filamentos intermediários de citoqueratina em seu citoplasma identificando sua origem epitelial. Neste contexto, contamos com um modelo de fácil preparo em que a grande maioria das células era de origem epitelial e glandular, e que pode ser expandida e sem alterações destas características.

A manutenção destas células foi realizada na presença de meio contendo estradiol e progesterona. A ação indutora do estradiol na manutenção da capacidade proliferativa destas células *in vivo* é amplamente descrita na literatura (PAVLIK; KATZENELLENBOGEN, 1978; SOPHONSRITSUK, *et al.*, 2021) e, embora não tenhamos testado especificamente sua ação, acreditamos ter sido de fundamental importância também em nossos estudos *in vitro*.

Para a obtenção de células endoteliais utilizamos a estratégia de seleção positiva em coluna imunomagnética, utilizando *beads* conjugados ao biomarcador endotelial CD105 (endogлина). Análises imunohistoquímicas destas células confirmaram que cerca de 65% continuaram apresentando-se CD105+ durante a após sua expansão. Estas células mostraram crescimento contínuo (nas 72h de estudo) e características

fenotípicas compatíveis às descritas para estas células, formando monocamada ao longo do tempo de cultura (BRIGHTON; HUNT, 1997). Estes resultados foram semelhantes aos encontrados por Kajimoto e colaboradores (2010), que obtiveram uma pureza de cerca de 70 % de células endoteliais combinando seleção magnética negativa e positiva, ao separar células endoteliais microvasculares de tecido adiposo.

Em nossos experimentos utilizamos matrigel como uma forma de mimetizar uma membrana basal na interface com as células estromais, de modo a favorecer a ancoragem e manutenção destas células no sistema 3D. Notamos que as células endoteliais cultivadas sobre a matriz 3D variavam em sua morfologia de acordo com a sua densidade e também com a concentração de matrigel. Esse achado corrobora estudos anteriores que mostraram que células endoteliais tendem a desenvolver morfologia variada dependendo das condições e estímulos ambientais, tais como presença de matrigel, fatores de crescimento, densidade das células plaqueadas, tipo de estímulo angiogênico ou mesmo pelas tensões de oxigênio mantidas no sistema *in vitro* (LAWLEY; KUBOTA, 1989; HUTCHINGS; ORTEGA; PLOUËT, 2003; DYE *et al.*, 2004; MARTINEZ *et al.*, 2008; ARNAOUTOVA *et al.*, 2009; DECICCO-SKINNER *et al.*, 2014). Matrigel contém fatores de crescimento (IGF-1, TGF- $\beta$ , EGF, PDGF, bFGF, NGF, VEGF e outros) e glicoproteínas da matriz extracelular (laminina, colágeno IV, entactina e perlecan) que atuam na manutenção, função e propriedades destas células (SLATER; PARTRIDGE; NADIVADA, 2017). Um estudo mostrou que células endoteliais humanas derivadas de células-tronco pluripotentes induzidas sem matrigel apresentam morfologia característica de células endoteliais semelhante a paralelepípedos, o que foi modificado na presença de matrigel, para estruturas semelhantes a tubos (BAATOUT, CHETA, 1996). A concentração de matrigel parece ser um fator de relevância neste fenótipo. Baixas concentrações de matrigel como substrato para o crescimento de células endoteliais tendem a favorecer a formação de monocamada, enquanto concentrações maiores induzem a formação de tubos (ARNAOUTOVA *et al.*, 2009). Além desse fator, Decicco-Skinner e colaboradores (2014) também associaram à formação de tubos, à densidade de células cultivadas sobre o matrigel. Segundo esses autores, baixas densidades de células sobre o matrigel favorecem a formação das estruturas semelhantes a tubos, o que não é observado quando maior densidade de células é utilizada no sistema (monocamada). No presente estudo, obtivemos resultados semelhantes; notamos que baixa concentração de matrigel e alta densidade de células pareceram favorecer a formação de áreas preenchidas por monocamadas, enquanto alta concentração de matrigel e

baixa densidade de células pareceram favorecer a formação de redes celulares intercomunicantes.

Outro tipo celular isolado a partir de biópsias uterinas neste estudo foram as células denominadas de estromais. Estas células provenientes da seleção negativa ao CD105, mostraram em sua maioria reatividade a vimentina e ao IGFBP1, com um percentual relativamente baixo de células CD105 e citoqueratina positivas. A avaliação destas células não levou em conta a determinação de células não decidualizadas, os fibroblastos. Estas são células difíceis de caracterização morfológica devido à sua heterogeneidade e necessitam da identificação de outros marcadores celulares como o PDGFR $\alpha$  além da vimentina (BEI *et al.*, 2015), o que não foi aqui realizado. O IGFBP1, por outro lado, é um importante produto proteico secretado abundantemente pelas células estromais endometriais durante a fase progesterônica do ciclo menstrual na medida em que ocorre o processo de decidualização (GIUDICE; MARK; IRWIN, 1992). Nesse contexto, nossas culturas de células estromais mostraram um predomínio de células em franco processo de decidualização. Este achado é esperado, desde que as biópsias são coletadas no início da fase secretora e as células obtidas tratadas com estradiol e principalmente progesterona o que é conhecido como um hormônio indutor de decidualização.

Ainda sobre a presença de células vimentina positivas, que foram aqui denominadas de estromais é possível que contenham outros tipos celulares, uma vez que endotélio e células musculares também apresentam esse marcador. No entanto, a baixa densidade de células CD105 e a alta densidade de células IGFBP1 positivas em nossos preparados, sugere o predomínio de células estromais. Cabe lembrar que células musculares lisas são encontradas no miométrio e no endométrio profundo (na parede das arteríolas espiraladas) e as biópsias foram realizadas de modo a apenas remover amostras do endométrio superficial.

Em geral, as células estromais apresentavam-se em forma estrelada e mesmo com aumento de densidade nas placas de cultura, mantinham-se próximas, mas não em monocamadas contínuas. A possibilidade de expansão destas células em cultura por até 3 passagens sugere que os procedimentos de obtenção e isolamento manteve células com capacidade proliferativa como os fibroblastos ou células tronco-mesenchimais. Tecidos conjuntivos e particularmente o endometrial, apresentam intensa capacidade regenerativa em relação a outros tecidos em condições fisiológicas, responsáveis pela sua remodelação ao longo do ciclo menstrual, o que tem sido atribuído a populações de células-tronco em seu interstício tecidual

(SCHWAB *et al.*, 2008).

Em suma, a caracterização fenotípica das células isoladas mostrou que embora houvesse predomínio das populações celulares específicas nas culturas realizadas, estas eram culturas mistas. Vantagens e desvantagens podem ser levantadas em função deste perfil de modelo. No entanto, no que se refere à população de células estromais, a presença de outros tipos celulares inerentes ao próprio tecido pode caracterizar um meio mais próximo ao encontrado *in vivo*, não caracterizando necessariamente uma desvantagem neste estudo. Por outro lado, seria interessante que o revestimento endotelial mimetizasse da melhor forma possível capilares endometriais sem a interferência de outros tipos interpostos.

## 6.2. Estratificação dos tecidos endometriais no sistema 3D

Ao longo de 24 h de cultivo, células estromais embebidas na matriz preparada apresentaram morfologia semelhante a fibroblastos encontrados *in vivo*. Morfologia semelhante em culturas utilizando matrizes tridimensionais de colágeno foram descritas em estudos anteriores (GRINNELL, 2000; SHAKIBA *et al.*, 2020). É possível que as semelhanças se devam principalmente à constituição das matrizes, uma vez que o colágeno também foi o principal componente presente na nossa matriz extracelular.

Além do colágeno I e III, outros componentes presentes na matriz extracelular endometrial foram utilizados, como o ácido hialurônico, um glicosaminoglicano constituído de unidades alternadas de ácido D-glucurônico e N-acetilglucosamina. A presença de ácido hialurônico tem sido considerada um fator facilitador para a migração e infiltração dos fibroblastos, deixando a matriz menos rígida e oferecendo suporte para formação *in situ* de “scaffolds” (KIM *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2021). McLaughlin e colaboradores (2020) mostraram sua importância, na medida em que um inibidor de hialuronano (4-metilumbeliferona) diminuiu a adesividade, motilidade e invasão de células epiteliais e estromais uterinas em sistemas *in vitro*. Outro componente utilizado foi a fibronectina, um dos principais componentes da matriz extracelular, essencial nos processos de tração e motilidade celular (DAVIDSON; KELLER; DESIMONE, 2004). Na medida em que utilizamos estes componentes-chave para a sobrevivência das células estromais, é possível que tenhamos contribuído para a manutenção e sobrevivência destas células. Nas análises histológicas de nossas culturas, a matriz utilizada se mostrou homogênea e interposta por células estromais e, levemente mais condensada ao redor das células, sugerindo a deposição de novos

componentes e a funcionalidade das células no sistema utilizado.

A fisiologia do tecido endometrial é regida por inúmeras interações moleculares entre seus componentes vasculares, glandulares e estromais. Segundo Beloglazova e colaboradores (2022), a ausência de células estromais sob o endotélio, previne a produção de membrana basal, levando a desestabilização do crescimento e manutenção das células endoteliais ao longo do tempo. Nas nossas preparações do modelo 3D, 24 horas após a inserção das células endoteliais, o sistema já apresentava o assentamento quase completamente contínuo destas células sobre a matriz celularizada. Interessantemente, as células se espalharam sobre a matriz com o matrigel e formaram um epitélio simples e contínuo. Embora a caracterização da população endotelial mostrou que se tratava de uma população mista de células (com algumas células CK e IGFBP1 positivas) não observamos na análise das células por imunofluorescência a presença de tipos celulares que não fossem exclusivamente vimentina e CD105 positivas. Este resultado sugere que a organização da estratificação foi seletiva, envolvendo a reepitelização apenas com as células endoteliais. Neste contexto, o modelo mostrou-se eficiente para mimetizar superfícies vasculares sobre tecido suporte, abrindo muitas oportunidades de estudos sobre as relações conteúdo vascular e suas ações sobre tecidos subjacentes. Entretanto, essas possibilidades devem ainda ser validadas com estudos aprofundados sobre a morfofisiologia destas células neste modelo.

No compartimento estromal, pudemos detectar a presença de outras células, além do predomínio de células exclusivamente reativas apenas a vimentina. Poucas células CK+ e CD105+ foram observadas em nossas análises imunohistoquímicas. A presença destas células não é uma característica distoante no estroma endometrial, que é rico em vasos e glândulas.

De modo geral, o sistema de cocultivo mostrou células de características morfológicas saudáveis revestindo células estromais organizadas em um arranjo tridimensional quando embebidas em uma matriz extracelular e, que guarda semelhanças com a organização tecidual encontrada *in vivo*.

### **6.3. Possibilidade de cocultivo de células trofodérmicas e endometriais humanas para estudo da implantação embrionária**

Como uma forma de testar o potencial do modelo caracterizado, realizamos um ensaio inserindo o trofodermis de três blastocistos aneuploides sobre o modelo 3D. No curto período em que esteve no sistema de cocultivo, o trofodermis aderiu às

células endometriais, mas não observamos qualquer invasão. A possibilidade de manutenção das células trofodérmicas saudáveis e aderidas ao sistema por si só foi um aspecto de sucesso do modelo. Obviamente, o tempo de cocultivo pode ter sido um fator limitante para que houvesse o reequilíbrio destas células após congelamento e descongelamento e sua ativação completa incluindo capacidade invasiva. De qualquer forma, o modelo se mostrou promissor na adesão do trofodermis e poderá ampliar conhecimentos da fase de implantação embrionária.

Um aspecto importante nessa ativação do trofodermis a ser considerado são os níveis hormonais. *In vivo* o meio tubário e mesmo o uterino está sob ação de esteroides, que desempenham papéis essenciais na ativação do blastocisto (MATSUMOTO, 2017). Durante o processo de fertilização *in vitro* e análise de seu perfil gênico e genético, os blastocistos obtidos na clínica de reprodução são mantidos em meio que não contém esteroides. Em nosso modelo, é vital que mantenhamos o meio com esses hormônios para a manutenção das células endometriais. Neste contexto, é possível que a adaptação nos meios de coleta e manutenção do blastocisto e o utilizado para o sistema de cocultivo requeira um certo tempo para a ativação da atividade invasiva do trofodermis. É possível que períodos mais longos de cultura permitam a diferenciação das células trofoblásticas, o que precisará ser estudado em experimentos futuros.

Outra possibilidade que não pode ser descartada é a incapacidade invasiva ser oriunda da aneuploidia encontrada nos blastocistos. Recentemente algumas clínicas têm utilizado embriões aneuploides para os tratamentos de reprodução assistida e encontrada taxas muito baixas de implantação destes embriões (SCHAEFFER *et al.*, 2020). No entanto, o fato de terem aderido ao sistema, indica que pelo menos parte de suas propriedades está mantida e que podem ser utilizados para o conhecimento do processo de implantação embrionária, mesmo que em suas fases precoces.

Em suma, o modelo apresentado mostra-se promissor embora apresente aspectos que precisam ser melhor estudados. Ele apresenta a desvantagem de propiciarem estudos de curta duração e nem sempre tão homogêneos, devido à heterogeneidade da procedência das células. No entanto, abre a possibilidade de estudos mais abrangentes no que se refere as possíveis relações e interações celulares nas respostas orgânicas a fatores ambientais. Assim, apesar dos riscos assumidos entendemos que este estudo pode contribuir de diferentes maneiras com conhecimentos importantes. A reconstrução uterina a partir de células endoteliais sobre um ambiente contendo células estromais por si só pode levar a um modelo para

múltiplos propósitos experimentais e testes terapêuticos, além de abrir novas possibilidades de estudo para a compreensão dos processos indutores/reguladores da fisiologia uterina e conseqüentemente, da gestação.



Os resultados obtidos mostraram a viabilidade da obtenção de células endometriais a partir de fragmentos de biópsias humanas para a montagem de um sistema de cocultivo com predomínio de células endoteliais, mantidas sobre células estromais sustentadas por uma matriz extracelular, mimetizando a organização tecidual tridimensional.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, Y. et al. Generation of a three-dimensional collagen scaffold-based model of the human endometrium. **Interface Focus**, v. 10, n. 2, p. 20190079, 2020.

ACHACHE, H. et al. Defective endometrial prostaglandin synthesis was identified in patients with repeated implantation failure undergoing in vitro fertilization. **Fertility and sterility**, v. 94, n. 4, p. 1271-1278, 2010.

ALTMÄE, S. et al. Meta-signature of human endometrial receptivity: a meta-analysis and validation study of transcriptomic biomarkers. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 10077, 2017.

AMER, M. I. et al. Human amnion as a temporary biologic barrier after hysteroscopic lysis of severe intrauterine adhesions: pilot study. **Journal of Minimally Invasive Gynecology**, v. 17, n. 5, p. 605-611, 2010.

APLIN, J. D.; CHARLTON, A. K.; AYAD, S. An immunohistochemical study of human endometrial extracellular matrix during the menstrual cycle and first trimester of pregnancy. **Cell and tissue research**, v. 253, n. 1, p. 231-240, 1988.

APLIN, J. D.; RUANE, P. T. Embryo–epithelium interactions during implantation at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 130, n. 1, p. 15-22, 2017.

ARNAOUTOVA, I. et al. The endothelial cell tube formation assay on basement membrane turns 20: state of the science and the art. **Angiogenesis**, v. 12, n. 3, p. 267-274, 2009.

ASHARY, N.; TIWARI, A.; MODI, D. Embryo implantation: war in times of love. **Endocrinology**, v. 159, n. 2, p. 1188-1198, 2018.

BAATOUT, S.; CHEȚA, N. Matrigel: a useful tool to study endothelial differentiation. **Romanian Journal of Internal Medicine**, v. 34, n. 3-4, p. 263-269, 1996.

BEI, Y. et al. Cardiac telocytes and fibroblasts in primary culture: different morphologies and immunophenotypes. **PLoS One**, v. 10, n. 2, p. e0115991, 2015.

BELOGLAZOVA, I. et al. New Insight on 2D In Vitro Angiogenesis Models: All That Stretches Is Not a Tube. **Cells**, v. 11, n. 20, p. 3278, 2022.

BENIRSCHKE, K., KAUFMANN, P. Early development of the human placenta. In: **Pathology of the Human Placenta**. Springer, Berlin, Heidelberg. p. 42-49, 2006.  
BILALIS, D. A.; KLENTZERIS, L. D.; FLEMING, S. Uterus, and endometrium: Immunohistochemical localization of extracellular matrix proteins in luteal phase endometrium of fertile and infertile patients. **Human reproduction**, v. 11, n. 12, p. 2713-2718, 1996.

BRIGHTON, C. T.; HUNT, R. M. Early histologic and ultrastructural changes in microvessels of periosteal callus. **Journal of Orthopaedic Trauma**, v. 11, n. 4, p. 244-

253, 1997.

CARTER, A. M., ENDERS, A. C., PIJNENBORG, R. The role of invasive trophoblast in implantation and placentation of primates. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 370, n. 1663, p. 20140070, 2015.

CASTRO-RENDÓN, W. A. et al. Blastocyst-endometrium interaction: intertwining a cytokine network. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, p. 1373-1385, 2006.

CHEN, C. P.; LIU, S. H.; LEE, M. Y.; CHEN, Y. Y. Heparan sulfate proteoglycans in the basement membranes of the human placenta and decidua. **Placenta**, v. 29, n. 4, p. 309 – 16, 2008.

CHEN, Y.; CHANG, Y.; YAO, S. Role of angiogenesis in endometrial repair of patients with severe intrauterine adhesion. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 6, n. 7, p. 1343, 2013.

CHEUNG, V. C. et al. Pluripotent stem cell-derived endometrialstromal fibroblasts in a cyclic, hormone-responsive, coculture model of human decidua. **Cell Reports**, v. 35, n. 7, p. 109138, 2021.

CRITCHLEY, H. O. D. et al. Physiology of the endometrium and regulation of menstruation. **Physiological Reviews**, 2020.

CROSS, J. C.; WERB, Z.; FISHER, S. J. Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. **Science**, v. 266, n. 5190, p.1508-1518, 1994.

DAMSKY, C.; SUTHERLAND, A.; FISHER, S. Extracellular matrix 5: adhesive interactions in early mammalian embryogenesis, implantation, and placentation. **The FASEB Journal**, v. 7, n. 14, p. 1320- 1329, 1993.

DAVIDSON, L. A.; KELLER, R.; DESIMONE, D. W. Assembly and remodeling of the fibrillar fibronectin extracellular matrix duringgastrulation and neurulation in *Xenopus laevis*. **Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists**, v. 231, n. 4, p. 888-895, 2004.

DEANS, R.; ABBOTT, J.. Review of intrauterine adhesions. **Journal of Minimally Invasive Gynecology**, v. 17, n. 5, p. 555-569, 2010.

DECICCO-SKINNER, K. L. et al. Endothelial cell tube formation assay forthe in vitro study of angiogenesis. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 91, p. e51312, 2014.

DEMIR, R. et al. Structural differentiation of human uterine luminal and glandular epithelium during early pregnancy: an ultrastructural and immunohistochemical study. **Placenta**, v. 23, n. 8-9, p. 672-684, 2002.

DEVI, K. A.; DAMAYANTI, N.; MATUM, M. Histogenesis of uterus in human fetuses.

**Journal of the Anatomical Society of India**, v. 67, n. 2, p. 166-170, 2018.

DÍEZ, M. C. et al. Generation of a novel three-dimensional scaffold-based model of the bovine endometrium. **Veterinary Research Communications**, p. 1-13, 2023.

DOMINGUEZ, F. et al. Human endometrial CD98 is essential for blastocyst adhesion. **PLoS One**, v. 5, n. 10, p. e13380, 2010.

DUVAL, K. et al. Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. **Physiology**, v. 32, n. 4, p. 266-277, 2017.

DYE, J. F. et al. Distinct patterns of microvascular endothelial cell morphology are determined by extracellular matrix composition. **Endothelium**, v. 11, n. 3-4, p. 151-167, 2004.

EGASHIRA, M., HIROTA, Y. Uterine receptivity and embryo–uterine interactions in embryo implantation: lessons from mice. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 12, n. 4, p. 127-132, 2013.

ENDERS, A. C. Implantation in the macaque: expansion of the implantation site during the first week of implantation. **Placenta**, v. 28, n. 8-9, p. 794-802, 2007.

ENDERS, A. C., HENDRICKX, A. G.; SCHLAFKE, S. Implantation in the rhesus monkey: initial penetration of endometrium. **American Journal of Anatomy**, v. 167, n. 3, p. 275-298, 1983.

ENDERS, A. C.; SCHLAFKE, Sandra. A morphological analysis of the early implantation stages in the rat. **American Journal of Anatomy**, v. 120, n. 2, p. 185-225, 1967.

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

FINN, C. A.; LAWN, A. M. Specialized junctions between decidual cells in the uterus of the pregnant mouse. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 20, n. 5-6, p. 321-327, 1967.

FLANNERY, C. A. et al. Insulin regulates glycogen synthesis in human endometrial glands through increased GYS2. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 103, n. 8, p. 2843-2850, 2018.

GARGETT, C. E.; CHAN, R. W. S; SCHWAB, K. E. Hormone and growth factor signaling in endometrial renewal: role of stem/progenitor cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 288, n. 1-2, p. 22-29, 2008.

GARRIDO-GOMEZ, T., DOMINGUEZ, F., LOPEZ, J. A., et al. Modeling human endometrial decidualization from the interaction between proteome and secretome. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 96, n. 3, p. 706–716, 2011.

GELLERSEN, B., BROSENS, J. J. Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure. **Endocrine Reviews**, v. 35, p. 851-905, 2014.

GENBACEV, O. D. et al. Trophoblast L-selectin-mediated adhesion at the maternal-fetal interface. **Science**, v. 299, n. 5605, p. 405-408, 2003.

GIUDICE, L. C.; DSUPIN, B. A.; IRWIN, J. C. Steroid and peptide regulation of insulin-like growth factor-binding proteins secreted by human endometrial stromal cells is dependent on stromal differentiation. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 75, n. 5, p. 1235-1241, 1992.

GNECCO, J. S. et al. Hemodynamic forces enhance decidualization via endothelial-derived prostaglandin E2 and prostacyclin in a microfluidic model of the human endometrium. **Human Reproduction**, v. 34, n. 4, p. 702-714, 2019.

GRINNELL, F. Fibroblast–collagen-matrix contraction: growth-factor signalling and mechanical loading. **Trends in Cell Biology**, v. 10, n. 9, p. 362-365, 2000.

HANDSCHUH, K. et al. Human chorionic gonadotropin produced by the invasive trophoblast but not the villous trophoblast promotes cell invasion and is down-regulated by peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ . **Endocrinology**, v. 148, n. 10, p. 5011-5019, 2007.

HANNA, J. et al. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. **Nature Medicine**, v. 12, n.9, p. 1065-1074, 2006.

HARRIS, L. K. Trophoblast-vascular cell interactions in early pregnancy: how to remodel a vessel. **Placenta**, v. 31, p. S93-S98, 2010.

HEMPSTOCK, J. et al. Endometrial glands as a source of nutrients, growth factors and cytokines during the first trimester of human pregnancy: a morphological and immunohistochemical study. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 2, n. 1, p. 1-14, 2004.

HORII, M., TOUMA, O., BUI, T., et al. Modeling human trophoblast, the placental epithelium at the maternal fetal interface. **Reproduction**, v. 160, n.1, p. R1-R11, 2020.

HUTCHINGS, H.; ORTEGA, Nathalie; PLOUËT, Jean. Extracellular matrix-bound vascular endothelial growth factor promotes endothelial cell adhesion, migration, and survival through integrin ligation. **The FASEB Journal**, v. 17, n. 11, p. 1-27, 2003.

IOZZO, R. V. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. **Annual review of biochemistry**, v. 67, n. 1, p. 609-652, 1998.

IRVING, J. A.; LALA, P. K. Functional role of cell surface integrins on human trophoblast cell migration: regulation by TGF- $\beta$ , IGF-II, and IGFBP-1. **Experimental cell research**, v. 217, n. 2, p. 419-427, 1995.

IRWIN, J. C. et al. Insulin-like growth factor regulation of human endometrial stromal cell function: coordinate effects on insulin-like growth factor binding protein-1, cell proliferation and prolactin secretion. **Regulatory Peptides**, v. 48, n. 1-2, p. 165-177, 1993.

KADOKAWA, Y. et al. Expression Pattern of E-and P-Cadherin in Mouse Embryos and

Uteri during the Periimplantation Period: (implantation/mouse embryo/cell adhesion molecules E-cadherin/P-cadherin). **Development, Growth & Differentiation**, v. 31, n. 1, p. 23-30, 1989.

KAJIMOTO, K. et al. Isolation and culture of microvascular endothelial cells from murine inguinal and epididymal adipose tissues. **Journal of Immunological Methods**, v. 357, n. 1-2, p. 43-50, 2010.

KALKUNTE, S. et al. In vitro and in vivo evidence for lack of endovascular remodeling by third trimester trophoblasts. **Placenta**, v. 29, n.10, p. 871-878, 2008.

KIM, S.-M.; KIM, J.-S. A review of mechanisms of implantation. **Development & Reproduction**, v. 21, n. 4, p. 351, 2017.

KIM, S.-H.; TURNBULL, Jeremy; GUIMOND, Scott. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. **Journal of Endocrinology**, v. 209, n. 2, p. 139-151, 2011.

KIM, Y. Y. et al. Synergistic regenerative effects of functionalized endometrial stromal cells with hyaluronic acid hydrogel in a murine model of uterine damage. **Acta Biomaterialia**, v. 89, p. 139-151, 2019.

KING, A. et al. Immunocytochemical characterization of the unusual large granular lymphocytes in human endometrium throughout the menstrual cycle. **Human immunology**, v. 24, n. 3, p. 195-205, 1989.

KOLANSKA, K. et al. Endometriosis with infertility: A comprehensive review on the role of immune deregulation and immunomodulation therapy. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 85, n. 3, p. e13384, 2021.

KREGE, J. H. et al. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor  $\beta$ . **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 26, p. 15677-15682, 1998.

KUO, C.Y., SHEVCHUK, M., OPFERMANN, J., et al. Trophoblast–endothelium signaling involves angiogenesis and apoptosis in a dynamic bioprinted placenta model. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 116, n. 1, p. 181-192, 2019.

LALA, P. K. et al. A crossroad between placental and tumor biology: What have we learnt? **Placenta**, v. 116, p. 12-30, 2021.

LAWLEY, T. J.; KUBOTA, Y. Induction of morphologic differentiation of endothelial cells in culture. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 93, n. 2, p. S59-S61, 1989.

LOKE, Y. W.; KING, A.; BURROWS, T. D. Decidua in human implantation. **Human Reproduction**, v. 10, n. suppl\_2, p. 14-21, 1995.

LONG, J. et al. Identification of a family of fatty-acid-speciated sonic hedgehog proteins, whose members display differential biological properties. **Cell Reports**, v. 10, n. 8, p. 1280-1287, 2015.

MARTINEZ, I. et al. The influence of oxygen tension on the structure and function of

- isolated liver sinusoidal endothelial cells. **Comparative Hepatology**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2008.
- MASLAR, I. A.; RIDDICK, D. H. Prolactin production by human endometrium during the normal menstrual cycle. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 135, n. 6, p. 751-754, 1979.
- MATSUMOTO, H. Molecular and cellular events during blastocyst implantation in the receptive uterus: clues from mouse models. **Journal of Reproduction and Development**, v. 63, n. 5, p. 445-454, 2017.
- MCLAUGHLIN, J. E. et al. Inhibition of hyaluronic acid synthesis decreases endometrial cell attachment, migration, and invasion. **Reproductive Sciences**, v. 27, n. 4, p. 1058-1063, 2020.
- MORI, M. et al. The decidua—the maternal bed embracing the embryo—maintains the pregnancy. In: **Seminars in Immunopathology**, p. 635-649, 2016.
- MURAKAMI, K. et al. Decidualization induces a secretome switch in perivascular niche cells of the human endometrium. **Endocrinology**, v. 155, n. 11, p. 4542-4553, 2014.
- MURATA, H.; TANAKA, S.; OKADA, H. Immune tolerance of the human decidua. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 2, p. 351, 2021.
- NG, S.-W. et al. Endometrial decidualization: the primary driver of pregnancy health. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 11, p. 4092, 2020.
- NGUYEN, H. P.T; SPRUNG, C. N.; GARGETT, C. E. Differential expression of Wnt signaling molecules between pre- and postmenopausal endometrial epithelial cells suggests a population of putative epithelial stem/progenitor cells reside in the basalis layer. **Endocrinology**, v. 153, n. 6, p. 2870-2883, 2012.
- NISHIGUCHI, A., GILMORE, C., SOOD, A., et al. In vitro placenta barrier model using primary human trophoblasts, underlying connective tissue and vascular endothelium. **Biomaterials**, v. 192, p. 140-148, 2019.
- O'CONNOR, B. B. et al. The role of extracellular matrix in normal and pathological pregnancy: Future applications of microphysiological systems in reproductive medicine. **Experimental Biology and Medicine**, v. 245, n. 13, p. 1163-1174, 2020.
- PAN-CASTILLO, B. et al. Morphophysical dynamics of human endometrial cells during decidualization. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 14, n. 7, p. 2235-2245, 2018.
- PARK, D. W. et al. Peripheral blood NK cells reflect changes in decidual NK cells in women with recurrent miscarriages. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 63, n. 2, p. 173-180, 2010.
- PARK, J. Y. et al. A microphysiological model of human trophoblast invasion during implantation. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 1-18, 2022.
- PARVANOV, D. et al. Association between endometrial senescent cells and immune

cells in women with repeated implantation failure. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, p. 1-8, 2023.

PATEL, J. et al. Regulation of hypoxia inducible factors (HIF) in hypoxia and normoxia during placental development. **Placenta**, v. 31, n. 11, p. 951-957, 2010.

PAVLIK, Edward J.; KATZENELLENBOGEN, Benita S. Células endometriais humanas em cultura primária de tecidos: interações estrogênicas e modulação da proliferação celular. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 2, pág. 333-344, 1978.

PEEK, M.; LANDGREN, B.-M.; JOHANNISSON, E. The endometrial capillaries during the normal menstrual cycle: a morphometric study. **Human Reproduction**, v. 7, n. 7, p. 906-911, 1992.

PIJNENBORG, R. The human decidua as a passageway for trophoblast invasion: a review. **Placenta**, v.19, p. 229-241, 1998.

PLAISIER, M., RODRIGUES, S., WILLEMS, F., et al. Different degrees of vascularization and their relationship to the expression of vascular endothelial growth factor, placental growth factor, angiopoietins, and their receptors in first-trimester decidual tissues. **Fertility and Sterility**, v. 88, n. 1,p. 176-187, 2007.

PLAKS, V. et al. Uterine DCs are crucial for decidua formation during embryo implantation in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 12, p. 3954-3965, 2008.

QIN, X. et al. An autocrine/paracrine role of human decidual relaxin. II. Stromelysin-1 (MMP-3) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1). **Biology of reproduction**, v. 56, n. 4, p. 812-820, 1997.

QUENBY, S. et al. Uterine natural killer cells and angiogenesis in recurrent reproductive failure. **Human Reproduction**, v. 24, n. 1, p. 45-54, 2009.

RAMATHAL, C. Y. et al. Endometrial decidualization: of mice and men. In:**Seminars in Reproductive Medicine**, p. 017-026, 2010.

ROBERTSON, W. B. Uteroplacental vasculature. **Journal of Clinical Pathology. Supplement (Royal College of Pathologists)**, v. 10, p. 9, 1976.

ROBSON, A. et al. Uterine natural killer cells mediate the dedifferentiation of spiral artery vascular smooth muscle cells in early human pregnancy. **Human Reproduction**, 2019.

ROWLANDS, T. M. et al. Cadherins: crucial regulators of structure and function in reproductive tissues. **Reviews of Reproduction**, v. 5, n. 1, p. 53-61, 2000.

RSHOUD, F. et al. Polycystic ovarian syndrome—association and risk factors between endometrial polyp and infertility. A retrospective study. **Menopause Review/Przegląd Menopauzalny**, v. 21, n. 2, p. 106-110, 2022.

RUANE, P. T. et al. Trophoctoderm differentiation to invasive syncytiotrophoblast is induced by endometrial epithelial cells during human embryo implantation. **bioRxiv**, 2020.

RUANE, P. T. et al. Trophoctoderm differentiation to invasive syncytiotrophoblast is promoted by endometrial epithelial cells during human embryo implantation. **Human Reproduction**, v. 37, n. 4, p. 777-792, 2022.

SCHAEFFER, Elizabeth et al. Embryos derived from donor or patient oocytes are not different for in vitro fertilization outcomes when PGT allows euploid embryo selection: a retrospective study. **Clinical and Translational Medicine**, v. 9, n. 1, p. e14, 2020.

SCHUTTE, S. C.; TAYLOR, R. N. A tissue-engineered human endometrial stroma that responds to cues for secretory differentiation, decidualization, and menstruation. **Fertility and sterility**, v. 97, n. 4, p. 997-1003, 2012.

SCHWAB, K. E.; HUTCHINSON, P.; GARGETT, C. E. Identification of surface markers for prospective isolation of human endometrial stromal colony-forming cells. **Human Reproduction**, v. 23, n. 4, p. 934-943, 2008.

SHAKIBA, D. et al. The balance between actomyosin contractility and microtubule polymerization regulates hierarchical protrusions that govern efficient fibroblast–collagen interactions. **ACS Nano**, v. 14, n. 7, p. 7868-7879, 2020.

SHARMA, S.; GODBOLE, G.; MODI, D. Decidual control of trophoblast invasion. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 75, n. 3, p. 341-350, 2016.

SINGH, N.; SETHI, A. Endometritis-Diagnosis, Treatment and its impact on fertility-A Scoping Review. **JBRA Assisted Reproduction**, v. 26, n. 3, p. 538, 2022.

SLATER, K.; PARTRIDGE, J.; NADIVADA, H. Tuning the elastic moduli of Corning® Matrigel® and collagen I 3D matrices by varying the protein concentration. **Corning Application Note**, 2017.

SMITH, C. A.; MOORE, H. D. M.; HEARN, J. P. The ultrastructure of early implantation in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). **Anatomy and Embryology**, v. 175, n. 3, p. 399-410, 1987.

SMITH, S. K. Regulation of angiogenesis in the endometrium. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 12, n. 4, p. 147-151, 2001.

SOPHONSRITSUK, A. et al. Effects of ethinyl estradiol in combined oral contraceptives on cell proliferation and apoptosis in ectopic endometrial tissue: a randomized controlled study. **Journal of Family & Reproductive Health**, v. 15, n. 1, p. 45, 2021.

STREULI, C. Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 11, n. 5, p. 634-640, 1999.

SZUBERT, M. et al. Adenomyosis and infertility—review of medical and surgical approaches. **International journal of environmental research and public health**, v.

18, n. 3, p. 1235, 2021.

TAKEICHI, M. The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. **Development**, v. 102, n. 4, p. 639-55. 1988.

TIAN, Y. et al. Endometrial hyperplasia in infertile women undergoing IVF/ICSI: A retrospective cross-sectional study. **Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction**, v. 49, n. 9, p. 101780, 2020.

TICCONI, C. et al. Clinical consequences of defective decidualization. **Tissue and Cell**, v. 72, p. 101586, 2021.

TOMARI, H. et al. Contribution of senescence in human endometrial stromal cells during proliferative phase to embryo receptivity. **Biology of Reproduction**, v. 103, n. 1, p. 104-113, 2020.

TORRY, D. S. et al. Angiogenesis in implantation. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 24, n. 7, p. 303-315, 2007.

TOTH, B. et al. Glycodelin protein and mRNA is downregulated in human first-trimester abortion and partially upregulated in mole pregnancy. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 56, n. 5, p. 477-485, 2008.

TURPEENIEMI-HUJANEN, T. et al. Extracellular matrix interactions in early human embryos: implications for normal implantation events. **Fertility and Sterility**, v. 64, n. 1, p. 132-138, 1995.

UCHIDA, H. et al. Studies using an in vitro model show evidence of involvement of epithelial-mesenchymal transition of human endometrial epithelial cells in human embryo implantation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 7, p. 4441-4450, 2012.

UJVARI, D.; GRAELLS BRUGALLA, C.; HIRSCHBERG, Angelica Lindén. Dihydrotestosterone potentiates insulin to up-regulate prokineticin-1 in decidualizing human endometrial stromal cells. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 24, n. 5, p. 3242-3245, 2020.

VERMA, S. et al. Human decidual natural killer cells express the receptor for and respond to the cytokine interleukin 15. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 4, p. 959-968, 2000.

VIDI, P. A., BISSELL, M. J., LELIÉVRE, S. A. Three-dimensional culture of human breast epithelial cells: the how and the why. **Methods in Molecular Biology**, v. 945, p. 193-219, 2013.

VINKETOVA, K., MOURDJEVA, M., ORESHKOVA, T. Human Decidual Stromal Cells as a Component of the Implantation Niche and a Modulator of Maternal Immunity. **Journal of Pregnancy**, v. 2016, p. 83-104, 2016.

WANG H., PILLA F., ANDERSON S., et al. A novel model of human implantation: 3D endometrium-like culture system to study attachment of human trophoblast (Jar) cell spheroids. **Molecular Human Reproduction**, v. 18, n.1, p. 33-43, 2012.

WANG, H., DEY, S. K. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. **Nature Reviews Genetics**, v. 7, n. 3, p. 185-199, 2006.

WILCOX, A. J. et al. Incidence of early loss of pregnancy. **New England Journal of Medicine**, v. 319, n. 4, p. 189-194, 1988.

WONG, M. K., WAHED, M., SHAWKY, S. A., et al. Transcriptomic and functional analyses of 3D placental extravillous trophoblast spheroids. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Infertility prevalence estimates: **1990–2021**. 2023.

YANG, R. et al. Mechanoadaptive injectable hydrogel based on poly ( $\gamma$ -glutamic acid) and hyaluronic acid regulates fibroblast migration forward healing. **Carbohydrate Polymers**, v. 273, p. 118607, 2021.

YE, D.; DAWSON, K. A.; LYNCH, I. A TEM protocol for quality assurance of in vitro cellular barrier models and its application to the assessment of nanoparticle transport mechanisms across barriers. **Analyst**, v. 140, n. 1, p. 83-97, 2015.

YOU Y., STELZL P., ZHANG Y., et al. Novel 3D in vitro models to evaluate trophoblast migration and invasion. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 81, n. 3, 13076, 2019.

ZAMBUTO, S. G.; CLANCY, K. B. H; HARLEY, B.A.C. A gelatin hydrogel to study endometrial angiogenesis and trophoblast invasion. **Interface Focus**, v. 9, n. 5, p. 20190016, 2019.

ZHENG, S. et al. Decidual mesenchymal stem/stromal cell- derived extracellular vesicles ameliorate endothelial cell proliferation, inflammation, and oxidative stress in a cell culture model of preeclampsia. **Pregnancy Hypertension**, v. 22, p. 37-46, 2020.

ZINAMAN, M. J. et al. Estimates of human fertility and pregnancy loss. **Fertility and Sterility**, v. 65, n. 3, p. 503-509, 1996.

## APÊNDICES

### APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para coleta de biópsia endometrial.



#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (VIA PARTICIPANTE)

Você está sendo convidado(a) a participar da pesquisa "Papel das células trofoblásticas na indução de fatores angiogênicos pelo epitélio glandular uterino e de apoptose pelo endotélio uterino. Análise em sistemas 3D de co-cultivo.", de responsabilidade da Bióloga pesquisadora e coordenadora científica do Grupo Huntington, Dra. Aline Rodrigues Lorenzon e da Profa Dra Estela Bevilacqua, Profa Titular e chefe do Laboratório de Biologia do Trofoblasto do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (ICB-USP). O Grupo Huntington será responsável pela disponibilização dos embriões para esse estudo.

Leia cuidadosamente o que se segue e pergunte ao responsável pelo estudo qualquer dúvida que você tiver. Os contatos estão listados ao final deste termo.

A finalidade deste estudo é entender como as células do embrião interagem com as células do útero no processo de implantação embrionária. Para isso, nosso estudo pretende desenvolver um método para cultivar as células do útero, mais especificamente do endométrio (que é a camada que fica em contato com o embrião quando ele chega no útero), juntamente com as células do embrião, mais especificamente com as células da trofoectoderme (que são as células que ficam mais externas no embrião), em laboratório com o intuito de pesquisar uma das etapas do processo de implantação embrionária. Vamos estudar de que forma as células da trofoectoderme estimulam a secreção de substâncias pelas glândulas do endométrio, facilitando assim o processo de implantação do embrião e se há ou não indução, por parte das células do trofoectoderme, de morte celular nas células endoteliais. Nós acreditamos que este estudo poderá contribuir para o melhor conhecimento básico de etapas importantes da implantação do embrião humano, que ainda é bastante pouco conhecido em humanos. Ao participar deste estudo, você contribuirá para o avanço dessa área do conhecimento.

Caso você aceite participar deste estudo, você nos autorizará que parte da biópsia de endométrio (um fragmento de ~ 1 cm<sup>3</sup>) a que você será submetida para o diagnóstico de endometrites antes dos procedimentos de Reprodução Assistida, seja doada para pesquisa científica. O uso desse material não implicará em riscos adicionais nem exigirá que você se submeta a qualquer outro procedimento. Os riscos relacionados à biópsia endometrial são considerados mínimos, sendo que todo material é estéril e ocorre uma assepsia local completa. Durante e após o procedimento, as pacientes podem ter cólicas abdominais semelhantes às cólicas menstruais. Neste caso, os médicos envolvidos podem receitar anti-inflamatórios e analgésicos quando julgarem necessário. A biópsia do endométrio será realizada nas dependências das clínicas do Grupo Huntington Medicina Reprodutiva e o fragmento destinado à pesquisa será transportado para o Laboratório de Biologia do Trofoblasto, onde terá suas células e glândulas separadas e mantidas em cultivo para que posteriormente possam ser

---

*Av. República do Líbano, 529 - Ibirapuera - São Paulo, SP 04501-000 - (11) 30596100*



utilizadas para experimentos com células de embriões.



Todos os seus dados serão mantidos em anonimato e armazenados em arquivos eletrônicos, sob a responsabilidade da Clínica Huntington. A sua identidade será mantida em sigilo e anonimato, em todos os momentos do estudo e na divulgação dos resultados. Apesar de todas as medidas disponíveis para a manutenção do anonimato de seus dados serem tomadas pela equipe da pesquisa, existe risco de quebra acidental do anonimato dos dados.

Na eventualidade de ocorrência de qualquer dano ou prejuízo a você em decorrência da participação deste estudo, a equipe de pesquisa responsável imediatamente garantirá acompanhamento e suporte gratuito, sejam eles diretos ou indiretos e imediatos ou tardios, pelo tempo necessário. Você tem o direito de buscar a indenização, conforme determina a lei, em caso de danos decorrentes da sua participação neste estudo.

A participação neste estudo não traz benefícios diretos para você neste momento. Porém, indiretamente você contribuirá para que novos conhecimentos sobre o processo de implantação do embrião humano no útero possam ser descobertos, e para que, no futuro, esse conhecimento possa auxiliar nos tratamentos de reprodução humana.

O fragmento de endométrio e todos os produtos derivados dele (células) utilizados para esse estudo serão unicamente utilizados para fins de pesquisa e não serão utilizadas para terapia ou qualquer outro fim em seres humanos.

Você não receberá recompensa financeira para participar deste estudo.

Você tem liberdade de desistir ou interromper a concessão da sua biópsia de endométrio para este estudo, no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação.

A retirada do consentimento da sua biópsia de endométrio do estudo deverá ser realizada por escrito e assinada, podendo dar-se a qualquer tempo, sem prejuízo a você, com validade a partir da data da comunicação da decisão. A desistência não virá a interferir no atendimento ou no tratamento médico.

Os resultados obtidos durante este estudo poderão ser publicados em revistas científicas, não havendo menção a seus dados pessoais. Se for de seu interesse, você terá acesso às principais conclusões do estudo.

Em qualquer etapa da pesquisa, você poderá entrar em contato com os profissionais responsáveis para esclarecimento de dúvidas ou para reportar algum problema. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com a Comissão de Ética em Pesquisa Seres Humanos (CEP) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP), um colegiado independente que defende os seus interesses como participante desta pesquisa, ou com a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Pág. 2/4



Este termo foi elaborado em duas vias que, devidamente assinadas, uma ficará com você e a outra, com as pesquisadoras responsáveis. Todas as páginas serão rubricadas pelas pesquisadoras responsáveis ou pessoas por elas delegadas, assim como pelos participantes da pesquisa.

Declaro que li e entendi este termo. Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas e voluntariamente participei do estudo.

\_\_\_\_\_  
Nome do Participante

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Participante

\_\_\_\_\_  
Nome do Participante

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Participante

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido desta paciente e comprometo-me a cumprir todos os termos acima descritos.

Aline Rodrigues Lorenzon

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador (Grupo Huntington)

Estela Maris Andrade Forell Bevilacqua

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador (ICB-USP)

Informações para contatos:

CEP-ICB-USP: Avenida Prof. Lineu Prestes, 2415, Cidade Universitária, Butantã, São Paulo, SP. CEP: 05508-000. TEL: (11) 3091-7733, das 08h às 17h - E-mail: [cep@icb.usp.br](mailto:cep@icb.usp.br).

CONEP:

Comissão Nacional de Ética em Pesquisa informando: SRTVN - Via W 5 Norte - Edifício PO700 - Quadra 701, Lote D - 3º andar - Asa Norte, CEP 70.719-040, Brasília (DF);

Pág. 3/4



Telefone: (61) 3315-5877. E-mail: [conep@saude.gov.br](mailto:conep@saude.gov.br). Horário de atendimento: 08h às 18h.

**Pesquisadoras Responsáveis:**

Prof. Dra Estela Bevilacqua, pode ser encontrada presencialmente no Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento – ICB-USP – Av. Prof. Lineu Prestes, 1524, sala 304, Cidade Universitária São Paulo, SP com agendamento prévio pelos telefones (11) 3091-8050 ou (11) 99945-0784 ou por e-mail [bevilacq@usp.br](mailto:bevilacq@usp.br), em período integral.

Dra. Aline Rodrigues Lorenzon, pode ser encontrada presencialmente na unidade Ibirapuera do Grupo Huntington Medicina Reprodutiva – Av. República do Líbano, 529, Ibirapuera, São Paulo SP, com agendamento prévio pelos telefones (11) 3059-6100 ou (11) 99969-3990 ou pelo e-mail [alorenzon@huntington.com.br](mailto:alorenzon@huntington.com.br), em período integral.



**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO  
(VIA DO PESQUISADOR)**

Você está sendo convidado(a) a participar da pesquisa "Papel das células trofoblásticas na indução de fatores angiogênicos pelo epitélio glandular uterino e de apoptose pelo endotélio uterino. Análise em sistemas 3D de co-cultivo.", de responsabilidade da Bióloga pesquisadora e coordenadora científica do Grupo Huntington, Dra. Aline Rodrigues Lorenzon e da Profa Dra Estela Bevilacqua, Profa Titular e chefe do Laboratório de Biologia do Trofoblasto do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (ICB-USP). O Grupo Huntington será responsável pela disponibilização dos embriões para esse estudo.

Leia cuidadosamente o que se segue e pergunte ao responsável pelo estudo qualquer dúvida que você tiver. Os contatos estão listados ao final deste termo.

A finalidade deste estudo é entender como as células do embrião interagem com as células do útero no processo de implantação embrionária. Para isso, nosso estudo pretende desenvolver um método para cultivar as células do útero, mais especificamente do endométrio (que é a camada que fica em contato com o embrião quando ele chega no útero), juntamente com as células do embrião, mais especificamente com as células da trofoectoderme (que são as células que ficam mais externas no embrião), em laboratório com o intuito de pesquisar uma das etapas do processo de implantação embrionária. Vamos estudar de que forma as células da trofoectoderme estimulam a secreção de substâncias pelas glândulas do endométrio, facilitando assim o processo de implantação do embrião e se há ou não indução, por parte das células do trofoectoderme, de morte celular nas células endoteliais. Nós acreditamos que este estudo poderá contribuir para o melhor conhecimento básico de etapas importantes da implantação do embrião humano, que ainda é bastante pouco conhecido em humanos. Ao participar deste estudo, você contribuirá para o avanço dessa área do conhecimento.

Caso você aceite participar deste estudo, você nos autorizará que parte da biópsia de endométrio (um fragmento de ~ 1 cm<sup>3</sup>) a que você será submetida para o diagnóstico de endometrites antes dos procedimentos de Reprodução Assistida, seja doada para pesquisa científica. O uso desse material não implicará em riscos adicionais nem exigirá que você se submeta a qualquer outro procedimento. Os riscos relacionados à biópsia endometrial são considerados mínimos, sendo que todo material é estéril e ocorre uma assepsia local completa. Durante e após o procedimento, as pacientes podem ter cólicas abdominais semelhantes às cólicas menstruais. Neste caso, os médicos envolvidos podem receitar anti-inflamatórios e analgésicos quando julgarem necessário. A biópsia do endométrio será realizada nas dependências das clínicas do Grupo Huntington Medicina Reprodutiva e o fragmento destinado à pesquisa será transportado para o Laboratório de Biologia do Trofoblasto, onde terá suas células



e glândulas separadas e mantidas em cultivo para que posteriormente possam ser utilizadas para experimentos com células de embriões.

Todos os seus dados serão mantidos em anonimato e armazenados em arquivos eletrônicos, sob a responsabilidade da Clínica Huntington. A sua identidade será mantida em sigilo e anonimato, em todos os momentos do estudo e na divulgação dos resultados. Apesar de todas as medidas disponíveis para a manutenção do anonimato de seus dados serem tomadas pela equipe da pesquisa, existe risco de quebra acidental do anonimato dos dados.

Na eventualidade de ocorrência de qualquer dano ou prejuízo a você em decorrência da participação deste estudo, a equipe de pesquisa responsável imediatamente garantirá acompanhamento e suporte gratuito, sejam eles diretos ou indiretos e imediatos ou tardios, pelo tempo necessário. Você tem o direito de buscar a indenização, conforme determina a lei, em caso de danos decorrentes da sua participação neste estudo.

A participação neste estudo não traz benefícios diretos para você neste momento. Porém, indiretamente você contribuirá para que novos conhecimentos sobre o processo de implantação do embrião humano no útero possam ser descobertos, e para que, no futuro, esse conhecimento possa auxiliar nos tratamentos de reprodução humana.

O fragmento de endométrio e todos os produtos derivados dele (células) utilizados para esse estudo serão unicamente utilizados para fins de pesquisa e não serão utilizadas para terapia ou qualquer outro fim em seres humanos.

Você não receberá recompensa financeira para participar deste estudo.

Você tem liberdade de desistir ou interromper a concessão da sua biópsia de endométrio para este estudo, no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação.

A retirada do consentimento da sua biópsia de endométrio do estudo deverá ser realizada por escrito e assinada, podendo dar-se a qualquer tempo, sem prejuízo a você, com validade a partir da data da comunicação da decisão. A desistência não virá a interferir no atendimento ou no tratamento médico.

Os resultados obtidos durante este estudo poderão ser publicados em revistas científicas, não havendo menção a seus dados pessoais. Se for de seu interesse, você terá acesso às principais conclusões do estudo.

Em qualquer etapa da pesquisa, você poderá entrar em contato com os profissionais responsáveis para esclarecimento de dúvidas ou para reportar algum problema. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com a Comissão de Ética em Pesquisa Seres Humanos (CEP) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP), um colegiado

Pág. 2/4



independente que defende os seus interesses como participante desta pesquisa, ou com a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Este termo foi elaborado em duas vias que, devidamente assinadas, uma ficará com você e a outra, com as pesquisadoras responsáveis. Todas as páginas serão rubricadas pelas pesquisadoras responsáveis ou pessoas por elas delegadas, assim como pelos participantes da pesquisa.

Declaro que li e entendi este termo. Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas e voluntariamente participarei do estudo.

\_\_\_\_\_  
Nome do Participante

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Participante

\_\_\_\_\_  
Nome do Participante

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Participante

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido desta paciente e comprometo-me a cumprir todos os termos acima descritos.

Aline Rodrigues Lorenzon

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador (Grupo Huntington)

Estela Maris Andrade Forell Bevilacqua

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador (ICB-USP)

Informações para contatos:

CEP-ICB-USP: Avenida Prof. Lineu Prestes, 2415, Cidade Universitária, Butantã, São Paulo, SP. CEP: 05508-000. TEL: (11) 3091-7733, das 08h às 17h - E-mail: [cep@icb.usp.br](mailto:cep@icb.usp.br).

CONEP:

Pág. 3/4



Comissão Nacional de Ética em Pesquisa informando: SRTVN - Via W 5 Norte - Edifício PO700 - Quadra 701, Lote D - 3º andar - Asa Norte, CEP 70.719-040, Brasília (DF); Telefone: (61) 3315-5877. E-mail: [conep@saude.gov.br](mailto:conep@saude.gov.br). Horário de atendimento: 08h às 18h.

**Pesquisadoras Responsáveis:**

Prof. Dra Estela Bevilacqua, pode ser encontrada presencialmente no Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento – ICB-USP – Av. Prof. Lineu Prestes, 1524, sala 304, Cidade Universitária São Paulo, SP com agendamento prévio pelos telefones (11) 3091-8050 ou (11) 99945-0784 ou por e-mail [bevilacq@usp.br](mailto:bevilacq@usp.br), em período integral.

Dra. Aline Rodrigues Lorenzon, pode ser encontrada presencialmente na unidade Ibirapuera do Grupo Huntington Medicina Reprodutiva – Av. República do Líbano, 529, Ibirapuera, São Paulo SP, com agendamento prévio pelos telefones (11) 3059-6100 ou (11) 99969-3990 ou pelo e-mail [alorenzon@huntington.com.br](mailto:alorenzon@huntington.com.br), em período integral.

## APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para coleta de embriões aneuplóides.



### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### (VIA PARTICIPANTE)

Você está sendo convidado(a) a participar da pesquisa "Papel das células trofoblásticas na indução de fatores angiogênicos pelo epitélio das glândulas uterinas humanas. Análise em sistemas 3D de co-cultivo.", de responsabilidade da Bióloga pesquisadora e coordenadora científica do Grupo Huntington, Dra. Aline Rodrigues Lorenzon e da Profa Dra Estela Bevilacqua, Profa Titular e chefe do Laboratório de Biologia do Trofoblasto do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (ICB-USP). O Grupo Huntington será responsável pela disponibilização dos embriões para esse estudo.

Leia cuidadosamente o que se segue e pergunte ao responsável pelo estudo qualquer dúvida que você tiver. Os contatos estão listados ao final deste termo.

A finalidade deste estudo é entender como as células do embrião interagem com as células do útero no processo de implantação embrionária. Para isso, nosso estudo pretende desenvolver um método para cultivar as células do útero, mais especificamente do endométrio (que é a camada que fica em contato com o embrião quando ele chega no útero), juntamente com as células do embrião, mais especificamente com as células da trofoectoderme (que são as células que ficam mais externas no embrião), em laboratório com o intuito de pesquisar uma das etapas do processo de implantação embrionária. Vamos estudar de que forma as células da trofoectoderme estimulam a secreção de substâncias pelas glândulas do endométrio, facilitando assim o processo de implantação do embrião. Nós acreditamos que este estudo poderá contribuir para o melhor conhecimento básico de etapas importantes da implantação do embrião humano, que ainda é bastante pouco conhecido em humanos. Ao participar deste estudo, você contribuirá para o avanço dessa área do conhecimento.

Caso você aceite participar deste estudo, você nos autorizará a utilizar os seus embriões criopreservados nas clínicas do Grupo Huntington Medicina Reprodutiva e que foram diagnosticados como aneuplóides após realização do exame genético pré-implantacional (PGT-A) de seu(s) ciclo(s) de fertilização *in vitro*. A realização do exame genético pré-implantacional será realizado no seu tratamento por uma indicação médica e apenas pacientes que irão realizar este teste genético poderão ser abordados para este estudo. Os embriões aneuplóides serão então descongelados terão suas células separadas e colocadas em tubos plásticos para que possam ser transportados e colocados juntamente com as células de endométrio no Laboratório de Biologia do Trofoblasto.

Todos os seus dados serão mantidos em anonimato e armazenados em arquivos eletrônicos, sob a responsabilidade da Clínica Huntington. A sua identidade será mantida em sigilo e anonimato, em todos os momentos do estudo e na divulgação dos resultados. Apesar de todas as medidas disponíveis para a manutenção do anonimato

Pág. 1/4



de seus dados serem tomadas pela equipe da pesquisa, existe risco de quebra acidental do anonimato dos dados.

Os embriões que serão utilizados nessa na pesquisa serão destruídos e não poderão mais ser utilizados para fins reprodutivos, contudo, por serem diagnosticados como aneuplóides, esses embriões são considerados inviáveis para a transferência uterina. Por envolver a destruição de seus embriões concedidos para a pesquisa, a participação neste estudo envolve risco de arrependimento que pode acarretar em desconforto psicológico.

Na eventualidade de ocorrência de qualquer dano ou prejuízo a você em decorrência da participação deste estudo, a equipe de pesquisa responsável imediatamente garantirá acompanhamento e suporte gratuito, sejam eles diretos ou indiretos e imediatos ou tardios, pelo tempo necessário. Você tem o direito de buscar a indenização, conforme determina a lei, em caso de danos decorrentes da sua participação neste estudo.

A participação neste estudo não traz benefícios diretos para você neste momento. Porém, indiretamente você contribuirá para que novos conhecimentos sobre o processo de implantação do embrião humano no útero possam ser descobertos, e para que, no futuro, esse conhecimento possa auxiliar nos tratamentos de reprodução humana.

Os embriões e todos os produtos derivados dele (células) utilizados para esse estudo serão unicamente utilizados para fins de pesquisa e não serão utilizadas para terapia ou qualquer outro fim em seres humanos.

Você não receberá recompensa financeira para participar deste estudo e nem terá qualquer despesa decorrente do mesmo. Todas as despesas para o desenvolvimento desse estudo serão de total responsabilidade dos pesquisadores envolvidos.

Você tem liberdade de desistir ou interromper a concessão de embriões para este estudo, no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação. Entretanto, uma vez tendo concedido os embriões para esta pesquisa, caso decida não mais participar do estudo, não podemos garantir que os embriões ainda estarão criopreservados.

A retirada do consentimento de guarda dos embriões armazenados no estudo deverá ser realizada por escrito e assinada, podendo dar-se a qualquer tempo, sem prejuízo a você, com validade a partir da data da comunicação da decisão. A desistência não virá a interferir no atendimento ou no tratamento médico.

Os resultados obtidos durante este estudo poderão ser publicados em revistas científicas, não havendo menção a seus dados pessoais. Se for de seu interesse, você terá acesso às principais conclusões do estudo.



Pág. 2/4

Em qualquer etapa da pesquisa, você poderá entrar em contato com os profissionais responsáveis para esclarecimento de dúvidas ou para reportar algum problema. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com a Comissão de Ética em Pesquisa Seres Humanos (CEP) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP), um colegiado independente que defende os seus interesses como participante desta pesquisa, ou com a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Este termo foi elaborado em duas vias que, devidamente assinadas, uma ficará com você e a outra, com as pesquisadoras responsáveis. Todas as páginas serão rubricadas pelas pesquisadoras responsáveis ou pessoas por elas delegadas, assim como pelos participantes da pesquisa.

Declaro que li e entendi este termo. Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas e voluntariamente participarei do estudo.

\_\_\_\_\_  
Nome do Participante

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Participante

\_\_\_\_\_  
Nome do Participante

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Participante

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido desta paciente e comprometo-me a cumprir todos os termos acima descritos.

Aline Rodrigues Lorenzon

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador (Grupo Huntington)

Estela Maris Andrade Forell Bevilacqua

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador (ICB-USP)

Informações para contatos:



CEP-ICB-USP: Avenida Prof. Lineu Prestes, 2415, Cidade Universitária, Butantã, São Paulo, SP. CEP: 05508-000. TEL: (11) 3091-7733, das 08h às 17h - E-mail: [cep@icb.usp.br](mailto:cep@icb.usp.br).

Pág. 3/4

CONEP:

Comissão Nacional de Ética em Pesquisa informando: SRTVN - Via W 5 Norte - Edifício PO700 - Quadra 701, Lote D - 3º andar - Asa Norte, CEP 70.719-040, Brasília (DF); Telefone: (61) 3315-5877. E-mail: [conep@saude.gov.br](mailto:conep@saude.gov.br). Horário de atendimento: 08h às 18h.

**Pesquisadoras Responsáveis:**

Prof. Dra Estela Bevilacqua, pode ser encontrada presencialmente no Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento – ICB-USP – Av. Prof. Lineu Prestes, 1524, sala 304, Cidade Universitária São Paulo, SP com agendamento prévio pelos telefones (11) 3091-8050 ou (11) 99945-0784 ou por e-mail [bevilacq@usp.br](mailto:bevilacq@usp.br), em período integral.

Dra. Aline Rodrigues Lorenzon, pode ser encontrada presencialmente na unidade Ibirapuera do Grupo Huntington Medicina Reprodutiva – Av. República do Líbano, 529, Ibirapuera, São Paulo SP, com agendamento prévio pelos telefones (11) 3059-6100 ou (11) 99969-3990 ou pelo e-mail [alorenzon@huntington.com.br](mailto:alorenzon@huntington.com.br), em período integral.



## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

### (VIA DO PESQUISADOR)

Você está sendo convidado(a) a participar da pesquisa "Papel das células trofoblásticas na indução de fatores angiogênicos pelo epitélio das glândulas uterinas humanas. Análise em sistemas 3D de co-cultivo.", de responsabilidade da Bióloga pesquisadora e coordenadora científica do Grupo Huntington, Dra. Aline Rodrigues Lorenzon e da Profa Dra Estela Bevilacqua, Profa Titular e chefe do Laboratório de Biologia do Trofoblasto do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (ICB-USP). O Grupo Huntington será responsável pela disponibilização dos embriões para esse estudo.

Leia cuidadosamente o que se segue e pergunte ao responsável pelo estudo qualquer dúvida que você tiver. Os contatos estão listados ao final deste termo.

A finalidade deste estudo é entender como as células do embrião interagem com as células do útero no processo de implantação embrionária. Para isso, nosso estudo pretende desenvolver um método para cultivar as células do útero, mais especificamente do endométrio (que é a camada que fica em contato com o embrião quando ele chega no útero), juntamente com as células do embrião, mais especificamente com as células da trofoectoderme (que são as células que ficam mais externas no embrião), em laboratório com o intuito de pesquisar uma das etapas do processo de implantação embrionária. Vamos estudar de que forma as células da trofoectoderme estimulam a secreção de substâncias pelas glândulas do endométrio, facilitando assim o processo de implantação do embrião. Nós acreditamos que este estudo poderá contribuir para o melhor conhecimento básico de etapas importantes da implantação do embrião humano, que ainda é bastante pouco conhecido em humanos. Ao participar deste estudo, você contribuirá para o avanço dessa área do conhecimento.

Caso você aceite participar deste estudo, você nos autorizará a utilizar os seus embriões criopreservados nas clínicas do Grupo Huntington Medicina Reprodutiva e que foram diagnosticados como aneuplóides após realização do exame genético pré-implantacional (PGT-A) de seu(s) ciclo(s) de fertilização *in vitro*. A realização do exame genético pré-implantacional será realizado no seu tratamento por uma indicação médica e apenas pacientes que irão realizar este teste genético poderão ser abordados para este estudo. Os embriões aneuplóides serão então descongelados terão suas células separadas e colocadas em tubos plásticos para que possam ser transportados e colocados juntamente com as células de endométrio no Laboratório de Biologia do Trofoblasto.



Todos os seus dados serão mantidos em anonimato e armazenados em arquivos eletrônicos, sob a responsabilidade da Clínica Huntington. A sua identidade será mantida em sigilo e anonimato, em todos os momentos do estudo e na divulgação dos resultados. Apesar de todas as medidas disponíveis para a manutenção do anonimato de seus dados serem tomadas pela equipe da pesquisa, existe risco de quebra acidental do anonimato dos dados.

Pág. 1/4

Os embriões que serão utilizados nessa na pesquisa serão destruídos e não poderão mais ser utilizados para fins reprodutivos, contudo, por serem diagnosticados como aneuplóides, esses embriões são considerados inviáveis para a transferência uterina. Por envolver a destruição de seus embriões concedidos para a pesquisa, a participação neste estudo envolve risco de arrependimento que pode acarretar em desconforto psicológico.

Na eventualidade de ocorrência de qualquer dano ou prejuízo a você em decorrência da participação deste estudo, a equipe de pesquisa responsável imediatamente garantirá acompanhamento e suporte gratuito, sejam eles diretos ou indiretos e imediatos ou tardios, pelo tempo necessário. Você tem o direito de buscar a indenização, conforme determina a lei, em caso de danos decorrentes da sua participação neste estudo.

A participação neste estudo não traz benefícios diretos para você neste momento. Porém, indiretamente você contribuirá para que novos conhecimentos sobre o processo de implantação do embrião humano no útero possam ser descobertos, e para que, no futuro, esse conhecimento possa auxiliar nos tratamentos de reprodução humana.

Os embriões e todos os produtos derivados dele (células) utilizados para esse estudo serão unicamente utilizados para fins de pesquisa e não serão utilizadas para terapia ou qualquer outro fim em seres humanos.

Você não receberá recompensa financeira para participar deste estudo e nem terá qualquer despesa decorrente do mesmo. Todas as despesas para o desenvolvimento desse estudo serão de total responsabilidade dos pesquisadores envolvidos.

Você tem liberdade de desistir ou interromper a concessão de embriões para este estudo, no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação. Entretanto, uma vez tendo concedido os embriões para esta pesquisa, caso decida não mais participar do estudo, não podemos garantir que os embriões ainda estarão criopreservados.

A retirada do consentimento de guarda dos embriões armazenados no estudo deverá ser realizada por escrito e assinada, podendo dar-se a qualquer tempo, sem prejuízo a você, com validade a partir da data da comunicação da decisão. A desistência não virá a interferir no atendimento ou no tratamento médico.



Os resultados obtidos durante este estudo poderão ser publicados em revistas científicas, não havendo menção a seus dados pessoais. Se for de seu interesse, você terá acesso às principais conclusões do estudo.

Em qualquer etapa da pesquisa, você poderá entrar em contato com os profissionais responsáveis para esclarecimento de dúvidas ou para reportar algum problema. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com a Comissão de Ética em Pesquisa Seres Humanos (CEP) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP), um colegiado independente que defende os seus interesses como participante desta pesquisa, ou com a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Pág. 2/4

Este termo foi elaborado em duas vias que, devidamente assinadas, uma ficará com você e a outra, com as pesquisadoras responsáveis. Todas as páginas serão rubricadas pelas pesquisadoras responsáveis ou pessoas por elas delegadas, assim como pelos participantes da pesquisa.

Declaro que li e entendi este termo. Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas e voluntariamente participarei do estudo.

\_\_\_\_\_  
Nome do Participante

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Participante

\_\_\_\_\_  
Nome do Participante

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Participante

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido desta paciente e comprometo-me a cumprir todos os termos acima descritos.

Aline Rodrigues Lorenzon

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador (Grupo Huntington)

Estela Maris Andrade Forell Bevilacqua

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador (ICB-USP)



**Informações para contatos:**

CEP-ICB-USP: Avenida Prof. Lineu Prestes, 2415, Cidade Universitária, Butantã, São Paulo, SP. CEP: 05508-000. TEL: (11) 3091-7733, das 08h às 17h - E-mail: [cep@icb.usp.br](mailto:cep@icb.usp.br).

Pág. 3/4

**CONEP:**

Comissão Nacional de Ética em Pesquisa informando: SRTVN - Via W 5 Norte - Edifício PO700 - Quadra 701, Lote D - 3º andar - Asa Norte, CEP 70.719-040, Brasília (DF); Telefone: (61) 3315-5877. E-mail: [conep@saude.gov.br](mailto:conep@saude.gov.br). Horário de atendimento: 08h às 18h.

**Pesquisadoras Responsáveis:**

Prof. Dra Estela Bevilacqua, pode ser encontrada presencialmente no Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento – ICB-USP – Av. Prof. Lineu Prestes, 1524, sala 304, Cidade Universitária São Paulo, SP com agendamento prévio pelos telefones (11) 3091-8050 ou (11) 99945-0784 ou por e-mail [bevilacq@usp.br](mailto:bevilacq@usp.br), em período integral.

Dra. Aline Rodrigues Lorenzon, pode ser encontrada presencialmente na unidade Ibirapuera do Grupo Huntington Medicina Reprodutiva – Av. República do Líbano, 529, Ibirapuera, São Paulo SP, com agendamento prévio pelos telefones (11) 3059-6100 ou (11) 99969-3990 ou pelo e-mail [alorenzon@huntington.com.br](mailto:alorenzon@huntington.com.br), em período integral.