



Modelo experimental de endometriose em ratas: caracterização e validação por meio de análise histológica e enzimática

Fabiana Albani Zambuzi¹, Maria Luiza Nunes Mamede Rosa¹, Andréa Carla Celloto¹

¹Faculdade de Ciências da Saúde de Barretos Dr. Paulo Prata - FACISB, São Paulo, Brasil

RESUMO

Introdução: A endometriose é uma doença caracterizada pela presença de tecido endometrial fora da cavidade uterina, que acomete um número expressivo de mulheres em idade reprodutiva e apresenta um diagnóstico complexo e invasivo. **Objetivo:** Caracterizar e validar um modelo experimental de endometriose descrito na literatura utilizando ratas Wistar. O estudo avaliou i) a habilidade em realizar o procedimento de indução da endometriose em ratas e assegurar a reprodutibilidade do modelo; ii) a viabilidade de obter amostras histopatológicas dos implantes que permitam caracterizar a doença. **Material e métodos:** A endometriose foi induzida em ratas adultas que tiveram um fragmento do corno uterino retirado e implantado na cavidade peritoneal. Após 21 dias, os implantes foram extraídos para realização das análises histológicas e dosagem de mieloperoxidase (MPO). **Resultados:** Foi demonstrado que houve aderência do implante ao peritônio, levando a formação de aderência das alças intestinais, tecido adiposo abdominal, cistos e novos vasos sanguíneos. A partir da análise histológica, observou-se o desenvolvimento característico do endométrio compatível com a fase de estro, em que há presença de células cúbicas com núcleo e nucléolos evidentes e infiltrados de neutrófilos nos implantes, além da detecção de MPO. **Conclusão:** O modelo empregado é de fácil execução e boa reprodutibilidade, capaz de reproduzir as características morfológicas da endometriose, além de possibilitar a obtenção de amostras para avaliação das alterações funcionais de células do sistema imune, bem como a detecção de mediadores produzidos por estas células que também estão relacionados à patogênese da endometriose.

Palavras-chave: Endometriose, inflamação, neutrófilos, modelo experimental, ratas.

ABSTRACT

Introduction: Endometriosis is a disease characterized by the presence of endometrial tissue outside the uterine cavity, which affects a significant number of women of reproductive age and presents a complex and invasive diagnosis. **Aim:** Characterize and validate an experimental model of endometriosis described in the literature using Wistar rats. The study evaluated i) the ability to perform the endometriosis in rats and ensure the reproducibility of the model; ii) the feasibility of obtaining histopathological samples of the implants that allow characterizing the disease. **Material and Methods:** Endometriosis was induced in adult female rats that had a fragment of the uterine horn removed and implanted in the peritoneal cavity. After 21 days, the implants were extracted for histological analysis and metalloproteinase (MPO) measurement. **Results:** It was demonstrated that there was adherence of the implant on peritoneum and it also showed the formation of adhesion on intestinal loops and abdominal adipose tissue, cysts and new blood vessels. From the histological analysis, the characteristic development of the endometrium compatible with the estrus phase was observed, with the presence of cubic cells, evident nucleus and infiltration of neutrophils in the implants, in addition to MPO detection. **Conclusion:** The model used is easy to execute and has good reproducibility, capable of reproducing the morphological characteristics of endometriosis, in addition to making it possible to obtain samples to assess the functional changes of immune cells, as well as the detection of mediators produced by these cells which also are related to the endometriosis pathogenesis.

Keywords: Endometriosis, inflammation, neutrophils, experimental model, rats.

INTRODUÇÃO

A endometriose é uma condição crônica, relativamente comum, que afeta entre 6–10% das mulheres em idade reprodutiva¹. Em mulheres com dor pélvica, essa prevalência aumenta para 40%² e, quando relacionada ao comprometimento da fertilidade feminina, foi relatado que 35-50% das mulheres com endometriose apresentam infertilidade e 25-50% das mulheres inférteis têm endometriose³. É uma doença que permanece mal diagnosticada, mal compreendida e tratada de forma ineficaz⁴.

Quanto à fisiopatologia, é considerada uma doença inflamatória crônica estrógeno-dependente, caracterizada pelo crescimento de tecido endometrial fora da cavidade uterina, sendo estes depósitos ectópicos, mais comumente encontrados em ovários, peritônio, ligamentos útero-sacros e fundo-de-saco retovaginal. Entretanto, implantes extra-pélvicos também podem estar presentes⁵.

Embora a etiologia da endometriose não seja completamente conhecida, foram propostas algumas teorias como: i) teoria de Sampson ou teoria da menstruação retrógrada⁶; ii) teoria da metaplasia celômica⁷⁻⁹; e iii) teoria da indução tumoral^{10, 11}. Apesar da teoria de Sampson ser a mais aceita, foi demonstrado que apenas 6-10% das mulheres desenvolvem endometriose, enquanto 76-90% apresentam menstruação retrógrada¹². Tem sido sugerido que mulheres que desenvolvem endometriose podem apresentar disfunção genética, bioquímica ou imunológica que impedem a remoção do tecido que refluiu para a cavidade peritoneal, facilitando a adesão celular às estruturas pélvicas e extra-pélvicas¹³.

Nos últimos anos, múltiplos estudos têm sido realizados para tentar responder perguntas acerca dos fatores imunológicos relacionados à patogênese da endometriose, sendo o principal mecanismo avaliado complementar à teoria da menstruação retrógrada. Por motivos ainda controversos, as células endometriais que adentram a cavidade abdominal não são eliminadas, desenvolvendo a doença. Alguns fatores que podem levar à adesão dessas células já são conhecidos. Neste sentido, independente da etiologia, estudos mostram que a adesão das células endometriais ocorre pela indução de moléculas de adesão, bem como pelo aumento na expressão de metaloproteinases de matriz e ativadores de

plasminogênio, que garantem a destruição local da matriz extracelular na endometriose, posteriormente proliferando e invadindo o tecido peritoneal¹⁴.

A possível falha na destruição das células endometriais na cavidade peritoneal pode ocorrer inicialmente devido a falhas nos mecanismos de reconhecimento destas células como antígenos pelo sistema imune. Células dendríticas e macrófagos desempenham a função de apresentar tais antígenos aos linfócitos T através do complexo de histocompatibilidade (MHC), bem como de fornecer sinais coestimuladores para a ativação destas células. As moléculas de MHC podem ser classificadas em MHCI e MHCII, sendo que as primeiras estão relacionadas à ativação de linfócitos T citotóxicos (T CD8) e as segundas estão associadas aos linfócitos T auxiliares (T CD4). Os linfócitos T citotóxicos secretam substâncias letais como granzimas e perforinas, que ocasionam a morte da célula-alvo auxiliando na destruição direta das células endometriais; enquanto os linfócitos T auxiliares secretam citocinas que podem ativar outras células do sistema imune como os macrófagos, e desencadear a destruição celular. Alterações em qualquer uma dessas etapas, seja na ativação ou função efetora das células T podem estar relacionadas com a gênese da endometriose^{15, 16}.

Além das falhas na apresentação e ativação de linfócitos T, alterações funcionais em outras células do sistema imune podem também estar relacionadas à patogênese da endometriose; e desta forma explicar a ocorrência da mesma em apenas uma porcentagem de mulheres que apresentam a menstruação retrógrada. Vários trabalhos demonstraram a participação de outras células como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, células natural killers e células B, as quais podem estar disfuncionais em mulheres com endometriose¹⁷⁻²⁰. Neste sentido, a redução da função citotóxica de células natural killers¹⁸, aumento da frequência de células dendríticas imaturas¹⁹, bem como aumento de população de células T auxiliares polarizadas para o perfil Th220 são alguns dos achados relacionados às disfunções das células do sistema imune em pacientes com endometriose. Adicionalmente, a produção de citocinas, quimiocinas fatores de crescimento, como fator de necrose tumoral (TFN), IL-8, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), os quais são mediadores

envolvidos na inflamação, angiogênese e crescimento do tecido, mostram-se aumentados no plasma e no fluido peritoneal de mulheres com endometriose, reforçando o papel das disfunções imunológicas no estabelecimento e desenvolvimento desta patologia⁴.

Um diagnóstico preciso da endometriose somente é alcançado pela visualização da lesão endometrial através de videolaparoscopia e posterior análise histopatológica com achados característicos da doença. Em relação ao tratamento ainda não se dispõe de algo que seja ideal, sendo as opções disponíveis o uso de medicamentos, cirurgias ou a associação de ambos. Devido à complexidade e necessidade de métodos invasivos para o diagnóstico da doença, estudos detalhados sobre a resposta dos focos de endometriose aos diversos medicamentos disponíveis no mercado são bastante escassos. Neste contexto, a possibilidade de utilizar um modelo experimental de fácil reprodutibilidade e baixo custo seria de grande valia tanto para esclarecer os mecanismos envolvidos na etiologia dessa doença como para investigar novas formas de tratamento.

OBJETIVO

Utilizar o modelo experimental de endometriose descrito por Jones²¹ e avaliar a viabilidade de se obter i) amostras histopatológicas dos implantes que permitam caracterizar a doença; ii) demonstrar a facilidade de indução e a reprodutibilidade do modelo.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados ratos Wistar fêmeas, pesando entre 180-210 g, provenientes do Biotério da Universidade de Franca (Unifran). Os animais foram acondicionados em ambiente com temperatura (22-25°C) e ciclo luz/escuro (12:12 horas) controlados, com livre acesso a água e ração. Os procedimentos com os animais, bem como os protocolos experimentais deste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética na Utilização de Animal (CEUA) da Faculdade de Medicina de Barretos Dr. Paulo Prata. (03/2020)

Desenho Experimental

Para a seleção dos animais foram realizadas coleta e análise de esfregaço vaginal, diariamente. O esfregaço foi colhido utilizando uma pipeta paster com pequena quantidade de solução fisiológica de NaCl 0,9% e o material analisado em microscópio, imediatamente após a coleta, sem necessidade de qualquer coloração. Somente as ratas que apresentaram três ou mais ciclos estrais a cada cinco dias foram incluídas no estudo.

Após jejum de 8 horas, 8 animais foram pesados e anestesiados com uma mistura de xilazina 2% e ketamina 5% (1:1), dose de 0,2 mL/100 g de peso, via intraperitoneal (ip). Os animais foram depilados manualmente na região abdominal caudal com área de 5 cm x 4 cm e anti-sepsia com polivinil-pirrolidona-iodo.

Uma incisão mediana de 3 cm foi realizada acometendo pele, plano músculo e peritônio, seguido de identificação dos órgãos intracavitários e exposição do útero, anexos e mesentério. O procedimento cirúrgico consistiu em identificação, ligadura e secção do terço médio do corno uterino esquerdo usando fio de náilon 6-0. Um segmento uterino medindo 4 mm x 4 mm foi retirado, colocado em solução fisiológica (NaCl 0,9%) e aberto longitudinalmente para exposição do endométrio.

O segmento uterino foi auto-transplantado para o peritônio, próximo a um vaso, mantendo-se a superfície endometrial voltada para a luz da cavidade peritoneal. A fixação do implante foi realizada com 4 pontos simples, sendo um em cada extremidade. A sutura da parede abdominal foi realizada em dois planos de sutura contínua acometendo o músculo e a pele com fio de náilon 4-0. Após a cirurgia os animais receberam uma dose única de 0,1 mL de terramicina (50mg/mL), via intramuscular; e paracetamol (200mg/Kg), via oral, 3x/dia, durante 3 dias. Tanto o antibiótico quanto a primeira aplicação do analgésico foram realizadas logo ao término da cirurgia.

Vinte e um dias após o implante os animais foram novamente anestesiados com sobredose dos anestésicos citados acima e posteriormente foi realizado deslocamento cervical. Após confirmação do óbito, a cavidade abdominal foi aberta para a

análise macroscópica e retirada do implante para confecção de lâminas histológicas e análise de Mieloperoxidase (MPO). Anteriormente à retirada, a área do implante foi medida lateralmente e quanto à altura.

Análise Macroscópica e Histológica

A medida da área do implante foi realizada empregando-se uma régua milimetrada e as características do mesmo, como formação de aderência, presença de cistos, novos vasos sanguíneos, foi observada. O implante foi removido, e um fragmento retirado e acondicionado em formol para posterior preparação de lâminas histológicas e análise.

Após 24 horas de fixação em formol tamponado (tampão fosfato) 10% (v/v), as amostras foram submetidas a uma sequência de soluções para o tratamento do tecido: desidratação progressiva (bateria de álcoois de baixa graduação até álcool absoluto: 50, 70, 80, 90, 95 e 100% - v/v), diafanização em xilol e inclusão em parafina. Em seguida os blocos foram seccionados em cortes de 3 μ m (Micrótomo 2040, Reichert-Jung, Alemanha), montados em lâminas e corados com hematoxilina/eosina.

Dosagem de Mieloperoxidase tecidual

O recrutamento de neutrófilos para o implante foi quantificado indiretamente a partir da medida da atividade da enzima MPO. Para realizar essa medida,

o implante retirado foi pesado e acondicionado em 1 mL do Tampão (NaCl 0,1M; NaEDTA 0,015M diluídos em NaPO₄ 0,02M, pH = 4,7) para maceração do tecido. Em seguida o macerado foi centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante descartado, o pellet ressuspensionado em tampão de lise (NaCl 0,2%) e centrifugado nas mesmas condições. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em 2,5 mL do tampão (1g de H-TAB em 200mL NaPO₄ 0,05 M, pH = 5,4). A solução foi armazenada em freezer -70 °C até sua utilização na dosagem.

Para realização da dosagem a amostra foi descongelada e centrifugada a 10.000 rpm por 15 min, a 4°C. Foram utilizados 3 μ L da amostra e 47 μ L de tampão fosfato (NaPO₄ 0,08M), respeitando-se o volume final de 50 μ L em todos os poços da placas de absorbância. Em seguida foram adicionados 25 μ L de tetrametilbenzidina (TMB-Sigma Chemical Company) e 100 μ L de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A placa foi mantida ao abrigo da luz por 5 minutos e a reação interrompida pela adição de 75 μ L de ácido sulfúrico (H₂SO₄). A placa foi levada ao leitor de ELISA para leitura de absorbância em 450nm. A partir do resultado de MPO, foi possível quantificar indiretamente a quantidade de neutrófilo no tecido.

RESULTADOS

A primeira análise realizada neste estudo foi em relação a dois aspectos, i) facilidade de

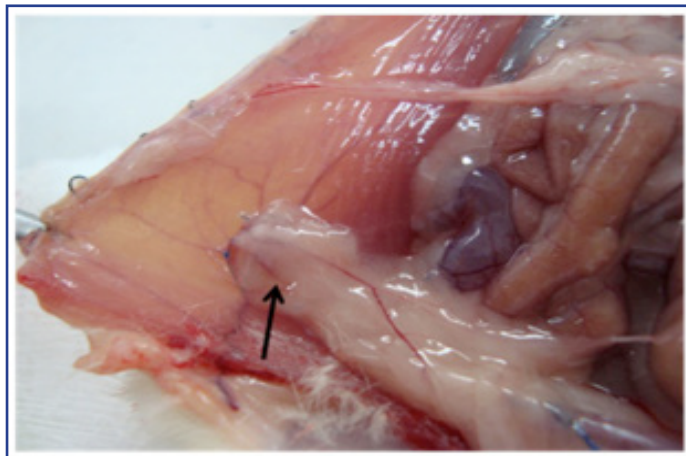


Figura 1. Fotografia mostrando o implante 21 dias após a cirurgia. Seta indica a posição do implante recoberto por tecido adiposo.

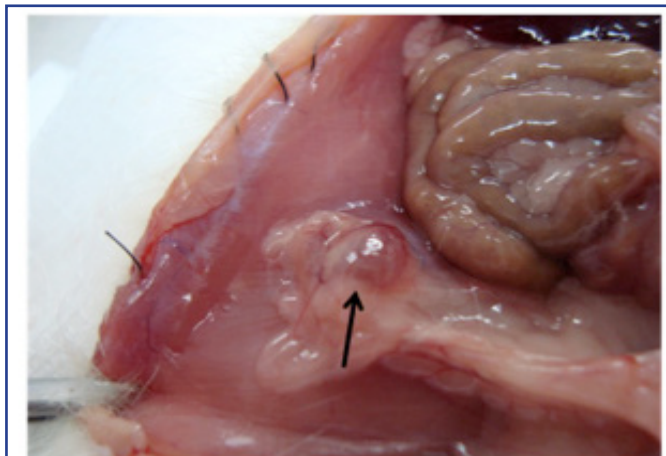


Figura 2. Fotografia mostrando o implante 21 dias após a cirurgia. Seta indica a posição do implante recoberto por tecido adiposo e presença de exsudato.

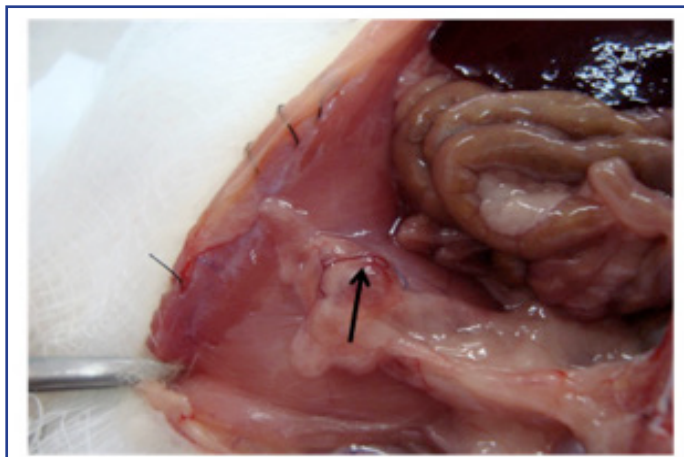


Figura 3. Fotografia mostrando o implante 21 dias após a cirurgia. Seta indica a formação de novos vasos sanguíneos para nutrição do implante.

realização da técnica cirúrgica, considerada de fácil execução para os pesquisadores; ii) reprodutibilidade do modelo, também considerada positiva uma vez que apenas um dos oito animais operados não apresentou a implantação correta do fragmento. Vinte e um dias após a cirurgia observamos o desenvolvimento e crescimento do implante (endometriose), assim como a formação de aderência das alças intestinais ou tecido adiposo abdominal (Figura 1), cistos (Figura 2) e novos vasos sanguíneos para a nutrição do implante (Figura 3). A média da área ocupada pelo implante foi de $40.0 \pm 6,32\text{mm}^2$.

Nos cortes histológicos observamos claramente a área delimitada entre o implante e a musculatura peritoneal (Figura 4) e o desenvolvimento característico do endométrio, compatível com a fase de estro, em que há a presença de células cúbicas com núcleo evidente

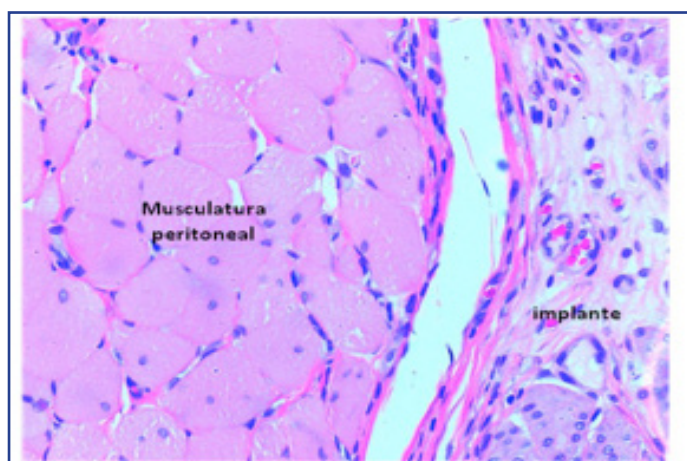


Figura 4. Fotomicrografia do implante 21 dias após a cirurgia. Musculatura do peritônio a esquerda e o implante a direita. Coloração hematoxilina/eosina, aumento 40x.

(Figura 5) e infiltrado de neutrófilos (Figura 6).

Adicionalmente às análises histológicas, nas quais pode ser observado o recrutado inflamatório rico em neutrófilos, também foi avaliada a atividade de mieloperoxidase, importante marcador de atividade destas células. No modelo avaliado, foi possível detectar níveis importantes desta enzima no tecido endometrial (1744 ± 236 neutrófilos/mg), demonstrando a aplicação deste modelo em avaliar também mediadores produzidos pelas células do sistema imune e que possibilitem análises funcionais e fenotípicas destas células.

DISCUSSÃO

As teorias para explicação do desenvolvimento da endometriose, dentre as quais a teoria de menstruação retrógrada⁶, ainda deixam diversas questões que necessitam de estudos para serem melhor compreendidas, principalmente em relação à participação de disfunções nos mecanismos da resposta imune. Neste sentido, modelos experimentais que possibilitem o estudo dos mecanismos envolvidos na implantação e desenvolvimento desta patologia são de extrema importância para a avaliação das disfunções que podem levar à endometriose.

Neste trabalho, mostramos que o modelo cirúrgico de implantação de fragmento do endométrio na cavidade peritoneal auxilia no estudo do desenvolvimento da endometriose, possibilitando a avaliação macroscópica e histopatológica do

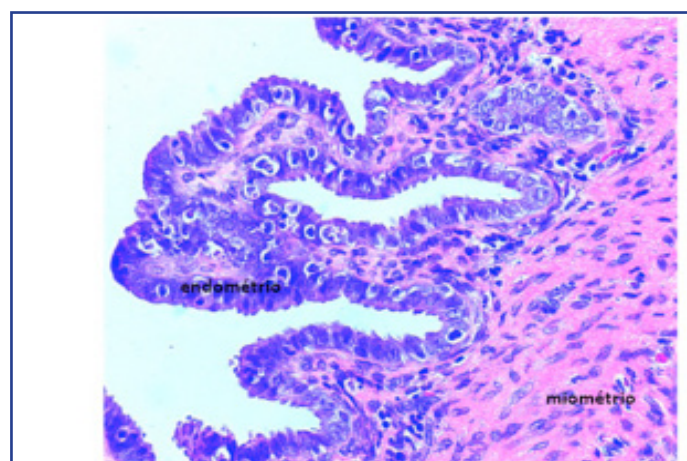


Figura 5. Fotomicrografia do implante 21 dias após a cirurgia. Localização do miométrio e endométrio. Coloração hematoxilina/eosina, aumento 40x.

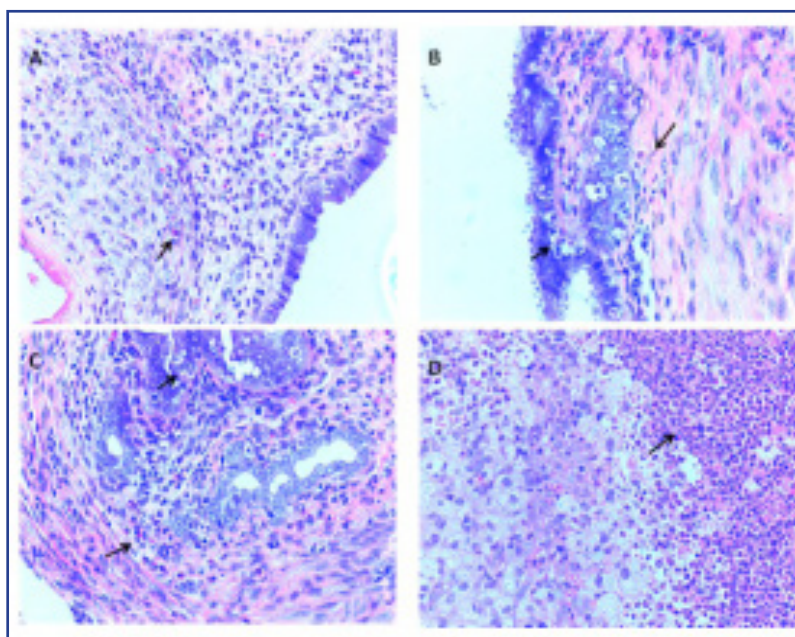


Figura 6. Fotomicrografia do implante 21 dias após a cirurgia. Setas indicam a presença de neutrófilos em diferentes graus. A) (+); B) (++); C) (+++) e D) (++++). Coloração hematoxilina/eosina, aumento 40x.

tecido implantado; e compreende um modelo de fácil execução técnica e com importante reprodutibilidade, visto o baixo índice de não implantação tecidual. Nossa avaliação corrobora outro estudo que também avaliou o modelo descrito por Jones²¹ para estudo da endometriose, concluindo que o modelo experimental utilizado é capaz de reproduzir as características morfológicas da doença e favorece a obtenção das amostras para avaliação com maior facilidade, especialmente em relação à mensuração da área de lesão, bem como a análise de ação de fármacos. Assim, o modelo descrito por Jones foi considerado o modelo mais adequado na visão dos pesquisadores em razão de sua boa reprodutibilidade e aceitação na literatura²².

Além destas avaliações, o modelo demonstrou ser importante estratégia para avaliação de recrutado inflamatório, permitindo a avaliação de células do sistema imune e sua função na patogênese da endometriose. Disfunções em diversas células do sistema imune têm sido relacionadas ao desenvolvimento da endometriose, acarretando falhas no reconhecimento e destruição das células endometriais, possibilitando, assim, a implantação do tecido ectópico, bem como atuando como fontes de importantes mediadores para recrutamento celular, fatores de crescimento e promoção de angiogênese^{4,13,15,18-20}. Em nossas avaliações histológicas foi possível observar

diferentes graus de recrutamento de neutrófilos, com casos de intenso infiltrado neutrofílico.

Os neutrófilos são importantes células do sistema imune inato, sendo a população celular mais abundante e inicialmente recrutada para os locais de inflamação. Funcionalmente, estas células atuam como as principais responsáveis pela fagocitose, secreção de enzimas e mediadores inflamatórios presentes em seus grânulos e liberação de armadilhas extracelulares (NETs)²³. Apesar de desempenharem importante papel na inflamação aguda, estudos têm demonstrado a participação destas células na resolução da inflamação, cicatrização de feridas e processos inflamatórios crônicos como artrite reumatoide, aterosclerose e doença inflamatória intestinal²⁴⁻²⁶.

Apesar das evidências da participação dos neutrófilos em processos inflamatórios crônicos, o papel destas células na patogênese da endometriose ainda é pouco compreendido. Já foi demonstrado que neutrófilos e macrófagos estão relacionados aos estágios iniciais da endometriose, com aumento significativo nos primeiros cinco dias após implantação, e correspondem a importantes fontes de fatores angiogênicos, como o VEGF²⁷. Outro grupo de pesquisadores demonstrou que a depleção de neutrófilos promoveu a redução do número de lesões em camundongos após a injeção de fragmentos de tecido endometrial, reforçando a participação destas células na endometriose²⁸. Por fim, um estudo mais

recente demonstrou presença de infiltrado neutrofílico em lesões de pacientes com endometriose, favorecido pelo microambiente, com aumento significativo de IL-8, quimiocina responsável pelo recrutamento destas células²⁹. Adicionalmente, neste mesmo trabalho, observou-se que neutrófilos circulantes de pacientes com endometriose apresentaram diferenças na expressão gênica quando comparados às células de controles saudáveis, sugerindo uma função desregulada destas células na endometriose. Dentre os genes com redução na expressão, destacou-se o CD17729. A depleção desta molécula em modelos tumorais tem sido associada ao aumento de proliferação e progressão tumoral³⁰, enquanto a presença de neutrófilos positivos para CD177 está associada à proteção em modelo de doença inflamatória intestinal³¹. Assim, evidências sugerem que alterações funcionais nos neutrófilos parecem estar associadas ao desenvolvimento da endometriose.

Trabalhos recentes em modelo tumoral têm demonstrado a existência de diferentes perfis de neutrófilos, com diversidade fenotípica e funcional, dentre os quais neutrófilos com características pró-tumorais, denominados N2, em analogia aos macrófagos ativados de maneira alternativa (M2)³². Sabe-se que o microambiente é papel fundamental para esta polarização, sendo observado que a hipóxia tecidual, bem como a ação de hormônios, especialmente o estrógeno, podem favorecer a diferenciação para a população de neutrófilos N2^{33, 34}. Chung et al (2017) demonstraram em modelo de involução mamária que o estrógeno é capaz de reprogramar neutrófilos para um perfil pró-tumoral³⁴. Desta forma, o microambiente observado na endometriose apresenta características que podem estar relacionadas a um favorecimento deste perfil de neutrófilos^{1,35}, e consequentemente ao desenvolvimento da doença.

Tais neutrófilos pró-tumorais são caracterizados pela secreção de citocinas e quimiocinas, como CCL1, CCL2 e IL-8, fatores angiogênicos e proteases responsáveis pela degradação de matriz extracelular (MMPs)^{36, 37}, mediadores que se mostraram importantes para a implantação e desenvolvimento da endometriose. Adicionalmente, este perfil de neutrófilos apresenta menor capacidade fagocítica e citotóxica^{36,37}, o que poderia também colaborar para a implantação do tecido ectópico. Reforçando esta possível polarização, também foi demonstrado que

na endometriose há favorecimento de um perfil de macrófagos M238, fonte de TGF- β , citocina sugerida como potencial indutor deste perfil de neutrófilos³².

Associado ao aumento de neutrófilos, também foi observada a detecção de MPO no modelo avaliado. A mieloperoxidase corresponde a uma enzima envolvida na síntese de espécies reativas de oxigênio pelos neutrófilos, atuando como marcador de ativação de neutrófilos e estresse oxidativo³⁹. Estudo com pacientes portadores de endometriose demonstrou aumento de neutrófilos positivos para MPO no tecido ectópico quando comparado aos grupos controle, principalmente na fase proliferativa do ciclo menstrual²⁹. Utilizando modelo animal e imuno-histoquímica, o mesmo grupo também demonstrou aumento de neutrófilos no fluido peritoneal e de marcação para MPO em neutrófilos presentes no implante endometrial, quando comparados ao tecido uterino doador. A presença de neutrófilos positivos para MPO foi observada com diferenças significativas até sete dias após a indução cirúrgica da endometriose²⁹.

CONCLUSÃO

Desta forma, concluímos que o modelo empregado é de fácil aplicação e boa reprodutibilidade, constituindo um modelo capaz de reproduzir as características morfológicas da endometriose, além de possibilitar a obtenção das amostras para avaliação de alterações funcionais de células do sistema imune, bem como a detecção de mediadores produzidos por estas células, os quais estão relacionados à patogênese da endometriose. Adicionalmente, novos estudos envolvendo avaliações das populações de neutrófilos, citocinas, quimiocinas e fatores angiogênicos poderão contribuir para elucidar a participação dos neutrófilos na implantação e desenvolvimento da endometriose.

AGRADECIMENTOS

Auxílio financeiro: Universidade de Franca (Unifran).

REFERÊNCIAS

- Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet*. 2004;364(9447):1789-99.
- Armour M, Lawson K, Wood A, Smith CA, Abbott J. The cost of illness and economic burden of endometriosis and chronic pelvic pain in Australia: A national online survey. *PLoS One*. 2019;14(10):e0223316.
- Sensky TE, Liu DT. Endometriosis: associations with menorrhagia, infertility and oral contraceptives. *Int J Gynaecol Obstet*. 1980;17(6):573-6.
- Miller JE, Ahn SH, Monsanto SP, Khalaj K, Koti M, Tayade C. Implications of immune dysfunction on endometriosis associated infertility. *Oncotarget*. 2017;8(4):7138-47.
- Podgaec S, Barbeiro DF, Gueuvoghlian-Silva BY, Bellelis P, Abrão MS, Baracat EC. Foxp3 expression in deep rectosigmoid endometriosis lesions and its association with chronic pelvic pain. *J Reprod Immunol*. 2014;104-105:96-9.
- Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol*; 1927. p. 422-69.
- Metzger DA, Haney AF. Etiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 1989;16(1):1-14.
- Ridley JH. The histogenesis of endometriosis: a review of facts and fancies. *Obstet Gynecol Surv*. 1968. p. 1-35.
- Gardner G, RR G, B R. The histogenesis of endometriosis; recent contributions. *Obstet Gynecol*; 1953. p. 615-37.
- Von Recklinghausen F. Adenomyomas and cystadenomas of the wall of the uterus and tube their origin as remnants of the wolffian body. *Wien Klin Wochenschr*; 1896. p. 530.
- Russell WW. Aberrant portions of the müllerian duct found in an ovary: ovarian cysts of müllerian origin. *Bull John Hopkins Hospital*; 1.1899; 10:8-10. p. 8-10.
- Halme J, Hammond MG, Hulka JF, Raj SG, Talbert LM. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstet Gynecol*. 1984;64(2):151-4.
- Ahn SH, Monsanto SP, Miller C, Singh SS, Thomas R, Tayade C. Pathophysiology and Immune Dysfunction in Endometriosis. *Biomed Res Int*. 2015;2015:795976.
- Donnez J, Binda MM, Donnez O, Dolmans MM. Oxidative stress in the pelvic cavity and its role in the pathogenesis of endometriosis. *Fertil Steril*. 2016;106(5):1011-7.
- Harada T, Iwabe T, Terakawa N. Role of cytokines in endometriosis. *Fertil Steril*. 2001;76(1):1-10.
- Bellelis P, Podgaec S, Abrão MS. Environmental factors and endometriosis. *Rev Assoc Med Bras* (1992). 2011;57(4):448-52.
- Kwak JY, Park SW, Kim KH, Na YJ, Lee KS. Modulation of neutrophil apoptosis by plasma and peritoneal fluid from patients with advanced endometriosis. *Hum Reprod*. 2002;17(3):595-600.
- Somigliana E, Viganò P, Gaffuri B, Candiani M, Busacca M, Di Blasio AM, et al. Modulation of NK cell lytic function by endometrial secretory factors: potential role in endometriosis. *Am J Reprod Immunol*. 1996;36(5):295-300.
- Schulke L, Berbic M, Manconi F, Tokushige N, Markham R, Fraser IS. Dendritic cell populations in the eutopic and ectopic endometrium of women with endometriosis. *Hum Reprod*. 2009;24(7):1695-703.
- Antsiferova YS, Sotnikova NY, Posiseeva LV, Shor AL. Changes in the T-helper cytokine profile and in lymphocyte activation at the systemic and local levels in women with endometriosis. *Fertil Steril*. 2005;84(6):1705-11.
- Jones RC. The effect of a luteinizing hormone releasing hormone (LRH) agonist (Wy-40,972), levonorgestrel, danazol and ovariectomy on experimental endometriosis in the rat. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1984;106(2):282-8.
- Shor E, Freitas V, Soares Junior JM, Simões MJ, Baracat EC. Endometriosis: Experimental model in rats.: *Rev. Bras. Ginecol. Obstet*; 1999.
- Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* ; 2013. p. 159-75.
- Jones HR, Robb CT, Perretti M, Rossi AG. The role of neutrophils in inflammation resolution. *Semin Immunol*. 2016;28(2):137-45.
- Kim MH, Liu W, Borjesson DL, Curry FR, Miller LS, Cheung AL, et al. Dynamics of neutrophil infiltration during cutaneous wound healing and infection using fluorescence imaging. *J Invest Dermatol*. 2008;128(7):1812-20.
- Soehnlein O, Steffens S, Hidalgo A, Weber C. Neutrophils as protagonists and targets in chronic inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(4):248-61.
- Lin YJ, Lai MD, Lei HY, Wing LY. Neutrophils and macrophages promote angiogenesis in the early stage of endometriosis in a mouse model. *Endocrinology*. 2006;147(3):1278-86.
- Takamura M, Koga K, Izumi G, Urata Y, Nagai M, Hasegawa A, et al. Neutrophil depletion reduces endometriotic lesion formation in mice. *Am J Reprod Immunol*. 2016;76(3):193-8.
- Symons LK, Miller JE, Tyryshkin K, Monsanto SP, Marks RM, Lingegowda H, et al. Neutrophil recruitment and function in endometriosis patients and a syngeneic murine model. *FASEB J*. 2020;34(1):1558-75.
- Zhou G, Peng K, Song Y, Yang W, Shu W, Yu T, et al. CD177+ neutrophils suppress epithelial cell tumorigenesis in colitis-associated cancer and predict good prognosis in colorectal cancer. *Carcinogenesis*. 2018;39(2):272-82.
- Zhou G, Yu L, Fang L, Yang W, Yu T, Miao Y, et al. CD177. *Gut*. 2018;67(6):1052-63.
- Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L, et al. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell*. 2009;16(3):183-94.
- Triner D, Shah YM. Hypoxic Regulation of Neutrophils in Cancer. *Int J Mol Sci*. 2019;20(17).
- Chung HH, Or YZ, Shrestha S, Loh JT, Lim CL, Ong Z, et al. Estrogen reprograms the activity of neutrophils to foster protumoral microenvironment during mammary involution. *Sci Rep*. 2017;7:46485.
- Wu MH, Hsiao KY, Tsai SJ. Hypoxia: The force of endometriosis. *J Obstet Gynaecol Res*. 2019;45(3):532-41.
- Wang X, Qiu L, Li Z, Wang XY, Yi H. Understanding the Multifaceted Role of Neutrophils in Cancer and Autoimmune Diseases. *Front Immunol*. 2018;9:2456.
- Granot Z, Jablonska J. Distinct Functions of Neutrophil in Cancer and Its Regulation. *Mediators Inflamm*.

2015;2015:701067.

38. Bacci M, Capobianco A, Monno A, Cottone L, Di Puppo F, Camisa B, et al. Macrophages are alternatively activated in patients with endometriosis and required for growth and vascularization of lesions in a mouse model of disease. *Am J Pathol.* 2009;175(2):547-56.
39. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol.* 2005;77(5):598-625.

AUTOR DE CORRESPONDÊNCIA

Andréa Carla Celotto

acarla_c@yahoo.com

Av. Loja Maçonica Revonadora 68, Número 100
Bairro Aeroporto - Barretos - Sp / Cep: 14785-002