

**CÍNTIA SANTOS FONSECA**

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DA INTEGRIDADE FUNCIONAL DOS OVÁRIOS  
(ASSOCIADO OU NÃO AO USO DE ESTROGÊNIO) NA MANUTENÇÃO DE  
IMPLANTES ENDOMETRIAIS INDUZIDOS CIRURGICAMENTE NO PERITÔNIO  
DE RATAS**

**Belo Horizonte  
Universidade Federal de Minas Gerais  
2006**

**CÍNTIA SANTOS FONSECA**

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DA INTEGRIDADE FUNCIONAL DOS OVÁRIOS  
(ASSOCIADO OU NÃO AO USO DE ESTRGÊNIO) NA MANUTENÇÃO DE  
IMPLANTES ENDOMETRIAIS INDUZIDOS CIRURGICAMENTE NO PERITÔNIO  
DE RATAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Saúde da Mulher da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito a obtenção do título de Mestre em Medicina.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Mendonça.

**Belo Horizonte**  
**Departamento de Ginecologia e Obstetrícia**  
**Faculdade de Medicina**  
**Universidade Federal de Minas Gerais**  
**2006**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**REITOR:** Ronaldo Tadeu Pena

**VICE-REITOR:** Heloísa Maria Murgel Starling

**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO**

**PRÓ-REITOR:** Jaime Arturo Ramirez

**FACULDADE DE MEDICINA**

**DIRETOR:** Francisco José Penna

**VICE-DIRETOR:** Tarcizo Afonso Nunes

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA MULHER**

**COORDENADOR:** João Lúcio dos Santos Júnior

**DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA**

**CHEFE:** João Gilberto de Castro e Silva

## DEDICATÓRIA

Ao Professor Doutor *Marcos Mendonça*, orientador deste trabalho, médico dedicado à ciência e aos seus pacientes e artífice de minha carreira acadêmica, pelo seu exemplo de vida profissional regida pela ética, pelos ensinamentos iniciados durante a Residência e pela grata convivência durante a pós-graduação, com todo o meu respeito e admiração.

A *Maria das Graças*, mãe carinhosa e dedicada, por seu amor incondicional, pelo incentivo e apoio sempre presentes sem os quais nenhuma conquista é possível ou vale a pena, e, sobretudo, pela honra de tê-la como mãe.

## AGRADECIMENTOS

A *Deus*, Nosso Pai, por ter me dado a vida e saúde.

Ao *Wálter*, com todo o meu carinho e amor, por ser um grande amigo e irmão em todas as horas.

A *Andréa*, por sua alegria e pelo seu amor de irmã que tornam a minha vida mais doce.

Ao *Lara*, pelo seu amor de pai e por sua generosidade com toda a minha família.

As minhas grandes amigas, *Anelise Leão*, *Adriana Busch*, *Cristiane Resende*, *Nicole Araújo* e *Kércia Lima* por acreditarem em mim, pelo apoio nas horas difíceis e pela convivência que tanto alegra a minha vida.

As mulheres da família Santos, tias e primas, pelo seu amor e força.

A *Dra. Cynthia Koepfel Berenstein*, patologista que realizou as leituras das lâminas com gentileza e interesse por este trabalho.

Ao *Marcelo*, por sua presteza e disponibilidade e também por sua ajuda durante a realização dos procedimentos cirúrgicos no Biotério.

*Qualquer*

*Qualquer tempo é tempo.*

*a hora mesma da morte*

*é hora de nascer.*

*Nenhum tempo é tempo*

*bastante para a ciência*

*de ver, rever*

*Tempo, contratempo*

*anulam-se, mas o sonho*

*resta, de viver.*

Carlos Drummond de Andrade

## RESUMO

Este estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar o papel da integridade funcional dos ovários na manutenção dos implantes de endométrio induzidos cirurgicamente no peritônio de ratas. Foram utilizadas trinta e seis ratas, albinas, virgens. Todos os animais foram submetidos à laparotomia no primeiro dia do estudo e quatro fragmentos de endométrio foram implantados no peritônio parietal de todos. Após trinta dias, doze animais foram submetidos à ooforectomia bilateral, doze à ooforectomia unilateral e nos outros doze os ovários foram preservados. Nos trinta dias seguintes, seis animais de cada grupo, que constituíram os subgrupos finais, receberam injeções musculares de benzoato de estradiol na dose de 0,1 mg duas vezes por semana. Sessenta dias após o procedimento inicial todos os animais foram submetidos à terceira laparotomia com retirada dos fragmentos de endométrio implantados no peritônio para a análise histopatológica. Os animais foram sacrificados imediatamente após a realização da última laparotomia. Os resultados mostraram que houve regressão dos implantes em 72,2% das amostras independente do procedimento ao qual cada animal foi submetido, não havendo diferença estatística entre nenhum dos subgrupos estudados.

Palavras-chave: endometriose, ovários, modelo experimental.

## **LISTA DAS ABREVIATURAS**

GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotrofinas

HE – Hematoxilina e Eosina

ICAM – “Intercelular adhesion molecule”

IL – Interleucina

IFN - Interferon

NK - “natural killers”

P. A. – Peso Absoluto

TNF- Fator de Necrose Tumoral

VEGF – “Vascular Endothelial Growth Factor”



## LISTA DE UNIDADES DE MEDIDA

g – grama

mg - miligrama

mL – mililitro

mm – milímetro

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

- Figura 1** Desenho da pesquisa .....página 22
- Figura 2** Implante endometrial com abscedação.....página 28
- Figura 3** Infiltrado inflamatório linfo-histiocitário com reação tipo corpo-estranho circundando as glândulas endometriais.....página 29
- Figura 4** Reação gigantocelular a corpo estranho (fio de sutura).....página 30
- Tabela 1** Distribuição das amostras de tecido endometrial (glândulas e/ou estroma) nos subgrupos ao final de 60 dias.....página 27

## ÍNDICE

## LISTAS

## RESUMO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. JUSTIFICATIVA.....	17
3. OBJETIVOS.....	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
5. RESULTADOS.....	27
6. DISCUSSÃO.....	31
7. CONCLUSÃO.....	34
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

## 1. INTRODUÇÃO

A endometriose se define pela presença de tecido endometrial ativo (glândulas e/ou estroma) fora da cavidade uterina (NAP *et al.*, 2004). Os locais mais afetados na pelve são os ovários, o peritônio, os ligamentos útero-sacros, e o fundo de saco de Douglas (JENKINS *et al.*, 1986), podendo também ser encontrada em localizações extrapélvicas (MUSE, 1988). Segundo NISOLE & DONNEZ (1997) para cada localização, esta afecção constitui uma entidade distinta, com características e comportamentos diversos.

De acordo com KNAPP (1998) esta doença foi inicialmente reconhecida por SHROEN em 1690 ao descrever detalhadamente a endometriose peritoneal e por VON ROKITANSKY em 1860 com a identificação de “endometriomas” em necropsias.

Trata-se de uma doença benigna comum, embora a sua real incidência seja difícil de ser estabelecida, uma vez que a confirmação diagnóstica exige procedimentos invasivos com realização de biópsia em áreas suspeitas. Estima-se que esteja presente em aproximadamente 10% das mulheres em idade fértil (FANTIN *et al.*, 2003), e em cerca de 30% das mulheres com dor pélvica crônica e infertilidade (FOSTER *et al.*, 1997), com aumento destes valores para até 50% quando estes grupos são avaliados em propedêutica específica destes agravos (NOGUEIRA & ABRÃO, 2000).

Em relação à idade, é uma doença que acomete mulheres jovens, a partir da menarca, e a sua incidência aumenta progressivamente até a faixa etária de 40-44 anos, declinando a seguir (HOUSTON *et al.*, 1988).

Os sintomas mais comuns incluem a dismenorréia, a dor pélvica crônica, e a algopareunia (MISSMER *et al*, 2003), não existindo correlação entre o tamanho das lesões e a sintomatologia (GALLOVÁ *et al*, 2002). A implicação clínica mais freqüente é a perda da fertilidade, que estaria diminuída em virtude de uma redução na fecundidade e possivelmente em consequência de alterações do desenvolvimento folicular e de alterações imunológicas (NAVARRO *et al.*, 2003).

O tratamento da endometriose baseia-se no uso de hormônios e em intervenções cirúrgicas. Ressalta-se que uma terapêutica livre de recidivas e de complicações onerosas às pacientes ainda não foi proposta (HENIG *et al*, 1988).

Os mecanismos que levam ao implante do tecido endometrial ectópico permanecem obscuros. Várias hipóteses foram formuladas para explicar a fisiopatologia das lesões, e a mais aceita é a teoria do fluxo retrógrado, na qual durante a menstruação, através das tubas uterinas, o endométrio atingiria o seu sítio ectópico. Outras idéias como a da disseminação linfática/hematogênica e a teoria da metaplasia celômica também são aceitas e fazem parte das várias concepções que tentam explicar a etiopatogenia da endometriose (D'HOOGHE & HILL, 1996).

Os mecanismos imunológicos e hormonais que são responsáveis pela aderência e manutenção dos implantes também não foram plenamente definidos e vêm sendo atribuídos a alterações do sistema imunológico, a predisposição genética e aos fatores hormonais.

DMONSK *et al.* (1981) sugeriram que a imunidade celular deficiente ou a falta de habilidade do organismo em reconhecer o tecido endometrial ectópico poderiam explicar o desenvolvimento da doença. LEBOVIC *et al.* (2001)

descrevem a participação e contribuição de diversos fatores para a persistência e progressão da doença, como, as células “natural killers” (NK), as moléculas de adesão intercelulares (ICAM – 1), o complemento C3, a citocina RANTES (Regulated on Activation, Normal T-Cell Expressed and Secreted), interleucinas (IL)-1 alfa e beta, IL-6, interferon gama, TNF (Fator de Necrose Tumoral) alfa e beta, VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) e outros fatores de crescimento celulares e a prostaglandina E2.

BARBIERI (1990) enfatiza também a importância de outros fatores que poderiam predispor ao surgimento da doença, tais como: obstrução cervical, menstruação por mais que oito dias e polimenorréia.

Uma das principais razões que limita os avanços no estudo da endometriose em humanos é a dificuldade em acessar as lesões, pois, é difícil monitorizar sua prevalência e progressão sem utilizar procedimentos invasivos. Sendo assim, os modelos animais são extremamente importantes na elucidação dos aspectos da fisiopatologia dessa doença (STORY e KENNEDY, 2004).

No início do século XX, já eram feitos experimentos na tentativa de reproduzir a doença no modelo animal (JACOBSON, 1926) e propostas teóricas para explicar a sua origem (SAMPSON, 1927).

Os únicos animais, com exceção das mulheres, que apresentam ciclos menstruais e que desenvolvem espontaneamente a endometriose são as macacas (VERNON, 1985), e com certeza, constituiriam os modelos experimentais mais confiáveis para o estudo da doença, mas os custos elevados na manutenção destes animais fazem com que vários investigadores escolham os pequenos

mamíferos, como as ratas e as coelhas, para efetuarem seus estudos (JONES, 1984 ; GOLAN, 1986).

O modelo de endometriose em ratas é considerado simples e válido pela maioria dos investigadores (ROSSI *et al.*, 2000).

SANTOS JÚNIOR (1986) induziu cirurgicamente endometriose através de implantes de endométrio em peritônio de ratas albinas para avaliar o efeito da administração de valerianato de estradiol e do danazol sobre os implantes, observou a presença de alto índice de mitose e de hiperplasia tecidual após o uso do estrogênio e inviabilidade associada à fibrose após a administração do danazol, bem como após ooforectomia.

REZENDE (1993) em trabalho realizado em nosso meio, conclui que o modelo experimental de endometriose na rata, permitindo a correlação histológica entre endométrio tópico e o ectópico é viável e de fácil repetição. O mesmo autor destaca também que o crescimento e desenvolvimento do tecido endometrial ectópico, transplantado em ratas, constituem um modelo de pesquisa capaz de estudar alguns aspectos da endometriose que não podem ser adequadamente investigados na mulher.

Além disso, estudos sobre a fisiologia da reprodução apontam para relação entre o ciclo estral e o ciclo menstrual, pois o ciclo ovariano das ratas, também é regulado por hormônios hipofisários e hipotalâmicos semelhantes aos das mulheres (FREEMAN, 1994).

FOSTER *et al.* (1997) ressaltam que em ratas, assim como em mulheres, o aparecimento da endometriose está associado com alterações do sistema

imunológico e enfatizam que o sistema imunológico daqueles animais tem sido melhor estudado quando comparado com outros.

Um recente trabalho de revisão publicado pelo Institute of Laboratory Animal Resources (Washington, DC) sobre o estudo da endometriose em modelos animais também ressalta a importância e eficiência do modelo experimental em ratas (STORY e KENNEDY, 2004).

ZANAGNOLO *et al.* (1991) ao investigar as ações do GnRH sobre implantes de endométrio induzidos cirurgicamente no peritônio de ratas enfatizou a importância deste modelo para a investigação de outras drogas.

Ao comparar duas técnicas de indução cirúrgica de endometriose (implante de fragmento de endométrio x implante de fragmento de parede uterina total) no peritônio parietal de ratas, ORTEGA-MORENO (1994) recomendou a utilização de fragmento de endométrio apenas, ao invés de fragmento de parede uterina total.

SHOR *et al.* (1999) em um artigo de revisão sobre o modelo experimental de endometriose em ratas, descrevem a técnica de indução cirúrgica da doença no peritônio usando fragmento de endométrio autólogo, e mais uma vez, reforçam a sua utilidade.



## 2. JUSTIFICATIVA

O modelo experimental de endometriose já se consagrou para a investigação de diversos aspectos desta doença como demonstram as evidências descritas nos trabalhos anteriormente citados. Uma vez que as lesões cirurgicamente induzidas são usadas para avaliação de drogas e substâncias que podem ser futuramente utilizadas para o seu tratamento, é necessário que os mecanismos envolvidos na manutenção destes implantes e que o seu comportamento natural sejam elucidados e compreendidos permitindo, assim, um entendimento melhor da ação e da eficácia do agente a ser testado.

A implantação cirúrgica de tecido endometrial autólogo no peritônio de ratas parece não depender da presença de ovários funcionantes (ROCK, 1993), pois implantes de endométrio suturados no peritônio de ratas castradas podem ser encontrados após três semanas do procedimento (BERQVIST, 1985); por outro lado, a manutenção dos implantes endometrióticos é dependente de hormônios ovarianos, uma vez que a ooforectomia bilateral causa a regressão dos mesmos. (ROSSI *et al.*, 2000).

Porém, é interessante apontar que um estudo no qual se analisou a implantação cirúrgica de endométrio no peritônio de ratas mostrou que os animais que receberam estrogênio após os procedimentos e os do grupo controle (que não receberam medicação) apresentaram um crescimento similar dos implantes entre 3 e 7 semanas. Isto pode parecer um resultado paradoxal, uma vez que os estrogênios são reconhecidamente responsáveis pelo crescimento dos implantes endometrióticos (Rossi *et al.*, 2000). Entretanto, isto também foi observado por

DIZEREGA e colaboradores (1980), que foram os primeiros a demonstrar a dependência estrogênica da endometriose, baseados na paradoxal eficácia terapêutica das combinações de estrogênios e progestagênios em seu tratamento. Os mesmos autores aventaram que a eficácia das pílulas anticoncepcionais no tratamento da endometriose residia não no fato da supressão da doença em progressão, mas sim pela inibição do fluxo menstrual retrógrado.

Uma vez que as ratas não têm fluxo retrógrado, o achado deste estudo sugere que a explicação para o sucesso terapêutico do uso de estrogênio seja a inibição ovariana e a conseqüente alteração que esta supressão causa na fisiologia da reprodução. Em outras palavras, os autores sugerem que a progressão da endometriose depende de uma complexa rede de interações endócrinas, muito mais do que a simples presença de estrogênios.

Enfatiza-se novamente que de acordo com as pesquisas acima, a progressão, mas não a implantação parece ser dependente da integridade dos ovários (ROSSI *et al.*, 2000). Em 2004, PAVIOTTI também demonstrou a dependência hormonal dos implantes endometriais em experimentação animal.

Considerando os resultados encontrados pelos pesquisadores supracitados, e também que muito tem que se estudar no intuito de elucidar os mecanismos responsáveis pela manutenção dos implantes de endométrio, elaboramos este projeto para avaliar o papel da integridade dos ovários sobre estas lesões.

### **3. OBJETIVO**

Investigar, através da avaliação histológica, o papel da integridade funcional dos ovários, associado ou não ao uso de estrogênio, na manutenção de implantes de endométrio induzidos cirurgicamente no peritônio de ratas.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

Este experimento foi submetido à avaliação e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) e pela Câmara do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da UFMG.

### **4.1 MATERIAL**

#### **4.1.1. Animais**

Ratas albinas, da raça Holtzman, virgens, com seis meses de idade e peso entre 250-300g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

Os animais permaneceram em gaiolas, sob temperatura, luz e ar ambiente, foram alimentados com ração e água "*ad libitum*".

#### **4.1.2. Equipamentos**

Foram utilizados, prancha de cortiça, algodão, gaze, compressas, fita adesiva, campo fenestrado, material para microcirurgia, cautério bipolar, afastadores autostáticos, lupa com aumento de quatro vezes, fios 8-0 mononáilon, fios 3-0 mononáilon, seringas descartáveis, luvas de borracha, lâmina de vidro com escala milimetrada, recipientes de plástico, máquina fotográfica digital,

gaiolas para ratos, lâminas e lamínulas de vidro para montagem de cortes histológicos, microscópio óptico modelo Nikon Eclipse E 200.

#### **4.1.3. Drogas e soluções**

Cloridrato de xilazina a 2% (Kensol ®), cloridrato de cetamina 50 mg/ml (Dapolen ®), solução oleosa de hexaidrobenzoato de estradiol 5 mg/ml (Benzo-Ginoestril ®), álcool etílico, xilol, parafina, formol a 10%, álcool iodado (polivinilpirrolidona), solução de cloreto de sódio a 0,9%, éter sulfúrico (P. A.), hematoxilina e eosina.

## **4.2 MÉTODOS**

### **4.2.1 Grupos Experimentais**

Todos os animais (n=36) foram inicialmente submetidos à laparotomia para implantação cirúrgica de endométrio autólogo e mantidos em observação por um período de 30 dias. A seguir, em novo procedimento cirúrgico foi realizada a confirmação histológica da aderência dos implantes e a distribuição aleatória em 3 grupos; 12 ooforectomia bilateral (grupo A), 12 ooforectomia unilateral (grupo B) e 12 ovários preservados (grupo C), sendo que cada grupo foi subdividido em 1 e 2 de acordo com o uso ou não de benzoato de estradiol na dose 0,1mg duas vezes por semana, para constituir os subgrupos finais. (Figura 1). Os animais foram marcados após cada procedimento com ácido picríco e com furos ou cortes na orelha para seguimento durante a pesquisa.

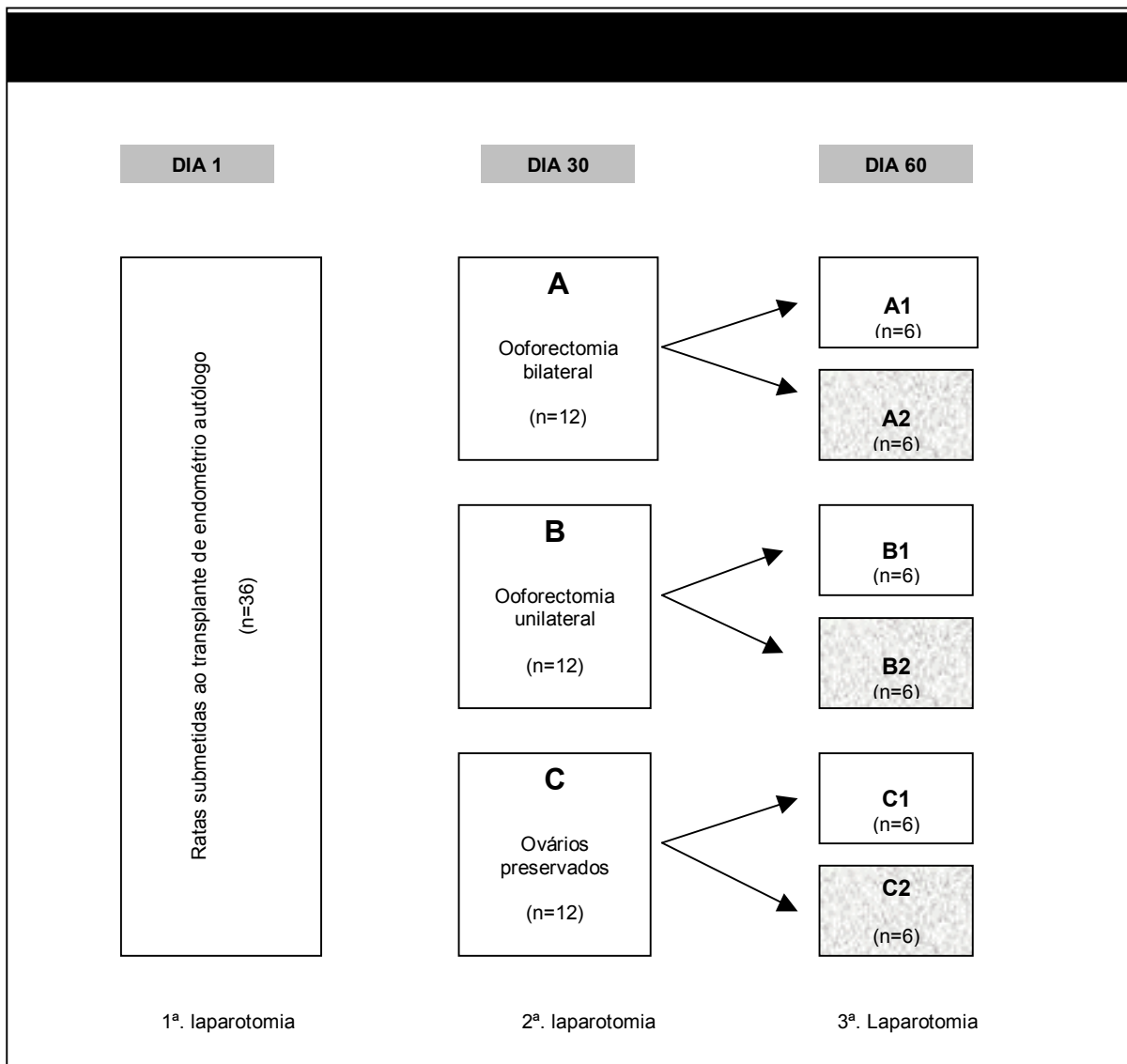


Figura 1: Desenho da pesquisa. E: uso do benzoato de estradiol.

#### 4.2.2 Pré-Operatório

As ratas foram anestesiadas com uma solução previamente preparada com 1 ml de cloridrato de xilazina a 2% e 1 ml de cloridrato de cetamina a 50mg/ml; recebendo 0,2 ml para cada 100 g peso do animal via intramuscular (músculo

extensor da coxa direita traseira). O tempo de indução ou latência observado foi de aproximadamente 3 minutos e o período anestésico persistiu por cerca 2 horas. Após a paralisia das vibrissas, foi realizada a secção dos pêlos da região ventral e posicionamento do animal em prancha de cortiça, em decúbito dorsal, com as pernas em posição anatômica, ligeiramente abduzidas e as patas fixadas com fita gomada.

#### **4.2.3 Procedimento cirúrgico**

O implante endometrial foi realizado em todos os animais (n = 36).

Após antissepsia da parede abdominal com álcool iodado e colocação de campo cirúrgico fenestrado, foi realizada incisão mediana longitudinal supra-púbica de aproximadamente 5 cm de extensão. Seguindo-se a abertura dos planos aponeuróticos, muscular e peritoneal, os afastadores foram colocados nas bordas da incisão cirúrgica. Após a identificação dos cornos uterinos, o corno esquerdo foi isolado a 2 cm da junção com o colo uterino e a arcada vascular do meso e os seus vasos cauterizados, para a sua retirada.

O segmento do corno uterino foi transferido para uma lâmina com escala milimetrada, mantido úmido com solução salina 0,9% e aberto no sentido longitudinal na face mesentérica. A ressecção do endométrio foi realizada no sentido transversal do corno, separando-se a camada basal do endométrio da camada muscular com o emprego de tesoura microcirúrgica reta e de bisturi oftalmológico. Do fragmento de endométrio foram retirados quatro retalhos de 4x4mm.

Entre as bifurcações dos vasos, os quatro retalhos endometriais foram suturados com ponto simples (náilon 8-0), dois em cada lado do abdome, mantendo-se o contato da porção basal do endométrio com o peritônio subjacente. Os implantes foram numerados de acordo com convenção de que os do lado esquerdo, o que estava em posição mais alta era o número um, enquanto o que estava em posição mais baixa era o número dois. Do lado direito os implantes foram o três e o quatro respectivamente.

Após revisão da cavidade abdominal foi realizada a síntese da parede com pontos totais em sutura simples, com fio náilon 3-0.

Após a cirurgia os animais foram mantidos no Biotério Central, sem alteração nos hábitos anteriores.

#### **4.2.4. Realização da ooforectomia**

No 30º dia após a realização dos implantes, as ratas do Grupo A foram submetidas à ooforectomia bilateral, as do grupo B foram submetidas à ooforectomia unilateral, e, as do grupo C permaneceram com os ovários preservados. Neste momento, foi feita a retirada do implante de número 2 de cada animal para a confirmação de sua viabilidade. Após identificação dos ovários e de seu pedículo vascular, que foi cauterizado fez-se a retirada do anexo esquerdo dos animais submetidos à ooforectomia unilateral e também do anexo direito se o animal pertencia ao grupo A. Em seguida foi realizada a sutura da parede abdominal como descrito anteriormente.



#### **4.2.5. Administração de estrogênio**

As ratas dos subgrupos A2, B2 e C2 foram selecionadas aleatoriamente e receberam injeções intramusculares de benzoato de estradiol na dose de 0,1 mg, duas vezes por semana, pelo período de um mês. A aplicação foi realizada no músculo extensor da coxa direita traseira dos animais.

Os animais dos subgrupos A1, B1 e C1 não receberam nenhuma medicação.

#### **4.2.5. Exérese do implante**

Após a sua identificação os implantes foram retirados. Na segunda laparotomia foi retirado o implante de número dois e na terceira laparotomia o implante um e três, tendo-se o cuidado de preservar sua estrutura para em seguida colocá-los em frascos individualizados, contendo formol a 10%.

#### **4.2.6. Sacrifício**

Os animais foram sacrificados ainda anestesiados ao final da terceira laparotomia através da inalação excessiva de éter sulfúrico (P.A.), sem contato com o ar ambiente, até apresentarem parada respiratória.

#### **4.2.9. Avaliação histopatológica**

Os fragmentos foram incluídos em blocos de parafina e cortados em aproximadamente quatro micrômetros de espessura em dois níveis diferentes. As lâminas foram coradas pela hematoxilina-eosina.

As amostras de tecido retiradas foram analisadas quanto à presença de glândulas e de estroma de padrão endometrial.

#### 4.2.9.1. Glândulas

Foi observada a presença ou ausência de glândulas de padrão endometrial, sendo consideradas apenas aquelas que apresentavam revestimento epitelial e formação luminal.

#### 4.2.9.3. Estroma endometrial

Verificou-se a presença ou ausência de estroma de padrão endometrial

### **4.2.10. Análise Estatística**

Foi utilizado o Teste Qui-Quadrado para avaliar a associação entre duas variáveis qualitativas, considerando os 36 indivíduos com resposta válida nas duas variáveis. O nível de significância considerado foi 5%. Quando necessário, o teste Qui-Quadrado foi adaptado (Teste Exato de Fisher).

## 5. RESULTADOS

Trinta dias após a implantação cirúrgica de endométrio autólogo, durante a segunda laparotomia, foi retirado o fragmento codificado como de número 2 para avaliação histológica. A presença de tecido endometrial foi confirmada em todos os animais.

Sessenta dias após a implantação cirúrgica de endométrio autólogo, na terceira laparotomia, foi retirado o fragmento alocado à direita dos vasos hipogástricos no lado direito dos animais (codificado como de número 3) para avaliação histológica.

Cada amostra foi avaliada segundo a presença ou ausência de glândulas e/ou estroma de padrão endometrial.

Foi encontrado tecido endometrial (glândulas e/ou estroma) em 10 (27,8%) amostras distribuídas conforme indica a tabela abaixo. (Tabela 1).

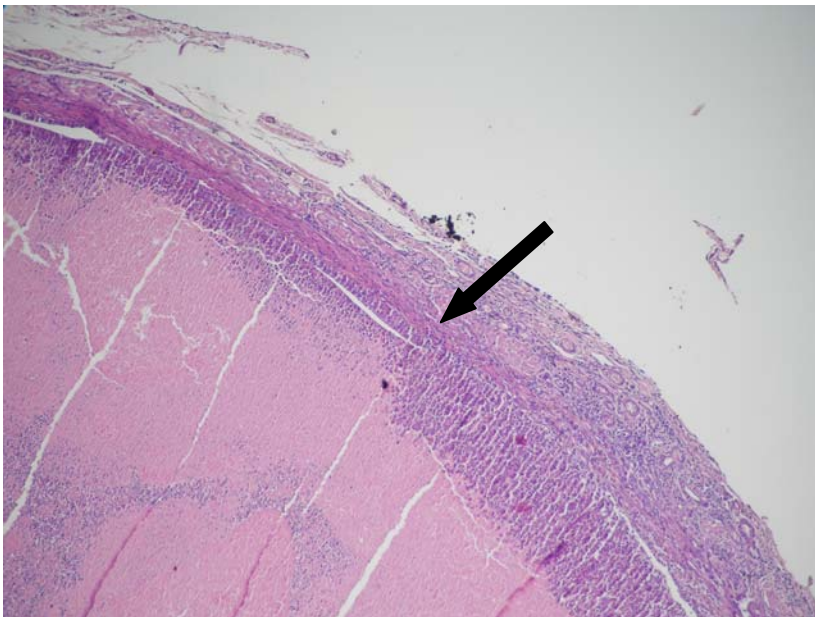
	<b>A</b> Ooforectomia Bilateral (n=12)		<b>B</b> Ooforectomia Unilateral (n=12)		<b>C</b> Ovários Preservados (n=12)	
	<b>A1</b> (n=6)	<b>A2 (E)</b> (n=6)	<b>B1</b> (n=6)	<b>B2 (E)</b> (n=6)	<b>C1</b> (n=6)	<b>C2 (E)</b> (n=6)
<b>Glândulas e/ou Estroma</b>	3 (50%)	2 (33,3%)	0 (0%)	2 (33,3%)	3 (50%)	0 (0%)

**Tabela 1: Distribuição da presença de tecido endometrial (glândulas e/ou estroma) nos subgrupos ao final de 60 dias. E: uso do benzoato de estradiol**

Todos os subgrupos foram comparados entre si (A1x A2), (B1x B2) e (C1 x C2), bem como os subgrupos A1, A2, B1 e B2 foram comparados com o subgrupo C1, uma vez que este não sofreu nenhuma interferência além do implante autólogo de endométrio. Não houve resultados significativos ( $p < 0,05$ ), ou seja, não encontramos diferença estatisticamente significativa para nenhuma das comparações.

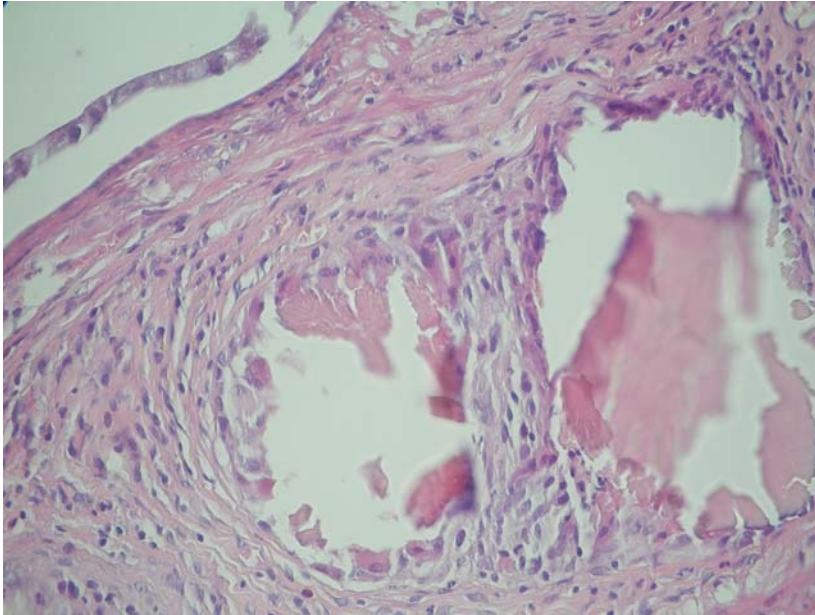
Outra observação foi encontro de reação gigantocelular e infiltrado inflamatório linfohistiocitário em 35 (97,2%) indivíduos, independente da presença ou ausência de tecido endometrial, fazendo deste achado um evento praticamente unânime.

A ilustração abaixo (figura 2) demonstra a situação descrita acima, onde podemos perceber a descontinuidade do tecido endometrial que cede a presença do infiltrado inflamatório.



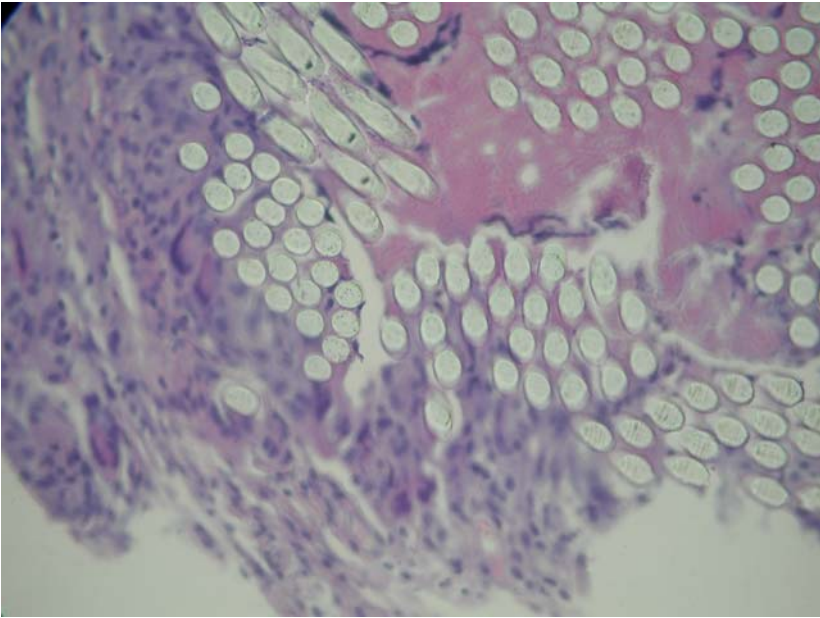
**Figura 2: Implante endometrial com abscedação (Subgrupo A1) A seta aponta para a transição entre o epitélio endometrial e o infiltrado inflamatório. HE. (Aumento 100 vezes)**

Na figura 3, que também evidencia o processo inflamatório podemos observar o infiltrado inflamatório ao redor de duas glândulas endometriais.



**Figura 3: Infiltrado inflamatório linfo-histiocitário com reação tipo corpo-estranho circundando as glândulas endometriais. Subgrupo C1.HE (400 x)**

Em 26 amostras (72,2%) a descrição histológica era em sua maioria de tecido conjuntivo com infiltrado linfocitário, presença de reação inflamatória tipo corpo-estranho, depósito de hemossiderina e evidências de degeneração do tecido endometrial implantado, como reação ao fio de sutura (figura 4)



**Figura 4: Reação gigantocelular a corpo estranho (fio de sutura) Subgrupo C1 HE. (400 x)**

## 6. DISCUSSÃO

O papel dos ovários na manutenção dos implantes de endométrio induzidos cirurgicamente no peritônio de ratas, bem como os mecanismos envolvidos neste processo são importantes para todos os ramos de pesquisas que envolvem o tratamento da endometriose, pois, a vitalidade destes tecidos é fundamental para a investigação de sua resposta as drogas.

O presente trabalho não mostrou diferença estatística entre os subgrupos estudados. A ooforectomia uni ou bilateral, seguida ou não da administração de estrogênio não alterou o comportamento dos tecidos implantados em um período de sessenta dias.

É importante ressaltar que houve grande regressão dos implantes em todos os grupos estudados, de uma maneira geral, a despeito de qualquer intervenção, observou-se esta tendência, pois, ao final de 60 dias, apenas 27,8% das amostras continham tecido endometrial.

Outro resultado relevante desta pesquisa, foi o encontro de reação inflamatória durante a avaliação histológica em 35 indivíduos (97,2%), o que fez deste achado o evento mais freqüente. Esta observação sugere que o tecido endometrial, embora autólogo, estimula a resposta imune do animal que atua no sentido de degeneração e destruição do mesmo.

Vale a pena apontar para o encontro de tecido endometrial em três amostras do grupo A1 (grupo que foi submetido à ooforectomia bilateral e que não recebeu estrogênio), uma vez que se acredita no papel fundamental dos ovários para a manutenção destas lesões, este resultado não era esperado, e contraria os

achados de ROSSI (2000), no qual o pesquisador afirma que a presença de ovários funcionantes é fundamental para a manutenção destas lesões.

RAJKUMAR et al (1990) também implantaram fragmentos autólogos de endométrio autólogo no peritônio parietal e realizaram ooforectomia em oito ratas. No segundo mês retiraram alguns fragmentos dos locais de implantação e verificaram a completa regressão dos implantes. Iniciaram então a administração de cipionato de 17 – beta estradiol (duas vezes por semana) e após 15 dias observaram recorrência do tecido endometrial ectópico. Um achado semelhante também foi observado por Sharpe *et al.* (1991) em estudo no qual observou o retorno dos implantes em ratas que tinham recebido análogos de GnRH após a supressão desta terapia. Já em nossa pesquisa as ratas permaneceram com os seus ovários preservados até o trigésimo dia, e só a partir de então sofreram as intervenções (ooforectomia total ou parcial, seguida ou não da administração de estrogênio) e curiosamente todos os grupos comportaram-se de maneira semelhante com tendência a regressão dos implantes independente da preservação da função reprodutiva ou da administração de estrogênio.

Em 1994, ORTEGA-MORENO, ao estudar duas técnicas para implantação de endométrio no peritônio parietal de ratas não encontrou tecido endometrial após 30 e 60 dias da implantação em nenhum dos animais independente do método utilizado (parede uterina total x fragmento de endométrio autólogo). Sendo assim, parece existir uma tendência a regressão dos implantes, mas a maneira como este processo se estabelece e o tempo necessário para tal não estão definidos.



Outro resultado intrigante foi a ausência de tecido endometrial em todas as amostras do subgrupo C 1 (que permaneceu com os ovários preservados e recebeu estrogênio), sendo assim, interroga-se qual seria a real ação inibidora da medicação sobre a fisiologia da reprodução e aponta para a importância de ovários funcionalmente íntegros ou de hormônio ovariano para a manutenção destes implantes.

Desta maneira, ainda faz-se necessário a realização de outros experimentos com um tempo de seguimento maior para determinar quando estas lesões se tornam estáveis, quando regridem e qual é a hostilidade do peritônio das ratas ao implante de endométrio.

## **7. CONCLUSÃO**

A integridade funcional dos ovários, associada ou não ao uso de estrogênio, não interferiu na manutenção de implantes de endométrio induzidos cirurgicamente no peritônio de ratas.

Os implantes de endométrio induzidos cirurgicamente no peritônio das ratas apresentaram significativa regressão quando avaliados histologicamente sessenta dias após a sua implantação.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBIERI, R. L. Etiology and epidemiology of endometriosis. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 162, p. 565-567, 1990.

BERQVIST, A. *et al.* Human uterine endometrium and endometriotic tissue transplanted into nude mice. Morphologic effect of various steroid hormones. **Am J Pathol.** v. 121, p. 337-341, 1985.

COTRIM, S. S. **Efeito da Administração Intraperitoneal de Pentoxifilina sobre implantes Endometriais Induzidos Cirurgicamente No Peritônio de Ratas.** 2004. 95 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004.

D'HOOGHE, T. M. & HILL, J. A. Endometriose. Em: **Novak Tratado de Ginecologia.** J. S. Berek, Guanabara Koogan, 12<sup>a</sup>. edição, 1998.

DIZEREGA, G. S., BARBER, D.L., HODGEN, G. D. Endometriosis: role of ovarian steroids in initiation, maintenance, and suppression. **Fertil Steril.**, v. 33, p. 649-653, 1980.

DMONWSKY, W. P. *et al.* Deficient cellular immunity in endometriosis. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v 141, p 377-183, 1981.

FREEMAN, M. E. The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. In: **The physiology of reproduction**. E. Knobil and J. D. Neil. Raven Press, 1994.

FORTIN *et al.* An improved mouse model for endometriosis allows noninvasive assessment of lesion implantation and development. **Fertil Steril.**, v. 80 (2), p. 832-838, 2001.

FOSTER, W. G., RUKA, M. P. *et al.* Morphologic characteristics of endometriosis in the mouse model: application to toxicology. **Can J Physiol Pharmacol.** v. 75, p. 1188-1196. 1997

GALLOVÁ, Z. U. *et al.* Endometriosis in reproductive immunology. **Am J Obstet Gynecol**, v 47, p. 269-274, 2002.

GOLAN, A. *et al.* The effect of treatment on experimentally produced endometrial peritoneal implants. **Fertil Steril.**, v. 46, p. 954-958, 1986.

GRUMER, R., SCHWARZER, F., *et al.* Peritoneal endometriosis: validation of an in-vivo model. **Hum Reprod.**, v 16, p. 1736-1743, 2001.

HENIG, I. *et al.* Effects of danazol, gonadotropin – releasing hormone agonist, and estrogen/progesterone combination on experimental endometriosis in the ovariectomized rat. **Fertil Steril**, v.49, n. 2, p. 349-355, 1988.

HOUSTON, D. E. *et al.* The epidemiology of pelvic endometriosis. **Clin. Obstet. Gynecol.**, v. 31, p. 787-800, 1988.

JACOBSON, V. C. The intraperitoneal transplantation of endometrial tissue. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 1, p. 169-183, 1926.

JENKINS, S. *et al.* Endometriosis: pathogenic implications of the anatomic distribution. **Obstet. Gynecol.** V. 67, p. 335-338, 1986.

JONES, R. C. The effect of luteinizing releasing hormone (LHR) agonist (Wy-40, 972), levonogestrel, danazol and ovariectomy on experimental endometriosis in the rat. **Acta Endocrinol (Copenh)**. v. 106, p 282, 1984.

KALIL, I. V. **Avaliação histológica de implantes de parede uterina total induzidos cirurgicamente em peritônio de ratas, após ooforectomia e estrogênio-terapia.** Belo Horizonte. Universidade Federal de Minas Gerais. 2000, 117p. (Dissertação de Mestrado – Área de Concentração: Ginecologia e Obstetrícia).

KNAPP, V.J. How old is endometriosis? Late 17<sup>th</sup> and 18<sup>th</sup> century European descriptions of the disease. **Fertil. Steril.** v. 72, p. 10-14, 1999.

LEBOVIC, D.I, *et al.* Induction of angiogenic phenotype in endometriotic stromal cell cultures by interleukin-1 beta. **Mol. Hum. Reprod.**, v. 6, p. 269-275, 2000.

MARTINS, M. M. F. **Avaliação da Viabilidade dos Implantes Endometriais Após Uso de Estrogênio Isolado Ou Associado À Progesterona em Ratas Ooforectomizadas.** 2002. 107 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.

MISSMER, S. A. *et al.* The epidemiology of endometriosis. **Obstet. Gynecol. Clin. N Am.** v. 30, p 1-19, 2003.

MUSE, K. Clinical manifestations and classifications of endometriosis. **Clin. Obstet. Gynecol.** v. 31, p 813-822, 1988.

NAVARRO, J. *et al.* How does endometriosis affect infertility? **Obstet. Gynecol. Clin. N. Am.**, v 30, p. 181-192, 2003.

NAP *et al.* Antiangiogenesis Therapy for Endometriosis. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 89 (3), p. 1089-1095, 2003.

NISOLE, M & DONNEZ, J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. **Fertil Steril.**, v 68, p 585-596, 1997.

NOGUEIRA, A. P. & ABRÃO, M.S. Endometriose: as hipóteses etiopatogênicas atuais. Em: **Endometriose. Uma visão contemporânea**. M.S. Abrão. Revinter, 2000.

OLIVE, D.L., PRITTS, E. A. Treatment of Endometriosis Review Article. **N Engl J Med**. v. 345 (4), p. 266-275, 2001.

ORTEGA-MORENO, J. Comparación de los técnicas para inducir la endometriosis experimental em la rata. **Clin. Invest. Gin. Obst**, v. 21, p. 54-59, 1994.

PAVIOTTI, A. P. **Estudo histológico comparativo entre o endométrio tópico e os implantes endometriais após o uso de estrogênio isolado ou associado ao progestágeno em ratas ooforectomizadas**. 2004. 100 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004.

RAJKUMAR, K. *et al*. The rat as an animal model for endometriosis to examine the recurrence of ectopic endometrial tissue after regression. **Fertil Steril**, v. 53, p. 921-925, 1990.

REZENDE, C. A. L. **Endometriose: estudo experimental sobre os efeitos recíprocos entre a endometriose induzida e a prenhez em ratas albinas**. Belo

Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 1993. 256 p. (Tese de Doutorado – Área de concentração: Cirurgia Abdominal).

ROCK, J. A. et al. Intraocular endometrium in the rabbit as model for endometriosis. **Fertil Steril.** v.59, p. 232-235, 1993.

ROSSI *et al.* Dynamic aspects of endometriosis in a mouse model through analysis of implantation and progression. **Arch Gynecol Obstet.**, v 263, p. 102-107, 2000.

SAMPSON, J. A. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v 14, p. 422-467, 1927.

SANTOS JUNIOR, J.L. **Modelo experimental de endometriose produzido por técnica microcirúrgica em ratas albinas – Estudo anatomopatológico dos implantes sob ação de danazol, valerianato de estradiol e ooforectomia.** Botucatu: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 1986. 127p (Tese de Doutorado - Área de Concentração: Ginecologia e Obstetrícia).

SHARP, K. L. *et al.* Spontaneous and steroid-induced recurrence of endometriosis after suppression by a gonadotropin-releasing hormone antagonist in the rat. **Am J Obstet Gynecol.**, v. 164, p. 187-194, 1991.



SCHOR, E. *et al.* Endometriose: Modelo Experimental em ratas. **RBGO**, v. 21, p. 281-284, 1999.

STORY, L., KENNEDY, S. Animal Studies in Endometriosis: A Review. **ILAR Journal.**, v. 45 (2), p. 132-138, 2004.

VERNON, M. N., WILSON, E. A. Studies on the surgical induction of endometriosis in the rat. **Fertil Steril.** v. 44, p. 127, 1985.

YANG, J. Z., FOSTER, W. G. Continuous Exposure to 2,3,7,8,-Tetrachlorodibenzeno-p-dioxin Inhibits The Growth of Surgically Induced Endometriosis In The ovariectomized Mouse Treated With High Dose Estradiol. **Toxicol Ind Health.**, v. 13, p. 15-25, 1997.

ZANAGNOLO, L. V. Time-related effects of gonadotropin-releasing hormone analog treatment in experimentally induced endometriosis in the rat. **Fertil Steril.**, v. 55, p. 411-415, 1991.

