

**FUNDAÇÃO OSWALDO ARANHA
CENTRO UNIVERSITÁRIO DE VOLTA REDONDA
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA
CURSO DE MEDICINA**

**DANIELA DE PAULA PARAISO ALVES
DANIELA FERNANDES DE SOUZA**

**ESTUDO DA VIA DA AROMATASE EM LESÕES DE
ENDOMETRIOSE EM ANIMAIS TRATADOS COM VITAMINA D**

**VOLTA REDONDA
2023**

**FUNDAÇÃO OSWALDO ARANHA
CENTRO UNIVERSITÁRIO DE VOLTA REDONDA
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA
CURSO DE MEDICINA**

**ESTUDO DA VIA DA AROMATASE EM LESÕES DE
ENDOMETRIOSE EM ANIMAIS TRATADOS COM VITAMINA D**

Trabalho de conclusão de módulo
apresentado ao curso de Medicina do
UniFOA como parte dos requisitos para
aprovação no Módulo VIII.

Alunas:

Daniela de Paula Paraiso Alves

Daniela Fernandes de Souza

Orientador:

Prof. Daniel Escorsim Machado

VOLTA REDONDA

2023

Dedicamos este trabalho a todas as pessoas que fizeram parte da nossa jornada acadêmica e que foram fundamentais para a conclusão deste TCM. À nossa família, pelo apoio incondicional, compreensão e amor que nos guiaram ao longo deste caminho. Ao nosso orientador, cuja orientação e conhecimento foram essenciais para o sucesso deste projeto. A todos que nos inspiraram com suas histórias de superação e resiliência, mostrando-nos a importância da Medicina. Que este trabalho possa contribuir para o bem-estar da sociedade e honrar o esforço de todos os que nos apoiaram. Nossa gratidão eterna a cada um de vocês.

Gostaríamos de expressar nossa sincera gratidão ao nosso orientador, famílias, amigos e todos que apoiaram nosso caminho na Medicina. Este trabalho é resultado de seu apoio e confiança. Obrigado por fazerem parte desta jornada.

"Medicina é a arte de distrair o paciente enquanto a Natureza cuida da doença."

(Voltaire)

RESUMO

A endometriose é uma doença ginecológica de aspecto inflamatório e crônico que pode causar dor e infertilidade, com acometimento de, principalmente, mulheres em idade fértil. É definida pela presença de tecido similar ao endométrio fora do útero e o crescimento da doença é dependente de estrogênio. O tratamento clínico da endometriose consiste em tratar a sintomatologia da dor com analgésicos e anti-inflamatórios e um tratamento hormonal para impedir a progressão da doença. Contudo, esse tratamento apresenta modificações no organismo e efeitos colaterais relevantes para a paciente, que trazem prejuízos para a vida da portadora dessa doença. Logo, este estudo buscou um possível tratamento para a endometriose com menos efeitos colaterais e que seja menos agressivo à saúde da mulher. Dessa forma, o presente estudo traz a possibilidade do tratamento da endometriose com a vitamina D. Evidências mostraram que a vitamina D modula a inflamação e a proliferação nas células endometrióticas. Além disso, um tratamento experimental de endometriose feito em ratos que foram tratados com vitamina D mostrou uma redução nas lesões endometrióticas, bem como uma diminuição do nível de estrogênio nos animais tratados. Com isso, avaliamos se a vitamina D atua na via da aromatase, uma enzima responsável pela etapa final da síntese do estrogênio ao converter testosterona em estradiol e androstenediona em estrona. Logo, o presente projeto estabeleceu um modelo experimental de endometriose em ratas Wistar, realizou tratamentos com calcitriol nas lesões endometrióticas estabelecidas, analisou macroscopicamente e histologicamente as lesões endometrióticas induzidas e quantificou os níveis de aromatase nas lesões endometrióticas induzidas, antes e após o tratamento. Após o período de tratamento, notamos que a vitamina D diminuiu as lesões do grupo tratado a partir da diminuição dos receptores de estrogênio nas células, além de ter diminuído os níveis de aromatase nos animais tratados. Logo, vimos que a vitamina D atua na via da aromatase e, com isso, sugerimos que essa substância possa controlar o avanço da endometriose.

Palavras-chave: Endometriose; Vitamina D; Tratamento alternativo; Aromatase.

ABSTRACT

Endometriosis is a gynecological disease of inflammatory and chronic aspect that can cause pain and infertility, with involvement of, mainly, women of childbearing age. It is defined by the presence of tissue similar to the endometrium outside the uterus and the growth of the disease is dependent on estrogen. Clinical treatment of endometriosis consists of treating pain symptomatology with analgesics and anti-inflammatory drugs and a hormonal treatment to prevent disease progression. However, this treatment presents changes in the body and side effects that are relevant to the patient, which bring damage to the life of the carrier of this disease. Therefore, this study sought a possible treatment for endometriosis with fewer side effects and that is less aggressive to women's health. Thus, the present study brought the possibility of treating endometriosis with vitamin D. Evidence has shown that vitamin D modulates inflammation and proliferation in endometriotic cells. In addition, an experimental treatment of endometriosis done in rats that were treated with vitamin D showed a reduction in endometriotic lesions, as well as a decrease in the level of estrogen in the treated animals. With this, we intended to evaluate whether vitamin D acts in the pathway of aromatase, an enzyme responsible for the final stage of estrogen synthesis by converting testosterone into estradiol and andosteredione into estrone. Therefore, the present project established an experimental model of endometriosis in Wistar rats, performed treatments with calcitriol in established endometriotic lesions, macroscopically and histologically analyzed the induced endometriotic lesions and quantified aromatase levels in induced endometriotic lesions before and after treatment. After the treatment period, we noticed that vitamin D reduced the lesions in the treated group due to the decrease in estrogen receptors in the cells, in addition to reducing aromatase levels in the treated animals. As a result, we saw that vitamin D acts on the aromatase pathway and, therefore, we suggest that that this substance can control the progression of endometriosis.

Keywords: Endometriosis; Vitamin D; Alternative treatment; Aromatase.

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	12
2.1 Endometriose	12
2.2 Sinais e sintomas	13
2.3 Fisiopatogenia da endometriose	13
2.4 Diagnóstico	14
2.5 Tratamento	14
2.6 Vitamina D	15
2.7 Aromatase	16
3 METODOLOGIA.....	16
3.1 Estabelecimento e caracterização de modelo experimental de endometriose peritoneal em Ratas Wistar.....	16
3.2 Caracterização Morfológica das Lesões	17
3.3 Estudo Imunohistoquímico para CYP19	18
3.4 Estudo Morfométrico	19
3.5 Análises Estatísticas.....	19
4 RESULTADOS FINAIS E DISCUSSÃO.....	19
4.1 Macroscopia	19
4.2 HE	20
4.3 Imunomarcção para receptor de estrogênio (RE).....	21
4.4 CYP19	22
5 CONCLUSÃO	24
6 REFERÊNCIA.....	24
7 ANEXO	26

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Análise macroscópica das lesões endometrióticas controle e tratada	20
Figura 2 - Análise histológica de amostras coradas com HE.....	21
Figura 3 - Imunorreatividade para RE	22
Figura 4 - Imunorreatividade para CYP2C19	23

LISTA DE SIGLAS

ESHRE	Sociedade Europeia de Reprodução Humana e Embriologia
AINE`S	Antinflamatório não esteroidal
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
DIU-LNG	Dispositivo intrauterino de liberação de levonorgestrel
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CYP19	Aromatase
CTRL	Controle
TRAT	Tratado
CYP2C19	Gene da subfamília da aromatase

LISTA DE ANEXOS

7.1 Guia de eutanásia para animais de ensino e pesquisa – CEUA UNIFESP 2019	26
7.2 Diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA	26
7.3 Formulário para solicitação de autorização para uso de animais em experimentação	27
7.4 Certificado de aprovação do presente projeto pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA).....	37

1 INTRODUÇÃO

A endometriose é uma doença ginecológica de aspecto inflamatório e crônico que pode causar dor e infertilidade. É definida pela presença de tecido similar ao endométrio fora do útero. O crescimento da endometriose é dependente de estrogênio e acomete mulheres na idade fértil, porém as manifestações clínicas e o manuseio da doença podem durar até depois da menopausa (FEBRASGO, 2019).

O tratamento clínico da endometriose consiste em tratar a sintomatologia da dor com analgésicos e anti-inflamatórios e um tratamento hormonal para impedir a progressão da doença. Contudo, esse tratamento apresenta modificações no organismo e efeitos colaterais relevantes para a paciente, que trazem prejuízos para a vida da portadora, como ganho de peso, alterações no humor e depressão (FEBRASGO, 2019). (GUIDELINE ESHRE 2022)

Logo, este estudo busca um possível tratamento para a endometriose com menos efeitos colaterais e que seja menos agressivo à saúde da mulher. Dessa forma, o presente estudo analisa a possibilidade do tratamento da endometriose com a vitamina D, uma molécula lipossolúvel que é produzida, em sua maior parte, pelo corpo humano através da radiação solar ultravioleta B. (KRATZ, SILVA E TENFEN, 2018).

Diversos estudos *in vitro* mostraram que a vitamina D possui efeitos anti-inflamatórios, anti-invasivos e antiproliferativos em patologias como a artrite reumatoide, câncer e a psoríase. No modelo experimental feito por Miyashita (2016), foi demonstrado que a vitamina D modula a inflamação e a proliferação nas células endometrióticas, e que os níveis séricos de 25-hidroxivitamina D3 foram significativamente mais baixos em mulheres com endometriose grave do que no grupo controle e nas mulheres com endometriose leve. Além disso, o modelo experimental do PICFOA Efeito da vitamina D em lesões endometrióticas: modelo experimental (2020 – 2021) (dados não publicados) observou uma redução nas lesões endometrióticas, bem como uma diminuição do nível de estrogênio nos animais tratados. Esses resultados são promissores e possibilitam uma investigação mais aprofundada do real mecanismo de ação da vitamina D nas lesões. Com isso,

planejamos avaliar se a vitamina D atua na via da aromatase, uma enzima importante para a síntese do estrogênio.

As portadoras de endometriose sofrem diariamente tanto pela doença quanto pelos efeitos colaterais advindos de seu tratamento padrão. Além disso, a endometriose apresenta sintomas como dismenorreia, dispareunia, infertilidade, entre outros, que ocasionam problemas sociais e pessoais às portadoras (FEBRASGO, 2019).

Devido à sua característica estrogênio-dependente, o tratamento da endometriose é feito por meio de hormônios e intervenções cirúrgicas que controlam a doença, mas que contribuem também para modificações no organismo das portadoras como ganho de peso, alterações no humor e depressão. (GUIDELINE ESHRE 2022). Já foi demonstrado no PICFOA Efeito da vitamina D em lesões endometrióticas: modelo experimental (2020 – 2021) que a vitamina D reduz as lesões em modelo experimental de endometriose. O projeto em questão visa elucidar um possível mecanismo de ação da vitamina D na via da aromatase.

O objetivo geral do presente estudo é analisar o efeito da suplementação de vitamina D em lesões endometrióticas experimentais. Os objetivos específicos são: estabelecer um modelo experimental de endometriose em ratas Wistar, realizar tratamentos com calcitriol nas lesões endometrióticas estabelecidas, analisar macroscopicamente e histologicamente as lesões endometrióticas induzidas e quantificar os níveis de aromatase nas lesões endometrióticas induzidas, antes e após o tratamento.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Endometriose

A endometriose é uma doença ginecológica estrogênio dependente e de natureza multifatorial, a qual é definida pela presença de tecido símile à glândula e/ou estroma endometrial fora da cavidade do útero, com acometimento de, principalmente, mulheres em idade fértil (FEBRASGO, 2019).

De acordo com Nisolle e Donnez (1997), essa doença é dividida em três tipos patológicos baseados em aspectos morfológicos e clínicos: a endometriose peritoneal, a endometriose ovariana e a endometriose profunda. Na peritoneal a paciente apresenta implantes superficiais no peritônio, na ovariana a paciente apresenta implantes superficiais ou cistos no ovário (endometriomas) e na profunda, a paciente apresenta lesão penetrante no espaço retroperitoneal ou na parede dos órgãos pélvicos de profundidade igual ou maior que 5 mm. (FEBRASGO 2019)

2.2 Sinais e sintomas

Segundo o Guideline ESHRE (2022), os sintomas achados e comparados com o grupo controle foram: dor pélvico-abdominal, dismenorreia, grande fluxo menstrual, infertilidade, dispareunia com sangue, sintomas do trato urinário. E com os sinais pregressos de: cistos ovarianos, síndrome do intestino irritável, doença inflamatória pélvica e displasia mamária.

2.3 Fisiopatogenia da endometriose

A fisiopatologia da endometriose é bastante controversa e possui várias teorias. A orientação mais aceita a postulada por Sampson (1927), segundo a qual ele propõe que ocorre um fluxo retrógrado de sangue menstrual e tecido endometrial pelas tubas de Falópio até a cavidade peritoneal e, com isso, células endometriais se implantariam no peritônio, causando a endometriose. Isso ocorreria em mulheres com um ambiente hormonal favorável e fatores imunológicos, que contribuiriam para a não eliminação das células endometrióticas desse local impróprio (FEBRASGO, 2019).

Outra teoria é a da metaplasia celômica postulada por Vercellini et al. (2014), a qual diz que a endometriose é ocasionada por um processo de diferenciação metaplásica dos tecidos celômicos normais do ovário e do peritônio, principalmente (FEBRASGO, 2019).

Há ainda uma outra teoria bastante discutida de que a teoria da menstruação em neonatos, postulada por Gordts et al. (2017), diz que o sangramento uterino neonatal, ocasionado pelo útero do neonato em resposta à queda da progesterona materna, refluiria pelas tubas uterinas e levaria junto células do tecido endometrial

fragmentado, as quais podem se implantar no peritônio, permanecem quiescentes e assintomáticas até a menarca da paciente (FEBRASGO, 2019).

Além disso, existem teorias que explicam a causa da endometriose por predisposição genética ou alterações epigenéticas (FEBRASGO, 2019).

2.4 Diagnóstico

O diagnóstico clínico da endometriose é feito pelo exame físico da pelve, inspeção e palpação do abdômen.

Para mulheres com endometriose peritoneal e ovariana o diagnóstico é feito, pela palpação bimanual e ultrassonografia transvaginal com imobilizador uterino e dos anexos (NEZHAT et al., 1994). Para endometriose profunda, o exame vaginal pode facilitar a detecção da infiltração ou nódulos na vagina, ligamento uterossacral ou fundo de saco de Douglas (BAZOT et al., 2009). (GUIDELINE ESHRE 2022)

As tecnologias de imagem e os biomarcadores combinados ou não com cirurgia são métodos utilizados para identificar ou descartar o diagnóstico. Mas aliado a imagem, a experiência clínica diagnóstica e habilidade de realizar o laudo da imagem garantirão um diagnóstico específico. (GUIDELINE ESHRE 2022)

O padrão ouro de diagnóstico para endometriose é a Laparoscopia, mas por ser um procedimento invasivo, não é utilizado como rotina na maioria dos países, com um alto índice de morbimortalidade. Na rotina inicial de diagnóstico, são utilizados ultrassonografia e ressonância magnética. (GUIDELINE ESHRE 2022)

2.5 Tratamento

O foco do tratamento da endometriose é a dor e a infertilidade. As mulheres em geral optam por analgésicos simples e AINEs sem prescrição médica, mas não obtêm muito sucesso, pois não inibe a ovulação. Com auxílio médico, para o gerenciamento da dor crônica, utilizam neuromoduladores que, diferente dos analgésicos simples e AINEs, atuam na modulação do sistema nervoso central. (GUIDELINE ESHRE 2022)

A terapia hormonal é baseada na evidência de tratamento de condição esteroide dependente, comumente utilizada drogas que vão modificar os hormônios locais pela supressão da atividade ovariana ou na ação direta dos receptores

esteroides. Estão inclusos: progestágenos, anti-progesterona, contraceptivos orais combinados, GnRH agonista, GnRH antagonista, DIU-LNG, danazol e inibidor de aromatase. O tratamento cirúrgico visa eliminar lesões endometrióticas e retirar tecidos acometidos do tecido sadio, a remoção é realizada por tratamento laparoscópico. (GUIDELINE ESHRE 2022)

2.6 Vitamina D

A vitamina D é uma vitamina lipossolúvel que possui diversos efeitos no organismo do ser humano, como seu papel na regulação nos níveis plasmáticos de cálcio e na mineralização do esqueleto por meio da sua ação nos ossos, nos rins, no intestino e nas paratireoides (KRATZ, SILVA E TENFEN, 2018). De acordo com Kratz, Silva e Tenfen (2018), em torno de 20% da vitamina D é obtida pela alimentação, enquanto a maioria é obtida através da exposição solar.

Diversos estudos recentes demonstraram que a vitamina D é um modulador eficaz do sistema imunológico, de forma que a substância induz a tolerância de células dendríticas e controla a maturação, migração e adesão de macrófagos, produção de citocinas e proliferação de linfócitos T (MIYASHITA et al, 2016).

De acordo com Miyashita et al. (2016), estudos *in vitro* demonstram os efeitos anti-inflamatórios, antiproliferativo e anti-invasivo em várias doenças como artrite reumatoide, psoríase e câncer.

Estudos observacionais, artigos experimentais *in vivo* e *in vitro* e estudos em modelo experimental realizados sobre a relação da vitamina D com a patogenia da endometriose constataam o potencial terapêutico dessa substância no tratamento da doença citada. Logo, a normovitaminose D pode apresentar respostas anti-inflamatórias e antiestrogênicas que resultariam na redução das lesões endometrióticas e, conseqüentemente, reduziriam os efeitos maléficis do tratamento padrão (MIYASHITA et al, 2016).

No modelo experimental PICFOA Efeito da vitamina D em lesões endometrióticas: modelo experimental (2020 – 2021), foi observada redução nas lesões endometrióticas e diminuição do nível de estrogênio nos animais tratados com vitamina D.

2.7 Aromatase

A aromatase é uma enzima que atua na etapa final da síntese do estrogênio, ao converter testosterona em estradiol e androstenediona em estrona. Em mulheres na idade fértil essa enzima é secretada pelos ovários a partir de um estímulo do hormônio folículo estimulante (FSH) e, nas mulheres pós-menopausa, a formação do estrogênio pela aromatase ocorre no tecido adiposo e na pele (T. MORI et al., 2018).

O estudo de Noble et al. (1997) demonstrou que não foi detectada atividade da aromatase no endométrio tóxico de mulheres sem endometriose, mas foi demonstrado atividade no endométrio e nos implantes de endometriose de mulheres com a doença, com incidência 11 vezes maior nos implantes.

Como a endometriose é uma doença estrogênio dependente, o tratamento pode ser feito com a diminuição da síntese do estrogênio nas lesões, que pode ocorrer pela diminuição da expressão da aromatase no local (T. MORI et al., 2018).

3 METODOLOGIA

3.1 Estabelecimento e caracterização de modelo experimental de endometriose peritoneal em Ratas Wistar.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA) do UniFOA e está registrado com o número de protocolo 002/2022 (certificado de aprovação em anexo). Para os experimentos foram utilizadas 10 Ratas Wistar de procedência do biotério do UNIFOA – Centro Universitário de Volta Redonda, com 8 semanas de vida, pesando em torno de 300 gramas.

Os animais, os quais não precisaram de jejum ou restrição hídrica, foram anestesiados com 0,6 Rompum® (Ketamina) + 0,2 Xilazina 2% intraperitoneal e após a completa anestesia foi realizada antisepsia e uma incisão na linha alba, ligadura e secção de um dos cornos uterinos. Em placa de petri com solução salina, o útero foi aberto longitudinalmente e o endométrio foi seccionado em 3 fragmentos de tamanho entre 3 e 4mm² e foram implantados na cavidade peritoneal utilizando fio de Nylon 6-0. Posteriormente, a parede abdominal foi fechada também com fio de Nylon 6-0. Os

animais permaneceram anestesiados durante no máximo 30 minutos, pois o tempo necessário e suficiente para a realização do procedimento cirúrgico proposto neste trabalho é de 10 minutos, conforme PICFOA Efeito da vitamina D em lesões endometrióticas: modelo experimental (2020 – 2021).

Foi realizada a antisepsia no pós-operatório e diariamente, para evitar contaminações. Não houve uso de fármacos analgésicos ou relaxantes musculares no pré e pós-operatório porque as lesões foram tratadas com Vitamina D3 e o tratamento com outros fármacos pode interferir no mecanismo de ação do composto que está sendo proposto.

Após 15 dias de indução da lesão endometriótica, foi iniciado o tratamento diário, via gavagem, durante 30 dias com 0,2 mg/mL de solução salina (n = 5), e com 200 UI de 1,25 dihidroxicholecalciferol (n = 5).

Após o período de 30 dias de tratamento, foram realizadas eutanásias dos animais, mediante overdose de anestésico. As amostras foram retiradas a partir de laparotomia mediana para ablação endometrial. As amostras retiradas foram avaliadas macroscopicamente para medição do crescimento das lesões (comprimento e largura), preparadas para realização das análises histológica. Todas as análises foram realizadas em ambos os grupos (controle x tratado).

Os animais foram mantidos em gaiolas comuns no biotério, sendo 2 animais por gaiola, com água filtrada não clorada e ração industrial comum, sem suplemento.

O grau de invasividade (GI) do experimento, segundo o CONCEA, é GI2, por conta de ser um experimento que causa estresse, desconforto ou dor, de leve intensidade.

Conforme as DIRETRIZES DA PRÁTICA DE EUTANÁSIA DO CONCEA (em anexo) utilizamos o método recomendável para eutanásia de mamíferos da ordem Rodentia. Para eutanásia é necessária a aplicação de no mínimo 3 vezes a dose anestésica. Dessa forma, foi administrado Propofol intravenoso na dose letal de 30 mg/kg (Guia de eutanásia 2019 – em anexo).

3.2 Caracterização Morfológica das Lesões

Após a coleta das amostras, as lesões foram fixadas em paraformaldeído (PFA) e tratadas para análise histológica conforme o seguinte protocolo:

As amostras foram colocadas em cassetes e direcionadas a sucessivos banhos em álcool I, II e III, 30 minutos cada. Foram também banhadas em xilol I, II e III durante 30 minutos e, em seguida, as amostras foram colocadas em parafina I e II por 20 minutos cada. Foram realizados cortes no tamanho de 5µm com um micrótomo. Posteriormente as lâminas foram coradas com hematoxilina por 3 minutos e eosina por 30 segundos. Os cortes então foram hidratados sucessivamente em 3 banhos de álcool 70%, 80% e 100%, clarificados com xilol I, II e III, 5 minutos cada. A lamínula foi colada com entellan na lâmina para que as mesmas fossem analisadas no microscópio óptico. A confirmação da viabilidade das lesões era realizada a partir da observação da presença de glândulas e/ou estroma.

3.3 Estudo Imunohistoquímico para CYP19

Para o estudo da distribuição de CYP19 (aromatase), foi realizada imunomarcação. O protocolo foi o seguinte:

Desparafinização: 3 banhos de álcool por 30 minutos cada e 3 banhos com xilol por 30 minutos cada seguido de banho com água destilada por 5 minutos.

Recuperação antigênica: tampão citrato 0,01M, pH 6,0 em microondas e dois banhos com tampão fosfato (PBS 0,1M, pH 7,4) a temperatura ambiente por 5 minutos cada.

Inativação da peroxidase endógena: peróxido 3% por 15 minutos em temperatura ambiente seguida de dois banhos com tampão fosfato (PBS 0,1M, pH 7,4) a temperatura ambiente por 5 minutos cada. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi feito com PBS/BSA 5% por 30 min em câmara úmida.

Os cortes foram incubados com anticorpo primário policlonal antiaromatase (ab-18995, Abcam) diluído em PBS/BSA 1% em câmara úmida overnight.

Em seguida, após dois banhos com tampão fosfato a temperatura ambiente, os cortes foram incubados com anticorpo secundário Biotina e Estreptavidina por 30 minutos cada.

Por fim, os cortes foram incubados com DAB até o tempo necessário de se obter uma coloração castanha e colocados em Hematoxilina por 3 minutos, passando, em seguida por banho de água corrente por 2 minutos.

Os cortes então foram hidratados com 2 banhos sucessivos de álcool, clarificados em xilol (5 minutos cada) e montados com entellan para serem observados em microscópio óptico.

3.4 Estudo Morfométrico

A análise morfométrica dos resultados foi feita por meio da observação microscópica (microscopia óptica) de cortes das lesões endometrióticas imunomarcadas com aromatase, fotografados em câmera digital e posteriormente analisados em programa de análise de imagem, Image Pro Plus 4.0. Para cada lâmina foram estudados 10 campos aleatórios de maior aumento (400X), utilizando a média dos resultados obtidos.

3.5 Análises Estatísticas

Os gráficos foram efetuados no programa Oringin Graph. Os dados foram representados em tabelas e gráficos, sendo informados a média e o desvio padrão ($x \pm DP$) e/ou o erro padrão ($x \pm EP$). Para essas análises, um $p < 0,05$ foi considerado significativo após aplicação do teste estatístico T-student. Para análise estatística utilizamos o programa ANOVA.

4 RESULTADOS FINAIS E DISCUSSÃO

4.1 Macroscopia

Após 15 dias da indução da lesão endometriótica, os 10 animais apresentaram cistos viáveis e lesões vascularizadas no local da implantação e, após esses 15 dias, foi realizado o tratamento durante 30 dias. As 10 ratas foram divididas em grupo tratado e grupo controle e, enquanto o grupo tratado recebeu 200 UI de 1,25 dihidroxicholecalciferol diariamente, o grupo controle recebeu solução salina.

Notou-se após o período de tratamento, que as lesões do grupo tratado diminuíram consideravelmente em relação as do grupo controle, as quais aumentaram de tamanho (Figura 1).

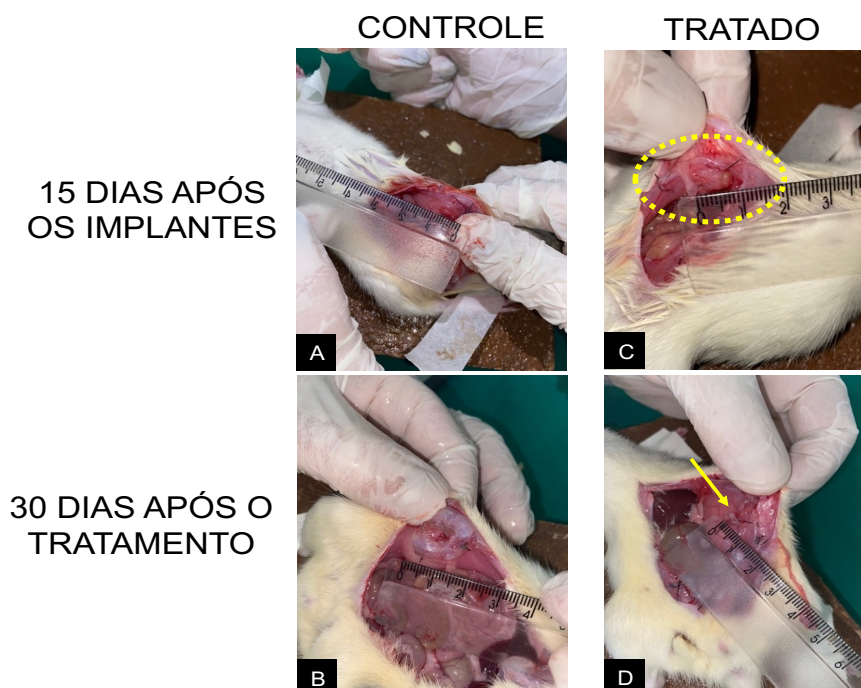


Figura 1 - Análise macroscópica das lesões endometrióticas controle e tratada. Após 15 dias da indução da lesão endometriótica, observou-se a presença de cistos viáveis em ambos os grupos (A e C). Após o tratamento, notou-se um crescimento das lesões no grupo controle (B) e uma redução significativa no grupo tratado (D).

4.2 HE

Após a análise macroscópica das estruturas, foi realizada a coleta e a confecção das lâminas com a coloração de hematoxilina-eosina (HE). Abaixo, estão dispostas na seguinte ordem: endométrio controle, endométrio tratado, endometriose controle e endometriose tratada.

No endométrio controle e tratado, observou-se a presença de glândulas envolvidas por um estroma composto por tecido conjuntivo. Na amostra de endometriose controle, observou-se a presença de glândulas endometriais viáveis

circundadas por um tecido conjuntivo, entretanto, nas lesões tratadas as glândulas encontram-se regredidas com uma intensa atrofia das células endometriais sugerindo que as lesões estão em processo de regressão (Figura 2).

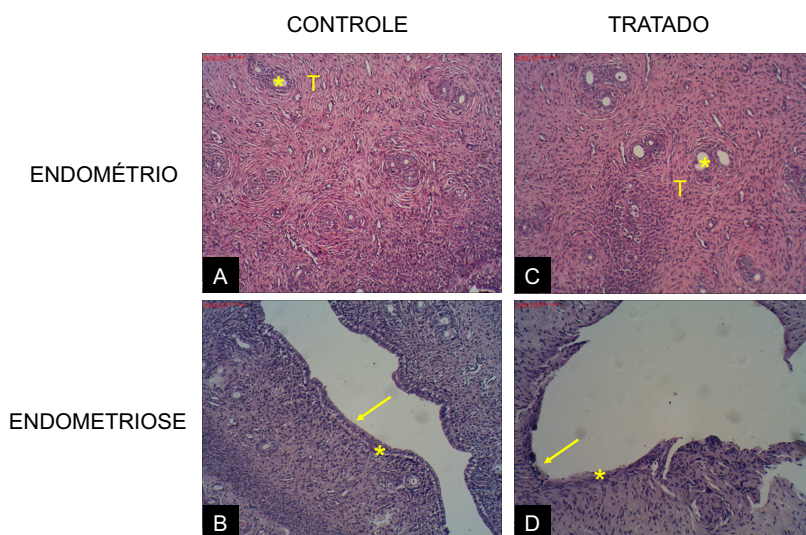


Figura 2 - Análise histológica de amostras coradas com HE. No endométrio controle e tratado, observa-se a presença de glândulas (*) envolvidas por um estroma composto por tecido conjuntivo (T). Nas lesões tratadas as glândulas (→) encontram-se regredidas com uma intensa atrofia das células endometriais

4.3 Imunomarcacão para receptor de estrogênio (RE)

A imunorreatividade para RE foi detectada nas amostras de endométrio em ambos os grupos. Já nas lesões de endometriose, a distribuição de RE foi observada principalmente no núcleo das células epiteliais glandulares e mais difusamente no estroma ao redor das glândulas. A imunodistribuição deste marcador foi significativamente menor no grupo tratado quando comparado ao grupo controle (Figura 3). Essas observações foram confirmadas pela análise histomorfométrica (Tabela 1 e Gráfico 1).

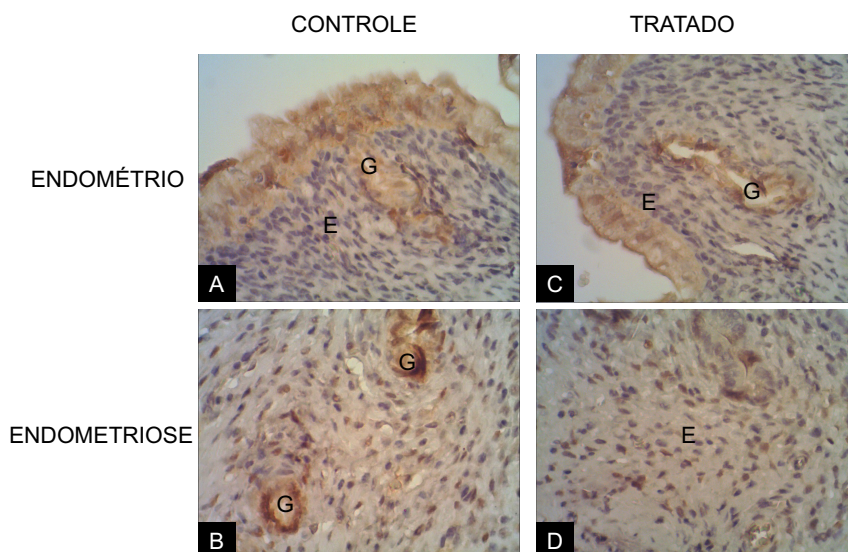


Figura 3 - Imunorreatividade para RE. A presença do RE foi detectada nas amostras de endométrio em ambos os grupos (A e C). Já nas lesões de endometriose, a distribuição de RE é observada principalmente no núcleo das células epiteliais glandulares no grupo controle (B) e com menos intensidade no grupo tratado (D).

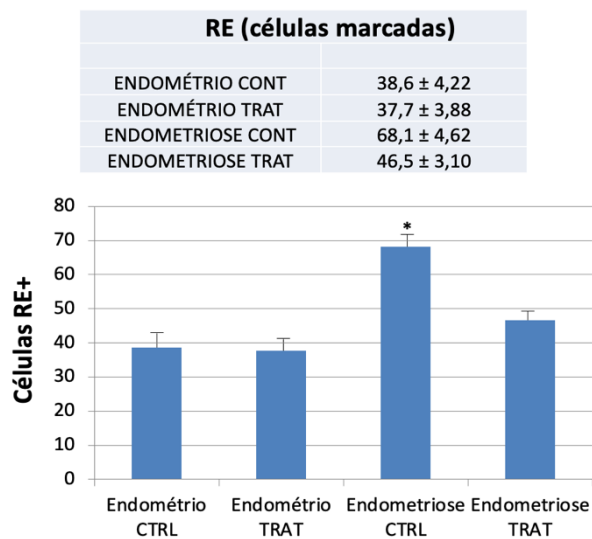


Tabela 1 e Gráfico 1 - Análise histomorfométrica das quantificações de células marcadas com RE.

4.4 CYP19

Resultados semelhantes foram observados com a enzima aromatase. Também detectamos imunorreatividade principalmente no núcleo das células epiteliais glandulares. Este marcador foi maior no grupo controle e diminuiu significativamente no grupo tratado (Figura 4). Esses resultados foram confirmados pela análise histomorfométrica (Tabela 2 e Gráfico 2).

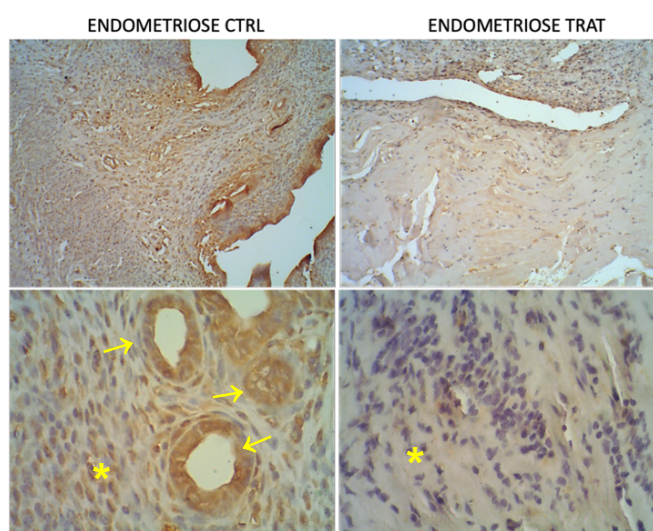


Figura 4 - Imunorreatividade para CYP2C19. As marcações foram detectadas principalmente no núcleo das células epiteliais glandulares (→). Este marcador foi maior no grupo controle e diminuiu significativamente no grupo tratado.

CYP19 (% células marcadas)	
ENDOMETRIOSE CONT	40,33 ± 2,93
ENDOMETRIOSE TRAT	7,19 ± 1,42

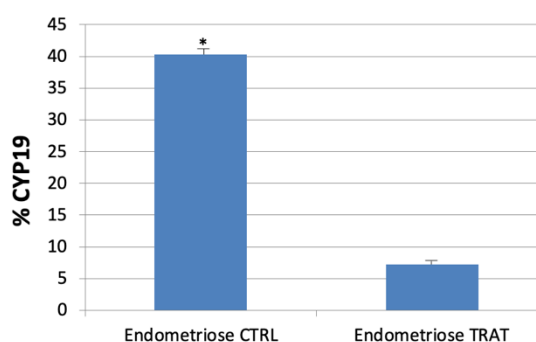


Tabela 2 e Gráfico 2 – Análise histomorfométrica das quantificações da células marcadas com CYP19

5 CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que a vitamina D reduziu o tamanho das lesões endometrióticas a partir da diminuição dos níveis de receptores de estrogênio. Além disso, foi visto que a vitamina D atua na via da aromatase, uma vez que este marcador foi significativamente menor nos animais tratados. Com isso, sugerimos que a vitamina D possa controlar o avanço da endometriose e seus sintomas, tornando-se um importante alvo para testes de novos medicamentos.

6 REFERÊNCIA

CARAÇA, D. B. et al. Endometriose. In: FILHO, A. L. D. S., et al. **Tratado de Ginecologia FEBRASGO**. Rio de Janeiro: ELSEVIER, 2019. p. 780-801. Acesso em 11 de abril de 2022

GROUP, E. E. G. D. **Endometriosis Guideline of European Society of Human Reproduction and Embryology**. [S.l.]: ESHRE, 2022. Disponível em: <https://www.eshre.eu/Guidelines-and-Legal/Guidelines/Endometriosis-guideline>

Acesso em 8 de abril de 2022

KRATZ, B.; SILVA, G. S. E.; TENFEN, A. Deficiência de vitamina D (25OH) e seu impacto na qualidade de vida: uma revisão de literatura. **Revista RBAC**, Porto Alegre, Agosto 2018. Acesso em: 8 de abril de 2022

MIYASHITA, M. et al. Effects of 1,25-Dihydroxy Vitamin D3 on Endometriosis. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, Tokyo, v. 101, n. 6, p. 2371-2379, June 2016. Acesso em 28 de março de 2022

MORI, T. et al. Aromatase as a target for treating endometriosis. **The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, Kyoto, June 2018. Acesso em: 20 de março de 2022

NOBLE, L. S. et al. Prostaglandin E2 Stimulates Aromatase Expression in Endometriosis-Derived Stromal Cells*. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Dallas, v. 82, n. Disponível em: <https://academic.oup.com/jcem/article/82/2/600/2823486?login=false> Acesso em 05 de abril de 2022


MACHADO, D. E. et al. A selective cyclooxygenase-2 inhibitor suppresses the growth of endometriosis with an antiangiogenic effect in a rat model. **Fertility and Sterility**, 93(8), 2674–2679. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2009.11.037> Acesso em 19 de maio de 2023

MACHADO, D. E. et al. Euterpe oleracea Extract (Açaí) Is a Promising Novel Pharmacological Therapeutic Treatment for Experimental Endometriosis. **PloS One**, 11(11). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0166059> Acesso em 19 de maio de 2023

MARQUES, L. O. et al. Análise histológica do efeito da trimegestona sobre o endométrio de ratas menopausadas. **Revista Do Médico Residente**, 13(4). <http://crmpr.org.br/publicacoes/cientificas/index.php/revista-do-medico-residente/article/view/119> Acesso em 19 de maio de 2023

7 ANEXO

7.1 Guia de eutanásia para animais de ensino e pesquisa – CEUA UNIFESP 2019

Guia de eutanásia para animais de ensino e pesquisa:		
Mamíferos		
Data Emissão Abril/2019	Data Vigência Abril/2021	Versão nº 01

2. MÉTODOS RECOMENDÁVEIS

2.1. PROTOCOLOS DE EUTANÁSIA MEDIANTE A UTILIZAÇÃO DE ANESTÉSICOS INJETÁVEIS

II - Propofol

- Promove depressão do SNC através de ação em receptores gabaérgicos.
- Para eutanásia é necessária a aplicação de no mínimo 3 vezes a dose anestésica ou a aplicação da dose anestésica seguida da complementação com um método secundário (ex. decapitação ou exsanguinação).
- Recomendação:** todas as espécies.

Espécies	Dose Anestésica (mg/kg)	Dose Letal (mg/kg)
Camundongos	30	90
Ratos	10	30
Hamsters	30	90
Cobaia	10	30
Coelhos	10	30
Suínos	1.66	5
Primates (<i>Callithrix sp.</i>)	10	30

Vias de administração:

- Administração **exclusivamente** por via intravenosa para todas as espécies.

Exemplo:
Espécie: Coelho Peso : 3kg Dose: 10mg/Kg Fármaco: Propofol 1% (10 mg/mL)

Utilizando a fórmula apresentada no item "cálculo de dose para eutanásia" temos:

$$\text{Dose anestésica} = \frac{3\text{kg} \times 10\text{mg/kg}}{10\text{mg/mL}} = 3 \text{ mL}$$

$$\text{Dose letal} = 3 \text{ mL} \times 3 = 9 \text{ mL}$$

9

7.2 Diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA

Tabela 1: Agentes e métodos de eutanásia por grupos taxonômicos* (continuação)

Classe Mammalia (Mamíferos)	
Ordem Rodentia - Roedores e pequenos mamíferos – camundongos, ratos, hamster, gerbil, cobaias	
Recomendáveis	Barbitúricos intravenoso ou intraperitoneal (em casos excepcionais quando da impossibilidade de administração intravenosa) Anestésicos gerais intravenosos (exemplo propofol) Anestésicos inalatórios (e. g. isofluorano) Sobredosagem da associação de anestésicos dissociativos (e.g. cetamina) e agonistas de adrenorreceptores alfa-2 (e.g. xilazina) administrada pelas vias intravenosa, intramuscular, ou intraperitoneal (em casos excepcionais quando da impossibilidade de administração intravenosa) Após a perda do reflexo corneal, os métodos acima podem ser complementados por cloreto de potássio associado ou não a bloqueador neuromuscular, ambos por via intravenosa
Aceitos com restrição	CO ₂ , desde que sejam seguidas as recomendações desta diretriz referentes ao item 8.1.1.2 Deslocamento cervical (ratos <150 g, camundongos) Decapitação com equipamentos comerciais de uso específico tipo guilhotina (lâminas e tesouras afiadas apenas em neonatos) Micro-ondas específicos para esta finalidade (não é aceito micro-ondas de uso doméstico) Congelamento rápido ou nitrogênio líquido para fetos e neonatos de ratos e camundongos Atordoamento, seguido de exsanguinação (apenas em animais silvestres em situações de campo)
Inaceitáveis	Éter, clorofórmio, nitrogênio, argônio e outros métodos não descritos nesta diretriz

7.3 Formulário para solicitação de autorização para uso de animais em experimentação



USO EXCLUSIVO DO CEUA

PROCOLO Nº _____

RECEBIDO EM: ___/___/___

FORMULÁRIO PARA SOLICITAÇÃO DE AUTORIZAÇÃO PARA USO DE ANIMAIS EM EXPERIMENTAÇÃO – PROCOLO PARA USO DE ANIMAIS

1. TÍTULO DO PROJETO:

Estudo da via de aromatase em lesões de endometriose em animais tratados com vitamina D

1.1. ÁREA DO CONHECIMENTO:

20601000 - CITOLOGIA E BIOLOGIA CELULAR

Lista das áreas do conhecimento disponível em:

<http://www.capes.gov.br/avaliacao/instrumentos-de-apoio/tabela-de-areas-do-conhecimento-avaliacao>

2. PRAZO:

Início 01/08/2022 Término 30/11/2023

3. DOCENTE/ PESQUISADOR RESPONSÁVEL:

Nome: Daniel Escorsim Machado

3.1. TITULAÇÃO

Graduação Especialização Mestrado Doutorado Pós-Doutorado

3.2. INSTITUIÇÃO/DEPARTAMENTO/CURSO:

UNIFOA – Curso de Medicina

3.3. CONTATO

Tel: (21) 98813-0215 Ramal: _____ e-mail: daniel.machado@foa.org.br

3.4 EXPERIÊNCIA PRÉVIA

Sim Não Por quanto tempo: 15 anos

3.5. TREINAMENTO

Sim Não Por quanto tempo: 15 anos

3.6. VÍNCULO COM A INSTITUIÇÃO:

Por quanto tempo: 10 anos

4. COLABORADORES:

Nome completo	Daniela de Paula Paraiso Alves e Daniela Fernandes de Souza
Instituição	UniFOA Centro Universitário de Volta Redonda
Nível acadêmico	Acadêmica
Experiência Prévia (anos)	Sem experiência prévia
Telefone	(24)998545363 e (22)998307682
E-mail	ddpaulaparaisoa@gmail.com danielaf.desouza98@gmail.com



Utilize essa tabela para o preenchimento dos dados de um colaborador. Copie, cole e preencha a tabela, quantas vezes forem necessárias, até que todos os colaboradores sejam contemplados.

5. RESUMO DO PROJETO

A endometriose caracteriza-se pela presença de tecido endometrial, composto por elementos estromais e/ou glandulares, fora da cavidade uterina. Os sintomas mais comuns são dor pélvica, dismenorreia, dispareunia e infertilidade, sendo estrogênio-dependente e progressiva, afetando 15% de todas as mulheres na idade reprodutiva.

O tratamento padrão da endometriose tem por objetivo impedir sua progressão, tratar os sintomas, eliminar seus focos e prevenir sua recorrência. Todavia, os tratamentos farmacológicos mais eficazes apresentam efeitos colaterais relevantes como ganho de peso, diminuição da libido e instabilidade emocional trazendo prejuízos à vida pessoal e social da portadora. Com isso, o tratamento cirúrgico ganha relevância, mas é um modelo caro e invasivo. Nesse contexto, a busca por novos tratamentos clínicos mais eficientes torna-se essencial.

Há um grande interesse em se identificar tratamentos mais naturais que auxiliam na redução da endometriose que podem ser benéficos para somar aos objetivos terapêuticos. A suplementação de vitaminas pode ser entendida como complementar ao tratamento da doença, visto que a mulher pode integrar novos hábitos e comportamentos à sua rotina.

O desenvolvimento do estresse oxidativo no ambiente peritoneal pode ser um dos eventos envolvidos na patogênese da doença, já que sabe-se que a endometriose apresenta um intenso processo inflamatório. A alimentação atual - rica em açúcares e gorduras saturadas e trans - baseada em produtos industrializados pode vir a ser um fator externo favorável a cascata inflamatória. Desse modo, a inclusão de alimentos ricos em nutrientes antioxidantes e fitoquímicos pode contribuir para a redução do status inflamatório da doença.

A vitamina D em diversos estudos é apontada como importante modulador do sistema imunológico, em particular vários estudos in vitro tem demonstrado os efeitos anti-inflamatório, antiproliferativo e anti-invasivo em várias patologias como artrite reumatoide, psoríase e câncer. Dessa forma, o nosso grupo observou uma redução nas lesões endometrióticas em modelo experimental (PICFOA 2020-2021), bem como uma diminuição do nível de estrogênio nos animais tratados. Esses resultados são promissores e possibilitam uma investigação mais aprofundada do real mecanismo de ação da vitamina D nas lesões. Com isso pretendemos avaliar se a vitamina D atua na via de aromatase, uma enzima importante para a síntese do estrogênio.

5.1. OBJETIVOS (na íntegra)

Objetivo geral:

Analisar o efeito da suplementação de vitamina D em lesões endometrióticas experimentais.

Objetivos específicos:

- Estabelecer um modelo experimental de endometriose em ratas Wistar
- Realizar tratamentos com calcitriol nas lesões endometrióticas estabelecidas
- Analisar macroscopicamente e histologicamente as lesões endometrióticas induzidas.
- Quantificar os níveis de aromatase nas lesões endometrióticas induzidas, antes e após o tratamento



5.2. JUSTIFICATIVA

O modelo experimental de endometriose já está bem estabelecido pelo grupo, que mostra experiência prévia nos últimos 15 anos com várias publicações na área:

1-MACHADO, D. E. et al. Higher expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 (Flk-1) and metalloproteinase-9 (MMP-9) in a rat model of peritoneal endometriosis is similar to cancer diseases. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR**, v. 29, n. 1, p. 4, 19 jan. 2010.

2-MACHADO, D. E. et al. Developing a Noninvasive Procedure Using Labeled Monoclonal Antibody Anti-VEGF (Bevacizumab) for Detection of Endometriosis. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 751460, 2015.

3-MACHADO, D. E. et al. Euterpe oleracea Extract (Açaí) Is a Promising Novel Pharmacological Therapeutic Treatment for Experimental Endometriosis. **PLoS ONE**, v. 11, n. 11, 16 nov. 2016.

Além das publicações, esse projeto trata-se da continuação do PICFOA2020-2021, no qual vimos uma redução nas lesões dos animais tratados com a vitamina D. Essa experiência é fundamental para a condução dos experimentos, que seguirão rigorosamente os princípios éticos, evitando ao máximo o sofrimento dos animais.

Item 5.2. A justificativa deverá conter as bases científicas para o estudo, aula ou treinamento proposto, particularmente os dados prévios in vitro e in vivo que justifiquem a experimentação em animais.

5.3. RELEVÂNCIA

As portadoras de endometriose sofrem diariamente tanto pela doença quanto pelos efeitos colaterais advindos de seu tratamento padrão. Além disso, a endometriose apresenta sintomas como dismenorreia, dispareunia, infertilidade, entre outros, que ocasionam problemas sociais e pessoais às portadoras. Devido à sua característica estrogênio-dependente, o tratamento da endometriose é feito por meio de hormônios e intervenções cirúrgicas que controlam a doença, mas que contribuem também para modificações no organismo das portadoras como ganho de peso, alterações no humor e depressão.

O projeto em questão busca um possível tratamento menos agressivo à saúde física e mental da mulher, visto que normovitaminose D pode apresentar respostas anti-inflamatórias e antiestrogênicas que resultariam na redução das lesões endometrióticas e consequentemente, reduziriam os efeitos maléficos do tratamento padrão.

Item 5.3. O potencial impacto da utilização dos animais para o avanço do conhecimento científico, a saúde humana, e/ou a saúde animal devem ser incluídos nesse item. Deve ficar claro que os benefícios potenciais da atividade envolvendo animais em pesquisa ou ensino se sobrepõem às consequências negativas da experimentação animal.

5.4 METODOLOGIA

Estabelecimento e caracterização de modelo experimental de endometriose peritoneal em Ratas Wistar.



Para os experimentos serão utilizadas 10 Ratas Wistar com 8 semanas de vida pesando em torno de 300 gramas. Os animais serão anestesiados e após a completa anestesia será realizada uma incisão na linha alba, ligadura e secção de um dos cornos uterinos. Em placa de petri com solução salina, o útero será aberto longitudinalmente e o endométrio será seccionado em 3 fragmentos de tamanho entre 3 e 4mm² para em seguida serem implantados na cavidade peritoneal utilizando fio de Nylon 6-0. Posteriormente a parede abdominal será fechada também com fio de Nylon 6-0. Os animais permanecerão anestesiados durante no máximo 30 minutos, pois o tempo necessário e suficiente para a realização do procedimento cirúrgico proposto neste trabalho é de 10 minutos. Após 15 dias de indução da lesão endometriótica será iniciado o tratamento diário, via gavagem, durante 30 dias com 0,2 mg/mL de solução salina (n = 5), e com 200 UI de 1,25 dihidroxicholecalciferol (n = 5). Após o período de 30 dias de tratamento serão realizadas eutanásias dos animais, mediante overdose de anestésico. As amostras retiradas serão avaliadas macroscopicamente para medição do crescimento das lesões (comprimento e largura), preparadas para realização das análises histológicas e imunohistoquímica.

Caracterização Morfológica das Lesões

As amostras das lesões endometrióticas serão fixadas em formol tamponado e processadas para a histologia. A coloração com hematoxilina-eosina (HE) permitirá confirmar as lesões pela presença de componentes endometriais estromais e/ou glandulares.

Estudo Imunohistoquímico

Para o estudo da distribuição de aromatase, será realizada imunomarcagem. O protocolo será o seguinte:

- Desparafinização: 3 banhos de álcool por 30 minutos cada e 3 banhos com xilol por 30 minutos cada seguido de banho com água destilada por 5 minutos.
- Recuperação antigênica: tampão citrato 0,01M, pH 6,0 em microondas e dois banhos com tampão fosfato (PBS 0,1M, pH 7,4) a temperatura ambiente por 5 minutos cada.
- Inativação da peroxidase endógena: peróxido 3% por 15 minutos em temperatura ambiente seguida de dois banhos com tampão fosfato (PBS 0,1M, pH 7,4) a temperatura ambiente por 5 minutos cada.
- O bloqueio dos sítios inespecíficos foi feito com PBS/BSA 5% por 30 min em câmara úmida.
- Os cortes serão incubados com anticorpo primário policlonal anti-aromatase (ab-18995, Abcam) diluído em PBS/BSA 1% em câmara úmida overnight.
- Em seguida, após dois banhos com tampão fosfato a temperatura ambiente, os cortes serão incubados com anticorpo secundário Biotina e Streptavidina por 30 minutos cada.
- Por fim, os cortes serão incubados com DAB até o tempo necessário de se obter uma coloração castanha e, colocados em Hematoxilina por 3 minutos passando em seguida por banho de água corrente por 2 minutos.
- Os cortes então serão hidratados com 2 banhos sucessivos de álcool, clarificados em xilol (5 minutos cada) e montados com entellan para serem observados em microscópio óptico.

Estudo Morfométrico

A análise morfométrica dos resultados será feita por meio da observação microscópica (microscopia óptica) de cortes das lesões endometrióticas imunomarcadas com aromatase, fotografados em câmera digital e posteriormente analisados em programa de análise de imagem, Image Pro Plus 4.0. Para cada lâmina serão estudados 10 campos aleatórios de maior aumento (400X), utilizando a média dos resultados obtidos.



6.6. TIPO E CARACTERÍSTICA:

Espécie	Linhagem	Idade	Peso aprox.	Quantidade		
				M	F	M+F
Anfíbio						
Ave						
Bovino						
Bubalino						
Cão						
Camundongo heterogênico						
Camundongo isogênico						
Camundongo <i>Knockout</i>						
Camundongo transgênico						
Caprino						
Chinchila						
Cobaia						
Coelhos						
Equídeo						
Espécie silvestre brasileira						
Espécie silvestre não-brasileira						
Gato						
Gerbil						
Hamster						
Ovino						
Peixe						
Primata não-humano						
Rato heterogênico	Wistar	8 sem	300 g		10	
Rato isogênico						
Rato <i>Knockout</i>						
Rato transgênico						
Réptil						
Suíno						
Outra						
			TOTAL		10	

6.7 MÉTODOS DE CAPTURA (somente em casos de uso de animais silvestres)

6.8. Existe planejamento estatístico?

 Sim [X] Não []

6.8.1 Detalhar o planejamento estatístico/delineamento experimental

Para os experimentos serão utilizadas 10 Ratas Wistar com 8 semanas. Após 15 dias de indução da lesão endometriótica será iniciado o tratamento diário com 0,2 mg/mL de solução salina (n = 5), e com 200 UI 1,25 dihidroxicholecalciferol (n = 5). Todas as análises serão realizadas em ambos os grupos (controle x tratado).



Outros:

10.1.2 PERÍODO DO ESTRESSE/DOR INTENCIONAL NOS ANIMAIS

Curto Longo Especificar:

10.2 USO DE FÁRMACOS ANESTÉSICOS:

Sim Não

Fármaco	Xilazina e Ketamina
Dose (UI ou mg/kg)	0,6 Rompum® (Ketamina) + 0,2 Xilazina 2%
Via de administração	Intraperitoneal
Frequência	No momento da cirurgia

Utilize esta tabela para o preenchimento de um fármaco. Copie, cole e preencha a tabela, quantas vezes forem necessárias, até que todos os fármacos sejam contemplados. No campo "fármaco", deve-se informar o(s) nome(s) do(s) princípio(s) ativo(s) com suas respectivas Denominação Comum Brasileira (DCB) ou Denominação Comum Internacional (DCI).

10.3. USO DE FÁRMACOS ANALGÉSICOS:

Sim Não Justifique em caso negativo:

Fármaco	Ibuprofeno (AINEs)
Dose (UI ou mg/kg)	7.5 mg/kg
Via de administração	Oral
Frequência	6-12 horas (5 dias)

Utilize esta tabela para o preenchimento de um fármaco. Copie, cole e preencha a tabela, quantas vezes forem necessárias, até que todos os fármacos sejam contemplados. No campo "fármaco", deve-se informar o(s) nome(s) do(s) princípio(s) ativo(s) com suas respectivas Denominação Comum Brasileira (DCB) ou Denominação Comum Internacional (DCI).

10.4. USO DE RELAXANTE MUSCULAR

Sim Não Justifique em caso negativo: As lesões serão tratadas com Vitamina D3. O tratamento com outros fármacos pode interferir no mecanismo de ação do composto que está sendo proposto.

Fármaco	
Dose (UI ou mg/kg)	
Via de administração	
Frequência	

Utilize esta tabela para o preenchimento de um fármaco. Copie, cole e preencha a tabela, quantas vezes forem necessárias, até que todos os fármacos sejam contemplados. No campo "fármaco", deve-se informar o(s) nome(s) do(s) princípio(s) ativo(s) com suas respectivas Denominação Comum Brasileira (DCB) ou Denominação Comum Internacional (DCI).

10.5. IMOBILIZAÇÃO DO ANIMAL:

Sim Não Especificar: Aplicação do anestésico

10.6. CONDIÇÕES ALIMENTARES:

10.6.1 Jejum:



Sim Não Duração: _____ (horas)

10.6.2. Restrição Hídrica:

Sim Não Duração: _____ (horas)

10.7 CIRURGIA:

Sim Não
 Única Múltipla Qual(is) Endometriose experimental

10.8 PÓS-OPERATÓRIO

10.8.1 OBSERVAÇÃO DA RECUPERAÇÃO:

Sim Não Período de observação: 12 (horas)

10.8.2 USO DE ANALGESIA

Sim Não

Justificar o "NÃO"-uso de analgesia pós-operatório, quando for o caso: As lesões serão tratadas com Vitamina D3. O tratamento com outros fármacos pode interferir no mecanismo de ação do composto que está sendo proposto.

Fármaco	
Dose (UI ou mg/kg)	
Via de administração	
Frequência	

Utilize esta tabela para o preenchimento de um fármaco. Copie, cole e preencha a tabela, quantas vezes forem necessárias, até que todos os fármacos sejam contemplados. No campo "fármaco", deve-se informar o(s) nome(s) do(s) princípio(s) ativo(s) com suas respectivas Denominação Comum Brasileira (DCB) ou Denominação Comum Internacional (DCI).

10.8.3. OUTROS CUIDADOS PÓS-OPERATÓRIOS

Sim Não Descrição: Será realizada a antisepsia no pós-operatório e diariamente para evitar contaminações.

10.9. EXPOSIÇÃO/INOCULAÇÃO/ADMINISTRAÇÃO:

Sim Não

Fármaco	1,25 dihidroxicholecalciferol
Dose (UI ou mg/kg)	200 UI
Via de administração	Gavagem
Frequência	Diária

No campo "fármaco", deve-se informar o(s) nome(s) do(s) princípio(s) ativo(s) com suas respectivas Denominação Comum Brasileira (DCB) ou Denominação Comum Internacional (DCI).

11. EXTRAÇÃO DE MATERIAL BIOLÓGICO

Sim Não

Material biológico	Lesão endometriótica
Quantidade da Amostra	1 lesão por animal
Frequência	Ao final do tratamento
Métodos de coleta	Biópsia



Utilize esta tabela para o preenchimento de um material biológico.

Copie, cole e preencha a tabela, quantas vezes forem necessárias, até que todos os materiais sejam contemplados.



12. FINALIZAÇÃO

12.1 MÉTODOS DE EUTANÁSIA

Sim [X] Não []
Descrição do método de eutanásia (substância, dose, via, materiais, equipamentos, membros da equipe envolvidos, método de confirmação da morte, etc.)
Conforme as DIRETRIZES DA PRÁTICA DE EUTANÁSIA DO CONCEA (em anexo), utilizaremos o método recomendável para eutanásia de mamíferos da ordem Rodentia (Tabela 1 página 44). Para eutanásia é necessária a aplicação de no mínimo 3 vezes a dose anestésica. Dessa forma, será administrado Propofol intravenoso na dose letal de 30 mg/kg (Guia de eutanásia 2019 página 9 – em anexo).

12.2 DESTINO DOS ANIMAIS APÓS O EXPERIMENTO:

Os animais serão eutanasiados.

12.3 FORMA DE DESCARTE DA CARCAÇA

Sacos plásticos ou caixas hermeticamente fechadas.

13. TERMO DE RESPONSABILIDADE

Eu, Daniel Machado (nome do responsável) certifico que:

a) Li o disposto na **Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008**, e nas demais normas aplicáveis à utilização de animais em ensino e/ou pesquisa, especialmente as Resoluções Normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA;

b) Este estudo não é desnecessariamente duplicativo, tem mérito científico e que a equipe que participa deste projeto foi treinada e é competente para executar os procedimentos descritos neste protocolo.

c) Tenho conhecimento do teor da **Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos – DBPA**, do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, de 14 de agosto de 2012.

d) Não existe método substitutivo que possa ser utilizado como uma alternativa ao projeto.

e) Declarado neste protocolo é a absoluta expressão da verdade. Estou ciente que o não cumprimento das condições aqui especificadas é de minha total responsabilidade (docente/pesquisador principal) e que estarei sujeito às punições previstas na legislação em vigor.

Assinatura:

Data: 24/05/2022



14. RESOLUÇÃO DA COMISSÃO

A Comissão de Ética no uso de animais, na sua reunião de ____ / ____ / ____ , considera o presente PROTOCOLO DE USO DE ANIMAIS:

<input type="checkbox"/>	Aprovado
<input type="checkbox"/>	Não aprovado

Volta Redonda, ____ de _____ de 20____.

Dimitri Ramos Alves
Coordenador do Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA

7.4 Certificado de aprovação do presente projeto pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)



**Comitê de Ética no Uso de Animais
(CEUA - UniFOA)**



PARECER Nº 002/2022

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “**ESTUDO DA VIA DE AROMATASE EM LESÕES DE ENDOMETRIOSE EM ANIMAIS TRATADOS COM VITAMINA D**”, registrada com o número de **Protocolo 002/2022**, sob a responsabilidade de **Daniel Escorsim Machado** – que envolve a produção, manutenção, ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pelo **COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UniFOA)**, DO CENTRO UNIVERSITÁRIO DE VOLTA REDONDA / RJ - UniFOA, em reunião de **08/06/2022**.

Finalidade	() Ensino	(X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 01/08/2022	Término: 30/11/2023
Espécie / linhagem / raça	Rato heterogênico / Wistar	
Nº de animais	10	
Peso / idade	300g / 8 Semanas	
Sexo	Fêmeas	
Origem	Biotério	
Observação	-----	

Volta Redonda, 08 de Junho de 2022.

Prof. Dr.
Dimitri Ramos
Alves

Assinado de forma digital
por Prof. Dr. Dimitri
Ramos Alves
Dados: 2022.06.08
15:50:00 -03'00'

Dimitri Ramos Alves
Coordenador do Comitê de Ética no Uso de Animais
(CEUA-UniFOA)