

Rodrigo Manuel Carneiro de Sá Malheiro Felgueiras

**AMPK/SIRT1/PGC-1 α /SIRT3 pathway –
independent activation of GPx1 expression by
metformin in the heart of mouse model of
endometriosis**

Ativação da expressão de GPx1 independente da via
AMPK/SIRT1/PGC-1 α /SIRT3 pela ação da metformina em
modelo de murganho de endometriose.

abril, 2021

Rodrigo Manuel Carneiro de Sá Malheiro Felgueiras
AMPK/SIRT1/PGC-1 α /SIRT3 pathway – independent
activation of GPx1 expression by metformin in the heart
of mouse model of endometriosis

Mestrado Integrado em Medicina

Área: Ciências Biológicas

Tipologia: Dissertação

Trabalho efetuado sob a Orientação de:

Delminda Magalhães, PhD

E sob a Coorientação de:

Catarina Neto, MSc

Trabalho organizado de acordo com as normas da revista:

Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics

abril, 2021

Eu, Rodrigo Manuel Carneiro de São Malheiro Felgueiras, abaixo assinado, n.º mecanográfico 201504297, estudante do 6º ano do Ciclo de Estudos Integrado em Medicina, na Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, declaro ter atuado com absoluta integridade na elaboração deste projeto de opção.

Neste sentido, confirmo que **NÃO** incorri em plágio (ato pelo qual um indivíduo, mesmo por omissão, assume a autoria de um determinado trabalho intelectual, ou partes dele). Mais declaro que todas as frases que retirei de trabalhos anteriores pertencentes a outros autores, foram referenciadas, ou redigidas com novas palavras, tendo colocado, neste caso, a citação da fonte bibliográfica.

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 02/04/2021

Assinatura conforme cartão de identificação:

Rodrigo Manuel Felgueiras

NOME

Rodrigo Manuel Carneiro de Sá Malheiro Felgueiras

NÚMERO DE ESTUDANTE

201504297

E-MAIL

rmcsmf@hotmail.com

DESIGNAÇÃO DA ÁREA DO PROJECTO

Ciências Biológicas

TÍTULO DISSERTAÇÃO/~~PROJECTO~~ (riscar o que não interessa)

AMPK/SIRT1/PGC-1 α /SIRT3 pathway - independent activation of GPx1 expression by metformin in the heart of a mouse model of endometriosis

ORIENTADOR

Deluinda R. Gamaelas Neves Lopes de Magalhães

COORDINADOR (se aplicável)

Ava Catarina Sotomaior Neto Pequiceira

ASSINALE APENAS UMA DAS OPÇÕES:

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.	☐
É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TRABALHO (INDICAR, CASO TAL SEJA NECESSÁRIO, Nº MÁXIMO DE PÁGINAS, ILUSTRAÇÕES, GRÁFICOS, ETC.) APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.	☐
DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, (INDICAR, CASO TAL SEJA NECESSÁRIO, Nº MÁXIMO DE PÁGINAS, ILUSTRAÇÕES, GRÁFICOS, ETC.) NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TRABALHO.	☒

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 02/04/2021

Assinatura conforme cartão de identificação:

RLC11L

Aos meus pais, que me deram certamente a mais e provavelmente exigiram de mim a menos durante 23 anos.

À Mafalda, por me apoiar sempre que tive de gastar parte do verão metido no laboratório e quando já não conseguia ver experiências à frente. Por todos os momentos, aniversários, celebrações e complicações que passámos e pelos que ainda vamos passar juntos.

Ao Solinca de Matosas, Depuralina e Drunk Souls por encherem estes 6 anos de faculdade com memórias e acontecimentos inesquecíveis, e fazerem a vida académica valer uma vida, curar uma depressão e estimular a desidrogenase alcoólica.

Ao Zé Pedro, por ter sido a minha introdução a esta casa, meu professor, colega, amigo, apoio técnico especializado e despejo de queixas aleatórias das mil e uma vezes que algo correu bem ou mal.

A todos os outros amigos e familiares que durante estes anos me ajudaram a enfrentar e lidar o que a faculdade trouxe.

Um agradecimento especial à Professora Delminda e a todo o pessoal do Departamento de Biologia Experimental que me acompanhou e ajudou durante estes 3 anos de trabalho em que o laboratório foi a minha residência estudantil improvisada.

“But nonetheless, you must forge on. To bring an end to your journey...and mine.”

Shanalotte, Emerald Herald

Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics

AMPK/SIRT1/PGC-1 α /SIRT3 pathway – independent activation of GPx1 expression by metformin in the heart of a mouse model of endometriosis.

Journal:	<i>Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Manuscripts
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Felgueiras, Rodrigo; University of Porto Faculty of Medicine, Department of Biomedicine; University of Porto Neto, Ana; University of Porto Faculty of Medicine; University of Porto Rodrigues, Adriana; University of Porto Faculty of Medicine; University of Porto Gouveia, Alexandra; University of Porto Faculty of Medicine; University of Porto; University of Porto Faculty of Nutrition and Food Sciences Almeida, Henrique; University of Porto Faculty of Medicine; University of Porto Neves, Delminda; University of Porto Faculty of Medicine, Department of Biomedicine;
Keyword:	AMPK, cardiovascular disease, endometriosis, glutathione peroxidase 1, metformin

SCHOLARONE™
Manuscripts

AMPK/SIRT1/PGC-1 α /SIRT3 pathway – independent activation of GPx1 expression by metformin in the heart of a mouse model of endometriosis

Authors:

Felgueiras R^{1,2}; E-mail: rmcsmf@hotmail.com

Neto AC^{1,2}, MSc; E-mail: caty.neto@gmail.com

Rodrigues AR^{1,2}, PhD; E-mail: adrod@med.up.pt

Gouveia AM^{1,2,3}, PhD; E-mail: agouveia@med.up.pt

Almeida H^{1,2}, MD PhD; E-mail: almeidah@med.up.pt

Neves D^{1,2}, PhD; E-mail: delmagal@med.up.pt

Author affiliations:

¹ – Department of Biomedicine - Experimental Biology Unit, Faculty of Medicine of the University of Porto

Alameda Prof. Hernâni Monteiro

4200-319 Porto, Portugal

² – Instituto de Investigação e Inovação em Saúde (i3S)

Rua Alfredo Allen, 208

4200-135 Porto, Portugal

³ – Faculty of Nutrition and Food Sciences

Rua do Campo Alegre, 823

University of Porto, 4150-180 Porto

This study was conducted in the Department of Biomedicine, Experimental Biology Unit of the Faculty of Medicine of the University of Porto.

Corresponding author:

Delminda Neves

Phone number: +351220426747

E-mail address: delmagal@med.up.pt

Address: Department of Biomedicine - Experimental Biology Unit, Faculty of Medicine of the
University of Porto. Alameda Prof. Hernâni Monteiro, 4200-319 Porto, Portugal

For Peer Review

Abstract

Endometriosis is a gynecological disease associated with an imbalance between oxidative species production and anti-oxidative defenses. In women, a correlation has been reported between endometriosis and incidence of cardiovascular events. As such, this study aimed to analyze the oxidation-responsive AMPK/SIRT1/PGC-1 α /SIRT3 pathway in the heart of a mouse model of endometriosis. The effect of metformin, an insulin-sensitizing and anti-oxidative drug with already shown positive results in endometriotic tissue was also studied. Thirty-six female B6CBA/F1 mice were divided into 4 groups (Control-C, Surgery-induced Endometriosis and Metformin-EM (50 mg/Kg/day orally administrated for 3 months), Endometriosis-E and Metformin-M). Immunofluorescent labelling of SIRT1 and SIRT3 was performed in heart tissue. Assessment of expression of AMPK α , SIRT1, PGC-1 α , SIRT3, SOD2, and GPx1 was carried out by Western Blotting. The quantification of microRNA(miR)-34a, miR-195, miR-217, miR-155 and miR-421, involved in the regulation of expression of SIRT1 and SIRT3, was performed by Real-Time PCR. Data showed an increase in phospho-AMPK α and in GPx1 expression in the EM group when compared to the C group, but not in the total AMPK, SIRT1, PGC-1 α , SIRT3 and SOD2, suggesting a GPx1 expression increase independently of the AMPK/SIRT1/PGC-1 α /SIRT3 pathway. MicroRNAs, excepting miR-217, showed a consistent trend of increase in the M group. Collectively, our study showed that endometriosis does not significantly affect the expression of the components of the AMPK/SIRT1/PGC-1 α /SIRT3 pathway in the heart. However, it indicates that an oxidative condition underlying endometriosis is required for metformin to evidence a beneficial antioxidant effect by increasing the expression of the anti-oxidative enzyme GPx1.

Keywords: AMPK, cardiovascular disease, endometriosis, glutathione peroxidase 1, metformin

Introduction

Endometriosis is a benign gynecological disease characterized by the presence and growth of endometrial tissue outside of its normal uterine location, that affects around 10% of women in reproductive age.¹ The ectopic endometrial tissue is mainly located within the pelvic cavity, but

frequently it is found in abdominal or thoracic cavities. This condition is associated with gynecological symptoms, including pelvic pain, infertility and, in advanced stages, distortion of the anatomy of the reproductive organs.^{1,2} Besides gynecological disturbances, studies have shown a correlation between endometriosis and incidence of cardiovascular diseases, supporting the view that endometriosis is a systemic disease with metabolic involvement.^{3,4}

Although the mechanisms of pathogenesis of endometriosis are far from being elucidated, a role for oxidative stress, defined as the imbalance between the oxidative species production and the anti-oxidative defenses, in the onset and progression of the disease has been proposed.⁵ In fact, peritoneal fluid and tissue samples from women with endometriosis show lower concentrations and/or activity of antioxidant enzymes.^{6,7} This evidence aligns with previous studies performed in endometriotic tissue detailing deleterious profiles of reactive oxygen species (ROS) production and/or antioxidant enzyme expression.⁷⁻⁹

The currently recommended medication for endometriosis, including analgesics and hormone-based medication, is frequently inefficient in the long-term. The latter class of drugs inhibits estrogen secretion and when interrupted leads to a high recurrence rate.¹⁰ In an attempt to identify an alternative therapeutic strategy for endometriosis, aiming at the regulation of the oxidative stress and with high potential to be used in patients, we tested the *N,N*-dimethylbiguanide-metformin in a mice model of disease. Metformin is a widely used drug for the treatment of diabetes mellitus¹¹ that primarily acts in the hepatocytes by suppressing mitochondrial respiration, increasing fat oxidation, mitigating inflammation and oxidation, increasing insulin sensitivity and lowering glycemia.¹² These changes have been demonstrated to culminate in the activation of 5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), an important cellular nutrient sensor that is activated in fasting conditions¹² and in response to ROS increase.¹³ Activity of AMPK decreases the nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) to NADH conversion rate,¹⁴ which increases NAD⁺ levels within cells and increments the activity of Sirtuin (SIRT)1, a member of the mammalian NAD⁺-dependent deacetylases family of sirtuins. AMPK and SIRT1 act together in the activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 α), the former through phosphorylation and the later through

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

deacetylation.^{15,16} PGC-1 α is a transcription factor that plays important roles in adaptive thermogenesis, gluconeogenesis, mitochondrial biogenesis and respiration through activation of multiple targets, including SIRT3, an additional member of the family of sirtuins.¹⁷ SIRT3 is directly involved in the activation of mitochondrial biogenesis/function genes, as demonstrated by their downregulation after SIRT3 silencing.¹⁸ Moreover, SIRT3 activates Foxo3a, a transcription factor that promotes protection against ROS through increase in Mn-dependent superoxide dismutase 2 (SOD2) expression.¹⁹ Beyond direct control of SOD2 expression, SIRT3 also seems to regulate its activity.²⁰ SOD2 catalyzes the conversion of superoxide radicals into hydrogen peroxide^{21,22} and is considered an anti-oxidative defense that contributes to mitigation of oxidative damage and reduction in mitochondrial function. The hydrogen peroxide generated by SOD2 activity is then converted to water by the action of other enzymes, such as Glutathione Peroxidase 1 (GPx1).²³ In response to oxidative stress, GPx1 expression increased concurrently with PGC-1 α ²⁴ through a mechanism mediated by nuclear factor erythroid 2-related (NRF2).²⁵ Furthermore, the regulation of the expression of the proteins of the AMPK/SIRT1/PGC1- α /SIRT3 pathway depends on microRNA(miR)s, small RNAs that inactivate target mRNAs after pairing with their untranslated regions. Among those, miR-34a inhibits the expression of SIRT1 and promotes apoptosis in tumor cells via a SIRT1-dependent p53 pathway, showing a tumor suppression role.²⁶ Suppression of miR-34a intervenes in antioxidant cellular mechanisms through increase of expression of various antioxidant enzymes.²⁷ MiR-195 also targets SIRT1 and suppresses its expression, which increases ROS and apoptosis in cardiomyocytes.²⁸ Another miR with an inhibitory effect on SIRT1's expression is miR-217, determined to be an inducer of senescence in human endothelial cells.²⁹ SIRT3 was identified as a direct target of miR-421 that leads to suppression of its expression, with ensuing increment in ROS in liver cells, by decreasing levels of SOD2 and catalase.³⁰ Additionally, an increase in SIRT3 was demonstrated in parallel with a suppression of miR-155, a potential oncogene that have a major role in inflammatory responses in many tissues.³¹

Supporting the beneficial effect of metformin in endometriosis, regression of endometriotic implants and local increment in SOD expression has been demonstrated in a rat model treated with 50 mg/kg/day

for 28 days.³² This points to an important role of oxidative stress in the development of endometriosis and its comorbidities and to the importance of its mitigation in the control of the disease. Despite little being known about its impact in the heart, we hypothesize that endometriosis associated oxidative stress promotes the development of cardiovascular disease, as demonstrated in the setting of ageing or diabetes. In addition, we are convinced that metformin, owing to its anti-oxidative properties, mitigates the endometriosis-associated cardiovascular disturbances.

In the present study, we address the role of metformin in the AMPK/SIRT1/PGC-1 α /SIRT3 oxidative stress-responsive pathway in the heart of a mice model of endometriosis. As well, we aimed to identify the miRNAs involved in the regulation of this pathway.

Methods

Mouse model and endometriosis induction

All animal procedures were undertaken according to the European Community Guidelines (86/609/EEC) and the Portuguese Act (129/92) for the use of experimental animals and were approved by the i3S Animal Ethics Committee and the Portuguese Competent Authority (DGAV–Direcção-Geral de Alimentação e Veterinária). All investigations in this study adhere to the ARRIVE 2.0 guidelines.

Female B6CBA/F1 mice, the first-generation progeny of a cross between male C57BL/6J and female CBA/CaCrI (Charles River Laboratories, Les Oncins, France) resistant to the after-effects of surgical procedures,^{33,34} were bred and housed at the i3S Animal Facility under pathogen-free conditions. All animal handling was performed by in-house personnel under veterinarian supervision and the research team was blinded, receiving only relevant experimental data and biologic materials. During experiments, animals were maintained under a 12-h light/dark cycle in a temperature- and humidity-regulated room ($22 \pm 2^\circ\text{C}$, $55 \pm 5\%$, respectively) with free access to water and standard rodent chow. A total of 36 mice were randomly divided into 4 groups: Control (C; n=6), Endometriosis with Metformin (EM; n=9), Endometriosis (E; n=14) and Metformin (M; n=7). This ensured a minimum of 4-6 mice/group for quantification procedures, a number obtained after application of a simplified formula for sample

size calculation in animal studies.³⁵ Endometriosis was surgically induced³⁶ in animals of groups E and EM at 6-8 weeks of age, by heterologous transplantation of endometrium from one donor onto the peritoneum of receptors from the same strain, according to a previously described protocol³⁷. The endometriosis-like phenotype was confirmed by ultrasound visualization of the implants. Animals from groups C and M were subject to a sham operation. Metformin (Alfa Aesar Chemicals, Massachusetts, USA) was administered orally in drinking water, in a dosage of 50mg/kg/day for 3 months to mice from groups M and EM. After this time, animals were euthanized, and the hearts were collected and divided in two equivalent halves. One half of each heart was immediately placed into liquid nitrogen and then stored at -80°C for molecular analysis. The other half was fixed with 4%-buffered formaldehyde, dehydrated, and embedded in paraffin to use in microscopy studies.

Immunofluorescence

Five µm sections were cut into with a microtome from two formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) blocks of each group and adhered onto glass slides. Deparaffinization was conducted by warming the slides for 30 min within a stove at 36°C, followed by a 10 min 100% xylene incubation. Afterwards, sequential 5 min incubations in 100%, 90% and 70% ethanol v/v aqueous solutions, were carried out, with a final submersion in water. This was followed by an incubation in a 1% w/v Sudan Black solution in 70% ethanol v/v aqueous solution for 20 min, to attenuate autofluorescence previously noted in heart sections observations. The slides were then incubated for 10 min twice in a phosphate-buffered saline (PBS) and twice in PBS supplemented with 0,02% Tween 20 (PBST). The slides were incubated for 30 min in a 1M HCl solution for antigen retrieval, followed by acid neutralization in a 2% (w/v) sodium tetraborate solution, and washes for 5 min in water and 10 min twice in PBS. Sections were then blocked with a 5% w/v bovine serum albumin (Nzytech, Lisboa, Portugal) solution in PBS for 1 h, followed by an overnight incubation in a humidity chamber at 4°C with the primary antibodies diluted in the same blocking solution: rabbit anti-SIRT1 (ProteinTech, Rosemont, Illinois, USA) 1/100 v/v or rabbit anti-SIRT3 1/300 v/v (Cell Signaling Technology, Devers, MA, USA) diluted with a marker of smooth muscle cells, mouse anti-α-actin 1/300 v/v (Millipore, Billerica, MA, USA). Negative controls were prepared with primary antibodies omission. After the incubation, the slides were washed twice in PBS

for 5 min and twice in PBS containing 1% v/v Triton X-100 (PBSTx) for 5 min. Then, sections were incubated with the appropriated secondary antibodies (anti-mouse conjugated with Alexa Fluor®A568 (Molecular Probes, Leiden, Netherlands) - red and anti-rabbit conjugated with Alexa Fluor®A488 (Molecular Probes) – green) diluted in PBSTx for 1 h at room temperature. The slides were washed twice for 5 min with PBSTx solution, followed by two washes 5 min each in PBS. Finally, nuclei were stained blue with a 1% w/v 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) solution (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) for 5 min, followed by a rapid PBS wash. The slides were then mounted with cover slips using a 50% v/v glycerol-PBS solution and analyzed under an ApoTome fluorescence microscope (Imager Z1, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany). Images were captured utilizing the AxioVision Software (Carl Zeiss AG).

Western Blotting

Heart fragments from all animals, preserved at -80°C, were homogenized in lysis buffer solution (0.25% v/v Triton X-100, 50mM Tris, 10 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM β -glycerophosphate, pH 7.6), supplemented with phosphatase and protease inhibitors (phosphatase inhibitor cocktail 2, ref. P5726, 0.4% v/v; phosphatase inhibitor cocktail 3, ref. P0044, 0.4% v/v; protease inhibitor cocktail, ref. P8340-5ML, 0.5% v/v, Sigma-Aldrich) with magnetic BulkBeads (Precellys, Montigny-le-Bretonneux, France) using the MagNA Lyser Instrument (Roche, Mannheim, Germany). Homogenization followed a protocol 2x30 s cycles at 6500 rpm. Then, each sample was ultrasonicated for 15 min and centrifuged at 15000g for 5 min. All the procedures were carried out at 4°C. After the centrifugation, the supernatant of each sample was collected into a new tube and preserved at -20°C. The concentration of protein in each sample was quantified using the Bradford Reagent colorimetric assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Twenty-five μ g of total protein per sample were diluted in gel loading buffer (50mM Tris pH 8.8, 2mM EDTA, 10% v/v glycerol, 2% w/v sodium dodecyl sulphate (SDS), 0.0125% w/v bromophenol blue) containing 10% v/v dithiothreitol and denatured through gentle shaking for 15 min at 65°C, followed by 10 min at 95°C, and centrifugation at 12000g for 5 min at room temperature. Proteins were then separated in a 12% acrylamide resolving gel within a protein electrophoresis system applying a constant current of 20mA/gel until all protein was stacked, followed by a constant current

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

of 25mA/gel (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) and transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad) in a blotting system (Bio-Rad) at a constant voltage of 30V for 2 h. After protein transfer, nitrocellulose membranes were stained with Ponceau S solution and images were acquired in a ChemiDoc XRS+system (Bio-Rad), using ImageLab software, for loading control on the semi-quantification of proteins. Membranes were blocked with a 5% w/v nonfat dry milk (Molico®) solution diluted in Tris-buffered saline supplemented with 0.1% v/v tween 20 (TBSt) for 1 h, with gentle shaking at room temperature. Primary antibodies were diluted in a 5% w/v BSA solution in TBSt containing 1% w/v sodium azide (full list of antibodies on Table A). Each membrane was incubated with the primary antibodies for a minimum of 2 overnights, at 4°C. Following this incubation, membranes were thoroughly washed for three times 10 min with TBSt and incubated for 1 h at room temperature with appropriated secondary antibodies (Table A), diluted in a 5% w/v nonfat dry milk in TBSt. Membranes were then washed with TBSt three times 15 min. Semi-quantification of pAMPK α was carried out relatively to total AMPK α , which implies that membranes allocated for the analysis of the former were reutilized for AMPK α analysis by undergoing an antibody stripping protocol, consisting of a thorough TBSt wash, followed by a 30 min incubation in a 10% w/v SDS solution and further TBSt wash. Afterwards, membranes were again blocked with nonfat dry milk and incubated with the anti-total AMPK α antibody and respective secondary antibody according to previous description.

For detection of protein bands in the immunoblots, the Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad) was used following the manufacturer instructions. Labelled protein band images were acquired using the ChemiDoc XRS+system (Bio-Rad) and the ImageLab software (Bio-Rad).

Semi-quantification of each protein band in the different experimental groups was obtained utilizing the respective Ponceau S lane staining value as a loading control. Afterwards, differences in exposure times that could exist between membranes were corrected by using the average value of samples from control group present in each membrane as a control reference for all the samples at that membrane. Each experiment was repeated 3 times and the repeated values for the same sample were averaged into a single value.

Real Time - Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

FFPE blocks from 5 animals per group were used to extract and analyze heart miRNAs expression. Five 15 µm sections were cut from FFPE blocks using a fresh microtome blade for each sample and placed in RNase-free tubes. Excess paraffin was trimmed, and samples were deparaffinized in 100% xylene, washed with 100% ethanol, and incubated with protease for 2 h at 50°C, followed by 15 min at 75°C to allow sample mixtures to clarify. RNA extraction was conducted utilizing the RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit (Thermo Fischer Scientific), according to manufacturer instructions. 7 µL of total RNA from each sample were used to generate cDNA using the MysticCq microRNA cDNA synthesis Mix (Sigma-Aldrich Co.).³⁸ According to the manufacturer's instructions, RT-PCR was conducted by adding 1 µL of cDNA, to 6 µL of PowerUp SYBR® Green Master Mix (Thermo Fischer Scientific), 0.25 µL of Universal Primer and 1.2 µL of miRNA-specific primer (miScript Primer Assay, Qiagen, Hilden, Germany; Table B contains all primer references). Primers for RNU1a, miR-34a and miR-421 were previously identified identical between human and mouse. RT-PCR was conducted using the StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using 96-thin-well PCR plates. The procedure consisted of a 10 min initial denaturation at 95°C, followed by 45 cycles of 15 s denaturation at 95°C, 30 s annealing at 55°C and 30 s extension at 60°C. Two control reactions were conducted for each PCR, one excluding Reverse Transcriptase and another excluding poly(A) polymerase. Amplification data were then analyzed using StepOne Software (Applied Biosystems). Each PCR was normalized with an internal control, RNU1a, using the RNU1a primer assay (Qiagen) and employing the formula $2^{-(CT_{target\ miRNA} - CT_{RNU1a})}$.

Statistical Analysis

The protein expression values for each animal were organized into the respective experimental groups (n between 5 and 13 per group) and analyzed with GraphPad Prism 6 Software, version 6.01 (GraphPad Software, Inc.). Statistical analysis of protein expression was conducted using a one-way Analysis of

Variance (ANOVA) test, followed by a multiple comparisons test utilizing Bonferroni's Correction. Results are presented as mean $\pm$ SEM, with p value $<.05$ considered statistically significant.

Results

Dual immunolabeling of SIRT1 and SIRT3 in the heart

The results of Immunofluorescence labelling of SIRT1, SIRT3 and α -actin in the heart tissue are visible in Figure 1. SIRT1 (green) was detected in all groups (Figure 1a), apparently more intense in endothelial cells (arrow) in groups E and EM, although some mild dispersed fluorescence is visible within the myocardium. The marker of smooth muscle cells, α -actin (red), was observed in the vascular muscle layer. Co-localization of both proteins (yellow) was detected, particularly in the EM group. Despite this, overall differences in IF labelling among experimental groups were mild. Regarding SIRT3, expression was evident in all experimental groups (Figure 1b). Labelling was restricted to endothelial cells (green) without co-localization with α -actin (red) that was observed exclusively in cardiac blood vessels.

Western Blotting semi-quantification of pAMPK α , AMPK α , SIRT1, SIRT3, PGC-1 α , SOD2 and GPx1

To understand whether endometriosis and/or metformin have an impact on the AMPK/SIRT1/PGC1- α /SIRT3 oxidative stress-responsive pathway in the heart, we conducted a semi-quantification of the protein expression levels through western blotting. Bands of expected molecular weight were identified for each protein: AMPK α -62kDa, SIRT1-140kDa, SIRT3-28kDa, PGC-1 α -105kDa, SOD2-25kDa, GPx1-22kDa, representative bands and Ponceau S staining of proteins for the experimental groups were depicted in Figure 2a. Graphical representation of the quantitative variation in expression of each protein among experimental groups is displayed in Figure 2(b-h), where data are presented as fold change relative to control group (1 arbitrary unit).

1
2
3 A 2.5-fold increase in the expression of pAMPK α in the Endometriosis/Metformin (EM) group,
4 comparatively with Control (C), (One-Way ANOVA $p = 0.0292$, Bonferroni comparison between C
5 and EM $p = 0.021$) was observed (Figure 2b). An increasing tendency that did not reach statistical
6 significance was observed in EM relatively to E and M groups. Expression levels of total AMPK α did
7 not show statistically significant differences among groups (Figure 2c), despite an equivalent trend to
8 the variation observed for the phosphorylated form of the enzyme.

9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
SIRT1 expression levels showed no difference among the study groups (Figure 2d), though a slight
increasing trend in E and EM groups congruent with immunofluorescence results is present. Regarding
SIRT3 (Figure 2e), PGC-1 α (Figure 2f) and SOD2 (Figure 2g), no statistical differences between the
groups were observed.

GPx1 expression was significantly higher in EM group compared to Control (C) (2.5-fold increase,
One-Way ANOVA $p = 0.0292$, Bonferroni comparison between C and EM $p = 0.021$) (Figure 2h).
Despite the absence of statistical significance, an equivalent variation trend among groups, relatively to
that observed for pAMPK1 α (Figure 2b) and AMPK1 α (Figure 2c) was observed for GPx1 α .

Quantification of expression of miR-34a, miR-195, miR-217, miR-155 and miR421 by Real-Time PCR

RT-PCR results for quantification of the miR-34a, miR-195, miR-217, miR-155 and miR421 are visible
in Figure 3. None of these miRNAs showed statistically significant differences in expression between
any groups. MiR-34a (Figure 3a), miR-195 (Figure 3b), miR-155 (Figure 3d) and miR-421 (Figure 3e),
all displayed a consistent trend of increase in the M group, while miR-217 (Figure 3c) displayed an
opposite trend, with the C group having the highest levels and the EM and M groups the lowest levels.

Discussion:

Endometriosis is associated with an increase in oxidative stress, an imbalance between the ROS production and the expression and/or activity of antioxidant enzymes, but the exact contribution and underlying mechanism has not yet been elucidated.^{6,39,40} As a chronic condition, frequently resistant to therapeutic strategies, its oxidative properties enhance the risk for women to develop cardiovascular disorders. For over a decade, metformin has been known to have a positive effect on heart diseases, with studies demonstrating an improvement of cardiovascular endpoints and overall mortality in patients undergoing treatment with this biguanide.^{41,42} The positive effect of metformin has been attributed, as least partially, to its intervention on the intracellular ROS balance and in the anti-oxidative response¹² but, to the best of our knowledge, the effect of metformin in the prevention or mitigation of endometriosis-related cardiovascular diseases remains to be investigated. Therefore, in this study, we assessed the effect of the disease and concurrently of the metformin treatment in the expression of the elements of the AMPK/SIRT1/PGC1- α /SIRT3 oxidative stress-responsive pathway in the heart of mice with surgically induced endometriosis.

We found a significant increase in pAMPK levels in the cardiac tissue of mice with endometriosis treated with metformin comparatively with controls. This finding corroborates previous demonstrations that metformin activates AMPK by phosphorylation.⁴³ However, such increase was not evident in healthy metformin-treated group, as well as, in endometriotic untreated animals. For total AMPK similar findings were observed, considering that no variation of the expression among groups reached statistical difference. However, parallel tendencies were visible in both AMPK and pAMPK expressions among the experimental groups, with an increase in groups E and M relatively to C, strengthened in EM group. The absence of increment in pAMPK in M group was an unexpected finding, considering that prior studies have determined a therapeutic potential for metformin regarding endometriosis through its action on AMPK, confirmed by nullifying its effects upon AMPK silencing in cultured endometriotic stromal cells.⁴⁴ Additionally, in this same study a suppression of CYP19A1 expression in endometriotic cells was observed, through metformin-induced AMPK activation.⁴⁴ However, comparatively with the control group, metformin had a differential effect in the phosphorylation of

1
2
3 AMPK in mice with endometriosis suggesting that metformin is more efficient in the activation of heart
4
5 anti-oxidative defenses of endometriosis individuals.
6
7

8 Others have demonstrated that the increment in AMPK activation increases activity of SIRT1 through
9
10 NAD⁺ augment and phosphorylation of PGC-1 α .^{15,16} Our results showed no difference in either of these
11
12 proteins in any experimental group. Additional studies concerning the evaluation of the activity of
13
14 SIRT1 and the deacetylation and phosphorylation status of PGC-1 α will be necessary to clarify if the
15
16 increase in pAMPK in EM group causes an increment in PGC-1 α activation. According to previous
17
18 evidence, the activation of PGC-1 α should result in an increment of SIRT3 expression and of SOD2,¹⁷
19
20 but the assessment of their expression levels demonstrated that neither SIRT3 nor SOD2 were increased
21
22 in mice with endometriosis treated with metformin. Taken together, these findings suggest that SOD2
23
24 activation is not a primary antioxidative defense in the heart neither in endometriosis nor by metformin
25
26 treatment. Consistent with this hypothesis is the absence of differences among groups in the expression
27
28 of miR-34a and miR-195 that target SIRT1 mRNA and result in decreased expression of antioxidant
29
30 enzymes.²⁶⁻²⁸ As well, miR-155 and miR-421 that act together in the regulation of expression of
31
32 SIRT3^{30,31} failed to reveal differences in expression among experimental groups. Interestingly, these
33
34 four miRs share a trend of increase in the M group, comparatively with other groups. The expression
35
36 of miR-217, however, shows different results, with all groups showing a trend of decrease in miR-217
37
38 levels when compared with C group. This trend was more evident in groups treated with metformin.
39
40 This finding only partially matches protein analysis results of SIRT1 expression, raising questions on
41
42 possible interactions with additional miRs.
43
44

45
46 GPx1 presented a significant increase in the group of mice with endometriosis treated with metformin
47
48 (EM) when compared to controls. No results of previous reports are conflicting. In fact, in a prior study
49
50 in mice treated with resveratrol, it was demonstrated the regression of endometriotic implants
51
52 concomitantly with increase in serum and endometriotic tissue levels of GPx1,⁴⁵ with a putative
53
54 involvement of AMPK and SIRT1 in this response; in contrast, another study reported a lower level of
55
56 antioxidant enzymes in patients with endometriosis, when compared with healthy counterparts.⁴⁶ Our
57
58 findings, in the heart of endometriosis mice displayed an increase in GPx1 that not reached significance
59
60

comparatively with controls, which is likely to reflect tissue specificity. Indeed, metformin use was shown to increase GPx1 in non-cardiac cells.⁴⁷

The increment in GPx1 in EM group relatively to controls parallels the effects in SOD2 and aligns with the differences found in the phosphorylation of AMPK, indicating that metformin is more efficient in the activation of anti-oxidative defenses in the heart of endometriosis individuals than in healthy counterparts. Several of the molecular mechanisms activated by metformin are AMPK-independent⁴⁸ and further analysis of other molecular pathways will be necessary to fully clarify its effects on the heart of mice with endometriosis.

Our data present some limitations, particularly in what concerns the translation to patients with endometriosis. The surgery-induced rodent model of endometriosis is a valuable tool to test the effect of medication and to identify the systemic impact of endometriosis in mice and the repercussion in other organs, but rodents do not spontaneously develop this disease. Another important difference is the fact that the endometrium of mice does not exhibit menstruation, a cyclical shedding in the absence of a pregnancy, that is appointed as a probable cause of endometriosis in women when occurs retrogradely.⁴⁹

Conclusion:

This study investigated for the first time the expression of the elements of the AMPK/SIRT1/PGC1- α /SIRT3 pathway in the heart of an endometriosis-induced mice model treated with metformin. Although the impact is not clear-cut, in this model, the heart responds to metformin by upregulating antioxidant enzymes, as GPx1, and pAMPK. The finding raises the possibility that metformin could exert benefits on the control of cardiovascular diseases in women with this gynecological condition. However, further studies clarifying not only the oxidative stress-related damage in the heart, but also the effects of metformin in the mitigation of the damage are required in order to understand the potential therapeutic value of metformin in patients with endometriosis.

Acknowledgments:

We thank Dr. José Pedro Barbosa from Department of Community Medicine, Information and Decision in Health, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, for his aid and overview of our methodology regarding statistical analysis.

Study Data Availability:

The authors declare they are in possession of all data utilized to achieve the results of this study. Any study data related requests are to be directed to the authors for data access.

Conflicts of Interest:

The authors declare no conflicts of interest regarding the publication of this paper.

References

1. Hickey M, Ballard K, Farquhar C. Endometriosis. *BMJ : British Medical Journal*. 2014;348:g1752. doi:10.1136/bmj.g1752
2. Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *The Lancet*. 2004;364(9447):1789-1799. doi:10.1016/S0140-6736(04)17403-5
3. Kvaskoff M, Mu F, Terry KL, et al. Endometriosis: a high-risk population for major chronic diseases? *Hum Reprod Update*. 2015;21(4):500-16. doi:10.1093/humupd/dmv013
4. Mu F, Rich-Edwards J, Rimm EB, Spiegelman D, Missmer SA. Endometriosis and Risk of Coronary Heart Disease. *Circulation: Cardiovascular Quality and Outcomes*. 2016;9(3):257-264. doi:10.1161/CIRCOUTCOMES.115.002224
5. Sourial S, Tempest N, Hapangama DK. Theories on the pathogenesis of endometriosis. *Int J Reprod Med*. 2014;2014:179515. doi:10.1155/2014/179515
6. Szczepanska M, Kozlik J, Skrzypczak J, Mikolajczyk M. Oxidative stress may be a piece in the endometriosis puzzle. *Fertil Steril*. 2003;79(6):1288-93. doi:10.1016/s0015-0282(03)00266-8
7. Oner-Iyidogan Y, Kocak H, Gurdol F, Korkmaz D, Buyru F. Indices of oxidative stress in eutopic and ectopic endometria of women with endometriosis. *Gynecol Obstet Invest*. 2004;57(4):214-7. doi:10.1159/000076691
8. Ota H, Igarashi S, Hatazawa J, Tanaka T. Immunohistochemical assessment of superoxide dismutase expression in the endometrium in endometriosis and adenomyosis. *Fertil Steril*. 1999;72(1):129-34. doi:10.1016/s0015-0282(99)00152-1

9. Ngô C, Chéreau C, Nicco C, Weill B, Chapron C, Batteux F. Reactive oxygen species controls endometriosis progression. *Am J Pathol*. Jul 2009;175(1):225-34. doi:10.2353/ajpath.2009.080804

10. Falcone T, Flyckt R. Clinical Management of Endometriosis. *Obstet Gynecol*. 2018;131(3):557-571. doi:10.1097/aog.0000000000002469

11. Cosentino F, Grant PJ, Aboyans V, et al. 2019 ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD: The Task Force for diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *European Heart Journal*. 2019;41(2):255-323. doi:10.1093/eurheartj/ehz486

12. Rena G, Hardie DG, Pearson ER. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia*. 2017;60(9):1577-1585. doi:10.1007/s00125-017-4342-z

13. Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13(4):251-262. doi:10.1038/nrm3311

14. Han X, Tai H, Wang X, et al. AMPK activation protects cells from oxidative stress-induced senescence via autophagic flux restoration and intracellular NAD⁺ elevation. *Aging Cell*. 2016;15(3):416-427. doi:<https://doi.org/10.1111/ace1.12446>

15. Cantó C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, et al. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature*. 2009;458(7241):1056-1060. doi:10.1038/nature07813

16. Zong H, Ren JM, Young LH, et al. AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99(25):15983-15987. doi:10.1073/pnas.252625999

17. Kong X, Wang R, Xue Y, et al. Sirtuin 3, a new target of PGC-1 α , plays an important role in the suppression of ROS and mitochondrial biogenesis. *PLoS One*. 2010;5(7):e11707. doi:10.1371/journal.pone.0011707

18. Torrens-Mas M, Hernández-López R, Pons D-G, Roca P, Oliver J, Sastre-Serra J. Sirtuin 3 silencing impairs mitochondrial biogenesis and metabolism in colon cancer cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2019;317(2):C398-C404. doi:10.1152/ajpcell.00112.2019

19. Sundaresan NR, Gupta M, Kim G, Rajamohan SB, Isbatan A, Gupta MP. Sirt3 blocks the cardiac hypertrophic response by augmenting Foxo3a-dependent antioxidant defense mechanisms in mice. *J Clin Invest*. 2009;119(9):2758-71. doi:10.1172/jci39162

20. Tao R, Coleman MC, Pennington JD, et al. Sirt3-mediated deacetylation of evolutionarily conserved lysine 122 regulates MnSOD activity in response to stress. *Mol Cell*. 2010;40(6):893-904. doi:10.1016/j.molcel.2010.12.013

21. Van Remmen H, Salvador C, Yang H, Huang TT, Epstein CJ, Richardson A. Characterization of the Antioxidant Status of the Heterozygous Manganese Superoxide Dismutase Knockout Mouse. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1999;363(1):91-97. doi:<https://doi.org/10.1006/abbi.1998.1060>

22. Remmen HV, Williams MD, Guo Z, et al. Knockout mice heterozygous for Sod2 show alterations in cardiac mitochondrial function and apoptosis. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2001;281(3):H1422-H1432. doi:10.1152/ajpheart.2001.281.3.H1422

23. Lubos E, Loscalzo J, Handy DE. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(7):1957-1997. doi:10.1089/ars.2010.3586

24. St-Pierre J, Drori S, Uldry M, et al. Suppression of Reactive Oxygen Species and Neurodegeneration by the PGC-1 Transcriptional Coactivators. *Cell*. 2006;127(2):397-408. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.024>

25. Hernandez-Montes E, Pollard SE, Vauzour D, et al. Activation of glutathione peroxidase via Nrf1 mediates genistein's protection against oxidative endothelial cell injury. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2006;346(3):851-859. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.05.197>

26. Yamakuchi M, Ferlito M, Lowenstein CJ. miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(36):13421-13426. doi:10.1073/pnas.0801613105

27. Zhang H, Zhao Z, Pang X, et al. MiR-34a/sirtuin-1/foxo3a is involved in genistein protecting against ox-LDL-induced oxidative damage in HUVECs. *Toxicol Lett*. 2017;277:115-122. doi:10.1016/j.toxlet.2017.07.216

28. Zhu H, Yang Y, Wang Y, Li J, Schiller PW, Peng T. MicroRNA-195 promotes palmitate-induced apoptosis in cardiomyocytes by down-regulating Sirt1. *Cardiovascular Research*. 2011;92(1):75-84. doi:10.1093/cvr/cvr145
29. Menghini R, Casagrande V, Cardellini M, et al. MicroRNA 217 Modulates Endothelial Cell Senescence via Silent Information Regulator 1. *Circulation*. 2009;120(15):1524-1532. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.864629
30. Cheng Y, Mai J, Hou T, Ping J. MicroRNA-421 induces hepatic mitochondrial dysfunction in non-alcoholic fatty liver disease mice by inhibiting sirtuin 3. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2016;474(1):57-63. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.04.065>
31. Mahesh G, Biswas R. MicroRNA-155: A Master Regulator of Inflammation. *J Interferon Cytokine Res*. 2019;39(6):321-330. doi:10.1089/jir.2018.0155
32. Yilmaz B, Sucak A, Kilic S, et al. Metformin regresses endometriotic implants in rats by improving implant levels of superoxide dismutase, vascular endothelial growth factor, tissue inhibitor of metalloproteinase-2, and matrix metalloproteinase-9. *Am J Obstet Gynecol*. 2010;202(4):368.e1-8. doi:10.1016/j.ajog.2009.10.873
33. Racho El-Akouri R, Kurlberg G, Dindelegan G, Mölne J, Wallin A, Brännström M. Heterotopic uterine transplantation by vascular anastomosis in the mouse. *J Endocrinol*. 2002;174(2):157-66. doi:10.1677/joe.0.1740157
34. El-Akouri RR, Kurlberg G, Brännström M. Successful uterine transplantation in the mouse: pregnancy and post-natal development of offspring. *Human Reproduction*. 2003;18(10):2018-2023. doi:10.1093/humrep/deg396
35. Arifin WN, Zahiruddin WM. Sample Size Calculation in Animal Studies Using Resource Equation Approach. *Malays J Med Sci*. 2017;24(5):101-105. doi:10.21315/mjms2017.24.5.11
36. Laganà AS, Garzon S, Franchi M, Casarin J, Gullo G, Ghezzi F. Translational animal models for endometriosis research: a long and windy road. *Ann Transl Med*. 2018;6(22):431-431. doi:10.21037/atm.2018.08.24
37. Cohen J, Ziyat A, Naoura I, et al. Effect of induced peritoneal endometriosis on oocyte and embryo quality in a mouse model. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2015;32(2):263-270. doi:10.1007/s10815-014-0390-1
38. Liu A, Xu X. MicroRNA isolation from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Methods Mol Biol*. 2011;724:259-267. doi:10.1007/978-1-61779-055-3_16
39. Liu Y, Luo L, Zhao H. Levels of lipid peroxides and superoxide dismutase in peritoneal fluid of patients with endometriosis. *J Tongji Med Univ*. 2001;21(2):166-7. doi:10.1007/bf02888087
40. Prieto L, Quesada JF, Cambero O, et al. Analysis of follicular fluid and serum markers of oxidative stress in women with infertility related to endometriosis. *Fertil Steril*. 2012;98(1):126-30. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.03.052
41. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). *The Lancet*. 1998;352(9131):854-865. doi:10.1016/S0140-6736(98)07037-8
42. Johnson JA, Majumdar SR, Simpson SH, Toth EL. Decreased Mortality Associated With the Use of Metformin Compared With Sulfonylurea Monotherapy in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2002;25(12):2244-2248. doi:10.2337/diacare.25.12.2244
43. Zhou G, Myers R, Li Y, et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *The Journal of Clinical Investigation*. 2001;108(8):1167-1174. doi:10.1172/JCI13505
44. Zhou Y, Xu J-N, Zeng C, et al. Metformin Suppresses Prostaglandin E2-Induced Cytochrome P450 Aromatase Gene Expression and Activity via Stimulation of AMP-Activated Protein Kinase in Human Endometriotic Stromal Cells. *Reproductive Sciences*. 2015;22(9):1162-1170. doi:10.1177/1933719115590664
45. Yavuz S, Aydin NE, Celik O, Yilmaz E, Ozerol E, Tanbek K. Resveratrol successfully treats experimental endometriosis through modulation of oxidative stress and lipid peroxidation. *J Cancer Res Ther*. 2014;10(2):324-9. doi:10.4103/0973-1482.136619
46. Öner-İyidoğan Y, Koçak H, Gürdöl F, Korkmaz D, Buyru F. Indices of Oxidative Stress in Eutopic and Ectopic Endometria of Women with Endometriosis. *Gynecologic and Obstetric Investigation*. 2004;57(4):214-217. doi:10.1159/000076691

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

47. Buldak Ł, Łabuzek K, Buldak RJ, et al. Metformin affects macrophages' phenotype and improves the activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase, catalase and decreases malondialdehyde concentration in a partially AMPK-independent manner in LPS-stimulated human monocytes/macrophages. *Pharmacological Reports*. 2014;66(3):418-429. doi:<https://doi.org/10.1016/j.pharep.2013.11.008>

48. Chen SC, Brooks R, Houskeeper J, et al. Metformin suppresses adipogenesis through both AMP-activated protein kinase (AMPK)-dependent and AMPK-independent mechanisms. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2017;440:57-68. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.11.011>

49. Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 1927;14(4):422-469. doi:10.1016/S0002-9378(15)30003-X

For Peer Review

Table A – Western-Blot Antibodies

Primary Antibodies	Concentration v/v
GPx1 – abcam ref. ab22604	1:1250
pAMPK α – Cell Signaling Technologies ref. Thr172	1:1000
PGC-1 α – ProteinTech ref. 66369-1-Ig	1:1000
SIRT1 – ProteinTech ref. 13161-1-AP	1:500
SIRT3 – Cell Signaling Technologies ref. D22A3	1:1000
SOD2 – Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA ref. sc-30080	1:10000
AMPK α (total) – Cell Signaling Technologies ref. 23A3	1:1000
Secondary Antibodies	Concentration v/v
Anti-Mouse – Santa Cruz Biotechnology ref. sc-2005	1:10000
Anti-Rabbit – Jackson ImmunoResearch Europe Ltd (Cambridgeshire, United Kingdom) ref. 711-035-152	1:5000

Table B – PCR miRNA Primers

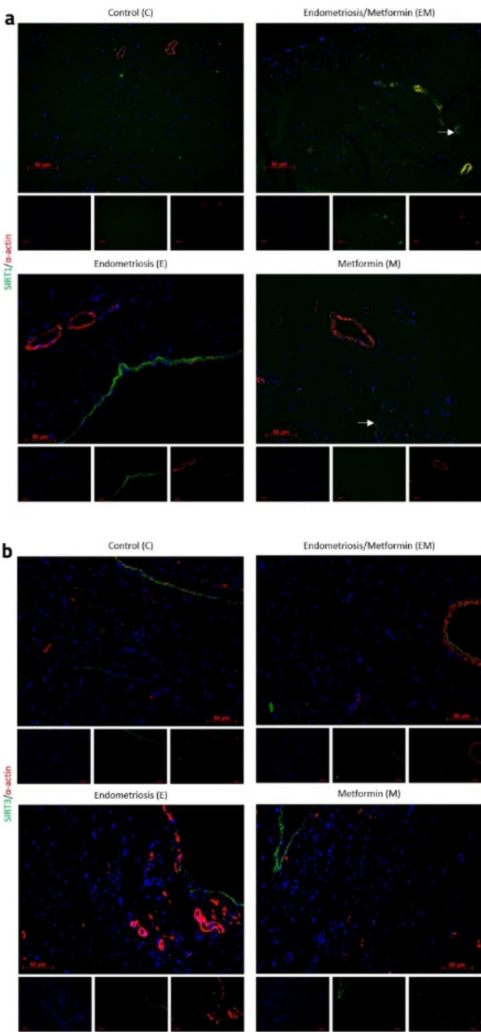
MiRNA	Reference
RNU	Hs_RNU1A_11 miScript Primer Assay, ref. MS00013986
miR-34a	Hs_miR-34a_1 miScript Primer Assay, ref. MS00003318
miR-195	Mm_miR-195_1 miScript Primer Assay, ref. MS00001792
miR-217	Mm_miR-217_2 miScript Primer Assay, ref. MS00007966
miR-421	Hs_miR-421_1 miScript Primer Assay, ref. MS00004165
miR-155	Mm_miR-155_1 miScript Primer Assay (ref. MS00001701)

Captions

Figure 1: Representative images of dual-immunolabeling of SIRT1/ α -actin and SIRT3/ α -actin in mouse heart tissue from Control (C), Endometriosis/Metformin (EM), Endometriosis (E) and Metformin (M) groups. SIRT1 (green) exhibits a slight generalized hue in the tissue but predominates in endothelial cells (arrow) whereas α -actin (red) is marked in vascular smooth muscle cells (1a). Colocalization of SIRT1 with α -actin resulted in yellow labeling. SIRT3 (green) was detected exclusively in endothelial cells, without colocalization with α -actin (1b). Nuclei were labeled blue (DAPI). Isolated blue, green and red channels are displayed below the corresponding composite images. SIRT1: Sirtuin1, SIRT3: Sirtuin3.

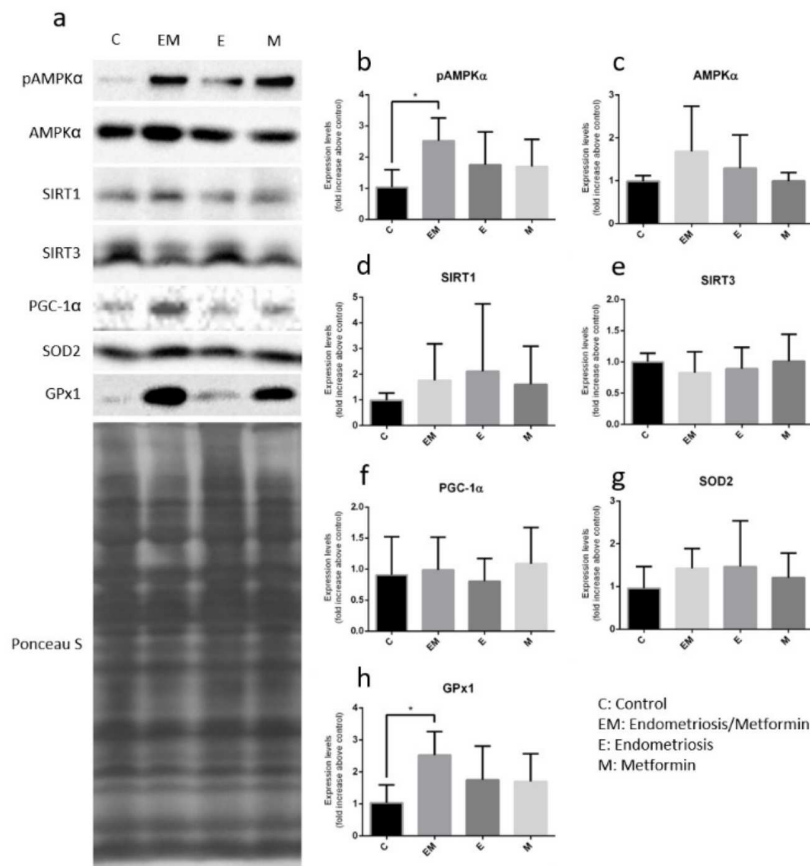
Figure 2: Western-blotting semiquantification of phospho-AMPK α , AMPK α , SIRT1, SIRT3, PGC-1 α , SOD2 and GPx1 levels in mouse heart. a) Representative blots of all proteins and of a Ponceau S-stained membrane. Control group (C) expression was used to normalize expression between groups, resulting in an expression value ≈ 1 . Expression values in remaining groups (EM: Endometriosis/Metformin, E: Endometriosis, M: Metformin) displayed in arbitrary units representing fold increase comparatively to the control group. b-i) graphical representation of protein band densitometric expression relative to the respective Ponceau S band ($n = 5-13$ per group). AMPK:AMP-activated protein kinase, SIRT1:Sirtuin1, SIRT3:Sirtuin3, PGC-1 α :Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha, SOD2:Superoxide dismutase 2, GPx1: Glutathione peroxidase 1; * $P < 0.05$. Error bars represent the standard error of the mean.

Figure 3: Expression levels of miR-34a (a), miR-195 (b), miR-217 (c), miR-155 (d) and miR-421 (e) by real-time polymerase chain reaction in mouse heart tissue sections, employing the formula $2^{-(CT \text{ target miRNA} - CT \text{ RNU1}\alpha)}$. Error bars represent the standard error of the mean.



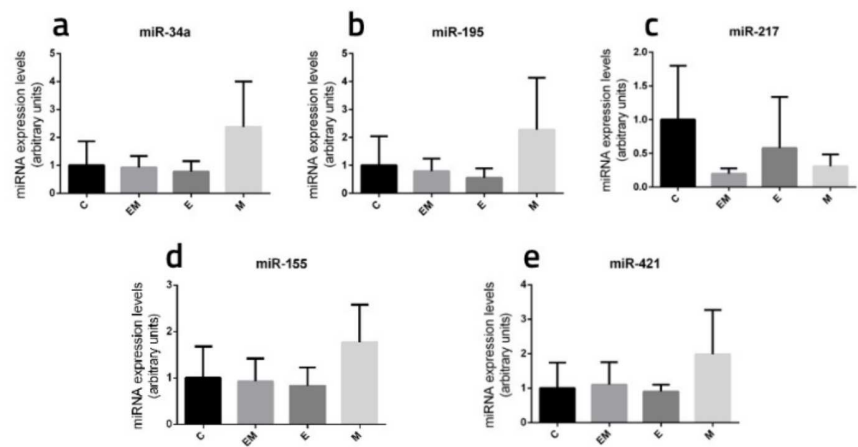
Representative images of dual-immunolabeling of SIRT1/α-actin and SIRT3/α-actin in mouse heart tissue from Control (C), Endometriosis/Metformin (EM), Endometriosis (E) and Metformin (M) groups. SIRT1 (green) exhibits a slight generalized hue in the tissue but predominates in endothelial cells (arrow) whereas α-actin (red) is marked in vascular smooth muscle cells (1a). Colocalization of SIRT1 with α-actin resulted in yellow labeling. SIRT3 (green) was detected exclusively in endothelial cells, without colocalization with α-actin (1b). Nuclei were labeled blue (DAPI). Isolated blue, green and red channels are displayed below the corresponding composite images. SIRT1: Sirtuin1, SIRT3: Sirtuin3.

119x248mm (192 x 192 DPI)



Western-blotting semiquantification of phospho-AMPKα, AMPKα, SIRT1, SIRT3, PGC-1α, SOD2 and GPx1 levels in mouse heart. a) Representative blots of all proteins and of a Ponceau S-stained membrane. Control group (C) expression was used to normalize expression between groups, resulting in an expression value ≈ 1. Expression values in remaining groups (EM: Endometriosis/Metformin, E: Endometriosis, M: Metformin) displayed in arbitrary units representing fold increase comparatively to the control group. b-i) graphical representation of protein band densitometric expression relative to the respective Ponceau S band (n = 5–13 per group). AMPK:AMP-activated protein kinase, SIRT1:Sirtuin1, SIRT3:Sirtuin3, PGC-1α: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha, SOD2: Superoxide dismutase 2, GPx1: Glutathione peroxidase 1; *P < 0.05. Error bars represent the standard error of the mean.

138x142mm (192 x 192 DPI)



Expression levels of miR-34a (a), miR-195 (b), miR-217 (c), miR-155 (d) and miR-421 (e) by real-time polymerase chain reaction in mouse heart tissue sections, employing the formula $2^{-(CT\ target\ miRNA-CT\ RNU1a)}$. Error bars represent the standard error of the mean.

122x66mm (192 x 192 DPI)

Anexos

Intended for healthcare professionals

Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics

Submit Paper



Please read the guidelines below
before visiting the submission site!

[Submission Site](#)

Manuscript Submission Guidelines:

Please read the guidelines below then visit *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics (JCPT)*'s submission site at <https://mc.manuscriptcentral.com/jcpat> to upload your manuscript. Please note that manuscripts not conforming to these guidelines may be returned. Remember you can log in to the submission site at any time to check on the progress of your paper through the peer review process.

SAGE Publishing disseminates high-quality research and engaged scholarship globally, and we are committed to diversity and inclusion in publishing. We encourage submissions from a diverse range of authors from across all countries and backgrounds.

Only manuscripts of sufficient quality that meet the aims and scope of *JCPT* will be reviewed.

As part of the submission process you will be required to warrant that you are submitting your original work, that you have the rights in the work, and that you have obtained and can supply all necessary permissions for the reproduction of any copyright works not owned by you, that you are submitting the work for first publication in the Journal and that it is not being considered for publication elsewhere and has not already been published elsewhere. Please see our guidelines on [prior publication](#). Note that ***JCPT* may accept submissions of papers that have been posted on pre-print servers; please state in the Submission Letter that the manuscript has been posted on a pre-print server, and include the DOI for the preprint in both the Submission Letter and in the designated field in the manuscript submission system.** Authors are not permitted to post an updated version of their paper on the preprint server while it is being peer reviewed for possible publication in the journal. If the article is accepted for publication, the author may re-use their work according to the journal's author archiving policy. If your paper is accepted, you must include a link on your preprint to the final version of your paper.

This Journal is a member of the [Committee on Publication Ethics](#).

This Journal recommends that authors follow the [Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing, and Publication of Scholarly Work in Medical Journals](#) formulated by the International

Committee of Medical Journal Editors (COMET).

There are no fees payable to submit or publish in this journal.

If you have any questions about publishing with SAGE, please visit the [SAGE Journal Solutions Portal](#).

1. [What do we publish?](#)
 - 1.1 [Aims & Scope](#)
 - 1.2 [Article types](#)
 - 1.3 [Writing your paper](#)
 - 1.3.1 [*Make your article discoverable*](#)
2. [Editorial policies](#)
 - 2.1 [Peer review policy](#)
 - 2.2 [Authorship](#)
 - 2.3 [Acknowledgements](#)
 - 2.3.1 [*Third party submissions*](#)
 - 2.3.2 [*Writing assistance*](#)
 - 2.4 [Funding](#)
 - 2.5 [Declaration of conflicting interests](#)
 - 2.6 [Research ethics and patient consent](#)
 - 2.7 [Clinical trials](#)
 - 2.8 [Reporting guidelines](#)
 - 2.9 [Research data](#)
3. [Publishing policies](#)
 - 3.1 [Publication ethics](#)
 - 3.1.1 [*Plagiarism*](#)
 - 3.1.2 [*Prior publication*](#)
 - 3.2 [Contributor's publishing agreement](#)
 - 3.3 [Open access and author archiving](#)
4. [Preparing your manuscript for submission](#)
 - 4.1 [Formatting](#)
 - 4.2 [Artwork, figures and other graphics](#)
 - 4.3 [Supplemental material](#)
 - 4.4 [Reference style](#)
 - 4.5 [English language editing services](#)
5. [Submitting your manuscript](#)
 - 5.1 [ORCID](#)
 - 5.2 [Information required for completing your submission](#)
 - 5.3 [Permissions](#)
6. [On acceptance and publication](#)

- 6.2 [OnlineFirst publication](#)
- 6.3 [Access to your published article](#)
- 6.4 [Promoting your article](#)
- 7. [Further information](#)
 - 7.1 [Appealing the publication decision](#)

1. What do we publish?

1.1 Aims & Scope

Before submitting your manuscript to *JCPT*, please ensure you have read the Aims & Scope.

Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics is a peer-reviewed journal that publishes original basic human studies, original animal studies, and original bench research with potential clinical application to cardiovascular pharmacology and therapeutics. The focus of the experimental studies is translational research. The journal also publishes review articles on basic research, clinical research, editorials, commentaries, points of view, and controversies. Selected journal supplements will also be published. Future focus will include cardioprotective therapies, stem cell therapy, regenerative cardiology, therapies for preventive cardiology (risk factor management), and antiarrhythmic therapies.

1.2 Article Types

JCPT publishes both original clinical studies and original preclinical investigations with clear translational relevance. Areas of interest include (but are not limited to) cardioprotective therapies, stem cell therapy, regenerative cardiology, therapies for preventive cardiology (risk factor management), as well as antiplatelet, anticoagulation and antiarrhythmic therapies.

Meta-analyses, Systematic Reviews, Editorials, Commentaries and Letters to the Editor will be given low priority and will be considered for publication on a highly selective basis. Case reports will not be accepted.

For preclinical investigation, priority will be given to in vivo studies that focus on pharmacologic therapy for disease models. In general isolated cell studies alone, without an in vivo component, will be given low priority. All research involving animals must adhere to the ARRIVE2 Guidelines: see Section 2.8. Failure to comply with these Guidelines will result in rejection of the manuscript.

Isolated cell studies alone, without an in vivo component, will be given low priority. *JCPT* will not consider studies of herbal remedies: these contributions should be submitted to journals of alternative medicine.

JCPT accepts the following article types:

- Manuscripts should be written clearly and concisely: maximum 6,000 words (including Abstract, Figure Legends and References)
 - 200-250 word structured abstract
 - 5-6 keywords
 - Maximum 50 references
- Reviews
 - Reviews should be written clearly and concisely: maximum 7,500 words (including Abstract, Figure Legends and References)
 - 200-250 word structured abstract
 - 5-6 keywords
 - Maximum 100 references
- Letters to the Editor
 - Letters are considered for publication on a highly selective basis, and must comment on a recent paper published in *JCPT*
 - Letters reporting original data will not be accepted
 - Maximum 1,000 words (including References)
 - No abstract
 - 3-4 keywords
 - Maximum 5 references

1.3 Writing your paper

The SAGE Author Gateway has some general advice and on [how to get published](#), plus links to further resources.

1.3.1 Make your article discoverable

For information and guidance on how to make your article more discoverable, visit our Gateway page on [How to Help Readers Find Your Article Online](#).

[Back to top](#)

2. Editorial policies

2.1 Peer review policy

JCPT operates a conventional single-blind reviewing policy in which the reviewer's name is always concealed from the submitting author.

Decisions on manuscripts will be taken as rapidly as possible. In general, Editors will seek advice from two or more expert reviewers about the scientific content and presentation of submitted articles.

The Editor or members of the Editorial Board may occasionally submit their own manuscripts for possible publication in the journal. In these cases, the peer review process will be managed by alternative members of the Board and the submitting Editor/Board member will have no involvement in the decision-making process.

JCPT is committed to delivering high quality, fast peer-review for your paper, and as such has partnered with Publons. Publons is a third party service that seeks to track, verify and give credit for peer review. Reviewers for JCPT can opt in to Publons in order to claim their reviews or have them automatically verified and added to their reviewer profile. Reviewers claiming credit for their review will be associated with the relevant journal, but the article name, reviewer's decision and the content of their review is not published on the site. For more information visit the [Publons](#) website.

2.2 Authorship

Papers should only be submitted for consideration once all contributing authors give consent. Those submitting papers should carefully check that all those whose work contributed to the paper are acknowledged as contributing authors.

The list of authors should include all those who can legitimately claim authorship. This is all those who:

1. Made a substantial contribution to the concept or design of the work; or acquisition, analysis or interpretation of data,
2. Drafted the article or revised it critically for important intellectual content,
3. Approved the version to be published,
4. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content.

Authors should meet the conditions of all of the points above. When a large, multicenter group has conducted the work, the group should identify the individuals who accept direct responsibility for the manuscript. These individuals should fully meet the criteria for authorship.

Acquisition of funding, collection of data, or general supervision of the research group alone does not constitute authorship, although all contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in the Acknowledgments section. Please refer to the [International Committee of Medical Journal Editors \(ICMJE\) authorship guidelines](#) for more information on authorship.

2.3 Acknowledgements

All contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in an Acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, or a department chair who provided only general support.

Any acknowledgements should appear first at the end of your article prior to your Declaration of Conflicting Interests (if applicable), any notes and your References.

2.3.1 Third party submissions

Where an individual who is not listed as an author submits a manuscript on behalf of the author(s), a statement must be included in the Acknowledgements section of the manuscript and in the accompanying cover letter. The statements must:

- Disclose this type of editorial assistance – including the individual's name, company and level of input
- Identify any entities that paid for this assistance
- Confirm that the listed authors have authorized the submission of their manuscript via third party and approved any statements or declarations, e.g. conflicting interests, funding, etc.

Where appropriate, SAGE reserves the right to deny consideration to manuscripts submitted by a third party rather than by the authors themselves.

2.3.2 Writing assistance

Individuals who provided writing assistance, e.g. from a specialist communications company, do not qualify as authors and so should be included in the Acknowledgements section. Authors must disclose any writing assistance – including the individual's name, company and level of input – and identify the entity that paid for this assistance. It is not necessary to disclose use of language polishing services.

2.4 Funding

JCPT requires all authors to acknowledge their funding in a consistent fashion under a separate heading. Please visit the [Funding Acknowledgements](#) page on the SAGE Journal Author Gateway to confirm the format of the acknowledgment text in the event of funding, or state that: "This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors."

2.5 Declaration of conflicting interests

It is the policy of JCPT to require a declaration of conflicting interests from all authors enabling a statement to be carried within the paginated pages of all published articles.

Please ensure that a 'Declaration of Conflicting Interests' statement is included at the end of your manuscript, after any acknowledgements and prior to the references. If no conflict exists, please state that: "The Author(s) declare(s) that there is no conflict of interest." For guidance on conflict of interest statements, please see the ICMJE recommendations [here](#).

Medical research involving human subjects must be conducted according to the [World Medical Association Declaration of Helsinki](#). A statement that the protocol and informed consent were reviewed and approved by an IRB (Institutional Review Board) should be included in the methods section.

Submitted manuscripts should conform to the [ICMJE Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing, and Publication of Scholarly Work in Medical Journals](#), and all papers reporting animal and/or human studies must state in the methods section that the relevant Ethics Committee or Institutional Review Board provided (or waived) approval. Please ensure that you have provided the full name and institution of the review committee, in addition to the approval number.

For research articles, authors are also required to state in the methods section whether participants provided informed consent and whether the consent was written or verbal.

Information on informed consent to report individual cases or case series should be included in the manuscript text. A statement is required regarding whether written informed consent for patient information and images to be published was provided by the patient(s) or a legally authorized representative. Please do not submit the patient's actual written informed consent with your article, as this in itself breaches the patient's confidentiality. The Journal requests that you confirm to us, in writing, that you have obtained written informed consent but the written consent itself should be held by the authors/investigators themselves, for example in a patient's hospital record. The confirmatory letter may be uploaded with your submission as a separate file.

Please also refer to the [ICMJE Recommendations for the Protection of Research Participants](#).

All research involving animals submitted for publication must be approved by an ethics committee with oversight of the facility in which the studies were conducted. The journal has adopted the [Consensus Author Guidelines on Animal Ethics and Welfare for Veterinary Journals](#) published by the International Association of Veterinary Editors. A statement to this effect needs to be described in the methods section. In addition a statement that the protocol was approved by an IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee) is required.

2.7 Clinical trials

JCPT conforms to the [ICMJE requirement](#) that clinical trials are registered in a WHO-approved public trials registry at or before the time of first patient enrollment as a condition of consideration for publication. The trial registry name and URL, and registration number must be included at the end of the abstract. The registration number and registry name for clinical trials should be provided in the methods section.

2.8 Reporting guidelines

of study. For example, all randomized controlled trials submitted for publication should include a completed [CONSORT](#) flow chart as a cited figure and the completed CONSORT checklist should be uploaded with your submission as a supplemental file. Systematic reviews and meta-analyses should include the completed [PRISMA](#) flow chart as a cited figure and the completed PRISMA checklist should be uploaded with your submission as a supplemental file. The [EQUATOR wizard](#) can help you identify the appropriate guideline. For all research involving animals, authors must include a sentence in the Methods section of the manuscript, affirming that all investigations adhere to the [ARRIVE2](#) Guidelines. Failure to comply with the ARRIVE Guidelines will result in rejection of the manuscript

Other resources can be found at [NLM's Research Reporting Guidelines and Initiatives](#).

2.9 Research data

At SAGE we are committed to facilitating openness, transparency and reproducibility of research. Where relevant, The Journal encourages authors to share their research data in a suitable public repository subject to ethical considerations and where data is included, to add a data accessibility statement in their manuscript file. Authors should also follow data citation principles. For more information please visit the [SAGE Author Gateway](#), which includes information about SAGE's partnership with the data repository figshare.

[Back to top](#)

3. Publishing Policies

3.1 Publication ethics

SAGE is committed to upholding the integrity of the academic record. We encourage authors to refer to the Committee on Publication Ethics' [International Standards for Authors](#) and view the Publication Ethics page on the [SAGE Author Gateway](#).

3.1.1 Plagiarism

JCPT and SAGE take issues of copyright infringement, plagiarism or other breaches of best practice in publication very seriously. We seek to protect the rights of our authors and we always investigate claims of plagiarism or misuse of published articles. Equally, we seek to protect the reputation of the journal against malpractice. Submitted articles may be checked with duplication-checking software. Where an article, for example, is found to have plagiarized other work or included third-party copyright material without permission or with insufficient acknowledgement, or where the authorship of the article is contested, we reserve the right to take action including, but not limited to: publishing an erratum or corrigendum (correction);

In order to help assure that all manuscripts are original submitted papers are routinely screened using a computerized plagiarism tracking system known as iThenticate. This program identifies phrases, sentences, and paragraphs that have previously been published, including the authors' own work. The program generates a similarity index. If the similarity index is greater than ~33% after removal of the bibliography, the manuscript will be returned to the authors without a review.

3.1.2 Prior publication

If material has been previously published it is not generally acceptable for publication in a SAGE journal. However, there are certain circumstances where previously published material can be considered for publication. Please refer to the guidance on the [SAGE Author Gateway](#) or if in doubt, contact the Editor at the address given below.

3.2 Contributor's publishing agreement

Before publication, SAGE requires the author as the rights holder to sign a Journal Contributor's Publishing Agreement. SAGE's Journal Contributor's Publishing Agreement is an exclusive licence agreement which means that the author retains copyright in the work but grants SAGE the sole and exclusive right and licence to publish for the full legal term of copyright. Exceptions may exist where an assignment of copyright is required or preferred by a proprietor other than SAGE. In this case copyright in the work will be assigned from the author to the society. For more information please visit the [SAGE Author Gateway](#).

3.3 Open access and author archiving

JCPT offers optional open access publishing via the SAGE Choice program. For more information please visit the [SAGE Choice website](#). For information on funding body compliance, and depositing your article in repositories, please visit [SAGE Publishing Policies](#) on our Journal Author Gateway.

[Back to top](#)

4. Preparing your manuscript for submission

4.1 Formatting

The preferred format for your manuscript is Word.

Manuscripts are accepted for consideration on the condition that they are contributed solely to JCPT. No substantial part of a paper may have been published elsewhere, including being published in another language besides English, except as a scientific abstract. All work must be

unacceptable. A direct quote of no more than 4 lines from textual material should be enclosed in double quotation marks; if longer than 4 lines it should be formatted as a block extract. Always verify the quote against the original source, and the citation should include the exact page number(s) of the source. Such directly quoted material should be used sparingly. The receipt of your manuscript by the Journal will be acknowledged and a decision regarding its status made as soon as possible. All manuscripts are subject to editorial review. Manuscripts must be written in acceptable English. Manuscripts submitted in poor English will be returned without review. Some manuscripts that are deemed inappropriate for the journal or very low priority by the editorial staff may be returned without review.

Submission Letter

The manuscript must be accompanied by a cover letter that states (1) all the authors have read and approved the final manuscript, (2) all authors have read and approve of the data being presented in the manuscript, and (3) the full name, address, e-mail address, phone, and fax number of the individual to whom correspondence concerning the manuscript is to be sent. The cover letter must also specifically state and verify that the paper being submitted has not been previously published in whole or in part in any form, including being published in another language besides English, is not under consideration for publication elsewhere, and is original. If the manuscript has been posted on a pre-print server, this must be acknowledged and the DOI for the preprint must be included in the cover letter. The cover letter should be addressed to

Karin Przyklenk, PhD
Editor-in-Chief
Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics
Wayne State University School of Medicine
Detroit, MI

Title Page

On the title page, please include all of the following information:

1. The names, degrees, and professional affiliation (position, department, institution, place) of all authors.
2. The name of the institution where the work reported was done.
3. Acknowledgment of grant support when appropriate.
4. Complete mailing address, telephone, and fax of corresponding author and e-mail addresses of all authors.

The *American Medical Association (AMA) Manual of Style*, is the standard source of style. For more information on the *AMA Manual of Style*, please visit

The abstract should be no longer than 250 words in length. The abstract should summarize the main points of the paper and be descriptive, narrative, and informative and should include only information that is in the article. Avoid abbreviations. At the bottom of the abstract, please also submit a maximum of 5 keywords for your article.

Body of the Text

For most original manuscripts, the subheadings Introduction, Methods and Materials, Results, Discussion, and Conclusion or Summary are suggested. The introduction should be no longer than 2-3 paragraphs and should provide background and rationale for the study and specifically state the purpose of the study. The methods section should describe what statistical tests were used. The text of the paper should be no longer than 15-20 double-spaced typed pages in most cases. All tables and figures should be referenced in the main text in the order in which they appear. The discussion should stress what is new in the paper and relate the author's findings to the existing literature. The discussion should show how the findings add to the existing knowledge base of the subject under study.

Abbreviations

Please avoid excessive and unnecessary abbreviations. Keep them to a minimum. The first time an abbreviation is used it should be defined.

Tables

All tables must be cited in text. Tables are to be numbered with Arabic numerals (Table 1, Table 2) in order of their text citation. Each table should be typed (double-spaced throughout) on a separate sheet of paper and should have a title. Use spaces, not vertical rules, to separate columns. Each table should have a legend in sufficient detail to allow understanding without reference to the text.

4.2 Artwork, figures and other graphics

For guidance on the preparation of illustrations, pictures and graphs in electronic format, please visit SAGE's [Manuscript Submission Guidelines](#).

Figures supplied in color will appear in color online regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. Color figures for the print issue are charged to the author at the rate of \$800 for the first figure and \$200 for each subsequent figure. Payment must be received before the article can appear in print; the author should note his or her desire to have figures appear in color in the print issue when he or she submits his or her article.

Scanned Images

Line art (black and white) images should be scanned as a bitmap at 900ppi. Photos should be scanned as grayscale or CMYK at 300ppi.

4.3 Supplemental material

This journal is able to host additional materials online (e.g. datasets, podcasts, videos, images etc.) alongside the full-text of the article. For more information please refer to our [guidelines on submitting supplemental files](#).

4.4 Reference style

JCPT adheres to the *AMA Manual of Style*. View the guide [here](#) to ensure your manuscript conforms to this style.

In the text, please use a superscripted number that correlates with the reference at the end of the manuscript. When several references are cited simultaneously in the text, you can list the superscripted numbers together, for example, “Many researchers have debated this subject.^{1,2,5,9}” Use “et al” for cites of 3 authors or more in text. However, in the references, list up to 6 authors. If there are more than 6 authors, list the first 3 authors and then “et al”. Type references double-spaced at the end of the manuscript numbered in order of appearance in the manuscript. Unpublished data and personal communications should be given as references. Manuscripts in press may be referenced; however, manuscripts that have been submitted for publication but have not been accepted yet should not be referenced. Avoid quoting abstracts where possible.

Journals

Michaud G, McGowan JL, van der Jagt R, et al. Are therapeutic decisions supported by evidence from health care research? *Arch Intern Med*. 1998;158:1665-1668.

Book Chapters

Cole BR. Cystinosis and cystinuria. In: Jacobson HR, Striker GE, Klahr S, eds. *The Principles and Practice of Nephrology*. Philadelphia, PA: BC Decker Inc; 1991:396-403.

Books

Sackett DL, Straus SE, Richardson WS, et al. *Evidence-based Medicine: How to Practice and Teach EBM*. 2nd ed. New York, NY: Churchill Livingstone; 2000.

4.5 English language editing services

Authors seeking assistance with English language editing, translation, or figure and manuscript

5. Submitting your manuscript

JCPT is hosted on SAGE Track, a web based online submission and peer review system powered by ScholarOne™ Manuscripts. Visit <https://mc.manuscriptcentral.com/jcpat> to login and submit your article online.

IMPORTANT: Please check whether you already have an account in the system before trying to create a new one. If you have reviewed or authored for the journal in the past year it is likely that you will have had an account created. For further guidance on submitting your manuscript online please visit [ScholarOne Online Help](#).

5.1 ORCID

As part of our commitment to ensuring an ethical, transparent and fair peer review process SAGE is a supporting member of [ORCID, the Open Researcher and Contributor ID](#). ORCID provides a unique and persistent digital identifier that distinguishes researchers from every other researcher, even those who share the same name, and, through integration in key research workflows such as manuscript and grant submission, supports automated linkages between researchers and their professional activities, ensuring that their work is recognized.

The collection of ORCID IDs from corresponding authors is now part of the submission process of this journal. If you already have an ORCID ID you will be asked to associate that to your submission during the online submission process. We also strongly encourage all co-authors to link their ORCID ID to their accounts in our online peer review platforms. It takes seconds to do: click the link when prompted, sign into your ORCID account and our systems are automatically updated. Your ORCID ID will become part of your accepted publication's metadata, making your work attributable to you and only you. Your ORCID ID is published with your article so that fellow researchers reading your work can link to your ORCID profile and from there link to your other publications.

If you do not already have an ORCID ID please follow this [link](#) to create one or visit our [ORCID homepage](#) to learn more.

5.2 Information required for completing your submission

You will be asked to provide contact details and academic affiliations for all co-authors via the submission system and identify who is to be the corresponding author. These details must match what appears on your manuscript. The affiliation listed in the manuscript should be the institution where the research was conducted. If an author has moved to a new institution since

where relevant).

5.3 Permissions

Please also ensure that you have obtained any necessary permission from copyright holders for reproducing any illustrations, tables, figures or lengthy quotations previously published elsewhere. For further information including guidance on fair dealing for criticism and review, please see the Copyright and Permissions page on the [SAGE Author Gateway](#).

[Back to top](#)

6. On acceptance and publication

6.1 SAGE Production

Your SAGE Production Editor will keep you informed as to your article's progress throughout the production process. Proofs will be made available to the corresponding author via our editing portal SAGE Edit or by email, and corrections should be made directly or notified to us promptly. Authors are reminded to check their proofs carefully to confirm that all author information, including names, affiliations, sequence and contact details are correct, and that Funding and Conflict of Interest statements, if any, are accurate. Please note that if there are any changes to the author list at this stage all authors will be required to complete and sign a form authorizing the change.

6.2 OnlineFirst publication

OnlineFirst allows final articles (completed and approved articles awaiting assignment to a future issue) to be published online prior to their inclusion in a journal issue, which significantly reduces the lead time between submission and publication. Visit the [SAGE Journals help page](#) for more details, including how to cite OnlineFirst articles.

6.3 Access to your published article

SAGE provides authors with online access to their final article.

6.4 Promoting your article

Publication is not the end of the process! You can help disseminate your paper and ensure it is as widely read and cited as possible. The SAGE Author Gateway has numerous resources to help you promote your work. Visit the [Promote Your Article](#) page on the Gateway for tips and advice.

7. Further information

Any correspondence, queries or additional requests for information on the manuscript submission process should be sent to the *JCPT* editorial office as follows:

Supriya Bidola, Peer Review Associate

supriya.bidola@sagepub.in

7.1 Appealing the publication decision

Editors have very broad discretion in determining whether an article is an appropriate fit for their journal. Many manuscripts are declined with a very general statement of the rejection decision. These decisions are not eligible for formal appeal unless the author believes the decision to reject the manuscript was based on an error in the review of the article, in which case the author may appeal the decision by providing the Editor with a detailed written description of the error they believe occurred.

If an author believes the decision regarding their manuscript was affected by a publication ethics breach, the author may contact the publisher with a detailed written description of their concern, and information supporting the concern, at publication_ethics@sagepub.com.

[Back to top](#)

More about this journal



Description



Aims and Scope



Editorial Board



Abstracting/Indexing

The ARRIVE Essential 10

These items are the basic minimum to include in a manuscript. Without this information, readers and reviewers cannot assess the reliability of the findings.

Item	Recommendation		Section/line number, or reason for not reporting
Study design	1	For each experiment, provide brief details of study design including:	Enter details here
		a. The groups being compared, including control groups. If no control group has been used, the rationale should be stated.	Enter details here
		b. The experimental unit (e.g. a single animal, litter, or cage of animals).	Enter details here
Sample size	2	a. Specify the exact number of experimental units allocated to each group, and the total number in each experiment. Also indicate the total number of animals used.	Enter details here
		b. Explain how the sample size was decided. Provide details of any <i>a priori</i> sample size calculation, if done.	Enter details here
Inclusion and exclusion criteria	3	a. Describe any criteria used for including and excluding animals (or experimental units) during the experiment, and data points during the analysis. Specify if these criteria were established <i>a priori</i> . If no criteria were set, state this explicitly.	Enter details here
		b. For each experimental group, report any animals, experimental units or data points not included in the analysis and explain why. If there were no exclusions, state so.	Enter details here
		c. For each analysis, report the exact value of <i>n</i> in each experimental group.	Enter details here
Randomisation	4	a. State whether randomisation was used to allocate experimental units to control and treatment groups. If done, provide the method used to generate the randomisation sequence.	Enter details here
		b. Describe the strategy used to minimise potential confounders such as the order of treatments and measurements, or animal/cage location. If confounders were not controlled, state this explicitly.	Enter details here
Blinding	5	Describe who was aware of the group allocation at the different stages of the experiment (during the allocation, the conduct of the experiment, the outcome assessment, and the data analysis).	Enter details here
Outcome measures	6	a. Clearly define all outcome measures assessed (e.g. cell death, molecular markers, or behavioural changes).	Enter details here
		b. For hypothesis-testing studies, specify the primary outcome measure, i.e. the outcome measure that was used to determine the sample size.	Enter details here
Statistical methods	7	a. Provide details of the statistical methods used for each analysis, including software used.	Enter details here
		b. Describe any methods used to assess whether the data met the assumptions of the statistical approach, and what was done if the assumptions were not met.	Enter details here
Experimental animals	8	a. Provide species-appropriate details of the animals used, including species, strain and substrain, sex, age or developmental stage, and, if relevant, weight.	Enter details here
		b. Provide further relevant information on the provenance of animals, health/immune status, genetic modification status, genotype, and any previous procedures.	Enter details here
Experimental procedures	9	For each experimental group, including controls, describe the procedures in enough detail to allow others to replicate them, including:	Enter details here
		a. What was done, how it was done and what was used.	Enter details here
		b. When and how often.	Enter details here
		c. Where (including detail of any acclimatisation periods).	Enter details here
		d. Why (provide rationale for procedures).	Enter details here
Results	10	For each experiment conducted, including independent replications, report:	Enter details here
		a. Summary/descriptive statistics for each experimental group, with a measure of variability where applicable (e.g. mean and SD, or median and range).	Enter details here
		b. If applicable, the effect size with a confidence interval.	Enter details here

The Recommended Set

These items complement the Essential 10 and add important context to the study. Reporting the items in both sets represents best practice.

Item		Recommendation	Section/line number, or reason for not reporting
Abstract	11	Provide an accurate summary of the research objectives, animal species, strain and sex, key methods, principal findings, and study conclusions.	Enter details here
Background	12	a. Include sufficient scientific background to understand the rationale and context for the study, and explain the experimental approach.	Enter details here
		b. Explain how the animal species and model used address the scientific objectives and, where appropriate, the relevance to human biology.	Enter details here
Objectives	13	Clearly describe the research question, research objectives and, where appropriate, specific hypotheses being tested.	Enter details here
Ethical statement	14	Provide the name of the ethical review committee or equivalent that has approved the use of animals in this study, and any relevant licence or protocol numbers (if applicable). If ethical approval was not sought or granted, provide a justification.	Enter details here
Housing and husbandry	15	Provide details of housing and husbandry conditions, including any environmental enrichment.	Enter details here
Animal care and monitoring	16	a. Describe any interventions or steps taken in the experimental protocols to reduce pain, suffering and distress.	Enter details here
		b. Report any expected or unexpected adverse events.	Enter details here
		c. Describe the humane endpoints established for the study, the signs that were monitored and the frequency of monitoring. If the study did not have humane endpoints, state this.	Enter details here
Interpretation/ scientific implications	17	a. Interpret the results, taking into account the study objectives and hypotheses, current theory and other relevant studies in the literature.	Enter details here
		b. Comment on the study limitations including potential sources of bias, limitations of the animal model, and imprecision associated with the results.	Enter details here
Generalisability/ translation	18	Comment on whether, and how, the findings of this study are likely to generalise to other species or experimental conditions, including any relevance to human biology (where appropriate).	Enter details here
Protocol registration	19	Provide a statement indicating whether a protocol (including the research question, key design features, and analysis plan) was prepared before the study, and if and where this protocol was registered.	Enter details here
Data access	20	Provide a statement describing if and where study data are available.	Enter details here
Declaration of interests	21	a. Declare any potential conflicts of interest, including financial and non-financial. If none exist, this should be stated.	Enter details here
		b. List all funding sources (including grant identifier) and the role of the funder(s) in the design, analysis and reporting of the study.	Enter details here

Preenchimento Arrive Guidelines

ARRIVE Essential 10

Item 1:

Página 5, “A total of 36 mice were randomly divided into 4 groups: Control (C; n=6), Endometriosis with Metformin (EM; n=9), Endometriosis (E; n=14) and Metformin (M; n=7).”

Item 2:

Página 5, “A total of 36 mice were randomly divided into 4 groups: Control (C; n=6), Endometriosis with Metformin (EM; n=9), Endometriosis (E; n=14) and Metformin (M; n=7).”; “Two formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) blocks of each group (...).”

Página 7, “FFPE blocks from 5 animals per group were used to extract and analyze heart miRNAs expression.”

Página 9, “The protein expression values for each animal were organized into the respective experimental groups (n between 5 and 13 per group) (...)”

Item 3:

Página 5, “A total of 36 mice were randomly divided into 4 groups: Control (C; n=6), Endometriosis with Metformin (EM; n=9), Endometriosis (E; n=14) and Metformin (M; n=7).”

Não se aplicaram critérios de exclusão; o estudo decorreu integralmente utilizando os 36 animais.

Item 4:

Página 5, “A total of 36 mice were randomly divided into 4 groups: Control (C; n=6), Endometriosis with Metformin (EM; n=9), Endometriosis (E; n=14) and Metformin (M; n=7).”

Os animais de cada grupo selecionados para fazer parte de cada análise foram selecionados aleatoriamente. Não se realizou controlo de confundidores.

Item 5:

Página 5, “All animal handling was performed by in-house personnel under veterinarian supervision and the research team was blinded, receiving only relevant experimental data and necessary biologic materials.”

Item 6:

Página 4, “In the present study, we attempted to analyze the role of metformin in the AMPK/SIRT1/PGC-1 α /SIRT3 oxidative stress-responsive pathway in the heart of a mice model of endometriosis. As well, we aimed to identify the miRNAs involved in the regulation of this pathway.”

Página 10, “To understand whether endometriosis and/or metformin have an impact on the AMPK/SIRT1/PGC1- α /SIRT3 oxidative stress-responsive pathway in the heart, we conducted a semi-quantification of the protein expression levels through western blotting.”

Item 7:

Página 9, “Statistical analysis of protein expression was conducted using a one-way Analysis of Variance (ANOVA) test, followed by a multiple comparisons test utilizing Bonferroni’s Correction. Results are presented as mean $\pm$ SEM, with $p < 0.05$ considered statistically significant.”

Item 8:

Página 5: “Female B6CBA/F1 mice, the first generation (*F1*) progeny of a cross between male C57BL/6J and female CBA/CaCrI (Charles River Laboratories, Les Oncins, France) resistant to the after-effects of surgical procedures, were bred and housed at the i3S Animal Facility under pathogen-free conditions.”

Item 9:

Página 5, “During experiments, animals were maintained under a 12-h light/dark cycle in a temperature- and humidity-regulated room (22 ± 2 °C, $55 \pm 5\%$, respectively) with free access to water and standard rodent chow.”

Página 5, “Endometriosis was surgically induced¹ in animals of groups E and EM at 6-8 weeks of age, by heterologous transplantation of endometrium from one donor onto the peritoneum of receptors from the same strain of mice, according to a previously described protocol². The endometriosis-like phenotype was confirmed by ultrasound visualization of the implants. Animals from groups C and M were subject to a sham operation. Metformin (Alfa Aesar Chemicals, Massachusetts, USA) was administered orally in drinking water, in a dosage of 50mg/kg/day for 3 months to mice from groups M and EM. After this time, animals were euthanized, and the hearts were collected and divided in two equivalent halves. One half of each heart was immediately placed into liquid nitrogen and then stored at -80°C for molecular analysis. The other half was fixed with 4%-buffered formaldehyde, dehydrated, and then embedded in paraffin wax to use in microscopy studies.”

Item 10:

Página 9, Results, subseção “Dual immunolabeling of SIRT1 and SIRT3 in the heart”

Página 10, Results, subseção “Western Blotting semi-quantification of pAMPK α , AMPK α , SIRT1, SIRT3, PGC-1 α , SOD2 and GPx1 α ”

Página 11, Results, subseção “Quantification of expression of miR-34a, miR-195, miR-217, miR-155 and miR421 by Real-Time PCR”

Recommended Set:

Item 11:

Página 1, Abstract.

Item 12:

Página 2, Introduction.

Item 13:

Página 4, “In the present study, we attempted to analyze the role of metformin in the AMPK/SIRT1/PGC-1 α /SIRT3 oxidative stress-responsive pathway in the heart of a mice model of endometriosis. As well, we aimed to identify the miRNAs involved in the regulation of this pathway.”

Item 14:

Página 4, “All animal procedures were undertaken according to the European Community Guidelines (86/609/EEC) and the Portuguese Act (129/92) for the use of experimental animals and were approved by the i3S Animal Ethics Committee and the Portuguese Competent Authority (DGAV – Direcção-Geral de Alimentação e Veterinária).”

Item 15:

Página 5, “(...) were bred and housed at the i3S Animal Facility under pathogen-free conditions. (...) During experiments, animals were maintained under a 12-h light/dark cycle in a temperature- and humidity-regulated room (22 ± 2 °C, $55 \pm 5\%$, respectively) with free access to water and standard rodent chow.”

Item 16:

De acordo com o protocolo verificado pela DGAV, enviado em anexo, foram definidos limites críticos para a gestão dos animais envolvidos no protocolo.

Item 17:

Página 11, Discussion.

Item 18:

Página 11, Discussion.

Item 19:

Protocolo previamente validado pela DGAV e Comissão de Ética Animal e Órgão Responsável pelo Bem-Estar dos Animais do i3S. Certificado e protocolo do projeto em anexo.

Item 20:

Página 15, Study Data Availability.

Item 21:

Página 15, Conflicts of Interest.



Projeto com experimentação animal/Project with animal experimentation

Vimos por este meio certificar que o projeto

Role of metformin in the control of oxidative stress and infertility in endometriosis

sob a responsabilidade de / coordenado por

Delminda Neves

com referência interna

nº 2018/27

foi revisto pela Comissão de Ética Animal e Órgão Responsável pelo Bem-Estar dos Animais do i3S. Os protocolos estão de acordo com as regras internas da instituição e o pedido de autorização está a ser submetido à Autoridade Competente DGAV.

This is to certify that the project

Role of metformin in the control of oxidative stress and infertility in endometriosis

under the responsibility of / coordinated by

Delminda Neves

internal reference

nº 2018/27

has been reviewed by the Animal Ethics Committee and Animal Welfare Body of the i3S. The protocols are in agreement with in-house standards and rules for animal experimentation and a request for authorization is being submitted to the competent authority, DGAV.

Pela Comissão de Ética Animal e Órgão Responsável pelo Bem-Estar dos Animais do i3S /

For the Animal Ethics Committee and the Animal Welfare Body

Porto 14 January 19

Anna Olsson

Secretária Executiva / Executive Secretary

Sofia Lamas

Attending Veterinarian / Médica Veterinária Responsável

INSTITUTO
DE INVESTIGAÇÃO
E INOVAÇÃO
EM SAÚDE
UNIVERSIDADE
DO PORTO

Rua Alfredo Allen, 208
4200-135 Porto
Portugal
+351 220 408 800
info@i3s.up.pt
www.i3s.up.pt



FORMULÁRIO PARA PEDIDO DE AUTORIZAÇÃO DE PROJETO DE UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA FINS CIENTÍFICOS

Este formulário inclui sete secções:

- **Secção 1:** Detalhes administrativos sobre o projeto, pessoas e estabelecimentos envolvidos
- **Secção 2:** Informações sobre o projeto
- **Secção 3:** Objetivos e benefícios potenciais do projeto
- **Secção 4:** Informações sobre os animais
- **Secção 5:** Informações sobre os procedimentos e o desenho experimental
- **Secção 6:** Resumo não técnico do projeto
- **Secção 7:** Declaração de responsabilidades

Todas as questões têm que ser respondidas, mesmo que a sua resposta seja “Não Aplicável” ou os campos do formulário que não serão utilizados para resposta, são devidamente rasurados.

As respostas têm que ser redigidas com texto bem legível e em português.

SECÇÃO 1: DETALHES ADMINISTRATIVOS SOBRE O PROJETO, PESSOAS E ESTABELECIMENTOS ENVOLVIDOS

REFERÊNCIA DO PROJETO

1.1. Título do projeto de utilização de animais:

Role of metformin in the control of oxidative stress and infertility in endometriosis

1.2. Nome do investigador responsável pela realização do projeto:

Delminda Neves Lopes de Magalhães

ENTIDADE E ESTABELECIMENTO/LOCAL

1.3. Entidade. Indicar a entidade que levará a cabo o projeto de utilização de animais:

I3S – Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, Universidade do Porto

1.4. Este projeto envolve a colaboração com outras entidades? Se sim, forneça o nome das entidades envolvidas e detalhes da colaboração.

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto – as amostras biológicas recolhidas dos animais serão analisadas nesta instituição.

1.5. Utilizador. Indicar o nome do utilizador que levará a cabo o projeto de utilização de animais:

Ana Catarina Neto Cerqueira e Delminda Neves Lopes de Magalhães

1.6. Estabelecimento(s) onde os animais serão alojados e onde serão realizados procedimentos:

I3S – Instituto de investigação e Inovação em Saúde, Universidade do Porto

1.7. No caso de a realização dos procedimentos se pretender fazer num **local diferente de um estabelecimento de um utilizador**, indique qual e forneça uma **justificação científica** para isso acontecer.

Não aplicável

PESSOAS

1.8. Investigador responsável:

Nome:	Delminda Neves Lopes de Magalhães
Qualificações académicas:	Doutoramento em Biologia Humana
Funções desempenhadas na entidade referida em 1.3.:	Professora Associada
Entidade/Departamento onde trabalha:	Faculdade de Medicina da Universidade do Porto / Departamento de Biomedicina
Morada:	Alameda Prof. Hernâni Monteiro 4200-319 Porto
Telefone:	22 04 26 747
Telefax:	22 551 36 55
Endereço email:	delmagal@med.up.pt
Tem/teve algum projeto autorizado nos últimos 5 anos? Se sim, qual a designação e data de autorização:	Não
Refira se tem formação em “ciência de animais de laboratório” e, se sim, liste os cursos que frequentou (com referência à data e local de realização):	Course in Laboratory Animal Science: 7 de Abril a 9 de Maio de 2008 Curso realizado no Instituto de Biologia Molecular e Celular da Universidade do Porto (80 horas). O programa do curso seguiu as recomendações da FELASA para a educação e treino de pessoas que trabalhem com animais de laboratório, de categoria C.
Refira a data de autorização emitida pela DGAV como pessoa para executar determinadas funções (por exemplo, conceção de procedimentos e projetos, realização de procedimentos em animais, etc.):	O certificado de creditação da DGAV data de 2 de Junho de 2008

1.9. Pessoa responsável pela realização de procedimentos nos animais:

Nome:	Ana Catarina Neto Cerqueira
Qualificações académicas:	Mestrado em Medicina e Oncologia Molecular
Funções desempenhadas no projeto de utilização de animais (por exemplo, realização de procedimentos em animais, prestação de cuidados a animais):	Realização de procedimentos em animais
Se for estudante, indicar o estatuto: (ex., sem licenciatura/mestrado/PhD/outros)	Estudante PhD
Entidade/Departamento onde trabalha/estuda:	Faculdade de Medicina da Universidade do Porto/



	Departamento de Biomedicina
Morada:	Alameda Prof. Hernâni Monteiro 4200-319 Porto
Telefone:	22 04 26 745
Telefax:	22 551 36 55
Endereço email:	caty.neto@gmail.com
Descreva a sua experiência e competência na manipulação e/ou envolvimento na utilização de animais:	
Refira se tem formação em “ciência de animais de laboratório” e, se sim, liste os cursos que frequentou (com referência à data e local de realização):	“Introductory course in laboratory animal Science” Local: I3S – Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, Universidade do Porto – Outubro a Janeiro de 2018
Refira a data de autorização emitida pela DGAV como pessoa para executar determinadas funções (por exemplo, conceção de procedimentos e projetos, realização de procedimentos em animais, etc.):	Licença será pedida em breve

1.10. Outras pessoas envolvidas:

Nome:	Delminda Neves Lopes de Magalhães
Qualificações académicas:	Doutoramento em Biologia Humana
Funções desempenhadas no projeto de utilização de animais (por exemplo, realização de procedimentos em animais, prestação de cuidados a animais):	Realização de procedimentos em animais
Se for estudante, indicar o estatuto: (ex., sem licenciatura/mestrado/PhD/outros)	
Entidade/Departamento onde trabalha/estuda:	Faculdade de Medicina da Universidade do Porto / Departamento de Biomedicina
Morada:	Alameda Prof. Hernâni Monteiro 4200-319 Porto
Telefone:	22 04 26 747
Telefax:	22 551 36 55
Endereço email:	delmagal@med.up.pt
Descreva a sua experiência e competência na manipulação e/ou envolvimento na utilização de animais:	Experimentação animal em roedores durante e após o seu doutoramento e orientação de estudantes de doutoramento e mestrado.
Refira se tem formação em “ciência de animais de laboratório” e, se sim, liste os cursos que frequentou (com referência à data e local de realização):	Course in Laboratory Animal Science: 7 de Abril a 9 de Maio de 2008 Curso realizado no Instituto de Biologia Molecular e Celular da Universidade do Porto (80 horas). O programa do curso seguiu as recomendações da FELASA para a educação e treino de pessoas que trabalhem com animais de laboratório, de categoria C.



Refira a data de autorização emitida pela DGAV como pessoa para executar determinadas funções (por exemplo, conceção de procedimentos e projetos, realização de procedimentos em animais, etc.):	O certificado de creditação da DGAV data de 2 de Junho de 2008
--	--

Para cada pessoa adicional, copiar a tabela 1.10. e preencher em conformidade

SECÇÃO 2: INFORMAÇÕES SOBRE O PROJETO

CONTINUAÇÃO DE PROJETO/UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS

2.1. Continuação de projeto/utilização de animais. Se pretende obter uma autorização para continuar o trabalho desenvolvido noutro projeto/utilização de animais previamente autorizado, refira a designação do mesmo(a), a data de autorização e a data de término.

Não

DATAS DO PROJETO

2.2. Datas do projeto:

Especifique a duração requerida para a autorização do projeto/utilização de animais ⁽¹⁾ :	5 anos
Data proposta para o início:	1/01/2019
Data prevista para o término:	31/12/2023

⁽¹⁾ De notar que, de acordo com o n.º 3, do artigo 46.º do Decreto-Lei, a duração máxima permitida para a realização de um projeto é de cinco anos.

SUBMISSÃO DO PROJETO AO ÓRGÃO RESPONSÁVEL PELO BEM-ESTAR DOS ANIMAIS

2.3. O projeto foi previamente submetido ao Órgão responsável pelo bem-estar dos animais (ORBEA) do estabelecimento onde os animais vão estar alojados? Se sim, anexe, ao presente pedido de autorização, o parecer não vinculativo emitido pelo ORBEA sobre o projeto em apreço.

Sim

FINANCIAMENTO E RECURSOS PARA A REALIZAÇÃO DO PROJETO

2.4. Financiamento e recursos para realização do projeto. Indique se dispõe de financiamento e de recursos adequados (por ex., instalações, equipamento, staff, conhecimento adequado, etc.) para realização deste projeto e descreva sumariamente. Se dispõe de financiamento, indique qual a entidade financiadora.

O Biotério do I3S dispõe de instalações e equipamento adequados e de pessoal qualificado para o alojamento/manutenção dos roedores a utilizar nas experiências e para a realização dos procedimentos experimentais a executar no projeto. Os membros da equipa de investigação, nomeadamente o investigador principal, possuem competências adequadas para a execução dos procedimentos experimentais.

RISCOS DE SAÚDE E/OU SEGURANÇA PARA OUTROS ANIMAIS, PESSOAS OU PARA A COMUNIDADE

2.5. O projeto envolve riscos de saúde e/ou de segurança para outros animais alojados nas instalações, pessoas ou para a comunidade?



Se sim, indique quais dos seguintes riscos de saúde e/ou de segurança estão envolvidos com o projeto, forneça detalhes e refira que medidas foram tomadas para minimizar esses riscos.

x	Gases anestésicos	Isoflurano (Isoflurano em máquina de anestesia volátil com sistema de filtros).
	Carcinogénios ou teratogénios	Não
	Material químico perigoso ou substâncias citotóxicas (não incluindo os gases anestésicos)	Não
	Organismos ou materiais biologicamente perigosos (por exemplo, vírus, bactérias, fungos, etc.). Especifique que grau de risco biológico está associado ao organismo.	Não
	Risco de radiação	Não
	Potenciais zoonoses	Não
	Outros	Não

SECÇÃO 3: OBJECTIVOS E BENEFÍCIOS POTENCIAIS DO PROJETO

3.1. O artigo 5º do Decreto-Lei requer que um programa de trabalho utilizando animais seja realizado para os seguintes **fins**. Para o efeito, deverá seleccionar o que se aplicar ao projeto proposto:

x	a) Investigação fundamental
x	b) Investigação translacional ou aplicada, tendo em vista um dos seguintes fins:
x	i. A prevenção, a profilaxia, o diagnóstico ou o tratamento de doenças, de problemas de saúde ou de outras situações anormais ou dos seus efeitos nos seres humanos, nos animais ou nas plantas;
	ii. A avaliação, a deteção, a regulação ou a alteração das condições fisiológicas nos seres humanos, nos animais ou nas plantas;
	iii. O bem-estar dos animais e a melhoria das condições de produção dos animais criados para fins agrícolas;
	c) Desenvolvimento, produção ou controlo da qualidade, da eficácia e da segurança de medicamentos, géneros alimentícios, alimentos para animais e outras substâncias ou produtos, para um dos objetivos mencionados na alínea b);
	d) Proteção do ambiente natural no interesse da saúde ou do bem-estar do homem ou dos animais;
	e) Investigação destinada à conservação das espécies;
	f) Ensino superior ou formação para aquisição, manutenção ou melhoria das qualificações profissionais;
	g) Inquéritos no domínio da medicina legal.

3.2. Faça uma **descrição do contexto global** do projeto seleccionando uma de entre as seguintes hipóteses e respondendo às questões:

x	<u>Para investigação:</u> Qual é a posição atual do projeto na área de trabalho e de que modo o mesmo irá ajudar a acrescentar conhecimento, progresso ou colmatar uma necessidade clínica, por exemplo, relativamente ao estado atualmente existente? A infertilidade, definida como a ausência de concepção após um ano de relações sexuais regulares desprotegidas, é atualmente considerada um problema de saúde pública que motiva uma demanda crescente de Tecnologia Reprodutiva Assistida, cujo sucesso global é de cerca de 30%. Uma das principais causas de infertilidade em mulheres jovens (40%) e que afeta 5-15% das mulheres em idade reprodutiva é a endometriose, uma doença ginecológica caracterizada por crescimento de tecido endometrial vascularizado ectópico, principalmente na cavidade pélvica. Apesar da incapacidade causada pela endometriose, a resposta terapêutica é ainda escassa, baseando-se fundamentalmente na supressão da função ovárica usando agonistas da hormona libertadora de gonadotropina (GnRH), moduladores seletivos dos recetores de progesterona ou inibidores da aromatase, tratamentos que se tem mostrado ineficazes na melhoria da fertilidade em pacientes com endometriose. A fisiopatologia da endometriose compreende uma resposta inflamatória, proliferação celular, migração e invasão e angiogénese. Existe uma forte convicção de que o stress oxidativo (SO) está envolvido na indução da inflamação, seja pelo aumento de espécies reativas de oxigénio (ROS) ou pela redução das defesas antioxidantes. Na verdade, um aumento dos níveis de ROS e das modificações oxidativas nas proteínas e a diminuição da
---	---

	capacidade antioxidante total foi reportado no soro e no líquido peritoneal de pacientes com endometriose. Curiosamente, esta condição parece ser contrariada nos tecidos do aparelho reprodutor, tais como células endometriais, granulosa e <i>cumulus oophorus</i> pela sobre-expressão da enzima superóxido dismutase. A endometriose também se associa a um desequilíbrio em microRNAs produzidos tanto em tecidos eutópicos e ectópicos endometriais que afetam a progressão da doença, a angiogénese e a condição reprodutiva. As pacientes com endometriose geralmente recorrem a tratamentos de procriação medicamente assistida (PMA), principalmente devido ao insucesso dos tratamentos com agonistas / antagonistas da hormona libertadora de gonadotropina na fertilidade. A avaliação da qualidade dos ovócitos constitui uma grande preocupação para o sucesso da PMA. A qualidade dos ovócitos pode ser influenciada pela composição do líquido folicular (LF), considerando que este contém proteínas, fatores de crescimento e microRNAs que modulam a maturação dos ovócitos e a ovulação. Além disso, o LF é facilmente colhido durante a obtenção de ovócitos pelas técnicas de reprodução assistida, constituindo uma fonte ótima de biomarcadores de qualidade de ovócitos e de maior sucesso de intervenção. Em concordância com o que se observa nas mulheres, a endometriose também diminui a qualidade dos ovócitos e o sucesso da gravidez em roedores, sem afetar o número de ovulações. Assim, os modelos animais de endometriose constituem uma ferramenta valiosa para elucidar a fisiopatologia da doença e putativas terapias farmacológicas. A metformina é um fármaco amplamente utilizado para o tratamento da diabetes tipo 2, reduzindo a glicose sérica, o stress oxidativo e também biomarcadores inflamatórios no sangue, e conduzindo a um aumento generalizado na síntese de microRNAs. Além disso, foi recentemente relatado que, devido às suas propriedades antioxidantes, a metformina induz a regressão de implantes endometriais num modelo de endometriose de ratos. A suplementação de metformina em culturas de células de estroma humano derivadas de endometriomas de ovário também reduz a proliferação celular, a secreção pró-inflamatória de citocinas e a produção de estrogénio, evidenciando a sua ação anti-inflamatória. Apesar desse efeito promissor no controlo da progressão da endometriose, o seu efeito na fertilidade no modelo animal e em pacientes com endometriose ainda é desconhecido. Por outro lado, a metformina tem sido utilizada com segurança e sucesso no controlo da diabetes gestacional sem efeitos colaterais para a mulher ou o embrião, e também no tratamento da infertilidade associada à síndrome de ovário policístico. Além disto, a metformina parece ter um papel protetor para distúrbios da gravidez, incrementando a ovulação e reduzindo o número de abortos. Neste projeto, procuramos estudar o efeito da metformina, um fármaco antidiabético com propriedades antioxidantes, amplamente utilizado no controlo da síndrome do ovário policístico, num modelo de indução de endometriose no murganho. Assim, postulamos que a metformina diminui o desequilíbrio oxidativo e a resposta inflamatória, induz regressão de endometriomas e secreção de estrogénio e que poderá ser usada como uma abordagem farmacológica válida para melhorar a infertilidade associada à endometriose.
	<u>Para satisfazer requisitos regulamentares:</u> Quais são os requisitos ou as <i>guidelines</i> regulamentares relevantes?
	<u>Para fins de produção ou diagnóstico:</u> Quais são os prováveis pedidos que justifiquem a necessidade do produto ou do serviço durante o tempo da autorização do projeto?
	<u>Para ensino:</u> Quais são as necessidades de formação subjacentes ao pedido de utilização de animais?

--	--

3.3. Faça uma descrição dos objetivos do projeto. O que é proposto alcançar, descobrir ou produzir com a realização deste projeto? Os objetivos devem ser específicos para o projeto em apreço, realistas e alcançáveis.

O principal objetivo do trabalho é perceber se a metformina poderá constituir uma abordagem farmacológica válida para melhorar a infertilidade associada à endometriose, atenuando o stress oxidativo, a angiogénese, a resposta inflamatória, a regressão dos endometriomas e a regulação da produção de estrogénios nos ovários e endometriomas.

3.4. Refira quais são os benefícios prováveis deste projeto e a razão por que valerão a pena para contrabalançar o sofrimento e efeitos adversos infligidos aos animais a envolver no projeto?

Com este projeto pretende-se determinar o efeito da administração oral de metformina, no desenvolvimento de lesões endometriais, determinando alvos moleculares da metformina envolvidos na infertilidade relacionada com a endometriose.

Sendo que nenhum dos animais será sujeito a procedimentos com severidade superior a moderada, consideramos que estes são bem contrabalançados pelos benefícios esperados.

3.5. Liste algumas referências bibliográficas e/ou **guidelines regulamentares** que suportem a necessidade do projeto e/ou os benefícios prováveis indicados para o mesmo, assim como de quaisquer modelos específicos propostos para serem utilizados nos procedimentos a realizar.

Medicine PCotASfR. Endometriosis and infertility. Fertil Steril. 2004;82 Suppl 1:S40-5.

Cohen J, Ziyat A, Naoura I, Chabbert-Buffet N, Aractingi S, Darai E, et al. Effect of induced peritoneal endometriosis on oocyte and embryo quality in a mouse model. J Assist Reprod Genet. 2015;32(2):263-70.

Soares SR, Martínez-Varea A, Hidalgo-Mora JJ, Pellicer A. Pharmacologic therapies in endometriosis: a systematic review. Fertil Steril. 2012;98(3):529-55.

Hughes E, Brown J, Collins JJ, Farquhar C, Fedorkow DM, Vandekerckhove P. Ovulation suppression for endometriosis. Cochrane Database Syst. Rev. 2007

SECÇÃO 4: INFORMAÇÕES SOBRE OS ANIMAIS**APLICAÇÃO DOS 3Rs****REPLACEMENT (SUBSTITUIÇÃO)**

4.1. Explique por que não é possível alcançar os objetivos do projeto através da utilização de métodos alternativos que não utilizem animais e indique que fontes e referências bibliográficas consultou para encontrar possíveis alternativas:

O trabalho a realizar tem por objetivo verificar se a metformina poderá ser uma abordagem farmacológica válida para melhorar a infertilidade associada à endometriose. Assim, pretende-se determinar o efeito da administração oral da metformina no desenvolvimento de lesões endometriais, estudando os alvos moleculares deste fármaco envolvidos na infertilidade relacionada com a endometriose. Uma parte das experiências deste projeto prescindirá do uso de modelos animais, isto é, parte das avaliações serão feitas em amostras humanas (no caso, líquido folicular e soro). No entanto, os órgãos do aparelho reprodutor, não acessíveis para estudo no caso das pacientes, têm propriedades emergentes que só são observadas no organismo funcionando como um todo.

Assim, é necessário recorrer ao uso de modelos animais, quer para validar os resultados obtidos com amostras humanas, quer para avaliar o efeito da metformina na fertilidade. Apesar da evolução verificada na engenharia de órgãos e tecidos, ainda não dispomos de modelos suficientemente eficientes para substituir o uso de animais. A utilização de um modelo animal é assim imprescindível, uma vez que os estudos em linhas celulares não poderão esclarecer o papel de um fármaco que apresenta efeitos pleiotrópicos em diferentes tecidos do organismo. Sendo objetivo deste trabalho estudar a possibilidade de uma nova aplicação de um fármaco já existente, a confirmação do benefício e ausência de efeitos indesejados terá sempre de ser avaliada previamente em modelo animal.

4.2. Que alternativas (totais ou parciais) considerou e irão ser utilizadas para alcançar os objetivos do projeto? Indique as fontes consultadas.

O projeto descrito contempla a realização de experiências em líquido folicular e soro humanos como método complementar aos estudos *in vivo* envolvendo os murganhos.

REDUCTION (REDUÇÃO)

4.3. Número de animais a serem utilizados.

90

4.4. Forneça justificação sobre o número de animais a ser utilizado, especificando os princípios do desenho experimental usados para calcular o número de animais a incluir em cada grupo experimental ou de tratamento, incluindo grupos controlo, de cada um dos procedimentos que farão parte do projeto. Indique quais as fontes de aconselhamento consultadas para esse efeito.

Estima-se que serão usadas 40 fêmeas no procedimento experimental distribuídas em quatro grupos (10 animais com indução de endometriose que farão tratamento com metformina; 10 animais com indução endometriose sem tratamento; 10 animais sem indução de endometriose que farão tratamento com metformina; 10 animais sem indução de endometriose sem tratamento). Metade dos animais de cada grupo será utilizada para acasalamento, tendo em vista a tarefa de avaliar a fertilidade.

Estima-se também a utilização de 8 fêmeas para a validação do método ecográfico. Estimamos também a utilização de 6 fêmeas dadoras de tecido endometrial, e 10 machos para o acasalamento. A soma de todos os grupos experimentais é de 64 animais, sendo que o pedido de 90 animais permite a repetição de algum grupo experimental no caso de vir a ser necessário.

4.5. Foi considerada alguma colaboração com outro estabelecimento (interno ou externo) para reduzir o número de animais utilizados (utilização conjunta dos animais) (por exemplo, diferentes órgãos do mesmo animal são usados em mais de um laboratório)?

Para além dos órgãos do aparelho reprodutor que serão utilizados neste projeto, todos os outros órgãos serão recolhidos para posterior análise, sendo que os cérebros serão cedidos e analisados por um outro grupo de investigação. Também alguns órgãos destes animais serão utilizados em dois projetos destinados a estudantes de Mestrado integrado em Medicina da FMUP.

REFINEMENT (REFINAMENTO)

4.6. Forneça informações sobre a escolha da espécie animal, procedimento(s) e limites críticos e explique por que razão são os mais refinados para o objetivo requerido.

A escolha dos murganhos B6CBA/F1 prende-se com o facto de serem um modelo de eleição para o transplante de tecidos, sendo que apresentam níveis baixos de rejeição.

Os procedimentos incluem o transplante de tecido uterino de murganhos dadoras para a cavidade peritoneal das recetoras, sem dano do sistema reprodutor das recetoras. Incluem ainda a administração por via oral de metformina. Estes procedimentos apresentam um efeito de severidade ligeiro-moderado.

Em todos os casos serão implementados limites críticos (human endpoints) como descrito na secção 5.

4.7. Para cada procedimento do projeto, forneça detalhes sobre como minimizar o sofrimento dos animais a envolver.

Todas as manipulações são feitas por pessoal treinado e creditado para o efeito e com experiência na técnica em questão, seguindo as recomendações de boas práticas internacionais no que diz respeito a procedimentos e administração de fármacos.

Os animais são alojados no biotério do I3S que está sob acreditação da DGAV e tratados por pessoas bem treinadas e experientes, incluindo uma médica veterinária.

As cirurgias serão efetuadas sob assepsia cirúrgica, com analgesia (buprenorfina) via subcutânea, a incisão será mínima, e a cirurgia assim como a recuperação do animal será efetuada em mantas de aquecimento, de forma a minimizar o desconforto do animal. Nas 72h após cirurgia, será administrada analgesia (buprenorfina) de 12/12h, por via subcutânea.

As ecografias serão efetuadas sob anestesia volátil (Isoflurano), utilizando também manta de aquecimento para manter a temperatura corporal do animal.

A administração da metformina será efetuada por via oral, misturada na água, trocando o biberão de dois em dois dias, durante três meses.

4.8. Para cada um dos procedimentos em que se preveja infligir uma severidade de grau Moderado ou Severo aos animais, justifique a razão para que a realização dos mesmos seja necessária.

1. Somente o procedimento cirúrgico de indução de endometriose é de severidade Moderada, não havendo nenhum com grau superior.

A realização deste procedimento tem como objetivo a indução cirúrgica da patologia a estudar (endometriose), através do implante de tecido endometrial na cavidade peritoneal.

4.9. Uma vez iniciado o projeto, os animais vivos serão removidos da instalação onde estão alojados? Se sim, explique qual a razão, indique como será feito o transporte, para que local serão levados, por quanto tempo e se retomam para a instalação de origem ou para outra.

Não aplicável

ANIMAIS

4.10. Espécie animal a utilizar no projeto.

Murganho

4.11. Irão ser utilizadas formas fetais de mamíferos ou formas larvares de alimentação autónoma? Se sim, especifique.

Não aplicável

4.12. Estirpe(s) a utilizar.

B6CBA/F1

4.13. Estatuto genético dos animais a utilizar:

x	Tipo selvagem
	Geneticamente alterados sem fenótipo nocivo
	Geneticamente alterados com fenótipo nocivo.

4.14. Animais geneticamente alterados. Especifique se o projeto em apreço envolve:

	A utilização de animais geneticamente alterados de linhagens existentes e sem problemas de bem-estar (sem fenótipo nocivo). - Descreva brevemente o(s) gene(s) e a função do gene(s) que foi alterado(s) e qual a razão por que este mapa genético é essencial para o seu projeto. - Quais os efeitos adversos esperados e não esperados para os animais que serão submetidos aos procedimentos do projeto. - Que cuidados especiais (médico-veterinários, de manejo, alojamento, etc.) poderão ser considerados utilizar tendo em conta a ocorrência desses efeitos adversos.
	Não aplicável
	A utilização de animais geneticamente alterados de linhagens existentes e com problemas de bem-estar (com fenótipo nocivo). - Descreva brevemente o(s) gene(s) e a função do gene(s) que foi alterado(s) e qual a razão por que este mapa genético é essencial para o seu projeto. - Descreva o impacto da alteração do genótipo no bem-estar do animal. - Quais os efeitos adversos esperados e não esperados para os animais que serão submetidos aos procedimentos do projeto. - Que cuidados especiais (médico-veterinários, de manejo, alojamento, etc.) poderão ser considerados utilizar tendo em conta o fenótipo dos animais e/ou a ocorrência de efeitos adversos.

	Não aplicável
	Criação de uma nova linhagem de animais geneticamente alterados. - Descreva brevemente o(s) gene(s) e a função do gene(s) que foi alterado(s) e qual a razão por que este mapa genético é essencial para o seu projeto. - Descreva o impacto esperado da alteração do genótipo no bem-estar do animal. - Que cuidados especiais (médico-veterinários, de manejo, alojamento, etc.) poderão ser considerados utilizar tendo em conta o fenótipo esperado dos animais.
	Não aplicável

4.15. Origem dos animais (estabelecimento, país, etc.)

Biotério I3S (Portugal)

4.16. Os animais a serem utilizados neste projeto foram **especificamente criados para serem utilizados para fins científicos**? Se não, forneça uma justificação científica sobre as razões pelas quais os animais a utilizar neste projeto não foram especificamente criados para fins científicos.

Sim

4.17. Os animais a serem utilizados neste projeto foram **capturados no meio selvagem**? Se sim, forneça uma justificação científica sobre as razões pelas quais os animais precisam de ser capturados no meio selvagem.

Não

Se sim, tem um parecer favorável emitido pelo Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas para a captura dos animais? Em caso afirmativo, anexe a este pedido de autorização de projeto, cópia desse mesmo parecer.

Não aplicável

4.18. Os animais a serem utilizados neste projeto são **errantes ou assilvestrados de alguma espécie animal doméstica**? Se sim, forneça uma justificação científica sobre as razões pelas quais um animal errante ou assilvestrado de uma espécie doméstica precisa de ser utilizado neste projeto.

Não

4.19. Os animais a serem utilizados neste projeto pertencem a alguma **espécie ameaçada de extinção**? Se sim, forneça uma justificação científica sobre as razões pelas quais é necessário utilizar uma espécie ameaçada de extinção neste projeto.

Não

CARACTERÍSTICAS DO MANEIO A PRESTAR AOS ANIMAIS

4.20. No caso de ser feito enriquecimento ambiental ao alojamento dos animais, descreva-o.

As caixas de reprodução possuem um abrigo de cartão e papel de ninho; as caixas de manutenção têm papel de ninho e rolos de papel.

4.21. Os animais a utilizar no projeto necessitam de condições de alojamento especiais? Se sim, especifique que condições e justifique a necessidade das mesmas terem que ser utilizadas.



Não

4.22. Os animais a utilizar no projeto necessitam de dieta alimentar ou de abeberamento especiais?

Se sim, especifique.

Sim, durante o tratamento com metformina necessitam da utilização de biberões com metformina diluída de forma a disponibilizar diariamente a cada animal a dose de 50mg/k, os biberões serão trocados de dois em dois dias.

4.23. Os animais a utilizar no projeto necessitam de prestação de cuidados ou de atenção especiais? Se sim, especifique.

Não

4.24. Os animais serão alojados individualmente? Se sim, forneça detalhes das circunstâncias, período de tempo e justificação para que se faça o alojamento individual.

Não

REUTILIZAÇÃO DE ANIMAIS

4.25. Algum dos animais a utilizar neste projeto foi previamente usado num outro estudo/utilização para fins científicos? Se sim, em que condições? Justifique a necessidade de envolvimento do mesmo neste projeto.

De notar que para um animal poder ser reutilizado, têm que estar satisfeitas as condições referidas nas alíneas a) a d), do ponto 1, do artigo 16º, do Decreto-Lei nº 113/2013. Assim, forneça informações sobre: o título do projeto prévio em que foi utilizado, a severidade efetiva do procedimento a que ficou sujeito, estado geral de saúde e de bem-estar do animal, parecer médico-veterinário sobre o envolvimento do animal num novo procedimento, tendo em conta a duração de vida do animal.

Não

SESSÃO 5: INFORMAÇÕES SOBRE OS PROCEDIMENTOS E O DESENHO EXPERIMENTAL

SEQUÊNCIA DE ACONTECIMENTOS

5.1. Faça uma descrição completa e exata, acompanhada por uma linha temporal, de todos os eventos e procedimentos (devidamente identificados e numerados) que irão acontecer a cada animal (ou grupo de animais), desde a altura em que são obtidos até à altura em que o projeto é finalizado.

No caso de melhorar a clareza da descrição do plano do projeto, ilustre as diferentes etapas acima mencionadas com um fluxograma ou um esquema.

Tarefa 1 – Indução de endometriose através da implantação de tecido endometrial na cavidade peritoneal.

Para a realização deste procedimento, será eutanasiada uma fêmea de murganho B6CBA/F1 dadora de tecido endometrial, de 8-10 semanas, para cada 4 fêmeas recetoras. Assim, a fêmea será eutanasiada através de deslocamento cervical e serão recolhidos os cornos uterinos que serão colocados em soro fisiológico a 37°C, e abertos longitudinalmente, expondo a camada endometrial, e cortados fragmentos de cerca de 3mm que serão implantados nas fêmeas recetoras (**Procedimento 1**). Sob anestesia volátil com Isoflurano, 20 animais receberão dois implantes, na cavidade peritoneal, dos fragmentos previamente recolhidos de tecido endometrial, um do lado direito e outro do lado esquerdo (**Procedimento 2 e 3**). Sob anestesia volátil com Isoflurano 20 animais serão sujeitos à cirurgia descrita no **Procedimento 3**, sendo que nestes animais não será implantado qualquer tecido, apenas será realizada a sutura na cavidade peritoneal – grupo controlo (**Procedimento 3**).

Tarefa 2 – Validação por Laparotomia do método ecográfico.

Para a realização deste procedimento serão utilizadas 8 fêmeas que terão recebido implantes na cavidade peritoneal (**Procedimento 2**) e onde serão efetuadas ecografias, sob anestesia volátil e efetuadas medições dos implantes, um mês após a cirurgia. Posteriormente, e para validação do método ecográfico, estas fêmeas serão sujeitas a uma pequena cirurgia, sob anestesia volátil, onde será aberta a cavidade peritoneal de forma a visualizar e medir os implantes para comparação e assim validação do método ecográfico (**Procedimento 2**).

Tarefa 3 – Avaliação da progressão da endometriose, tratamento com metformina, e avaliação da fertilidade

Um mês após a cirurgia e até ao final do projeto será efetuada uma ecografia por mês para a monitorização dos implantes nos 20 animais com implante (**Procedimento 3**). Quatro semanas após a cirurgia, o grupo com indução de endometriose será subdividido em 2 subgrupos de 10 animais, e durante 3 meses um subgrupo receberá oralmente 50mg/kg/dia de metformina dissolvida na água. O grupo controlo será também subdividido em dois subgrupos, com 10 animais cada, e durante 3 meses um subgrupo receberá pela via descrita 50mg/kg/dia de metformina. Os subgrupos sem tratamento não terão qualquer adição na água. (**Procedimentos 2, 3 e 4**). Os 20 animais que não serão acasalados serão sacrificados 24 horas após o final do tratamento por punção cardíaca para colheita do sangue, seguida de deslocamento cervical

Vinte e quatro horas após o final do tratamento, 5 animais de cada subgrupo serão colocadas em caixas de acasalamento. No 18º dia de gestação, as fêmeas serão pesadas e sacrificadas por punção cardíaca para colheita do sangue, seguida de deslocamento cervical (**Procedimentos 3 e 4**). Serão recolhidos os órgãos do sistema reprodutor (ovários e cornos uterinos), assim como todos os restantes órgãos do animal. A massa dos tecidos recolhidos será determinada. Estes serão divididos

e imediatamente congelados a -80°C e -20°C para posterior análise de expressão génica e proteica, respetivamente. Parte dos tecidos serão incluídos em parafina para estudos morfológicos e de imunolocalização.

DESENHO EXPERIMENTAL

5.2. Para cada um dos procedimentos que irão ser realizados a cada animal (ou grupo de animais), preencher a tabela em baixo, indicando e descrevendo cada item contido na mesma:

Título do procedimento:	Eutanásia e recolha de tecido endometrial das dadoras
Nº do procedimento:	1
Justificação/relevância para a realização do procedimento:	Importante para a recolha do tecido que será transplantado para os animais dos grupos experimentais
Espécie animal:	Murganho
Nº de animais a utilizar:	6 animais
Técnica utilizada:	Deslocamento cervical, seguido de macro disseção
Duração do procedimento:	10 minutos por animal
Frequência do procedimento:	Intervenção única
Anestesia associada?:	Que princípio ativo? Dose? Via de administração? Frequência? Não aplicável
Analgesia associada?:	Que princípio ativo? Dose? Via de administração? Frequência? Não aplicável
Estabelecimento de limites críticos:	Não aplicável
Efeitos adversos do procedimento no bem-estar animal:	Não aplicável
Classificação de severidade do procedimento proposta ⁽¹⁾ :	Não recuperação
Destino dos animais no final do procedimento:	Occisão
Se o destino dos animais for a occisão, refira qual o método de occisão a utilizar ⁽²⁾ :	Deslocamento cervical.

(1) A classificação de severidade deverá ter em conta as categorias (Não recuperação, Ligeiro, Moderado e Severo) e os critérios de atribuição dispostos no Anexo IV, do Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto.

(2) A occisão dos animais deverá ser feita utilizando um método adequado referido no Anexo II do Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto. No caso de ser previsto outro método de occisão diferente, qual a justificação científica para isso ocorrer e que provas científicas tem que permitam concluir que o método proposto é, pelo menos, tão humano quanto os contidos no referido anexo.

Procedimentos cirúrgicos. Quando forem realizados procedimentos cirúrgicos deverão também ser incluídas informações sobre os seguintes assuntos:

- Se a cirurgia implicará recobro dos animais ou não;
- Cuidados/procedimentos pré-cirúrgicos a realizar aos animais;
- Descrição dos procedimentos cirúrgicos, incluindo uma descrição sobre o local anatómico de acesso;

- Cuidados pós-cirúrgicos a realizar aos animais;
- Medicação intra-operatória (que substância, dose, frequência e via de administração)

Não aplicável

Quando o **procedimento for a administração de uma substância**, refira de que substância se trata, veículo (se necessário) e em que dose (mg/kg de peso vivo), volume, frequência e via será feita a sua administração.

Não aplicável

Quando o **procedimento for a administração de um produto biológico/agente infeccioso**, refira de que produto/espécie/estirpe se trata e em que dose, frequência e local e via será feita a sua administração.

Não aplicável

Quando o **procedimento for a colheita de uma amostra biológica** (incluindo para genotipagem), refira de que tecido ou fluído se trata e o volume, frequência, local e via de colheita que serão realizadas.

Não aplicável

Título do procedimento:	Indução da endometriose, ecografia, e confirmação por laparotomia, tratamento com metformina e acasalamento
Nº do procedimento:	2
Justificação/relevância para a realização do procedimento:	Indução da endometriose: Importante para o estabelecimento do modelo animal a utilizar que visa estudar a patologia. Monitorização por ecografia: Importante para a monitorização do tamanho dos implantes ao longo do projeto. Confirmação por laparotomia: Importante para validar as medições efetuadas pela ecografia Tratamento com metformina: Importante para a resposta ao principal objetivo do projeto, verificar se o tratamento melhora a capacidade reprodutiva dos animais. Acasalamento e gestação: Importante para a resposta ao principal objetivo do projeto, verificar se o tratamento melhora a capacidade reprodutiva dos animais.
Espécie animal:	Murganho
Nº de animais a utilizar:	Indução da endometriose: 8 animais Monitorização por ecografia: 8 animais Confirmação por Laparotomia: 8 animais Tratamento com metformina: 8 animais Acasalamento e gestação: 4 animais (2 do grupo de tratamento com metformina, 2 do grupo que não fez tratamento) Machos para acasalamento: 2 Número total de animais: 10
Técnica utilizada:	Indução da endometriose: Implantação de dois fragmentos (3mm) de tecido endometrial proveniente de dadoras na cavidade peritoneal, um do lado direito e outro do lado esquerdo. Monitorização por ecografia: Visualização ecográfica Confirmação por Laparotomia: Visualização dos implantes na cavidade peritoneal, 4 semanas após cirurgia, com medição dos

	mesmos. Tratamento com metformina: Conforme o grupo que integram, os animais terão disponível <i>ad libitum</i> água com ou sem metformina (50mg/kg/dia). A quantidade de água ingerida será regularmente verificada de forma a ajustar se necessário a dose. Os biberões serão trocados de dois em dois dias. Acasalamento e gestação: Os animais serão colocados em caixas de acasalamento (1 macho e 2 fêmeas por caixa).
Duração do procedimento:	Indução da endometriose: 30 minutos por animal Monitorização por ecografia: 10 minutos por animal Confirmação por Laparotomia: 20 minutos por animal Tratamento com metformina: 3 meses Acasalamento e gestação: 20 dias
Frequência do procedimento:	Indução da endometriose: Intervenção única Monitorização por ecografia: 1 vez por mês Confirmação por Laparotomia: Intervenção única Tratamento com metformina: diária (com troca de biberão a cada dois dias) Acasalamento e gestação: Intervenção única
Anestesia associada?:	Que princípio ativo? Dose? Via de administração? Frequência? Indução da endometriose: Volátil, Isoflurano Monitorização por ecografia: Volátil, Isoflurano Confirmação por Laparotomia: Volátil, Isoflurano Tratamento com metformina: Não aplicável Acasalamento e gestação: Não aplicável
Analgesia associada?:	Que princípio ativo? Dose? Via de administração? Frequência? Indução da endometriose: Buprenorfina, 0,1mg/100g, subcutânea, 12-12h (72h) Monitorização por ecografia: Não aplicável Confirmação por Laparotomia: Buprenorfina, 0,1mg/100g, subcutânea, 12-12h (72h) Tratamento com metformina: Não aplicável Acasalamento e gestação: Não aplicável
Estabelecimento de limites críticos:	Indução da endometriose: Após a cirurgia os animais serão monitorizados duas vezes por dia nas 72h seguintes. Em caso de existirem sinais de sofrimento (por exemplo, inatividade, pelo em mau estado, secreção das narinas e/ou olhos), estes serão monitorizados frequentemente e se necessário eutanasiados. Monitorização por ecografia: Não são previstos problemas de bem-estar animal. No entanto, em caso de existirem sinais de sofrimento (por exemplo, inatividade, pelo em mau estado, secreção das narinas e/ou olhos), estes serão monitorizados frequentemente e se necessário eutanasiados. Confirmação por Laparotomia: Após a cirurgia os animais serão monitorizados duas vezes por dia nas 72h seguintes. Em caso de existirem sinais de sofrimento (por exemplo, inatividade, pelo em mau estado, secreção das narinas e/ou olhos), estes serão monitorizados frequentemente e se necessário eutanasiados.

	Tratamento com metformina: Não são previstos problemas de bem-estar animal. No entanto, em caso de existirem sinais de sofrimento (por exemplo, inatividade, pelo em mau estado, secreção das narinas e/ou olhos), estes serão monitorizados frequentemente e se necessário eutanasiados. Acasalamento e gestação: Não são previstos problemas de bem-estar animal. No entanto, em caso de existirem sinais de sofrimento (por exemplo, inatividade, pelo em mau estado, secreção das narinas e/ou olhos), estes serão monitorizados frequentemente e se necessário eutanasiados.
Efeitos adversos do procedimento no bem-estar animal:	Indução de endometriose: Espera-se um desconforto, temporário após recuperação pós-cirúrgica, o que será minimizado pela introdução de limites críticos. Monitorização por ecografia: Não é de esperar qualquer efeito adverso. Confirmação por Laparotomia: Espera-se um desconforto, temporário após recuperação pós-cirúrgica, o que será minimizado pela introdução de limites críticos. Tratamento com metformina: Não é de esperar qualquer efeito adverso. Acasalamento e gestação: Não é de esperar qualquer efeito adverso.
Classificação de severidade do procedimento proposta ⁽¹⁾ :	Moderada
Destino dos animais no final do procedimento:	Indução de endometriose: Recobro e alojamento dos animais durante 4 semanas para posterior realização do tratamento e acasalamento. Monitorização por ecografia: Alojamento dos animais até ao final do projeto Confirmação por Laparotomia: Recobro e alojamento dos animais durante 1 semana para posterior realização do tratamento e acasalamento. Tratamento com metformina: 2 animais de cada grupo serão alojados para seguirem para acasalamento e gestação. 2 animais de cada grupo serão eutanasiados. Acasalamento e gestação: Ao 18º dia de gestação as fêmeas serão eutanasiadas. As não gestantes também serão eutanasiadas. Os machos serão cedidos a outros estudos
Se o destino dos animais for a occisão, refira qual o método de occisão a utilizar ⁽²⁾ :	Indução de endometriose: Não aplicável Monitorização por ecografia: Não aplicável Tratamento com metformina: Nos animais a sacrificar: Punção cardíaca após anestesia volátil (Isoflurano), seguida de deslocamento cervical. Recolha do sangue e macrodissecção dos órgãos. Acasalamento e gestação: Punção cardíaca após anestesia volátil (Isoflurano), sucedida de deslocamento cervical. Recolha do sangue e macrodissecção dos órgãos.

(3) A classificação de severidade deverá ter em conta as categorias (Não recuperação, Ligeiro, Moderado e Severo) e os critérios de atribuição dispostos no Anexo IV, do Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto.

- (4) A occisão dos animais deverá ser feita utilizando um método adequado referido no Anexo II do Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto. No caso de ser previsto outro método de occisão diferente, qual a justificação científica para isso ocorrer e que provas científicas tem que permitam concluir que o método proposto é, pelo menos, tão humano quanto os contidos no referido anexo.

Procedimentos cirúrgicos. Quando forem realizados procedimentos cirúrgicos deverão também ser incluídas informações sobre os seguintes assuntos:

- Se a cirurgia implicará recobro dos animais ou não;
- Cuidados/procedimentos pré-cirúrgicos a realizar aos animais;
- Descrição dos procedimentos cirúrgicos, incluindo uma descrição sobre o local anatómico de acesso;
- Cuidados pós-cirúrgicos a realizar aos animais;
- Medicação intra-operatória (que substância, dose, frequência e via de administração)

Indução da endometriose: Os animais serão anestesiados com Isoflurano. Será administrada uma dose de analgésico por via subcutânea (buprenorfina; 0,1mg/100g). O pelo da região abdominal será rapado e a pele limpa com álcool a 70% seguido de uma solução de Iodopovidona. Será feita uma incisão na pele abdominal, seguindo a linha média. Seguidamente será feita uma incisão no peritонеu, onde serão implantados dois fragmentos de tecido endometrial, um de cada lado, utilizando um fio de sutura 7-0 não absorvível. O peritонеu será suturado utilizando uma sutura 6-0 absorvível, que também será utilizada para suturar a pele. Durante o procedimento cirúrgico a temperatura corporal será monitorizada e mantida constante utilizando placas de aquecimento. Nas 72h pós-operatório, será administrado aos animais um analgésico (buprenorfina; 0,1mg/100mg) de 12 em 12h. Estes serão monitorizados duas vezes por dia.

Confirmação por Laparotomia: Um mês após a cirurgia de indução da endometriose, e após as ecografias com medição dos implantes, os animais serão anestesiados com Isoflurano. Será administrada uma dose de analgésico por via subcutânea (buprenorfina; 0,1mg/100g). O pelo da região abdominal será rapado e a pele limpa com álcool a 70% seguido de uma solução de Iodopovidona. Será feita uma incisão na pele abdominal, seguindo a linha média. Seguidamente será feita uma incisão no peritонеu que será levantado de forma a expor os implantes, os quais serão medidos. O peritонеu será suturado utilizando uma sutura 6-0 absorvível, que também será utilizada para suturar a pele. Durante o procedimento cirúrgico a temperatura corporal será monitorizada e mantida constante utilizando placas de aquecimento. Nas 72h pós-operatório, será administrado aos animais um analgésico (buprenorfina; 0,1mg/100mg) de 12 em 12h. Estes serão monitorizados duas vezes por dia.

Quando o **procedimento for a administração de uma substância**, refira de que substância se trata, veículo (se necessário) e em que dose (mg/kg de peso vivo), volume, frequência e via será feita a sua administração.

Não aplicável

Quando o **procedimento for a administração de um produto biológico/agente infeccioso**, refira de que produto/espécie/estirpe se trata e em que dose, frequência e local e via será feita a sua administração.

Metformina 50mg/kg/dia por via oral, dissolvida na água (os biberões serão trocados a cada dois dias)

Quando o **procedimento for a colheita de uma amostra biológica** (incluindo para genotipagem), refira de que tecido ou fluido se trata e o volume, frequência, local e via de colheita que serão realizadas.

Ao 18º dia de gestação as fêmeas serão eutanasiadas por punção cardíaca para recolha do sangue,

sob anestesia volátil (Isoflurano). O óbito será confirmado por deslocamento cervical. A recolha do sangue é feita para tubos com EDTA, o qual será centrifugado e armazenado a -80°C para posteriores análises bioquímicas. A cavidade abdominal será aberta e serão recolhidos todos os órgãos. A cavidade torácica será também aberta e todos os órgãos serão recolhidos. O cérebro também será recolhido. O número de locais de implantação, fetos e peso fetal serão registrados. A massa de todos os tecidos recolhidos será determinada. Os tecidos serão imediatamente congelados a -80°C e a -20°C para posteriores estudos moleculares. Parte dos tecidos serão fixados em formol tamponado e incluídos em parafina para estudos morfológicos e de imunolocalização.

Título do procedimento:	Indução da endometriose, ecografia, tratamento com metformina e acasalamento
Nº do procedimento:	3
Justificação/relevância para a realização do procedimento:	Indução da endometriose: Importante para o estabelecimento do modelo animal a utilizar que visa estudar a patologia. Monitorização por ecografia: Importante para a monitorização do tamanho dos implantes ao longo do projeto. Tratamento com metformina: Importante para a resposta ao principal objetivo do projeto, verificar se o tratamento melhora a capacidade reprodutiva dos animais. Acasalamento e gestação: Importante para a resposta ao principal objetivo do projeto, verificar se o tratamento melhora a capacidade reprodutiva dos animais.
Espécie animal:	Murganho
Nº de animais a utilizar:	Indução da endometriose: 20 animais Monitorização por ecografia: 20 animais Tratamento com metformina: 10 animais Acasalamento e gestação: 10 animais (5 do grupo de tratamento com metformina, 5 do grupo que não fez tratamento) Machos para acasalamento: 5 Número total de animais: 25
Técnica utilizada:	Indução da endometriose: Implantação de dois fragmentos (3mm) de tecido endometrial proveniente de dadoras na cavidade peritoneal, um do lado direito e outro do lado esquerdo. Monitorização por ecografia: Visualização ecográfica Tratamento com metformina: Conforme o grupo que integram, os animais terão disponível <i>ad libitum</i> água com ou sem metformina (50mg/kg/dia). A quantidade de água ingerida será regularmente verificada de forma a ajustar se necessário a dose. Os biberões serão trocados de dois em dois dias. Acasalamento e gestação: Os animais serão colocados em caixas de acasalamento (1 macho e 2 fêmeas por caixa).
Duração do procedimento:	Indução da endometriose: 30 minutos por animal Monitorização por ecografia: 10 minutos por animal Tratamento com metformina: 3 meses Acasalamento e gestação: 20 dias
Frequência do procedimento:	Indução da endometriose: Intervenção única Monitorização por ecografia: 1 vez por mês

	Tratamento com metformina: diária (com troca de biberão a cada dois dias) Acasalamento e gestação: Intervenção única
Anestesia associada?:	Que princípio ativo? Dose? Via de administração? Frequência? Indução da endometriose: Volátil, Isoflurano Monitorização por ecografia: Volátil, Isoflurano Tratamento com metformina: Não aplicável Acasalamento e gestação: Não aplicável
Analgesia associada?:	Que princípio ativo? Dose? Via de administração? Frequência? Indução da endometriose: Buprenorfina, 0,1mg/100g, subcutânea, 12-12h (72h) Monitorização por ecografia: Não aplicável Tratamento com metformina: Não aplicável Acasalamento e gestação: Não aplicável
Estabelecimento de limites críticos:	Indução da endometriose: Após a cirurgia os animais serão monitorizados duas vezes por dia nas 72h seguintes. Em caso de existirem sinais de sofrimento (por exemplo, inatividade, pelo em mau estado, secreção das narinas e/ou olhos), estes serão monitorizados frequentemente e se necessário eutanasiados. Monitorização por ecografia: Não são previstos problemas de bem-estar animal. No entanto, em caso de existirem sinais de sofrimento (por exemplo, inatividade, pelo em mau estado, secreção das narinas e/ou olhos), estes serão monitorizados frequentemente e se necessário eutanasiados. Tratamento com metformina: Não são previstos problemas de bem-estar animal. No entanto, em caso de existirem sinais de sofrimento (por exemplo, inatividade, pelo em mau estado, secreção das narinas e/ou olhos), estes serão monitorizados frequentemente e se necessário eutanasiados. Acasalamento e gestação: Não são previstos problemas de bem-estar animal. No entanto, em caso de existirem sinais de sofrimento (por exemplo, inatividade, pelo em mau estado, secreção das narinas e/ou olhos), estes serão monitorizados frequentemente e se necessário eutanasiados.
Efeitos adversos do procedimento no bem-estar animal:	Indução de endometriose: Espera-se um desconforto, temporário após recuperação pós-cirúrgica, o que será minimizado pela introdução de limites críticos. Monitorização por ecografia: Não é de esperar qualquer efeito adverso. Tratamento com metformina: Não é de esperar qualquer efeito adverso. Acasalamento e gestação: Não é de esperar qualquer efeito adverso.
Classificação de severidade do procedimento proposta ⁽¹⁾ :	Moderada
Destino dos animais no final do procedimento:	Indução de endometriose: Recobro e alojamento dos animais durante 4 semanas para posterior realização de outras tarefas. Monitorização por ecografia: Alojamento dos animais até ao final do

	projeto Tratamento com metformina: 5 animais de cada grupo serão alojados para seguirem para acasalamento e gestação. 5 animais de cada grupo serão eutanasiados. Acasalamento e gestação: Ao 18º dia de gestação as fêmeas serão eutanasiadas. As não gestantes também serão eutanasiadas. Os machos serão cedidos a outros estudos
Se o destino dos animais for a occisão, refira qual o método de occisão a utilizar (2):	Indução de endometriose: Não aplicável Monitorização por ecografia: Não aplicável Tratamento com metformina: Nos animais a sacrificar: Punção cardíaca após anestesia volátil (Isoflurano), seguida de deslocamento cervical. Recolha do sangue e macrodisseção dos órgãos. Acasalamento e gestação: Punção cardíaca após anestesia volátil (Isoflurano), sucedida de deslocamento cervical. Recolha do sangue e macrodisseção dos órgãos.

- (5) A classificação de severidade deverá ter em conta as categorias (Não recuperação, Ligeiro, Moderado e Severo) e os critérios de atribuição dispostos no Anexo IV, do Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto.
- (6) A occisão dos animais deverá ser feita utilizando um método adequado referido no Anexo II do Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto. No caso de ser previsto outro método de occisão diferente, qual a justificação científica para isso ocorrer e que provas científicas tem que permitam concluir que o método proposto é, pelo menos, tão humano quanto os contidos no referido anexo.

Procedimentos cirúrgicos. Quando forem realizados procedimentos cirúrgicos deverão também ser incluídas informações sobre os seguintes assuntos:

- Se a cirurgia implicará recobro dos animais ou não;
- Cuidados/procedimentos pré-cirúrgicos a realizar aos animais;
- Descrição dos procedimentos cirúrgicos, incluindo uma descrição sobre o local anatómico de acesso;
- Cuidados pós-cirúrgicos a realizar aos animais;
- Medicação intra-operatória (que substância, dose, frequência e via de administração)

Os animais serão anestesiados com Isoflurano. Será administrada uma dose de analgésico por via subcutânea (buprenorfina; 0,1mg/100g). O pelo da região abdominal será rapado e a pele limpa com álcool a 70% seguido de uma solução de Iodopovidona. Será feita uma incisão na pele abdominal, seguindo a linha média. Seguidamente será feita uma incisão no peritонеu, onde serão implantados dois fragmentos de tecido endometrial, um de cada lado, utilizando um fio de sutura 7-0 não absorvível. O peritонеu será suturado utilizando uma sutura 6-0 absorvível, que também será utilizada para suturar a pele. Durante o procedimento cirúrgico a temperatura corporal será monitorizada e mantida constante utilizando placas de aquecimento. Nas 72h pós-operatório, será administrado aos animais um analgésico (buprenorfina; 0,1mg/100mg) de 12 em 12h. Estes serão monitorizados duas vezes por dia.

Quando o **procedimento for a administração de uma substância**, refira de que substância se trata, veículo (se necessário) e em que dose (mg/kg de peso vivo), volume, frequência e via será feita a sua administração.

Não aplicável

Quando o **procedimento for a administração de um produto biológico/agente infeccioso**, refira de que produto/espécie/estirpe se trata e em que dose, frequência e local e via será feita a sua administração.

Metformina 50mg/kg/dia por via oral, dissolvida na água (os biberões serão trocados a cada dois dias)

Quando o **procedimento for a colheita de uma amostra biológica** (incluindo para genotipagem), refira de que tecido ou fluído se trata e o volume, frequência, local e via de colheita que serão realizadas.

Ao 18º dia de gestação as fêmeas serão eutanasiadas por punção cardíaca para recolha do sangue, sob anestesia volátil (Isoflurano). O óbito será confirmado por deslocamento cervical. A recolha do sangue é feita para tubos com EDTA, o qual será centrifugado e armazenado a -80°C para posteriores análises bioquímicas. A cavidade abdominal será aberta e serão recolhidos todos os órgãos. A cavidade torácica será também aberta e todos os órgãos serão recolhidos. O cérebro também será recolhido. O número de locais de implantação, fetos e peso fetal serão registados. A massa de todos os tecidos recolhidos será determinada. Os tecidos serão imediatamente congelados a -80°C e a -20°C para posteriores estudos moleculares. Parte dos tecidos serão fixados em formol tamponado e incluídos em parafina para estudos morfológicos e de imunolocalização.

Título do procedimento:	Simulação da cirurgia, tratamento com metformina e acasalamento
Nº do procedimento:	4
Justificação/relevância para a realização do procedimento:	Simulação da cirurgia: Importante para o estabelecimento do modelo animal a utilizar que visa estudar a patologia, sendo que servirá como grupo controlo Tratamento com metformina: Importante para a resposta ao principal objetivo do projeto, verificar se o tratamento melhora a capacidade reprodutiva dos animais. Acasalamento e gestação: Importante para a resposta ao principal objetivo do projeto, verificar se o tratamento melhora a capacidade reprodutiva dos animais.
Espécie animal:	Murganho
Nº de animais a utilizar:	Simulação da cirurgia: 20 animais Tratamento com metformina: 10 animais Acasalamento e gestação: 10 animais (5 do grupo de tratamento com metformina, 5 do grupo que não fez tratamento) Machos para acasalamento: 5 Número total de animais: 25
Técnica utilizada:	Simulação da cirurgia: Utilização de uma sutura no peritонеu (mimetizando parte da cirurgia de indução da endometriose) um do lado direito e outro do lado esquerdo. Tratamento com metformina: Conforme o grupo que integram, os animais terão disponível <i>ad libitum</i> água com ou sem metformina (50mg/kg/dia). A quantidade de água ingerida será regularmente verificada de forma a ajustar se necessário a dose. Os biberões serão trocados de dois em dois dias. Acasalamento e gestação: Os animais serão colocados em caixas de acasalamento (1 macho e 2 fêmeas por caixa).
Duração do procedimento:	Simulação da cirurgia: 30 minutos por animal Tratamento com metformina: 3 meses

	Acasalamento e gestação: 20 dias
Frequência do procedimento:	Simulação da cirurgia: Intervenção única Tratamento com metformina: diária (com troca de biberão a cada dois dias) Acasalamento e gestação: Intervenção única.
Anestesia associada?:	Que princípio ativo? Dose? Via de administração? Frequência? Simulação da cirurgia: Volátil, Isoflurano Tratamento com metformina: Não aplicável Acasalamento e gestação: Não aplicável
Analgesia associada?:	Que princípio ativo? Dose? Via de administração? Frequência? <u>Simulação da cirurgia</u> : Buprenorfina, 0,1mg/100g, subcutânea, 12-12h (72h) Tratamento com metformina: Não aplicável Acasalamento e gestação: Não aplicável
Estabelecimento de limites críticos:	Simulação da cirurgia: Após a cirurgia os animais serão monitorizados duas vezes por dia nas 72h seguintes. Em caso de existirem sinais de sofrimento (por exemplo, inatividade, pelo em mau estado, secreção das narinas e/ou olhos), estes serão monitorizados frequentemente e se necessário eutanasiados. Tratamento com metformina: Não são previstos problemas de bem-estar animal. No entanto, em caso de existirem sinais de sofrimento (por exemplo, inatividade, pelo em mau estado, secreção das narinas e/ou olhos), estes serão monitorizados frequentemente e se necessário eutanasiados. Acasalamento e gestação: Não são previstos problemas de bem-estar animal. No entanto, em caso de existirem sinais de sofrimento (por exemplo, inatividade, pelo em mau estado, secreção das narinas e/ou olhos), estes serão monitorizados frequentemente e se necessário eutanasiados.
Efeitos adversos do procedimento no bem-estar animal:	Simulação da cirurgia: Espera-se um desconforto, temporário após recuperação pós-cirúrgica, o que será minimizado pela introdução de limites críticos. Tratamento com metformina: Não é de esperar qualquer efeito adverso. Acasalamento e gestação: Não é de esperar qualquer efeito adverso.
Classificação de severidade do procedimento proposta ⁽¹⁾ :	Moderada
Destino dos animais no final do procedimento:	Simulação da cirurgia: Recobro e alojamento dos animais durante 4 semanas para posterior realização de outras tarefas. Tratamento com metformina: 5 animais de cada grupo serão alojados para seguirem para acasalamento e gestação. 5 animais de cada grupo serão eutanasiados. Acasalamento e gestação: Ao 18º dia de gestação as fêmeas serão eutanasiadas. As não gestantes também serão eutanasiadas. Os machos serão cedidos a outros estudos
Se o destino dos animais for	Indução de endometriose: Não aplicável

a occisão, refira qual o método de occisão a utilizar (2):	Tratamento com metformina: Nos animais a sacrificar: - Punção cardíaca após anestesia volátil (Isoflurano), seguida de deslocamento cervical. Recolha do sangue e macrodisseção dos órgãos. Acasalamento e gestação: Punção cardíaca após anestesia volátil (Isoflurano), sucedida de deslocamento cervical. Recolha do sangue e macrodisseção dos órgãos.
--	--

- (7) A classificação de severidade deverá ter em conta as categorias (Não recuperação, Ligeiro, Moderado e Severo) e os critérios de atribuição dispostos no Anexo IV, do Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto.
- (8) A occisão dos animais deverá ser feita utilizando um método adequado referido no Anexo II do Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto. No caso de ser previsto outro método de occisão diferente, qual a justificação científica para isso ocorrer e que provas científicas tem que permitam concluir que o método proposto é, pelo menos, tão humano quanto os contidos no referido anexo.

Procedimentos cirúrgicos. Quando forem realizados procedimentos cirúrgicos deverão também ser incluídas informações sobre os seguintes assuntos:

- Se a cirurgia implicará recobro dos animais ou não;
- Cuidados/procedimentos pré-cirúrgicos a realizar aos animais;
- Descrição dos procedimentos cirúrgicos, incluindo uma descrição sobre o local anatómico de acesso;
- Cuidados pós-cirúrgicos a realizar aos animais;
- Medicação intra-operatória (que substância, dose, frequência e via de administração)

Os animais serão anestesiados com Isoflurano. Será administrada uma dose de analgésico por via subcutânea (buprenorfina; 0,1mg/100g). O pelo da região abdominal será rapado e a pele limpa com álcool a 70% seguido de uma solução de Iodopovidona. Será feita uma incisão na pele abdominal, seguindo a linha média. Seguidamente será feita uma incisão no peritoneu, onde serão feitas duas suturas, utilizando um fio de sutura 7-0 não absorvível. O peritoneu será suturado utilizando uma sutura 6-0 absorvível, que também será utilizada para suturar a pele. Durante o procedimento cirúrgico a temperatura corporal será monitorizada e mantida constante utilizando placas de aquecimento. Nas 72h pós-operatório, será administrado aos animais um analgésico (buprenorfina; 0,1mg/100mg) de 12 em 12h. Estes serão monitorizados duas vezes por dia.

Quando o **procedimento for a administração de uma substância**, refira de que substância se trata, veículo (se necessário) e em que dose (mg/kg de peso vivo), volume, frequência e via será feita a sua administração.

Metformina 50mg/kg/dia por via oral, dissolvida na água (os biberões serão trocados a cada dois dias)

Quando o **procedimento for a administração de um produto biológico/agente infeccioso**, refira de que produto/espécie/estirpe se trata e em que dose, frequência e local e via será feita a sua administração.

Não aplicável

Quando o **procedimento for a colheita de uma amostra biológica** (incluindo para genotipagem), refira de que tecido ou fluído se trata e o volume, frequência, local e via de colheita que serão realizadas.

Ao 18º dia de gestação as fêmeas serão eutanasiadas por punção cardíaca para recolha do sangue, sob anestesia volátil (Isoflurano). O óbito será confirmado por deslocamento cervical. A recolha do sangue é feita para tubos com EDTA, o qual será centrifugado e armazenado a -80°C para posteriores análises bioquímicas. A cavidade abdominal será aberta e serão recolhidos todos os órgãos. A cavidade torácica será também aberta e todos os órgãos serão recolhidos. O cérebro também será



recolhido. O número de locais de implantação, fetos e peso fetal serão registados. A massa de todos os tecidos recolhidos será determinada. Os tecidos serão imediatamente congelados a -80°C e a -20°C para posteriores estudos moleculares. Parte dos tecidos serão fixados em formol tamponado e incluídos em parafina para estudos morfológicos e de imunolocalização.

Quando o **procedimento for a colheita de uma amostra biológica** (incluindo para genotipagem), refira de que tecido ou fluído se trata e o volume, frequência, local e via de colheita que serão realizadas.

24h após o último dia de tratamento com metformina, os animais serão sacrificados por punção cardíaca para recolha do sangue, sob anestesia volátil (Isoflurano). O óbito será confirmado por deslocamento cervical. A recolha do sangue é feita para tubos com EDTA, o qual será centrifugado e armazenado a -80°C para posteriores análises bioquímicas. A cavidade abdominal será aberta e serão recolhidos todos os órgãos. A cavidade torácica será também aberta e todos os órgãos serão recolhidos. O cérebro também será recolhido. A massa de todos os tecidos recolhidos será determinada. Os tecidos serão imediatamente congelados a -80°C ou -20°C para posteriores estudos moleculares. Parte dos tecidos serão fixados em formol tamponado e incluídos em parafina para estudos morfológicos e de imunolocalização.

**SECÇÃO 6: RESUMO NÃO TÉCNICO DO PROJETO**

De notar que, de acordo com a alínea b), do artigo 43º do Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto, no pedido de autorização de um projeto deverá ser incluído um **resumo não técnico do projeto**, e considerou-se de utilidade que o mesmo faça parte da presente secção.

O resumo deverá ser redigido claramente usando termos não técnicos, sempre que possível, por forma a poder ser facilmente entendido por um leigo. Para além disso, de acordo com o artigo 49º do Decreto-Lei, o projeto deverá ser explicado salvaguardando sempre a propriedade intelectual e as informações confidenciais que identifiquem quer as pessoas envolvidas no projeto quer o estabelecimento onde os animais serão alojados.

O resumo não técnico será posteriormente publicitado no sítio da Internet da DGAV.

Modelo de Resumo não técnico de projeto experimental

Título do projeto	Role of metformin in the control of oxidative stress and infertility in endometriosis		
Duração do projeto	5 anos		
Palavras-chave (máx. 5)	Endometriose, Metformina, Fertilidade		
Fim/objetivo do projeto (de acordo com Artº 5º) ⁽¹⁾	Investigação fundamental	Sim	
	Investigação translacional ou aplicada	Sim	
	Uso regulamentar e produção de rotina		Não
	Proteção do ambiente natural no interesse da saúde ou do bem-estar do homem ou dos animais		Não
	Investigação destinada à conservação das espécies;		Não
	Ensino superior ou formação para aquisição, manutenção ou melhoria das qualificações profissionais		Não
	Inquéritos no domínio da medicina legal		Não
	Manutenção de colónias de animais geneticamente alterados ⁽²⁾		Não
Descreva os Objetivos do Projeto (ex., incógnitas científicas ou necessidades científicas/clínicas a serem abordadas, etc.)	A infertilidade, definida como ausência de concepção após um ano de relações regulares desprotegidas, é atualmente considerada um problema de saúde pública que motiva o aumento da demanda por Tecnologia de Reprodução Assistida, cujo sucesso global é de cerca de 30%. A endometriose é uma das principais causas de infertilidade em mulheres jovens (40%) e afeta 5-15% das mulheres em idade reprodutiva. Neste projeto, procuramos estudar o efeito da metformina,		

	uma droga antidiabética com propriedades antioxidantes, atualmente utilizada no controlo da síndrome dos ovários policísticos, num modelo de indução de endometriose no murganho. Assim, postulando que a metformina diminui o desequilíbrio oxidativo e a resposta inflamatória, induz a regressão de endometriomas e regula a secreção de estrogénio e, de fato, pomos a hipótese de esta poder ser usada como uma abordagem farmacológica válida para melhorar a infertilidade associada à endometriose.
Quais são os potenciais benefícios que possam derivar deste projeto (como poderia a ciência avançar ou os seres humanos ou outros animais poderiam beneficiar com o projeto)?	Com este projeto pretende-se compreender a atuação da metformina na patologia da endometriose, particularmente no que à fertilidade diz respeito. De facto, os resultados deste estudo poderão possibilitar uma nova terapia para a endometriose e melhorar a vida de muitas mulheres.
Que espécies animais e números aproximados de animais serão utilizados?	90 animais da espécie murganho
No contexto do que é proposto fazer-se aos animais, quais são os efeitos adversos esperados e o grau provável/esperado de severidade? O que acontecerá aos animais no final da realização do projeto?	Não se prevê que os procedimentos de injeção de anestésicos e suplementação da água com um fármaco (metformina) induzam efeitos adversos com efeito maior do que ligeiro. Apenas as cirurgias para indução de endometriose ou simulação de cirurgia podem surtir alguns efeitos inesperados, como dor no pós-operatório associada à cirurgia de severidade moderada, mas serão minimizados pela introdução de limites críticos. Os animais serão eutanasiados de forma indolor, por punção cardíaca após anestesia volátil e posterior deslocamento cervical, no fim da realização do projeto. Após confirmação do óbito, será feita a colheita dos tecidos que posteriormente serão analisados. Os machos utilizados para o acasalamento serão reutilizados por cedência a outros projetos.
Aplicação dos 3Rs	
1.Replacement (Substituição) Refira a razão por que precisa utilizar animais e por que não pode usar alternativas não-animais	A utilização de modelo animal é imprescindível para determinar o efeito da administração oral da metformina no desenvolvimento de lesões endometriais, assim como para identificar os alvos moleculares deste fármaco envolvidos na infertilidade relacionada com a endometriose. Sempre que oportuno as experiências deste projeto foram planeadas evitando o uso de modelos animais, isto é, várias avaliações serão feitas em amostras humanas (no caso, líquido folicular e soro). No entanto, os órgãos do aparelho reprodutor têm propriedades emergentes que só são observadas no organismo funcionando como um todo. Só no organismo intacto será possível estudar a fertilidade. Assim, é necessário recorrer ao uso de modelos animais,

	quer para validar os resultados obtidos com amostras humanas, quer para avaliar o efeito da metformina na fertilidade. Não existem alternativas eficientes para estes estudos.		
2.Reduction (Redução) Explique como garantirá que serão utilizados os números mínimos de animais	O desenho experimental foi otimizado de modo a reduzir o número de animais em cada experiência. Deste modo, parte do projeto será realizado recorrendo a amostras humanas de líquido folicular.		
3.Refinement (Refinamento) Explique a escolha da(s) espécie e a razão porque o modelo(s) animal que serão usados são os mais refinados, tendo em conta os objetivos. Explique as medidas gerais que serão tomadas para minimizar os custos de bem-estar (danos) aos animais.	A escolha dos murganhos B6CBA/F1 prende-se com o facto de serem um modelo de eleição para o transplante de tecidos, sendo que apresentam níveis baixos de rejeição. Os procedimentos incluem o transplante de tecido uterino de murganhos dadoras para a cavidade peritoneal das recetoras, sem dano do sistema reprodutor das recetoras. Incluem ainda a administração por via oral de metformina. Estes procedimentos apresentam um efeito ligeiro-moderado. No sentido de garantir o bem-estar do animal, as experiências serão efetuadas por pessoal licenciado pela DGAV, as gaiolas terão enriquecimento ambiental e “humane endpoints” serão pré-definidos para determinar o fim das experiências. Para tal os animais serão monitorizados diariamente e ser-lhes-á fornecida fluidoterapia sempre que percam 10% do seu peso corporal, ou serão eutanasiados se perderem 20% do peso corporal.		
Para uso oficial			
O projeto será submetido a avaliação retrospectiva?	Sim	Não	Observações

Notas: (1) Elimine Sim ou Não, conforme apropriado.

(2) Com esta opção deverá ser escolhido, pelo menos, um fim/objetivo adicional.

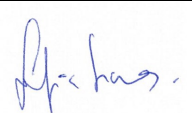
SECÇÃO 7: DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADES**DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADES*****DO INVESTIGADOR RESPONSÁVEL***

1. Li o Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto, relativo à “proteção dos animais utilizados para fins científicos”.
2. Confirmo que o uso de animais neste projeto estará de acordo com o diploma supracitado e com outras orientações dadas pela entidade competente.
3. Eu aceito a responsabilidade pela condução do projeto tal como delineado nesta aplicação, de acordo com a legislação.
4. Eu declaro que tenho as qualificações e a experiência apropriadas para realizar os procedimentos descritos neste projeto ou para assegurar que eles são feitos corretamente.
5. Eu declaro que cada pessoa envolvida neste projeto foi adequadamente instruída e é competente para levar a cabo os procedimentos por que são responsáveis.
6. Eu declaro que estão disponíveis os meios adequados para levar a cabo este projeto.
7. Confirmo que o Órgão responsável pelo bem-estar dos animais (ORBEA) do estabelecimento onde irá decorrer o projeto, emitiu um parecer não vinculativo sobre o mesmo, o qual anexo a este pedido.

Nome	Assinatura	Data
Delminda Neves Lopes de Magalhães		19/10/2018

DO RESPONSÁVEL PELO ESTABELECIMENTO ONDE OS ANIMAIS SERÃO ALOJADOS

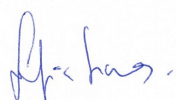
- Eu declaro que, uma vez que o projeto esteja autorizado pela DGAV, eu assumo a responsabilidade por assegurar que irão ser prestadas aos animais as condições adequadas, de acordo com o Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto.

Nome	Assinatura	Data
Sofia Lamas		26-12-2018

DA PESSOA PERTENCENTE AO ÓRGÃO RESPONSÁVEL PELO BEM-ESTAR DOS ANIMAIS (ORBEA) EM QUEM O RESPONSÁVEL PELO ESTABELECIMENTO ONDE OS ANIMAIS SERÃO ALOJADOS DELEGUE COMPETÊNCIA

- Eu declaro que, uma vez que o projeto esteja autorizado pela DGAV, eu assumo a responsabilidade por assegurar que irão ser prestadas aos animais as condições adequadas, de acordo com o Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto.



Nome	Assinatura	Função assumida no ORBEA	Data
Sofia Lamas		Veterinária	26-12-2018

Antes da submissão do formulário verifique se:

1. Respondeu a todas as questões (mesmo que a sua resposta seja “Não aplicável” ou que tenha rasurado os campos não aplicáveis);
2. Todas as pessoas envolvidas no projeto foram identificadas na Secção 1;
3. O utilizador que levará a cabo o projeto de utilização de animais fica claramente identificado;
4. O estabelecimento(s)/local onde irão ficar alojados os animais e decorrer os procedimentos fica(m) identificado(s);
5. O investigador responsável leu e assinou o formulário depois de preenchido, na Secção 7;
6. O responsável pelo estabelecimento onde os animais serão alojados (ou o membro do Órgão responsável pelo bem-estar dos animais (ORBEA, artigo 34º do Decreto-Lei) a quem este delegue essa competência) leu e assinou o formulário depois de preenchido, na Secção 7;
7. O resumo não técnico do projeto está redigido em português e de acordo com os requisitos estipulados no artigo 49º do Decreto-Lei;
8. Anexou, ao pedido de autorização do projeto a submeter à DGAV, o **parecer não vinculativo** emitido pelo **Órgão responsável pelo bem-estar dos animais** do estabelecimento onde os animais irão ser alojados, de acordo com o ponto 2, do artigo 43º do Decreto-Lei;
9. Anexou, ao pedido de autorização do projeto a submeter à DGAV, se aplicável para o projeto em apreço, o **parecer favorável** emitido pelo **Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas**, no que diz respeito à utilização de animais capturados no meio selvagem, de acordo com o ponto 2, do artigo 9º do Decreto-Lei.