



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA**

**FRANCISCO EDSON XIMENES GOMES PEREIRA**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MODELO DE ENDOMETRIOSE  
SUBCUTÂNEA EM RATAS PARA ESTUDO DE PROVÁVEIS MECANISMOS  
FISIOPATOLÓGICOS E DO EFEITO DE DROGAS**

**FORTALEZA**

**2013**

**FRANCISCO EDSON XIMENES GOMES PEREIRA**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MODELO DE ENDOMETRIOSE  
SUBCUTÂNEA EM RATAS PARA ESTUDO DE PROVÁVEIS MECANISMOS  
FISIOPATOLÓGICOS E DO EFEITO DE DROGAS**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Médico-Cirúrgicas. Área de concentração: Metabolismo e Comportamento Biocelular no Estresse.

Orientador: Prof. Dr. Francisco das Chagas Medeiros

**FORTALEZA**

**2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências da Saúde

- 
- P436d      Pereira, Francisco Edson Ximenes Gomes.  
            Desenvolvimento e validação de um modelo de endometriose subcutânea em ratas para estudo de prováveis mecanismos fisiopatológicos e do efeito de drogas / Francisco Edson Ximenes Gomes Pereira. – 2013.  
            76 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Cirurgia, Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, Mestrado em Ciências Médico-Cirúrgicas, Fortaleza, 2013.  
            Área de Concentração: Metabolismo e Comportamento Biocelular no Estresse.  
            Orientação: Prof. Dr. Francisco das Chagas Medeiros.
1. Endometriose. 2. Modelos Animais. 3. Modelos Animais de Doenças. 4. Ratos. I. Título.

---

CDD 618.1075

**FRANCISCO EDSON XIMENES GOMES PEREIRA**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MODELO DE ENDOMETRIOSE  
SUBCUTÂNEA EM RATAS PARA ESTUDO DE PROVÁVEIS MECANISMOS  
FISIOPATOLÓGICOS E DO EFEITO DE DROGAS**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Médico-Cirúrgicas. Área de concentração: Metabolismo e Comportamento Biocelular no Estresse.

Aprovada em: 06/12 /2013.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Francisco das Chagas Medeiros (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Angelina Silva Medeiros  
Universidade de Fortaleza - UNIFOR

---

Prof. Dr. Luciano Silveira Pinheiro  
Universidade Federal do Ceará – UFC

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Francisco Airton Gomes Pereira e Maria Ximenes Gomes Pereira, por me educar e proporcionar as condições adequadas para meu aprendizado.

À minha esposa Erivania da Cruz Gomes Ximenes e a meus filhos, Camila, Bruno e Samuel, por compreenderem a falta de atenção que deixei de dar a eles.

Ao Prof. Dr. Francisco das Chagas Medeiros, meu Orientador, pelos conhecimentos transmitidos e o tempo dispensado mesmo fora de horário de trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos, Coordenador da Pós-Graduação do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, por ter aceitado o meu projeto de ingresso no Mestrado.

Ao Prof. Dr. Antônio Ribeiro da Silva Filho, por ter iniciado os contatos com o Departamento de Cirurgia.

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Carvalho de Almeida, por ter feito toda a análise histológica do nosso trabalho, pela consideração e paciência em me transmitir os conhecimentos necessários ao entendimento do estudo em epígrafe.

Aos estudantes de Medicina Ana Carolina Rodrigues de Andrade, Angélica Maria Holanda Pascoal da Silva e Francisco Eugênio de Vasconcelos Filho, pela ajuda no trabalho de laboratório e, em especial ao Bruno Hállan Meneses Dias que além da ajuda no laboratório, também foi importante nos cálculos estatísticos.

Ao Sr. Bento Francisco de Oliveira, técnico do biotério, que foi muito importante no cuidado com as ratas; sem sua ajuda seria quase impossível realizar este trabalho.

## RESUMO

A endometriose é definida como a presença de tecido endometrial (glândula e estroma) fora do útero (mais precisamente revestimento endometrial). O objetivo foi desenvolver e validar um modelo de endometriose subcutânea em ratas para estudo de prováveis mecanismos fisiopatológicos e do efeito de drogas. Inicialmente, as ratas (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar) foram implantadas subcutaneamente com fragmentos uterinos 4x4 mm para avaliar o crescimento de endometrioma após 1, 7, 14 e 21 dias. Implantes de tecido endometrial foram confirmados por análise histológica. O maior ganho de peso relativo do endometrioma foi observado no dia 14 (peso úmido relativo  $29,1 \pm 6,79$  mg%, peso seco relativo  $5,36 \pm 0,97$  mg%). Posteriormente, os animais foram divididos em grupos e receberam estradiol (2,5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg sc), acetato de medroxiprogesterona (0,5 mg/kg, 2 mg/kg, 5 mg/kg sc), pamoato de triptorrelinea (0,18 mg/kg, 0,56 mg/kg sc) e ácido acetilsalicílico (3 mg/kg gavagem) no quinto dia após a implantação. Peso úmido relativo e seco relativo do endometrioma foram usados como um indicador de crescimento para o modelo de endometriose. No grupo tratado com estradiol, o peso úmido relativo médio e peso seco relativo médio no dia 14 após a implantação foi de  $36,62 \pm 4,97$  mg% e  $3,97 \pm 1$  mg % (2,5 mg/kg),  $56,37 \pm 20,19$  mg% e  $9,11 \pm 3,85$  mg% (5 mg/kg),  $173,89 \pm 69,53$  mg% e  $27,67 \pm 10,27$  mg% (10 mg/kg), respectivamente. No grupo tratado com acetato de medroxiprogesterona, os valores correspondentes foram  $13,58 \pm 2,53$  mg% e  $2,67 \pm 0,5$  mg% (0,5 mg/kg),  $14,29 \pm 2,07$  mg% e  $3,71 \pm 1,31$  mg% (2 mg/kg), e  $15,33 \pm 7,08$  mg% e  $2,68 \pm 1,44$  mg% (5 mg/kg). No grupo tratado com pamoato de triptorrelinea, os valores correspondentes foram  $20,04 \pm 4,02$  mg% e  $5,21 \pm 1,54$  m% (0,18 mg/kg), e  $10,86 \pm 1,88$  mg% e  $1,89 \pm 0,29$  mg% (0,56 mg/kg). No grupo tratado com ácido acetilsalicílico 3 mg/kg, os valores correspondentes foram  $12,81 \pm 2,04$  mg% e  $2,09 \pm 0,4$  mg%. No grupo de estradiol, o ganho de crescimento foi dependente da dose: os animais que receberam 10 mg/kg diferiram significativamente dos animais que receberam doses mais baixas e a partir de animais não tratados ( $p < 0,0001$ ). Em conclusão, o modelo mostrou ser reprodutível e fácil de usar.

**Palavras chave:** Endometriose. Modelos Animais. Modelos Animais de Doenças. Ratos.

## ABSTRACT

Endometriosis is defined as the presence of endometrial tissue (gland and stroma) outside the uterus. The objective of this study was to design a model of subcutaneous endometriosis in rats for the evaluation of the effect of drugs and the pathophysiology of endometriosis. Initially, female Wistar rats (*Rattus norvegicus*) were implanted subcutaneously with 4x4 mm uterine fragments to evaluate endometrioma growth after 1, 7, 14 and 21 days. Endometrial tissue implants were confirmed by histological analysis. The greatest relative weight gain was observed on the 14th day (wet weight  $29.17 \pm 6.79$  mg%; dry weight  $5.36 \pm 0.97$  mg%). Subsequently, animals were assigned to treatment groups and given either estradiol (2.5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg sc), medroxyprogesterone acetate (0.5 mg/kg, 2 mg/kg, 5 mg/kg sc), triptorelin pamoate (0.18 mg/kg, 0.56 mg/kg sc) and acetylsalicylic acid (3 mg/kg gavage) on the fifth day following implantation. Wet and dry relative weight of the endometrioma were used as a indicator of growth for model of endometriosis. In the group treated with estradiol, the average wet weight and dry weight on the 14 th day following implantation was  $36.62 \pm 4.97$  mg% and  $3.97 \pm 1$  mg% (2.5 mg),  $56.37 \pm 20.19$  mg% and  $9.11 \pm 3.85$  mg% (5 mg), and  $173.89 \pm 69.53$  mg% and  $27.67 \pm 10.27$  mg% (10 mg), respectively. In the group treated with medroxyprogesterone acetate, the corresponding figures were  $13.58 \pm 2.53$  mg% and  $2.67 \pm 0.5$  mg% (0.5 mg),  $14.29 \pm 2.07$  mg% and  $3.71 \pm 1.31$  mg% (2 mg), and  $15.33 \pm 7.08$  mg% and  $2.68 \pm 1.44$  mg% (5 mg). In the group treated with triptorelin pamoate, the corresponding figures were  $20.04 \pm 4.02$  mg% and  $5.21 \pm 1.54$  mg% (0.18 mg), and  $10.86 \pm 1.88$  mg% and  $1.89 \pm 0.29$  mg% (0.56 mg). In the group treated with 3 mg acetylsalicylic acid, the corresponding figures were  $12.81 \pm 2.04$  mg% and  $2.09 \pm 0.4$  mg%. In the estradiol group, growth gain was dose-dependent: animals receiving 10 mg differed significantly from animals receiving lower doses and from untreated animals ( $p < 0.0001$ ). In conclusion, the model was found to be reproducible and easy to use.

**Key words:** Endometriosis. Models, Animal. Disease Models, Animal. Rats

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1-	Fisiopatologia da sobrecarga de ferro ( $F^{2+}$ )	23
Figura 2 -	Mecanismo de produção do estrogênio via AMPc	24
Figura 3 -	Mecanismo de produção do estrogênio via ciclooxigenase	26
Figura 4 -	Expressão da aromatase na endometriose	27
Figura 5 -	Incisão da pele da parede abdominal	36
Figura 6 -	Túnel para implante do fragmento uterino	36
Figura 7 -	Cavidade peritoneal aberta	37
Figura 8 -	Identificação do hemi-útero esquerdo	37
Figura 9 -	Exérese do hemi-útero esquerdo	38
Figura 10 -	Abertura longitudinal do hemi-útero	38
Figura 11 -	Fragmento de 4x4mm de área de hemi-útero esquerdo de rata	39
Figura 12 -	Momento do implante no subcutâneo	39
Figura 13 -	Aspecto final da cirurgia	40
Figura 14 -	Ratas na recuperação após cirurgia	40
Figura 15 -	Histomorfometria de endometrioma subcutâneo de rata. Hematoxilina e eosina (40x)	42
Figura 16 -	Curva de crescimento dos endometriomas subcutâneos em ratas	45
Figura 17 -	Aspectos macroscópicos dos endometriomas em dias da curva de crescimento	50
Figura 18 -	Detalhe da vascularização dos endometriomas	51
Figura 19 -	Aspectos histológicos de endometrioma subcutâneo de rata	52
Figura 20 -	Detalhes de achados histológicos de endometrioma subcutâneo de rata	52
Figura 21 -	Histomorfometria das lesões endometrióticas subcutâneas de rata	56



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Curva de desenvolvimento dos pesos relativos úmidos e secos dos endometriomas subcutâneos comparada aos pesos dos hemi-úteros direitos em rata	44
Tabela 2 -	Efeito dos esteroides sexuais ( $\beta$ -estradiol e acetato de medroxiprogesterona) sobre o desenvolvimento dos endometriomas subcutâneos e hemi-úteros direitos em ratas.	47
Tabela 3 -	Efeito do GnRH (pamoato de triptorrelina) sobre o desenvolvimento dos pesos relativos dos endometriomas subcutâneos e hemi-úteros direitos em ratas.	48
Tabela 4 -	Efeito do AAS (ácido acetilsalicílico) sobre o desenvolvimento dos pesos relativos dos endometriomas subcutâneos e hemi-úteros direitos em ratas.	48
Tabela 5 -	Histomorfometria das lesões endometrióticas subcutâneas em ratas	55

## LISTA DE ABREVIATURAS

AAS	Ácido acetilsalicílico
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	Teste estatístico de análise de variância
17- $\beta$ -HSD1	17- $\beta$ -hdroxiesteróide desidrogenase tipo 1
17- $\beta$ -HSD2	17- $\beta$ -hdroxiesteróide desidrogenase tipo 2
CAM	Membrana corioalantóica de frango
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CD44	Receptor de ácido hialurônico
CEPA	Comissão de Ética em Pesquisa Animal
COX-1	ciclooxigenase-1
COX-2	ciclooxigenase-2
COUP-TF	<i>ovalbumin upstream promoter transcription factor</i>
CREB	<i>cyclic-amp response element Binding protein</i>
F <sup>2+</sup>	Ferro
Flt1	Receptor tirosina quinase
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
HO	Heme oxigenasse 1
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular
I $\kappa$ B	Proteína inibitória do NF- $\kappa$ B
IKK	I $\kappa$ B quinase
IL-1 $\alpha$	Interleucina 1 alfa
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
KDR	Receptor tirosina quinase
MMPs	Metaloproteinases
MMP-3	Metaloproteinase tipo 3
MMP-7	Metaloproteinase tipo 7
NF- $\kappa$ B	Fator de transcrição nuclear kappa beta

PAAF	Punção aspirativa com agulha fina
PGs	Prostaglandinas
PGE2	Prostaglandina E2
PGF2 $\alpha$	Prostaglandina F2 $\alpha$
PR-A	Receptor de progesterona A
PR-B	Receptor de progesterona B
PUBMED	<i>US National Library of Medicine National Institute of Health</i>
RANTES	<i>Regulated on Activation Normal Tcell Expressed and Secreted</i>
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SF-1	Fator de transcrição estimulatório 1
TGF- $\beta$	Fator de transformação do crescimento beta
TIMPs	Inibidores teciduais da matriz metaloproteinases
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
1.1	Teoria da menstruação retrógrada ou Teoria da implantação de Sampson	13
1.2	Teoria da metaplasia celômica	14
1.3	Teoria da indução	14
1.4	Teoria dos restos embrionários	14
1.5	Teoria da metástase vascular e linfática	15
1.6	Sobrevivência e crescimento dos implantes	15
1.7	Invasão de células endometriais no mesotélio	16
1.8	Sobrevivência e proliferação das células endometriais ectópicas	17
1.9	Endometriose subcutânea	28
<b>2</b>	<b>PESQUISAS EM ANIMAIS</b>	<b>31</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>34</b>
3.1	Geral	34
3.2	Específicos	34
<b>4</b>	<b>ANIMAIS E MÉTODOS</b>	<b>35</b>
4.1	Animais	35
4.2	Modelo de endometriose subcutânea	35
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>44</b>
5.1	Curva de desenvolvimento dos pesos úmidos e secos relativos dos endometriomas subcutâneos no tempo comparado aos pesos dos hemi-úteros direitos de ratas	44
5.2	Efeito dos esteroides sexuais ( $\beta$ -estradiol e acetato de medroxiprogesterona), GnRH (pamoato de triptorrelina) e AAS (ácido acetilsalicílico) sobre os pesos úmidos e secos relativos dos endometriomas subcutâneos e hemi-úteros direitos de rata	45
5.3	Aspectos macroscópicos dos endometriomas subcutâneos	49
5.4	Aspectos histológicos e histomorfométricos dos	51

<b>endometriomas subcutâneos</b>	
5.4.1 <i>Histologia</i>	51
5.4.2 <i>Histomorfometria</i>	53
<b>6 DISCUSSÃO</b>	57
<b>6.1 Comparação do modelo com a literatura</b>	57
<b>6.2 Análise dos resultados</b>	61
6.2.1 <i>Curva de desenvolvimento</i>	61
6.2.2 <i>Efeito dos esteróides sexuais (<math>\beta</math>-estradiol e acetato de medroxiprogesterona) sobre o desenvolvimento dos endometriomas subcutâneos e hemi-úteros direitos de ratas</i>	61
6.2.3 <i>Efeito do GnRH (pamoato de triptorrelina) sobre o desenvolvimento dos endometriomas subcutâneos e hemi-úteros direitos de ratas</i>	63
6.2.4 <i>Efeito do AAS (Ácido Acetilsalicílico) sobre o desenvolvimento dos endometriomas subcutâneos e hemi-úteros direitos de ratas</i>	64
6.2.5 <i>Histomorfometria</i>	65
<b>7 CONCLUSÕES</b>	66
<b>REFERÊNCIAS</b>	67
<b>ANEXO</b>	77

## 1 INTRODUÇÃO

A endometriose é definida como a presença de tecido endometrial (glândulas e estroma) fora do leito endometrial (KITAWAKI *et al.*, 2003; MEDEIROS e VASCONCELOS, 2011).

Estima-se que sete milhões de mulheres nos Estados Unidos sejam acometidas por endometriose e mais de setenta milhões no mundo. Interessante notar que 3 a 5% de mulheres na pós-menopausa podem apresentar endometriose (BELLELIS *et al.*, 2010).

A endometriose não é doença exclusiva de mulheres, pois, existem casos descritos em homens sob terapia estrogênica prolongada para tratamento de carcinoma prostático, porém, nesses casos, com localização mais frequente no trato geniturinário (bexiga, próstata e região paratesticular) (MEIRELLES; LOSANO; VIANA; 2005).

Algumas pacientes portadoras de endometriose são assintomáticas. Em pacientes submetidas à laqueadura tubária sem sintomas de endometriose, pode-se fazer o diagnóstico em 2 a 18% delas. No entanto, a maioria apresenta sintomas em diferentes intensidades, sendo os principais sintomas: dismenorreia, dor pélvica crônica, infertilidade, dispareunia de profundidade, sintomas intestinais e urinários cíclicos, como dor ou sangramento ao evacuar ou urinar durante o período menstrual (BELLELIS *et al.*, 2010).

Existem várias teorias para explicar a origem da endometriose: Teoria da menstruação retrógrada ou Teoria da implantação de Sampson, da metaplasia celômica, da indução, de restos embrionários e da metástase vascular e linfática (SELI; BERKKANOGLU; ARICI; 2003).

### 1.1 Teoria da menstruação retrógrada ou Teoria da implantação de Sampson

Esta teoria defende que células endometriais refluem pelas trompas uterinas durante o período menstrual e se implantam no peritônio da cavidade abdominal. Para que isso ocorra, é preciso que haja refluxo menstrual, que as células sejam

viáveis e que elas sejam capazes de se aderirem, de se invadirem, de se implantarem e de se proliferarem no peritônio (SELI; BERKKANOGLU; ARICI; 2003).

Watkins, em 1938, observou sangue fluindo pelas trompas de Falopio em mulheres que foram submetidas à laparotomia durante a menstruação (WATKINS *apud* SELI; BERKKANOGLU; ARICI, 2003). A presença de sangue na cavidade abdominal foi observada em mulheres que foram submetidas à diálise peritoneal (BLUMENKRANTZ *et al.*, 1981). Estudos com laparoscopia demonstraram que a menstruação retrógrada ocorre em 76 a 90% das mulheres com tubas uterinas pérvias (HALME *et al.*, 1984; LIU; HITCHCOCK, 1986).

### **1.2 Teoria da metaplasia celômica**

A Teoria da metaplasia celômica defende que a endometriose se desenvolve de metaplasia de células do peritônio pélvico (METZGER; HANEY, 1989). Estímulo infeccioso, hormonal ou outros podem resultar em metaplasia das células do peritônio e resultar na endometriose (MEYER *apud* SELI; BERKKANOGLU; ARICI, 2003). Através de estudos embriológicos, mostrou-se que o peritônio pélvico, o epitélio germinativo do ovário e ductos müllerianos são derivados do epitélio da parede celômica. A ocorrência de endometriose em homens é vista como uma comprovação da teoria celômica (SCHRODT; ALCORN; IBANEZ, 1980 e OLIKER; HARRIS, 1971).

### **1.3 Teoria da indução**

A teoria da indução propõe que fatores bioquímicos ou imunológicos endógenos induzam células indiferenciadas a se diferenciar em tecido endometriótico. Essa teoria é suportada após uma experiência em que amostras de útero de coelhas grávidas foram implantadas no tecido subcutâneo, que foi estimulado com gonadotrofinas imediatamente antes do implante. Sete dias após, verificou-se células com características de endométrio e formação cística no tecido ao redor (LEVANDER; NORMANN, 1955).

### **1.4 Teoria dos restos embrionários**

A teoria de restos embrionários defende que restos celulares, de origem mülleriana, seriam ativados por estímulos específicos para diferenciarem-se em endométrio. Essa teoria poderia explicar alguns casos de endometriose relatados em homens (VON RECKLINGHAUSEN; RUSSEL *apud* SELI; BERKKANOGLU; ARICI, 2003).

### **1.5 Teoria da metástase vascular e linfática**

Sampson demonstrou a presença de tecido endometrial no interior de veias uterinas de mulheres com adenomiose (SAMPSON *apud* SELI; BERKKANOGLU; ARICI, 2003). Foi encontrado endometriose em 6,7% de nódulo linfático de 178 autópsias e em 6,5% de 153 mulheres que se submeteram a linfadenectomia (JAVERT, 1952). Essa teoria poderia explicar endometriose em osso, músculo, cérebro, nervo, pulmão, espaço vertebral e extremidades (JUBANYIR, 1997).

### **1.6 Sobrevivência e crescimento dos implantes**

A teoria da implantação é a mais aceita para o desenvolvimento da endometriose. Porque, somente algumas mulheres desenvolvem a doença, ainda não se sabe. Cinco etapas são necessárias para o desenvolvimento da lesão endometriótica: adesão das células endometriais ao peritônio, invasão das células endometriais no peritônio, recrutamento de células inflamatórias subsequentes ao implante, angiogênese ao redor do implante e proliferação celular endometrial (SELI; BERKKANOGLU; ARICI, 2003).

Fragmentos de endométrio na fase proliferativa e secretória, juntamente com peritônio, foram cultivados por um período de 24 a 48 horas, sendo encontrado endométrio aderido tanto no lado epitelial como no não epitelial do mesotélio. Quando foi repetido o experimento, deixando-se a cultura incubada por uma hora, foi observada a rápida adesão do endométrio ao peritônio, confirmando assim, que células endometriais podem aderir ao mesotélio intacto (WITZ; MONTOYA-RODRIGUES; SCHENKEN, 1999, 2001).

O ácido hialurônico é produzido e expresso ao longo da membrana das células mesoteliais, contribuindo para a matriz pericelular, onde é o maior



componente da matriz extracelular. O principal receptor para o ácido hialurônico é o CD44, células endometriais epiteliais e estromais expressam CD44. O pré-tratamento de células mesoteliais com hialuronidase diminui a adesão de células endometriais em 40% (DECHAUD *et al.*, 2001). Esses resultados sugerem que o ácido hialurônico e o CD44, podem estar envolvidos na adesão inicial do endométrio ao mesotélio (SELI; BERKKANOGLU; ARICI, 2003).

### **1.7 Invasão de células endometriais no mesotélio**

As enzimas metaloproteinases estão envolvidas na invasão do mesotélio. As metaloproteinases (MMPs) e os inibidores teciduais da matriz metaloproteinase (TIMPs), desempenham uma função importante na remodelação normal do endométrio que acompanha a menstruação (SALAMONSEN; WOOLLEY, 1996). As metaloproteinases são responsáveis pela degradação dos componentes da matriz extracelular (vários tipos de colágenos, gelatina, proteoglicanos, laminina, fibronectina e elastina) (BIRKEDAL-HANSEN, 1993). No endométrio eutópico, a expressão das metaloproteinases é regulada pelos hormônios (estrogênio e progesterona) e citocinas durante cada fase do ciclo menstrual. Coincidindo com a ruptura e a remodelação que ocorrem na menstruação e, durante a fase proliferativa inicial do ciclo menstrual, ocorre *up regulation* da expressão das metaloproteinases (RODGERS *et al.*, 1993). Durante a fase lútea, as MMPs são inibidas pela progesterona (SELI; BERKKANOGLU; ARICI, 2003). Fatores parácrinos que medeiam a ação da progesterona sobre a expressão das metaloproteinases endometrial tem sido investigados. Um desses fatores é o fator de transformação de crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), que é produzido pelo estroma endometrial em resposta a ação da progesterona e pode suprimir a expressão da MMP-7 epitelial independentemente da progesterona. Um anticorpo direcionado contra isoformas de mamíferos de TGF- $\beta$  (fator de transformação do crescimento beta), abole a supressão da progesterona na MMP-7 no estroma epitelial de co-cultura, que mostra o TGF- $\beta$  como o principal mediador da supressão da MMP-7 no endométrio humano (BRUNER *et al.*, 1995). Outra citocina que regula a expressão de MMP é a interleucina-1 alfa (IL-1 $\alpha$ ), que é um potente estimulador da MMP-3 na fase proliferativa endometrial em célula de cultura. A exposição *in vivo* à progesterona reduz a estimulação da IL-1 $\alpha$  sobre a MMP-3 na fase secretória (KELLER *et al.*,

2000). Células do estroma endometrial cultivada e tratada com progesterona provoca perda da sensibilidade em dobro da IL-1 $\alpha$  em estimular a MMP-3. A capacidade de estimulação da IL-1 $\alpha$  retorna ao normal com a retirada da progesterona (OSTEEN *et al.*, 1999). Células endometrióticas cultivadas, obtidas de um modelo de rato, expressam níveis elevados de MMP-3 quando comparadas com células estromais do endométrio eutópico de rato, ambas tratadas com progesterona. A expressão persistente e elevada de MMP-3 se relaciona com níveis elevados de IL-1 $\alpha$  visto nas células do estroma endometriótico tratadas com progesterona (COX; PIVA; SHARP-TIMMS, 2001). A produção de IL-1 $\alpha$  pelas células endometrióticas parece que elas são capazes de ultrapassar a supressão que a progesterona provoca na expressão da MMP-3, situação esta que não é vista na cultura de células estromais normais. Ainda não se sabe o que causa uma expressão aumentada de MMP e TIMP (SELI; BERKKANOGLU; ARICI, 2003).

### **1.8 Sobrevivência e proliferação das células endometriais ectópicas**

Uma resposta imune deficiente, que resulta em uma inadequada retirada dos debris do sangue menstrual refluído na cavidade abdominal, parece ser o fator causador da endometriose. Esta doença está associada com alterações na imunidade inata e adquirida, tanto ao nível de componente celular como humoral. O fluido peritoneal de mulheres com endometriose contém número aumentado de células imunes, essas células parecem facilitar o desenvolvimento da endometriose ao invés de inibi-lo. Os leucócitos, que deveriam retirar as células endometriais da cavidade peritoneal parecem ajudar na sua proliferação, secretando fatores de crescimento e citocinas. Os produtos secretórios das células imunes, como citocinas e prostaglandinas, contribuem para dismenorreia, dispareunia e dor pélvica crônica. A inflamação pélvica pode levar a aderências, cicatrizes e obstrução das tubas uterinas, assim como, interferir na foliculogênese, na fertilização e na implantação do embrião (SELI; BERKKANOGLU; ARICI, 2003).

Nas mulheres com endometriose, os monócitos do sangue periférico apresentam estado de ativação aumentado (ZELLER *et al.*, 1987). Os monócitos do sangue periférico, tanto em condições basais como estimulados, produzem fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-8 (IL-8) em níveis elevados em relação a mulheres saudáveis (BRAUN; GEBEL; HOUSE, 1996).

Macrófagos próprios da cavidade peritoneal removem células vermelhas sanguíneas, fragmentos teciduais danificados, células em apoptose e, provavelmente, células endometriais que atingiram a cavidade peritoneal através das tubas uterinas. O fluido peritoneal na endometriose apresenta concentração, e número de macrófagos muito aumentados em comparação a mulheres saudáveis. Eles são grandes e ativados que, em condições basais e estimulados, produzem altos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 e interleucina-10 (IL-10) (RANA; BRAUN; HOUSE, 1996). Esses macrófagos produzem também, elevados níveis de prostaglandinas (PGs), tais como PGE2 e PGF2 $\alpha$  (KARCK; REISTER; SCHAFER, 1996).

Os produtos de secreção dos macrófagos do peritônio e dos monócitos circulantes, de mulheres com endometriose parecem estimular o crescimento e manutenção dos focos de endometriose (LEBOVIC; MUELLER; TAYLOR, 2001). O líquido peritoneal de mulheres com endometriose em cultura estimula a proliferação de células do estroma do endométrio (SURREY; HALME, 1990). Os monócitos do sangue periférico de mulheres com endometriose estimulam a proliferação de células do endométrio em cultura, enquanto os monócitos de mulheres férteis inibem a proliferação de células do endométrio (BRAUN *et al.*, 1994).

Estudos demonstraram uma diminuição da atividade citotóxica das células *natural killer* contra endométrio autólogo e heterólogo (OOSTERLYNCK *et al.*, 1991; WILSON *et al.*, 1994). Foi evidenciado que as células *natural killer* tem maior expressão de receptores *killer-inhibitory* (WU *et al.*, 2000), quando estimulados, esses receptores enviam sinais inibitórios que inibem a atividade citotóxica (SELI; BERKKANOGLU; ARICI, 2003).

Em relação aos linfócitos periféricos, ocorre uma alteração qualitativa e não uma alteração quantitativa em mulheres com endometriose (GLEICHER *et al.*, 1984; HILL *et al.*, 1988). Os linfócitos T estão aumentados no líquido peritoneal (HILL *et al.*, 1988).

As citocinas agem como mensageiros parácrinos e autócrinos dentro do sistema imune e entre o sistema imune e outros sistemas do corpo. A ação delas é mediada por um receptor de citocina específico. Citocinas e fatores de crescimento são importantes na regulação de quimiotaxia, na mitose, na angiogênese e na diferenciação. Parecem estimular a implantação e crescimento de endométrio ectópico por indução da proliferação e da angiogênese (SELI; BERKKANOGLU; ARICI; 2003).

Os fatores de crescimento e citocinas no líquido peritoneal de mulheres com endometriose induzem à quimiotaxia de células mononucleares à cavidade peritoneal, o que leva a um aumento da secreção de fatores do crescimento e citocinas. Além disso, estimulam a adesão de células do estroma endometrial à fibronectina, facilitando assim, a fixação inicial das células endometriais à superfície do peritônio (GARCIA-VELASCO; ARICI, 1999). Adicionalmente aumentam a atividade das metaloproteinases que degradam a matriz extracelular, facilitando a invasão e induzem a proliferação das células estromais do endométrio, que estão envolvidas no processo de angiogênese (ARICI, 2002).

Igualmente aos implantes tumorais que não crescem mais do que 1-2 mm em tamanho, a não ser que desenvolva um suprimento sanguíneo, o implante de endométrio necessita desencadear uma resposta angiogênica para sobreviver em seu novo meio-ambiente (NAP *et al.*, 2004). Foi observado que no modelo de membrana corioalantóica, o endométrio humano é altamente angiogênico e capaz de atrair os vasos sanguíneos do tecido circundante (MAAS; LE NOBLE; DULSELMAN, 1999).

Foi observado que mulheres com endometriose apresentavam níveis de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) no peritônio bem maior que mulheres sem endometriose. As concentrações de fator de crescimento endotelial vascular apresentaram uma variação cíclica, sendo os níveis maiores na fase proliferativa do que na fase secretória. Interessante observar, que não houve variação cíclica nas mulheres saudáveis (McLAREN *et al.*, 1996a).

Receptores expressos pelos macrófagos Flt1 e KDR (receptores tirosina quinase para fatores de crescimento endotelial vascular em células endoteliais) foram detectados. Durante o ciclo menstrual a expressão de Flt1 foi constante, enquanto que a expressão de KDR aumentou na fase lútea, quando as células migraram em resposta ao fator de crescimento endotelial vascular. A expressão de KDR e a resposta migratória foram bem maiores nas mulheres com endometriose, dando a entender que os esteróides ovarianos, regularam a secreção de fator de crescimento angiogênico dos macrófagos peritoneais. Isso pode explicar a regressão de endométrio ectópico após tratamento com antagonista de estrogênio, e regredindo também a angiogênese (McLAREN *et al.*, 1996b).

O Fator de transcrição nuclear kappa beta (NF- $\kappa$ B) é um fator nuclear que se liga a uma sequência de 10 pares de bases na região promotora do gene que

codifica a cadeia leve  $\kappa$  das moléculas de anticorpos das células B, é constituído de duas subunidades: p65 (conhecida como RelA) e p50. Existem outras descritas como c-Rel, RelB e p52 (BAEUEERLE; BALTIMORE, 1996). O fator de transcrição NF- $\kappa$ B é muito superior a outros fatores de transcrição porque tem muitas ações, e pode ser ativado por vários estímulos: glutamato, neutrofinas, proteínas neurotóxicas ( $\beta$ -amilóide), citocinas (interleucina-1 e fator de necrose tumoral), glicocorticoides, ésteres de forbol, peptídeo natriurético atrial, ceramidas, produtos provenientes de vírus e bactérias, irradiação ultravioleta, produtos de reações de enzimas como a óxido nítrico sintase induzível e a ciclooxigenase tipo 2 (O'NEILL; KALTSCHMIDT, 1997). Quando o NF- $\kappa$ B é ativado, induz a expressão de muitos genes que codificam citocinas pró-inflamatórias como, quimiocinas, fatores de crescimento, fatores angiogênicos, moléculas de adesão [e-selectina, ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule), VCAM-1 (Vascular cellular adhesion molecule)]. Induz também enzimas como a óxido nítrico sintase indutível (iONS) e a ciclooxigenase-2 (COX-2) (GUO, 2007).

O NF- $\kappa$ B encontra-se no citoplasma ligado a uma proteína inibitória (I $\kappa$ B) que impede a translocação do NF- $\kappa$ B para o núcleo, sendo necessária a fosforilação e degradação do I $\kappa$ B para que possa ser translocado para o núcleo (BALDWIN, 1996). Existem vários subtipos de I $\kappa$ B: I $\kappa$ Ba, I $\kappa$ Bb, I $\kappa$ Be, I $\kappa$ Bg e Bcl-3, sendo os mais estudados o I $\kappa$ Ba e o I $\kappa$ Bb. Vários estímulos levam à fosforilação do I $\kappa$ B. Estando a proteína I $\kappa$ B fosforilada, ela recebe a adição da ubiquitina pela ação da ubiquitina ligase que, em seguida, é degradada pelo complexo proteossoma 26S, resultando, assim, na liberação do NF- $\kappa$ B. Tanto o I $\kappa$ Ba quanto o I $\kappa$ Bb ligam-se ao p50, tornando a sequência localizadora de núcleo inacessível e impedindo sua translocação (GHOSH; MAY; KOPP, 1998). O desmembramento do complexo I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B libera o NF- $\kappa$ B para ligar-se ao núcleo, levando a um aumento da expressão dos genes alvo. A fosforilação do I $\kappa$ B se dá pela ação da I $\kappa$ B quinase (IKK), que contém duas subunidades com propriedades de quinase: IKKa e IKKb (ZANDI *et al.*, 1997).

Estudos realizados em cultura de células endometrióticas, utilizando como estímulo dessas células a interleucina 1beta (IL1 $\beta$ ) e TNF- $\alpha$ , provocou a expressão de várias citocinas pró-inflamatórias através da via de ativação do NF- $\kappa$ B. Inibidores de NF- $\kappa$ B usados em cultura de células endometriais, de células endometrióticas e, em modelos de endometriose animal, provocou uma redução da maioria das citocinas reguladas pelo NF- $\kappa$ B (GONZALEZ-RAMOS *et al.*, 2008). Em outro estudo,

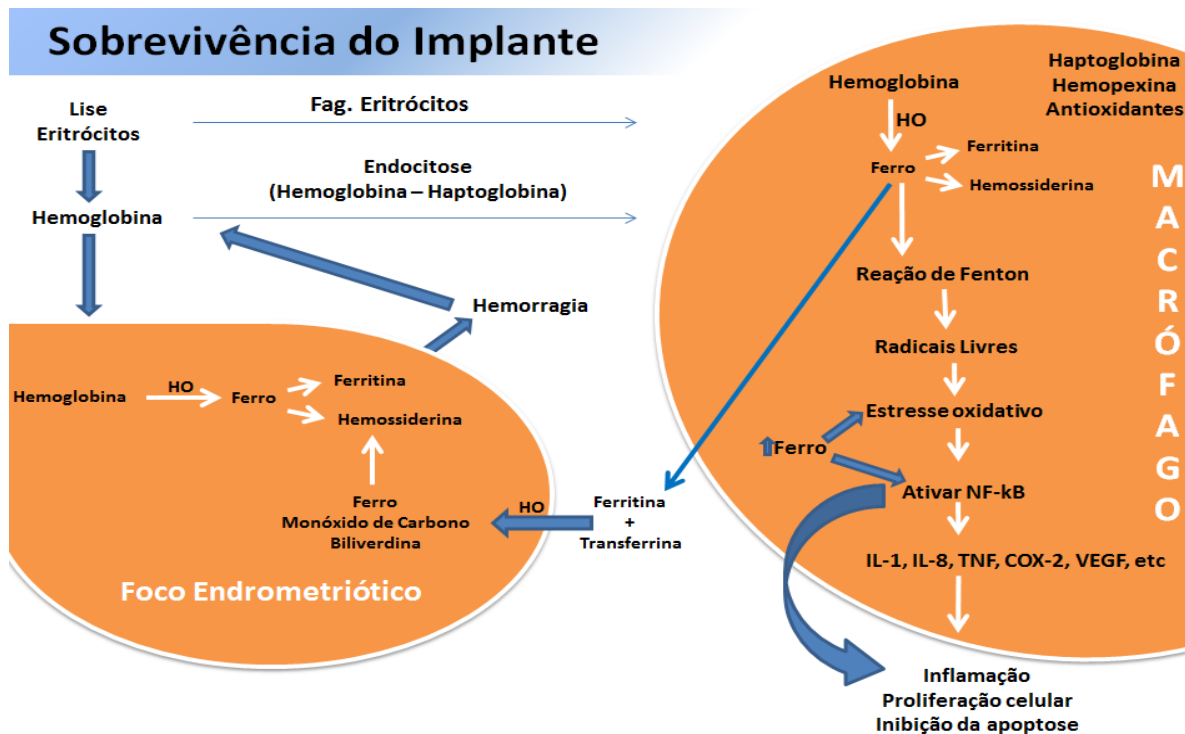
a estimulação da via do NF-kB provocou também a síntese de citocinas pró-inflamatórias como RANTES (Regulated on Activation Normal Tcell Expressed and Secreted), IL-1, ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule) e TNF- $\alpha$  (GONZALEZ-RAMOS *et al.*, 2010).

A estimulação do NF-kB modula a transcrição de muitos genes que desencadeiam proliferação celular e inibem a apoptose (YAMAMOTO; GAYNOR, 2001). A inibição do NF-kB em modelo de endometriose em camundongo, induzida com célula endometrial humana, provocou a redução de lesão endometriótica devido à diminuição da proliferação celular e aumento da apoptose das células endometrióticas (GONZALEZ-RAMOS *et al.*, 2008).

Outro elemento que está envolvido na manutenção do foco endometriótico é o ferro ( $F^{2+}$ ). Embora o ferro seja um metal essencial para os organismos vivos, o acúmulo excessivo de ferro nos tecidos e nas células pode resultar em toxicidade (CRICHTON *et al.*, 2002). A maioria das células se protege da toxicidade do ferro expressando a heme oxigenase 1 (HO) induzível e proteínas limpadoras como as haptoglobinas e as hemopexinas, que se ligam à hemoglobina e ao heme respectivamente. Entretanto, a sobrecarga de ferro observada na cavidade peritoneal de pacientes com endometriose, comparada com pacientes controles, sugerem que a homeostase desse elemento está alterada. Tem sido alegado, que o ferro pode ser uma causa e consequência da endometriose (DEFRÈRE *et al.*, 2008; DEFRÈRE *et al.*, 2011). A sobrecarga de ferro na cavidade peritoneal pode ser devido ao refluxo abundante ou a um defeito no sistema de depuração deste metal (DEFRÈRE *et al.*, 2008). Os macrófagos fagocitam os eritrócitos ou captam por endocitose, o complexo hemoglobina-haptoglobina formado após a liberação da hemoglobina com a lise dos eritrócitos (KNUTSON; WESSLING-RESNICK, 2003). No interior do macrófago, após o metabolismo da hemoglobina e do heme pela heme oxigenase, há a liberação de ferro, o qual é armazenado no macrófago na forma de ferritina e hemossiderina. O macrófago pode liberar ferro na forma de ferritina, ligado à transferrina ou à hemoglobina após lise do eritrócito, aumentando assim a concentração de ferro no peritônio (VAN LANGENDONCKT; CASANAS-ROUX; DONNEZ, 2002a). Esse ferro liberado para o peritônio pode ser absorvido pelo foco endometriótico, onde pode ser metabolizado pela heme oxigenase em ferro, monóxido de carbono e biliverdina. O ferro no interior do foco endometriótico, pode ser incorporado pela ferritina ou hemossiderina, que em

condições de sobrecarga se acumula nas lesões endometrióticas (VAN LANGENDONCKT; CASANAS-ROUX; DONNEZ, 2002b). As funções fisiológicas do macrófago incluem fagocitose, metabolismo do ferro, propriedades antimicrobianas e citotoxicidade mediada pelo TNF. Em concentrações normais, o ferro promove as funções fisiológicas do macrófago, mas, em caso de sobrecarga, sabe-se que prejudica a fagocitose do macrófago. Também é reconhecido como indutor do NF-κB nos macrófagos hepáticos provocando dano tissular e inflamação crônica (SHE *et al.*, 2002; WARD *et al.*, 2002). O excesso de ferro no macrófago pode sobrecarregar a capacidade da ferritina de sequestrar o ferro, causando injúria oxidativa à célula. O ferro pode agir como um catalisador na reação de Fenton ( $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}^\cdot$ ), gerando radicais livres, incluindo o radical hidroxil, que é um dos mais reativos. Esse radical hidroxil reage com muitos constituintes celulares como, resíduos aminoácidos, bases purinas e pirimidinas do DNA, atacam lipídeos de membrana e iniciam uma reação em cadeia de radicais livres, conhecida como peroxidação lipídica. As espécies reativas de oxigênio (ROS) são geradas no interior das células durante seu metabolismo normal, sendo que, elas possuem seus mecanismos de defesa para impedir a toxicidade desses ROS, que são as enzimas citoprotetoras e os antioxidantes. Entretanto, quando a produção de ROS é maior que a dos mecanismos de defesa, ocorre um estresse oxidativo, que é nocivo para a célula (VAN LANGENDONCKT; CASANAS-ROUX; DONNEZ, 2002a; JACKSON *et al.*, 2005). Então, o estresse oxidativo, mediado pela sobrecarga de ferro, pode ativar o NF-κB no macrófago peritoneal, expressando e secretando fatores pró-inflamatórios, fatores de crescimento e fatores angiogênicos tais como IL-1, IL-8, TNF, COX-2 e VEGF (LOUSSE *et al.*, 2008; LOUSSE *et al.*, 2010). Resumindo, os principais processos que o NF-κB regula são a inflamação, a proliferação celular e a inibição da apoptose (GONZALEZ-RAMOS; DEFRÈRE; DEVOTO, 2012) (Figura 1).

**Figura 1 - Fisiopatologia da sobrecarga de ferro ( $F^{2+}$ )**



Mecanismo do acúmulo de ferro no macrófago e no foco endometriótico.

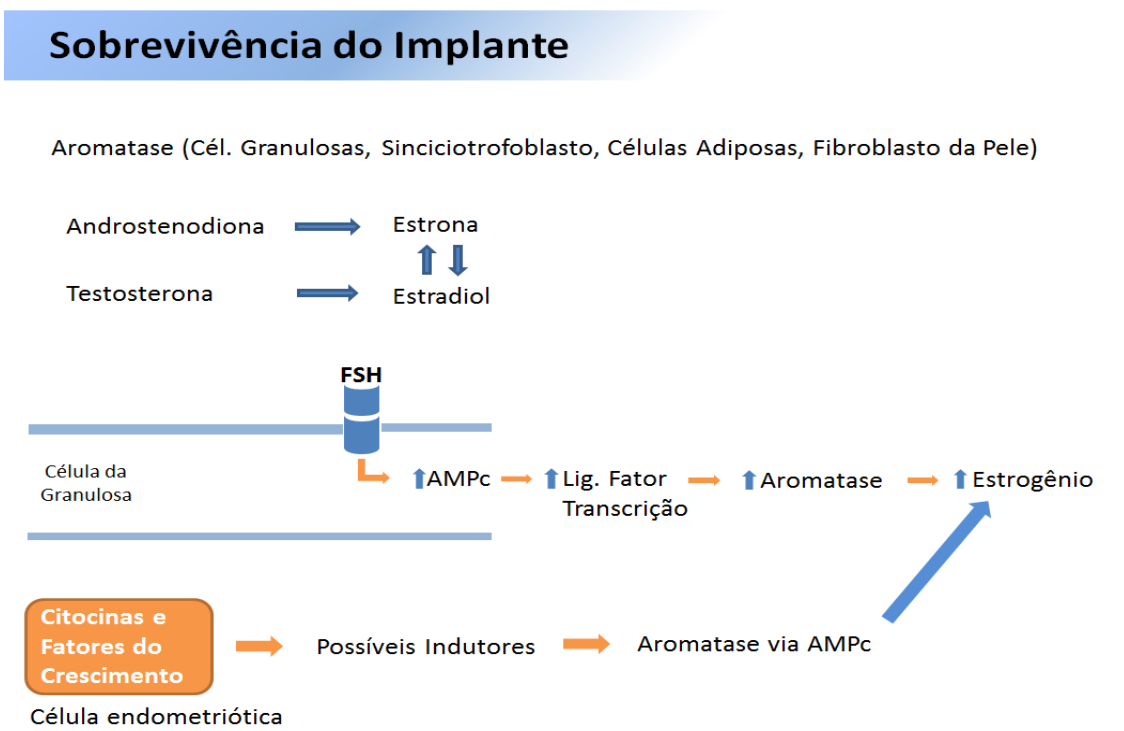
FONTE: Próprios autores.

A endometriose é uma doença estrogênica-dependente. A síntese e o metabolismo anormal do estrogênio tem sido implicados na patogênese da endometriose. A aromatase catalisa a síntese de estrona a partir da androstenodiona, e a síntese de estradiol, a partir da testosterona. A aromatase está presente em vários tipos de células como, as células granulosas do ovário, sinciciotrofoblasto placentário, células adiposas e fibroblastos da pele. Acredita-se que a ação do estrogênio ocorre por mecanismo endócrino. Ou seja, o estrogênio circulante exerce seu efeito após ser deixado pela corrente sanguínea nos tecidos alvo (BULUN *et al.*, 1993). O estrogênio também exerce um efeito intracrine (tipo de efeito parácrino interno). O estrogênio produzido pela aromatase dentro de uma célula de músculo liso (leiomioma), ou de célula estromal endometriótica, exerce seu efeito por ligação ao seu receptor dentro da mesma célula. Endométrio e miométrio sem endometriose não tem expressão de aromatase (BULUN; SIMPSON; WORD, 1994; NOBLE *et al.*, 1997).



No ovário da mulher em idade reprodutiva, a ligação do hormônio folículo estimulante ao seu receptor na membrana da célula da granulosa provoca um aumento dos níveis de AMPc (adenosina monofosfato cíclico). Devido a esse aumento do AMPc, há um aumento da ligação do fator de transcrição à região promotora do gene da aromatase (MICHAEL *et al.*, 1995; MICHAEL; MICHAEL; SIMPSON, 1997). Como resultado, há um aumento da expressão da aromatase e, em consequência, aumento da secreção de estrogênio do folículo pré-ovulatório (MICHAEL *et al.*, 1995; SIMPSON *et al.*, 1994). Células do estroma derivadas de implantes de endometriose, cultivadas e incubadas com análogo de AMPc exibem elevados níveis de aromatase. Fatores de crescimento, citocinas e outros fatores, tem sido investigados como possíveis indutores da atividade da aromatase via AMPc em endometriose (NOBLE *et al.*, 1997) (Figura 2).

**Figura 2 – Mecanismo de produção do estrogênio via AMPc**



Produção do estrogênio via aromatase e AMPc na endometriose.

FONTE: Próprios autores.

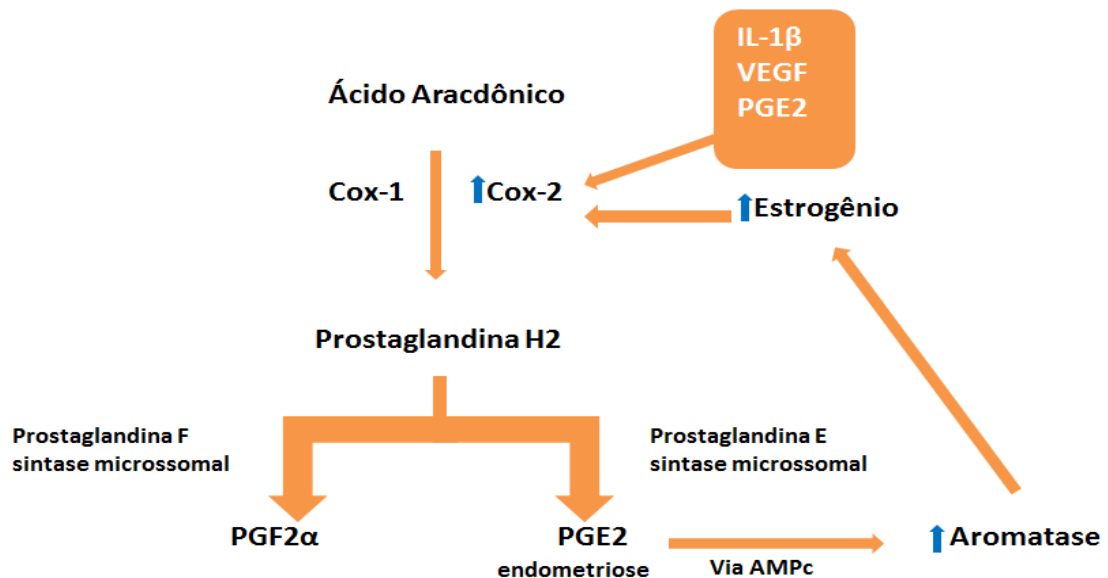
Em cultura de células estromais endometriais, o estrogênio aumentou a produção de prostaglandina E2, através do estímulo da ciclooxygenase 2 (HUANG *et al.*, 1998). A prostaglandina E2 foi identificada como o indutor mais potente da

aromatase via AMPc nas células do estroma endometriótico, mas nem os análogos de AMPc e nem prostaglandina E2 estimulam a atividade da aromatase no estroma de células do endométrio eutópico (ZEITOUN *et al.*, 1998). As prostaglandinas produzidas localmente no útero e em tecidos endometrióticos de mulheres com endometriose, principalmente as prostaglandinas E2 e F2 $\alpha$ , são importantes na patogênese da endometriose (JABBOUR *et al.*, 2006). As ciclooxigenases (COX-1 e COX-2) catalisam a conversão do ácido aracdônico em prostaglandina H2 em grande parte das células do organismo, incluindo miométrio, endométrio e tecido endometriótico (FUNK, 2001).

A COX-1 é responsável pela prostaglandina basal e a COX-2 é responsável principalmente pela inflamação. As células uterinas são ricas em prostaglandina F sintase microssomal e prostaglandina E sintase microssomal, as quais catalisam a prostaglandina H2 em prostaglandina F2 $\alpha$  e prostaglandina E2 respectivamente (JABBOUR *et al.*, 2006). Quatro substâncias induzem a expressão da COX-2 e a produção de prostaglandina E2 nas células uterinas e tecido endometriótico. A citocina interleucina -1 $\beta$  e a própria prostaglandina E2 (de maneira autócrina) induz a expressão da COX-2 (TAMURA *et al.*, 2002a). O fator de crescimento endotelial vascular também induz a COX-2. O receptor  $\beta$  de estradiol induz o próprio estrogênio a induzir a COX-2 (TAMURA *et al.*, 2002b). Dessa maneira, todas essas substâncias levam a uma grande produção de prostaglandina E2 em tecido endometriótico (Figura 3).

**Figura 3** - Mecanismo de produção do estrogênio via ciclooxygenase

## Sobrevivência do Implante

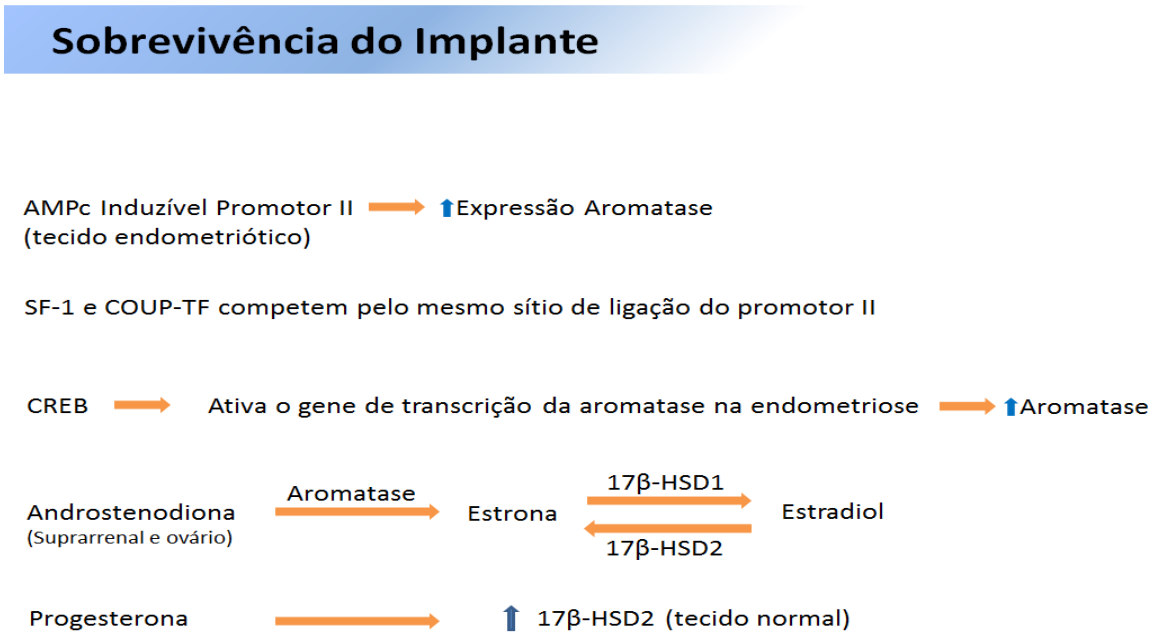


Ciclo vicioso de produção do estrogênio via COX-2 na endometriose.

FONTE: Próprios autores

O *AMPc induzível promotor II* parece ser o responsável pela expressão da aromatase em tecido endometriótico *in vivo*. Dois fatores de transcrição, o fator de transcrição estimulatório (SF-1) e o fator inibidor, *chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF)*, competem pelo mesmo sítio de ligação do promotor II aromatase. O *COUP-TF* está expresso em todo endométrio eutópico e na endometriose, enquanto o SF-1 está expresso especificamente na endometriose, e liga-se ao promotor II aromatase com mais avidéz que o COUP-TF. O SF-1 e outros fatores de transcrição como o *cyclic-AMP Response Element Binding Protein (CREB)* ativam o gene de transcrição da aromatase na endometriose, enquanto o COUP-TF inibe esse processo (ZEITOUN *et al.*, 1998). Resumindo, a alteração molecular que provoca a expressão local da aromatase em células endometrióticas, mas não no endométrio normal, é uma produção anormal de SF-1, que supera a inibição protetora, mantida normalmente pelo COUP-TF no endométrio normal (SELI; BERKKANOGLU; ARICI, 2003) (Figura 4).

**Figura 4 - Expressão da aromatase na endometriose**



Expressão anormal da aromatase e 17 $\beta$ -HSD1 na endometriose.

FONTE: Próprios autores.

O substrato principal para aromatase extra-ovariana na endometriose é a androstenodiona, de origem suprarrenal e ovariana na mulher no menacme, e androstenodiona suprarrenal na mulher pós-menopausada. A aromatase transforma a androstenodiona em estrona (E1), que é um estrogênio fraco. A enzima 17 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 1 (17 $\beta$ -HSD tipo 1), presente no tecido endometriótico, converte a estrona em estradiol (E2), que é um estrogênio forte e exerce sua ação completamente (ANDERSON; MORGHRABI, 1997; ZEITOUN *et al.*, 1998). Ao contrário, a 17 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 2 (17 $\beta$ -HSD tipo2), converte o estradiol em estrona nas células glandulares do endométrio eutópico durante a fase lútea (ANDERSON; MORGHRABI, 1997). Em cultura, a progesterona aumenta a atividade da enzima 17 $\beta$ -HSD tipo 2 nas células glandulares endometriais. A expressão da 17  $\beta$ -HSD tipo 2 está ausente nas células glandulares do tecido endometriótico (ZEITOUN *et al.*, 1998). Em resumo, a expressão anormal da aromatase, a presença da 17  $\beta$ -HSD tipo 1 e a ausência da 17 $\beta$ -HSD tipo 2 no tecido endometriótico, provocam uma elevação nos níveis local de estradiol, comparado com o endométrio eutópico, promovendo assim, a

sobrevivência e o crescimento dos implantes endometrióticos (SELI; BERKKANOGLU; ARICI, 2003).

A progesterona através da ligação aos seus receptores nas células do estroma endometrial aumenta a formação de ácido retinóico, que por sua vez induz a expressão da 17 $\beta$ -HSD tipo 2 de forma parácrina nas células do epitélio endometrial (CHENG *et al.*, 2008). Células do estroma endometriótico que têm receptores de progesterona diminuídos, não respondem a progesterona. Com isso, não produzem ácido retinóico que, devido a essa falta, não pode induzir a 17 $\beta$ -HSD tipo 2 nas células epiteliais e, assim, não pode diminuir o efeito do estrogênio (CHENG *et al.*, 2007).

Alguns genes alvos da progesterona estão desregulados durante a implantação. Por exemplo, o gene protótipo responsivo a ação da progesterona, glicodelina, esta em um estado de *downregulation* no endométrio de mulheres com endometriose em comparação com mulheres sem endometriose. Isso sugere que o endométrio de mulheres com endometriose também apresentam resistência à progesterona (KAO; GERMEYER; TULAC, 2003).

A resistência à progesterona no tecido endometriótico é explicada pelos baixos níveis de receptores de progesterona. No endométrio, os níveis de receptores de progesterona A (PR-A) e de receptores de progesterona B (PR-B) aumentam progressivamente durante a fase proliferativa, um pico imediatamente antes da ovulação e diminuição após a ovulação, sugerindo que o estrogênio estimula os níveis de receptores de progesterona (ATTIA *et al.*, 2000). No tecido endometriótico, o PR-B é indetectável e o PR-A é muito reduzido (JACKSON *et al.*, 2007).

## 1.9 Endometriose subcutânea

A endometriose pode se desenvolver em qualquer parte do organismo. Um dos locais extrapélvicos é o tecido celular subcutâneo, principalmente em incisões de cirurgias. O endometrioma de parede abdominal ocorre na maioria das vezes em cicatriz de cesárea (57%) e cicatriz de histerectomia (11%) (MEDEIROS *et al.*, 2010). A taxa de recorrência é de 4,3% (HORTON *et al.*, 2008). A etiologia do endometrioma de cicatriz cirúrgica é desconhecida. Porém, a teoria da implantação encontra vários adeptos, a mesma tendo como base, experimentos como de Ridley e Edwards, em 1958, que verificaram endometriose em parede abdominal após

injeção de tecido endometrial neste local (MEIRELLES; LOSANO; VIANA, 2005). Tem sido descrito endometriose de parede abdominal mesmo sem cirurgia anterior. O endometrioma subcutâneo tem sido confundido com abscesso, lipoma, hematoma, cisto sebáceo, granuloma de sutura, hérnia inguinal, hérnia incisional, tumor dermóide, sarcoma, linfoma primário ou metastático. Quando o diagnóstico é duvidoso, pode-se valer da punção aspirativa com agulha fina (PAAF). O endometrioma de parede abdominal é encontrado em apenas 0,5-1% das mulheres com endometriose pélvica, e a endometriose pélvica, por sua vez, é observada em 24% das mulheres que apresentam endometriose de cicatriz (MEDEIROS *et al.*, 2010).

Como a endometriose subcutânea está relacionada com história de antecedentes de cirurgias ginecológicas, essas tem aumentado muito. É de se esperar que ocorra incremento da incidência de endometriomas de cicatriz cirúrgica. A incidência de cesárea tem aumentado no mundo todo, mas não tem sido visto tão alta quanto no Brasil (FAÚNDES; CECATTI, 1991). No ano de 2004, segundo Knupp; Melo; Oliveira (2008), tivemos no Estado do Rio de Janeiro uma incidência de cesárea de 49,4% no Sistema Único de Saúde (SUS), e no sistema privado um índice assustador de 83,2% (KNUPP; MELO; OLIVEIRA, 2008). No Brasil, no ano de 2009, o índice de cesárea foi de 47% (BRASIL, 2009).

Várias hipóteses, baseadas principalmente em evidências indiretas, podem ser levantadas para explicar a preferência pela cesárea que existe atualmente tanto entre as mulheres como entre os médicos que fazem os seus partos. As razões porque as mulheres preferem a cesárea ao parto vaginal são duas. Uma é o medo de sentir dor durante o trabalho de parto e o parto. A outra razão, é que elas tem a ideia de que a cesárea mantém a anatomia e fisiologia da vagina e do períneo íntegros, enquanto o parto vaginal provoca perda acentuada da função do coito normal. Esta interpretação tem sido encorajada até por professores de Obstetrícia e transmitida aos seus alunos, a ponto de ter se tornado um conceito prevalente entre médicos e pacientes. Outro fator cultural importante é o conceito de que o parto vaginal é prejudicial ao feto. Quando ocorre um óbito associado ao parto vaginal, a repercussão é muito maior do que quando é associado a uma cesárea (FAÚNDES; CECATTI, 1991).

A preferência dos médicos pela cesárea tem vários motivos. A conveniência de uma intervenção programada, que não tomará seu tempo mais que

uma hora, ao contrário do parto vaginal, que poderá lhe tomar várias horas, podendo ocorrer a qualquer hora do dia ou da noite, final de semana e feriados. Também a incerteza quanto à possibilidade de hipóxia e trauma fetal fazem a preferência do parto cirúrgico. O parto nas mãos de profissionais que não tem bom treinamento obstétrico pode ter uma influência importante na decisão de intervir pela via alta (FAÚNDES; CECATTI, 1991).

Outras razões que poderiam explicar o aumento do índice de cesárea seriam o alargamento das indicações, classificadas como conquistas da Obstetrícia atual, tais como os avanços no diagnóstico da anóxia crônica, da Perinatologia e da diminuição dos riscos nas intervenções cirúrgicas (GOLAN; WINSTON; DARGENIO, 1984).

A histerectomia é a segunda cirurgia mais frequente entre as mulheres em idade reprodutiva, sendo precedida apenas pelo parto cirúrgico. À semelhança do que ocorre em outros países, a grande maioria do procedimento cirúrgico é indicada por patologias benignas. O que tem contribuído também para o aumento da incidência de histerectomia é a concepção errônea de muitos médicos de que o útero se faz necessário somente para a reprodução (JONES, 1984).

## 2 PESQUISAS EM ANIMAIS

Foram propostos vários modelos de animais para estudo da endometriose. Dentre esses modelos, podemos destacar o modelo da membrana de frango corioalantóica (CAM). Devido à CAM possuir componentes da matriz extracelular semelhante a do peritônio humano, ela pode ser usada para investigar o potencial invasor do tecido endometrial e a angiogênese. Primatas não humanos (Rhesus e Babuínos, usados com maior frequência), além de terem endometriose espontânea, o modelo é bem adequado para investigar o papel do sistema imunológico em desenvolvimento e progressão da endometriose. Os modelos primatas são mais intimamente relacionados com a situação nos seres humanos e, portanto, são mais apropriados. Eles revelam muitas semelhanças com as mulheres com respeito à anatomia pélvica, características fisiológicas reprodutivas e funções imunológicas (GRÜMMER, 2006).

Existem também modelos de endometriose em coelhos, camundongos e ratos. Nesses modelos, foram usados vários tipos de implantes: implantes no peritônio, na parede lateral do abdome, implante sob a cápsula renal, no mesentério, no ligamento útero-ovárico e implante no globo ocular (SCHOR *et al.*, 1999). Endometriose em tecidos de ratos é semelhante às lesões humanas *in vivo*, embora existam desvantagens de extrapolação dos dados através da espécie, o modelo da rata pode ser usado para estudar os acontecimentos envolvidos na patogênese e na fisiopatologia da endometriose ou novas abordagens terapêuticas para essa desordem que não são acessíveis em seres humanos (SHARP-TIMMS, 2006).

O modelo de endometriose em rata permite estudo de mecanismos e reguladores de uma forma controlada e livre de influências de confusão, tais como a variação individual da doente, idade, dieta, fase do ciclo menstrual, uso de medicamentos e influências ambientais. Como acontece com qualquer modelo de sistema, existem vantagens e desvantagens de usar o rato como modelo para endometriose. As vantagens são que podem ser observados 70 a 80 ciclos reprodutivos por ano, em comparação com 12 ciclos por ano das primatas. A puberdade ocorre dentro de 2 meses do nascimento e o ciclo reprodutivo é cerca de dois anos. O padrão do sistema endócrino reprodutor da rata segue uma sequência temporal semelhante ao ser humano, mas a fase lútea é menor na rata. O ciclo pode ser monitorado por lavagem vaginal não invasiva. Além disso, em comparação com



os primatas, custos com alojamentos e tratamentos são significativamente inferiores (SHARP-TIMMS, 2006). O modelo da rata também fornece um sistema imunológico bem caracterizado e, portanto, é adequado e amplamente utilizado para o estudo do efeito de drogas imunomoduladoras, e agentes anti-inflamatórios sobre a endometriose.

As desvantagens são que o endométrio uterino de ratas não sofre ruptura que resulta em menstruação. No entanto, sofre proteólise da matriz extracelular, medida pelo peso úmido do endométrio e conteúdo colágeno. Existe também intervalo filogenético grande entre ratos e humanos (SHARP-TIMMS, 2006).

Pesquisamos na base de dados do PUBMED (US National Library of Medicine National Institute of Health) e nos periódicos da CAPES, com os seguintes descritores para camundongos: subcutaneous [All Fields] AND (“endometriosis” [MeSH Terms] OR “endometriosis” [All Fields] AND (“mice” [MeSH Terms] OR “mice”[All Fields] OR “mouse” [All Fields] e os seguintes descritores para ratos: subcutaneous [All Fields] AND (“endometriosis” [MeSH Terms] OR “edometriosis” [All Fields] AND (“rats” [MeSH Terms] OR “rats [All Fields] OR “rat” [All Fields]). Com os descritores acima, apareceram nos 18 trabalhos dos quais somente três tratavam do respectivo modelo subcutâneo de endometriose. XU *et al.* (2009), usaram camundongos com deficiência na função dos linfócitos T e B, usaram endométrio heterólogo (humano) e implantaram em bolsa no subcutâneo. LIU *et al.* (2010), usaram endométrio heterólogo incubado com adenovírus e injetaram no subcutâneo. WANG *et al.* (2013), usaram camundongo nude e implantaram endométrio autólogo em bolsa no subcutâneo.

Evidenciamos 16 trabalhos com os descritores acima, de modelo de endometriose subcutânea em ratos, mas somente dois tratavam de modelo subcutâneo de endometriose. FU *et al.* (2013), implantaram fragmentos de útero em bolsa subcutânea. MOHAMMADZADEH *et al.* (2008), usaram seis fragmentos de hemi-útero esquerdo, sendo que, o endométrio foi separado do miométrio usando microscópio. Implantaram quatro fragmentos na cavidade peritoneal e dois fragmentos no subcutâneo de cada lado do abdome. No trabalho de Mohammadzadeh, houve implante em cavidade peritoneal, não sendo, portanto, um modelo subcutâneo puro. Verificando todos os trabalhos que falavam em subcutâneo, percebemos que nenhum deles se preocupou em sistematizar o modelo e nem explicar o método detalhadamente como nós fizemos.

Diante do exposto acima e considerando a inexistência na literatura consultada, faz-se necessário desenvolver modelo experimental de endometriose subcutânea, em ratas Wistar e estudar a ação de drogas sobre os implantes endometrióticos.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

- Desenvolver e validar um modelo de endometriose subcutânea em ratas para o estudo de prováveis mecanismos fisiopatológicos e do efeito de drogas.

#### **3.2 Específicos**

- Utilizar o modelo de endometriose experimental subcutânea e estudar a evolução dos implantes endometrióticos em ratas controle e ratas tratadas com estradiol, acetato de medroxiprogesterona, análogo de GnRH (pamoato de triptorrelina) e AAS (ácido acetil salicílico).
- Investigar o peso dos endometriomas em ratas controle e ratas tratadas com as drogas a serem testadas e listadas acima.
- Analisar os aspectos histológicos dos endometriomas em ratas controle e ratas tratadas.

## 4 ANIMAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram usadas 132 ratas, *Rattus norvegicus*, variedade albina, linhagem wistar; pesando em torno de 150g e com 3 meses de vida. As Ratas foram provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC), foram mantidas em gaiolas de polipropileno (30 x 17 x 15 cm), providas de tampa com grade metálica de aço inoxidável e forradas com maravalhas, acondicionadas em ambiente refrigerado. Foram alimentadas com ração padrão e água *ad libitum*. Promoveu-se alternância dos ciclos claro/escuro a cada 12 horas, com iluminação artificial com lâmpada fluorescente de 40 watts.

Esta investigação foi aprovada pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA), da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, protocolo 21/2011 em 29/08/2011.

### 4.2 Modelo de endometriose subcutânea

A anestesia foi realizada por via intraperitoneal com hidrato de cloral a 10% na dose de 0,1ml por 30 g de rata. Tricotomia do sítio cirúrgico e antissepsia do local da cirurgia com iodo tópico PVPI a 10% (1% de iodo ativo). Efetuou-se uma incisão longitudinal suprapúbica de 2,5 cm de extensão, iniciando-se a 0,5 cm do bordo superior do pube. Logo após, construía-se túnel subcutâneo entre o bordo direito da incisão e a parede abdominal anterior, em ângulo de 45 graus, em direção à região inguinal direita, onde seria aposto um fragmento do útero. Após a abertura longitudinal da parede abdominal, identificou-se o útero bicornio e realizou-se exérese do hemi-útero esquerdo para preparar o fragmento do implante. O hemi-útero esquerdo foi aberto em toda sua extensão e retirou-se um fragmento de 4 x 4 mm de área. A fixação do fragmento foi realizada com fio mononylon 4-0 (agulha 1,7 cm Ethicon) na região inguinal direita, no subcutâneo, através do túnel previamente construído. Síntese da parede abdominal em dois planos (plano 1, peritônio e músculo; plano 2, pele), com sutura contínua, ambos com mononylon 4-0. Observar os tempos cirúrgicos nas fotos a seguir (figuras 5 a 14).

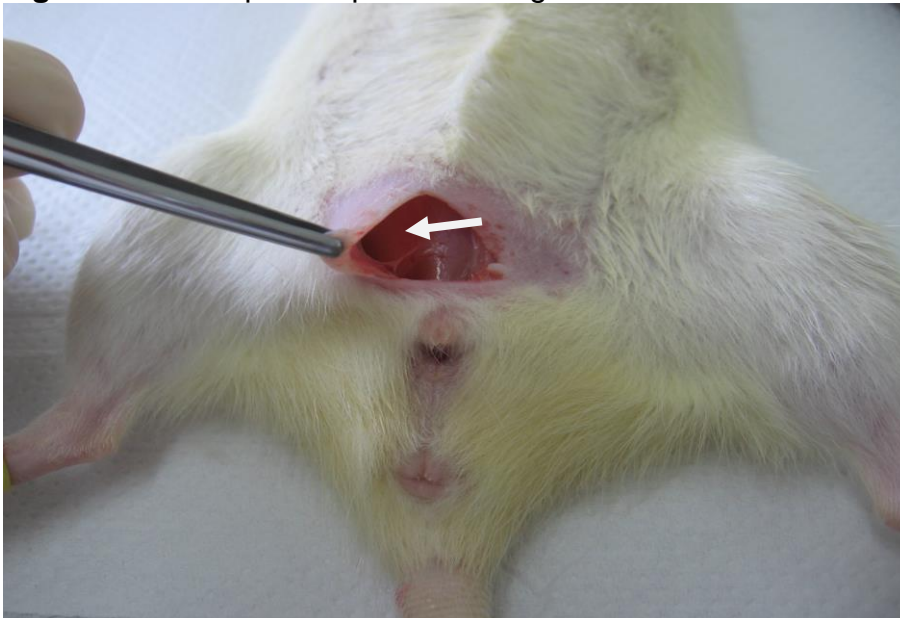
**Figura 5 -** Incisão da pele da parede abdominal



Incisão longitudinal da pele da parede abdominal, suprapúbica de 2,5 cm de extensão, iniciando-se a 0,5 cm do bordo superior do pube.

FONTE: Próprios autores

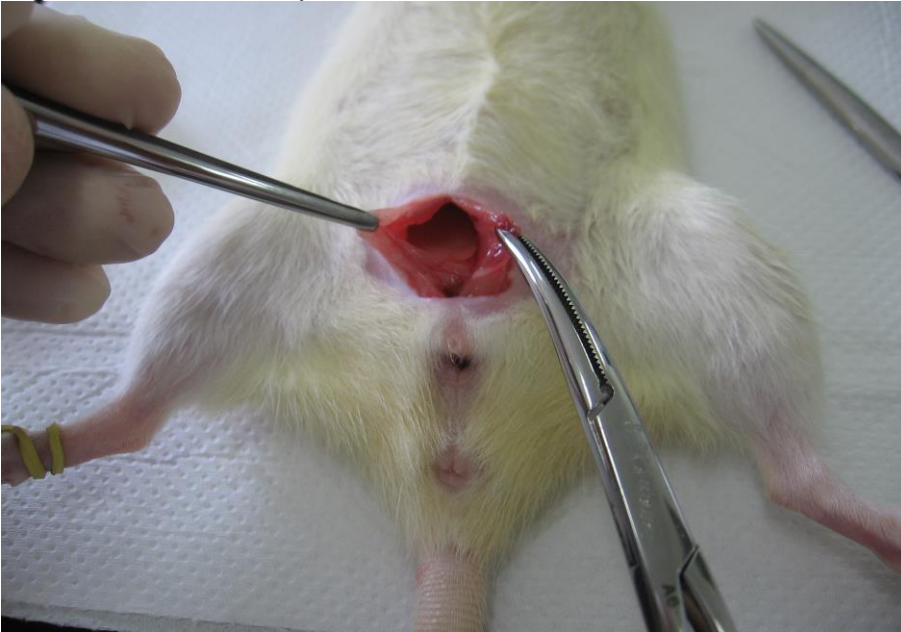
**Figura 6 -** Túnel para implante do fragmento uterino



Túnel entre a metade direita da incisão e a parede abdominal anterior até a fossa ilíaca direita da rata (seta).

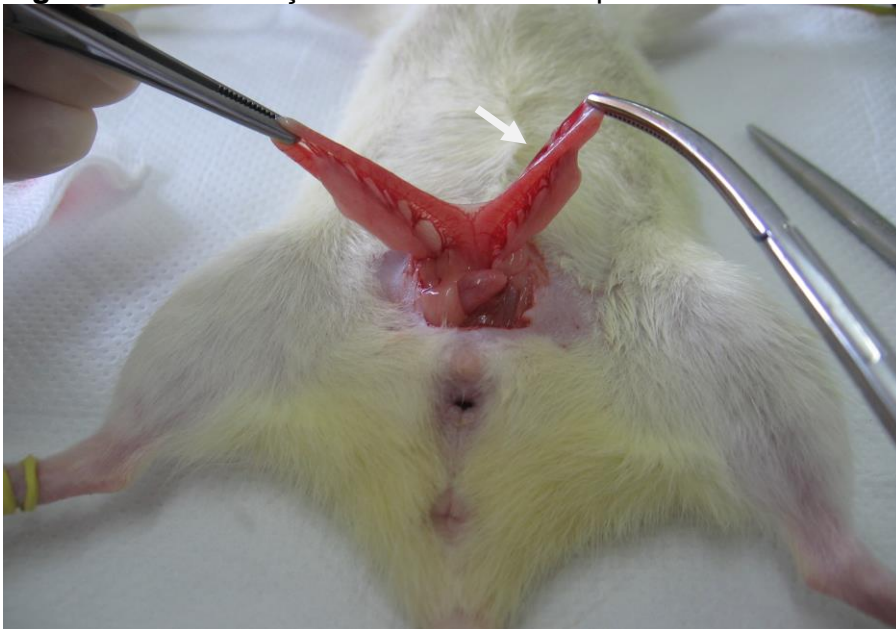
FONTE: Próprios autores

**Figura 7 -** Cavidade peritoneal aberta



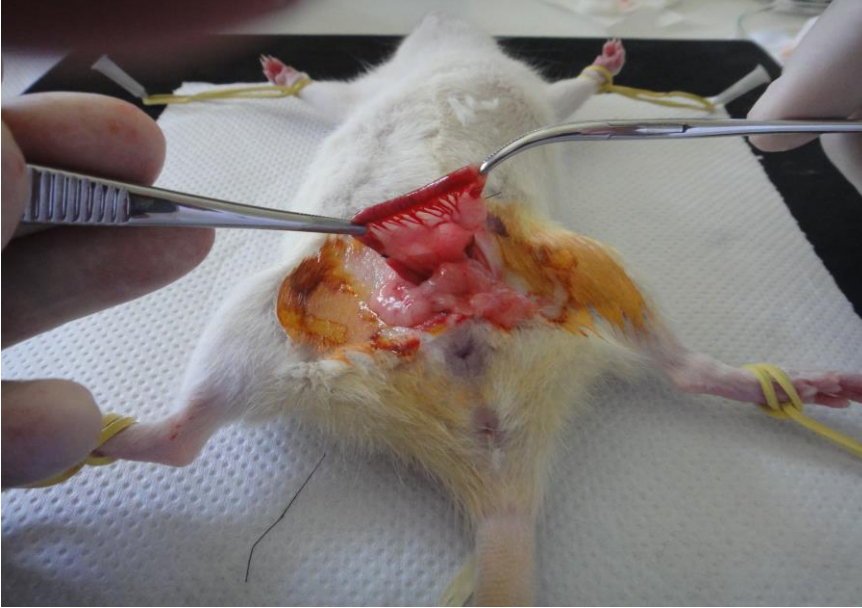
Identificação do útero após abertura da cavidade peritoneal.  
FONTE: Próprios autores

**Figura 8 -** Identificação do hemi-útero esquerdo



Exposição do útero para identificação do hemi-útero esquerdo (seta).  
FONTE: Próprios autores

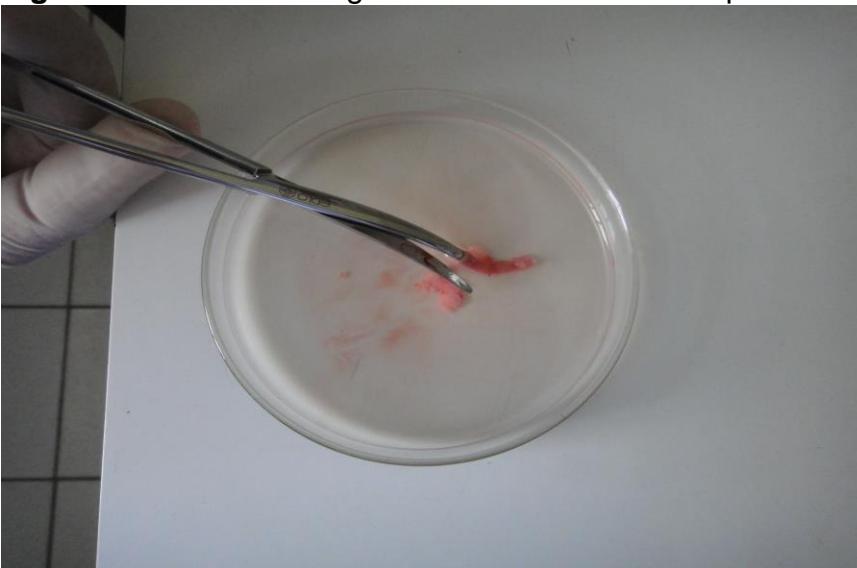
**Figura 9 - Exérese do hemi-útero esquerdo**



Ligadura dos pedículos vasculares para exérese do hemi-útero esquerdo.

FONTE: Próprios autores

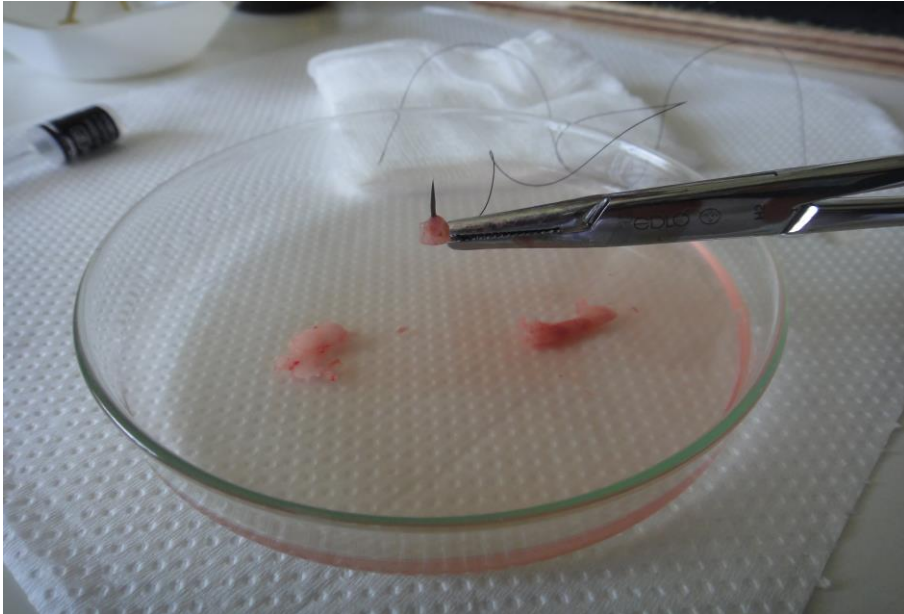
**Figura 10 - Abertura longitudinal do hemi-útero esquerdo**



Abertura longitudinal do hemi-útero esquerdo para confecção de fragmento de 4x4mm de área.

FONTE: Próprios autores

**Figura 11** - Fragmento de 4x4mm de área de hemi-útero esquerdo da rata



Fragmento de 4x4mm de área a ser implantado no subcutâneo da região inguinal direita da rata.

FONTE: Próprios autores

**Figura 12** - Momento do implante no subcutâneo



Fragmento de 4x4mm de área sendo implantado no subcutâneo da região inguinal direita da rata.

FONTE: Próprios autores



**Figura 13** - Aspecto final da cirurgia



Aspecto final da cirurgia após sutura contínua da parede abdominal em dois planos.

FONTE: Próprios autores

**Figura 14** - Ratas na recuperação após cirurgia



Ratas na recuperação sendo aquecidas com lâmpadas incandescentes, aeradas e caixa forrada com maravalhas.

FONTE: Próprios autores

Foi iniciado o experimento com quatro grupos de 10 ratas para verificarmos a curva de crescimento do implante endometrial (endometriomas) ao longo do tempo. Esses grupos foram de 1 dia, 7 dias, 14 dias e 21 dias. Todos os grupos foram sacrificados com overdose de anestesia para retirada do tumor (endometrioma), e do hemi-útero direito para ser realizado a aferição dos pesos úmidos relativos (mg%) e pesos secos relativos (mg%).

Após a definição da curva de crescimento (crescimento máximo no dia 14), foram idealizados grupos para tratamento (10 ratas em cada grupo) com estradiol 3 doses (2,5; 5 e 10 mg/Kg via sc), acetato de medroxiprogesterona 3 doses (0,5; 2 e 5 mg/Kg via sc), GnRH (pamoato de triptorrelina) 2 doses (0,18 e 0,56 mg/Kg via sc), AAS (ácido acetilsalicílico) dose de 3 mg via gavagem e grupo controle salina 0,9% 1 ml por gavagem. Todos os tratamentos foram iniciados no quinto dia do implante, sendo o estradiol, acetato de medroxiprogesterona e GnRH administrados por via subcutânea; o AAS e a salina, por gavagem. O tempo de tratamento foi de 9 dias, período que corresponde dois a três meses de ciclos menstruais na mulher e ao tempo máximo de crescimento do tumor. Os animais foram sacrificados e foram avaliados os pesos úmidos e secos relativos. O peso úmido foi aferido logo que o endometrioma foi retirado da rata. Os endometriomas foram mantidos por um período de uma hora em estufa a 170 graus centígrados e em seguida, após resfriamento foram pesados para obtenção do peso seco relativo. O peso relativo foi realizado da seguinte maneira: peso do endometrioma x 100 dividido pelo peso final da rata. As peças retiradas foram pesadas em balança de precisão (SHIMADZU AUW220D).

Idealizamos um grupo controle somente para análise histológica, porque os endometriomas dos outros grupos foram secados em estufa para aferição dos pesos secos. Os cortes histológicos foram fixados em formalina a 10% durante 24h. Após esse período, o material foi colocado em processador histológico automático de tecidos (Leica modelo TP 1020), e incluído em parafina. Procedeu-se à microtomia em equipamento Leica modelo RM 2235, obtendo-se cortes histológicos de 4 $\mu$  e, a seguir, colocados em estufa a 60°C, diafanizados em xilol, hidratados, corados pela Hematoxilina & Eosina e em seguida examinados por um único patologista experiente.

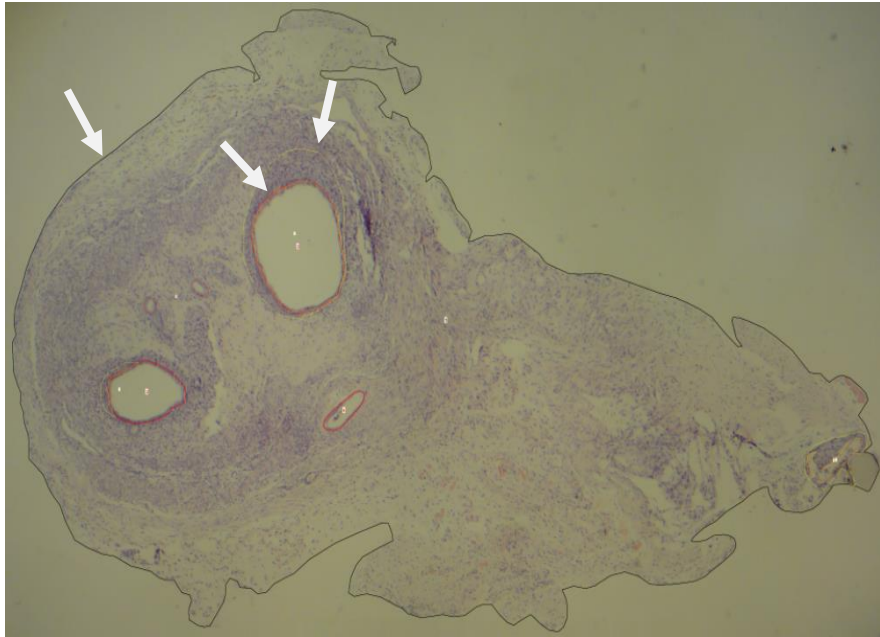
Foi realizado também a histomorfometria dos cortes histológicos, para calcular as áreas de vários aspectos das lâminas como, glândula, estroma, tecido adiposo, tecido muscular, hemorragia e tecido de granulação.

As lâminas histológicas foram fotografadas com câmera digital *Sony Cyber-shot DSC-TX5*<sup>®</sup> com resolução de 10.2MP com aumento de 10x (ocular) e de 4x, 10x e 40x (objetivas).

Após o processo de fotografia, utilizou-se o *software Microsoft Image Composite Editor*<sup>®</sup>, Versão 1.4.4.0 para realizar a composição das imagens, cujo objetivo foi refazer o padrão observado na lâmina. Utilizou-se a edição que “calcula os melhores pontos de sobreposição entre as imagens, incluindo distorção de perspectiva, além de translação, rotação, escala e distorção”. Esta opção é particularmente útil para a montagem de imagens de uma grande superfície plana, conforme editor do programa. Depois de realizada a montagem das imagens, comparou-se o resultado final com o corte observado à microscopia e julgou-se, através de patologista experiente, satisfatória a qualidade final.

A análise das fotos foi feita concomitantemente com a análise da microscopia. A marcação das imagens foi realizada pelo patologista que utilizou o *software Image J*<sup>®</sup>, Versão 1.44p, o qual permite a marcação de áreas variadas, bem como sua identificação através de cores e números distintos, análise das medidas da marcação, tais como distância mínima e distância máxima entre os pontos da marcação, além do cálculo da área selecionada (figura 15).

**Figura 15** – Histomorfometria de endometrioma subcutâneo em rata. Hematoxilina e eosina (40x)



Em preto, área total do corte histológico analisada. Em vermelho, áreas de glândulas endometriais. Em amarelo, área de estroma endometrial (veja as setas).

FONTE: Próprios autores

Após a análise, realizou-se a computação dos dados no *software Microsoft Office Excel® 2007*. Foi efetuado o agrupamento e cálculo das porcentagens ocupadas pelas áreas referentes à glândula endometrial, estroma, tecido adiposo, tecido muscular, hemorragia e tecido de granulação.

A análise estatística foi realizada com o *software GraphPad Prism for Windows 5.0*, versão de 12 de março de 2007, sendo utilizado o teste de D'Agostino e Pearson para verificação de normalidade e os testes ANOVA e Tukey para a comparação entre os diferentes grupos. Foram considerados significativos os resultados que apresentaram  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Curva de desenvolvimento dos pesos úmidos e secos relativos dos endometriomas subcutâneos no tempo comparada aos pesos dos hemi-úteros direitos de ratas

O resultado de cada grupo foi dado pela média aritmética dos pesos úmidos e secos relativos dos endometriomas subcutâneos  $\pm$  erro padrão da média. No dia 1, os pesos úmidos e secos relativos foram respectivamente  $8,31 \pm 0,42$  mg% e  $1,42 \pm 0,13$  mg%. No dia 7, os pesos úmidos e secos relativos foram respectivamente  $15,25 \pm 4,47$  mg% e  $1,10 \pm 0,34$  mg%. No dia 14, os pesos úmidos e secos relativos foram respectivamente  $29,17 \pm 6,79$  mg% e  $5,36 \pm 0,97$  mg%. No dia 21, os pesos úmidos e secos relativos foram respectivamente  $11,38 \pm 4,69$  mg% e  $1,69 \pm 0,64$  mg%. Pesos úmidos e secos relativos dos hemi-úteros direitos. No dia 1, os pesos úmidos e secos relativos foram respectivamente  $72,64 \pm 2,44$  mg% e  $13,93 \pm 0,5$  mg%. No dia 7, os pesos úmidos e secos relativos foram respectivamente  $76,64 \pm 10,73$  mg% e  $14,09 \pm 2,06$  mg%. No dia 14, os pesos úmidos e secos relativos foram respectivamente  $117,06 \pm 12,46$  mg% e  $19,34 \pm 1,78$  mg%. No dia 21, os pesos úmidos e secos relativos foram respectivamente  $108,83 \pm 12,61$  mg% e  $20,8 \pm 1,69$  mg% (Tabela 1 e Figura 16).

**Tabela 1** - Curva de desenvolvimento dos pesos úmidos relativos e secos relativos dos endometriomas subcutâneos comparada aos pesos dos hemi-úteros direitos em rata

<b>PESO RELATIVO</b>	<b>DIA 1 (média <math>\pm</math> epm)</b>	<b>DIA 7 (média <math>\pm</math> epm)</b>	<b>DIA 14 (média <math>\pm</math> epm)</b>	<b>DIA 21 (média <math>\pm</math> epm)</b>
Peso úmido do endometrioma(mg%)	$8,31 \pm 0,42$	$15,25 \pm 4,47$	$29,17 \pm 6,79$	$11,38 \pm 4,69$
Peso seco do endometrioma(mg%)	$1,42 \pm 0,13$	$1,10 \pm 0,34$	$5,36 \pm 0,97$	$1,69 \pm 0,64$
Peso úmido hemi-útero direito (mg%)	$72,64 \pm 2,44$	$76,64 \pm 10,73$	$117,06 \pm 12,46$	$108,83 \pm 12,61$
Peso seco hemi-útero direito (mg%)	$13,93 \pm 0,5$	$14,09 \pm 2,06$	$19,34 \pm 1,78$	$20,81 \pm 1,69$

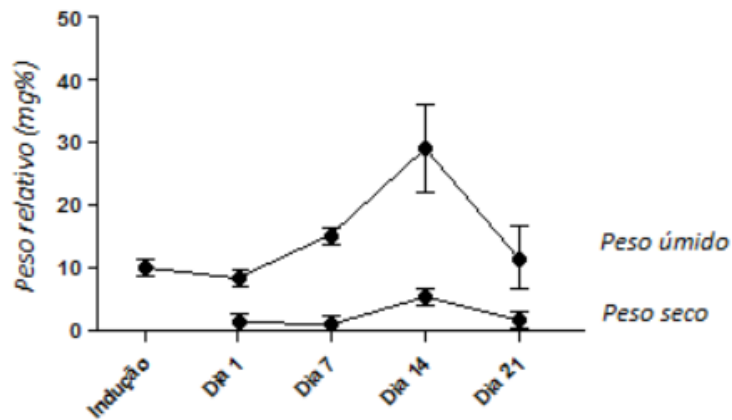
O dia 14 difere do dia 1 após a indução do endometrioma úmido,  $p= 0,0198$ .

O dia 14 após a indução do endometrioma seco difere dos demais,  $p= 0,0018$ .

O crescimento do hemi-útero direito úmido e seco não teve significância estatística.

One- way ANOVA e Tukey's Multiple Comparisons Test.

**Figura 16** - Curva de crescimento dos endometriomas subcutâneos em ratas



O dia 14 difere do dia 1 após a indução do endometrioma úmido,  $p= 0,0198$ .

O dia 14 após a indução do endometrioma seco difere dos demais,  $p= 0,0018$ .

One- way ANOVA e Tukey's Multiple Comparisons Test.

## 5.2 Efeito dos esteroides sexuais ( $\beta$ -estradiol e acetato de medroxiprogesterona), GnRH (pamoato de triptorrelina) e AAS (ácido acetilsalicílico) sobre os pesos úmidos e secos relativos dos endometriomas subcutâneos e hemi-úteros direitos de ratas

No grupo tratado com  $\beta$ -estradiol na dose 2,5 mg/kg, os pesos úmidos e secos relativos dos endometriomas subcutâneos foram respectivamente  $36,62 \pm 4,97$  mg% e  $3,97 \pm 1$  mg%; na dose de 5 mg/kg, os pesos úmidos e secos relativos dos endometriomas subcutâneos foram respectivamente  $56,37 \pm 20,19$  mg% e  $9,11 \pm 3,85$  mg%; na dose de 10 mg/kg, os pesos úmidos e secos relativos dos endometriomas subcutâneos foram respectivamente  $173,89 \pm 69,53$  mg% e  $27,67 \pm 10,27$  mg%. No grupo tratado com acetato de medroxiprogesterona, na dose 0,5 mg/kg, os pesos úmidos e secos relativos dos endometriomas subcutâneos foram respectivamente  $13,58 \pm 2,53$  mg% e  $2,67 \pm 0,5$  mg%; na dose de 2 mg/kg, os pesos úmidos e secos relativos dos endometriomas subcutâneos foram respectivamente  $14,29 \pm 2,07$  mg% e  $3,71 \pm 1,31$  mg%; na dose de 5 mg/kg, os pesos úmidos e secos relativos dos endometriomas subcutâneos foram respectivamente  $15,33 \pm 7,08$  mg% e  $2,68 \pm 1,44$  mg%. No grupo tratado com GnRH, na dose de 0,18 mg/kg, os pesos úmidos e secos relativos dos endometriomas subcutâneos foram

respectivamente  $20,04 \pm 4,02$  mg% e  $5,21 \pm 1,54$  mg%; na dose de 0,56 mg/kg, os pesos úmidos e secos relativos dos endometriomas subcutâneos foram respectivamente  $10,86 \pm 1,88$  mg% e  $1,89 \pm 0,29$  mg%. No grupo tratado com AAS, na dose 3mg/kg, os pesos úmidos e secos relativos dos endometriomas subcutâneos foram respectivamente  $12,81 \pm 2,04$  mg% e  $2,09 \pm 0,4$  mg%. Quanto aos pesos úmidos e secos relativos dos hemi-úteros direitos, no grupo tratado com  $\beta$ -estradiol, na dose de 2,5 mg/kg, os pesos úmidos e secos relativos dos hemi-úteros direitos foram respectivamente  $166,51 \pm 16,57$  mg% e  $27,71 \pm 2,64$  mg%; na dose de 5 mg/kg, os pesos úmidos e secos relativos dos hemi-úteros direitos foram respectivamente  $185,94 \pm 16,49$  mg% e  $31,11 \pm 2,41$  mg%; na dose de 10mg/kg, os pesos úmidos e secos relativos dos hemi-úteros direitos foram respectivamente  $223,18 \pm 32,66$  mg% e  $42,31 \pm 4,11$  mg%. No grupo tratado com acetato de medroxiprogesterona, na dose de 0,5 mg/kg, os pesos úmidos e secos relativos dos hemi-úteros direitos foram respectivamente  $74,57 \pm 4,57$  e  $13,41 \pm 2,53$ ; na de dose 2 mg/kg, os pesos úmidos e secos relativos dos hemi-úteros direitos foram respectivamente  $94,44 \pm 7,93$  mg% e  $14,07 \pm 1,62$  mg%; na dose de 5 mg/kg, os pesos úmidos e secos relativos dos hemi-úteros direitos foram respectivamente  $73,95 \pm 12,79$  mg% e  $15,38 \pm 3,45$  mg%. No grupo tratado com GnRH, na dose 0,18 mg/kg os pesos úmidos e secos relativos dos hemi-úteros direitos foram respectivamente  $41,18 \pm 5,30$  mg% e  $7,77 \pm 0,92$  mg%; na dose de 0,56 mg/kg os pesos úmidos e secos relativos dos hemi-úteros direitos foram respectivamente  $66,14 \pm 6,76$  mg% e  $11,99 \pm 0,92$  mg%. No grupo tratado com AAS, na dose 3mg/kg, os pesos úmidos e secos relativos dos hemi-úteros direitos foram respectivamente  $82,1 \pm 7,76$  mg% e  $15,79 \pm 2,21$  mg%.

O tratamento foi iniciado a partir do quinto dia, porque já existem adesão e vascularização do implante nesse período; o tratamento terminava no décimo terceiro dia e, no décimo quarto dia, as ratas foram sacrificadas. Esse período equivale aproximadamente a três meses de ciclo menstrual na mulher, portanto, um tratamento crônico (Tabelas 2, 3, e 4).

**Tabela 2 –** Efeitos dos esteroides sexuais ( $\beta$ -estradiol e acetato de medroxiprogesterona) sobre o desenvolvimento dos endometriomas subcutâneos e hemi-úteros direitos de ratas

PESO RELATIVO	ESTRADIOL (SC)			Acetato de medroxiprogesterona (SC)			Controle (dia 14) gavagem 2ml Salina 0,9%/dia
	2,5 mg/Kg	5 mg/Kg	10 mg/Kg	0,5 mg/Kg	2 mg/Kg	5 mg/Kg	
Peso úmido Endometrioma (mg%)	36,6±4,9	56,3±20,1	173,9±69,5	13,5±2,5	14,3±2,0	15,3±7,1	29,1±6,8
Peso seco Endometrioma (mg%)	3,97 ± 1	9,11 ± 3,8	27,67 ± 11	2,67 ± 0,5	3,71 ± 1	2,68 ± 1	5,36, ± 1
Peso úmido Hemi-útero direito (mg%)	166,51±16	185,94±16	223,18±32	74,57± 5	94,44± 8	73,95±12	117,06±12
Peso seco Hemi-útero direito(mg%)	27,71±2,6	31,11±2,4	42,31±4,1	13,41±2,5	14,07±0,6	15,38±3,4	19,34±1,7

O endometrioma úmido tratado com Estradiol na dose de 10mg difere dos demais,  $p= 0,0064$ .

O endometrioma seco tratado com Estradiol na dose de 10mg difere dos demais.  $p= 0,0032$ .

Os endometriomas úmidos tratados com acetato de medroxiprogesterona diferiram do controle,  $p= 0,0069$ .

Os endometriomas secos tratados com acetato de medroxiprogesterona diferiram do controle,  $p=0,0013$ .

Os hemi-úteros direitos úmidos tratados com estradiol apresentaram diferença significativa entre os grupos,  $p=0,0001$ .

Os hemi-úteros direitos secos tratados com estradiol apresentaram diferença significativa entre os grupos,  $p=0,0001$ .

Os hemi-úteros direitos úmidos tratados com acetato de medroxiprogesterona diferiram do controle,  $p= 0,0398$ .

Os hemi-úteros secos tratados com acetato de medroxiprogesterona diferiram do controle, estatisticamente não significante,  $p= 0,1462$ .

One-way ANOVA e Tukey's Multiple Comparison Test.



**Tabela 3 –** Efeito do GnRH (pamoato de triptorrelina) sobre o desenvolvimento dos endometriomas subcutâneos e hemi-úteros direitos de ratas

PESO RELATIVO	GnRH (Triptorrelina) sc		Controle 14 dias
	0,18 mg/Kg	0,56 mg/Kg	Salina 0,9% gavagem 2 ml/dia
Peso úmido do endometrioma (mg%)	20,04 ± 4,02 <sup>a</sup>	10,86 ± 1,88 <sup>a</sup>	29,17 ± 6,79 <sup>b</sup>
Peso seco do endometrioma (mg%)	5,21 ± 1,54	1,89 ± 0,29	5,36 ± 0,97
Peso úmido do hemi-útero direito (mg%)	41,18 ± 5,30	66,14 ± 6,76	117,06 ± 12,46
Peso seco do hemi-útero direito (mg%)	7,77 ± 0,92	11,99 ± 0,92	19,34 ± 1,78

O endometrioma úmido tratado com GnRH na dose de 0,56mg difere do controle, p=0,0095.

Os endometriomas secos tratados com GnRH na dose de 0,56mg difere do controle, p=0,0038.

Os hemi-úteros úmidos tratados com GnRH nas duas doses diferiram do controle, p=0,0119

Os hemi-úteros secos tratados com GnRH nas duas doses diferiram do controle, p=0,0054.

One-way ANOVA e Tukey's Multiple Comparison Test.

**Tabela 4 –** Efeito do AAS (ácido acetilsalicílico) sobre o desenvolvimento dos endometriomas subcutâneos e hemi-úteros direitos de ratas

PESO RELATIVO	AAS (ácido acetilsalicílico) gavagem	Controle 14 dias
	3 mg/Kg	Salina 0,9% gavagem 2 ml/dia
Peso úmido do endometrioma (mg%)	12,81 ± 2,04	29,17 ± 6,79
Peso seco do endometrioma (mg%)	2,09 ± 0,4	5,36 ± 0,97
Peso úmido do hemi-útero direito (mg%)	82,10 ± 7,76	117,06 ± 12,46
Peso seco do hemi-útero direito (mg%)	15,79 ± 2,21	19,34 ± 1,78

O grupo tumor úmido tratado com AAS na dose de 3mg difere do grupo controle. Teste T de Student, p=0,0218.

O grupo tumor seco tratado com AAS na dose de 3mg difere do grupo controle. Teste T de Student, p=0,0092.

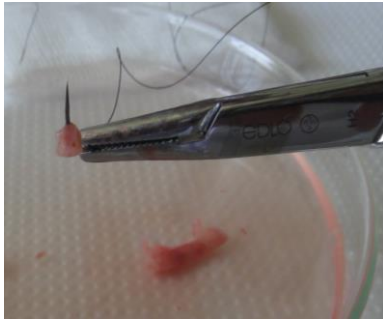
O grupo hemi-útero úmido tratado na dose de 3mg não difere do controle. Teste T de Student, p=0,0655.

O grupo hemi-útero seco tratado na dose de 3mg não difere do controle. Teste T de Student, p=0,3231.

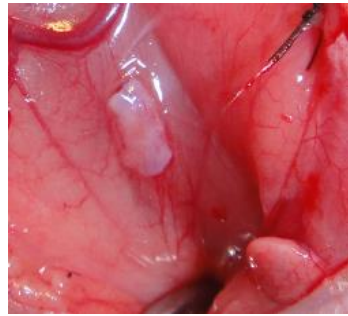
### **5.3 Aspectos macroscópicos dos endometriomas subcutâneos**

Macroscopicamente, os endometriomas apresentaram vários aspectos de acordo com o tempo de implante que foi observado. No dia 1 (24h após o implante endometrial SC), apresentou uma coloração esbranquiçada, estando solto ou levemente fixado e sem vascularização. No dia 7, apresentou coloração branco-rosado sem vascularização, firmemente fixado e, às vezes, podia ser visto alguma área de hemorragia. No dia 14, apresentou coloração rosado, com vascularização ao redor e inclusive na sua superfície. Às vezes, podia apresentar um aspecto cístico. Nesse período, mediu 5,76 mm em média. No dia 21, apresentou as mesmas características do dia 14, porém com dimensões e pesos menores (figuras 17 e 18).

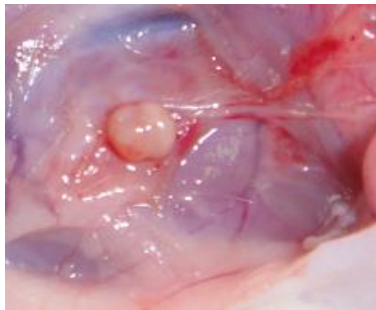
**Figura 17 – Aspectos macroscópicos dos endometriomas nos dias da curva de crescimento**



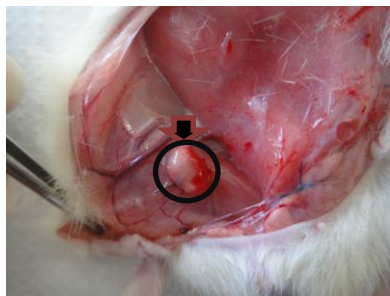
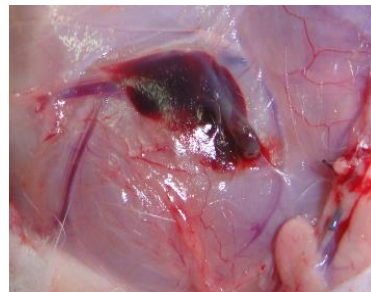
Dia do implante



Dia 1. Tem uma coloração esbranquiçada, estando solto ou levemente fixado e sem vascularização.



Dia 7 tem coloração branco-rosada sem vascularização, firmemente fixado e às vezes pode ser vista alguma área de hemorragia.

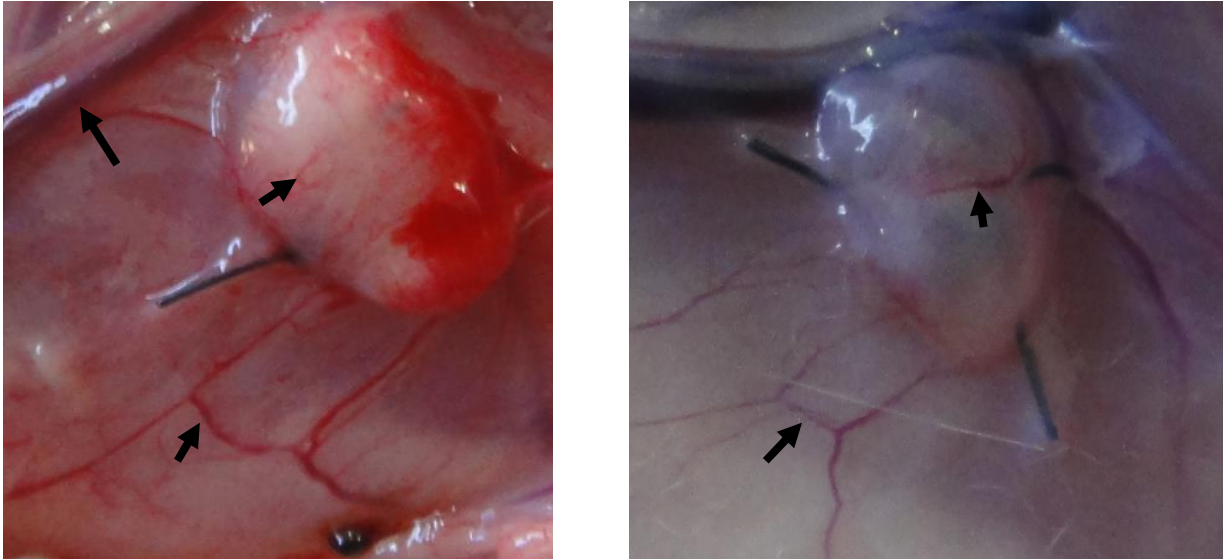


Dia 14 tem coloração rosada, com vascularização ao redor e inclusive na sua superfície, às vezes, pode apresentar um aspecto cístico.



Dia 21 tem as mesmas características do 14º dia, só que com dimensões e pesos menores.

**Figura 18** – Detalhe da vascularização dos endometriomas



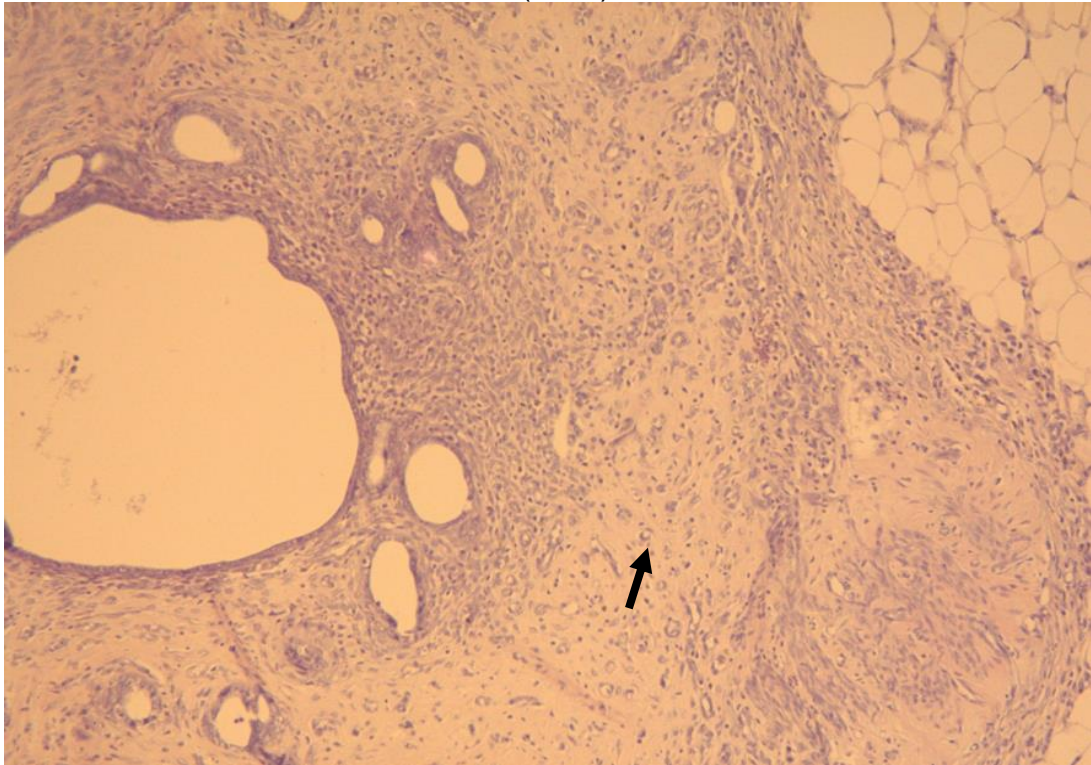
As setas mostram o detalhe da vascularização na superfície e em torno dos endometriomas de 14 dias. O vaso calbroso no canto superior esquerdo da figura faz parte da anatomia normal da rata.

#### **5.4 Aspectos histológicos e histomorfométricos dos endometriomas subcutâneos**

##### *5.4.1 Histologia*

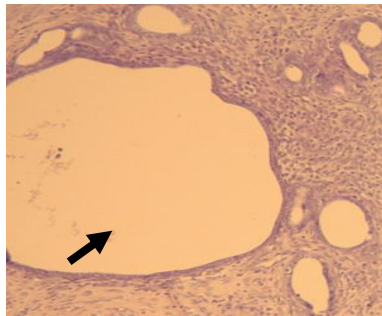
Microscopicamente, foi comprovado o implante de endometriose com os seguintes achados: numerosas glândulas do tipo endometrial madura semelhante a do endométrio tópico, circundadas por estroma endometrial em pequena quantidade. Tecido de granulação exuberante em torno dos focos endometrióticos. Áreas de fibrose e alguns focos hemorrágicos. A presença de tecido adiposo é marcante (figuras 19 e 20).

**Figura 19** – Aspectos histológicos de endometrioma subcutâneo de rata. Hematoxilina e eosina (100x)

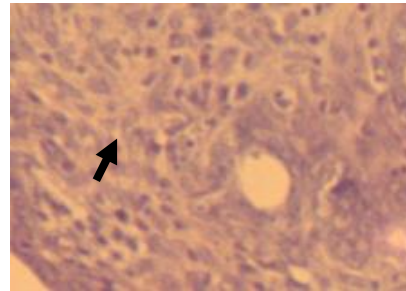


Glândulas endometriais maduras semelhantes à do endométrio tópico, circundadas por estroma endometrial (à esquerda). Presença de tecido adiposo (canto superior direito). Observar, entre o endométrio e o tecido adiposo, faixa de tecido de granulação (seta).

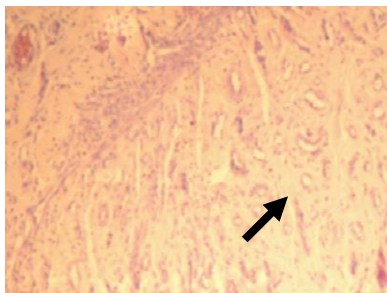
**Figura 20** – Detalhes de achados histológicos dos endometriomas subcutâneos de ratas. Hematoxilina e eosina (100x)



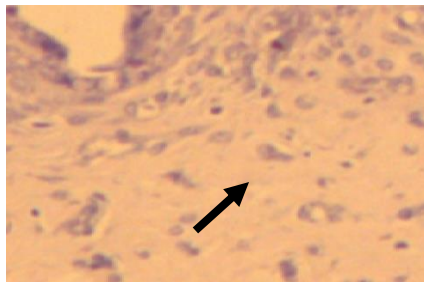
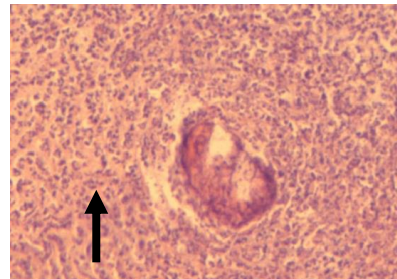
Glândulas



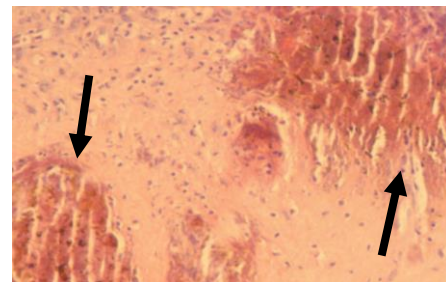
Estroma



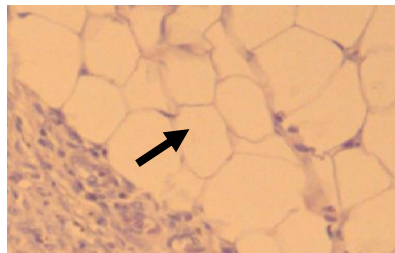
Tecido de granulação



Fibrose



Hemorragia



Tecido adiposo

A seta mostra o detalhe de cada aspecto.

#### 5.4.2 Histomorfometria

Na análise histomorfométrica das lesões endometrióticas subcutâneas, em relação à área total analisada, foram encontrados os seguintes valores médios para o grupo controle:  $4,25 \pm 1,55\%$  de glândulas;  $1,25 \pm 0,52\%$  de estroma;  $32,25 \pm 14,60\%$  de tecido adiposo;  $1,65 \pm 1,34\%$  de tecido muscular;  $16,03 \pm 27,54\%$  de hemorragia;  $56,90 \pm 11,24\%$  de tecido de granulação; de um total de 100%. No grupo tratado com estradiol foram encontrados:  $35,37 \pm 8,88\%$  de glândulas;  $1,42 \pm 0,56\%$  de estroma; não foi observado tecido adiposo;  $13,55 \pm 14,04\%$  de tecido muscular;  $1,67 \pm 0,86\%$  de hemorragia;  $52,21 \pm 8,27\%$  de tecido de granulação; de um total de 100%. No grupo tratado com análogo do GNRH foram encontrados:  $15,16 \pm 16,85\%$  de glândulas,  $3,35 \pm 0\%$  de estroma; não foi observado tecido adiposo;  $8,04 \pm 0\%$  de tecido muscular estriado;  $5,49 \pm 3,98\%$  de hemorragia;  $73,67 \pm 12,78\%$  de tecido de granulação, de um total de 100%. No grupo tratado com acetato de medroxiprogesterona foram encontrados:  $24,05 \pm 19,54\%$  de glândulas;  $1,71 \pm 0,72\%$  de estroma; não foi observado tecido adiposo;  $14,73 \pm 12,97\%$  de tecido muscular;  $5,71 \pm 2,72\%$  de hemorragia;  $64,46 \pm 24,09\%$  de tecido de granulação, de um total de 100% (Tabela 5 e Fig.21).

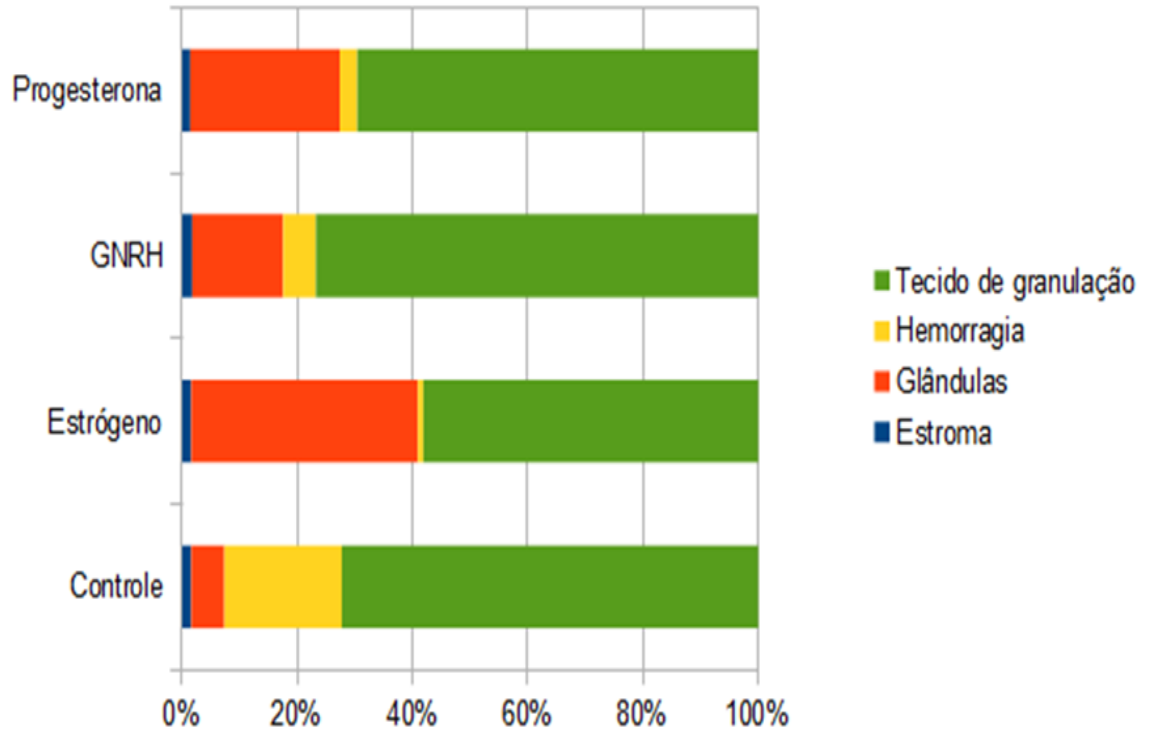
**Tabela 5 – Histomorfometria das lesões endometrióticas subcutâneas de rata**

	<b>Glândulas</b>	<b>Estroma</b>	<b>Tecido adiposo</b>	<b>Tecido muscular</b>	<b>Hemorragia</b>	<b>Tec. de granulação</b>	<b>Total</b>
<b>CONTROLE</b>							
Caso 01	2,98%	1,35%	27,50%	0,70%	57,26%	57,26%	100,0%
Caso 02	4,27%	0,64%	30,89%	-	2,25%	61,96%	100,0%
Caso 03	6,67%	1,10%	18,03%	2,60%	4,38%	67,20%	100,0%
Caso 04	4,16%	1,89%	52,56%	-	0,21%	41,18%	100,0%
Porcentagem acumulada	18,08%	4,98%	128,98%	3,30%	64,10%	227,60%	400,00%
Média ± Desvio Padrão	4,52 ± 1,55%	1,25 ± 0,52%	32,25 ± 14,60%	1,65 ± 1,34%	16,03 ± 27,54%	56,90 ± 11,24%	-
<b>ESTRADIOL</b>							
Caso 01	25,54%	2,24%	-	28,40%	1,06%	42,76%	100,00%
Caso 02	32,54%	1,34%	-	11,77%	-	54,36%	100,00%
Caso 03	46,78%	1,10%	-	0,49%	2,27%	49,36%	100,00%
Caso 04	36,61%	1,01%	-	-	-	62,37%	100,00%
Porcentagem acumulada	141,47%	5,69%	-	40,66%	3,33%	208,85%	400,00%
Média ± Desvio Padrão	35,37 ± 8,88%	1,42 ± 0,56%	-	13,55 ± 14,04%	1,67 ± 0,86%	52,21 ± 8,27%	-
<b>GNRH</b>							
Caso 01	-	-	-	-	-	-	-
Caso 02	27,07%	-	-	-	8,30%	64,63%	100,00%
Caso 03	3,24%	3,35%	-	8,04%	2,67%	82,70%	100,00%
Caso 04	-	-	-	-	-	-	-
Porcentagem acumulada	30,31%	3,35%	-	8,04%	10,97%	147,33%	200,00%
Média ± Desvio Padrão	15,16 ± 16,85%	3,35 ± 0%	-	8,04 ± 0%	5,49 ± 3,98%	73,67 ± 12,78%	-
<b>PROGESTERONA</b>							
Caso 01	50,34%	1,66%	-	5,56%	3,78%	38,67%	100,00%
Caso 02	25,64%	-	-	-	-	74,36%	100,00%
Caso 03	15,69%	1,01%	-	23,90%	7,63%	51,77%	100,00%
Caso 04	4,51%	2,45%	-	-	-	93,03%	100,00%
Porcentagem acumulada	96,18%	5,12%	-	29,46%	11,41%	257,83%	400,00%
Média ± Desvio Padrão	24,05 ± 19,54%	1,71 ± 0,72%	-	14,73 ± 12,97%	5,71 ± 2,72%	64,46 ± 24,09%	-

\* Casos 01 e 04 do grupo tratado com GNRH foram descartados por apresentarem grandes abscessos.



**Figura 21** – Histomorfometria das lesões endometrióticas subcutâneas de rata (média das áreas de cada componente).



Média  $\pm$  EPM das áreas medidas- Controle: glândulas  $4,52 \pm 1,55\%$ ; estroma  $1,25 \pm 0,52\%$ ; tecido adiposo  $32,25 \pm 14,6\%$ ; tecido muscular  $1,65 \pm 1,34\%$ ; hemorragia  $16,03 \pm 27,54\%$ ; tecido de granulação  $56,9 \pm 11,24\%$ .

Estradiol: glândulas  $35,37 \pm 8,88\%$ ; estroma  $1,42 \pm 0,56\%$ ; tecido adiposo não observado; tecido muscular  $13,55 \pm 14,04\%$ ; hemorragia  $1,67 \pm 0,86\%$ ; tecido de granulação  $52,21 \pm 8,27\%$ .

GnRH: glândulas  $15,16 \pm 16,85\%$ ; estroma  $3,35 \pm 0\%$ ; tecido adiposo não observado; tecido muscular  $8,04 \pm 0\%$ ; hemorragia  $5,49 \pm 3,98\%$ ; tecido de granulação  $73,67 \pm 67\%$ .

Progesterona: glândulas  $24,05 \pm 19,54\%$ ; estroma  $1,71 \pm 0,72\%$ ; tecido adiposo não avaliado; tecido muscular  $14,73 \pm 12,97\%$ ; hemorragia  $5,71 \pm 2,72\%$ ; tecido de granulação  $64,46 \pm 24,09\%$ .

## 6 DISCUSSÃO

Este experimento foi realizado (com modificações baseadas no modelo de Vernon e Wilson, 1985) com o propósito de desenvolver um modelo padronizado de endometriose subcutânea, que pudesse ser utilizado para estudo de prováveis mecanismos fisiopatológicos e do efeito de drogas sobre a endometriose, motivados por não existir na literatura consultada um modelo que preenchesse esses requisitos e, também, que fosse um modelo de fácil execução e de baixo custo.

### 6.1 Comparação do modelo com a literatura

Não há dúvidas, de que o modelo de primata para estudo da endometriose tem maior relação com a situação em seres humanos, portanto, adequado para investigar início e progressão da endometriose, parâmetros imunológicos, padrões de herança e mecanismos de *feedback* sobre o endométrio tópico. O primata é a única espécie que apresenta menstruação espontânea, tem muitas semelhanças com as mulheres, como anatomia pélvica, características fisiológicas reprodutivas e imunológicas (GRÜMMER, 2006). Primatas desenvolvem endometriose espontânea e estabelecem lesões iguais e em locais também iguais as que as mulheres desenvolvem (MACKENZIE; CASEY, 1975; D'HOOGHE *et al.*, 1991). Considerações éticas e alto custo para realização de experimentos limitam o uso deste modelo para pesquisa em endometriose (GRÜMMER, 2006).

Alguns fatores que possam existir somente no endométrio humano, para que possa desenvolver e manter um foco endometriótico não está presente no endométrio de roedores tem levado autores a desenvolver modelo heterólogo (BERGQVIST *et al.*, 1985; GRÜMMER *et al.*, 2001). O modelo heterólogo de roedor é uma ferramenta para experimentos que avaliam a etiologia, para teste terapêutico e modulação hormonal, porque se baseia na saúde do endométrio humano. Pode ser usado tecido endometrial ou tecido endometriótico humano (GRÜMMER, 2006). No modelo homólogo, utiliza-se de transplante de endométrio do próprio animal ou de animais singênicos (geneticamente idênticos) em animais imunocompetentes, enquanto que, em modelo heterólogo, o endométrio humano é transferido para animais imunodeficientes (GRÜMMER, 2006).

No modelo de roedora heteróloga (camundongo nude), o endométrio humano fica intacto por no máximo quatro semanas. Após três semanas do implante podem ser observados desdiferenciação e infiltrado de linfócitos (GRÜMMER *et al.*, 2001). No modelo homólogo peritoneal de rato, as lesões permanecem viáveis por um período de pelo menos 10 meses, ou seja, 40 semanas (VERNON e WILSON, 1985).

Na rata, o fragmento uterino implantado mostra características da doença humana, com formação de lesões vascularizadas, contendo glândulas, estroma e cistos, independentemente de sua localização peritoneal (CUMMINGS; METCALF, 1995).

Existem diferenças importantes entre o modelo de roedores e a fisiologia reprodutiva humana, por isso, esse modelo tem suas limitações. Os roedores não menstruam e não desenvolvem endometriose espontânea. Apesar das limitações, esse modelo oferece muitas vantagens, tais como baixo custo, poder realizar estudos em grandes grupos de animais geneticamente semelhantes, estudos a longo prazo, não há rejeição do tecido ectópico auto-implantado, investigar mecanismos envolvidos na fixação de células endometriais no peritônio, investigar efeito de drogas e avaliação de drogas imunomoduladoras devido a um sistema imune bem caracterizado (GRÜMMER, 2006).

Como pode se observar pelos resultados apresentados nesses experimentos, a curva de desenvolvimento dos pesos relativos dos endometriomas subcutâneos ao longo do tempo, o grupo de 14 dias foi o que apresentou os maiores pesos. Esse aumento poderia ser explicado pela reação inflamatória aguda que, comumente, dura em torno de uma a duas semanas (PATOLOMED, 2009), coincidindo, assim, com o período de maior crescimento do peso do endometrioma, juntamente com retenção líquida que, depois desse período diminuiria, ficando em um patamar menor de peso e, ajudado também pela reação fibrótica em torno do endometrioma, que poderia dificultar o acesso de mais células inflamatórias ao local do endometrioma. Este fato foi verificado no endometrioma de 21 dias que, nesse período, apresenta-se bem menor em relação ao de 14 dias. Uchiide; Ihara; Sugmata (2002) encontraram resultados parecidos com os do presente estudo; eles evidenciaram uma reação inflamatória progressiva nos primeiros 4 a 7 dias, com a presença de células do plasma, eosinófilos, linfócitos, mastócitos e macrófagos, tendo a reação inflamatória diminuída, e as células também desaparecidas após 14

dias do autotransplante, permanecendo eosinófilos apoptóticos e macrófagos fagocitando corpos apoptóticos.

Como não existe na literatura experimento semelhante para comparações, observaremos as diferenças com alguns modelos mais parecidos.

XU *et al.* (2009) usaram camundongos com deficiência na função dos linfócitos T e B, utilizando endométrio heterólogo (humano) e implantando-o em bolsa no subcutâneo, mas não descrevendo como fizeram a bolsa. Nesse trabalho, foi usado animal com sistema imune modificado e endométrio heterólogo, tornando o método mais complexo do que o do modelo deste experimento. LIU *et al.* (2010), usaram endométrio heterólogo incubado com adenovírus e injetaram no subcutâneo. No trabalho de LIU, foi utilizado um microorganismo e isso poderia modificar a fisiopatologia da endometriose. WANG *et al.* (2013), usaram camundongo nude e implantaram endométrio autólogo em bolsa no subcutâneo, mas também não descreveram como fizeram a bolsa. Nesse trabalho, foi utilizado também animal com sistema imune modificado, podendo, portanto, alterar a fisiopatologia da endometriose (WANG *et al.*, 2013).

FU *et al.* (2013), implantaram fragmentos de útero autólogo em bolsa subcutânea, mas não descreveram como fizeram a bolsa. Neste experimento, não foi explicado o método, não podendo ser feita alguma comparação. MOHAMMADZADEH *et al.* (2008) usaram seis fragmentos de hemi-útero esquerdo, sendo que, o endométrio foi separado do miométrio usando microscópio. Implantaram quatro fragmentos na cavidade peritoneal e dois fragmentos no subcutâneo de cada lado do abdome. Neste experimento, houve implante em cavidade peritoneal, não sendo, portanto, um modelo subcutâneo puro. Além disso, foi usado microscópio para separar o endométrio do miométrio diferindo do modelo proposto, que não foi usado esse instrumento e nem foi preciso separar o endométrio do miométrio, tornando este método bem mais simples. No achado histológico do modelo proposto não foi encontrado tecido muscular uterino.

JOÃO NETO *et al.* (2007) utilizaram a classificação de QUEREDA; BARROSO; ACIEN (1996) para avaliar o desenvolvimento dos implantes, na qual se usa uma classificação baseada mais no aspecto do endometrioma, que se classifica dessa maneira: grau zero- implantação desaparece ou ausência de forma cística, grau I- implantação forma uma vesícula com diâmetro menor do que 2 mm ou forma sólida, grau II- implantação é cística e seu diâmetro está entre 2 e 4,5 mm, grau III-

vesícula com diâmetro maior que 4,5 mm. Em seu experimento foi encontrado endometriomas classificados em sua maioria nos graus II e III (JOÃO NETO *et al.*,2007). Nesse experimento, foi usado peso úmido e peso seco para avaliar o desenvolvimento dos implantes, que é um método baseado em medida (peso em kg), não sendo observador-dependente, portanto, um método mais confiável.

Ji *et al.* (2011) utilizaram Guizhi Fuling Capsule (GZFLC), uma fórmula da medicina tradicional chinesa, agente imunomodulador, para pesquisar a sua eficácia sobre implantes de endometriose na parede externa do abdome em ratas. Nesse estudo, foi verificada que o GZFLC reduziu o tamanho dos implantes (em volume) de endometriose devido a sua ação imunomoduladora no modelo de endometriose em rata. No entanto, eles não demonstraram como realizaram esse implante na parede externa do abdome. Ao contrário, sistematizamos o método de como fazer o modelo de endometriose subcutânea.

BERGQVIST *et al.* (1985) utilizou tecido endometriótico obtido por laparotomia (seis mulheres) e tecido de endométrio, obtido através de curetagem uterina (simultaneamente das mesmas seis mulheres), e implantou no subcutâneo de camundongos nus para estudar o efeito morfológico de várias drogas (estradiol, acetato de medroxiprogesterona e danazol). Nos seus estudos encontraram glândulas de vários tamanhos, formas e um estroma pouco celular, um padrão parecido com este experimento. Eles encontraram tecido fibroso nos animais tratados com estrogênio, fibrose esta que parecia substituir os enxertos, tanto de tecido endometrial como de tecido endometriótico. O que chama atenção neste trabalho, é que foi utilizado tecido humano (heterólogo) para indução da endometriose subcutânea, ao contrário deste experimento que foi usado tecido autólogo.

KEENAN *et al.* (1999) realizaram implante na cavidade peritoneal próximo a vasos de maior irrigação (mesentério do intestino delgado) e tiveram que fazer três cirurgias no mesmo animal. Ao contrário, neste experimento, foi realizada apenas uma cirurgia e foi colocado o implante em um tecido (subcutâneo) que não tem a irrigação abundante de um intestino.

Utilizando modelo de endometriose em ratas Cason; Samuelson; Berkley (2003) observaram que implantes do tipo cisto aumentavam à medida que os níveis estrogênicos aumentavam na rata. Esses achados se assemelham aos achados

deste experimento, ou seja, a resposta foi dose-dependente (CASON; SAMUELSEN; BERKLEY, 2003).

## 6.2 Análise dos resultados

### 6.2.1 Curva de desenvolvimento

Agora, serão discutidos os resultados traduzidos em números, começando pelo grupo controle. Observando a curva de desenvolvimento do grupo controle (dia 14), foi percebido que há um aumento progressivo no peso dos endometriomas úmidos, mas estatisticamente significante somente no dia 14 em relação ao dia 1 ( $p = 0,0198$ ); no peso dos endometriomas secos há um aumento progressivo também, portanto, uma curva ascendente com diferença estatística significante do dia 14 em relação a todos os outros dias ( $p = 0,0018$ ) (figura 21).

Provavelmente, essa diferença entre os endometriomas úmidos e secos seja explicada, porque, no peso seco, está se pesando efetivamente os tecidos que foram acrescidos no peso, ou seja, não há interferência de infiltração líquida e processo inflamatório, que dura em torno de uma a duas semanas (PATOLOMED, 2009). Nos pesos dos hemi-úteros úmidos e secos, não houve crescimento significante em nenhum grupo, resultado esse que poderia ser esperado, já que não estava sendo dado hormônio exógeno (estrogênio) para estimular o crescimento dos hemi-úteros. O estrogênio produzido pelo endometrioma, provavelmente teve uma ação mais local e, também, esse estrogênio não teria chegado a corrente sanguínea devido à fibrose em torno do endometrioma (ZEITOUN *et al.* 1998).

### 6.2.2 Efeito dos esteróides sexuais ( $\beta$ -estradiol e acetato de medroxiprogesterona) sobre o desenvolvimento dos endometriomas subcutâneos e hemi-úteros direitos de ratas

Terminado o experimento da curva de desenvolvimento e tendo-se padronizado o início e o término do tratamento, foi iniciado o estudo com drogas para verificar a resposta do endometrioma subcutâneo ao estradiol, acetato de medroxiprogesterona, análogos de GnRH (pamoato de triptorelina) e ácido acetilsalicílico (AAS). Constatou-se a resposta do endometrioma subcutâneo às

drogas semelhante ao seu comportamento em focos de endometriose que ocorrem em mulheres com esta enfermidade.

O peso úmido dos endometriomas do grupo tratado com estrogênio ( $\beta$ -estradiol, 10 mg/kg) tiveram diferença significativa em relação ao controle e às demais doses ( $p = 0,0064$ ). As doses de 2,5 mg/kg e 5 mg/kg não mostraram diferença significativa entre si e nem entre elas e o controle. Portanto, essas doses não foram suficientes para desenvolver os endometriomas. Os pesos secos dos endometriomas do grupo tratado com estrogênio 10 mg/kg apresentaram o mesmo padrão de resposta que os pesos úmidos dos endometriomas ( $p = 0,0032$ ). Os pesos úmidos dos hemi-úteros tratados com estrogênio 10 mg/kg tiveram diferença estatística significativa em relação ao controle e às demais doses ( $p = 0,0001$ ). As doses de 2,5 mg/kg e 5 mg/kg não diferiram entre si, mas tiveram diferença em relação ao controle e à dose de 10 mg, mostrando uma curva de crescimento ascendente em relação ao controle e evidenciando também uma resposta positiva ao estrogênio melhor que os endometriomas. Essa curva ascendente deste experimento é semelhante aos achados de Cason; Samuelsen; Berkley (2003). Essa diferença de resposta poderia ser explicada, provavelmente pela presença de fibrose nos endometriomas, a qual não responde aos estrogênios. BERGQVIST *et al.* (1985) em seus experimentos também encontraram muita fibrose em seus achados histológicos de endometriose. Os pesos secos dos hemi-úteros tratados com estrogênio tiveram as mesmas respostas que os pesos úmidos dos hemi-úteros tratados com estrogênio ( $p = 0,0001$ ), mostrando também uma curva ascendente.

Os pesos úmidos dos endometriomas tratados com acetato de medroxiprogesterona nas doses de 0,5 mg/kg, 2 mg/kg e 5 mg/kg tiveram uma diminuição nos seus pesos em relação ao controle ( $p = 0,0069$ ), mas, entre as doses não houve diferença significativa. Os pesos secos dos endometriomas tratados com acetato de medroxiprogesterona nas doses de 0,5 mg/kg, 2 mg/kg e 5 mg/kg tiveram o mesmo padrão de resposta dos endometriomas úmidos tratado com acetato de medroxiprogesterona, o que mostrou certa surpresa, já que na endometriose há uma resistência à progesterona e, nesse experimento, a menor dose (0,5 mg/kg) é dez vezes menor que a dose de 5 mg/kg. A não ser que a dose de 0,5 mg/kg já seja uma dose alta para esse tipo de animal (rata) ou, devido à resistência à progesterona, a resposta máxima seria com a dose de 0,5 mg/Kg. Mesmo aumentando a dose, a resposta seria a mesma. Os pesos úmidos dos hemi-úteros tratados com acetato de

medroxiprogesterona nas doses de 0,5 mg/kg, 2 mg/kg e 5 mg/kg tiveram uma diferença significativa somente na dose de 0,5 mg em relação ao controle ( $p = 0,0398$ ). Entre as doses não houve diferença significativa. Os pesos secos dos hemi-úteros tratados também com acetato de medroxiprogesterona nas mesmas doses, não apresentaram diferença significativa entre as doses e nem entre as doses e o controle. Esses achados poderiam ser explicados baseados em que os hemi-úteros não apresentam endometriose. Portanto, não tendo endometriose, não tem reação inflamatória e, não tendo inflamação, eles não teriam infiltração de líquido e de células inflamatórias com seus produtos secretórios, pois, a progesterona que tem ação anti-inflamatória (SEMPR, 2007) não teria como agir para diminuir seu peso. Outra explicação é que o endométrio e o miométrio normais não expressam aromatase. Ao contrário do que ocorre no foco de endometriose, há aromatase produzindo estrogênio, que contribui para aumentar ainda mais a lesão endometriótica, portanto, não tendo lesão, não tem estrogênio local, para que a progesterona exerça sua ação de antagonista do estrogênio ao nível do útero para diminuir sua ação proliferativa (BULUN; SIMPSON; WORD, 1994; NOBLE *et al.*, 1997).

### 6.2.3 Efeito do GnRH (pamoato de triptorrelina) sobre o desenvolvimento dos endometriomas subcutâneos e hemi-úteros direitos de ratas

Os pesos úmidos dos endometriomas tratados com GnRH nas doses de 0,18 mg/kg e 0,56 mg/kg provocaram uma diminuição dos endometriomas, mas somente a dose 0,56 mg/kg obteve diferença significativa em relação ao controle ( $p = 0,0095$ ); não houve diferença significativa entre as doses. Os pesos secos dos endometriomas tratados com GnRH nas doses de 0,18 mg/kg e 0,56 mg/kg foram reduzidos, mas somente a dose de 0,56 mg teve significância estatística em relação ao controle ( $p = 0,0038$ ). Não houve diferença significativa entre as doses de 0,18 mg/kg e 0,56 mg/kg. A diminuição dos pesos dos endometriomas com GnRH eram resultado esperado, no caso de o implante se desenvolver, porque o GnRH provoca um bloqueio da liberação de gonadotrofinas, levando a uma diminuição na produção de estrogênio (KIESEL *et al.*, 2002). Desta maneira, não poderia estimular o endometrioma, que é estrogênio dependente. O que chamou atenção, foi que o GnRH levou a uma maior diminuição dos pesos dos endometriomas e dos hemi-



úteros, dentre as drogas que foram usadas no sentido de bloquear o desenvolvimento dos endometriomas. Os pesos úmidos dos hemi-úteros tratados com GnRH nas doses de 0,18 mg/kg e 0,56 mg/kg tiveram diminuição dos pesos, e diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ( $p = 0,0119$ ), mas não mostraram diferença entre as drogas em termos estatísticos. Os pesos secos dos hemi-úteros tratados com GnRH nas doses de 0,18 mg/kg e 0,56 mg/kg tiveram o mesmo padrão de resposta que os pesos úmidos dos hemi-úteros ( $p = 0,0054$ ), e também não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre as drogas. A diminuição dos hemi-úteros pelo GnRH poderá ser explicada pelo bloqueio intenso da liberação de gonadotrofina, levando a uma falta de estrogênio, já que o útero é órgão responsivo ao estrogênio. Pelo fato do GnRH ter uma melhor resposta na diminuição dos pesos, inclusive nos hemi-úteros sadios, isso mostra a potência do bloqueio hormonal que o mesmo causou (KIESEL *et al.*, 2002).

#### *6.2.4 Efeito do AAS (ácido acetilsalicílico) sobre o desenvolvimento dos endometriomas subcutâneos e hemi-úteros direitos de ratas*

Os pesos úmidos dos endometriomas tratados com AAS na dose de 3 mg/kg diferiram do controle com significância estatística ( $p = 0,0218$ ). Os pesos secos dos endometriomas tratados com AAS na dose de 3 mg/kg tiveram diferença significativa em relação ao controle ( $p = 0,0092$ ). Os pesos úmidos e secos dos hemi-úteros tratados com AAS na dose de 3 mg, não tiveram diferença estatística significativa em relação ao controle. A diminuição dos pesos dos endometriomas tratados com o AAS é muito importante para demonstrar a validação do modelo de endometriose subcutânea, porque o AAS não é uma droga que tem ação sobre a produção de estrogênio. Sua ação se faz por bloqueio do processo inflamatório, demonstrando que a endometriose é uma doença que também se inicia e se mantém com inflamação. O AAS impede o processo inflamatório por inibir um dos mais importantes fatores de transcrição (NF- $\kappa$ B) (O'NEILLE; KALTSCHMIDT, 1997). Fator este que, quando ativado, libera muitas citocinas pró-inflamatórias (GUO, 2007). O AAS inibe a subunidade IKKbeta da IKK (IKB quinase), bloqueando assim, a fosforilação da IKB (proteína inibitória do NF- $\kappa$ B). E, assim, não havendo a fosforilação da IKB, não ocorrerá a translocação do NF- $\kappa$ B para o núcleo, impedindo que o mesmo libere fatores que favorecem o processo inflamatório (YIN;

YAMMAMOTO; GAYNOR,1998). Outra via de inibição do processo inflamatório pelo AAS é a inibição da produção de prostaglandinas. O AAS inibe de maneira irreversível a COX-1 e a COX-2, estas enzimas transformam o ácido aracdônico em PGH2 que é uma precursora da PGE2 (OLIVEIRA, 2001). Como já foi dito, a prostaglandina E2 é uma potente estimuladora da aromatase que, por sua vez, aumenta a produção de estrogênio (ZEITOUN *et al.*, 1998). Como o endometrioma se desenvolve respondendo a fator hormonal (estrogênio) e a fatores inflamatórios (citocinas pró-inflamatórias), é compreensível que o AAS, bloqueando o fator inflamatório, provocará uma redução importante no peso do endometrioma. Já foi dito que não houve diminuição dos pesos dos hemi-úteros, resultado este, que vem comprovar a importância do processo inflamatório na composição das lesões de endometriose. Os pesos dos hemi-úteros não poderiam diminuir, já que os mesmos não estavam com endometriose. Portanto, não poderiam responder a uma droga de ação anti-inflamatória.

#### 6.2.5 *Histomorfometria*

Na análise histomorfométrica das lesões endometrióticas subcutâneas, em relação à área total analisada, foi observado , no grupo controle, ocorreu uma maior área de hemorragia em relação aos grupos tratados, o que poderia ser explicado como devido à ciclicidade, ou seja, no controle está ocorrendo o que ocorre normalmente durante o ciclo menstrual, o foco endometriótico sangrando igualmente ao endométrio tópico e no controle não está havendo nenhum bloqueio para que isso não ocorra (VISCOMI *et al.*, 2004). Portanto, é de se esperar que, nesse grupo, ocorra mais área de hemorragia. No grupo tratado com estrogênio, houve maior área de glândulas em relação ao controle e aos outros grupos. O fato podendo ser explicado pela estimulação proliferativa que esse esteróide faz nas glândulas. Observou-se também em todos os grupos, inclusive no controle, a presença de grande quantidade de área com tecido de granulação. Muito provavelmente a presença de tecido de granulação faz parte do processo fisiopatológico da endometriose, ou seja, é uma doença que tem em sua evolução o processo inflamatório e de cicatrização (WERNER; GROSE, 2003) (ver figura 4).

## 7 CONCLUSÕES

- 1) O modelo é adequado para estudo de prováveis mecanismos fisiopatológicos e do efeito de drogas.
- 2) O endometrioma cresceu com o uso de estradiol de maneira semelhante ao que ocorre na mulher.
- 3) O endometrioma diminuiu com o uso de acetato de medroxiprogesterona de maneira semelhante ao que ocorre na mulher.
- 4) O endometrioma diminuiu com o uso de análogos de GnRH de maneira semelhante ao que ocorre na mulher.
- 5) O endometrioma diminuiu com o uso de AAS, sendo essa droga importante para a validação do modelo.
- 6) O modelo é factível de ser executado e apresenta baixo custo financeiro.

## REFERÊNCIAS

- ANDERSON, S.; MORGHABI, N. Physiology and molecular genetics of 17-beta-hydroxysteroid de hydrogenases. **Steroids**, v. 62, p. 143-7, 1997.
- ARICI, A. Local cytokines in endometrial tissue: the role of interleukin-8 in the pathogenesis of endometriosis. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 955, p. 101-9, 2003.
- ATTIA, G. R.; ZEITOUN, K.; EDWARDS, D.; JOHNS, A.; CARR, B. R.; BULUN, S. E. Progesterone receptor isoform A but not B is expressed in endometriosis. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 85, p. 2897-902, 2000.
- BALDWIN, A. S. J. The NF-kB and Ikb proteins: new discoveries and insights. **Annu Ver. Immunol.**, v. 14, p. 649-83, 1996.
- BAEUERLE, P. A.; BALTIMORE, D. NF-kB: Ten years after. **Cell**, v. 87 p. 13-20, 1996.
- BELLELIS, P.; DIAS JR, J. A.; PODGAEC, S.; GONZALEZ, M.; BARACAT, E. C.; ABRÃO, M. S. Aspectos epidemiológicos e clínicos da endometriose pélvica - uma série de casos. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 56, n. 4, p. 467-71, 2010.
- BERGQVIST, A.; JEPPSSON, S.; KULLANDER, S.; LJUNGBERG, O. Human Uterine Endometrium and Endometriotic Tissue Human Transplanted Into nude Mice. Morphologic effects of various steroidhormones. **Am. J. Pathol.**, v. 121, p. 337-341, 1985.
- BIRKEDAL-HANSEN, H. Rolon of Matrix Metalloproteinase in Human Periodontal Diseases. **Journal of Periodontology**, v. 64, n. 5, p. 474-484, 1993.
- BLUMENKRANTZ, J. M.; GALLAGHER, N.; BASHORE, R. A.; TENCKHOFF, H. Retrograde menstruation in women undergoing chronic peritoneal dialysis. **Obstet. Gynecol.**, v. 57, p. 667-70, 1981.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portal da Saúde. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=35995](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=35995)>. Acesso em: 15 jun. 2012.
- BRAUN, D. P.; MURIANA, A.; GEBEL, H.; ROTMAN, C.; RANA, N.; DMOWSKI, W. P. Monocyte-mediated enhancement of endometrial cell proliferation in women with endometriosis. **Fertil. Steril.**, v. 61, p. 78-84, 1994.
- BRAUN, D. P.; GEBEL, H.; HOUSE, R. Spontaneous and induced synthesis of cytokines by peripheral blood monocytes in patients with endometriosis. **Fertil. Steril.**, v. 65, n. 6, p. 1125-1129, 1996.
- BRUNER, K. L.; RODGERS, W. H.; GOLD, L. I.; KORC, M.; HARGROVE, J. T.; MATRISIAN, L. M. Transforming growth factor beta mediates the progesterone suppression of an epithelial metalloproteinase by adjacent stroma in the human endometrium. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 92, p. 7362-6, 1995.

BULUN, S. E.; PRICE, T. M.; AITKEN, J.; MAHENDROO, M. S. SIMPSON E. R. A link between breast cancer and local estrogen biosynthesis suggested by quantification of breast adipose tissue aromatase cytochrome P450 transcripts using competitive polymerase chain reaction after reverse transcription. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 77, p. 1622-8, 1993.

BULUN, S. E.; SIMPSON, E. R.; WORD, R. A. Expression of the CYP19 gene and its product aromatase cytochrome P450 in human uterine leiomyoma tissues and cells in culture. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 78, p. 736-43, 1994.

CASON, A. M.; SAMUELSEN, C. L.; BERKLEY, K. J. Estrous changes in vaginal nociception in a rat model of endometriosis. **Horm. Behav.**, v. 44, p. 123-131, 2003.

CHENG, Y. H.; IMIR, A.; FENKCI, V.; YILMAZ, M. B.; SERDAR; BULUN, S. E. Stromal cells of endometriosis fail to produce paracrine factors that induce epithelial 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 gene and its transcriptional regulator Sp1: a mechanism for defective estradiol metabolism. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 196, issue 4, p. 391.e1-e8, 2007.

CHENG, Y. H.; YIN, P.; XUE, Q.; YILMAZ, B.; DAWSON, M. I.; BULUN, S. E. Retinoic acid (RA) regulates 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in endometrium: interaction of RA receptors with specificity protein (SP) 1/SP3 for estradiol metabolism. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 93, p. 1915-23, 2008.

COX, K. E.; PIVA, M.; SHARPE-TIMMS, K. L. Differential regulation of matrix metalloproteinase-3 gene expression in endometriotic lesions compared with endometrium. **Biol. Reprod.**, v. 65, p.1297-303, 2001.

CRICHTON, R. R.; WILMET, S.; LEGSSYER, R.; WARD, R. J. Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. **J. Inorg. Biochem.**, v. 91, p. 9-18, 2002.

CUMMINGS, A. M.; METCALF, J. L. Induction of endometriosis in mice: a new model sensitive to estrogen. **Reprod. Toxicol.**, v. 9, p. 233-238, 1995.

DECHAUD, H.; WITZ, C. A.; MONTOYA-RODRIGUEZ, I. A.; DEGRAFFENREID, L. A.; SCHENKEN, R. S. Mesothelial cell-associated hyaluronic acid promotes adhesion of endometrial cells to mesothelium. **Fertil. Steril.**, v. 76, p. 1012-8, 2001.

DEFRÈRE, S.; LOUSSE, J. C.; GONZALEZ-RAMOS, R.; COLETTE, S.; DONNEZ, J.; VAN LANGENDONCKT, A. Potential involvement of iron in the pathogenesis of peritoneal endometriosis. **Mol. Hum. Reprod.**, v. 14, p. 377-75, 2008.

DEFRÈRE, S.; LOUSSE, J. C.; COLETTE, S.; DONNEZ, O.; DONNEZ, J. Insights into iron and nuclear factor-kappa B(NF-Kb) involvement in chronic inflammatory processes in peritoneal endometriosis. **Histol. Histopathol.**, v. 26, p. 1083-92, 2011.

D'HOOGHE, T. M.; BAMBRA, C. S.; CORNILLIE, F. J.; ISAHAKIA, M.; KONINCKX, P. R. Prevalence and laparoscopic appearance of spontaneous endometriosis in the baboon (*Papio anubis*, *Papio cynocephalus*). **Biol. Reprod.**, v. 45, p. 411-416, 1991.

FAÚNDES, A.; CECATTI, J. G. A. Operação cesárea no Brasil. Incidência, tendências, causas, consequências e propostas de ação. **Cad. Saúde Pública**, v. 7, n. 2, 1991.

FU, G.; CHE, X, SUN, Y.; HUANG, X.; XU, H.; ZHOU, C.; ZHANG, X. Pigment epithelial-derived factor expression in endometriotic lesions in a rat model of endometriosis. **Acta Histochemica**, v. 115, p. 301-307, 2013.

FUNK, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. **Science**, v. 294, p. 1871-5, 2001.

GARCIA-VELASCO, J. A.; ARICI, A. Interleukin-8 stimulates the adhesion of endometrial stromal cells to fibronectin. **Fertil. Steril.**, v. 72, p. 336-40, 1999.

GHOSH, S.; MAY, M. J; KOPP, E. B. NF-kB and rel proteins: evolutionary conserved mediators of immune responses. **Ann. Rev. Immunol.**, v. 16 p. 225-60, 1998.

GLEICHER, N.; DMOWSKI, W. P.; SIEGEL, I.; LIU, T. L.; FRIBERG, J.; RADWANSKA, E. Lymphocyte subsets in endometriosis. **Obstet. Gynecol.**, v. 63, p. 463-6, 1984.

GOLAN, A.; WINSTON, R. M.; DARGENIO, R. Experimental endometriosis: a microsurgical animal model in rats. **Isr. J. Med. Sci.**, v. 20, p. 1094-1096, 1984.

GONZALEZ-RAMOS, R.; VAN LANGENDONCKT, A.; DEFRÈRE, S.; LOUSSE, J. C.; METTLER, M.; GUILLET. Agents blocking the nuclear factor-kappaB (NF-kB) pathway are affective inhibitors of endometriosis in an in vivo experimental model. **Gynecol. Obstet. Invest.**, v. 65, p. 174-86, 2008.

GONZALEZ-RAMOS, R.; VAN LANGENDONCKT, A.; DEFRÈRE, S.; LOUSSE, J. C.; COLETTE, S.; DEVOTO, L. Involvement of the nuclear factor-kB pathway in the pathogenesis of endometriosis. **Fertil. Steril.**, v. 94, p. 1985-94, 2010.

GONZALEZ-RAMOS, R; DEFRÈRE, D.; DEVOTO, L. Nuclear factor-kappaB: a main regulator of inflammation and cell survival in endometriosis pathophysiology. **Fertil Steril**, v. 98, n. 3, 2012.

GRÜMMER, R.; SCHWARZER, F.; BAINCZYK, K.; HESS-STUMPP, H.; REGIDOR, P. A.; SCHINDLER, A. E.; WINTERHAGER, E. Peritoneal endometriosis: validation of an in vivo model. **Hum. Reprod.**, v. 16, p. 1736-1743, 2001.

GRÜMMER, R. Animals Models in Endometriosis Research. **Hum. Reprod. Update**, v. 12, n. 5, p. 641-649, 2006.

GUO, S. W. Nuclear factor-kB (NF-kB): an unsuspected major culprit in the pathogenesis of endometriosis that is still at large? **Gynecol. Obstet. Invest.**, v. 63, p. 71-97, 2007.

HALME, J.; HAMMOND, M. G.; HULKA, J. F.; RAJ, S. G.; TALBERT, L. M. Retrograde menstruation in healthywomen and in patientswith endometriosis. **Obstet. Gynecol.**, v. 64, p. 151-4, 1984.

HILL, J. A.; FARIS, H. M. P.; SCHIFF, I.; ANDERSON, D. J. Characterization of leukocyte subpopulations in the peritoneal fluid of women with endometriosis. **Fertil. Steril.**, v. 50, p. 216-22, 1988.

HORTON, J. D.; DEZEE, K. J.; AHNFELDT, E. P.; WAGNER, M. Abdominal Wall Endometriosis: a Surgeon's Perspective and Review of 445 cases. **Am. J. Surg.**, v. 196, p. 207-212, 2008.

HUANG, J. C.; LIU, D. Y.; YADOLLAHI, S.; WU, K. K.; DAWOOD, M. Y. Interleukin-1 beta induces cyclooxygenase-2 gene expression in cultured endometrial stromal cells. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 83, p. 538-41, 1998.

JABBOUR, H. N.; Sales, K. J.; Smith, O. P.; Battersby, S.; Boddy, S. C. Prostaglandin receptors are mediators of vascular function in endometrial pathologies. **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 252, p. 191-200, 2006.

JACKSON, L. W.; SCHISTERMAN, E. F.; DEY-RAO, R.; BROWNE, R.; ARMSTRONG, D. Oxidative stress and endometriosis. **Hum. Reprod.**, v. 20, n. 7, p. 2014-2020, 2005.

JAVERT, C. T. The spread of benign and malignant endometrium in the lymphatic system with a note of coexisting vascular involvement. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 64, p. 780-806, 1952.

JACKSON, K. S.; BRUDNEY, A; HASTINGS, J. M.; MAVROGIANIS, P. A.; KIM, J. J.; FAZLEABAS, A. T. Thealtered distribution of the steroid hormone receptors and the chaperone immunophilin FKBP52 in a baboon model of endometriosis associated with progesterone resistance during the window of uterine receptivity. **Reprod. Sci.**, v. 14, p. 137-50, 2007.

JI, X.; GAO, J.; CAI, X.; LU, W.; HU, C.; WANG, Z.; CHENG, X.; GU, Z.; WAN, G.; ZHANG, S.; CAO, P. Immunological regulation of Chinese herb Guizhi Fuling Capsule on rat endometriosis model. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, p. 624-629, 2011.

JOÃO NETO, N.; TORRES, O. J. M.; COELHO, T. M.; JOEL JÚNIOR, N. N. N.; AGUIAR, G. C.; COSTA, L. K.A. Evaluation of the macroscop growth degree of experimental endometriosis in rats. **Acta Cir. Bras.**, v. 22, supplement 1, 2007.

JONES, R. C. The effect of a luteinizing hormone releasing hormone(LRH) agonist (Wy-40,972), levonorgestrel, danazol, and ovariectomy on experimental endometriosis in the rat. **Acta Endocrinol. (Copenh)**, v. 106, p. 282-288, 1984.

JUBANYIR, K. J. Comite, F. Extrapelvic endometriosis. **Obstet. Gynecol. Clin. North Am.**, v. 24, p. 411-40, 1997.

KAO, L. C.; GERMEYER, A.; TULAC, S. Expression profiling of endometrium from women with endometriosis reveals candidate genes for disease-based implantation failure and infertility. **Endocrinology**, v. 144, p. 2870-81, 2003.

KARCK, U.; REISTER, F.; SCHAFFER, W. PGE2 and PGF2-alpha release by human peritoneal macrophages in endometriosis. **Prostaglandins**, v. 51, n. 1, p. 49-60, 1996.

KEENAN, J. A.; BOYCE, P. K. W.; MASSEY, P. J.; CHEN, T. T.; CAUDLE, M. R.; BUKOVSKY, A. Regression of endometrial explants in a rat model of endometriosis treated with the immune modulators loxoribine and levamisole. **Fertil. Steril.**, v. 72, n. 1, 1999.

KELLER, N. R.; SIERRA-RIVERA, E.; EISENBERG, E.; OSTEN, K. G. Progesterone exposure prevents matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) stimulation by interleukin-1alpha in human endometrial stromal cells. **J Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 85, p. 1611-9, 2000.

KIESEL, L. A.; RODY, A.; GREB, R. R.; SZILÁGYI, A. Clinical use of GnRH analogues. **Clin. Endocrinol.**, v. 56, p. 677-87, 2002.

KITAWAKI, J.; KADO, N.; ISHIHARA, H.; KOSHIBA, H.; KITAOKA, Y.; HONGO, H. Endometriosis: the pathophysiology as an estrogen-dependent disease. **J. Stereoid Biochem. Mol. Biol.**, v. 83, p. 149-155, 2003.

KNUPP, V. M. A. O.; MELO, E. C. P.; OLIVEIRA, R. B. Distribuição do parto vaginal e da Cesariana no município do Rio de Janeiro no período de 2001 a 2004. **Esc. Anna Nery Rev. Enferm.**, v. 12, n. 1, p. 39-44, 2008.

KNUTSON, M.; WESSLING-RESNICK, M. Iron metabolism in the reticuloendothelial system. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, v. 38, p. 61-88, 2003.

LEBOVIC, D. I.; MUELLER, M.D.; TAYLOR, R. N. Immunobiology of endometriosis. **Fertil. Steril.**, v. 75, p. 1-10, 2001.

LEVANDER, G.; NORMANN, P. The pathogenesis of endometriosis: an experimental study. **Acta Obstet. Gynecol. Scand.**, v. 34, p. 366-98, 1955.

LIU, B.; WANG, NING-NING; WANG, ZI-LIAN; HONG, SHAN-SHAN; LI, JIAN-TAO; DING, HUI-JUAN; PAN, QIU-HUI; DONG, YU; ZHOU, CAN-QUAN; ZHUANG, GUANG-LUN. Improved nude mouse models for green fluorescence human endometriosis. **J. Obstet. Gynaecol. Res.**, v. 36, n. 6, p. 1214-1221, 2010.

LIU, D. T. Y.; HITCHCOCK, A. Endometriosis: its association with retrograde menstruation, dysmenorrhoea and tubal pathology. **Br. J. Obstet. Gynaecol.**, v. 93, p. 859-62, 1986.

LOUSSE, J. C.; VAN LANGENDONCKT, A.; GONZALEZ-RAMOS, R.; DEFRÈRE, S.; RENKIN, E.; DONNEZ, J. Increased activation of nuclear factor-kappaB (NF-kB)



in isolated peritoneal macrophages of patients with endometriosis. **Fertil. Steril.**, v. 90, p. 217-20, 2008.

LOUSEE, J. C.; DEFRÈRE, S.; COLETTE, S.; VAN LANGENDONCKT, A.; DONNEZ, J. Expression of eicosanoid biosynthetic and catabolic enzymes in peritoneal endometriosis. **Hum. Reprod.**, v. 25, p. 734-41, 2010.

MAAS, J. W. M.; LE NOBLE, F. A. C.; DUNSELMAN, G. A.J. The chick embryo chorion allantoic membrane as a model to investigate the angiogenic properties of human endometrium. **Gynecol. Obstet. Invest.**, v. 48, p. 108-112, 1999.

MACKENZIE, W. F.; CASEY, H. W. Animal model of human disease. Endometriosis. Animal model: endometriosis in rhesus monkeys. **Am. J. Pathol.**, v. 80, p. 431-344, 1975.

McLAREN, J.; PRENTICE, A.; CHARMOCK-JONES, D. S.; SMITH, S. K. Vascular endothelial growth factor (VEGF) concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis. **Hum. Reprod.**, v. 11, p. 220-3, 1996a.

McLAREN, J.; PRENTICE, A.; CHARMOCK-JONES, D. S.; MILLICAN, S. A.; MULLER, K. H.; SHARKEY, A. M. Vascular endothelial growth factor is produced by peritoneal fluid macrophages in endometriosis and is regulated by ovarian steroids. **J. Clin. Invest.**, v. 11, p. 482-9, 1996b.

MEDEIROS, F. C.; CAVALCANTE, D. I. M.; MEDEIROS, M. A. S.; ELEUTÉRIO JR, J. Fine-Needle Aspiration in Cytology of Scar Endometriosis: study of seven cases and literature review. **Diagn. Cytopathol.**, v. 39, n.1, p. 1-4, 2010.

MEDEIROS, F.C.; VASCONCELOS, D. L. Endometriose. In: Magalhães, M. L. C; Medeiros, F. C; Pinheiro, L. S. **Ginecologia baseada em problemas**. Fortaleza: LCR; 2011. 470 p.

MEIRELLES, M.; LOSANO, R.; VIANA, A. de Toledo. Endometrioma de cicatriz: estudo de 14 casos. **Arq. Med. Hosy Fac. Cienc. Med.**, v. 50, n. 3, p. 92-96, 2005.

METZGER, D. A.; HANEY, A. F. Etiology of endometriosis. **Obstet. Gynecol. Clin. North Am.**, v. 16, n. 1, 1989.

MICHAEL, M. D.; KILGORE, M. W.; MOROHASHI, K.; SIMPSON, E. R. Ad4BP/SF-1 regulates cyclic AMP- induced transcription from the proximal promoter (PII) of the human aromatase P450 (CYP19) gene in the ovary. **J. BiolChem.**, v. 270, p. 13561-6, 1995.

MICHAEL, M. D.; MICHAEL, L. F.; SIMPSON, E. R. A CRE-like sequence that binds CREB and contributes to cAMP-dependent regulation of the proximal promoter of the human aromatase P450 (CYP19) gene. **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 134, p.147-56, 1997.

MOHAMMADZADEH, A.; HEIDARI, M.; SOLTANGHORAEE, H.; JEDDI-TEHRANI, M.; NOVIN, M. G.; AKHONDI, M. M. A.; ZERAATI, H.; MOHAMMADZADEH, F.

Evaluation of the effect of pentoxifylline on white blood cell count in serum and peritoneal fluid in female rats with endometriosis. **J. Obstet. Gynaecol. Res.**, v. 34, n. 3, p. 307-313, 2008.

NAP, A. W.; GRIFFIOEN, A. W.; DUNSELMAN, G. A.; BOUMA-TER STEEGE, J. C.; THIJSSSEN, V. L.; EVERS, J.L. Antiangiogenesis therapy for endometriosis. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 89, p. 1089-1095, 2004.

NOBLE, L. S.; TAKAYAMA, K.; ZEITOUN, K. M.; PUTMAN, J. M.; JOHNS, D. A.; HINSHELWOOD, M. M. Prostaglandin E2 stimulates aromatase expression in endometriosis-derived stromal cells. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 82, p. 600-6, 1997.

OLIKER, A. J.; HARRIS, A. E. Endometriosis of the bladder in a male patient. **J Urol.**, v.106, p.858-9, 1971.

OLIVEIRA, G. M. M. Antiagregantes plaquetários. **Rev. SOCERJ**, v. 14, n. 1, p. 21-27, 2001.

O'NEILL, L. A. J.; KALTSCHIMDT, C. NF-Kb: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. **TINS**, v. 20, p. 252-8, 1997.

OOSTERLYNCK, D. J.; CORNILLIE, F. J.; WAER, M.; VANDEPUTTE, M.; KONINCKX, P. R. Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. **Fertil. Steril.**, v. 56, p. 45-51, 1991.

OSTEEN, K. G; KELLER, N. R.; FELTUS, F. A.; MELNER, M.H. Paracrine regulation of matrix metalloproteinase expression in the normal human endometrium. **Gynecol. Obstet. Invest.**, v. 48, p. 2-13, 1999.

PATOLOMED. **Inflamação aguda X Inflamação crônica**. Disponível em: <<http://patolomed.blogspot.com.br/2009/09/inflamacao-aguda-x-inflamacao-cronica.html>>. Acesso em: 19 jul. 2013.

QUEREDA F.; BARROSO, J.; ACIEN, P. Individual and combined effects of triptoreline and gestrinone on experimental endometriosis in rat. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, v. 67, p. 35-40, 1996.

RANA, N.; BRAUN, D. P.; HOUSE, R. Basal and stimulated secretion of cytokines by peritoneal macrophages in Women with endometriosis. **Fertil. Steril.**, v. 65, n. 6, p. 925-930, 1996.

RODGERS, W. H.; OSTEEN, K. G.; MATRISIAN, L. M.; NAVRE, M.; GIUDICE, L. C.; GORSTEIN, F. Expression and localization of matrilysin, a matrix metalloproteinase, in human endometrium during the reproductive cycle. **Am J. Obstet. Gynecol.**, v. 168, p. 253-60, 1993.

SALAMONSEN, L. A.; WOOLLEY, D. E. Matrix metalloproteinases in normal menstruation. **Hum. Reprod.**, v. 11, p. 124-33, 1996.

SCHOR, E.; FREITAS, V. de; SOARES JUNIOR, J. M.; SIMÕES, M. de J.; BARACAT, E. C. Endometriosis: modelo experimental em ratas. **R.B.G.O.**, v. 21, n. 5, p. 281-284, 1999.

SCHRODT, G. R.; ALCORN, M. O.; IBANEZ, J. Endometriosis of the male urinary system: a case report. **J. Urol.**, v. 124, p. 722-3, 1980.

SELI, E.; BERKKANOGLU, M.; ARICI, A. Pathogenesis of endometriosis. **Obst. Gynecol. Clin. North Am.**, v. 30, p. 41-61, 2003.

SEMPR. **Progesterona – Atualização e novas perspectivas**. Reunião de Protocolo apresentado em 09/11/2007. Disponível em: <<http://www.sempr.org.br/pdfs/progesterona.pdf>>. Acesso em: 20 jul. 2013.

SHARP-TIMMS, K. L. Using rats as a research model for the study of endometriosis. **Ann N Y Acad Sci**, v. 955, p. 318-327, 2006.

SHE, H.; XIONG, S.; LIN, M.; ZANDI, E.; GIULIVI, C.; TSUKAMOTO, H. Iron activates NF-kappaB in Kupffer cells. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 283, p. 719-26, 2002.

SIMPSON, E. R.; MAHENDROO, M. S.; MEANS, G. D.; KILGORE, M. W.; HINSHELWOOD, M. M.; GRAHAM-LORENCE, S. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. **Endocr. Rev.**, v. 15, p. 342-55, 1994.

SURREY, E. S.; HALME, J. Effect of peritoneal fluid from endometriosis patients on endometrial stromal cell proliferation in vitro. **Obstet. Gynecol.**, v. 76, p. 792-7, 1990.

TAMURA, M.; SEBASTIAN, S.; YANG, S.; GURATES, B.; FANG, Z.; BULUN, S. E. Interleukin-1beta elevates cyclooxygenase-2 protein level and enzyme activity via increasing its mRNA stability in human endometrial stromal cells: an effect mediated by extracellularly regulated kinase 1 and 2. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 87, p. 3263-73, 2002a.

TAMURA, M.; SEBASTIAN, S.; GURATES, B.; YANG, S.; FANG, Z.; BULUN, S. E. Vascular endothelial growth factor up-regulates cyclooxygenase-2 expression in human endothelial cells. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 87, p. 3504-7, 2002b.

UCHIIDE, I.; IHARA, T.; SUGMATA, M. Pathological evaluation of the rat endometriosis model. **Fertil. Steril.**, v. 78, n. 4, 2002.

VAN LANGENDONCKT, A.; CASANAS-ROUX, F.; DONNEZ, J. Iron overload in the peritoneal cavity of women with pelvic endometriosis. **Fertil. Steril.**, v. 78, p. 712-8, 2002a.

VAN LANGENDONCKT, A.; CASANAS-ROUX, F.; DONNEZ, J. Oxidative stress and peritoneal endometriosis. **Fertil. Steril.**, v. 77, p. 861-70, 2002b.

VERNON, M. W.; WILSON, E. A. Studies on the surgical inductions of endometriosis in the rats. **Fertil. Steril.**, v. 44, n. 5, p. 684-7, 1985.

VISCOMI, F. A.; DIAS, R.; DE LUCA, L.; DE FRANCO, M. F.; IHLENFELD, M. F. K. Correlação dos Aspectos Laparoscópicos com as Alterações Histológicas Glandulares das Lesões Endometrióticas peritoneais. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 50, n. 3, p. 344-8, 2004.

WANG, C. C.; XU, H.; MAN, G. C. W.; ZHANG, T.; ON CHU, K.; CHU, Y. C.; CHENG, J. T. Y.; LI, G.; HE, X. Y.; QIN, L.; LAU, T. S.; KWONG, J.; CHAN, T. H. Prodrug of green tea epigallocatechin-3-gallate (Pro-EGCG) as a potente anti-angiogenic agent for endometriosis in mice. **Angiogenesis**, v. 16, p. 59-69, 2013.

WARD, R. J.; WILMET, S.; LEGSSYER, R.; CRICHTON, R.R. The influence of iron homoeostasis on macrophage function. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 30, p. 762-5, 2002.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiol. Rev.**, v. 83, p. 835-870, 2003.

WILSON, T.J.; HERTZOG, P. J.; ANGUS, D.; MUNNERY, L.; WOOD, E. C.; KOLA, I. Decreased natural killer cell activity in endometriosis patients: relationship to disease pathogenesis. **Fertil. Steril.**, v. 62, p. 1086-8, 1994.

WITZ, C. A.; MONTOYA-RODRIGUES, I. A. B. S.; SCHENKEN, R. S. Whole Explants of Peritoneum and Endometrium: a novel model of the early endometriosis lesion. **Fertil. Steril.**, v. 71, n.1, 1999.

WITZ, C. A.; MONTOYA-RODRIGUES, I. A. B. S.; SCHENKEN, R. S. Short term culture of peritoneum explants confirms attachment of endometrium to intact peritoneal mesothelium. **Fertil. Steril.**, v.75, p. 385-90, 2001.

WU, M.Y.; YANG, J. H.; CHAO, K. H.; HWANG, J. L.; HO, H.N. Increase in the expression of killer cell inhibitory receptors on peritoneal natural killer cells in women with endometriosis. **Fertil. Steril.**, v. 74, n. 6, p. 1187-1191, 2000.

XU, H.; LUI, W. T.; CHU, C. Y.; NG, P. S.; WANG, C. C.; ROGERS, M.S. Anti-angiogenic effects of green tea catechin on an experimental endometriosis mouse model. **Hum. Reprod.**, v. 24, n. 3, p. 608-618, 2009.

YAMAMOTO, Y.; GAYNOR, R. B. Therapeutic potential of inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway in the treatment of inflammation and cancer. **J. Clin. Invest.**, v. 107, p. 135-42, 2001.

YIN, M. J.; YAMAMOTO, Y.; GAYNOR, R. B. The anti-inflammatory agents ASA and salicylate inhibit the activity of I ( $\kappa$ )B kinase-beta. **Nature**, v. 396, p. 77-80, 1998.

ZANDI, E.; ROTHWART, D. M.; DELHASE, M.; HAYAKAWA, M.; KARIN, M. The I $\kappa$ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK $\alpha$  and IKK $\beta$ , necessary for I $\kappa$ B phosphorylation and NF- $\kappa$ B activation. **Cell**, v. 91, p. 243-52, 1997.

ZEITOUN, K.; TAKAYAMA, K.; SASANO, H.; SUZUKI, T.; MOGHRABI, N.; ANRESON, S. Deficient 17- $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in endometriosis: failure to metabolize 17- $\beta$ -estradiol. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 83, p. 4474-80, 1998.

ZELLER, J. M.; HENIG, I.; RADWANSKA, E.; DMOWSKI, W. P. Enhancement of human monocyte and peritoneal macrophage chemiluminescence activities in women with endometriosis. **Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.**, v. 13, p. 78, 1987.

## ANEXO



Universidade Federal do Ceará  
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA  
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE  
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

## DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação n° 21/2011, sobre o projeto intitulado: “**IDEALIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UM MODELO DE ENDOMETRIOSE SUBCUTÂNEA EM RATAS PARA O ESTUDO DE EFEITO DE DROGAS E DE FISIOPATOLOGIA**”, de responsabilidade do Prof. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 29 de agosto de 2011.

Fortaleza, 03 de outubro de 2011

Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar  
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA