

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**ENVOLVIMENTO DE ÓXIDO NÍTRICO,
PROSTAGLANDINAS E FATOR DE NECROSE
TUMORAL NO DESENVOLVIMENTO DE IMPLANTES
ENDOMETRIAIS ECTÓPICOS (PERITONEAIS) E SUAS
REPERCUSSÕES SOBRE A DOR E INFERTILIDADE
EM RATAS**

Francisco das Chagas Medeiros

Fortaleza - Ceará

2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**ENVOLVIMENTO DE ÓXIDO NÍTRICO, PROSTAGLANDINAS E FATOR DE
NECROSE TUMORAL NO DESENVOLVIMENTO DE IMPLANTES
ENDOMETRIAIS ECTÓPICOS (PERITONEAIS) E SUAS REPERCUSSÕES
SOBRE A DOR E INFERTILIDADE EM RATAS**

FRANCISCO DAS CHAGAS MEDEIROS

TESE APRESENTADA À COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
FARMACOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ - UFC, PARA A OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE DOUTOR EM FARMACOLOGIA

ORIENTADOR: PROF. DR. RONALDO DE ALBUQUERQUE RIBEIRO

FORTALEZA - CEARÁ

2005

Esta tese foi submetida como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Doutor em farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se a disposição dos interessados na Biblioteca central da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta tese é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas de ética científica de citação.

Francisco das Chagas Medeiros

Tese aprovada em: 03 de fevereiro de 2005

Banca examinadora:

Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro
Universidade Federal do Ceará
(Orientador)

Profa. Dra. Ana Maria Sampaio Assreuy
Universidade Estadual do Ceará

Prof. Dr. Fernando Queiroz Cunha
Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto

Prof. Dr. Francisco Valdeci Almeida Ferreira
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao
Universidade Federal do Ceará

Este trabalho foi realizado com suporte financeiro da Funcap, CAPES e CNPq.

Dedicado a

Angelina

Aline

Alice

AGRADECIMENTOS

É difícil manifestar adequadamente com palavras meu testemunho de gratidão para com os amigos e colegas que tanto contribuíram para a realização deste trabalho. Podemos citar os nomes, entretanto, seria impossível captar a extensão e a importância da ajuda e lealdade de cada um.

Detrás de cada um de nós, há aqueles que nos fazem, que é nossa mão direita e muitas vezes as duas, assim como foi, e é **Angelina**, fonte constante de apoio e estímulo não só no que se referia à amizade, coleguismo, lealdade, mas também pelo valor inestimável de sua contribuição, imprescindível na realização do meu labor e da minha vida.

Ao **Prof. Dr. Ronaldo Albuquerque Ribeiro** que pos o seu Laboratório a minha disposição, me tangendo no caminho dessa hipótese, agradeço.

Ao **Prof. Dr. Fernando Cunha**, colaborador constante e de ajuda preciosa em parte dessa pesquisa e nas críticas construtivas que fez, fará, na banca de minha avaliação.

Ao **Prof. Dr. V. S. N. Rao** (Incentivador da minha carreira universitária, não sei se boa ou ruim, mas deleitosa), pela bondade e simplicidade de por à minha disposição seus vastos conhecimentos científicos, mas principalmente humanísticos que me fizeram repensar a ciência e a vida, desde o meu Mestrado.

Ao **Prof. Dr. Odorico de Moraes**, sempre crítico e incentivador, que contribuiu sobremaneira para a minha formação e me proveu de seu Laboratório para o desenvolvimento de parte dos meus afazeres e agora como crítico e avaliador do todo.

Ao **Prof. Dr. Dalgimar Beserra de Menezes**, pela mente crítica e lógica somada à clareza “inglesa”, com que me expressou seus conceitos e por ter realizado as avaliações histopatológicas.

Ao **Mardhem, Eugenio Giffoni** e especialmente ao **Bené (Benedito Arruda Carneiro Filho)**, ex-alunos, agora todos colegas e que tanto me ajudaram nessa lida de anos, minha eterna gratidão.

Dou meus agradecimentos mais sinceros, ao **Prof. Dr. Eilson Góes**, que me propiciou alguns momentos ao seu lado, na lida do aprendizado estatístico pelo simples interesse de ensinar.

A muitos de meus amigos que me brindavam amavelmente com sua ajuda inestimável: **Bento Francisco, Prof. Dr. Clielder, Prof. Dr. Carlos Maurício, Prof. Dr. Krishnamurti, Prof. Dr. Manassés Fonteles**, e a todos que desinteressadamente me ajudaram, minha eterna gratidão.

Ao **Prof. Dr. Manuelito Almeida**, o primeiro que me trouxe a esse ambiente físico (Departamento de Fisiologia e Farmacologia).

Aos **Professores Doutores Ana Maria Sampaio e Francisco Valdeci Almeida** pelas avaliações como participantes da banca.

Em memória, ao **Prof. Dr. Carlos Alberto Flores**.

SUMÁRIO

RESUMO	xvii
ABSTRACT	xviii
1. Introdução	1
1.1. Hormônio-dependência da endometriose.....	5
1.2. Endometriose e prostaglandinas	9
Ciclo-oxigenases 1 e 2	14
1.3. Imunopatologia da endometriose	21
1.4. Fatores de crescimento relacionados com a endometriose	27
1.5. Fator de necrose tumoral, Interleucinas e endometriose	37
1.6. Possível papel do óxido nítrico na endometriose	42
OBJETIVOS	47
MATERIAIS E MÉTODOS	48
Animais	48
O Modelo de Endometriose - Técnica	48
Controle falso-operados	49
Evolução dos implantes endometrióticos	49
Testes para verificação da dor - Teste Nociceptivo	53
Efeitos sobre a fertilidade - Efeito sobre a fertilidade de ratas intactas.....	53
Efeitos de drogas sobre a fertilidade de ratas tratadas cronicamente	54
Efeitos de algumas drogas sobre o implante endometriótico peritoneal.....	54
Atividade da sintase de óxido nítrico no tecido endometrial ectópico	55
Ensaio do conteúdo de TNF- α no líquido peritoneal	55
Efeitos de drogas sobre o edema uterino e sobre a proliferação celular em ratas imaturas	56
Drogas utilizadas	56
ANALISE ESTATÍSTICA	56
RESULTADOS	58
BLOCO 1. Revalidação do modelo de endometriose por transplantes de endométrio ao peritônio	59

1. 1.	Evolução dos implantes peritoneais de endométrio (endometriomas), macroscopia e microscopia	60
1. 2.	Evolução dos transplantes peritoneais de endométrio dependente tempo	61
1. 3.	Efeito do desenvolvimento dos transplantes peritoneais de endométrio sobre a fertilidade	63
1. 4.	Efeito do desenvolvimento dos transplantes peritoneais de endométrio sobre a nocicepção	63
Bloco 2	Papel de metabolitos da ciclo-oxigenase 1 e 2 (COX-1 E COX-2) no desenvolvimento de implantes ectópicos (peritoneais) de endométrio em ratas e suas repercussões sobre a dor e a fertilidade.....	67
2. 1.	Drogas e tratamentos	68
2. 2.	Papel de metabolitos da ciclo-oxigenase 1 e 2 (COX-1 E COX-2) no desenvolvimento de implantes ectópicos (peritoneais) de endométrio em ratas.	68
2. 3.	Efeito do tratamento com inibidores seletivos relativos de COX-1 e COX-2 sobre os eventos reprodutivos em ratas intactas e ratas com transplante peritoneal de endométrio	72
2. 3. 1.	Efeito do tratamento com inibidores seletivos relativos de cox-1 e cox-2 sobre os eventos reprodutivos em ratas intactas	72
2. 3. 2.	Efeito do tratamento com inibidores seletivos relativos de COX-1 e COX-2 sobre os eventos reprodutivos em ratas com transplante peritoneal de endométrio	75
2. 3. 3.	Efeito do tratamento com drogas inibidoras relativas de COX-1 e COX-2 sobre o edema uterino induzido por estradiol em ratas imaturas	78
2. 3. 4.	Efeito do tratamento com drogas inibidoras relativas de COX-1 e COX-2 sobre a proliferação celular uterina induzido por estradiol em ratas imaturas	78
2. 4.	Efeito da impantação peritoneal de endométrio em ratas sobre a resposta nociceptiva induzida por ácido acético intraperitoneal em animais controle e tratados com inibidores seletivos relativos de COX-1 e COX -2.....	82
Bloco 3.	Implicação do óxido nítrico sobre o transplante peritoneal de endométrio em ratas e suas repercussões. Sobre a dor e a fertilidade.....	84

3. 1.	Efeitos da modulação da Óxido nítrico-sintase (L-name e L-Arginina) sobre a evolução (desenvolvimento) do transplante peritoneal de endométrio em ratas.....	85
3. 2.	Efeitos da modulação da Óxido nítrico-sintase (L-name e L-Arginina) sobre a fertilidade de ratas com transplantes peritoneais de endométrio	86
3. 3.	Efeitos da modulação da Óxido nítrico-sintase (L-name) sobre a Nocicepção (contorções abdominais induzidas com ácido acético) de ratas intactas e sobre ratas com transplantes peritoneais de endométrio.....	88
3.4.	Expressão da NO-sintase em implantes peritoneais de endométrio (endometriomas) em ratas.....	90
Bloco 4.	Envolvimento de TNF alfa sobre o desenvolvimento de implantes ectópicos peritoneais de endométrio em ratas e suas repercussões sobre a dor e a fertilidade.....	91
4. 1	Drogas utilizadas	92
4. 2.	Efeitos de drogas moduladoras do Fator de Necrose Tumoral sobre o crescimento (desenvolvimento) do transplante peritoneal de endométrio em ratas.....	92
4. 3.	Efeito dose-dependente da da pentoxifilina (PTX; 2,5; 10 e 30mg/Kg) sobre o crescimento (desenvolvimento) do implante peritoneal de endométrio em ratas.....	94
4. 4.	Efeito da talidomida (1,0; 2,5; e 5,0 mg/Kg) sobre o crescimento (desenvolvimento) do implante peritoneal de endométrio em ratas.....	95
4. 5.	Efeitos de drogas moduladoras do Fator de Necrose Tumoral (talidomida e pentoxifilina) sobre a fertilidade de ratas intactas.....	95
4. 6	Efeito da Pentoxifilina (2,5; 10 e 30mg/Kg) sobre os eventos reprodutivos em ratas com implante peritoneal de endométrio.....	99
4. 7.	Efeito da Pentoxifilina sobre o edema e proliferação celular uterinos em ratas imaturas.....	99
4. 8.	Efeito da Talidomida sobre o edema e proliferação celular uterinos em ratas imaturas	104

4. 9.	Níveis tempo-dependente do TNF- α no líquido peritoneal (obtido por lavagem) de ratas intactas, ratas com implantes peritoneais de endométrio não tratadas e tratadas com drogas inibidoras do TNF- α (Talidomida e Pentoxifilina).....	107
4. 10.	Efeito da impantação peritoneal de endométrio sobre a resposta nociceptiva induzida por ácido acético intraperitoneal em animais controle e tratados com pentoxifilina	109
4. 11.	Atividade da sintase de óxido nítrico no tecido endometrial ectópico tratado com pentoxifilina	111
	DISCUSSÃO	113
	CONCLUSÕES	141
	REFERÊNCIAS	144

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURAS	PAGINA
1 Fisiopatologia da endometriose, dependência hormonal e crescimento do endometrioma	8
2 Fisiopatologia da endometriose.	20
3 Fisiopatologia da dismenorréia em mulheres com endometriose	21
4 Fisiopatologia da endometriose. Possíveis mecanismos da endometriose dependentes do TNF e Interleucinas	37
5 Etiologia e Histogênese da endometriose.	41
6 Hipóteses para a implantação e progressão de implantes endometrióticos	42
7 Modelo esquemático de endometriose em ratas Wistar (Transplante peritoneal de endométrio)	50
8. Técnica cirúrgica do transplante peritoneal de endométrio em ratos	51
9 Macroscopia de lesão induzida por transplante peritoneal de endométrio.....	60
10 Blocos histológicos corados em hematoxilina e eosina demonstrando glândulas e estroma endometriais, cistificados.....	61

11	Crescimento tempo-dependente de autotransplantes de endométrio no peritônio de ratas como modelo de endometriose.....	62
12	Efeito do desenvolvimento dos transplantes peritoneais de endométrio sobre a fertilidade (número de implantações ovulares por corno uterino)	64
13	Efeito do desenvolvimento dos transplantes peritoneais de endométrio sobre a fertilidade (percentagem de rata grávidas) .	65
14	Efeito do desenvolvimento dos transplantes peritoneais de endométrio sobre a nocicepção (contorções abdominais).....	66
15	Efeito do tratamento com drogas inibidoras relativas de COX-1 e COX-2 sobre o crescimento (desenvolvimento) de transplantes peritoneais de endométrio em ratas	70
16	Efeito do tratamento com drogas inibidoras relativas de COX-1 e COX-2 sobre o desenvolvimento de transplantes peritoneais de endométrio em ratas (percentagem de variação)	71
17	Efeito do tratamento com drogas inibidoras relativas de COX-1 e COX-2 sobre a fertilidade de ratas intactas (número de implantes ovulares por rata)	73
18	Efeito do tratamento com drogas inibidoras relativas de COX-1 e COX-2 sobre a fertilidade de ratas intactas (percentagem de ratas grávidas).....	74
19	Efeito do tratamento com drogas inibidoras relativas de COX-1 e COX-2 sobre a fertilidade de ratas com transplantes peritoneais de endométrio (percentagem de ratas grávidas)	76
20	Efeito do tratamento com drogas inibidoras relativas de COX-1 e COX-2 sobre a fertilidade de ratas com transplantes peritoneais de endométrio (número de implantes ovulares por corno uterino).....	77
21	Efeito do tratamento com drogas inibidoras relativas de COX-1 e COX-2 sobre o edema uterino induzido por estradiol em ratas imaturas.....	80
22	Efeito do tratamento com drogas inibidoras relativas de COX-1 e COX-2 sobre a proliferação celular uterina induzido por estradiol em ratas imaturas.....	81

23	Efeito do tratamento com drogas inibidoras relativas de COX-1 e COX-2 sobre a dor (nocicepção, contorções abdominais) de ratas com transplantes peritoneais de endométrio.....	83
24	Efeitos da modulação da Óxido nítrico-sintase (L-name) sobre a Nocicepção (contorções abdominais induzidas com ácido acético) de ratas intactas e sobre ratas com transplantes peritoneais de endométrio	89
25	Expressão da NO-sintase induzida e constitutiva em implantes peritoneais de endométrio (endometriomas) em ratas	90
26	Efeitos de drogas moduladoras do Fator de Necrose Tumoral sobre o crescimento (desenvolvimento) do transplante peritoneal de endométrio em ratas.....	93
27	Efeito dependente da dose de Pentoxifilina (PTX; 2,5; 10 e 30mg/Kg) sobre o crescimento (desenvolvimento) do implante peritoneal de endométrio (endometrioma) em ratas.....	94
28	Efeito da talidomida (um inibidor da produção de TNF sobre o desenvolvimento de endometriomas (transplantes peritoneais de endométrio) em ratas.....	96
29	Efeito de inibidores do TNF- α (talidomida e pentoxifilina) sobre a fertilidade de ratas intactas (número de implantações ovulares por animal).....	97
30	Efeito de inibidores do TNF- α (talidomida, 5 mg/Kg v. o. e pentoxifilina 30 mg/Kg sc) sobre a fertilidade de ratas intactas (Porcentagem de ratas grávidas)	98
31	Efeito da Pentoxifilina sobre o edema uterino em ratas imaturas.....	102
32	Efeito da Pentoxifilina sobre a proliferação celular uterina em ratas imaturas	103
33	Efeito da Talidomida sobre o edema uterino em ratas imaturas .	105
34	Efeito da Talidomida sobre o edema e proliferação celular uterinos em ratas imaturas.....	106
35	Efeito da implantação peritoneal de endométrio sobre a resposta nociceptiva induzida por ácido acético intra-peritoneal em animais controle e tratados com Pentoxifilina.....	110
36	Atividade da sintase de óxido nítrico no tecido endometrial ectópico controle e tratado com pentoxifilina	112

37	Modelos de interação entre as vias da NO-sintase e ciclo-oxigenase na inflamação	127
38	Papel do Óxido nítrico na regulação dos vários processos reprodutivos	130

LISTA DE QUADROS

QUADRO		pagina
1.	Fatores de crescimento relacionados com a endometriose ...	34-36

LISTA DE TABELAS

TABELA		pagina
1	Efeitos da modulação da óxido nítrico-sintase com L-Nitroarginina metilester (L-name) e L-Arginina sobre a evolução (desenvolvimento) do transplante peritoneal de endométrio em ratas	86
2	Efeito da modulação do óxido nítrico sobre a implantação ovular em ratas com implantes peritoneais de endométrio (endometriose)	87
3	Efeito da Pentoxifilina (PTX) sobre a percentagem de ratas grávidas e sobre o número médio de implantes embrionários em ratas com implantes peritoneais de endométrio	101
4	Níveis tempo-dependente do TNF- α no líquido peritoneal (obtido por lavagem) de ratas intactas, ratas com implantes endometrióticos peritoneais não tratadas (controle) e tratadas com drogas inibidoras do TNF- α (Talidomida e Pentoxifilina) ..	108

ABREVIATURAS

EGF = Fator de crescimento epidérmico.

PDGF = O fator de crescimento derivado de plaquetas.

MDGF = Fatores de crescimento derivados de macrófagos

E₂ = Estradiol

P = Progesterona

ER = Receptor de estrogênio

PR = Receptor de progestágenos

RNA_m = Ácido ribonucleico mensageiro

ER-WT = Receptor de estrógeno do tipo wild

PRL = Prolactina

TXB₂ = Tromboxano B₂

PGs = Prostaglandina (s)

MØs = Macrófagos

TNF- α = Fator de necrose tumoral alfa

IL-1 = Interleucina 1

GM-CSF = Fator estimulante de colônia de macrófago-granulócito

IGF I = (*insulin-like growth factor*) = Fator de crescimento insulina-simile I.

IGF-II = Fator de crescimento insulina-simile II.

RAFS = Associação de Fertilidade Americana Revisada (Classificação de endometriose)

LP = Líquido peritoneal

PBM = Esfregaço de sangue periférico

NK = células assassinas naturais (

CD57+CD16+ = sub-séries de NK moderadamente diferenciadas das células NK em sangue periférico.

CD4+ e CD8+ = sub-séries de linfócitos

Células T = são células inflamatórias (Th1 inflammatory cells)

VEGF = Fator de crescimento endotelial vascular

LPS = Lipopolisacarídeo

KDR (*kinase domain receptor*) = Receptor do domínio kinase
COX-2 = Ciclooxygenase-2
COX-1 = Ciclooxygenase-1
PLA₂ = Fosfolipase A₂
ER-E5SV = Receptor de estrogênio, variante "splicing" exon 5
6-ceto-PGF1 alfa = um metabólito da PGI₂.
PGI₂ = Prostaglandina GI₂
IL-1 = Interleucina 1
IL-2 = Interleucina 2
IL-5 = Interleucina 5
IL-6 = Interleucina 6
IL-8 = Interleucina-8
IL-10 = Interleucina 10
rIL-6 = Receptor de Interleucina 6
EPA = ácido eicosapentaenóico
IFN-gama = Interferon gama.
GM-CSF = Fator estimulante de colônia granulócito macrófago
M-CSF = fator estimulante de colônia macrófago
RANTES = Citocina com potente atividade quimiotática para monócitos em humanos
cNOS = Sintase de óxido nítrico constitutiva
iNOS = Sintase de óxido nítrico indutível

ABSTRACT

INVOLVMENT OF NITRIC OXIDE, PROSTAGLANDINS AND TUMOR NECROSIS FACTOR ON THE DEVELOPMENT OF ECTOPIC ENDOMETRIAL IMPLANTS (PERITONEAL) AND ITS REPERCUSSIONS ON PAIN AND FERTILITY IN RATS.

Francisco das Chagas Medeiros. Dissertation presented to the Department of Physiology and Pharmacology, School of Medicine, Federal University of Ceará as a partial fulfillment for the requirement of the degree of doctorate. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro (M.D.; PhD). Fortaleza, 2005.

Endometriosis is a disease characterized by the presence of endometrial glands and stroma out of the uterine cavity and of the myometrium. It may cause tumor, pain (chronic pelvic pain, dyspareunia and dysmenorrhea) and infertility. Currently available evidence indicates that endometrial cells misplaced during menses into the peritoneal cavity in women with endometriosis, implant and proliferate in the ectopic locations, an action that is associated with mobilization of the immune cells into the peritoneal cavity and a profound local and systemic immune response. An increase in the amount of peritoneal fluid is a characteristic finding in endometriosis and associated with improved presence of immune cells like macrophages as well as a wide range of soluble substances derived from those macrophages like prostaglandins, interleukins, TNF, growth factors and reactive oxygen species. It is likely the role of medication for this disease will expand in the future. Also the mechanisms of all these substances must be elucidated in the pathogenesis of endometriosis. The purpose of this study is to verify: (i) the drugs effects that selectively inhibits one of the enzymes ciclooxigenase type 1 (COX-1) responsible for the physiologic events of the organism and the induced COX-2, involved in the inflammatory process; (ii) the effects of L-NAME, a competitive antagonist of nitric oxide as well as NO synthase activity assayed by ³H-labelled citrulline from labelled L-arginine and (iii) the effects of TNF-alfa modulating drugs (Thalidomide and pentoxifylline) on the development of experimental endometriosis and on its related pain and infertility in female rats. Experimental endometriosis was developed in female Wistar rats and the animals were divided into tests groups. The treatment was given from the 5th to the 14th day of endometriosis induction to verify the effects on growth of endometriomas evaluated by its wet weight and histopathology and acutely 30 minutes before the nociceptive stimulus in order to evaluating pain (writhing test) and fertility was assessed through the percentage of pregnant rats. Aspirin (30mg/kg - an inhibitor of intermediate selectivity among COXs); piroxicam (1mg/kg) and indomethacin (2mg/kg), specific selective inhibitors of COX-1 and nabumetone (5 and 15mg/kg) and meloxicam (0.4mg/kg) relative selective inhibitors against COX-2 were used per os. All the accomplished treatments decreased significantly the pain as evaluated by the writhing test. The mean wet weights of the endometriomas (g%) were as shown [Endo control: 0.595 ± 0.085; Aspirin: 0.122 ± 0.019; piroxicam: 0.766 ± 0.35; indomethacin: 2.058 ± 0.96 and for Nabumetone 5mg: 0.252 ± 0.032; Nabumetone 15mg: 0.135 ± 0.03 and meloxicam: 0.387 ± 0.04]. As to fertility, the percentage of pregnant animals were as follows: Endo control, 40%; intact control, 100%; Sham operated, 100%; Indomethacin, Zero%; meloxicam, 60%; Aspirin, 60% and Nabumetone 5 and 15, 50 e 58% respectively. The treatments with Aspirin and Nabumetone had decreased the development of the endometriomas significantly as well as contributed to the relief of the pain and increasing fertility. These results suggest the role of COX-1 and -2 in the pathophysiology of endometriosis related pain, fertility and on its growth. NO synthase activity assayed by ³H-labelled citrulline from labelled L-arginine. The nitric oxide synthase was expressed as pmol of citrulline/mg protein/min. The endometriomas expressed iNOS at the: 5th day: 1.94 ± 0.5; 10th day: 2.46 ± 0.2 and day 15: 1.17 ± 0.3 as well as cNOS that decreased in a time-dependent way (5th day: 2.48 ± 0.7; 10th day: 1.8 ± 0.19; and day 15: 0.78 ± 0.3). This decreasing activity of cNOS was probably found by the endometrial shedding that occurs normally in the course of this disease as well as by the fibrosis that surrounds the endometriomas and the increasing iNOS by the inflammatory peritoneal and tissue reaction that is frequently found in endometriosis. The use of L-NAME also decreased the wet weight of endometriomas as well as ameliorates the pain and fertility in a dose dependent fashion. Pentoxifylline (30mg/Kg/day) administered subcutaneously for 10 consecutive days during the established phase of endometriosis (days 5-14 post induction) was effective in decreasing the expression of nitric oxide synthase, both induced and constitutive. The results of the present study as those previously shown suggest the involvement of nitric oxide in the development of

experimental endometriosis. TNF- α modulating drugs proved to reduce the mean weights of endometrial implants, obtained at day 15 of endometriosis induction with pentoxifylline (30 mg/Kg), thalidomide (5mg/Kg) and dexamethasone (0.2mg/Kg) treated rats (control: $0.595 \pm 0.085\text{g}\%$; pentoxifylline: $0.06 \pm 0.008\text{g}\%$; thalidomide: $0.206 \pm 0.049\text{g}\%$ and dexamethasone: $0.145 \pm 0.02\text{g}\%$). The results of the present study suggest the involvement of TNF- α in the pathophysiology of experimental endometriosis. The peritoneal levels of TNF- α evaluated in intact rats showed $28.95 \pm 1.18\text{ng}$ of TNF- α /ml. The levels of TNF- α increased in the peritoneal fluid in a time dependent way after the peritoneal implant (endometriotic rat). These drugs also attenuated pain and increased fertility.

RESUMO

ENVOLVIMENTO DE ÓXIDO NÍTRICO, PROSTAGLANDINAS E FATOR DE NECROSE TUMORAL NO DESENVOLVIMENTO DE IMPLANTES ENDOMETRIAIS ECTÓPICOS (PERITONEAIS) E SUAS REPERCUSSÕES SOBRE A DOR E INFERTILIDADE EM RATAS.

Francisco das Chagas Medeiros, Tese apresentada ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará para a obtenção do título de Doutor. Orientador: Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro. Fortaleza, 2005.

Endometriose é uma doença caracterizada pela presença de glândulas e estroma endometriais fora da cavidade uterina e do miométrio. Clinicamente pode causar tumores, dor (dor pélvica crônica, dispareunia e dismenorréia) e infertilidade. Evidências correntes indicam que as células endometriais ectópicas durante a menstruação (menstruação retrógrada) jogadas a cavidade peritoneal em mulheres com endometriose, implantam e proliferam ectopicamente no peritônio e em outros órgãos, uma ação que está associada com a mobilização de células do sistema imune para a cavidade peritoneal e com uma profunda resposta imune e local. Um aumento na quantidade do líquido peritoneal é um achado característico na endometriose e está associado com a presença aumentada de células imunes como os macrófagos assim como um sem número de substâncias solúveis derivadas daqueles macrófagos como prostaglandinas, interleucinas, TNF, fatores de crescimento e espécies reativas de oxigênio. É provável por isso que novas medicações para essa doença evoluam no futuro próximo, para isso devem-se elucidar os mecanismos de todas essas substâncias na patogênese da endometriose. Os objetivos desse trabalho são verificar: (i) os efeitos de drogas inibidoras seletivas da enzima ciclooxigenase tipo 1 (COX-1) responsável pelos eventos fisiológicos do organismo e pela induzida COX-2, envolvida nos processos inflamatórios; (ii) os efeitos do L-NAME, um antagonista competitivo do óxido nítrico assim como a atividade da NO-sintase avaliada pelo ensaio da citrulina marcada (³H-labelled citrulline from labelled L-arginine) e (iii) os efeitos das drogas moduladoras de TNF-alfa (Talidomida e pentoxifilina) sobre o desenvolvimento da endometriose experimental e suas repercussões sobre a dor e a fertilidade em ratas. Endometriose experimental foi desenvolvida em ratas Wistar e os animais foram divididos em grupos testes. O tratamento foi dado do 5^o ao 15^o dia da indução da endometriose para verificar os efeitos sobre o crescimento dos endometriomas avaliados pelo peso úmido e histopatologia e agudamente 30 minutos antes do estímulo nociceptivo para avaliar a dor (contorções abdominais) e a fertilidade investigada pela percentagem de ratas grávidas e pelo número de embriões por corno uterino. Aspirina (30mg/kg - um inibidor de seletividade intermediária entre as COXs); piroxicam (1mg/kg) e indometacina (2mg/kg), um inibidor seletivo específico da COX-1 e nabumetona (5 e 15mg/kg) e meloxicam (0,4mg/kg) inibidor seletivo relativo da COX-2 foram usados por via oral. Todos os tratamentos realizados diminuíram significativamente a dor quando avaliadas pelo teste de contorções. A média dos pesos úmidos dos endometriomas (g%) são mostrados (Controle endometriose: 0,595±0,085; Aspirina: 0,122±0,019; piroxicam: 0,766±0,35; indometacina: 2,05±0,96 e para Nabumetona 5mg: 0,52±0,032; Nabumetona 15mg: 0,135±0,03 e meloxicam: 0,387±0,04). Com relação à fertilidade, a percentagem de ratas grávidas foi: Controle endometriose, 40%; controle intacto, 100%; Falso-operado, 100%; Indometacina, Zero%; meloxicam, 60%; Aspirina, 60% e Nabumetona 5 e 15, 50 e 58% respectivamente. Os tratamentos com Aspirina e Nabumetona diminuíram significativamente o desenvolvimento dos endometriomas assim como contribuíram para o alívio da dor e incrementaram a fertilidade. Estes resultados sugerem o papel da COX-1 e -2 na fisiopatologia da dor relacionada a endometriose assim como a infertilidade e o crescimento dos endometriomas. A atividade da sintase de óxido nítrico realizada através da citrulina marcada dada em pmol de citrullina/mgxproteína/min é expressa nos endometriomas. A iNOS no 5^o dia: 1,94±0,5; 10^o dia: 2,46±0,2 e no dia 15: 1,17±0,3 assim como com a cNOS que diminui de forma tempo-dependente (5^o dia: 2,48±0,7; 10^o dia: 1,8±0,19; e dia 15: 0,78±0,3). Essa diminuição da atividade da cNOS é provavelmente devida a descamação endometrial que ocorre normalmente com a evolução da doença assim como devida a fibrose que circunda os endometriomas e o aumento da iNOS pelo processo inflamatório peritoneal encontrado na endometriose. O uso do L-NAME também fez diminuir os pesos úmidos dos endometriomas assim como melhorou a fertilidade e aliviou a dor de forma dose-dependente. A Pentoxifilina (30mg/Kg/day) administrada entre o 5^o e o 14^o dia da indução da endometriose foi efetiva na diminuição da expressão da sintase de óxido nítrico, ambas constitutiva como induzida. Os resultados desse estudo sugerem o envolvimento do óxido nítrico no desenvolvimento da

endometriose experimental assim como nas suas repercussões: dor e infertilidade. Os níveis peritoneais de TNF- α em ratas intactas foram de $28,95 \pm 1,18$ ng/ml. Os níveis de TNF- α aumentaram no líquido peritoneal de ratas endometrióticas de forma tempo dependente. Drogas que modulam o TNF foram efetivas em reduzir o crescimento de endometriomas experimentais: Controle: $0,595 \pm 0,085$ g%; pentoxifilina (30 mg/Kg): $0,06 \pm 0,008$ g%; talidomida (5mg/Kg): $0,20 \pm 0,049$ g% e dexametasona (0,2mg/Kg): $0,145 \pm 0,02$ g%. Essas drogas também aliviaram a dor e incrementaram a fertilidade. Esses resultados sugerem o envolvimento do TNF na fisiopatologia da endometriose.

INTRODUÇÃO

Endometriose é definida histologicamente pela presença de tecido endometrial em localização ectópica, fora do miométrio. Tradicionalmente, os patologistas têm requerido a presença de ambas glândulas e estroma com evidência de ciclicidade menstrual (presença de hemorragia tecidual ou macrófagos envoltos em hemossiderina, hemossiderófagos) para estabelecer firmemente o diagnóstico. Clinicamente não se tem um padrão sintomatológico consistente, os sintomas presentes tendem a inespecificidade e muitas pacientes são assintomáticas. A tríade sintomática mais encontrada é aquela da infertilidade, dor (dismenorréia, dor pélvica crônica) e massa pélvica (cistos ovarianos, endometriomas e outros órgãos lesionados). Infertilidade é a queixa que mais freqüentemente leva a mulher à procura de orientação médica. A proporção de mulheres com infertilidade que apresenta endometriose chega a 30% ou mais. A dor pélvica é o sintoma mais comum da endometriose, sendo a dismenorréia progressiva secundária o tipo mais freqüente, podendo também surgir disúria, urgência miccional e disquezia entre outras (**COUTINHO ET AL. 1995**). A prevalência de endometriose na literatura até os dias de hoje varia largamente entre 1 e 50% baseado em séries cirúrgicas estudadas. Desde que o diagnóstico de endometriose requer um procedimento operatório (laparotomia exploradora ou laparoscopia), a estimativa da prevalência varia com a sintomatologia da mulher que requer esse método diagnóstico (dor pélvica crônica, infertilidade, mioma uterino, laparotomias ginecológicas, etc), daí a prevalência observada variar abundantemente com a indicação da avaliação, o tipo de procedimento cirúrgico realizado, e a experiência do cirurgião na identificação das lesões. Em uma revisão da prevalência de endometriose entre laparotomias ginecológicas, a taxa na população geral foi de 1,3%. Na população infértil ela alcançava níveis de cerca de 15 a 25%, sendo um achado laparoscópico muito freqüente (cerca de 75% de todas as laparoscopias). Prevalência ainda maior tem sido relatada entre pacientes com endometriose relacionada com infertilidade, variando de 20 a 66%. (NISOLLE & DONNEZ, 1997)

Mais de um século se passou desde a descrição original da endometriose por VON ROKITANSKI em 1860 e ainda não sabemos com certeza a patogênese dessa doença. Uma revisão completa da patogênese da endometriose requer uma visita à teoria histogenética e fatores críticos ao crescimento e manutenção da mesma. As pesquisas mais antigas dirigiam-se ao entendimento da histogênese. Hoje os investigadores objetivam pesquisas sobre os fatores de crescimento e outros mecanismos etiológicos que possam contribuir para o desenvolvimento dessa desordem.

Três teorias histogenéticas da endometriose dominam o pensamento corrente: a teoria original de que a endometriose desenvolvia-se através de transformação metaplásica das células do peritoneu pélvico (metaplasia celômica de SAMPSON, 1927) a segunda teoria da histogênese sustenta que o endométrio seja transplantado para localizações ectópicas (linfática, vascular e iatrogênica); a terceira teoria - conhecida como a teoria da indução - é a combinação das duas primeiras, e revela que substâncias desconhecidas liberadas do endométrio descamado induzem a um mesênquima indiferenciado para formar tecido endometriótico.

Independente da teoria histogenética, fatores adicionais devem ser responsáveis pela expressão e manutenção da doença. A menstruação retrógrada é um fenômeno consistente bem estabelecido com ambos os modelos de transplante ou de indução de endometriose. Além do grau do fluxo menstrual retrógrado, outros fatores podem contribuir para a iniciação da doença. Uma resposta imune alterada ou uma reação à lesão tecidual pode resultar na incapacidade de remoção dos debrís menstruais que refluíram pela trompa para a cavidade peritoneal, portanto aumentando a possibilidade da endometriose. Anormalidades da citotoxicidade mediada pela célula-T, da atividade da célula "*Natural Killer*", das funções da célula-B e deposição de complemento tem sido descritas em mulheres com endometriose (HALME ET AL. 1987).

Uma vez localizado ectopicamente, o endométrio deve ser mantido e o crescimento deve ser estimulado para que a endometriose ocorra. Em geral os implantes endometrióticos deveriam comportar-se como endométrio normal, tópico com relação à resposta aos hormônios, com estrogênios estimulando o crescimento e agentes progestacionais inibindo-o. Entretanto, o que se observa é que implantes endometriais ectópicos freqüentemente comportam-se de uma forma aberrante e imprevisível. Grande parte dos implantes endometrióticos não apresenta as alterações histológicas cíclicas do endométrio tópico. O propósito do tratamento hormonal da endometriose tem sido a criação de um *milieu* endócrino abaixo do ideal para a manutenção do endométrio ectópico, resultando na regressão e reabsorção dos implantes, entretanto pouco se conhece ainda sobre as condições hormonais que suportam a iniciação e manutenção dos implantes endometriais. A função cíclica dos implantes endometriais ectópicos tem sido mostrada em estudos em humanos e em primata. Por outro lado, um número grande de evidências contra-argumentam, desde que o endométrio ectópico tem pouca capacidade de responder a estímulos hormonais. Estudos de microscopia ótica e eletrônica falharam em demonstrar alterações histológicas que se correlacionem com o endométrio tópico correspondente. Um contra-argumento forte foi demonstrado em um estudo de receptores hormonais em endométrios tópicos e ectópicos, onde foi encontrada uma menor concentração de receptores estrogênicos e progestagênicos em tecido endometriótico ectópico comparado ao tecido tópico (SELI ET AL. 2003).

A possibilidade de que o desenvolvimento e progressão da endometriose estejam associados com “função imune” anormal é a hipótese mais recente para a etiologia da doença. Nos últimos 10 a 15 anos, vários dados têm sugerido alterações da imunidade celular e humoral em mulheres com endometriose. Se esse fator imunológico é uma causa separada ou um fator sinérgico para uma ou mais causas é o que deve ser estabelecido. *Há, entretanto, pouca dúvida de que o processo imunológico exerce uma peça importante no desenvolvimento e progressão da doença* (LEBOVIC ET AL. 2002; SELI ET AL. 2003).

Uma variável importante é o papel dos fatores de crescimento. Em roedores, o fator de crescimento epidérmico (EGF), O fator transformador de crescimento- α e receptores para EGF têm sido demonstrados em endométrios tópicos e ectópicos. O EGF, o fator de crescimento insulina-símile I e hormônio do crescimento estimulam o crescimento de células estromais endometriais humanas “*in vitro*”. O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) tem levado a proliferação de células estromais endometriais humanas de forma dose-dependente. Finalmente fatores de crescimento derivados de macrófagos (MDGF) aumentam a proliferação de células estromais endometriais com estimulação máxima do crescimento quando MDGF e estrogênios estão ambos presentes no meio de cultura. Tais dados sugerem que uma combinação de fatores, incluindo os hormonais além do número e capacidade secretora de células residentes peritoneais, devam ser requeridas para a sustentação do crescimento do endométrio ectópico e, portanto, induzir a uma endometriose clínica. (MEDEIROS, 1992; MEDEIROS ET AL. 1999, LEBOVIC ET AL. 2002)

Hoje em dia, endometriose é vista como sendo uma doença herdada poligenicamente, de etiologia complexa e multifatorial (OLIVE & SCHWARTZ, 1993).

Discorre-se, para um melhor entendimento, os variados tópicos da fisiopatologia da endometriose referente ao nosso trabalho e suas repercussões clínicas e ou "deixas" a pesquisa.

1. 1. DEPENDÊNCIA HORMONAL DA ENDOMETRIOSE

Endometriose tem sido considerada até os dias de hoje como hormônio-dependente pelo fato de dificilmente ser diagnosticada antes da menarca, ser rara após a menopausa e tender a diminuir durante a gravidez. Em modelos

animais de endometriose, o tecido endometrial cirurgicamente transplantado não requer suporte hormonal para a implantação, mas necessita de estradiol (E_2) e/ou progesterona (P) para sua manutenção (DIZEREGA ET AL. 1980). A manipulação do meio ambiente hormonal (esteróides sexuais, E_2 e P) é até o momento os fundamentos da conduta médica da endometriose. Evidências recentes, entretanto, indicam que a endometriose apresenta uma diferenciação histológica heterogênea em resposta às mudanças hormonais, os achados histológicos do endométrio ectópico são freqüentemente discordantes daqueles do endométrio tópico.

Os tecidos endometrióticos possuem receptores estrogênicos, progestagênicos e androgênicos (COUTINHO ET AL. 1995). Num estudo por KAUPPILA ET AL. (1987), onde foram avaliados 80 espécimes de tecido de 71 pacientes não tratadas e estabelecendo o diagnóstico de endometriose, receptores de estrógeno e de progestagênio foram encontrados em 70% dos implantes, só receptores de progestágenos, em 24% dos implantes e nenhum receptor em 6% dos implantes. Além disso, a concentração de receptores no tecido ectópico foi muito menor que a concentração correspondente no endométrio eutópico.

O tecido endometrial demonstra também uma variação grande de desenvolvimento que caminha desde glândulas de má diferenciação até bem diferenciadas. A microscopia eletrônica mostra que essa variação no desenvolvimento morfológico ocorre tanto entre glândulas como dentro da mesma glândula. Glândulas pobremente diferenciadas, que não mostraram resposta às mudanças hormonais, foram encontradas em 25% dos implantes endometrióticos. Esses tecidos endometrióticos pobremente diferenciados não responderam ao danazol, enquanto aqueles bem diferenciados responderam muito bem (COUTINHO ET AL. 1995; BERGQVIST ET AL. 1985; METZGER ET AL. 1993; e NISOLLE E DONNEZ, 1997).

BERGQVIST & FERNO (1993) mostraram que lesões endometrióticas primárias (não recorrentes), ambos receptores de estrogênio (ER) e de

progéstágenos (PR), apresentaram-se significativamente em menores quantidades que no endométrio tópico. Nas lesões recorrentes, os níveis de ER no citosol foram significativamente menores que no endométrio, mas não houve diferenças significativas com relação aos PRs. No tecido endometriótico, os níveis de receptores de progesterona foram significativamente maiores na endometriose recorrente que no tecido primário, mas não houve diferença com relação aos ERs. Os ERs foram significativamente menores no endometrioma ovariano mas não na endometriose peritoneal comparado com o endométrio normal. Não houve diferença quanto aos receptores de progesterona. Esse estudo mostrou, portanto que os níveis de ER e PR na endometriose primária e recorrente são diferentes e pode indicar que diferentes mecanismos de regulação podem ocorrer nos diferentes estágios da doença.

AUDE BÉLIAR ET AL. (2004) mostraram que há menos receptores de esteróides no tecido endometriótico ectópico que no endométrio tópico e discute que a endometriose ovariana apresenta diferentes achados biológicos quando comparada a endometriose peritoneal, daí a diversidade de achados nesse sentido.

NISOLLE E DONNEZ (1997) com o objetivo de analisar a atividade proliferativa de endométrios eutópicos e ectópicos através do ciclo menstrual e suas correlações com a quantidade de receptores esteróides, mostraram por imunohistoquímica que no endométrio normal, o índice de proliferação glandular era maior na fase proliferativa quando comparado com a fase secretora e nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os endométrios ectópicos e eutópicos, exceto durante a fase secretora tardia, quando a atividade proliferativa estava ainda presente no tecido endometriótico. O índice de proliferação foi semelhante no endometrioma ovariano, no endométrio ectópico e eutópico. No endométrio normal, as concentrações mais altas de receptores de estrógeno e de progesterona ocorreram nas células epiteliais e estromais durante a fase proliferativa tardia do ciclo menstrual. Os ERs e PRs declinam na fase secretora. No endométrio ectópico, PR persiste no epitélio glandular durante a fase secretora tardia e os

ERs persistiram tanto no estroma como no epitélio nessa mesma fase do ciclo quer em lesões ovarianas, como em lesões petequiais vermelhas. Esses resultados mostram que pode haver diferentes mecanismos de controle de proliferação no endométrio ectópico.

A expressão do RNAm do receptor de estrogênio, variante "splicing" exon 5 (ER-E5SV) para as propriedades dominantes e para o potencial metastático dos cânceres ginecológicos, tem sido estudado por FUJIMOTO ET AL. (1995) que analisaram as implicações biológicas da expressão do RNAm do ER-E5SV e do receptor de estrógeno do tipo wild (ER-WT) no endométrio normal e no endométrio ectópico, desde que esse último conserve a implantação e potencial de disseminação semelhante aos tumores. O ER-WT encontrava-se diminuído na segunda fase do ciclo menstrual, mas não no tecido endometriótico, portanto aqueles autores concluíram que a cascata do ER-WT deveria estar parcialmente desorganizada. Os níveis de RNAm para o ER-E5SV no tecido endometriótico era menor que no endométrio normal tópico, independente da fase do ciclo menstrual, mas não variava de fase para fase do ciclo. Esse "status", segundo aqueles autores, pode resultar em uma resposta incompleta aos esteróides endógenos, e contribuir para o potencial da implantação e disseminação da endometriose.

A regulação hormonal do tecido endometriótico é claramente diferente do endométrio tópico, portanto não nos surpreendemos pelo fato de algumas pacientes não responderem à terapia hormonal. A terapia hormonal pode abrandar a doença, mas não a erradica e os sintomas de recorrência são comuns após a descontinuação da medicação.

A figura 1 demonstra a fisiopatologia da endometriose como dependente hormonalmente do estradiol (E_2), da progesterona (P_4) e da prolactina (PRL) entre outros mecanismos (DIAMOND E OSTEEN, 1997).

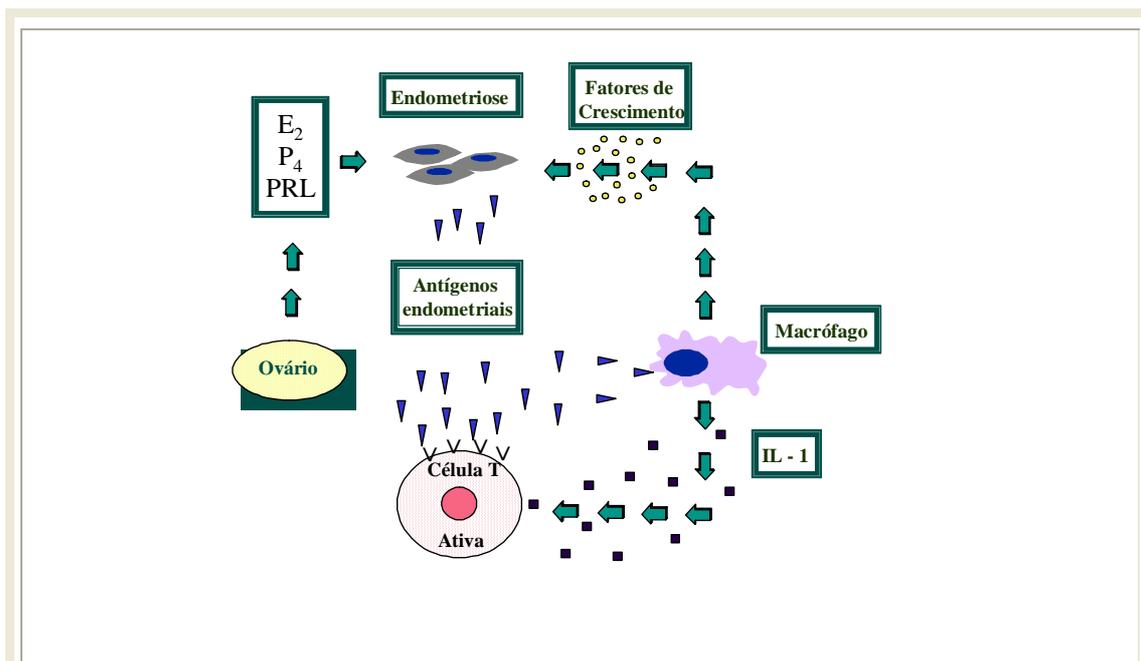


FIGURA 1. FISIOPATOLOGIA DA ENDOMETRIOSE, DEPENDÊNCIA HORMÔNAL E CRESCIMENTO DO ENDOMETRIOMA. O implante endometriótico depende basicamente da progesterona, de estrogênios e de prolactina. Observam-se ainda as interações com interleucina-1 derivada de macrófagos (dentre outros).

Mais recentemente, uma aberração molecular intrínseca nos implantes pélvicos da endometriose foi proposta como significativamente contribuinte para o desenvolvimento da endometriose – referindo-nos a expressão aberrante de aromatase, deficiência de 17 β -hidroxiesteróide dehidrogenase (17 β -HSD) tipo 2 e resistência às ações protetoras da progesterona. Sendo a endometriose uma doença estrogênio dependente, as alterações acima descritas são de extrema importância na fisiopatologia da endometriose (BULUN ET AL. 2000).

Outras teorias sobre a manutenção do endométrio ectópico surgem, assim como explicações para a sua fisiopatologia da dor e da infertilidade (que comumente acontecem em humanos), e entre estas, as prostaglandinas e mais recentemente os fatores imunológicos e toda a sua cascata de fatores de crescimento (HALME ET AL. 1983 a e b).

1. 2. ENDOMETRIOSE E PROSTAGLANDINAS

Não existe nenhuma explicação aceita universalmente para os sintomas da endometriose, mas fatores peritoneais locais municiam uma explicação e sugerem um papel importante para os macrófagos, seus produtos de secreção, incluindo interleucinas, fatores de crescimento e prostaglandinas (PGs).

As PGs estão envolvidas provavelmente na etiologia da endometriose desde a sua patogênese, quando J. A. SAMPSON (1927) propôs a teoria da menstruação retrógrada que foi "justificada" por VIJAYAKUMAR E WALTERS (1983) como ocorrendo contrações miométriais provocadas pelas PGs produzidas durante a menstruação e em consequência levando ao regurgitamento tubário de *debrís* menstruais à cavidade peritoneal.

As PGs apresentam um sem número de ações bioquímicas que poderiam ser imputadas a si um papel importante na gênese, função e sintomatologia da endometriose, entretanto isso ainda precisa ser provado consistentemente (HURST E ROCK, 1991). Macrófagos peritoneais ativados estão provavelmente presentes e em número aumentado em mulheres com endometriose e são capazes de secretar prostaglandinas, dessa forma, influenciando na proliferação endometriótica. Macrófagos (MØs) ativados são capazes de secretar uma variedade de moléculas reguladoras, tais como TNF- α e interleucinas que, por seu turno, interagem de várias formas com as PGs. Por exemplo, O TNF- α é capaz de aumentar a adesão das células estromais endometriais a células mesoteliais peritoneais em cultura. As Prostaglandinas, o ácido aracdônico e as interleucinas podem também estar envolvidos na estimulação de proliferação fibroblástica e deposição de colágeno, provavelmente através da geração de radicais livres. Esses achados podem contribuir para escarificação peritoneal e formação de aderências, comuns nas mulheres acometidas de endometriose. O papel das PGs no processo inflamatório indica que ela pode contribuir para a dor de origem peritoneal e de tecidos profundos na endometriose. O possível envolvimento de leucotrienos é desconhecido. Sem dúvida, numerosas interações entre moléculas estão envolvidas na patogênese da endometriose e isso pode ser particularmente complexo com respeito ao mecanismo da infertilidade, por exemplo. Até o

momento, todos esses mecanismos são especulativos e muito provavelmente as PGs fazem parte dessa cascata de interações, certamente como intermediários ou moduladores mais do que efetores primários (FRASER, 1992).

A dor pélvica é considerada o sintoma mais comumente associado à endometriose. Vários autores indicam que entre 30 e 80% de pacientes com dor pélvica crônica apresentam endometriose (FEDELE ET AL. 1990 e KONINCKX ET AL. 1991). Além disso, 70% das pacientes com endometriose se queixam de dismenorréia e 30%, de dor pélvica intermenstrual e dispareunia severa (FEDELE ET AL. 1992).

Sabe-se que o endométrio ectópico secreta PGs e que esta secreção está associada intimamente aos macrófagos. Ambos PGs e mediadores inflamatórios secretados por esses macrófagos, tais como fatores de crescimento, fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina 1 (IL-1), podem mediar o processo inflamatório levando ao dano tecidual e a fibrose, resultando em dor pélvica, entre outras conseqüências (CHRISTMAN ET AL. 1992).

Antiprostaglandínicos, bastante utilizados por pacientes endometrióticas só melhoram parcialmente a dismenorréia associada a endometriose, entretanto, essas drogas são usadas como teste terapêutico e seu uso é justificado quando a dor pélvica for devida à produção de PGs quer pelo tecido endometriótico, quer pelos macrófagos ativados. Infelizmente, essas drogas não são efetivas em modificar sintomas tais como dor intermenstrual e dispareunia, e não teriam qualquer efeito sobre a progressão da endometriose (VIGNALI, 1995).

A dor pélvica e a dismenorréia associada a endometriose ainda nos dias de hoje são mais comumente conduzidas com tratamento médico, tais como terapia supressiva hormonal e secundariamente ou menos freqüentemente com antiinflamatória não esteroideal de forma sintomática. Entretanto, uma porção significativa de pacientes não se aliviará da dor com o tratamento médico. A cirurgia está indicada para essas pacientes (ROCK, 1995).

As PGs e líquido peritoneal como mediadores da infertilidade associada a endometriose têm sido extensivamente avaliados. Estudos são contraditórios e as relações entre PGs e endometriose não têm sido nem confirmadas nem descartadas. A grande dificuldade na elucidação do papel das PGs na infertilidade associada a endometriose está na labilidade das mesmas e resultantes dificuldades na medição laboratorial dessas moléculas e de seus metabólitos. Outras variáveis parecem dificultar essa observação desde que implantes endometriais, macrófagos peritoneais e o próprio peritoneu são todos fontes de PGs (SCHENKEN ET AL. 1987), Além disso, existem diferenças significativas na produção de PGs pelos diferentes subtipos morfológicos de endometriose (VERNON ET AL. 1986).

Está determinado que as prostaglandinas estão envolvidas nos processos reprodutivos e que as mesmas podem irromper esse processo alterando o desenvolvimento folicular, a motilidade tubária e levando à disfunção do corpo lúteo por sua influência na implantação ovular como proposto por PITTAWAY E WENTZ em 1984.

Se não bastasse, as PGs podem estar envolvidas como mediadores inflamatórios e na resposta imune da endometriose. Estudos (em humanos) sobre prostaglandinas no líquido peritoneal suportam significativas diferenças entre pacientes com endometriose e pacientes controle, assim como metade das referências refuta essa hipótese. Estudos onde o líquido peritoneal foi colhido na fase lútea do ciclo menstrual mostraram-se uma tendência ao aumento dos níveis de PGs em mulheres com endometriose (BENEDETTO, 1989). BADAWEY ET AL. (1985) também controlando o período (no ciclo menstrual – fase lútea) de aspiração do líquido peritoneal mostraram que pacientes endometrióticas apresentam altas concentrações de prostaglandinas $F_{2\alpha}$ e E_2 só durante a fase lútea. Tromboxano B_2 (TXB_2) e 6-cetoprostaglandina $F_{1\alpha}$, produtos da degradação do tromboxano A_2 e prostaciclina estão aumentados ou não (ROCK ET AL. 1982). Estudos em animais também suportam que haja um aumento dos níveis de PGs no líquido peritoneal após indução cirúrgica da endometriose (SCHENKEN ET AL. 1984). Entretanto, o papel das prostaglandinas

na infertilidade associada a endometriose permanece controverso e especulativo.

Com relação a fosfolipase A_2 , não existem diferenças significativas na sua concentração entre os grupos controle e endometriótico no líquido peritoneal segundo UEKI ET AL. (1994), entretanto, SANO ET AL. (1994) encontraram pelo menos quatro tipos mensuráveis de fosfolipase A_2 (PLA_2) detectados nas células mononucleares peritoneais de mulheres submetidas à laparoscopia, duas delas cálcio dependentes e as outras duas, cálcio-independentes cujas atividades foram significativamente mais altas em mulheres endometrióticas que em controles normais.

O papel das PGs na dismenorréia de pacientes endometrióticas é pouco entendido, KOIKE ET AL. (1992) investigaram as relações entre a severidade da dismenorréia e a produção de PG em miométrio normal, adenomiose, ovário normal e cisto endometriótico e encontraram uma relação direta entre os níveis de 6-ceto-PGF $_{1\alpha}$ (um metabólito da PGI $_2$) teciduais e nos cistos endometrióticos assim como na adenomiose.

Esse estudo foi parcialmente repetido por KOIKE ET AL. (1994), que concluíram que a produção de PGs foi significativamente aumentada no tecido endometriótico que em outros tecidos, especialmente a 6-ceto-prostaglandina $F_{1\alpha}$ que foi o produto dominante na adenomiose. As diferenças na concentração de PGs também se correlacionaram com o sintoma dismenorréia, sendo maior nesses casos, e sugerem que o aumento na PGI $_2$ no tecido endometriótico parece induzir hiperalgesia durante a menstruação.

Os sintomas dolorosos da endometriose coincidem com a segunda fase do ciclo menstrual, daí SHARMA ET AL. (1994) medirem PGF $_{2\alpha}$ na fase médio-luteal e encontrarem um aumento nos níveis dessa prostaglandina nas mulheres com endometriose moderada quando comparadas a mulheres com pélvis normal. Encontraram ainda níveis abaixo do normal de PGE $_2$ e relações baixas de PGE $_2$ /PGF $_{2\alpha}$.

Tem-se repetidamente demonstrado que PGs estão relacionadas ao quadro dismenorréico das endometrióticas. DARGENIO ET AL. (1992) investigaram se o tratamento com antiprostaglandínicos melhoraria a fertilidade de ratas com endometriose induzida. Esse autor tratou os animais com indometacina no período pré ou pós-ovulatório. Quando dada no pré-ovulatório, a indometacina aumentou o número de implantações fetais e o índice de fecundidade. O tratamento pós-ovulatório não interferiu no número de implantações ovulares.

A associação de endometriose à infertilidade é bem conhecida, especula-se que a resposta inflamatória que acompanha a endometriose pode evitar a fertilização, o desenvolvimento embrionário ou sua implantação.

O ácido eicosapentaenóico (EPA) inibe a produção dos metabólitos do ácido aracdônico dependente da ciclo-oxigenase. YANO (1992) estudou os efeitos da suplementação dietética de EPA sobre os níveis de PGE₂, PGF_{2-alfa} e IL-1 no líquido peritoneal de coelhas endometrióticas. Os níveis de PGF_{2-alfa} peritoneal em coelhas endometrióticas foram menores que nos animais controle após o tratamento com EPA, não havendo diferenças significativas entre os outros mediadores inflamatórios.

CICLO-OXIGENASES 1 E 2

Prostaglandinas estão envolvidas em numerosos processos importantes na reprodução de mamíferos, inclusive no início da parturição. As prostaglandinas são sintetizadas a partir do ácido aracdônico pelas enzimas ciclo-oxigenases. Há duas isoformas dessas enzimas: ciclo-oxigenase 1 (COX-1), forma constitutiva e a COX-2, forma induzida. A COX-2 tem sido recentemente categorizada como um gene imediato-precoce e está associada ao crescimento e à diferenciação celular (TJANDRAWINATA ET AL. 1997).

CHARPIGNY ET AL. (1997) encontraram a expressão das duas isoformas de ciclo-oxigenases no útero de ovelhas pela técnica de Western blot e demonstraram que as duas isoformas exibiam diferentes padrões de expressão: COX-1 em níveis constantes no endométrio durante o ciclo estral e estágios comparáveis de gravidez; a COX-2, ao contrário, mostrava-se alta e transitoriamente expressa entre os dias 12 e 15 do ciclo estral e declinava daí em diante a níveis indetectáveis. O endométrio na gravidez precoce mostrava expressões similares da COX-2. Os estudos imuno-histoquímicos demonstraram que a COX-1 localizava-se tanto no epitélio como nas células estromais, enquanto que a COX-2 localizava-se exclusivamente no epitélio luminal e, em menor extensão, nas glândulas superficiais. O tratamento de ovariectomizadas com esteróides indicava que a expressão de COX-1 não se modificava, enquanto que a COX-2 era altamente induzida por tratamento com progesterona. O estradiol também aumentava a expressão dessa enzima, mas só após o uso de progestágenos. Esses resultados sugerem que a síntese de PG no útero é devida à indução da COX-2.

A síntese de prostaglandinas no útero ao termo gestacional é modulada pelas isoformas 1 e 2 das ciclo-oxigenases. DONG ET AL. (1996) caracterizaram a expressão da proteína para a COX-1 e -2 no útero de ratas e na cérvix durante o ciclo estral, gravidez e durante o trabalho de parto, assim como nas células miometriais cultivadas. Seus resultados indicaram que o útero da rata, o cervix e as células miometriais expressaram ambas as proteínas; e que durante a gravidez, tanto COX-1 como a COX-2 aumentam com pico máximo durante o trabalho de parto (em torno de 250%); indicaram ainda um aumento de duas vezes na COX-2 cervical é vista durante o trabalho de parto espontâneo; e que durante o pró-estro e estro, a expressão uterina da COX-2 está elevada; além disso, ambos COX-1 e -2 estiveram expressas nas células miometriais das ratas e o tratamento com IL-1 beta (10 ng/ml) produziu um significativo aumento na COX-2 e por fim estudos imunocitoquímicos mostraram que ambas COX-1 e -2 estavam primariamente localizadas nas células epiteliais do endométrio, nas células musculares lisas nas camadas circulares do miométrio e nas células epiteliais e musculares lisas do colo uterino. Concluíram que o aumento da

expressão de COX-2 pode estar envolvido na contratilidade uterina no termo e no amadurecimento do colo.

No roedor, um aumento da permeabilidade vascular uterina no sítio de aposição do blastocisto é um dos eventos mais precoces requeridos para o processo da implantação. Esse evento é precedido por um edema uterino generalizado que leva a um fechamento luminal e coincide com a reação de “atracamento” entre o trofotoderma e o epitélio luminal. Prostaglandinas vasoativas estão implicadas nesse processo. CHAKRABORTY ET AL. (1996) demonstraram que os genes da COX são diferentemente no útero de camundongo no período peri-implantação. Durante o período pré-implantação (dias 1 a 4), o gene da COX-1 estava expresso no epitélio uterino principalmente no dia 4 até a iniciação da reação de “atracamento”; na noite seguinte, a expressão estava sub-regulada. Essa expressão da COX-1 coincide com o edema uterino generalizado requerido para o fechamento luminal. Em contraste, o gene da COX-2 estava expresso no epitélio luminal e células estromais sub-epiteliais no pólo anti-mesometrial exclusivamente ao redor do blastocisto no momento da reação de atracamento, no dia 4, e persistiu até a manhã do dia seguinte. Esse gene uterino não estava expresso no sítio de aposição do blastocisto durante a implantação retardada tratada com progesterona (P_4), mas foi prontamente verificada ao redor do blastocisto ativado após o término do retardo pelo 17 beta-estradiol (E_2). Os resultados acima sugerem que a síntese de PG catalisada por COX-2 é importante para o aumento da permeabilidade vascular localizada e reação de atracamento. O gene da COX-1 “sub-regulado” (down-regulated) a partir da reação de atracamento (dia 4) estava então expresso novamente na decídua mesometrial e anti-mesometrial, nos leitos deciduais secundários nos dias 7 e 8. Esses resultados sugerem que a geração de PGs por COX-1 está envolvida na decidualização e/ou permeabilidade vascular endometrial localizada e continuada, observada durante esse período. Ao contrário, o gene da COX-2, expressa no pólo anti-mesometrial nos dias 4 e 5, troca de sítio de expressão para o pólo mesometrial dia 6 em diante. Resultados que sugerem que as PGs produzidas nesse sítio pela COX-2 estão envolvidas na angiogênese para o

estabelecimento da placenta. No camundongo ovariectomizado, o gene da COX-1 foi induzido no epitélio por um tratamento combinado com P₄ e E₂. Entretanto, o tratamento com P₄ e/ou E₂ não influencia o gene uterino da COX-2. De uma maneira geral, esses autores concluíram que o gene uterino da COX-1 é influenciado pelos esteróides ovarianos, enquanto os da COX-2 é regulado pelo blastocisto durante a sua implantação e durante a gravidez precoce.

Apesar da forte correlação clínica e laboratorial entre as prostaglandinas e endometriose, os mecanismos básicos entre essas moléculas e os achados clínicos: dor (dismenorréia), infertilidade e crescimento endometriótico ainda não estão esclarecidos. Alguns trabalhos apontam (inespecificamente) que sua modulação poderiam ter valor efetivo na qualidade de vida das mulheres endometrióticas. MATSUZAKI ET AL. (2004) encontraram uma expressão de COX-2 significativamente aumentada nas células estromais do endométrio eutópico de pacientes com endometriose profunda quando comparada ao estroma durante a fase secretora precoce, média e tardia de mulheres controle. Esses autores fizeram ainda uma correlação direta entre os níveis da expressão de COX-2 e a intensidade de dor (dismenorréia). Esse estudo reforçou os achados de OTA ET AL. (2001) quando encontraram os mesmos resultados com relação a expressão de COX-2, sendo que só na fase lútea precoce e intermediária. Estes não fizeram menção a relações com dor.

Outros autores fizeram menção de correlação entre PGs e a dor queixada pelas mulheres endometrióticas tais como DAWOOD ET AL. (1984), BENEDETTO (1989) inclusive fazendo menção a enxaqueca menstrual, KOIKE ET AL. (1992) entre tantos.

Isso nos leva a crer que o uso de AINES, e talvez especificamente os inibidores da COX-2 venham a inromper esse mecanismo doloroso e na verdade COBELLIS ET AL. (2004) demonstraram a eficácia do rofecoxib no tratamento da dor relacionada a endometriose.

De acordo com a teoria da menstruação retrógrada, o endométrio vivo na cavidade peritoneal necessita de provisão sanguínea para a sobrevivência do implante e desenvolvimento da endometriose. Esse processo é chamado de angiogênese que é um processo complexo envolvendo proliferação, migração e extensão das células endoteliais, aderências dessas células a matriz extracelular com remodelação da matriz e formação do lúmen. Então, a angiogênese é um fenômeno importante na fisiopatologia da endometriose. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é um potente fator angiogênico envolvido nos processos fisiológicos e na angiogênese patológica. Níveis elevados de VEGF foram detectados no líquido peritoneal de pacientes endometrióticas. Os VEGFs são secretados de macrófagos peritoneais em resposta a esteróides ovarianos (MCLAREN ET AL. 1996).

Segundo RYAN ET AL. (1995), a interleucina-8 (IL-8), um fator angiogênico derivado de macrófago também foi detectado em concentrações elevadas no líquido peritoneal de mulheres endometrióticas quando comparada a controles.

O bloqueio da liberação de PGs pelo Rofecoxib das células endometrióticas parece ter sido o responsável pelo alívio da dor naquelas pacientes. Outros benefícios poderiam ter sido atingidos. Vários estudos têm demonstrado que os inibidores específicos da cox-2 têm a capacidade de inibir o crescimento e proliferação celular de vários tumores, entre eles, o de colon, epidérmico, vesícula dentre outros (CAO E PRESCOTT, 2002). Os inibidores da COX-2 tem sido efetivos na quimioprevenção de pacientes de risco de pólipos de colon (OSHIMA E TAKETO, 2002) e isso parece se dever ao seu efeito anti-angiogênico. A hipótese de que os AINES poderiam inibir a angiogênese de pacientes endometrióticas parece plausível (COBELLIS ET AL. 2004).

Por outro lado, as informações sobre a fertilidade obtidas através de camundongos privados da COX-2 (COX-2 knock-out mice) sugerem que a COX-2 tenha papel essencial na manutenção da fertilidade, sendo necessária em cada estágio da gravidez. (LIM ET AL. 1997).

Nas figuras 2 e 3, esquematizam-se alguns efeitos das prostaglandinas na fisiopatologia da endometriose (DIAMOND E OSTEEN, 1997).

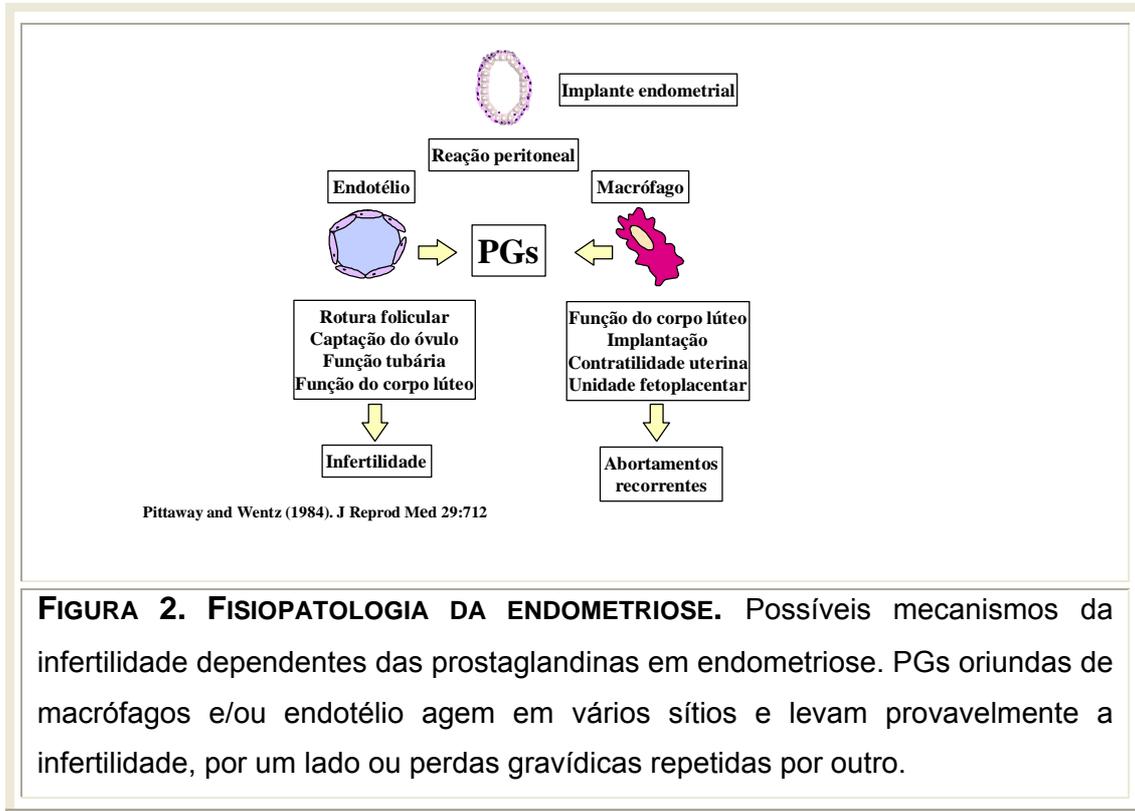
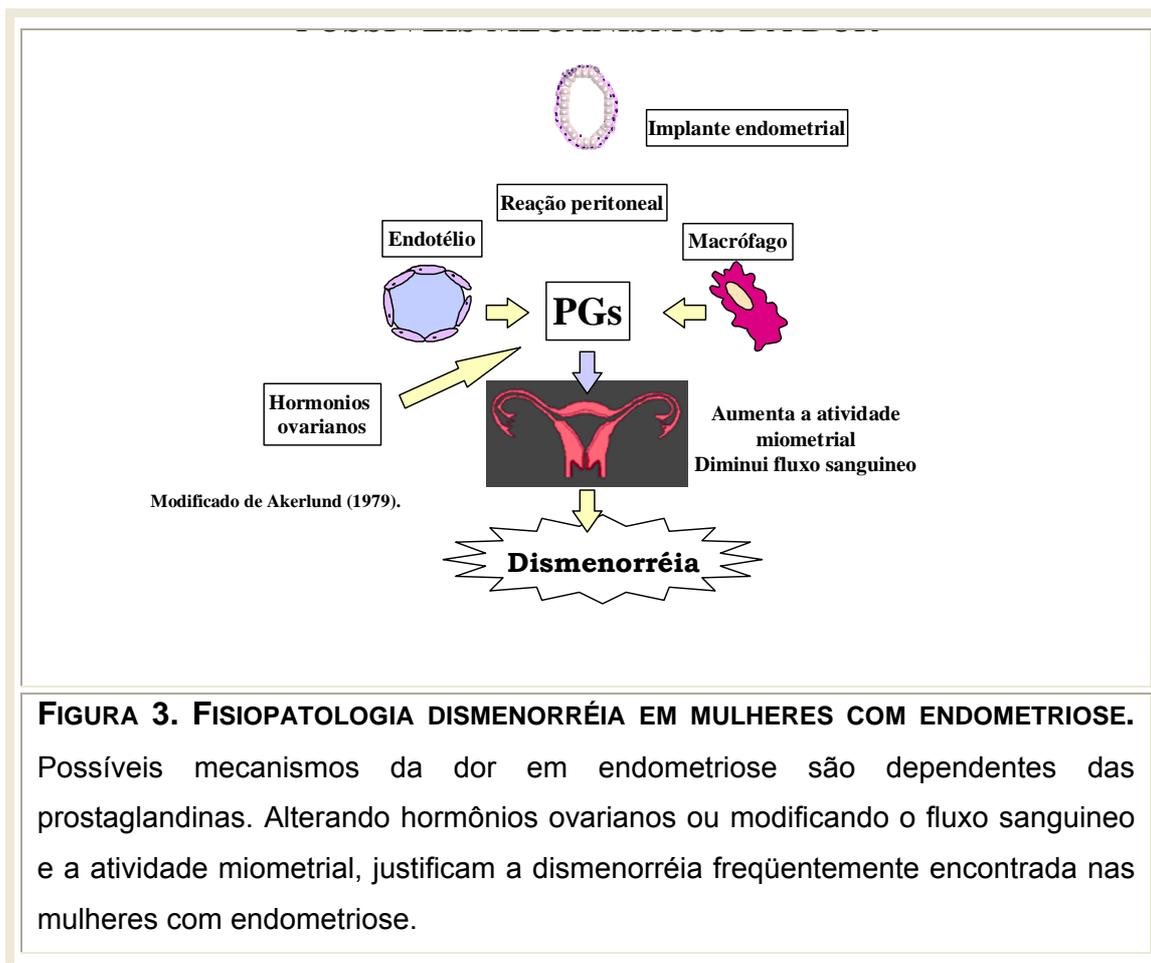


FIGURA 2. FISIOPATOLOGIA DA ENDOMETRIOSE. Possíveis mecanismos da infertilidade dependentes das prostaglandinas em endometriose. PGs oriundas de macrófagos e/ou endotélio agem em vários sítios e levam provavelmente a infertilidade, por um lado ou perdas gravídicas repetidas por outro.

Alterações da função ovariana, com produção estrogênica, e/ou o déficit na função do corpo lúteo, podem participar ainda do desenvolvimento e crescimento dos endometriomas (DIAMOND E OSTEEN, 1997).



Na verdade, um só mecanismo não explicaria todos os mecanismos da infertilidade e surge, então em acréscimo aos anteriores (hormonais e prostaglandinas), o extenso e ainda pouco explicado fator imunológico.

1. 3. IMUNOPATOLOGIA DA ENDOMETRIOSE

CÉLULAS PERITONEAIS RELACIONADAS COM A ENDOMETRIOSE

O timo e a medula óssea são os principais órgãos envolvidos no reabastecimento programado de linfócitos T e B na circulação e nos tecidos periféricos. As células precursoras desses linfócitos são os precursores linfóides comuns na medula óssea. Eles se originam de uma célula mãe (tronco) hematopoiético pluripotente. O precursor linfóide comum tem a capacidade de se desenvolver em linfócito B ou T dependendo do micro-ambiente no qual ele “habita”. As células T se desenvolvem no timo e as B desenvolvem-se do fígado fetal e da medula óssea adulta. Também da célula

mãe hematopoiética, precursor mielóide comum, originam-se os macrófagos e monócitos. Uma terceira população de células, chamadas “null cel” (células nulas) que incluem as células matadoras (Killer cell, K) e matadoras naturais (natural killer cells, NK), se originam também daquela célula tronco, entretanto existem incertezas com relação ao mecanismo preciso de seu modo de desenvolvimento (EVERS, 1995).

É bem reconhecido que as respostas imunes mediadas pelas células contribuem para a eliminação de antígenos estranhos e células que invadem o organismo. Também é provável que o sistema imune possa reconhecer e eliminar células autólogas alteradas ou extraviadas como as células do endométrio, quando ectópicas. Este mecanismo pode ser operativo na maioria das mulheres e pode prevenir o desenvolvimento de endometriose. Recentes estudos em mulheres com endometriose demonstram mudanças funcionais nessas células do sistema imune, inclusive monócitos/macrófagos, células assassinas naturais, linfócitos T citotóxicos e células B. Estas mudanças sugerem vigilância, reconhecimento e destruição diminuída das células endometriais extraviadas e possível facilitação de implantação delas, com posterior desenvolvimento de endometriose. Monócitos de sangue periférico (PBM) e macrófagos peritoneais (PM) podem representar um papel chave neste respeito, e podem controlar a função de outras células imunes. Isso é demonstrado em mulheres férteis normais sem endometriose: PBM e PM suprimem a proliferação de células endometriais *in vitro*.

Na endometriose, estimulam a proliferação de células endometriais. Isso acontece em aproximadamente um terço das pacientes, permanecendo nos outros dois terços de pacientes os efeitos de PM e PBM semelhante a esses de controles férteis, sugerindo endometriose subclínica. De maneira interessante, células endometriais em mulheres com endometriose são mais sensíveis ao efeito estimulatório do PBM, e mais resistentes a citotoxicidade (DMOWSKI ET AL. 1994).

Uma alteração na imunidade mediada pela célula pode estar entre os fatores patogênicos da endometriose. IWASAKI ET AL. (1993) encontraram

células T supressoras significativamente aumentadas, e células T citotóxicas significativamente diminuídas no líquido peritoneal e no sangue periférico de mulheres com endometriose, quando comparado a controles. Da mesma forma, a atividade das células natural killer (NK) estava diminuída no sangue periférico dessas mulheres.

KANZAKI ET AL. (1992) investigaram o efeito do soro de pacientes com endometriose sobre a atividade de células assassinas naturais (NK, natural killer). A atividade de células NK de voluntários saudáveis foi examinada após a incubação com soro de pacientes com endometriose ou de controles. As células K562 foram usadas como alvos. Encontraram que linfócitos tratados com soro de pacientes endometrióticas expressaram níveis significativamente mais baixos de citotoxicidade quando comparados a linfócitos tratados com soro controle. Esta supressão de citotoxicidade era dose dependente e o grau de supressão era proporcional ao tempo de incubação das células efectoras com o soro. A citotoxicidade diminuída também foi observada com o soro de pacientes que tinham sido tratados com danazol. Este achado espetacular sugere que fatores humorais que podem inibir atividade da célula NK *in vitro* estão presentes no sangue periférico de pacientes que têm endometriose; além disso, eles sugerem que a atividade de célula NK suprimida possa permitir o desenvolvimento de células endometriais em locais ectópicos.

Um estudo por KIKUCHI ET AL. (1993) foi executado para elucidar se lesões endometrióticas poderiam afetar subtipos de linfócitos no sangue periféricos. Mudança de subtipos de linfócitos de mulheres saudáveis normais e de pacientes com mioma uterino ou com endometriose antes e depois de procedimentos cirúrgicos também foi investigada, tendo encontrado aqueles autores que a porcentagem e o número absoluto das sub-séries CD57+CD16+ [NK moderadamente diferenciadas] das células NK em sangue periférico de pacientes com endometriose era significativamente baixo que os valores de mulheres saudáveis normais e pacientes com mioma uterino, enquanto não havia nenhuma diferença em CD4+ e CD8+ (sub-séries de linfócitos) entre mulheres saudáveis normais e pacientes com mioma uterino ou endometriose.

Em pacientes com endometriose, a porcentagem e número absoluto de CD8+CD11+ (células T supressoras) foram aumentados significativamente depois de tratamento cirúrgico, enquanto esses não mudaram em pacientes com mioma uterino. Por outro lado, ressecção de lesões endometrióticas resultou em uma diminuição significativa da porcentagem de células CD57+CD16 (células NK imaturas) e um aumento significativo, não só na porcentagem, mas também no número absoluto de células CD57+CD16+ (NK moderadamente diferenciadas), sugerindo que a existência de lesões endometrióticas perturbam a diferenciação das células NK. Além disso, células T indutoras de supressão como mostrado pela medida de CD4+2H4+ e CD4+4B4 estiveram aumentadas significativamente depois do tratamento cirúrgico de endometriose.

Estudos adicionais por TANAKA ET AL. (1992) e por OOSTERLYNCK ET AL. (1993) confirmam a atividade diminuída das células NK em mulheres com endometriose. A atividade das NK é caracterizada pela capacidade espontânea de células linfóides derivadas de hospedeiros não-imunizados de reconhecer e lisar certas linhagens de células tumorais, células infectadas por vírus e linhagem de células de tumores transplantados. A endometriose é caracterizada pela implantação e proliferação de tecido ectópico autólogo na cavidade pélvica. Daí talvez a importância de se investigar essas células. E não se encontrou outra coisa senão o fato de que a atividade das células NK em sangue periférico de mulheres com endometriose era mais baixo que em mulheres sem endometriose. Em adição, o soro periférico de mulheres com endometriose fez suprimir a atividade das células NK de forma dose-dependente. Estes estudos provêm a especulação que a imunidade natural mediada através das células NK pode modular o desenvolvimento de implante ectópico de endométrio.

Os macrófagos são as células mais numerosas no peritoneu. O número e a ativação dos macrófagos têm sido reportados na fisiopatologia da endometriose. Para avaliar o estado de ativação dessas células, BRAUN ET AL. (1992) observaram que sua citotoxicidade era elevada nos estágios I e II da

endometriose e em controles inférteis comparadas com controles férteis. A citotoxicidade nos estágios III e IV da endometriose era mais baixa que nos estágios I e II. A indometacina *in vitro* aumentou a citotoxicidade no estágio III e IV, mas não nos outros grupos testados. A citotoxicidade com os grupos tratados com danazol ou análogos de GnRH (GnRH-a) foi aumentada comparada com pacientes sem tratamento em fases comparáveis da doença. Concluíram então que a citotoxicidade dos macrófagos peritoneais em mulheres com endometriose é afetada pela extensão da endometriose, pelo metabolismo das prostaglandinas, e pelo tratamento com danazol ou com GnRH-a.

OOSTERLYNCK ET AL. (1993) investigaram as subpopulações de linfócitos no sangue periférico (PB) e líquido peritoneal (PF) de mulheres com e sem endometriose para avaliar se a citotoxicidade das células NK, diminuída em mulheres com endometriose, era devida a um defeito quantitativo ou não. Encontraram que o número e a concentração de células mononucleares no PF estavam aumentados em mulheres com endometriose comparado às mulheres

sem endometriose. A relação CD4/CD8 foi invertida no PF, e isto era mais pronunciado em mulheres com endometriose. No PF de mulheres com endometriose, 41,3% dos linfócitos eram CD8 positivo, comparado a 34,3% em mulheres sem endometriose. A porcentagem de linfócitos NK positivo em PF, usando três anticorpos monoclonais diferentes dirigidos contra marcadores das células NK (CD57, CD16, e CD56) não era diferente entre mulheres com e sem endometriose. Concluíram que as células monocíticas no líquido peritoneal consistiam principalmente em células citotóxicas irrestritas ou HLA-restritas capazes de reagir com vários antígenos da cavidade pélvica, oriundos do trato genital inferior. Além disso, não era provável que a atividade de NK diminuída descrita em PB e PF de mulheres com endometriose fosse causada por um defeito quantitativo, desde que a porcentagem de NK linfócitos-positivo não era diferente entre mulheres com e sem endometriose.

Controvérsias com relação ao papel das células "imunológicas" peritoneais continuam rondando na fisiopatologia da endometriose. HUA ET AL.

(1996) investigaram o papel das células NK no desenvolvimento da endometriose e mostraram que sua atividade tanto no líquido peritoneal como no sangue periférico estava diminuída, quando comparadas a mulheres controle inférteis e férteis. Mostraram ainda que essa atividade diminuía com o aumento no estadiamento da endometriose.

Uma base imunológica para a patogênese da endometriose há muito tem sido considerada importante. As interações entre as células peritoneais, incluindo macrófagos, células B, células T, células NK e as células endometriais retrógradas são consideradas críticas, mas permanecem controversas. Refazendo dados da literatura, HO ET AL. (1997) mostraram que macrófagos peritoneais são ativados pelo refluxo menstrual recorrente, levando a auto-anticorpos locais e sistêmicos, apesar das células B não aumentarem numericamente. A diminuição na atividade da célula NK na

cavidade peritoneal e no sangue periférico pode estar relacionada à falha na "limpeza" do tecido endometrial ectópico. As células peritoneais T são as predominantes (Th1 inflammatory cells) e são disfuncionais devido à diminuição de sua ativação (especialmente na população HLA-DR+CD4+CD3+) e na produção de interleucina 2. Esses autores concluíram portanto que os linfócitos T e NK estão suprimidos em mulheres com endometriose, mas não concluem se como causa ou efeito da doença.

BRAUN E DMOWSKI (1998) compararam o efeito citolítico de monócitos do sangue periférico (PBM) e macrófagos peritoneais sobre células endometriais tópicas e ectópicas em mulheres com endometriose. Os monócitos do sangue periférico foram significativamente citolíticos que os macrófagos peritoneais contra células endometriais autólogas. Chamou a atenção o fato dessas mesmas células ter apresentado similaridades no que diz respeito a citólise de células de uma linhagem de hepatoma. Aqueles autores encontraram ainda que as células endometriais ectópicas foram significativamente mais resistentes a citólise que as células eutópicas e concluíram que a capacidade reduzida dos macrófagos peritoneais mediarão a destruição das células

endometriais associado ao aumento da resistência dessas células ectópicas a citólise mediada por macrófago podem facilitar a sobrevivência dessas células na cavidade peritoneal de mulheres com endometriose.

1. 4. FATORES DE CRESCIMENTO RELACIONADOS COM A ENDOMETRIOSE

A angiogênese é um fenômeno importante na fisiopatologia da endometriose, condição onde há uma implantação de endométrio ectópico, na cavidade peritoneal. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é um potente fator angiogênico envolvido nos processos fisiológicos e na angiogênese patológica. Níveis elevados de VEGF foram detectados no líquido peritoneal de pacientes endometrióticas. VEGF foi encontrado nos macrófagos teciduais presentes no endométrio ectópico e nos macrófagos ativados em líquido peritoneal. A ativação dos macrófagos foi maior em mulheres com endometriose peritoneal e o meio condicionado por estes macrófagos causou uma proliferação de células endoteliais aumentada e dependentes do VEGF quando comparado aos de mulheres normais. Os VEGFs são secretados de macrófagos peritoneais em resposta a esteróides ovarianos e sua secreção aumentada após ativação com lipopolisacarídeo (LPS). Saliente-se que os macrófagos peritoneais expressaram receptores para os hormônios esteróides e que receptores para VEGF, ftl e KDR (*kinase domain receptor*) foram também detectados, sugerindo uma regulação autócrina. Durante o ciclo menstrual, a expressão do ftl foi constante mas a do KDR aumentou na segunda fase do ciclo. Esse aumento também é significativo em mulheres endometrióticas quando comparado a controles. Daí sugerir-se que os macrófagos ativados são a principal fonte de VEGF na endometriose e que sua expressão é regulada diretamente por esteróides ovarianos (MCLAREN ET AL. 1996).

Segundo RYAN ET AL. (1995), a interleucina-8 (IL-8), um fator angiogênico derivado de macrófago também foi detectado em concentrações elevadas no líquido peritoneal de mulheres endometrióticas quando comparada a controles. O aumento foi relacionado ao estágio (gravidade) da endometriose, daí esses autores hipotetizarem que a IL-8 seria um importante fator angiogênico, estaria

envolvido na fisiopatologia da endometriose promovendo neovascularização de endométrio ectópico.

SCHRÖDER, GAETJE E BAUMANN (1996) demonstraram que pacientes com endometriose estágio IV apresentaram níveis de IL-6 no *líquido peritoneal* levemente superior quando comparados com endometriose estágios I e II ou com outros problemas como massas ovarianas ou inflamação crônica. Por outro lado, os níveis *séricos* de IL-6 foram maiores nos estágios iniciais da doença (estágios I e II) quando comparados aos estágios III e IV ou massas ovarianas ou inflamação crônica. Pacientes com endometriose também revelaram receptores de IL-6 (rIL-6) no líquido peritoneal e no soro quando comparada a outras pacientes de grupo controle. Isso levou a conclusão de que a IL-6 e seu receptor solúvel poderiam estar envolvidos na fisiopatologia da endometriose.

BRAUN ET AL. (1996) mostraram que a síntese basal (por monócitos de sangue periférico) de TNF- α , IL-6 e IL-8 era significativamente maior em mulheres com endometriose comparada a mulheres férteis. Mostraram ainda que os níveis de TNF- α também aumentavam em resposta ao estímulo com LPS por monócitos de sangue periférico. A IL-10, tanto basal quanto estimulada, não sofreu alteração de síntese.

RIER ET AL. (1994) demonstraram que a severidade da endometriose se correlacionava com os níveis aumentados de IL-6 acompanhados pela diminuição do receptor solúvel para IL-6 (IL-6sR) no líquido peritoneal de mulheres endometrióticas. Estudos adicionais pelos mesmos autores revelaram que células estromais de implantes ectópicos secretavam essa citocina *in vitro*, além de apresentaram uma resistência à inibição do crescimento induzido pela expressão de IL-6sR. Esses achados, segundo aqueles autores suportam a hipótese de que a desregulação das respostas a IL-6 tem papel na fisiopatologia da endometriose mais que seu aumento, isoladamente.

Já RANA ET AL. (1996) demonstraram que as citocinas TNF- α , IL-8 e IL-10 em mulheres endometrióticas são sintetizadas em níveis maiores que os normais por macrófagos peritoneais tanto em estado basal quanto estimulado por LPS, confirmando parcialmente os resultados de BRAUN ET AL. (1996) quanto a IL-8 mas contrariando quanto a IL-10.

KEENAN ET AL. (1995) ressaltam o conceito de que a endometriose está associada à ativação de macrófagos peritoneais e a uma concentração maior dessas células. Essa ativação é refletida pelo aumento dos níveis de citocinas encontradas nos meios de culturas de macrófagos. A IL-1 e o TNF- α , ao contrário da IL-2, estiveram significativamente aumentados nos meios de cultura, entretanto não houve mudanças significativas nos níveis dessas citocinas no líquido peritoneal apesar dessas células estarem em número aumentado nas pacientes com endometriose. Esses autores acham que a ausência de significância estatística nos níveis de citocinas peritoneais faz delas inocentes no desenvolvimento e progressão da doença.

Níveis de interleucina 5 (IL-5) e IL-6 estiveram significativamente mais altos no líquido peritoneal de indivíduos endometrióticos quando comparados a indivíduos controle, o mesmo não acontecendo com a IL-1 α , esses estudos de KOYAMA ET AL. (1993) concluíram que a IL-5 e IL-6 mas não a IL-1 estariam associados à fisiopatologia da endometriose.

As concentrações de EGF ou FGF básico no líquido peritoneal não diferiram significativamente entre as pacientes com endometriose e não-endometrióticas. Em mulheres normais, esses fatores estiveram aumentados significativamente na segunda fase do ciclo menstrual, mas esse fato não se correlacionou com a severidade da endometriose. Na verdade as concentrações de EGF e FGF foram muito variáveis no líquido peritoneal de mulheres endometrióticas e nas não-endometrióticas que fica difícil fazer uma correlação (HUANG, PAPASAKELARIOU E DAWOOD, 1996).

A expressão do RNA mensageiro para o receptor do fator de crescimento epidérmico (mRNA-EGF-R) no tecido endometriótico foi significativamente menor que o do endométrio eutópico. O receptor para EGF foi detectado em células glandulares mais intensamente que nas células estromais tanto nos endometriomas quanto nos implantes endometrióticos e não existe diferença entre o tecido endometriótico e endométrio tópico. O EGF portanto pode estar envolvido na fisiopatologia da doença. (HUANG E YEH, 1994).

KEENAN ET AL. (1994) encontraram níveis de IL-6 significativamente aumentados em meios de cultura de macrófagos de mulheres endometrióticas. Esses níveis aumentaram 4 vezes nos estágios precoces da doença e 8 vezes nos estágios avançados. Por outro lado não encontraram diferenças significativas nos níveis de IL-6 ou interferon gama (INF-gama) no líquido peritoneal entre os grupos endometriótico e controle. Sugerem o não envolvimento do INF-gama na fisiopatologia da endometriose.

Por outro lado, KLEIN ET AL. (1994) encontraram uma maior percentagem de leucócitos expressando RNA mensageiro (mRNA) para INF-gama no endométrio ectópico que no tópico, assim como receptores para INF-gama estiveram presentes no epitélio glandular de endométrio ectópico. Esses achados sugerem um possível efeito parácrino para os leucócitos residentes através do INF-gama na regulação da proliferação celular na endometriose.

KLEIN ET AL. (1993) demonstraram que a concentração geral de células T e macrófagos que expressaram o mRNA para o INF-gama era significativamente maior no tecido endometrial ectópico que o eutópico. Os leucócitos residentes podem ter um papel parácrino na regulação da proliferação de endometriose via INF-gama.

UEKI ET AL. (1994) mostraram que os níveis de IL-1 e Fator estimulante de colônia de macrófago-granulócito (GM-CSF) foram similares tanto no grupo controle como no endometriótico, entretanto a IL-6 esteve aumentado em 50%

de pacientes com infertilidade associada a endometriose. Segundo aqueles autores esses resultados sugerem que o tecido inflamatório encontrado na endometriose não está relacionado com ativação de macrófago peritoneal, além disso os altos níveis de IL-6 observados em mulheres endometrióticas inférteis sugerem que algum evento imunológico seja responsável pela infertilidade.

O fator estimulante de colônia granulócito macrófago (GM-CSF) foi localizado nas células epiteliais endometriais assim como no epitélio endometriótico, com expressão significativamente aumentada na endometriose na fase secretora do ciclo menstrual. Essa citocina pode estar envolvida na fisiopatologia da endometriose elicitando migração, proliferação e ativação de macrófagos peritoneais e endometriais (SHARPE-TIMMS ET AL. 1994).

A concentração de M-CSF no líquido peritoneal de mulheres endometrióticas foi significativamente maior que nas pacientes controles, entretanto não houve diferença significativa entre a concentração de M-CSF e o estadiamento da endometriose. Por outro lado, em pacientes com infertilidade primária e endometriose, havia uma correlação direta entre os níveis de M-CSF e a gravidade da endometriose avaliada pelo rAFS. Daí, especula-se que exista alguma relação entre os níveis aumentados de M-CSF na cavidade peritoneal e a infertilidade primária associada a endometriose, especialmente relacionada à progressão da doença (FUKAYA ET AL. 1994).

Em endometriose induzida cirurgicamente em ratas demonstrou-se a presença e distribuição celular do TGF- α 1 e 3 (mas não para o TGF- α 2) que estão presentes em todos os tipos de células dos implantes endometrióticos, exceto as células estromais. As células inflamatórias que se infiltram entre as células estromais e nos cistos associados ao implante contém a maior intensidade de coloração (imunohistoquímica) para os TGF- α de 1 a 3 seguidos pelos epitélios glandular e luminal, pelos fibroblastos das aderências fibróticas e das células musculares lisas endoteliais e das arteríolas. Os resultados desses autores implicam o TGF- α como tendo possíveis papéis

parácrinos/autócrinos na manutenção dos tecidos endometrióticos e no desenvolvimento de aderências fibróticas associadas a endometriose (CHEGINI ET AL. 1994).

GIUDICE ET AL. (1994) investigaram o sistema IGF (*insulin-like growth factor*) em líquido peritoneal de mulheres com ciclos menstruais normais e seu potencial mitogênico em culturas de células estromais. Os fatores de crescimento IGF-I, IGF-II, e IGF-binding protein-1 (IGFBP-1), -2, -3, e -4 foram identificados no líquido peritoneal e seu poder mitogênico pode estimular o crescimento de células estromais na cavidade pélvica facilitando assim a proliferação de endometriose.

As concentrações de RANTES (uma citocina com potente atividade quimiotática para monócitos em humanos) e interferon gama, citocinas solúveis passíveis de recrutar e ativar macrófagos foram encontrados em níveis significativamente aumentados no líquido peritoneal de mulheres com endometriose e tais níveis se correlacionaram com a severidade da doença, ao contrário do interferon gama. Concluíram que a RANTES pode ter um papel importante no recrutamento de macrófagos peritoneais na fisiopatologia da endometriose (KHORRAM ET AL. 1993). O quadro 1 descreve o resumo do descrito acima.

SIGLA	DESCRIÇÃO	AUTOR(ES)
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular (aumentada no líquido peritoneal)	MCLAREN ET AL. 1996.
IL-6	Interleucina 6 (aumentada no soro e líquido peritoneal)	SCHRODER, GAETJE E BAUMANN, 1996.
rIL-6	Receptor de IL-6 (idem)	SCHRODER, GAETJE E BAUMANN, 1996.

IL-6	Aumentado com e sem estímulo	BRAUN ET AL. 1996.
TNF- α	Aumentado com e sem estímulo	BRAUN ET AL. 1996.
IL-10	Não interfere	BRAUN ET AL. 1996.
IL-8	Aumentado com e sem estímulo	BRAUN ET AL. 1996.
EGF	Fator de crescimento epidérmico (#)	HUANG ET AL. 1996.
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto (#)	HUANG ET AL. 1996.
TNF- α	(+)	RANA ET AL. 1996.
IL-8	(+)	RANA ET AL. 1996.
IL-10	(+)	RANA ET AL. 1996.
IL-1 β	# (veja raciocínio no texto)	KEENAN ET AL. 1995.
IL-2	# (veja raciocínio no texto)	KEENAN ET AL. 1995.
TNF- α	# (veja raciocínio no texto)	KEENAN ET AL. 1995.
IL-8	Interleucina-8 (+)	RYAN ET AL. 1995.
IL-6sR	Receptor solúvel de IL-6 (-)	RIER ET AL. 1994.
IL-6	Interleucina 6 (+)	RIER ET AL. 1994.
IL-6	Interleucina 6 (+)	KEENAN ET AL. 1994.
INF-gama	Interferon gama (#)	KEENAN ET AL. 1994.
IL-1	(#)	UEKI ET AL. 1994.
IL-6	(+)	UEKI ET AL. 1994.
GM-CSF	Fator estimulante de colônia de macrófago-granulócito (#).	UEKI ET AL. 1994.
INF-gama mRNA	RNA mensageiro para o interferon gama (+)	KLEIN ET AL. 1994.
INF-gama R	Receptor do interferon gama (+)	KLEIN ET AL. 1994.
mRNA-EGF-R	RNA mensageiro para o receptor de fator de crescimento epidérmico no tecido endometriótico foi	HUANG E YEH, 1994.

	significativamente menor	
EGF	Fator de crescimento epidérmico (#)	HUANG E YEH, 1994.
GM-CSF	Fator estimulante de colônia de macrófago-granulócito (+).	SHARPE-TIMMS ET AL. 1994.
M-CSF	Fator estimulante de colônia de macrófago (+), principalmente com infertilidade.	FUKAYA ET AL. 1994.
TGF- β 1	Fator transformador de crescimento beta 1 (+)	LEBOVIC ET AL. 2002.
TGF- β 2	Fator transformador de crescimento beta 2 (+)	LEBOVIC ET AL. 2002.
TGF- β 3	Fator transformador de crescimento beta 3 (+)	LEBOVIC ET AL. 2002.
INF-gama (mRNA)	RNA mensageiro para o interferon gama.	KLEIN ET AL. 1993.
IL-5	Interleucina 5 (+)	KOYAMA ET AL. 1993.
IGF-I	Fator de crescimento insulina-símile I (insulin-like growth factor I). Funcionam como mitogênico.	GIUDICE ET AL. 1994.
IGF-II	Fator de crescimento insulina-símile II (insulin-like growth factor II). Funcionam como mitogênico.	GIUDICE ET AL. 1994.
IGF-BP-1	Proteína ligadora do Fator de crescimento insulina-símile 1. (+)	GIUDICE ET AL. 1994.
IGF-BP-2	Proteína ligadora do Fator de crescimento insulina-símile 2. (+)	GIUDICE ET AL. 1994.
IGF-BP--3	Proteína ligadora do Fator de crescimento insulina-símile 3. (+)	GIUDICE ET AL. 1994.
IGF-BP-4	Proteína ligadora do Fator de crescimento insulina-símile 4. (+)	GIUDICE ET AL. 1994.

RANTES	Citocina quimiotática para macrófagos (+)	KHORRAM ET AL. 1993.
--------	---	----------------------

QUADRO 1. FATORES DE CRESCIMENTO RELACIONADOS COM A ENDOMETRIOSE.

(#) Parece não estar relacionado com endometriose

(+) Aumentado.

(-) Diminuído

Todos esses fatores de crescimento podem originar-se de macrófagos peritoneais ativados. Alguns fatores de crescimento são mais freqüentemente estudados e parecem mais fortemente responsáveis pela fisiopatologia da endometriose, e entre eles a interleucina-1 e o fator de necrose tumoral (TNF) mostrados na figura 4 e este ultimo descrito mais pormenorizadamente a seguir.

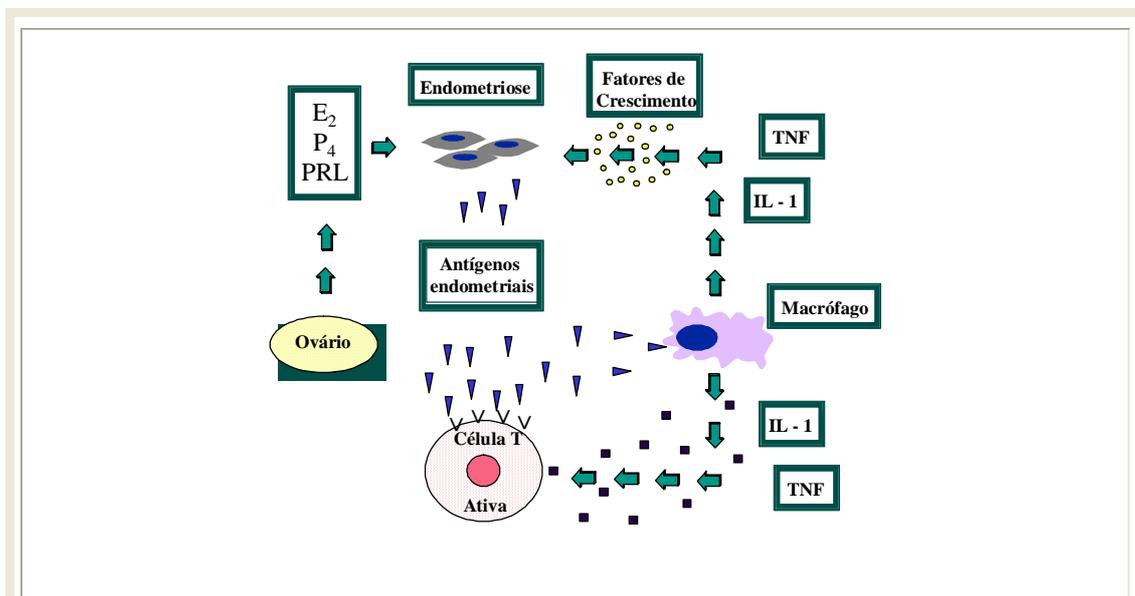


FIGURA 4. FISIOPATOLOGIA DA ENDOMETRIOSE. Possíveis mecanismos da endometriose dependentes do TNF-alfa e Interleucinas sobre o desenvolvimento dos endometriomas. Note-se ainda as interações hormonais com outros fatores de crescimento.

1. 5. FATOR DE NECROSE TUMORAL, INTERLEUCINAS E ENDOMETRIOSE

VERCELLINI ET AL. (1993) determinando os níveis de TNF no plasma e líquido peritoneal de mulheres com e sem endometriose, não encontraram diferenças significativas entre estes dois grupos em ambos os sítios.

Os efeitos do estradiol (E_2), da progesterona (P) e do danazol sobre a produção de interleucina 1 beta ($IL-1-\beta$) e sobre o fator de necrose tumoral alfa ($TNF-\alpha$) por monócitos humanos foram investigados por MORI ET AL. (1990). Esses autores demonstraram que E_2 e P em concentrações fisiológicas aumentam a produção dessas citocinas de doadores de baixos níveis de IL e TNF, mas não afetaram sua produção em indivíduos com alta produção de TNF e IL-1. O danazol inibiu a produção de IL-1 e de TNF pelos monócitos, de forma dose-dependente, não só nos doadores de monócitos com alta produção de TNF e IL-1, mas também naqueles de baixa produção dessas citocinas assim como na ausência ou presença de E_2 ou P. Eles sugeriram com esses achados que o possível mecanismo de ação do danazol no tratamento da endometriose e infertilidade associado à anormalidade imunológica seria o da inibição da produção dessas citocinas.

MORI ET AL. (1991), investigando os níveis de IL-1 e TNF no líquido peritoneal de mulheres com várias patologias ginecológicas desvendaram uma elevação dos níveis dessas citocinas na doença inflamatória pélvica aguda e em todos os estágios da endometriose comparados aos grupos controle, com miomas uterinos, com cistos ovarianos ou com síndrome aderencial pélvica pós-infecciosa. Os níveis dessas citocina não se correlacionavam com o número de macrófagos peritoneais. Pelo fato dessas citocinas serem normalmente produzidas pelos macrófagos peritoneais independente de estímulos, esse aumento nas citocinas acima podem se dever, presumivelmente, a ativação desses macrófagos.

HALME (1991) discute as várias evidências para a infertilidade associada a endometriose, entre elas os vários mecanismos peritoneais que podem levar a sub-fertilidade, incluindo os fatores anatômicos e ovulatórios, entretanto

recentes estudos mostraram para ele que as células inflamatórias locais e seus produtos de secreção seriam importantes mediadores da infertilidade. Além disso, estudos *in vitro* identificaram macrófagos peritoneais e seus produtos de secreção, especificamente o TNF- α como o mais provável contribuinte para a redução da fecundabilidade através dos seus efeitos sobre a função espermática.

LIANG ET AL. (1994) também encontraram uma quantidade maior de TNF no líquido peritoneal de mulheres inférteis com endometriose e mostraram os efeitos deletérios desse líquido sobre a motilidade espermática e sobre o teste hipo-osmótico, teste de função espermática diretamente relacionado com o poder fecundante do espermatozóide. Sugeriram daí que o TNF poderia ser o agente anti-fertilidade em pacientes endometrióticas inférteis.

Numerosas substâncias derivadas de macrófagos, tais como citocinas e fatores promotores de crescimento foram descritos no líquido peritoneal de mulheres com endometriose. A endometriose peritoneal ativa é caracterizada por hipervascularização. TNF- α é uma citocina pleiotrófica também envolvida na angiogênese e imunorregulação. KUPKER ET AL. (1996) encontraram uma concentração maior de TNF- α no líquido peritoneal de mulheres endometrióticas tanto ativa quanto inativa quando comparado a mulheres não endometrióticas e nestas o TNF- α esteve em maior concentração naquelas com endometriose ativa que nas inativas e foi encontrado em maiores concentrações nos estágios avançados da doença (estágios III e IV rAFS).

RANA ET AL. (1996) demonstraram que as citocinas TNF- α , IL-8 e IL-10 são sintetizadas em níveis superiores aos normais por macrófagos peritoneais de mulheres endometrióticas, tanto a níveis basais como estimulados com LPS, sugerindo que os macrófagos peritoneais são as principais fontes dessas citocinas no líquido peritoneal.

O grupo do Institute for the Study and Treatment of Endometriosis, Rush Medical College, Chicago, Illinois 60612, USA mostraram que a endometriose

está associada com um aumento das secreções de várias citocinas (TNF- α , IL-6, IL-8 mas não IL-10) por monócitos do sangue periférico estimulados por LPS. Cada uma dessas citocinas pode ter seu papel na sintomatologia e na patogênese dessa doença (BRAUN, 1996).

A presença de diferentes citocinas no líquido peritoneal de mulheres com endometriose tem sido avaliada por muitos autores e com resultados controversos. KEENAN ET AL. (1995), por exemplo, encontraram apenas um aumento das citocinas IL-1 e TNF- α no líquido peritoneal estatisticamente não significativo enquanto que IL-2 não alterou. Encontraram, entretanto um número maior de macrófagos peritoneais que os indivíduos normais e sugeriram que as concentrações aumentadas daquelas citocinas não são responsáveis pelo desenvolvimento e progressão da endometriose.

Levando em conta que além de outras citocinas e fatores de crescimento, o fator de necrose tumoral alfa, como fator citotóxico derivado de macrófago, exerce uma variedade de efeitos imunológicos sobre o organismo, que ele é também um importante fator angiogênico e que devido a seu fator citotóxico para os gametas, o TNF possa ter um papel essencial como mediador pélvico da infertilidade, RICHTER ET AL. (1998) investigaram a síntese de TNF-alfa por macrófagos peritoneais em mulheres com e sem endometriose. Esses autores não só encontraram uma maior concentração de TNF-alfa no líquido peritoneal de mulheres com endometriose que em mulheres sadias, mas também encontraram uma correlação entre as concentrações de TNF e a intensidade da doença avaliado pelo rAFS.

Por fim outros mecanismos e as associações de muitos seriam responsáveis por essa doença do século passado que ainda hoje acomete boa parcela da população feminina e de ainda incerto tratamento por incertos os seus mecanismos. A complexidade destes são demonstradas nas duas figuras a seguir (figuras 5 e 6).

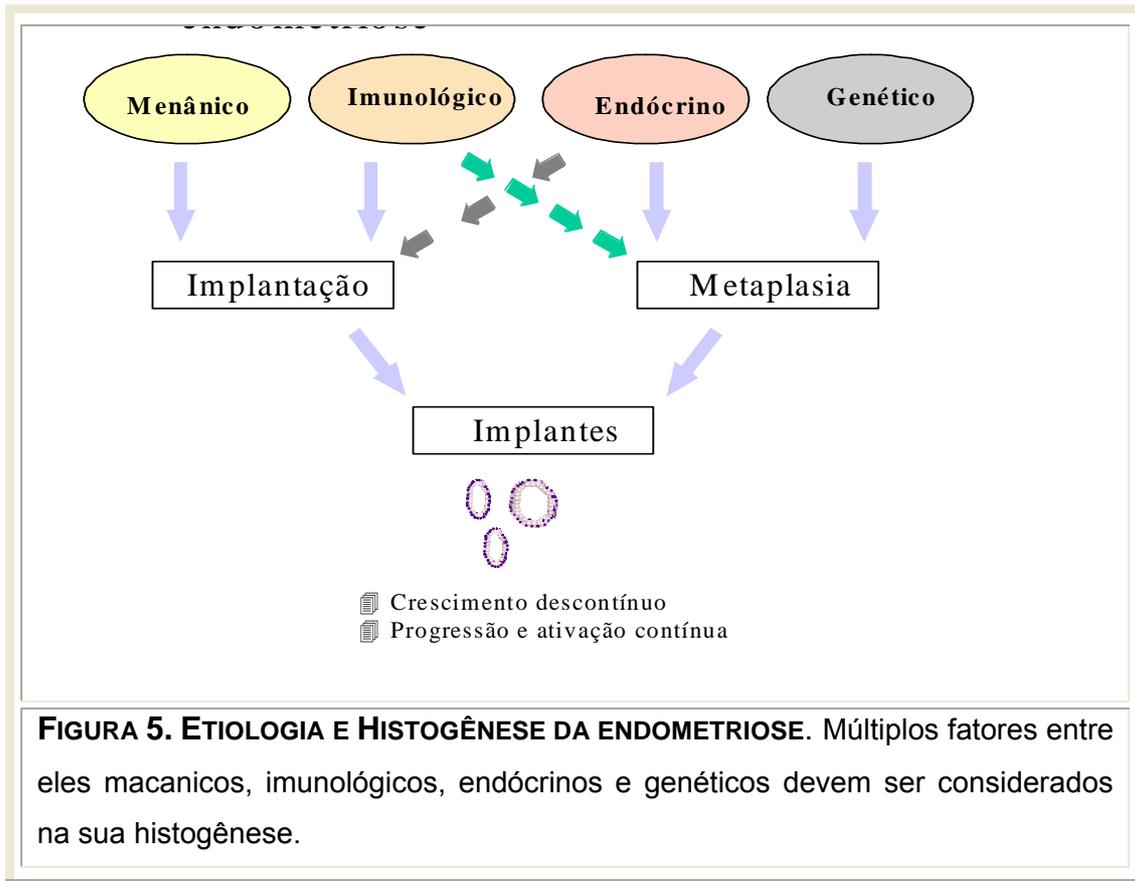


FIGURA 5. ETIOLOGIA E HISTOGÊNESE DA ENDOMETRIOSE. Múltiplos fatores entre eles macanicos, imunológicos, endócrinos e genéticos devem ser considerados na sua histogênese.

pode causar dores pélvicas severas (ARICI E ORAL, 1997). A alteração do sistema imunológico no meio ambiente peritoneal têm um papel importante na fisiopatologia da endometriose (RAMEY E ARCHER, 1993), já discutido previamente.

Muitas teorias tentando estabelecer um papel etiológico para o sistema imune em endometriose propõem que o crescimento ectópico de células endometriais na cavidade peritoneal estimula o sistema imune. Apesar da etiologia e patogênese da endometriose ainda não ter sido claramente entendida, pesquisas tem mostrado alterações imunológicas associadas a endometriose tais como o aumento no número (HANEY, MUSCATO E WEINBERG, 1981) e atividade (HALME, BECKER E WING, 1984) de macrófagos peritoneais e secreções de citocinas tais como interleucina-1 e fator de necrose tumoral por essas células (FAKIH ET AL. 1987; EISERMANN ET AL. 1988).

L-arginina exerce um efeito trófico sobre o timo, aumentando o número de células linfocitárias no timo e a blastogênese desses linfócitos em resposta a mitógenos, alotransplantes de pele, rejeição e regressão de tumores (BARBUL, 1986).

O óxido nítrico produzido pela enzima constitutiva modula varias funções tais como tono vascular e neurotransmissão no sistema nervoso central, via ativação da guanilato ciclase. Por outro lado, a enzima induzida tem sido responsabilizada pelo mecanismo de ação citostática/citotóxica dos macrófagos ativados sobre as células alvo (IALENTI, MONCADA E DI ROSA, 1993).

A endometriose tem sido considerada como uma imunopatologia que envolve alterações na imunidade mediada pela célula assim como demonstra alterações na imunidade humoral (BROSSENS E DONNEZ, 1992).

Tem-se mostrado que a L-arginina melhora a imunidade do hospedeiro, visto que aumenta o numero de linfócitos tímicos e aumentam a resposta da célula T a mitógenos (BARBUL, 1986; IALENTI, MONCADA E DI ROSA, 1993). Além

do mais a suplementação dietética com L - arginina aumenta a atividade do Natural-killer e das células-killer ativadas por linfocinas em voluntários sadios (IALENTI, MONCADA E DI ROSA, 1993). É possível, portanto que o aumento na população linfocítica leve a ativação macrofágica aumentada e a uma amplificação na resposta imunológica geral. O papel da L-arginina - NO nos linfócitos não foi ainda esclarecido, entretanto, tem-se observado que linfócitos T murinos, estimulados, geram NO seguindo a indução da NO sintase (KIRK, REGAN E BARBUL, 1991).

Mudanças no volume do líquido peritoneal (LP) assim como na sua concentração de uma variedade de células, hormônios e outros componentes têm sido encontradas em indivíduos com endometriose. Entre os componentes celulares do líquido peritoneal, os macrófagos são as células nucleadas predominantes e tem como função primária, processar através de fagocitose, os debrís celulares como bactérias, espermatozóides, tecido endometrial retrógrado e agem como primeira linha de defesa do organismo em resposta a um estímulo inflamatório. Esses mesmos macrófagos são também encontrados como células residentes em tecidos ovariano, tubário e endometrial. Essas células em seu estado ativado expressam, sintetizam e liberam cerca de 100 substancias, incluindo fatores promotores de crescimento e fatores citotóxicos. Entre essas substancias os fatores de crescimento, citocinas, eicosanóides (NATHAN, 1987; RAPPOLEE E WERB, 1992) e óxido nítrico (NO) (NATHAN, 1992). Como grande expressão de iso-enzimas tipo NO-sintase no útero humano em condições fisiológicas e patológicas tem sido descritas, O NO poderia apresentar algum papel na patogênese da endometriose (OTA ET AL. 1998; KHORRAM ET AL. 1999).

O óxido nítrico é sintetizado da L-arginina pela ação da sintase de óxido nítrico (NOS), enzima que existe em três isoformas. A NOS cerebral e NOS endotelial, também referidas como constitutivas (cNOS), são responsáveis pela liberação basal contínua de NO e ambas requerem cálcio e calmodulina para sua ativação (GRIFFITH E STUEHR, 1995; SNYDER, 1995). A terceira isoforma é a indizível (iNO), independente do cálcio e de calmodulina e é expressa somente

em resposta a citocinas e lipopolissacarídeos inflamatórios (MONCADA ET AL. 1991; MORRIS E BILIAR. 1994). A atividade da cNOS e da iNOS podem ser especificamente e estequiometricamente inibida por análogos estruturais da L-arginina como o L-nitroarginina metiléster (L-NAME) (FUKUTO E CHAUDHURI, 1995).

O óxido nítrico regula o tônus das células musculares lisas, agregação e aderência plaquetária, crescimento celular, apoptose, neurotransmissão, reações imunológicas por lesões ou induzidas por infecção (MONCADA ET AL. 1991). Como esses processos estão também associados com a biologia, fisiologia e fisiopatologia de vários processos reprodutivos, é provável que o óxido nítrico tenha também um importante papel na reprodução e conseqüentemente nas interações entre endometriose e infertilidade. Além disso, o NO tem sido implicado nos efeitos uterinos mediados por estrogênio, edema e proliferação (RAO ET AL. 1995) e em condições patológicas tais como infertilidade, doença hipertensiva específica da gravidez e remodelação tecidual (YALLAMPALLI ET AL. 1996; BUHIMSCHI ET AL. 1997; ROSSELLI ET AL. 1998) e recentemente WU ET AL. (1999) mostraram que os macrófagos peritoneais de mulheres em estágios iniciais de endometriose secretavam maior quantidade de NO.

A progesterona, uma das drogas mais utilizadas no tratamento da endometriose, em concentrações observadas durante a gravidez humana e durante o ciclo menstrual inibe a produção de óxido nítrico assim como a proliferação de macrófagos (SELI E ARICI, 2002).

O óxido nítrico é molécula que está envolvida em várias atividades biológicas tais como vasodilatação, neurotransmissão e sistema imune celular. A estimulação da NO-sintase e conseqüente liberação de NO por células tumorais tem papel crítico no desenvolvimento de tumores, muito provavelmente implicado na angiogênese tumoral e na progressão do câncer de colon e em alguns cânceres ginecológicos. Evidências experimentais indicam que o NO media diversos aspectos da biologia tumoral tais como a

supressão do sistema imune do hospedeiro que se acompanha do crescimento tumoral e facilita metástases (RASPOLINI ET AL. 2004).

OBJETIVOS

Tivemos como objetivo geral, avaliar o envolvimento de mediadores inflamatórios na patogênese da endometriose experimental em ratas, induzidas com implantes peritoneais de endométrio. Portanto tiveram-se como objetivos específicos:

1. Avaliar o papel de metabólitos das ciclooxigenases 1 e 2 (COX-1 e COX-2) no desenvolvimento de implantes ectópicos peritoneais de endométrio em ratas e suas repercussões sobre a dor e a fertilidade.
2. Verificar o envolvimento do TNF- α sobre o desenvolvimento de implantes ectópicos peritoneais de endométrio em ratas e suas repercussões sobre a dor e a fertilidade.
3. Verificar a implicação do óxido nítrico sobre o desenvolvimento de implantes ectópicos peritoneais de endométrio em ratas e suas repercussões sobre a dor e a fertilidade.

MATERIAIS E MÉTODOS

ANIMAIS

Utilizamos ratos (*Rattus norvegicus*, variedade albina) Wistar, fêmeas e machos maduros, de fertilidade comprovada, pesando em torno de 200 gramas e provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. Os animais são alojados a cada seis indivíduos por gaiola (30 x 17 x 15 cm), aclimatados com ciclos naturais dia/noite, água e ração à vontade. Ratas imaturas também foram utilizadas para verificação de edema e proliferação celular uterina.

O MODELO DE ENDOMETRIOSE - TÉCNICA

Para induzir hipertrofia endometrial e facilidade de realização dos transplantes, cada animal recebeu 18 a 24h antes do procedimento cirúrgico 30 µg/rata de benzoato de estradiol (Sigma Co) s. c., em óleo de girassol. A anestesia foi induzida e mantida com éter dietílico. As ratas anestesiadas são posicionadas em decúbito dorsal, a superfície abdominal é depilada e limpa com álcool. A laparotomia é realizada em condições semi-assépticas através de incisão que se origina a cerca de 1 cm do púbis e se estende cranialmente por 2 ou 3 cm na linha mediana. O trato reprodutor é examinado para confirmação da normalidade. O corno uterino direto é ressecado após ligadura proximal e distal ao ovário respectivamente com linha de nylon 5-0 (ETHICON, Johnson e Johnson). Depois de ressecado, o corno uterino é colocado em solução de ringer lactato previamente aerada, enquanto se procede a retirada dos restos de gordura e secção longitudinal do mesmo. Depois de aberto procura-se seccioná-lo em quatro pedaços de pesos e tamanhos aproximados. Um deles é pesado e serve, após cálculo da média do grupo como controle do

peso inicial. Usando-se ainda sutura de nylon 5-0, se fixa outros três pedaços em locais estratégicos do trato reprodutor: (01) ligamento útero-ovariano direito, a meio cm aproximadamente do ovário, (02) a meio cm lateral ao corno restante, aproveitando sua vascularização e (03) no peritônio parietal anterior a direita, cerca de 1 cm da incisão abdominal. Cuida-se de suturar a superfície serosa do coto uterino de forma a manter a superfície endometrial para a cavidade abdominal. O abdome é limpo com ringer lactato e a parede abdominal é suturada em dois planos com pontos separados de nylon 4-0 **(Figuras 1 e 2)** (MEDEIROS, 1992).

CONTROLE FALSO-OPERADOS

Procedimentos gerais semelhantes ao descrito anteriormente serão realizados, exceto que durante o ato cirúrgico, o útero e mesossalpinge seriam massageados com a ponta dos dedos durante alguns segundos, o corno uterino direito será descartado após sua exérese e pontos simples de sutura de nylon 5-0 serão apostos nos mesmos locais onde teriam sido implantados os cotos endometriais.

EVOLUÇÃO DOS IMPLANTES ENDOMETRIÓTICOS

Ao final de 15 dias da implantação endometrial, os animais serão pesados e sacrificados por deslocamento cervical. Os tecidos implantados serão descritos macroscopicamente, removidos por dissecação sob visão de lupa com dois aumentos e pesados. O resultado dos pesos, corrigidos em gramas de tecido endometriótico para 100g de peso animal (peso relativo). Cada implante excisado será fixado em formalina neutra a 10% e examinado histologicamente após embebição com parafina e corado com hematoxilina e eosina, pela microscopia ótica.

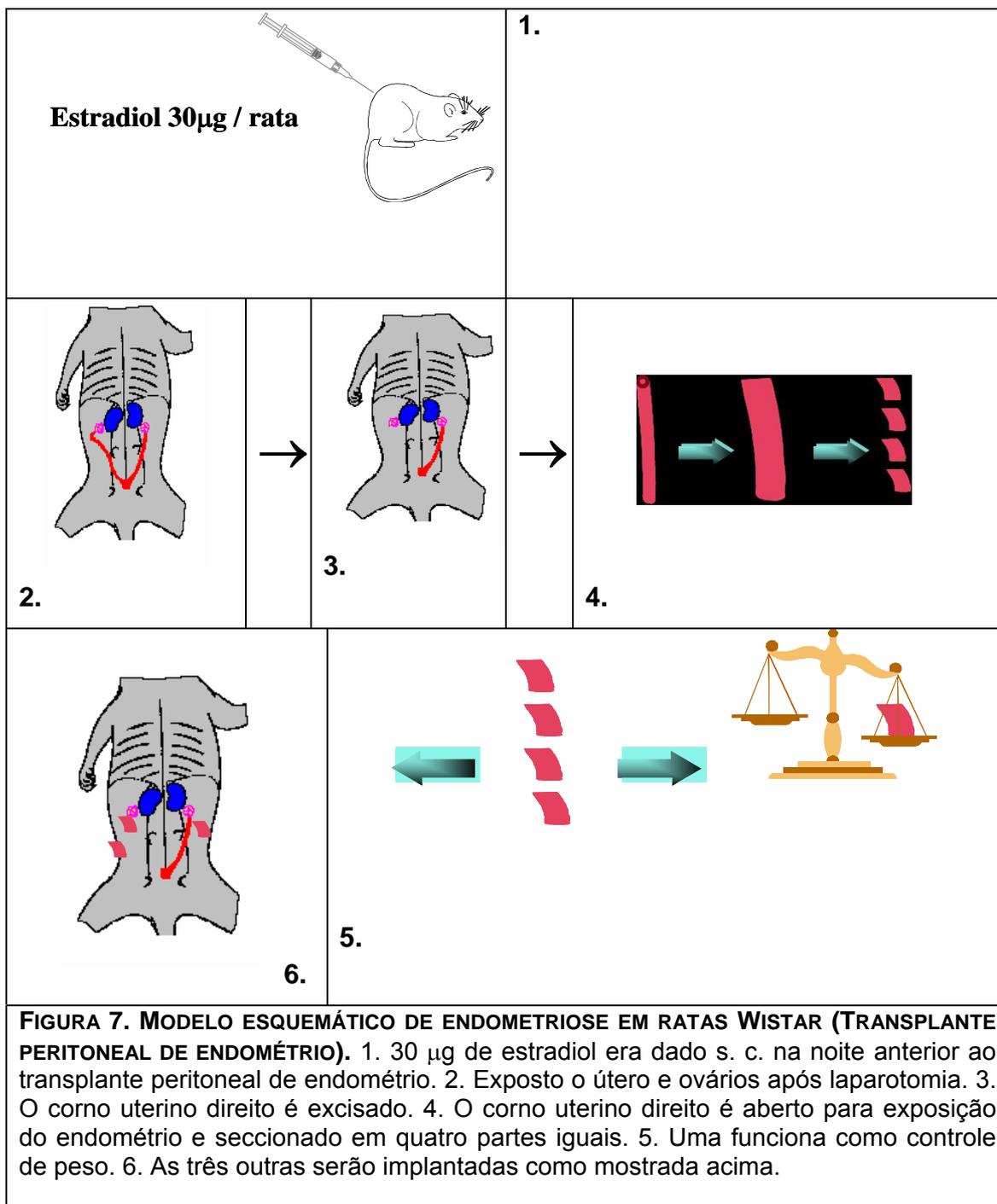
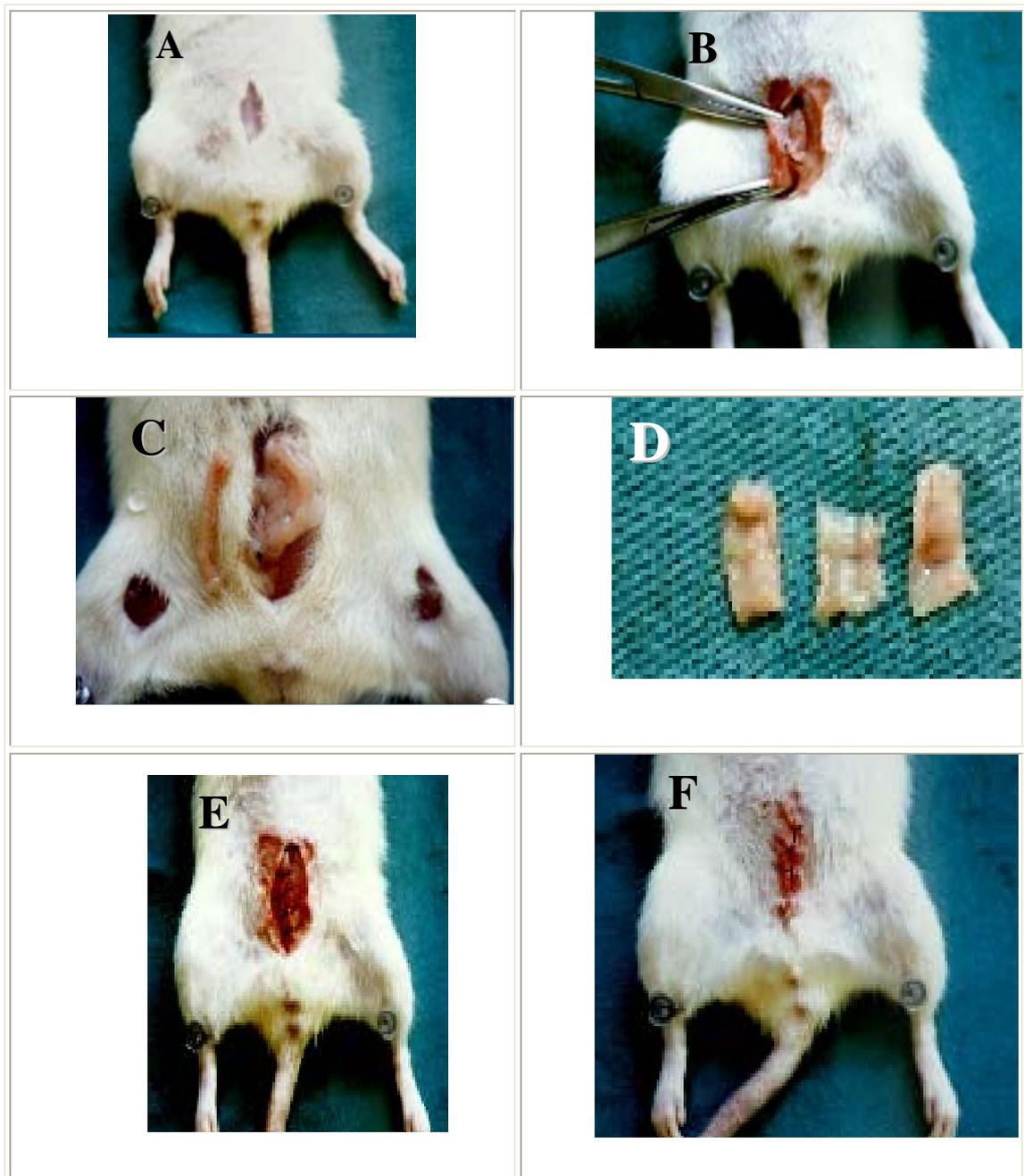


FIGURA 8. TÉCNICA CIRÚRGICA DO TRANSPLANTE PERITONEAL DE ENDOMÉTRIO EM RATOS. Hipertrofia endometrial realizada com 30 µg/rata de benzoato de estradiol 18 a 24h antes do procedimento cirúrgico. A anestesia com éter dietílico. A laparotomia é realizada em condições semi-assépticas através de incisão que se origina a cerca de 1 cm do púbis e se estende cranialmente por 2 ou 3 cm na linha mediana. O trato reprodutor é examinado para confirmação da normalidade. O corno uterino direito é ressecado após ligadura proximal e distal ao ovário respectivamente com linha de nylon 5-0. O corno uterino é colocado em solução de ringer lactato aerada, para a retirada dos restos de gordura e secção longitudinal do mesmo. Depois de aberto secciona-se em quatro pedaços de tamanhos aproximados. Um deles é pesado para cálculo da média do grupo controle do peso inicial. Usando-se ainda sutura de nylon 5-0, se fixa outros três pedaços em locais estratégicos do trato reprodutor: (01) ligamento útero-ovariano direito, a meio cm aproximadamente do ovário, (02) a meio cm lateral ao corno restante, aproveitando sua vascularização e (03) no peritônio parietal anterior a direita, cerca de 1 cm da incisão abdominal. Sutura-se a superfície serosa de forma a manter a superfície endometrial para a cavidade abdominal. O abdome é limpo com ringer lactato e a parede abdominal é suturada em dois planos com pontos separados de nylon 4-0 (Figuras 1 e 2).



TESTES PARA VERIFICAÇÃO DA DOR

Teste Nociceptivo

A atividade nociceptiva era testada usando-se o modelo das contorções abdominais em ratos – “*writhing model*” (COLLIER ET AL. 1968). Para esse

propósito utilizamos ácido acético, um estímulo nociceptivo bem conhecido (DUARTE ET AL. 1988; RIBEIRO ET AL. 2000). Os ratos tinham ácido acético (0,01 ml/kg de peso corporal de uma solução com concentração de 0,6%, volume/volume) injetado na cavidade peritoneal 30 minutos após os respectivos tratamentos no 15^o dia da indução da endometriose e eram colocados individualmente em grandes cilindros de vidro. A resposta nociceptiva consistia na contração dos músculos abdominais com alongamento dos membros posteriores. A intensidade da nocicepção era quantificada contando-se o número cumulativo de contorções que ocorressem entre o 10^o e o 30^o minuto após o estímulo. Os controles eram submetidos à injeção com solução fisiológica a 0,9%.

EFEITOS SOBRE A FERTILIDADE

EFEITOS DE DROGAS SOBRE A FERTILIDADE DE RATAS INTACTAS

As ratas testadas serão acasaladas com machos de fertilidade comprovada. Cada gaiola de acasalamento conterá um macho para três fêmeas. A ciclicidade reprodutiva de todas as ratas será examinada diariamente por esfregaços vaginais e o dia da concepção (dia 1) é determinado pela presença de espermatozóides no esfregaço vaginal direto. As ratas grávidas serão tratadas com a droga teste do 4^o ao 6^o dia de gravidez (RAO ET AL. 1994) e então sacrificadas por deslocamento cervical no 10^o dia de gravidez. Os resultados serão dados em número de fetos implantados (implantações embrionárias) por corno uterino e percentagem de ratas grávidas por grupo de animais testados.

EFEITOS DE DROGAS SOBRE A FERTILIDADE DE RATAS TRATADAS CRONICAMENTE

EFEITO SOBRE A IMPLANTAÇÃO OVULAR

As ratas endometrióticas tratadas e controles serão postas a cruzar com machos de fertilidade comprovada. Cada gaiola de acasalamento conterá um macho para três fêmeas. A ciclicidade reprodutiva de todas as ratas será examinada diariamente por esfregaços vaginais e o dia da concepção (dia 1) é

determinado pela presença de espermatozóides no esfregaço vaginal direto. As ratas grávidas serão então sacrificadas por deslocamento cervical no 10º dia de gravidez e contado o número de fetos implantados por corno uterino e percentagem de ratas grávidas por grupo de animais testados.

EFEITOS DE ALGUMAS DROGAS SOBRE A O IMPLANTE ENDOMETRIÓTICO PERITONEAL (ENDOMETRIOSE)

Os efeitos das drogas sobre a endometriose serão verificados após tratamento pelas várias vias de administração por um período de dez dias, do 5º ao 14º dia. Ao fim de cada tratamento, no 15º dia, os animais serão sacrificados, seus implantes, "endometriomas", serão pesados e estudados histologicamente.

Atividade da sintase de óxido nítrico no tecido endometrial ectópico

Os ratos (seis por grupo) foram sacrificados nos dias 5º, 10º e 15º do implante peritoneal de endométrio. Os endometriomas foram excisados e congelados em nitrogênio líquido para observar a atividade da NO-sintase mensurada pela técnica da citrulina marcada com ³H, oriunda da L-arginina marcada (³H-labelled citrulline from labelled L-arginine). A sintase de óxido nítrico foi expressa como pmol de ³H-citrulina/mg proteína/minuto (SALHAB ET AL. 2000).

ENSAIO DO CONTEÚDO DE TNF- α NO LÍQUIDO PERITONEAL

Os animais tiveram suas cavidades peritoneais lavadas com solução salina (3ml/cavidade) e o exsudato centrifugado a 300g por 10 minutos. As concentrações de TNF- α nos sobrenadantes foram determinadas por Elisa como descrita por CUNHA ET AL, 1993. Sumariamente, cubetas foram encubadas por 12 h (overnight) a 4°C com anticorpo anti-TNF- α (10 μ g/ml). Após lacradas as placas, as amostras e o padrão em varias diluições foram adicionadas em duplicata e encubadas a 4°C por 24h. As placas foram lavadas três vezes com tampão e um Segundo anticorpo policlonal contra TNF-

α diluído de 1/1000 foi adicionado (100 μ l/well). Após encubação posterior a temperatura ambiente por 1 hora, as placas foram lavadas e 100 μ l de peroxidase (avidin-horseradish) diluída de 1:5000 foi adicionada. Cem μ l de um reagente de cor, OPD (orthophenylenediamina) foi adicionado 15 minutos mais tarde e as placas foram encubadas no escuro, a 37°C por 15 a 20 minutos. A reação enzimática foi parada com H₂SO₄ e lida com uma absorvância de 490 nM. Os resultados são reportados como medias \pm EPM de quatro cubetas (wells) e os experimentos foram repetidos duas vezes.

EFEITOS DE DROGAS SOBRE O EDEMA UTERINO E SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR EM RATAS IMATURAS

Para a avaliação do edema, os animais receberam dose única s. c. de 10 μ g de etinil estradiol do Sigma (E₂); após 6h foram sacrificados e os pesos uterinos úmidos (PU) obtidos. Na avaliação da proliferação celular, os animais receberam doses diárias s.c. de 3 μ g de E₂ s.c. durante 3 dias, ao final dos quais (no 4º dia) foram sacrificados e os pesos uterinos secos (PS) obtidos (RAO ET AL. 1995).

ANALISE ESTATÍSTICA

Os resultados eram reportados como média \pm E. P. M. (erro padrão da média) para no mínimo seis animais em cada grupo ou em percentagem. A análise estatística era realizada através de ANOVA (análise de variância) seguido do teste de Tukey ou Bonferroni, ou ainda ao Qui-quadrado, quando aplicável. As diferenças entre os grupos eram consideradas significativas se $P < 0,05$.

DROGAS UTILIZADAS

1. Acido acetil salicilico
2. Dexametasona

3. Estradiol sigma
 - a. Indometacina
4. L-Arginina
5. L-Name
6. Meloxican
7. Nabumetona
8. Pentoxifilina
9. Piroxican
10. Soro Fisiológico a 0,9%
11. Talidomida

RESULTADOS

Os resultados serão demonstrados em quatro blocos para melhor entendimento e facilitar a discussão. Serão os estudos dos objetivos descritos anteriormente:

BLOCO 1. REVALIDAÇÃO DO MODELO DE ENDOMETRIOSE POR TRANSPLANTES AUTÓLOGOS DE ENDOMÉTRIO AO PERITÔNIO.

BLOCO 2. PAPEL DE METABÓLITOS DAS CICLOOXIGENASES 1 E 2 (COX-1 E COX-2) NO DESENVOLVIMENTO DE IMPLANTES ECTÓPICOS PERITONEAIS DE ENDOMÉTRIO EM RATAS E SUAS REPERCUSSÕES SOBRE A DOR E A FERTILIDADE.

BLOCO 3. IMPLICAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE IMPLANTES ECTÓPICOS PERITONEAIS DE ENDOMÉTRIO EM RATAS E SUAS REPERCUSSÕES SOBRE A DOR E A FERTILIDADE.

BLOCO 4. ENVOLVIMENTO DO TNF- α SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE IMPLANTES ECTÓPICOS PERITONEAIS DE ENDOMÉTRIO EM RATAS E SUAS REPERCUSSÕES SOBRE A DOR E A FERTILIDADE.

**Bloco 1. REVALIDAÇÃO DO MODELO DE
ENDOMETRIOSE POR TRANSPLANTES
AUTÓLOGOS DE ENDOMÉTRIO AO
PERITÔNIO.**

1. BLOCO 1. REVALIDAÇÃO DO MODELO DE ENDOMETRIOSE POR TRANSPLANTES AUTÓLOGOS DE ENDOMÉTRIO AO PERITÔNIO.

1. 1. Evolução dos implantes peritoneais de endométrio (endometriomas), macroscopia e microscopia.

Os procedimentos cirúrgicos para indução da endometriose com o transplante peritoneal de endométrio foram bem tolerados em todos os animais e o transplante de tecido endometrial foi quase sempre um sucesso. No exame macroscópico (Figura 9), os implantes endometrióticos apareceram bem vascularizados, com conteúdo hemorrágico, massas sólidas ou cistos multiloculados cheios de material fluido seroso, consistente com endometriose.

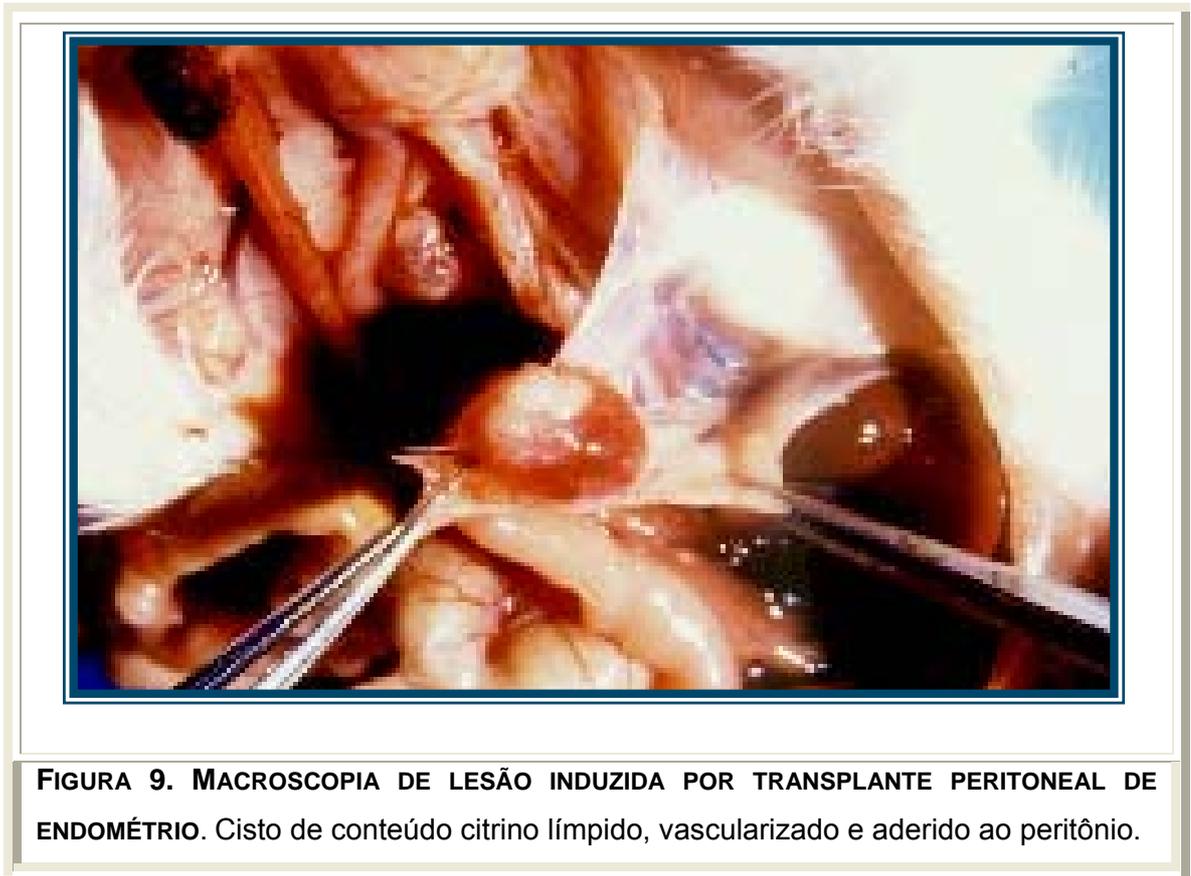


FIGURA 9. MACROSCOPIA DE LESÃO INDUZIDA POR TRANSPLANTE PERITONEAL DE ENDOMÉTRIO. Cisto de conteúdo citrino límpido, vascularizado e aderido ao peritônio.

Amostras histológicas realizadas aleatoriamente demonstraram glândulas e estroma endometriais típicas de lesões endometrióticas (Figura 10). Esses resultados são válidos para todos os outros blocos a seguir e validam o modelo macroscópico e histologicamente.



FIGURA 10. BLOCOS HISTOLÓGICOS CORADOS EM HEMATOXILINA E EOSINA. Demonstram-se glândulas e estroma endometriais, cistificados. Visualiza-se desgarramento de epitélio em bloco e células soltas isoladas. 40X.

1. 2. Evolução dos transplantes peritoneais de endométrio tempo-dependente

Os implantes endometriais para o peritônio desenvolveram-se com crescimento dependente do tempo cujos pesos relativos foram significativamente diferentes nos dias examinados (1^o, 10^o e 15^o), respectivamente $0,075 \pm 0,001g\%$; $0,250 \pm 0,150g\%$ e $0,550 \pm 0,210g\%$ (Figura 11).

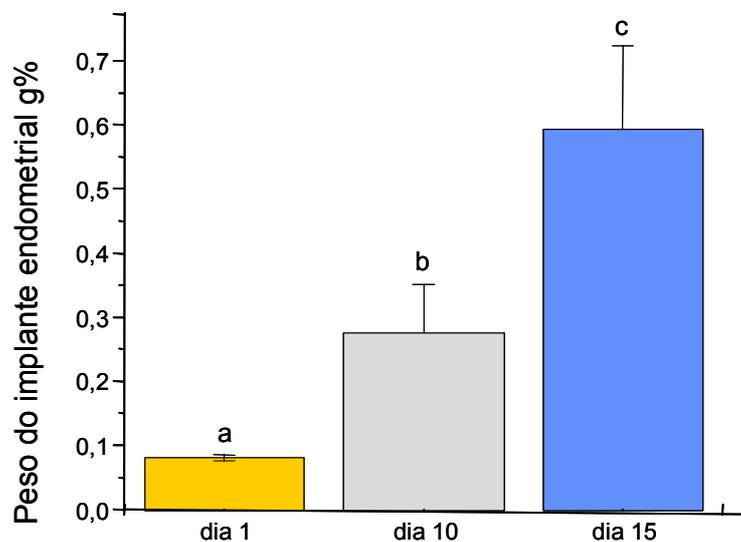


FIGURA 11. CRESCIMENTO TEMPO-DEPENDENTE DE AUTOTRANSPLANTES DE ENDOMÉTRIO NO PERITÔNIO DE RATAS COMO MODELO DE ENDOMETRIOSE.

Os resultados mostram média de pesos úmidos (g%) dos implantes peritoneais de 12 animais para cada tempo (1^o, 10^o e 15^o dias). Letras diferentes significam médias significativamente diferentes. ANOVA (análise de variância) seguido do teste de Tukey, $P < 0,05$.

1. 3. Efeito do desenvolvimento dos transplantes peritoneais de endométrio sobre a fertilidade

O GRUPO DE ANIMAIS QUE RECEBEU O IMPLANTE PERITONEAL DE ENDOMÉTRIO E FOI TRATADO COM SALINA A 0,9% DEMONSTROU UMA REDUÇÃO DRAMÁTICA NA PERCENTAGEM DE RATAS GRÁVIDAS E NA MÉDIA DO NÚMERO DOS EMBRIÕES IMPLANTADOS QUANDO COMPARADOS AO CONTROLE CIRÚRGICO (FALSO-OPERADO) E AOS ANIMAIS INTACTOS. RATAS INTACTAS SUBMETIDAS AO TESTE DA IMPLANTAÇÃO EMBRIONÁRIA RESULTARAM EM 100% DE GRAVIDEZ COM MÉDIA DE $4,37 \pm 0,18$ EMBRIÕES POR CORNO UTERINO. O GRUPO DE ANIMAIS FALSO-OPERADOS FICOU

TAMBÉM SEM DIFERENÇA SIGNIFICATIVA, COM 100% DE GRAVIDEZ E MÉDIA DE $4,33 \pm 0,86$ EMBRIÕES POR CORNO UTERINO. HOVE UMA QUEDA DRÁSTICA E SIGNIFICANTE NOS ANIMAIS COM IMPLANTES PERITONEAIS DE ENDOMÉTRIO COM APENAS 20% DE RATAS GRÁVIDAS E $1,83 \pm 0,86$ EMBRIÕES POR CORNO UTERINO (FIGURAS 12 E 13).

1. 4. Efeito do desenvolvimento dos transplantes peritoneais de endométrio sobre a nocicepção

Todos os grupos tratados tiveram as dores avaliadas pelo teste de contorções abdominais induzidas com ácido acético. No grupo intacto, contabilizamos $16 \pm 3,27$ contorções abdominais em 20 minutos; no grupo falso-operado (FO) contou-se $18,7 \pm 3,24$ contorções em 20 minutos e no grupo com transplante peritoneal de endométrio não tratado obtivemos $30,5 \pm 3,57$ contorções em 20 minutos (Figura 14).

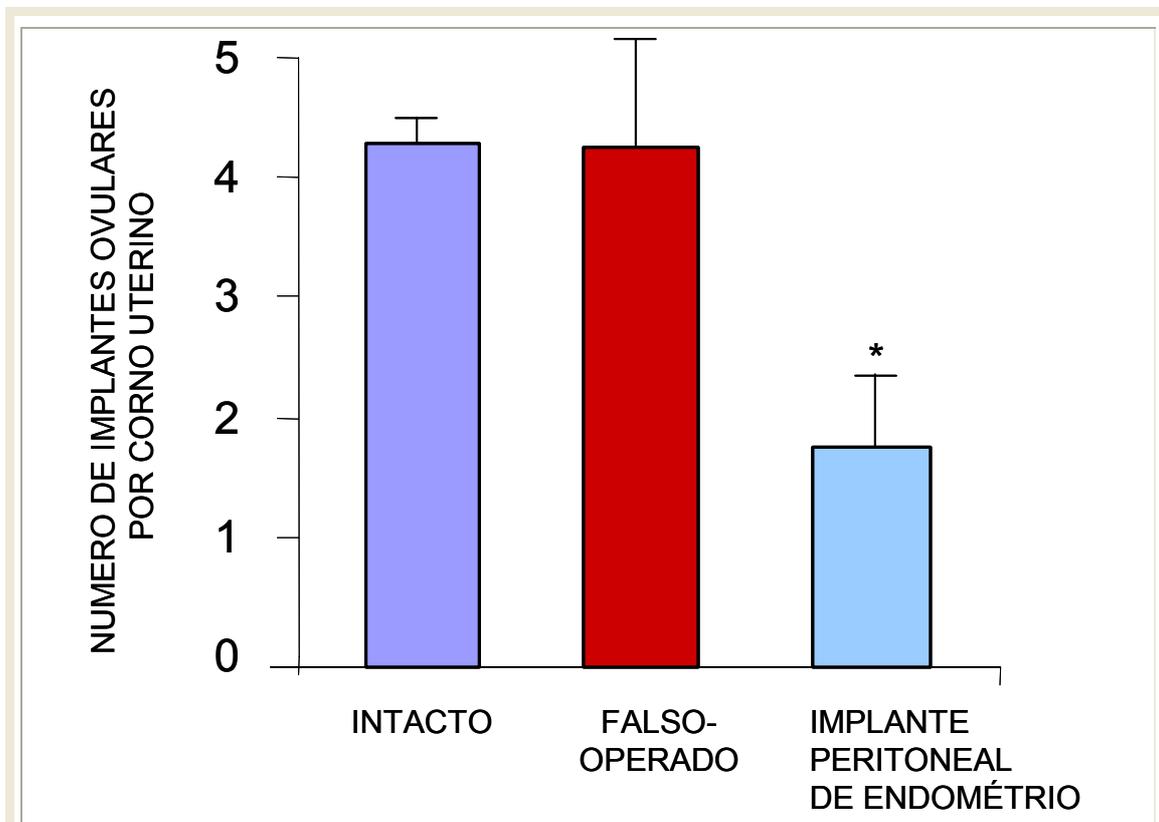


FIGURA 12. EFEITO DO DESENVOLVIMENTO DOS TRANSPLANTES PERITONEAIS DE ENDOMÉTRIO SOBRE A FERTILIDADE (NÚMERO DE IMPLANTAÇÕES OVULARES POR CORNO UTERINO).

INTACTO representa animais normais, íntegros, sem qualquer manipulação cirúrgica. * significa média significativamente diferente. ANOVA (análise de variância) seguido do teste de Tukey, $P < 0,05$.

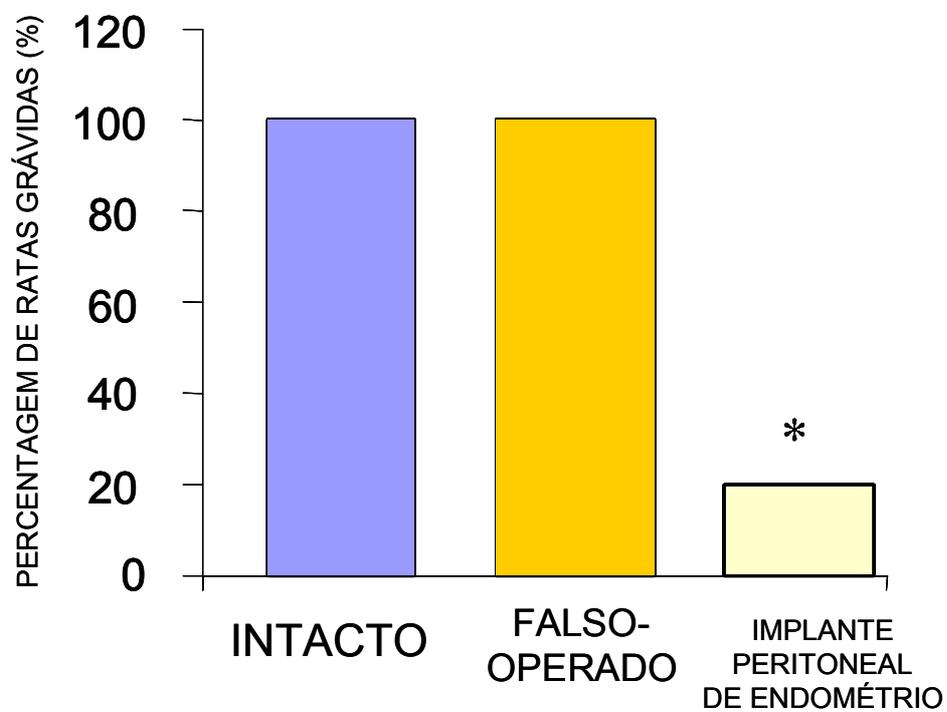
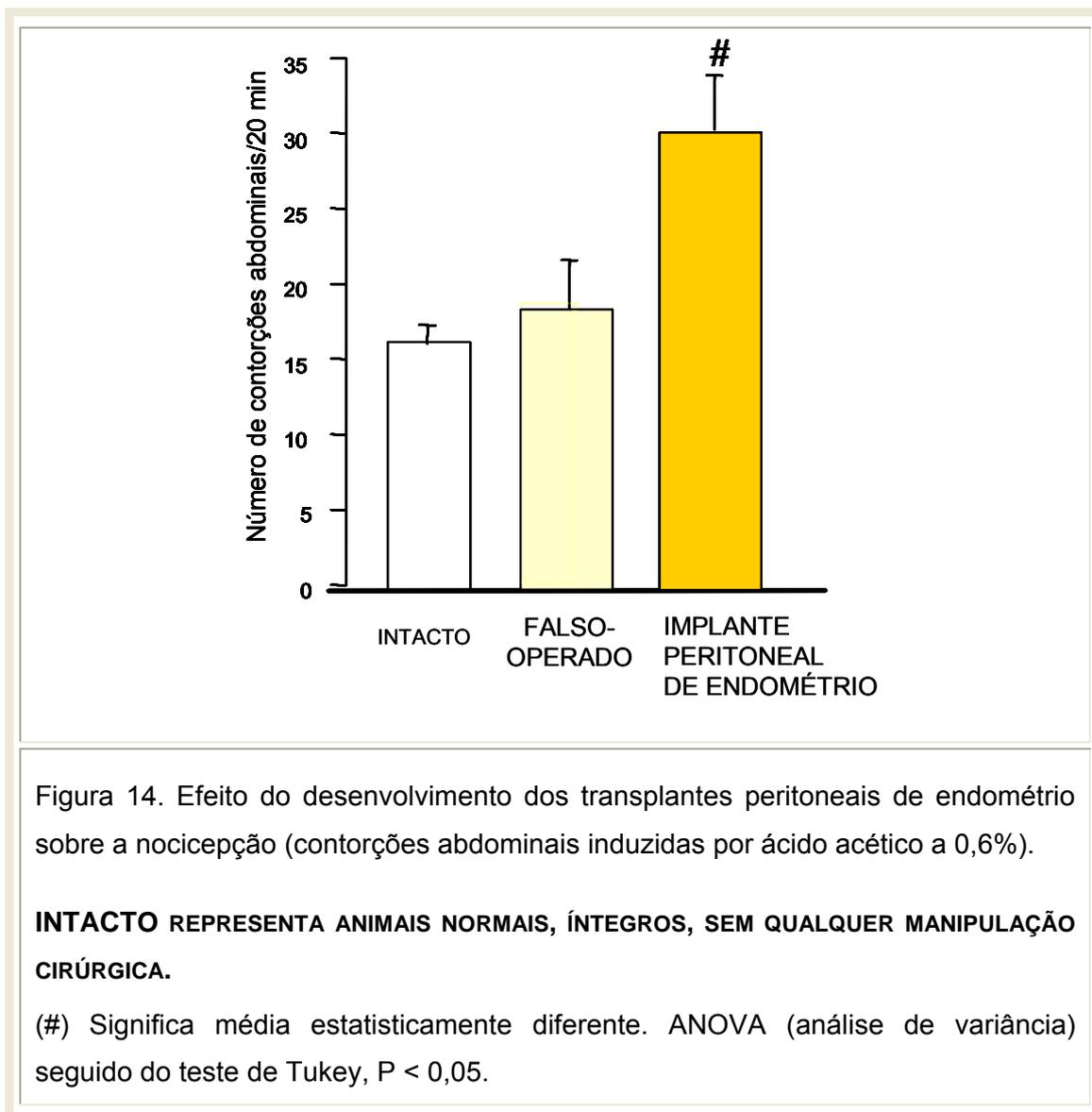


Figura 13. Efeito do desenvolvimento dos transplantes peritoneais de endométrio sobre a fertilidade (percentagem de ratas grávidas).

INTACTO representa animais normais, íntegros, sem qualquer manipulação cirúrgica. (*) Resultado significativamente diferente. Qui-quadrado.



Os resultados acima mostram um modelo factível como já previamente demonstrado em nossa dissertação de Mestrado com o estabelecimento de lesão macroscópica e histológica demonstrável e de evolução gradativa no tempo com repercussões sobre a fertilidade e nocicepção a semelhança da endometriose Humana (MEDEIROS, 1992).

Bloco 2. PAPEL DE METABÓLITOS DAS CICLOOXIGENASES 1 E 2 (COX-1 E COX-2) NO DESENVOLVIMENTO DE IMPLANTES ECTÓPICOS (PERITONEAIS) DE ENDOMÉTRIO EM RATAS E SUAS REPERCUSSÕES SOBRE A DOR E A FERTILIDADE.

2. BLOCO 2. PAPEL DE METABÓLITOS DAS CICLOOXIGENASES 1 E 2 (COX-1 E COX-2) NO DESENVOLVIMENTO DE IMPLANTES ECTÓPICOS PERITONEAIS DE ENDOMÉTRIO EM RATAS E SUAS REPERCUSSÕES SOBRE A DOR E A FERTILIDADE.

2. 1. DROGAS E TRATAMENTOS

Os animais foram divididos em vários grupos (12 a 20 por grupos) e tratados com aspirina (AAS; 30mg/kg), piroxicam (PIRO; 1,0 mg/kg) e indometacina (INDO; 2,0 mg/kg), considerados inibidores seletivos preferenciais de COX-1, e com dois inibidores preferenciais de COX-2 (PAIRET ET AL, 1996), meloxicam (MELOX; 0,4 mg/kg) e nabumetona (NAB; 5,0 e 15 mg/kg). Todas as drogas foram dadas por via oral e o tratamento feito por 10 dias, do 5^o ao 14^o dia do implante peritoneal de endométrio. Todas as drogas foram diluídas em salina estéril a 0,9% (w/v).

2. 2. PAPEL DE METABÓLITOS DAS CICLOOXIGENASES 1 E 2 (COX-1 E COX-2) NO DESENVOLVIMENTO DE IMPLANTES ECTÓPICOS PERITONEAIS DE ENDOMÉTRIO (ENDOMETRIOMAS) EM RATAS.

Os implantes ectópicos após excisados foram pesados e seus pesos úmidos relativos (g%) foram significativamente reduzidos pelo tratamento com aspirina (30mg/kg) e Nabumetona (15mg/kg) [Figura 15]. Indometacina e Piroxicam não reduziram o desenvolvimento dos endometriomas, ao contrário a Indometacina aumentou significativamente a lesão. Com relação aos endometriomas, a média dos pesos dos grupos foi de $0,595 \pm 0,085$ (g%) para o grupo controle enquanto que para o tratado com AAS foi de $0,122 \pm 0,019$ g%; para o Meloxicam, foi de $0,387 \pm 0,04$ g%; para a Indometacina, $2,058 \pm 0,96$ g%; para o Nabumetona (5mg/Kg), $0,252 \pm 0,032$ g% e para Nabumetona (15mg/Kg), $0,135 \pm 0,03$ g%.

Apesar de não significativa a diminuição ou aumento que houve com outras drogas inibidoras da COX, resolvemos re-demonstrar esses resultados de forma diferente, pois talvez houvesse relevância clínica na seleção dessas drogas como analgésicas em indivíduos endometrióticos (Figura 16).

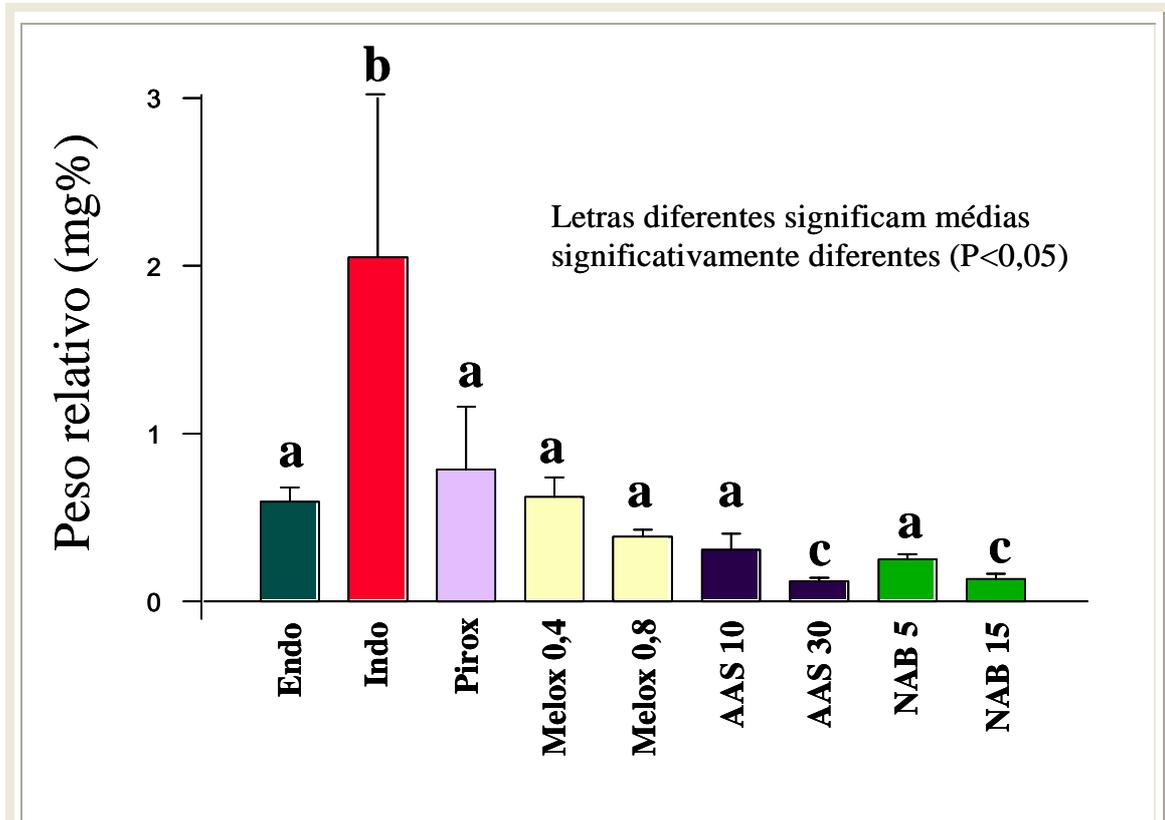


FIGURA 15. EFEITO DO TRATAMENTO COM DROGAS INIBIDORAS RELATIVAS DE COX-1 E COX-2 SOBRE O CRESCIMENTO (DESENVOLVIMENTO) DE TRANSPLANTES PERITONEAIS DE ENDOMÉTRIO EM RATAS.

Os dados são de médias de pesos úmidos relativos mg% após 10 dias de tratamento. **Endo** significa grupo controle com implante endometrial peritoneal tratada com salina 0,9%. **Indo**, grupo tratado com Indometacina 2mg/kg e **Pirox**, grupo tratado 1mg/kg. **Melox**, representa meloxicam nas doses de 0,4 e 0,8 mg/kg, AAS, ácido acetil salicílico nas doses de 10 e 30 mg/Kg. NAB para nabumetona nas doses de 5 e 15 mg/Kg.

Letras diferentes significam médias significativamente diferentes. ANOVA (análise de variância) seguido do teste de Bonferroni. As diferenças entre os grupos eram consideradas significativas se $P < 0,05$. Endo representa transplante peritoneal de endométrio.

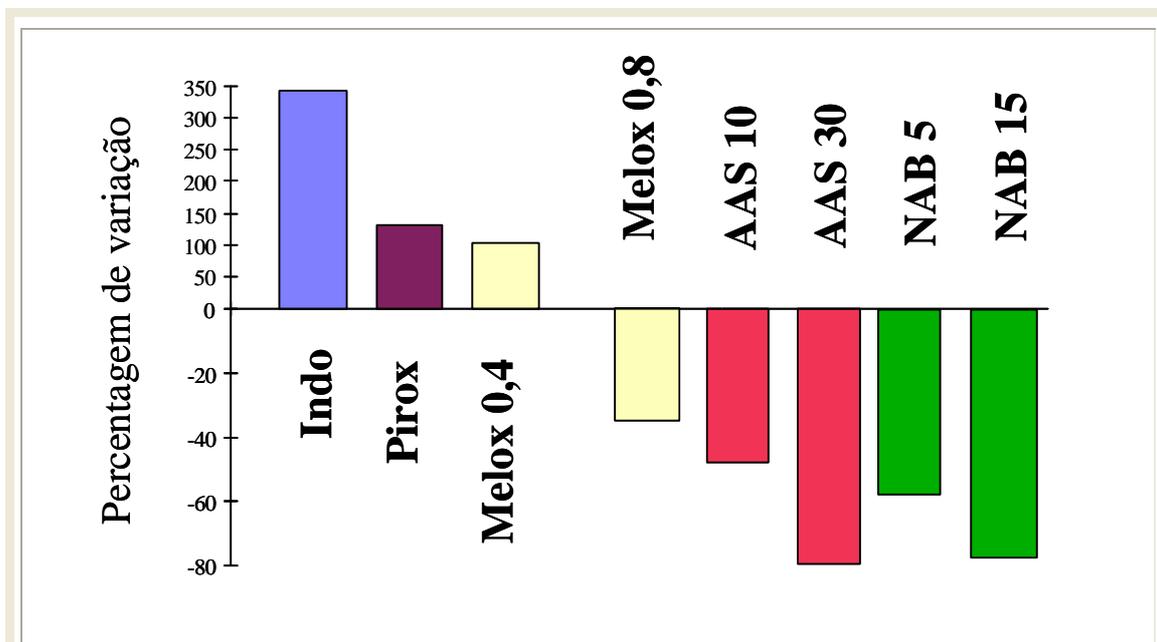


FIGURA 16. EFEITO DO TRATAMENTO COM DROGAS INIBIDORAS RELATIVAS DE COX-1 E COX-2 SOBRE O CRESCIMENTO (DESENVOLVIMENTO) DE TRANSPLANTES PERITONEAIS DE ENDOMÉTRIO EM RATAS.

Os dados são de médias de pesos úmidos relativos mg% após 10 dias de tratamento. **Endo** significa grupo controle com implante endometrial peritoneal tratada com salina 0,9%. **Indo**, grupo tratado com Indometacina 2mg/kg e **Pirox**, grupo tratado 1mg/kg. **Melox**, representa meloxicam nas doses de 0,4 e 0,8 mg/Kg. **AAS**, ácido acetil salicílico nas doses de 10 e 30 mg/Kg. **NAB** para nabumetona nas doses de 5 e 15 mg/Kg.

Letras diferentes significam médias significativamente diferentes. ANOVA (análise de variância) seguido do teste de Bonferroni. As diferenças entre os grupos eram consideradas significativas se $P < 0,05$. Endo representa transplante peritoneal de endométrio.

2. 3. Efeito do tratamento com inibidores seletivos relativos de COX-1 e COX-2 sobre os eventos reprodutivos em ratas intactas e ratas com transplante peritoneal de endométrio

2. 3. 1. EFEITO DO TRATAMENTO COM INIBIDORES SELETIVOS RELATIVOS DE COX-1 E COX-2 SOBRE OS EVENTOS REPRODUTIVOS EM RATAS INTACTAS

O número de implantes ovulares por ratas intactas ($10,0 \pm 0,2$) teve queda significativa com o uso de Indometacina ($4,0 \pm 1,0$) e Piroxicam ($4,0 \pm 0,5$) e não foram alterados pelo uso de Aspirina, Nabumetona ou Meloxicam (Figura 17). Por outro lado quando se avaliou a percentagem de ratas grávidas, interferiram significativamente negativas, além do Piroxicam (50%) e Indometacina (50%), o Meloxicam pareceu ter efeito dose-dependente (0,4 e 0,8 mg/Kg), com diminuição significativa de respectivamente 60 e 40% (Figura 18).

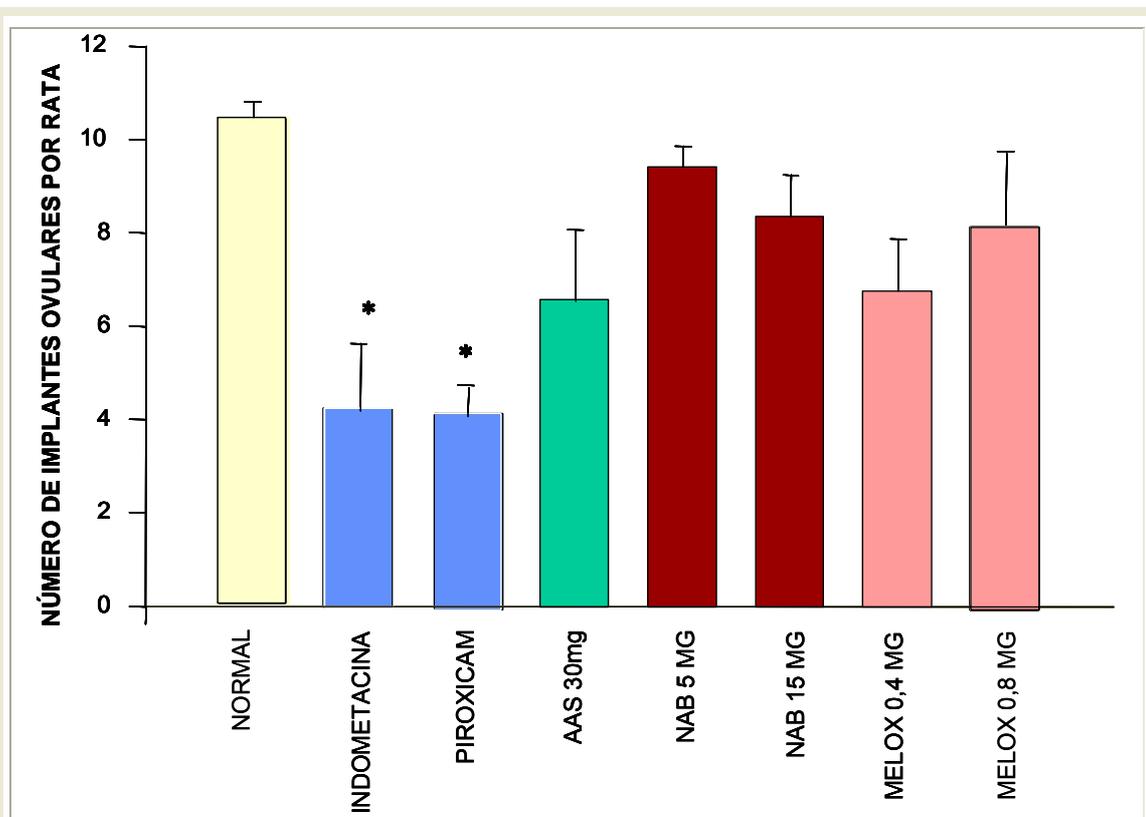


FIGURA 17. EFEITO DO TRATAMENTO COM DROGAS INIBIDORAS RELATIVAS DE COX-1 E COX-2 SOBRE A FERTILIDADE DE RATAS INTACTAS (NÚMERO DE IMPLANTES OVULARES POR RATA).

NORMAL significa ratas intactas sem quaisquer procedimentos cirúrgicos, tratados com salina 0,9%. Os dados são de médias do número de implantes ovulares por ratas. **Indometacina**, grupo tratado com Indometacina 2mg/kg e **Piroxicam**, grupo tratado 1mg/kg. **Melox** representa meloxicam nas doses de 0,4 e 0,8 mg/Kg. **AAS**, ácido acetil salicílico na dose de 30 mg/Kg. **NAB** para nabumetona nas doses de 5 e 15 mg/Kg. As drogas eram administradas no 4^o, 5^o e 6^o dias da gravidez.

(*) Significativamente diferente. ANOVA (análise de variância) seguido do teste de Tukey. As diferenças entre os grupos eram consideradas significativas se $P < 0,05$.

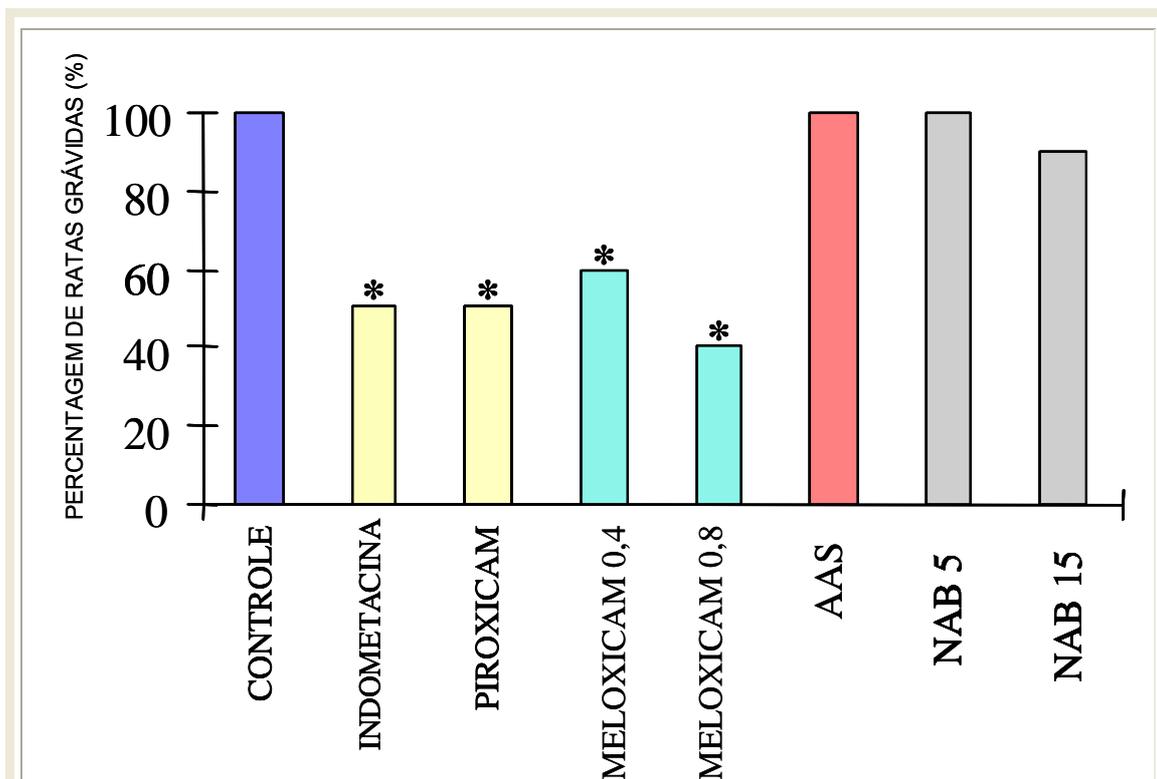


FIGURA 18. EFEITO DO TRATAMENTO COM DROGAS INIBIDORAS RELATIVAS DE COX-1 E COX-2 SOBRE A FERTILIDADE DE RATAS INTACTAS (PERCENTAGEM DE RATAS GRÁVIDAS)

CONTROLE significa ratas intactas (sem qualquer procedimento cirúrgico) tratadas com salina 0,9%. Os dados são de percentagem de ratas grávidas no grupo.

Indometacina, grupo tratado com Indometacina 2mg/kg e **Piroxicam**, grupo tratado 1mg/kg. **Meloxicam** representa meloxicam nas doses de 0,4 e 0,8 mg/Kg, **AAS**, ácido acetil salicílico na dose de 30 mg/Kg. **NAB** para nabumetona nas doses de 5 e 15 mg/Kg. As drogas eram administradas no 4º, 5º e 6º dias da gravidez.

(*) Significativamente diferentes. Qui-quadrado. As diferenças entre os grupos eram consideradas significativas se $P < 0,05$.

2. 3. 2. EFEITO DO TRATAMENTO COM INIBIDORES SELETIVOS RELATIVOS DE COX-1 E COX-2 SOBRE OS EVENTOS REPRODUTIVOS EM RATAS COM TRANSPLANTE PERITONEAL DE ENDOMÉTRIO

A percentagem de ratas grávidas (fertilidade) foi de 40% para o grupo com transplante peritoneal de endométrio (endometriose) não tratado, 100% para o grupo controle intacto, 100% para o falso-operado. Os grupos tratados com Indometacina e Meloxicam não obtiveram uma gravidez, sequer. O grupo tratado com Aspirina e os grupos tratados com Nabumetona (5 e 15 mg/Kg) obtiveram respectivamente 60%, 50 e 58% de ratas grávidas (Figuras 19 e 20).

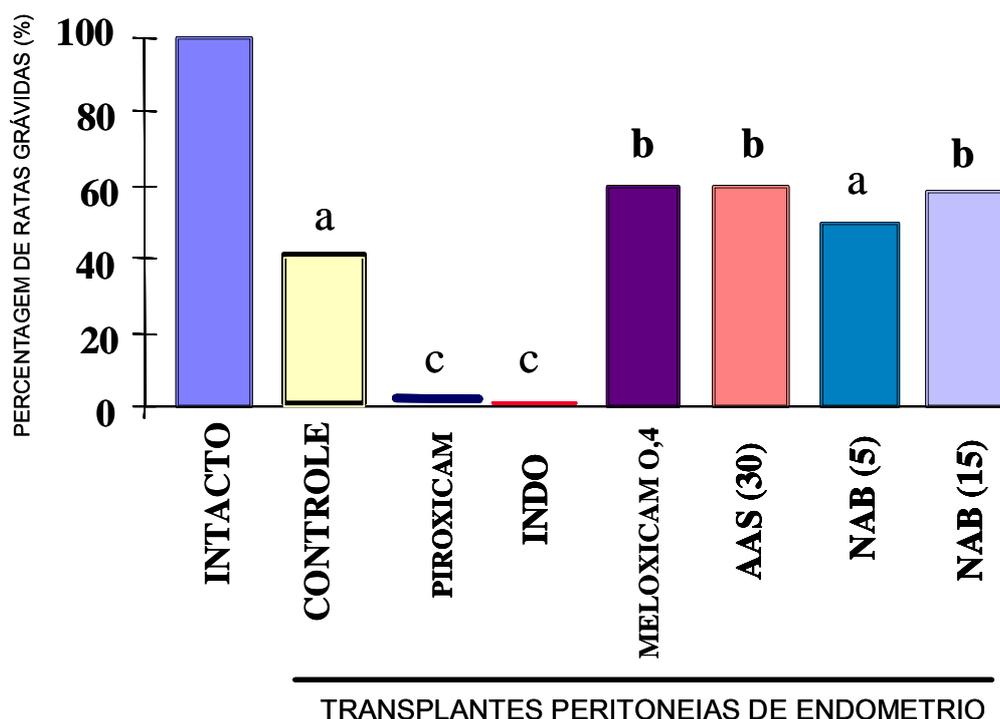


FIGURA 19. EFEITO DO TRATAMENTO COM DROGAS INIBIDORAS RELATIVAS DE COX-1 E COX-2 SOBRE A FERTILIDADE DE RATAS COM TRANSPLANTES PERITONEAIS DE ENDOMÉTRIO (PERCENTAGEM DE RATAS GRÁVIDAS).

Os dados são de percentagem de ratas grávidas no grupo.

INTACTA significa ratas intactas (sem qualquer procedimento cirúrgico)

CONTROLE significa ratas com transplante peritoneal de endométrio tratadas com salina 0,9%. **INDO**, grupo tratado com Indometacina 2mg/kg e **Piroxicam**, grupo tratado 1mg/kg. **Meloxicam**, representa meloxicam nas doses de 0,4 mg/kg, **AAS**, ácido acetil salicílico na dose de 30 mg/Kg. **NAB** para nabumetona nas doses de 5 e 15 mg/Kg. As drogas eram administradas do 5º ao 14º dia de implante endometriótico. Daí em diante as ratas eram acasaladas com machos férteis e avaliadas diariamente para gravidez por 20 dias que se positiva, eram sacrificadas no 10º dia para verificar o número de ratas grávidas. As que não engravidavam em 20 dias eram computadas como não grávidas.

Letras distintas significam médias estatisticamente diferentes quando comparado ao grupo controle com transplante peritoneal de endométrio. Qui-quadrado. As diferenças entre os grupos eram consideradas significativas se $P < 0,05$.

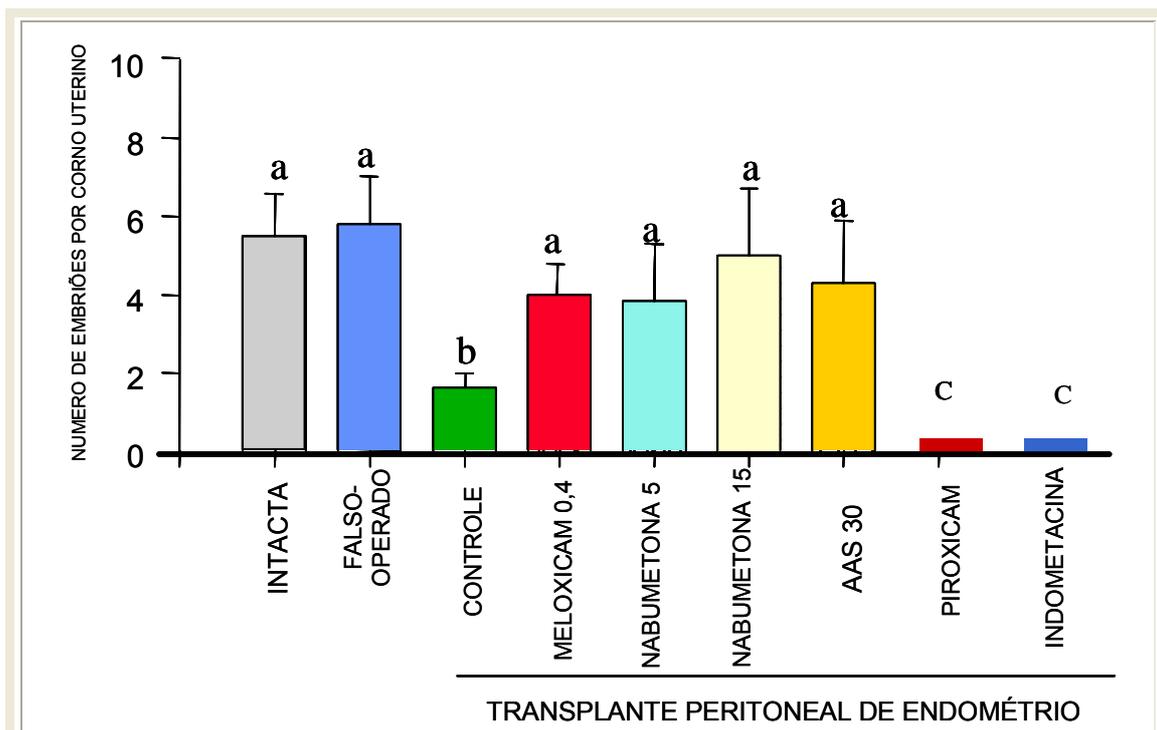


FIGURA 20. EFEITO DO TRATAMENTO COM DROGAS INIBIDORAS RELATIVAS DE COX-1 E COX-2 SOBRE A FERTILIDADE DE RATAS COM TRANSPLANTES PERITONEAIS DE ENDOMÉTRIO (NÚMERO DE IMPLANTES OVULARES POR CORNO UTERINO).

Os dados são médias do número de embriões por corno uterino por grupo.

INTACTA significa ratas intactas (sem qualquer procedimento cirúrgico).

FALSO-OPERADO: animais abertos e fechados depois de retirado um corno uterino sem entretanto realizar-se o implante peritoneal de endométrio.

CONTROLE, grupo de ratas com transplante peritoneal de endométrio tratado com salina 0,9%. **INDOMETACINA**, grupo tratado com Indometacina 2mg/kg e

PIROXICAM, grupo tratado 1mg/kg. **MELOXICAM** representa meloxicam na dose de 0,4 mg/kg, **AAS**, ácido acetil salicílico na dose de 30 mg/Kg. **NABUMETONA**

nas doses de 5 e 15 mg/Kg. As drogas eram administradas do 5^o ao 14^o dia de implante endometriótico. Daí em diante as ratas eram acasaladas com machos férteis e avaliadas diariamente para gravidez por 20 dias que se positiva, eram sacrificadas no 10^o dia para verificar o número de ratas grávidas. As que não engravidavam em 20 dias eram computadas como não grávidas. Letras distintas significam médias estatisticamente diferentes. ANOVA (análise de variância) seguido do teste de Bonferroni. As diferenças entre os grupos eram consideradas significativas se $P < 0,05$.

2. 3. 3. EFEITO DO TRATAMENTO COM DROGAS INIBIDORAS RELATIVAS DE COX-1 E COX-2 SOBRE O EDEMA UTERINO INDUZIDO POR ESTRADIOL EM RATAS IMATURAS

As drogas utilizadas foram o AAS (10 e 30mg/Kg, v.o. - um inibidor de seletividade intermédia entre as COXs); Indometacina (INDO, 2mg/Kg, v.o.) Piroxicam (1mg/Kg, v.o.), inibidor relativo específico para COX-1, Nabumetona (NAB, 5 e 15mg/Kg, v.o.) e Meloxicam (MEL, 0,4 e 0,8 mg/Kg, v.o.), ambos inibidores específicos relativos da COX-2. Nenhuma das drogas nas doses acima, isoladamente modificou significativamente o edema uterino de ratas imaturas (resultados omitidos). Os resultados mostraram para controle ($0,181 \pm 0,054$); para o grupo tratado com salina ($1,181 \pm 0,056$); para o grupo com Indometacina ($2,136 \pm 0,250$); para o com Piroxicam ($1,950 \pm 0,145$); para o AAS 10 e 30 mg respectivamente ($2,045 \pm 0,227$ e $1,040 \pm 0,043$); Para Nabumetona 5 e 15 mg respectivamente ($1,009 \pm 0,136$ e $1,136 \pm 0,131$) e finalmente para o Meloxicam 0,4 e 0,8 mg/Kg respectivamente ($1,178 \pm 0,068$ e $2,181 \pm 0,159$). Observou-se que a Indometacina aumentou o edema uterino em 80,1 e piroxicam em 65,11%; o AAS 10mg/Kg aumentou em 73,15%, o AAS 30mg/Kg diminuiu em 11,51% (ns), o Nabumetona diminuiu em 11,51 e 14,56% respectivamente para 5 e 15 mg/Kg. Já o Meloxicam não interferiu diminuindo com a dose de 0,4 mg/Kg mas aumentou em 84,67% com 0,8 mg/Kg (Figura 21).

2. 3. 4. EFEITO DO TRATAMENTO COM DROGAS INIBIDORAS RELATIVAS DE COX-1 E COX-2 SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR UTERINA INDUZIDA POR ESTRADIOL EM RATAS IMATURAS

Foram os seguintes os resultados para a proliferação celular uterina. Os animais intactos tiveram seus pesos uterinos secos em $0,280 \pm 0,057$ mg/g. Os animais tratados com salina tiveram a média do peso uterino seco de $0,971 \pm 0,142$ mg/g; o tratado com Indometacina, $0,942 \pm 0,057$ mg/g; o tratado com

Piroxicam $0,970 \pm 0,059$ mg/g; os grupos tratados com AAS 10 e 30 mg/Kg foram respectivamente de $0,885 \pm 0,085$ e $0,828 \pm 0,042$ mg/g; para os grupos tratados com Meloxicam 0,4 e 0,8 mg/Kg respectivamente $1,085 \pm 0,100$ e $0,657 \pm 0,071$ mg/g; para os grupos tratados com Nabumetona 5 e 15 mg/Kg foram de $0,600 \pm 0,041$ e $0,685 \pm 0,052$ mg/g. A Nabumetona, na dose de 5 mg diminuiu significativamente a proliferação celular em 38,20% (Figura 22). Nenhuma das drogas nas doses acima, isoladamente modificou significativamente a proliferação celular uterina de ratas imaturas.

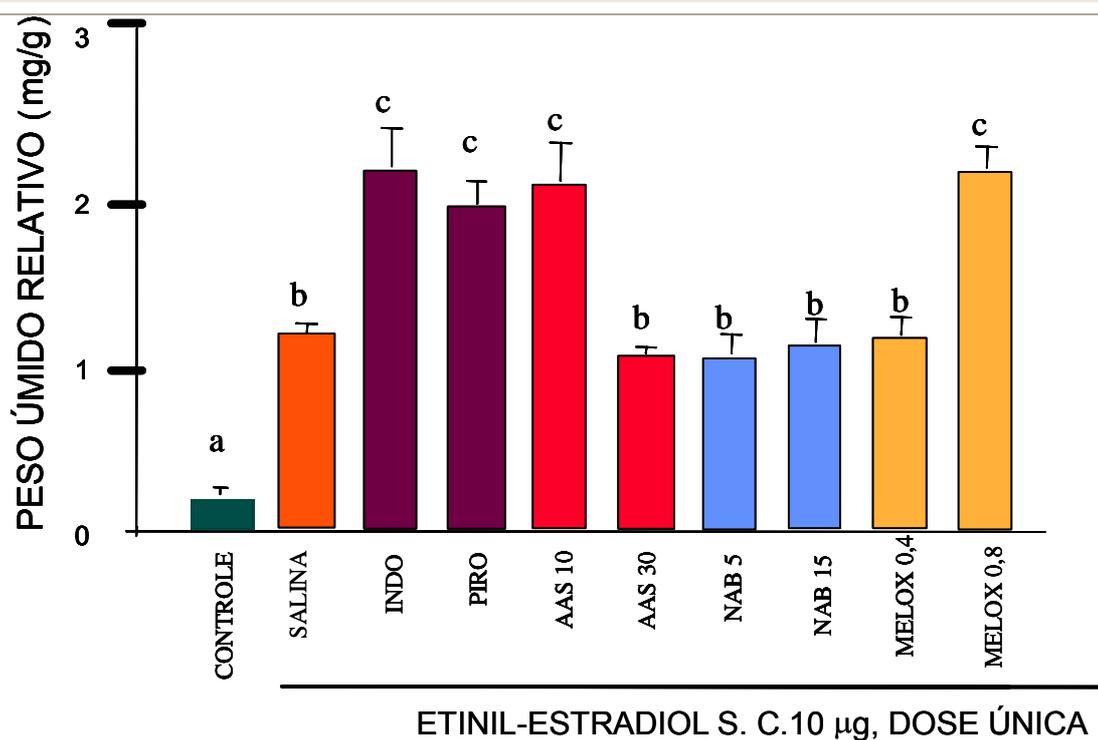


FIGURA 21. EFEITO DO TRATAMENTO COM DROGAS INIBIDORAS RELATIVAS DE COX-1 E COX-2 SOBRE O EDEMA UTERINO INDUZIDO POR ESTRADIOL EM RATAS IMATURAS.

CONTROLE: ratas não estrogenizadas tratadas com salina 0,9%. **SALINA:** animais estrogenizados tratados com salina 0,9%. As drogas utilizadas foram o **AAS** (10 e 30mg/Kg, v.o. - um inibidor de seletividade intermédia entre as COXs); Indometacina (INDO, 2 mg/Kg, v.o.) Piroxicam (PIRO, 1mg/Kg, v.o.), inibidor relativo específico para COX-1, Nabumetona (NAB, 5 e 15mg/Kg, v.o.) e Meloxicam (MELOX, 0,4 e 0,8 mg/Kg, v.o.), Para a avaliação do edema, os animais receberam dose única s. c. de 10 µg de Estradiol; após 6h foram sacrificados e os pesos uterinos úmidos (PU) obtidos. As drogas testadas foram administradas 30 minutos antes da estrogenização. Grupos de 12 animais. Letras dissimilares representam grupos estatisticamente diferentes. As drogas eram administradas s. c. meia hora antes do Estradiol. ANOVA (análise de variância) seguido do teste de Bonferroni. As diferenças entre os grupos eram consideradas significativas se $P < 0,05$.

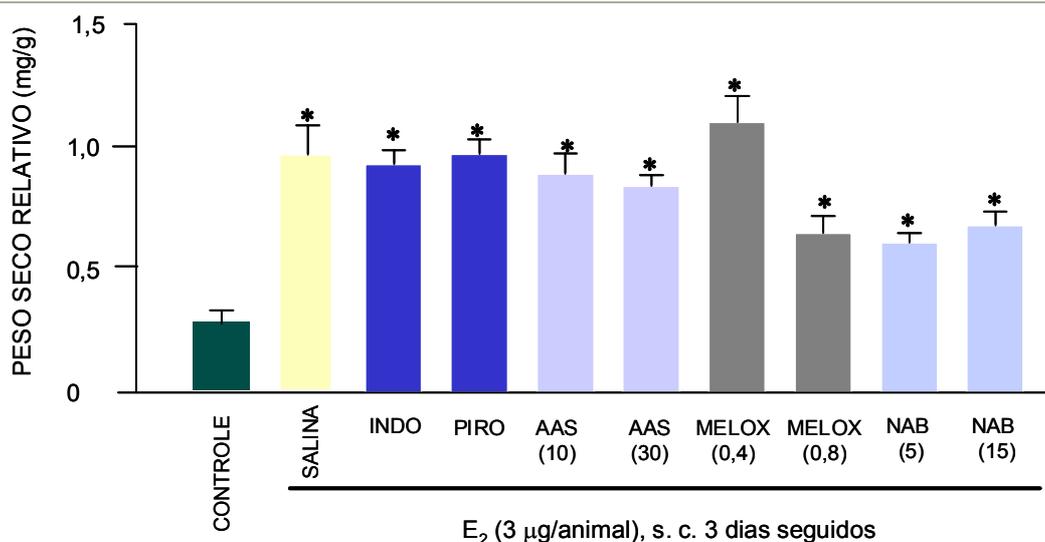


FIGURA 22. EFEITO DO TRATAMENTO COM DROGAS INIBIDORAS RELATIVAS DE COX-1 E COX-2 SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR UTERINA INDUZIDO POR ESTRADIOL EM RATAS IMATURAS.

CONTROLE: ratas não estrogenizadas tratadas com salina 0,9%. **SALINA:** animais estrogenizados tratados com salina 0,9%. As drogas utilizadas foram o **AAS** (10 e 30mg/Kg, v. o. - um inibidor de seletividade intermediária entre as COXs); Indometacina (**INDO**, 2 mg/Kg, v. o.) Piroxicam (**PIRO**, 1mg/Kg, v. o.), inibidor relativo específico para COX-1, Nabumetona (**NAB**, 5 e 15mg/Kg, v. o.) e Meloxicam (**MELOX**, 0,4 e 0,8 mg/kg, v.o.), Para a avaliação da proliferação celular, os animais receberam doses diárias por 3 dias consecutivos de 3µg s. c. de etinil-estradiol; No 4^o dia foram sacrificados e os pesos uterinos secos (PS) obtidos. As drogas testadas foram administradas 30 minutos antes de cada dose de estrogênio. Grupos de 12 animais. Letras dissimilares representam grupos estatisticamente diferentes. ANOVA (análise de variância) seguido do teste de Bonferroni. As diferenças entre os grupos eram consideradas significativas se $P < 0,05$.

2. 4. EFEITO DA IMPANTAÇÃO PERITONEAL DE ENDOMÉTRIO EM RATAS SOBRE A RESPOSTA NOCICEPTIVA INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO INTRAPERITONEAL EM ANIMAIS CONTROLE E TRATADOS COM INIBIDORES SELETIVOS RELATIVOS DE COX-1 E COX -2

Todos os grupos tratados tiveram atenuadas significativamente ($p < 0,05$) as dores avaliadas pelo teste de contorções. No grupo falso-operado (FO) contaram-se $18,7 \pm 3,24$ contorções em 20 minutos; No grupo com endometriose não tratado obtivemos $30,5 \pm 3,57$ contorções em 20 minutos; no grupo tratado com Indometacina encontramos $20,3 \pm 2,24$; no tratado com Meloxicam, $16 \pm 3,6$; O grupo que usou AAS, $16,5 \pm 1,24$; e aqueles que usaram Nabumetona (5mg/Kg), $20,3 \pm 2,57$ e Nabumetona 15mg/(Kg), $16 \pm 3,27$ (Figura 23).

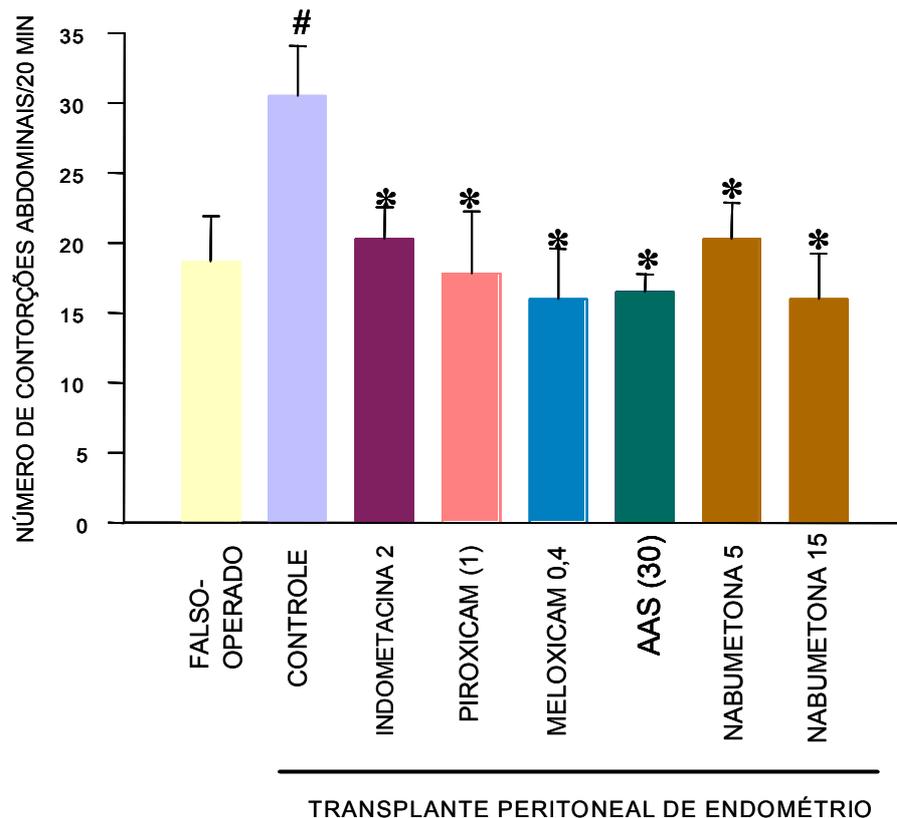


FIGURA 23. EFEITO DO TRATAMENTO COM DROGAS INIBIDORAS RELATIVAS DE COX-1 E COX-2 SOBRE A DOR (NOCICEPÇÃO, CONTORÇÕES ABDOMINAIS) DE RATAS COM TRANSPLANTES PERITONEAIS DE ENDOMÉTRIO.

As contorções abdominais foram avaliadas no 15^o dia de implante endometriótico e entre 30 e 45 minutos após a dose das drogas testadas. **FALSO-OPERADO:** animais abertos e fechados depois de retirado um corno uterino sem, entretanto realizar-se o implante peritoneal de endométrio. **CONTROLE:** ratas com transplantes peritoneais de endométrio tratadas com salina a 0,9%. As drogas utilizadas foram o **AAS** (30mg/Kg, v. o. - um inibidor de seletividade intermédia entre as COXs); **INDOMETACINA** (2 mg/Kg, v. o.) **PIROXICAM** (1mg/Kg, v. o.), inibidor relativo específico para COX-1, **NABUMETONA** (5 e 15mg/Kg, v. o.) e **MELOXICAM** (0,4 mg/Kg, v. o.), (*) Significativamente diferente do controle com transplante peritoneal de endométrio; (#) significativamente diferente do falso-operado. ANOVA (análise de variância) seguido do teste de Tukey. As diferenças entre os grupos eram consideradas significativas se $P < 0,05$.

**BLOCO 3. IMPLICAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO
SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE
IMPLANTES ECTÓPICOS PERITONEAIS DE
ENDOMÉTRIO EM RATAS E SUAS
REPERCUSSÕES SOBRE A DOR E A
FERTILIDADE.**

BLOCO 3. IMPLICAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE IMPLANTES ECTÓPICOS PERITONEAIS DE ENDOMÉTRIO EM RATAS E SUAS REPERCUSSÕES SOBRE A DOR E A FERTILIDADE.

3. 1. EFEITOS DA MODULAÇÃO DA ÓXIDO NÍTRICO-SINTASE (L-NAME E L-ARGININA) SOBRE A EVOLUÇÃO (DESENVOLVIMENTO) DO TRANSPLANTE PERITONEAL DE ENDOMÉTRIO EM RATAS

Cada grupo era formado por 10 ratas. Os animais foram tratados com L-Nitroarginina metiléster [L-Name] (LN, 10 e 20mg/Kg, s. c. divididas em duas tomadas por dia), L-arginina (LA, 600mg/Kg, v. o.) e com a associação dos dois (LN-LA), um grupo funcionou como controle e foi tratado com salina s. c. O tratamento perdurou do 5^o ao 14^o dia. No 15^o dia. Os resultados são mostrados na tabela 1. Os animais tratados com L-NAME (20mg/Kg) tiveram significativa diminuição no peso dos endometriomas quando comparados ao controle: $0,595 \pm 0,82$ versus $0,96 \pm 0,013$ g% (média dos pesos relativos \pm erro padrão da média). Essa diminuição pareceu ser dose dependente, desde que o tratamento com L-NAME (10 mg/Kg) diminuiu o peso dos endometriomas igualmente, mas não significativamente. O tratamento com L-Arginina isoladamente tendeu ao aumento no peso dos endometriomas e a associação L-Arginina com L-NAME reverteu parcialmente o processo.

GRUPOS	PESO RELATIVO DOS IMPLANTES PERITONEAIS DE ENDOMÉTRIO (ENDOMETRIOMAS) (G% ± E. P. M.)
IMPLANTE PERITONEAL DE ENDOMÉTRIO (Tratada com salina)	0,595 ± 0,085 ^a
L-NAME (10 mg/kg)	0,295 ± 0,024 ^a
L-NAME (20 mg/kg)	0,096 ± 0,013 ^b
L-NAME (20 mg/kg) + L-Arginina	0,350 ± 0,061 ^a
L-Arginina (600 mg/kg)	0,270 ± 0,059 ^a

TABELA 1. EFEITOS DA MODULAÇÃO DA ÓXIDO NÍTRICO-SINTASE COM L-NITROARGININA METILESTER (L-NAME) E L-ARGININA SOBRE A EVOLUÇÃO (DESENVOLVIMENTO) DO TRANSPLANTE PERITONEAL DE ENDOMÉTRIO EM RATAS.

O número de animais foi de 10 por grupo. Letras díspares significam médias estatisticamente diferentes. ANOVA (análise de variância) seguido do teste de Bonferroni. As diferenças entre os grupos eram consideradas significativas se $P < 0,05$.

3. 2. EFEITOS DA MODULAÇÃO DA ÓXIDO NÍTRICO-SINTASE (L-NAME E L-ARGININA) SOBRE A FERTILIDADE DE RATAS COM TRANSPLANTES PERITONEAIS DE ENDOMÉTRIO

Os animais foram acasalados no 15^o dia do tratamento e a gravidez foi verificada pelo encontro de espermatozóides na vagina. Os animais foram sacrificados no 10^o dia de gravidez e contados o número de implantes ovulares e a percentagem de ratas grávidas. Os resultados não mostraram alterações significativas no número de implantes ovulares por corno uterino quando comparado ao grupo controle (com implante peritoneal de endométrio tratado com salina 0,9%), entretanto houve aumento significativo na percentagem de ratas grávidas no grupo tratado com L-Name 20 mg/Kg.

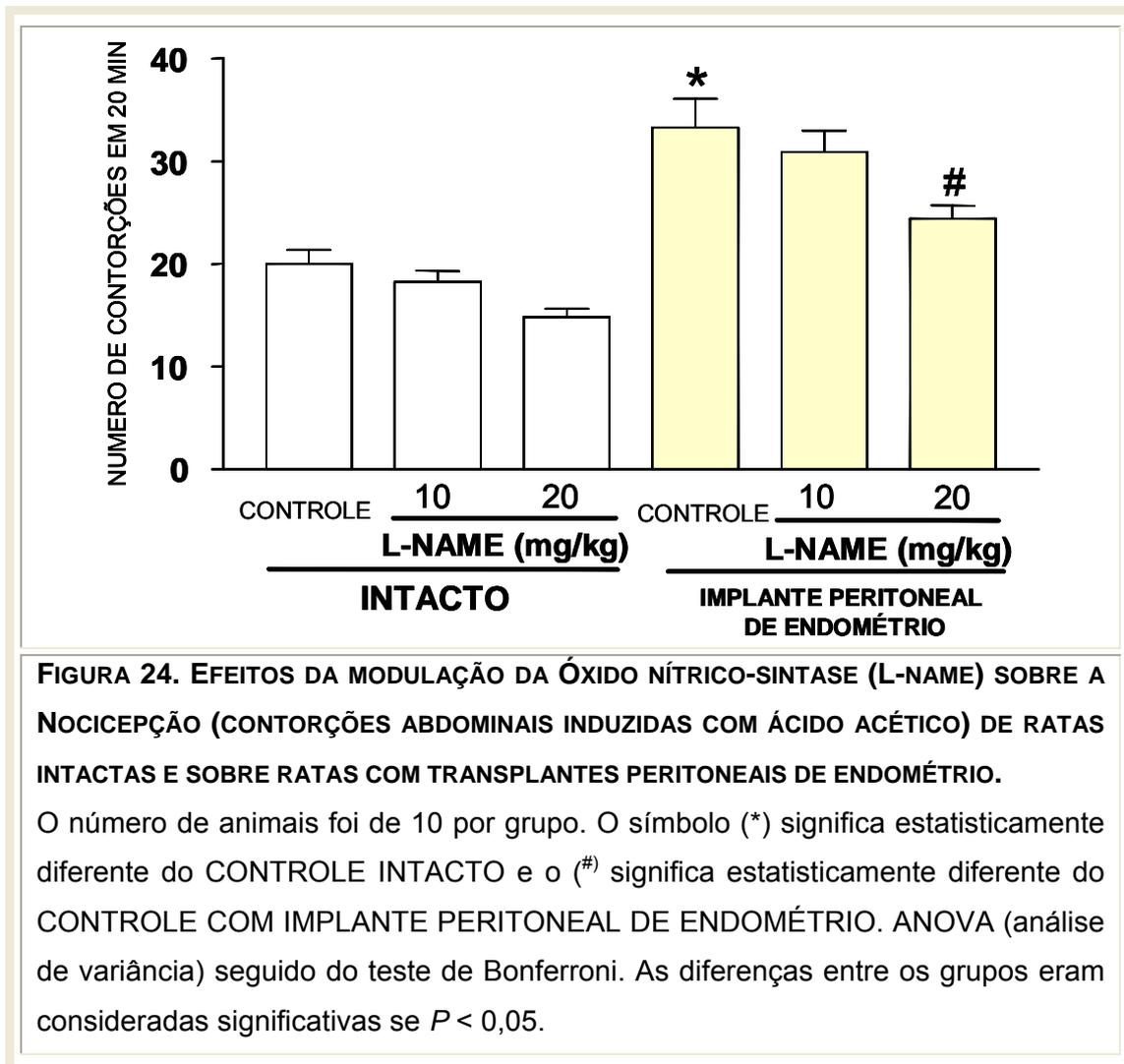
GRUPOS #	PERCENTAGEM DE RATAS GRÁVIDAS (%)	MÉDIA DAS IMPLANTAÇÕES OVULARES NO 10 ^o DIA DE GRAVIDEZ.
ENDOMETRIOSE - CONTROLE	40 ^a	1,83 ± 0,86 ^a
L-Name (10mg/Kg, s. c.)	60 ^a	2,50 ± 1,30 ^a
L-Name (20mg/Kg, s. c.)	80 ^b	3,33 ± 1,33 ^a
L-Arginina (600mg/Kg, s. c.)	50 ^a	2,33 ± 1,11 ^a
L-Name + L-Arginina *	50 ^a	2,50 ± 1,14 ^a
CONTROLE INTACTO	100 ^b	4,37 ± 0,59 ^b
FALSO-OPERADO	100 ^b	4,33 ± 0,86 ^b

TABELA 2. EFEITO DA MODULAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO SOBRE A IMPLANTAÇÃO OVULAR EM RATAS COM IMPLANTES PERITONEAIS DE ENDOMÉTRIO (ENDOMETRIOSE).

Cada grupo constou de 10 animais. * Grupo tratado com L-Arginina (600 mg/Kg) e L-NAME (20 mg/Kg). Os animais foram tratados do 5^o ao 14^o dia do implante peritoneal de endométrio. Letras dessemelhantes significam médias de grupos estatisticamente significantes. Qui-quadrado para a análise das percentagens de ratas grávidas. ANOVA (análise de variância) seguido do teste de Bonferroni para o numero de implantes por corno uterino. As diferenças entre os grupos eram consideradas significativas se $P < 0,05$.

3. 3. EFEITOS DA MODULAÇÃO DA ÓXIDO NÍTRICO-SINTASE (L-NAME) SOBRE A NOCICEPÇÃO (CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS COM ÁCIDO ACÉTICO) DE RATAS INTACTAS E SOBRE RATAS COM TRANSPLANTES PERITONEAIS DE ENDOMÉTRIO

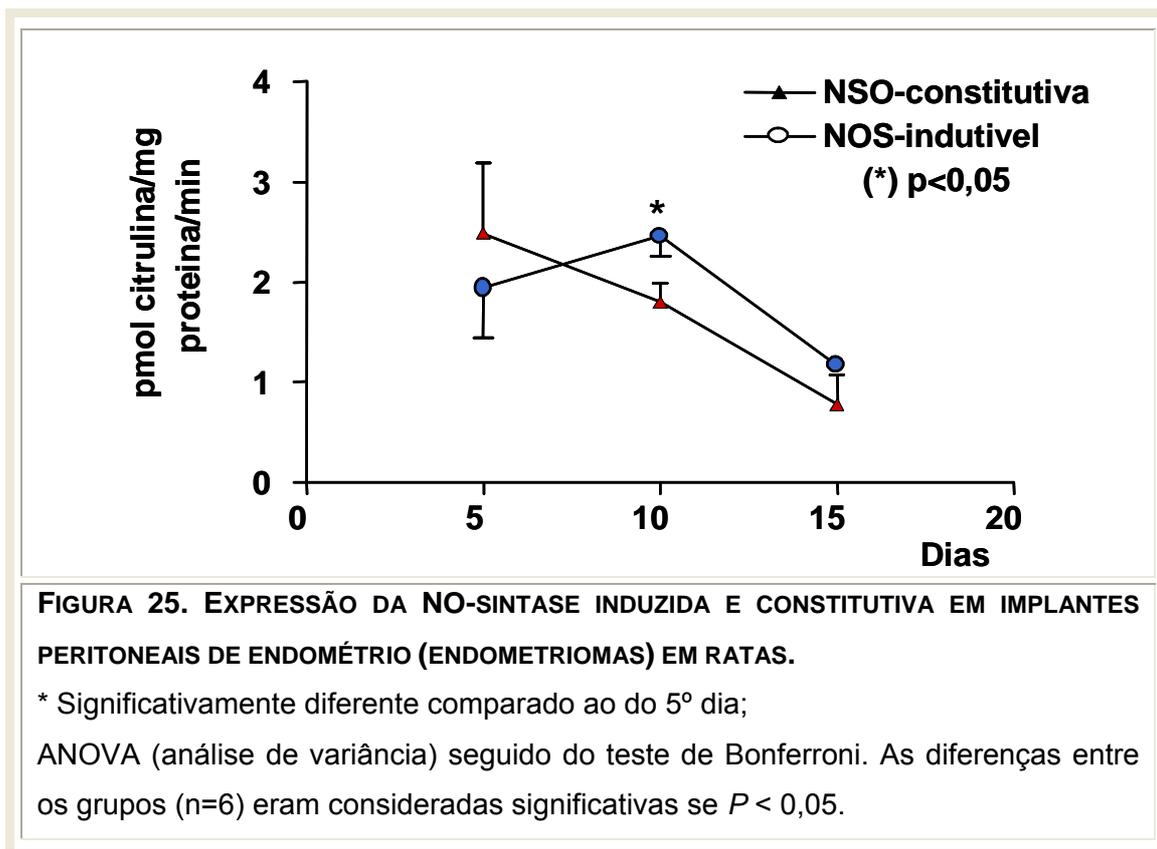
Ratas intactas que foram submetidas à injeção intra-peritoneal de ácido acético a 0,6% (0,01 ml/g) mostraram $20 \pm 1,42$ contorções abdominais em 20 minutos. Os animais intactos tratados com L-Name nas doses de 20 e 20 mg/Kg apresentaram respectivamente $18,57 \pm 1,28$ e $15 \pm 0,71$ contorções abdominais, sem significância estatística. Por outro lado mostra-se que no modelo de implantes peritoneais de endométrio, o L-Name 20 mg/Kg diminuiu significativamente o número de contorções abdominais de $35,57 \pm 2,50$ do grupo tratado com salina para $24 \pm 0,87$ contorções abdominais em 20 minutos (Figura 24).



3.4. EXPRESSÃO DA NO-SINTASE EM IMPLANTES PERITONEAIS DE ENDOMÉTRIO (ENDOMETRIOMAS) EM RATAS.

Os animais (em grupos de 6), foram sacrificados nos dias 5, 10 e 15 do implante peritoneal de endométrio, os endometriomas foram excisados e congelados em nitrogênio líquido para observar a atividade da NO-sintase mensurada pela ^3H -citrulina e arginina marcadas (^3H -labelled citrulline from labelled L-arginine). A NO-sintase foi expressa em pmol de citrulina/mg proteína/minuto. A NO-sintase induzida (iNOS) foi expressa nos

endometriomas com valores de: $1,94 \pm 0,5$; $2,46 \pm 0,2$ e $1,17 \pm 0,3$ pmol de citrulina/mg proteína/minuto, respectivamente nos dias 5, 10 e 15 assim como a NO-sintase constitutiva (cNOS) que decrescia de forma tempo-dependente (5º dia: $2,48 \pm 0,7$; 10º dia: $1,8 \pm 0,19$; e dia 15º: $0,78 \pm 0,3$). Os resultados são mostrados na Figura 25.



BLOCO 4. ENVOLVIMENTO DO TNF-ALFA SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE IMPLANTES ECTÓPICOS PERITONEAIS DE ENDOMÉTRIO EM RATAS E SUAS REPERCUSSÕES SOBRE A DOR E A FERTILIDADE.

BLOCO 4. ENVOLVIMENTO DO TNF-ALFA SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE IMPLANTES ECTÓPICOS PERITONEAIS DE ENDOMÉTRIO EM RATAS E SUAS REPERCUSSÕES SOBRE A DOR E A FERTILIDADE.

4. 1. DROGAS UTILIZADAS

Utilizou-se inicialmente a Talidomida, Pentoxifilina e Dexametasona como inibidoras de TNF e Indometacina como liberadora ou promotora. As doses iniciais e vias de administração foram respectivamente 5 mg/Kg por via oral; 30 mg/Kg por via subcutânea; 0,2mg/Kg s. c. e a Indometacina teve a dose de 2 mg/Kg via oral.

4. 2. EFEITOS DE DROGAS MODULADORAS DO FATOR DE NECROSE TUMORAL SOBRE O CRESCIMENTO (DESENVOLVIMENTO) DO TRANSPLANTRE PERITONEAL DE ENDOMÉTRIO EM RATAS.

A Talidomida na dose de 5 mg/Kg por via oral, a Pentoxifilina na dose de 30 mg/Kg por via subcutânea e a Dexametasona na dose de 0,2mg/Kg s. c. diminuíram significativamente o peso úmido dos implantes peritoneais de endométrio de $0,595 \pm 0,085g\%$ do controle para $0,206 \pm 0,049g\%$ com tratamento com Talidomida; para $0,06 \pm 0,008g\%$ com uso da Pentoxifilina e $0,145 \pm 0,02g\%$ com injeções de Dexametasona. O grupo tratado com Indometacina que aumenta a liberação de TNF mostrou um aumento dramático no peso dos implantes para $2,05 \pm 0,96g\%$ (Figura 26).

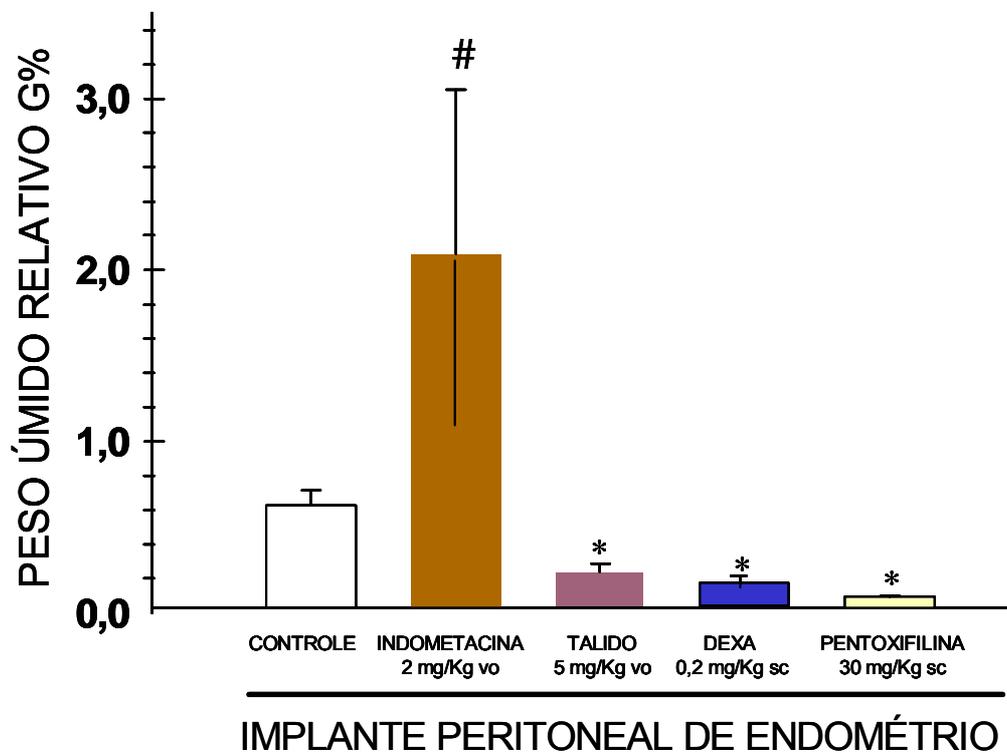


FIGURA 26. EFEITOS DE DROGAS MODULADORAS DO FATOR DE NECROSE TUMORAL SOBRE O CRESCIMENTO (DESENVOLVIMENTO) DO TRANSPLANTE PERITONEAL DE ENDOMÉTRIO EM RATAS.

CONTROLE, tratado com salina a 0,9%, TALIDO, tratado com talidomida (5mg/Kg, v. o.), DEXA, grupo tratado com dexametasona (0,2mg/Kg, s. c.).

N = 10 animais por grupo. O símbolo (*) Equivale a estatisticamente diminuído comparado ao controle. O símbolo # significa estatisticamente aumentado comparado ao controle. ANOVA (análise de variância) seguido do teste de Bonferroni. As diferenças entre os grupos eram consideradas significativas se $P < 0,05$.

4. 3. EFEITO DOSE-DEPENDENTE DA PENTOXIFILINA (PTX; 2,5; 10 E 30MG/KG) SOBRE O CRESCIMENTO (DESENVOLVIMENTO) DO IMPLANTE PERITONEAL DE ENDOMÉTRIO EM RATAS.

Os implantes ectópicos após excisados foram pesados e seus pesos úmidos relativos (g%) foram significativamente reduzidos pelo tratamento com Pentoxifilina (2,5; 10 e 30 mg/Kg) de forma dependente da dose (Figura 27). A Pentoxifilina nas doses de 2,5; 10 e 30 mg/Kg s. c. mostrou respectivamente os pesos úmidos de $0,363 \pm 0,122$ g%; $0,219 \pm 0,044$ g% e $0,060 \pm 0,008$ g% quando comparado ao controle, $0,595 \pm 0,085$ g%.

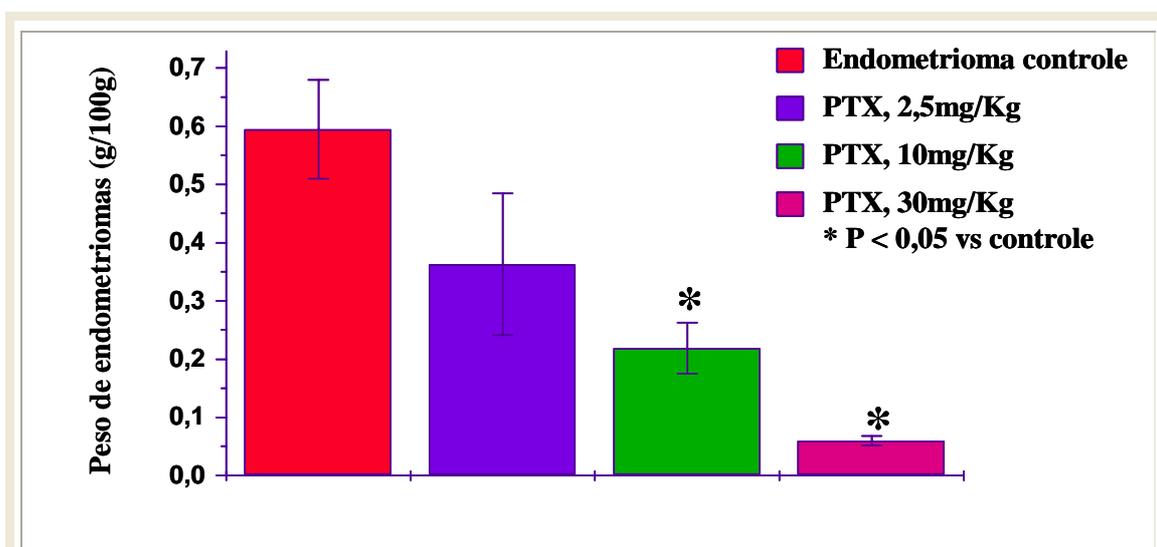


FIGURA 27. EFEITO DEPENDENTE DA DOSE DE PENTOXIFILINA (PTX; 2,5; 10 E 30MG/KG) SOBRE O CRESCIMENTO (DESENVOLVIMENTO) DO IMPLANTE PERITONEAL DE ENDOMÉTRIO (ENDOMETRIOMA) EM RATAS.

A Pentoxifilina foi administrada por via subcutânea do 5^o ao 14^o dia do implante peritoneal de endométrio. Os resultados em médias de pesos úmidos em g%. (*) Significativamente diferente do controle. ANOVA (análise de variância) seguido do teste de Bonferroni. As diferenças entre os grupos (n=10) eram consideradas significativas se $P < 0,05$. Endometriomas significa implantes peritoneais de endométrio.

4. 4. EFEITO DA TALIDOMIDA (1,0; 2,5; E 5,0 MG/KG) SOBRE O CRESCIMENTO (DESENVOLVIMENTO) DO IMPLANTE PERITONEAL DE ENDOMÉTRIO EM RATAS.

Os implantes ectópicos após excisados foram pesados e seus pesos úmidos relativos (g%) foram significativamente reduzidos pelo tratamento com Talidomida (1,0; 2,5; e 5,0 mg/Kg) de forma independente da dose (Figura 28). A Talidomida nas doses acima, por via oral mostrou respectivamente os pesos úmidos de $0,344 \pm 0,066$ g%; $0,355 \pm 0,088$ g% e $0,206 \pm 0,049$ g% quando comparado ao controle, $0,595 \pm 0,085$ g%. Daqui a diante usaremos a dose de 5,0 mg/Kg de peso.

4. 5. EFEITOS DE DROGAS MODULADORAS DO FATOR DE NECROSE TUMORAL (TALIDOMIDA E PENTOXIFILINA) SOBRE A FERTILIDADE DE RATAS INTACTAS.

Nem a Pentoxifilina nem a Talidomida interferiu significativamente na fertilidade de ratas intactas quando avaliadas pela percentagem de ratas grávidas ou pelo número de implantações embrionárias por rata. A média das implantações embrionárias foram de $8,3 \pm 0,3$ para o controle intacto contra $8,5 \pm 0,8$ para a Talidomida e $6,0 \pm 1,0$ para a Pentoxifilina (Figura 29). Quanto à percentagem de ratas grávidas, estas ocorreram em 100%, 100% e 80% para os animais intactos, que usaram Talidomida e Pentoxifilina respectivamente (Figura 30).

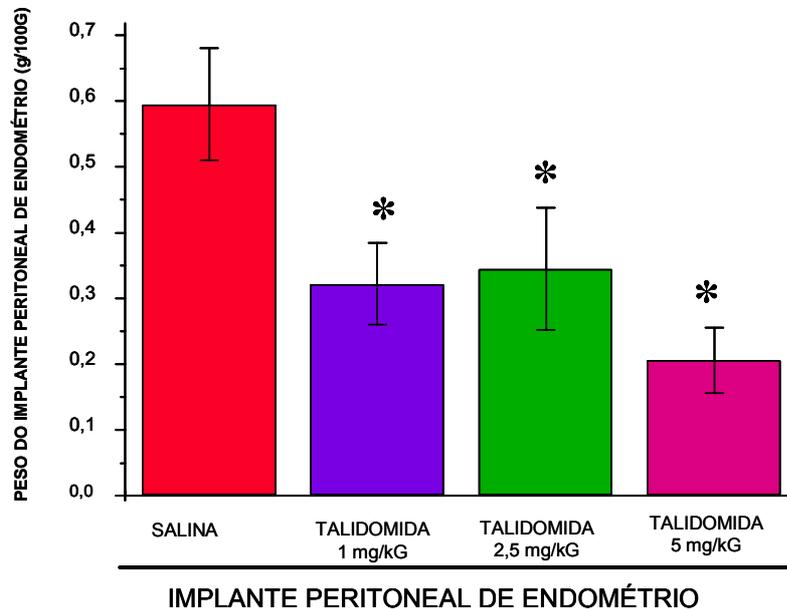


FIGURA 28. EFEITO DA TALIDOMINA (UM INIBIDOR DA PRODUÇÃO DE TNF) SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE ENDOMETRIOMAS (TRANSPLANTES PERITONEAIS DE ENDOMÉTRIO) EM RATAS.

A Talidomida foi administrada por via oral do 5^o ao 14^o dia do implante peritoneal de endométrio. Os resultados em médias de pesos úmidos em g%. (*) Significativamente diferente do controle. ANOVA (análise de variância) seguido do teste de Bonferroni. As diferenças entre os grupos (n=10) eram consideradas significativas se $P < 0,05$.

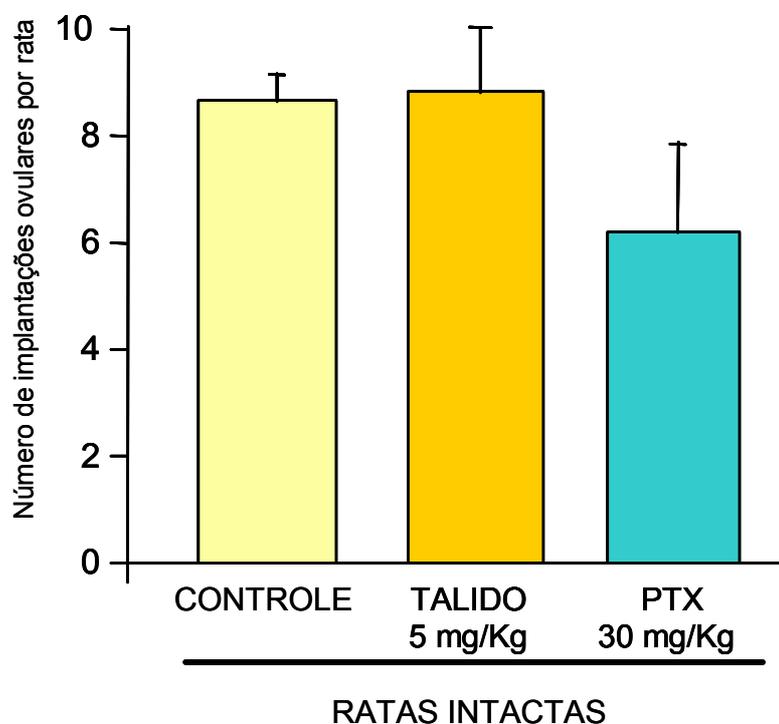


FIGURA 29. EFEITO DE INIBIDORES DO TNF- α (TALIDOMIDA E PENTOXIFILINA) SOBRE A FERTILIDADE DE RATAS INTACTAS (NÚMERO DE IMPLANTAÇÕES OVULARES POR ANIMAL)

CONTROLE significa ratas intactas (sem qualquer procedimento cirúrgico) tratadas com salina 0,9%. Os dados são de número de implantações por rata grávida. TALIDO, grupo tratado com 5 mg/Kg de Talidomida por via oral do 4^o ao 6^o dia de gravidez. PTX representa pentoxifilina, administrada por via subcutânea nos mesmos dias da talidomida. No 10^o dia as ratas eram sacrificadas e contadas o número de implantes ovulares.

N= 12 animais por grupo. Não houve significância entre as médias, ANOVA (análise de variância), teste de Bonferroni com P = 0,05.

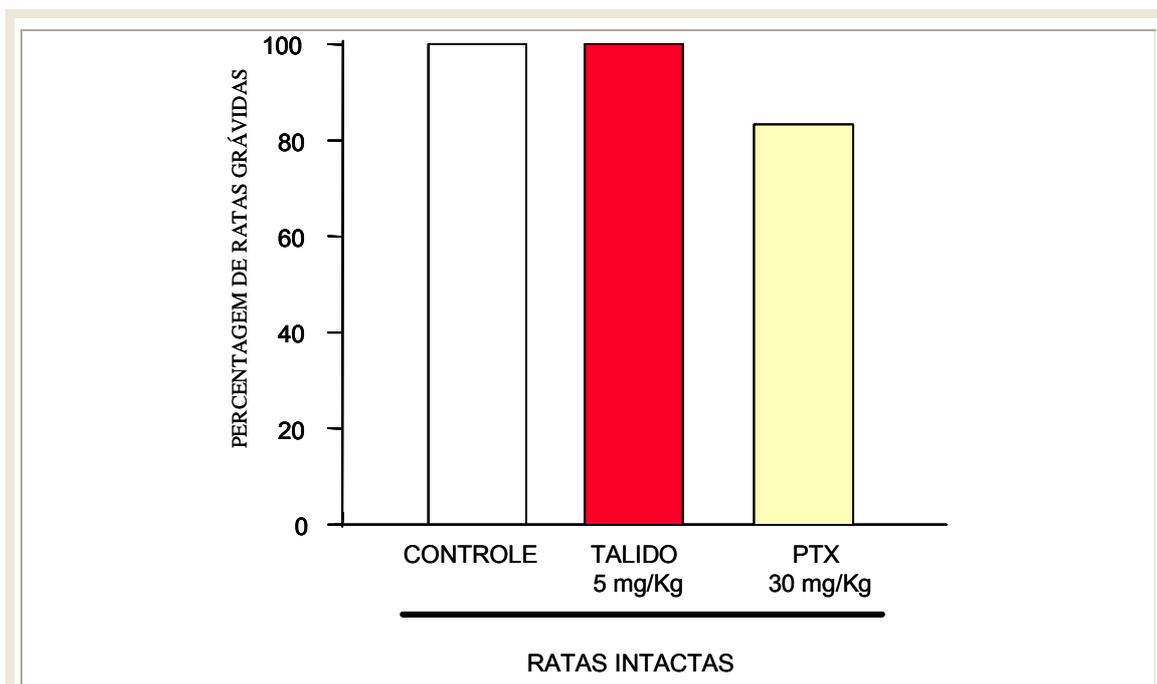


FIGURA 30. EFEITO DE INIBIDORES DO TNF- α (TALIDOMIDA, 5 MG/KG V. O. E PENTOXIFILINA 30 MG/KG S. C.) SOBRE A FERTILIDADE DE RATAS INTACTAS (PERCENTAGEM DE RATAS GRÁVIDAS).

CONTROLE significa ratas intactas (sem qualquer procedimento cirúrgico) tratadas com salina 0,9%. Os dados são de número de percentagem de ratas grávidas.

TALIDO, grupo tratado com 5 mg/Kg de Talidomida por via oral do 4^o ao 6^o dia de gravidez. **PTX** representa pentoxifilina, administrada por via subcutânea nos mesmos dias da talidomida. No 10^o dia as ratas eram sacrificadas e contadas o número de implantes ovulares.

N=12 animais por grupo. Não houve significância entre os resultados, Qui-quadrado com $P < 0,05$.

4. 6. EFEITO DA PENTOXIFILINA (2,5; 10 E 30MG/KG) SOBRE OS EVENTOS REPRODUTIVOS EM RATAS COM IMPLANTE PERITONEAL DE ENDOMÉTRIO.

O efeito do implante peritoneal de endométrio sobre a performance reprodutiva foi significativa. O grupo de ratas que recebeu o implante endometrial e foi tratado com salina demonstrou uma redução dramática na percentagem de ratas grávidas e no número médio dos embriões implantados quando comparados ao controle cirúrgico (falso-operado) e aos animais intactos. Ao contrário, com o tratamento de ratas com implantes peritoneais de endométrio usando-se Pentoxifilina (30mg/kg), houve melhora da fertilidade de modo dose-dependente, mostrando um aumento no número de embriões implantados e na percentagem de ratas grávidas. Ratas intactas submetidas ao

teste da implantação embrionária resultaram em 100% de gravidez com média de $4,37 \pm 0,18$ embriões por corno uterino. Sem diferença significativa ficou também o grupo de animais falso-operados com 100% de gravidez e média de $4,33 \pm 0,86$ embriões por corno uterino. Houve uma queda drástica e significativa nos animais endometrióticos (com implantes peritoneais de endométrio) com apenas 20% de ratas grávidas e $1,83 \pm 0,86$ embriões por corno uterino. O tratamento com Pentoxifilina nas doses de 10 e 30 mg/Kg s. c. aumentou a taxa de ratas grávidas e o número médio de implantações embrionárias para respectivamente (50%) $2,6 \pm 0,67$ e (70%) $5,1 \pm 0,7$ embriões por corno uterino. Este último com significância estatística (Tabela 3).

4. 7. EFEITO DA PENTOXIFILINA SOBRE O EDEMA E PROLIFERAÇÃO CELULAR UTERINOS EM RATAS IMATURAS

A pentoxifilina na dose de 30 mg/Kg de peso dada isoladamente ou em associação com o estradiol não interferiu no peso uterino úmido (no edema uterino). A Média dos pesos dos úteros de animais controles foi de $0,500 \pm 0,062$ mg/g, assemelhando-se a média do grupo que usou Pentoxifilina ($0,317 \pm 0,037$ mg/g). Da mesma forma, os grupos pré-tratados com Salina e Pentoxifilina (meia hora antes da administração de Estradiol) demonstraram médias similares, respectivamente $1,300 \pm 0,075$ e $1,350 \pm 0,125$ mg/g (Figura 31). Com relação ao peso seco (proliferação celular uterina), a Pentoxifilina na dose de 30 mg/Kg diminuiu significativamente o peso seco em 48% comparado ao controle positivo (em uso do Estradiol). As médias dos pesos secos foram as seguintes para os respectivos grupos: $0,315 \pm 0,052$ para controle negativo (tratado com Salina); $1,184 \pm 0,180$ para o grupo controle positivo (tratado com Estradiol); $0,150 \pm 0,026$ mg/g para o grupo tratado com Pentoxifilina isoladamente na dose de 30 mg/Kg; e $1,105 \pm 0,144$; $1,026 \pm 0,157$ e $0,605 \pm 0,047$ para a Pentoxifilina nas doses de 2,5, 10 e 30 mg/Kg de peso associado ao Estradiol (Figura 32).

GRUPOS	PERCENTAGEM DE RATAS GRÁVIDAS (%)	NÚMERO DE IMPLANTES EMBRIONÁRIOS (MÉDIA ± EPM)
ANIMAIS INTACTOS	100	4,37 ± 0,18 ^a
FALSO-OPERADOS	100	4,33 ± 0,86 ^a
TRATADO COM SALINA (CONTROLE)	20	1,83 ± 0,86 ^b
PTX (2,5 MG/KG)	40	1,33 ± 0,71 ^b
PTX (10 MG/KG)	50	2,6 ± 0,67 ^c
PTX (30 MG/KG)	70*	5,1 ± 0,7 ^c

TABELA 3. EFEITO DA PENTOXIFILINA (PTX) SOBRE A PERCENTAGEM DE RATAS GRÁVIDAS E SOBRE O NÚMERO MÉDIO DE IMPLANTES EMBRIONÁRIOS EM RATAS COM IMPLANTES PERITONEAIS DE ENDOMÉTRIO.

Os animais foram tratados por via subcutânea, do 5^o ao 14^o dia do implante peritoneal de endométrio e foram então acasalados com machos de fertilidade comprovada. Letras diferentes representam grupos estatisticamente diferentes com $P < 0,05$. ANOVA, teste de Bonferroni. (*) Significativamente diferente do CONTROLE, Qui-quadrado. N=12 animais por grupos.

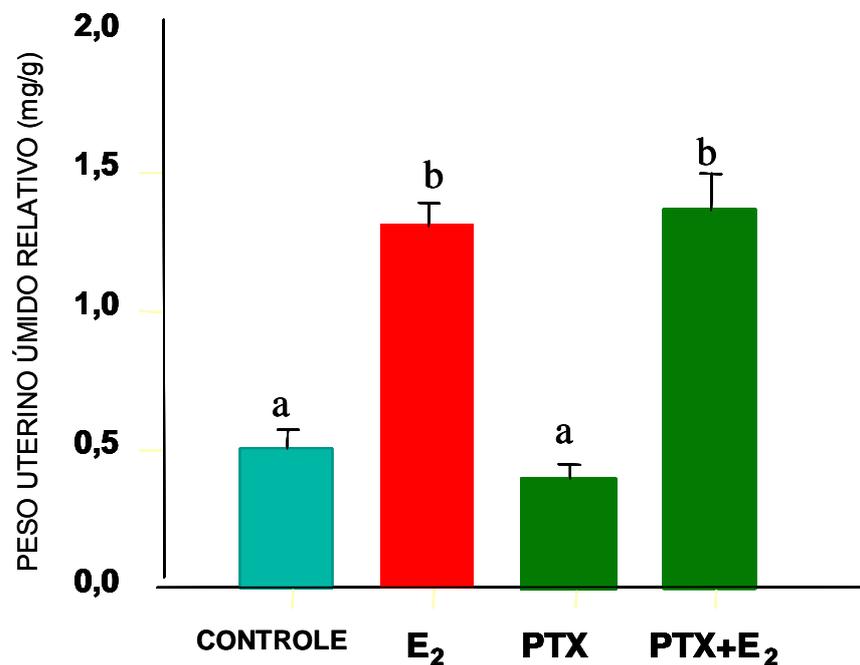


FIGURA 31. EFEITO DA PENTOXIFILINA SOBRE O EDEMA UTERINO (PESO ÚMIDO RELATIVO) EM RATAS IMATURAS.

CONTROLE, ratas imaturas tratadas com salina 0,9% s. c.; E₂, tratadas com estradiol na dose de 10 µg s. c.; PTX, tratadas com pentoxifilina na dose de 30 mg/Kg, s. c.; PTX + E₂, tratadas com a associação de Pentoxifilina e Estradiol nas mesmas doses acima descritas.

Letras diferentes significam grupos estatisticamente distintos. ANOVA, teste de Bonferroni. P < 0,05. N = 12 animais por grupos.

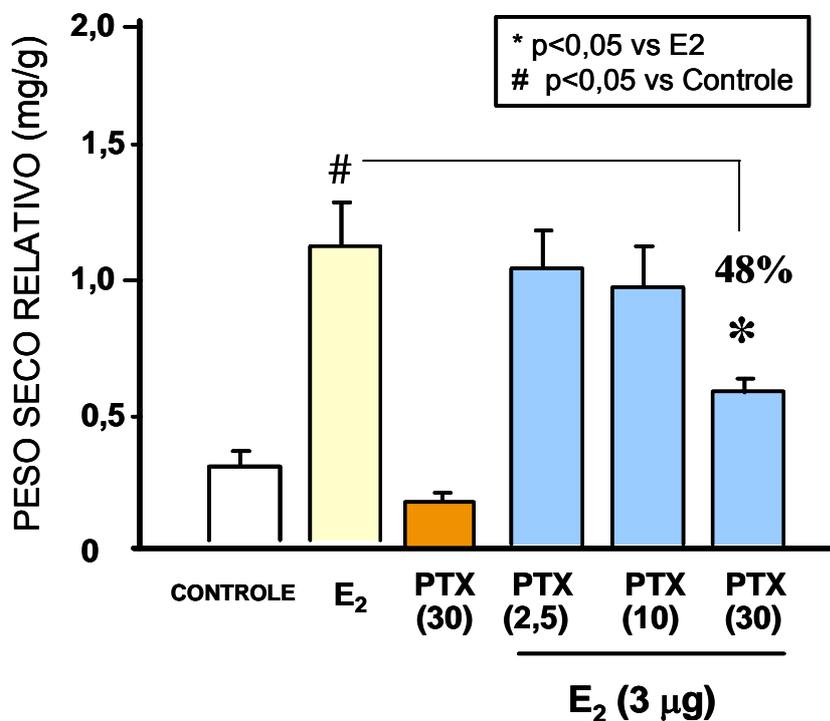


FIGURA 32. EFEITO DA PENTOXIFILINA SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR UTERINA (PESO SECO RELATIVO) EM RATAS IMATURAS.

CONTROLE, ratas imaturas tratadas com salina s. c.; E₂, tratadas com estradiol na dose de 3 µg s. c. por três dias seguidos; PTX, tratadas com pentoxifilina na dose de 30 mg/Kg, s. c.; PTX + E₂, tratadas com a associação de Pentoxifilina nas doses de 2,5, 10 e 30 mg/Kg de Pentoxifilina e Estradiol 3 µg s. c. por três dias seguidos.

O símbolo # significa estatisticamente diferente do controle. O símbolo * significativamente diferente do E₂. ANOVA, teste de Bonferroni. P < 0,05. N=12 animais por grupos.

4. 8. EFEITO DA TALIDOMIDA SOBRE O EDEMA E PROLIFERAÇÃO CELULAR UTERINOS EM RATAS IMATURAS

A Talidomida na dose de 5,0 mg/Kg de peso dada isoladamente demonstrou atividade estrogênica no edema uterino. A Média dos pesos dos úteros de animais controles foi de $0,525 \pm 0,060$ mg/g, diferindo-se da média do grupo que usou Talidomida ($1,125 \pm 0,150$ mg/g). De outra forma, os grupos pré-tratados com Salina e Talidomida meia hora antes da administração de estradiol demonstraram médias similares, inclusive a Talidomida, respectivamente $1,350 \pm 0,077$ e $1,525 \pm 0,075$ mg/g (Figura 33). Com relação ao peso seco (proliferação celular uterina), a Talidomida na dose de 5,0 mg/Kg diminuiu significativamente o peso seco em 40% comparado ao controle positivo (em uso do Estradiol). As médias dos pesos secos foram as seguintes para os respectivos grupos: $0,315 \pm 0,052$ mg/g para controle negativo (tratado com Salina); $1,184 \pm 0,180$ mg/g para o grupo controle positivo (tratado com Estradiol); $0,236 \pm 0,050$ mg/g para o grupo tratado com Talidomida isoladamente na dose de 5,0 mg/Kg; e $0,894 \pm 0,105$ e $0,552 \pm 0,026$ mg/g para a Talidomida nas doses de 2,5 e 5,0 mg/Kg de peso associado ao Estradiol (Figura 34).

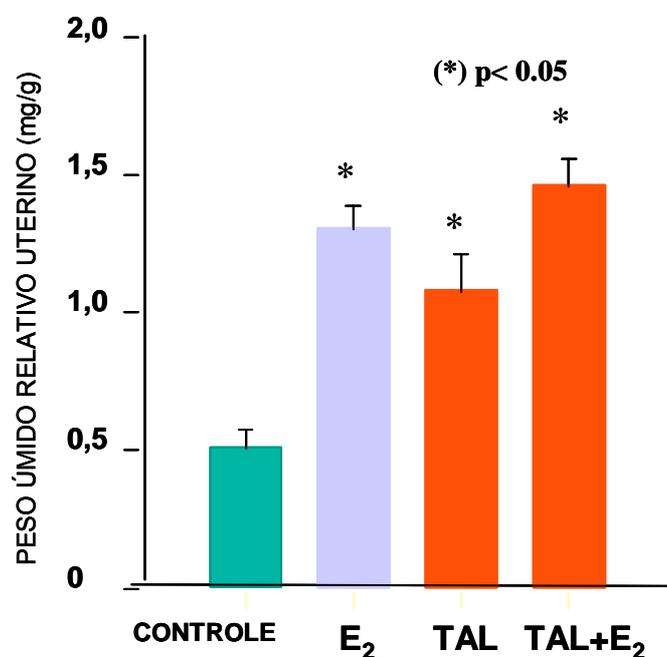


FIGURA 33. EFEITO DA TALIDOMIDA SOBRE O EDEMA UTERINO (PESO ÚMIDO RELATIVO) EM RATAS IMATURAS.

CONTROLE, ratas imaturas tratadas com salina s. c.; E₂, tratadas com estradiol na dose de 10 µg s. c.; TAL, tratadas com Talidomida na dose de 5,0 mg/Kg, s. c.; TAL + E₂, tratadas com a associação de Talidomida e Estradiol nas mesmas doses acima descritas.

O símbolo * significativamente diferente do controle. ANOVA, teste de Bonferroni. P < 0,05. N = 12 animais por grupos.

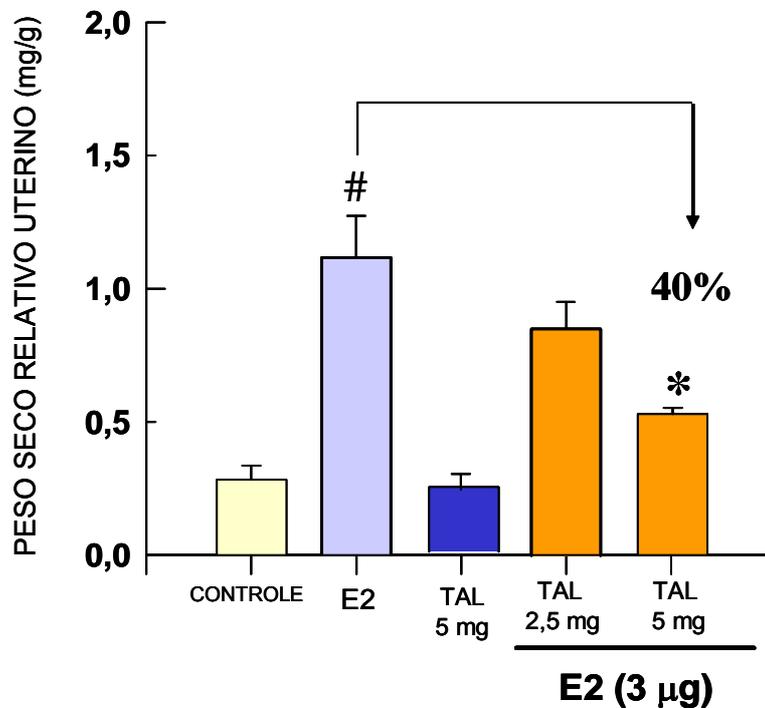


FIGURA 34. EFEITO DA TALIDOMIDA SOBRE O EDEMA E PROLIFERAÇÃO CELULAR UTERINA EM RATAS IMATURAS.

CONTROLE, ratas imaturas tratadas com salina s. c.; E₂, tratadas com estradiol na dose de 10 µg s. c.; TAL, tratadas com Talidomida nas doses de 2,5 e 5,0 mg/Kg, s. c.; E₂, tratadas com Estradiol na dose de 3µg.

O símbolo # significativamente diferente do controle, * significativamente diferente de E₂. ANOVA, teste de Bonferroni. P< 0,05. N=12 animais por grupos.

4. 9. NÍVEIS TEMPO-DEPENDENTE DO TNF- α NO LÍQUIDO PERITONEAL (OBTIDO POR LAVAGEM) DE RATAS INTACTAS, RATAS COM IMPLANTES PERITONEAIS DE ENDOMÉTRIO NÃO TRATADAS E TRATADAS COM DROGAS INIBIDORAS DO TNF- α (TALIDOMIDA E PENTOXIFILINA).

O nível de TNF- α avaliado no líquido peritoneal de ratas intactas (controle intacta) revelou-se de $28,950 \pm 1,189$ ng de TNF- α /ml. Os níveis de TNF- α no líquido peritoneal aumentaram de forma tempo-dependente após a implantação peritoneal de endométrio. O TNF- α aumentou de $18,88 \pm 2,77$ ng/ml no 5º dia de implante endometrial para $27,77 \pm 4,44$ ng/ml no 10º dia e finalmente para $36,4 \pm 2,99$ ng/ml no 15º dia (Tabela 4).

O tratamento com Pentoxifilina (30 mg/Kg s. c.) do 5º ao 14º dia do implante peritoneal de endométrio diminuiu significativamente os níveis de TNF quando comparado ao nível do TNF do controle com implante peritoneal de endométrio não tratado no 15º dia, $21,97 \pm 1,84$ para pentoxifilina contra $36,4 \pm 2,99$ ng/ml no controle do 15º dia (Tabela 4).

Os animais tratados com Talidomida resultaram em $7,630 \pm 2,570$ e $4,895 \pm 3,055$ ng de TNF- α /ml, respectivamente com 5 e 10 dias de tratamento, ou seja, no 10º e 15º dia da implantação endometriótica. Os resultados mostram claramente o papel do TNF na endometriose experimental no nosso modelo e que a Pentoxifilina assim como a Talidomida exercem atividade anti-TNF.

GRUPOS	MÉDIA ± E.P.M. (NG DE TNF-α/ML)
CONTROLE INTACTO	28,950 ± 1,189
ANIMAIS COM IMPLANTES PERITONEAIS DE ENDOMÉTRIO (CONTROLE POSITIVO)	
5^o DIA	18,785 ± 2,985
10^o DIA	27,860 ± 4,360
15^o DIA	36,400 ± 2,992 [#]
TRATADOS COM PENTOXIFILINA 30MG/Kg	
10^o DIA	25,380 ± 1,635 ^{ns}
15^o DIA	22,175 ± 1,365*
TRATADOS COM TALIDOMIDA 5,0 MG/Kg	
10^o DIA	7,630 ± 2,570**
15^o DIA	4,895 ± 3,055*

TABELA 4. NÍVEIS TEMPO-DEPENDENTE DO TNF- α NO LÍQUIDO PERITONEAL (OBTIDO POR LAVAGEM) DE RATAS INTACTAS, RATAS COM IMPLANTES ENDOMETRIÓTICOS PERITONEAIS NÃO TRATADAS (CONTROLE) E TRATADAS COM DROGAS INIBIDORAS DO TNF- α (TALIDOMIDA E PENTOXIFILINA).

Os valores são dados como média ± E. P. M. O símbolo # indica significância estatística ($P < 0,05$) entre o grupo com implantes peritoneais de endométrio no 15^o dia comparado ao controle intacto. O símbolo * demonstra médias estatisticamente diferentes comparadas ao grupo com implante peritoneal de endométrio no 15^o dia. ^{ns} significa sem significância estatística comparado ao controle positivo no 10^o dia. ** indica médias estatisticamente diferentes do controle positivo no 10^o dia. ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

4. 10. EFEITO DA IMPANTAÇÃO PERITONEAL DE ENDOMÉTRIO SOBRE A RESPOSTA NOCICEPTIVA INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO INTRAPERITONEAL EM ANIMAIS CONTROLE E TRATADOS COM PENTOXIFILINA.

No 15^o dia do transplante peritoneal de endométrio, os animais eram testados para atividade nociceptiva usando-se o modelo das contorções abdominais (COLLIER E COLS, 1968). A injeção de ácido acético nos animais endometrióticos tratados com salina 0,9% (Controle positivo, C₂) demonstraram uma maior resposta nociceptiva ($35,29 \pm 1,76$ contorções abdominais em 20 minutos) quando comparadas às respostas elicitadas nos animais falsos-operados (C₁) [$15,88 \pm 0,11$ contorções abdominais em 20 minutos]. O tratamento com Pentoxifilina (30 mg/kg) reduziu significativamente o número de contorções observadas nas ratas com endometriose cirurgicamente induzidas ($20,58 \pm 0,59$ contorções abdominais em 20 minutos) [Figura 35].

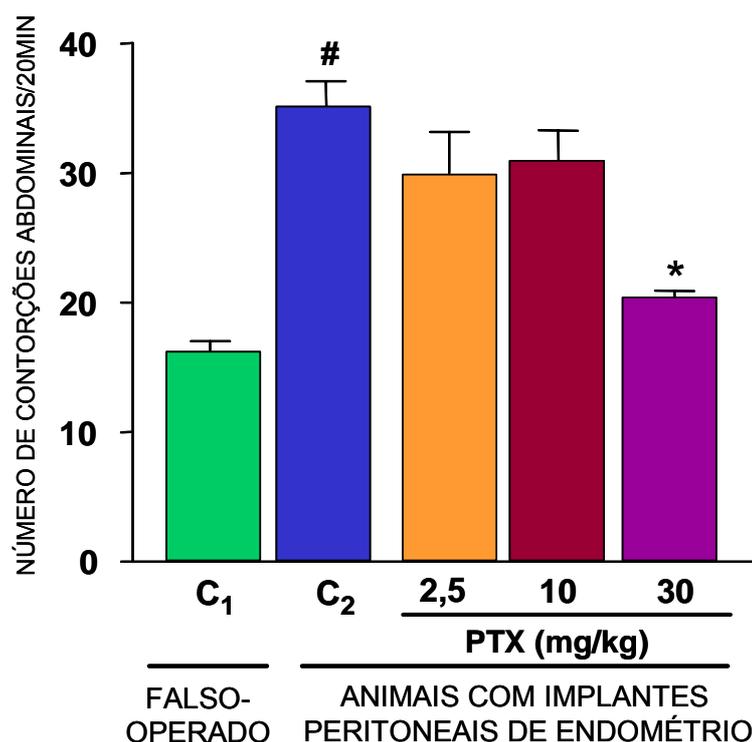


FIGURA 35. EFEITO DA IMPANTAÇÃO PERITONEAL DE ENDOMÉTRIO SOBRE A RESPOSTA NOCICEPTIVA INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO INTRAPERITONEAL EM ANIMAIS CONTROLE E TRATADOS COM PENTOXIFILINA.

Os valores são mostrados como médias \pm EPM (erro padrão da média) do número total de contorções abdominais que ocorreram entre 10 e 30 minutos após a injeção de ácido acético a 0,6%. N=10 animais por grupo. O símbolo * indica significância estatística ($P < 0,05$) entre os grupos tratados com pentoxifilina e o grupo de implante peritoneal de endométrio não tratado (salina, C₂). O símbolo # indica significância estatística ($P < 0,05$) entre os grupos com implantes endometriais (C₂) e falso-operado (C₁). ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

4. 11. ATIVIDADE DA SINTASE DE ÓXIDO NÍTRICO NO TECIDO ENDOMETRIAL ECTÓPICO TRATADO COM PENTOXIFILINA

Os endometriomas expressaram a enzima sintase de óxido nítrico indutível e constitutiva. A sintase de óxido nítrico indutível mostrou sua atividade nos dias 5, 10 e 15 respectivamente: $1,94 \pm 0,5$; $2,46 \pm 0,2$ e $1,17 \pm 0,3$ pmol de ^3H -citrulina/mg proteína/minuto. A sintase de óxido nítrico constitutiva foi expressa nos seguintes tempos: dia 5 = $2,48 \pm 0,7$; dia 10 = $1,8 \pm 0,19$ e dia 15 = $0,78 \pm 0,3$ pmol de ^3H -citrulina/mg de proteína/minuto (dados mostrados no capítulo de óxido nítrico). O tratamento com PTX 30 mg/Kg do 5^o ao 14^o dia do implante endometrial diminuiu significativamente tanto a enzima constitutiva como a induzida (Figura 36).

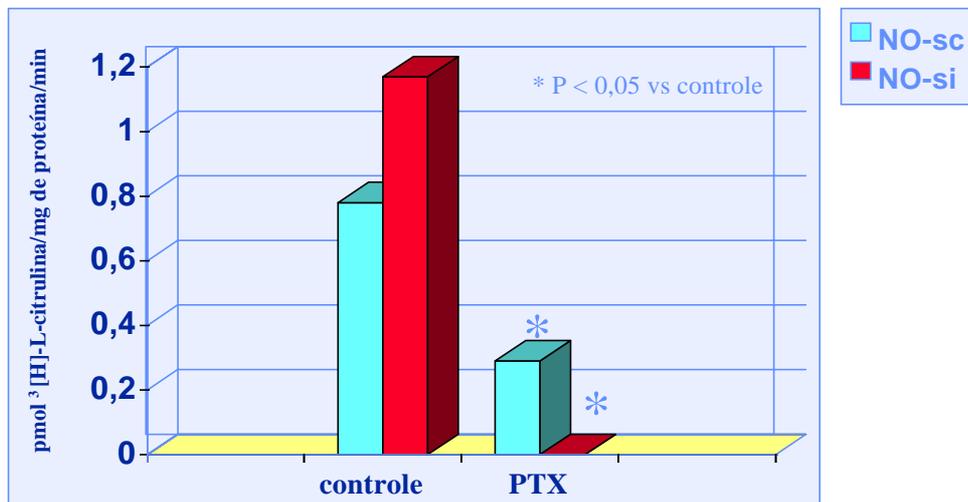


FIGURA 36. ATIVIDADE DA SINTASE DE ÓXIDO NÍTRICO NO TECIDO ENDOMETRIAL ECTÓPICO CONTROLE E TRATADO COM PENTOXIFILINA.

O tratamento com PTX 30 mg/Kg do 5^o ao 14^o dia do implante endometrial diminuiu significativamente tanto a enzima constitutiva como a induzida. Os resultados são mostrados como média de 6 animais no 15^o dia de indução endometriótica (controle) ou no 10^o dia de tratamento com PTX 30mg/Kg.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

O procedimento cirúrgico para indução da endometriose com o transplante peritoneal de endométrio foi bem tolerado em todos os animais e o transplante de tecido endometrial foi quase sempre um sucesso. No exame macroscópico (Figura 9), os implantes endometrióticos apareceram bem vascularizados, com conteúdo hemorrágico, massas sólidas ou císticas multiloculadas cheias de materiais fluidos serosos, consistentes com endometriose. Amostras histológicas realizadas aleatoriamente demonstraram glândulas e estroma endometriais típicas de lesões endometrióticas (Figura 10). Os achados se assemelham a endometriose humana. O modelo ora apresentado foge do alvo da discussão em virtude da validade demonstrada em nossa monografia de Mestrado (MEDEIROS, 1992).

A discussão se dará em torno dos três módulos estudados. Inicialmente os animais foram testados para os inibidores preferenciais específicos de COX-1 ou COX-2. Os animais foram tratados com Aspirina (AAS; 30mg/kg), Piroxicam (PIRO: 1,0 mg/kg) e Indometacina (INDO: 2,0 mg/kg), considerados inibidores seletivos preferenciais de COX-1, e com dois inibidores preferenciais de COX-2 (PAIRET ET AL. 1996), o Meloxicam (MELOX: 0,4 mg/kg) e a Nabumetona (NAB: 5,0 e 15 mg/kg).

Os implantes ectópicos após excisados foram pesados e seus pesos úmidos relativos (g%) foram significativamente reduzidos pelo tratamento com Aspirina (10 e 30mg/kg) e Nabumetona (5 e 15mg/kg) de forma dose dependente [Figura 15]. A Indometacina e o Piroxicam não reduziram o desenvolvimento dos endometriomas, ao contrário a Indometacina aumentou significativamente a lesão.

O número de implantes ovulares por ratas intactas teve queda significativa com o uso de Indometacina e Piroxicam e não foram alterados pelo uso de Aspirina, Nabumetona ou Meloxicam nas doses utilizadas (Figura 17). Por outro lado quando se avaliou a percentagem de ratas grávidas, interferiram significativamente negativas, além do Piroxicam e Indometacina, o Meloxicam que pareceu ter efeito dependente da dose (0,4 e 0,8 mg/Kg), com diminuição significativa de respectivamente 60 e 40% (Figura 18). Todos os grupos tratados tiveram as

dores diminuídas significativamente ($p < 0,05$) quando avaliadas pelo teste das contorções abdominais (Figura 23).

Esses achados não demonstraram muito claramente resultados distintos entre as diferentes classes de drogas nas doses utilizadas. Todos os inibidores da ciclo-oxigenase-1 e 2 aliviaram a dor de animais com implantes endometrióticos, independentes da sua seletividade, mas muito mais importante, nossos resultados mostraram que o inibidor preferencial da COX-2, a Nabumetona e um inibidor seletivo preferencial da COX-1, a Aspirina foram efetivos em além do efeito analgésico exercerem um efeito aparentemente antiproliferativo, levando a uma significativa diminuição do peso dos implantes endometrióticos ectópicos (peritoneais) e melhorando a performance reprodutiva desses animais. Se o aumento dos prostanoídes no líquido peritoneal forem responsáveis por alguns dos sintomas ou efeitos da endometriose tais como infertilidade e dor pélvica, sua redução deve ser capaz de aliviar tais sintomas dolorosos igualmente pelo bloqueio das duas COXs.

A recente descoberta de que a resposta das prostaglandinas para a dor e outros sintomas em focos inflamatórios é sintetizada por uma forma de enzima induzida de ciclo-oxigenase, oferece um novo alvo a nossa terapêutica, pelo menos como analgésicas. O papel das PGs no processo inflamatório indica que ela pode contribuir para a dor de origem peritoneal e de tecidos profundos na endometriose. O possível envolvimento de leucotrienos é desconhecido. Sem dúvida, numerosas interações entre moléculas estão envolvidas na patogênese da endometriose e isso pode ser particularmente complexo com respeito ao mecanismo da infertilidade, por exemplo. Até o momento, todos esses mecanismos são especulativos e muito provavelmente as PGs fazem parte dessa cascata de interações, certamente como intermediários ou moduladores mais do que efetores primários (FRASER, 1992).

Testamos os efeitos benéficos oferecidos por essa nova classe de drogas sobre a endometriose. Os metabólitos derivados da COX-2 têm papel importante na resposta inflamatória aguda e na ação proliferativa desregulada, além disso, cronicamente, eles têm ação angiogênica (CROFFORD, 1996). Em adição, ORLICKY ET AL. (1987) demonstraram a necessidade de $\text{PGF}_{2\alpha}$ como co-fator na estimulação da síntese de 17-beta-estradiol e na proliferação endometrial em coelhos. Podemos então especular que a inibição desses eventos poderia estar associada aos resultados dos implantes endometrióticos ectópicos e em consequência, a diminuição da dor. A endometriose tem sido reportada como uma doença com um componente imunológico importante, muitas vezes classificada como auto-imune. Uma das teorias imunopatológicas

da endometriose tem envolvido as prostaglandinas e células T. Nestas células, a COX-1 está constitutivamente expressa e a COX-2 é induzida durante sua ativação. Tanto a imuno-ativação quanto a imuno-inibição tem sido atribuídas a inibidores de ciclo-oxigenases. RIVERO ET AL. (2002) mostraram que nem os inibidores seletivos ou os não seletivos da COX-2 modificaram a ativação, proliferação ou suscetibilidade a apoptose das células T. Aqueles autores concluíram que as ciclo-oxigenases parecem não ter papel relevante sobre os linfócitos T e discutem que as ações do uso de AINEs em pacientes com doenças auto-imunes/inflamatórias não teriam efeitos imunomoduladores.

Múltiplas teorias têm sido propostas em um esforço para explicar a infertilidade associada a endometriose. O aumento das prostaglandinas no líquido peritoneal pode ter um efeito deletério sobre a foliculogênese, a captação e transporte ovular, ou ainda pode causar luteolise, disfunção ovulatória e também alterar a implantação embrionária. Apesar do efeito mais plausível do excesso de prostaglandinas no líquido peritoneal afetar diretamente a função tubária e, portanto a captação folicular (COUTINHO & MAIA, 1971). Os resultados da nabumetona são principalmente considerados devido à inibição da COX-2. Por outro lado, compostos que inibem preferencialmente a COX-1, O AAS, por exemplo, inibiu todos os eventos avaliados em nosso estudo. De fato, essas ações do AAS podem ter sido devidas a outros mecanismos não relacionados a COX-1 e sim com a inibição da expressão da sintase de óxido nítrico induzida, por exemplo, (KWON ET AL. 1997) e a transcrição do fator NfkappaB, que é importante na resposta imune e inflamatória (CAI ET AL. 1996). Isso poderia explicar em parte os benefícios do AAS mostrado por nós.

Acredita-se que a sensação de dor esteja associada à liberação ou gênese de substâncias endógenas, tais como as prostaglandinas em resposta a outros compostos endógenos como a Bradicinina. A Aspirina e os demais antiinflamatórios não esteroidais utilizados por nós inibem a atividade das ciclo-oxigenases e, portanto suprimem a síntese de prostaglandinas e, como resultados previnem a sensibilização dos nociceptores. A seletividade por ciclo-

oxigenases tipo I ou II diferencia os antiinflamatórios pelos efeitos colaterais. As prostaglandinas, por si só, não causam dor, mas tem um papel importante na sua modulação. São geradas de precursores da membrana plasmática e liberadas em resposta a estímulos nocivos. A liberação das prostaglandinas por seu turno sensibiliza os nociceptores as substâncias algésicas (LEVINE ET AL. 1986).

A aspirina é um ácido orgânico fraco que é única entre os AINEs no que diz respeito a irreversibilidade da acetilação da COX. A Aspirina age também deprimindo o estímulo da dor em sítios subcorticais como tálamo e hipotálamo. A aspirina em pequenas doses e em longo prazo tem sido usada como muitos outros usos terapêuticos inclusive como profilático do câncer do cólon, possivelmente relacionada a seu efeito inibidor da COX. A aspirina pode suprimir a incidência de tumores via salicilato pelo aumento da apoptose nas células iniciadas com carcinógenos (BARNES ET AL. 1998).

Apesar do desenvolvimento de novos agentes antiinflamatórios, a Aspirina permanece a droga antiinflamatória mais comumente utilizada. Por muito tempo o mecanismo de ação da aspirina tinha sido atribuído predominantemente à inibição da atividade da ciclooxigenase e conseqüente síntese de prostaglandinas. Entretanto, outros mecanismos, entre eles a inibição da indução do mRNA específico ou ativação do fator nuclear do fator de transcrição kB (NF-kB) elicitado em respostas a agentes inflamatórios como a IL-1. Devido o NF-kB estar envolvido na indução da expressão da iNOS, a aspirina inibe a produção de NO (KEPKA-LENHART ET AL. 1996).

LI ET AL. (2001) demonstraram que drogas antiinflamatórias não esteroidais como a aspirina, por exemplo, reduzem o risco de tumores (cânceres) devido a sua atividade antiproliferativa e a seus efeitos indutores de apoptose. O caminho crítico para apoptose envolve a liberação do citocromo c da mitocôndria que então interage com Apaf-1 para ativar as proteases caspases que orquestram a morte celular programada. Demonstrou-se que a aspirina e o meloxicam em altas doses diminuíram os níveis de TNF-alfa em

retinopatia diabética, da mesma forma suprimiram a expressão de eNOS. A atividade anti-TNF-alfa da aspirina pode não ser devida a sub-regulação da atividade da ciclooxigenase.

Estudos recentes como o de RODRIGUEZ-BURFORD ET AL. (2002) têm demonstrado o uso de antiinflamatórios não esteroidais como agentes quimiopreventivos de câncer de ovário. Entre essas drogas estão a aspirina, o acetaminofen e inibidores seletivos de COX-2. Essas drogas levaram a um índice mitótico diminuído, diminuição significativo do Ki-67 e incremento na apoptose com inibidores da COX-2.

A expressão de COX-2 acontece em numerosos tumores. NAKANISHI ET AL. (2001), investigando os efeitos de inibição da COX-2 sobre a apoptose de células de colangiocarcinoma mostraram que COX-2 quer induzidas por citocinas ou por transfecção transitória, significativamente inibia a apoptose mediada pelo Fas (um receptor da morte celular), provavelmente pela super-regulação da expressão de Mcl-1 e que a inibição farmacológica da COX-2 pode ser útil no aumento da apoptose mediada por Fas.

Utilizamos um modelo de proliferação celular uterina induzida por estradiol em ratas imaturas para demonstrar que nenhuma das drogas utilizadas como inibidoras seletivas relativas de COX-1 ou 2 foi efetiva como antiproliferativas no útero e provavelmente, em consequência, no implante endometrial ectópico. Assinala-se que esses efeitos poderiam ser mediados via sistema imunológico, atingindo primariamente os macrófagos visto que estes não estariam presentes naqueles animais imaturos nas mesmas proporções e condições que nos endometrióticos.

Antiinflamatórios não esteróides inibem a ciclo-oxigenase (COX), que é sintetizada a partir do ácido aracdônico na membrana celular. A variante constitutiva, a COX-1 é expressa em muitas células, o tempo todo, providenciando as funções básicas da vida. Em contraste, a COX-2, induzível, não é produzida no epitélio normal, mas causa inflamação e promove a formação de tumores em resposta a fatores de crescimento, citocinas ou sinas oncogênicos. A COX exerce essas funções pela produção de prostaglandina E₂ (PGE₂), que por sua vez ativa o receptor epitelial específico que por seu turno ativa a produção de AMP cíclico. O AMPc estimula a síntese de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que engatilha a angiogênese que promove o crescimento e espraiamento do tumor (LEWIS, 2000).

NAKANISHI ET AL. (2001) demonstraram que além de outros AINEs, a nabumetona suprime a proliferação celular (linhagens de células de leucemia) induzindo a uma parada no ciclo celular entre G0/G1 e que esta parada induzida por estes inibidores da COX não estava associada a supra-regulação de inibidores de cinase dependente de ciclinas mas inibidores de COX-2 também inibiam a diferenciação celular dessas células induzidas por interferon gama, TNF-alfa e ácido retinóico. Esses achados sugeriam que a inibição da proliferação e diferenciação celular se devia por fatores ou mecanismos dependentes e independentes da COX.

A COX tem papel importante na nidadação, ou seja, na a preparação do útero para a adesão e implantação do blastocisto. O útero e o blastocisto, ambos devem estar adequados para a implantação. Isso acontece através das ações dos hormônios ovarianos progesterona e estrogênio. O preparo do útero ocorre pelas ações de ambos os hormônios. A progesterona transforma o endométrio em um estado “pré-receptivo” que é responsivo ao estrogênio. No útero, o estrogênio (estradiol) se liga a seu receptor e inicia o estado “receptivo” do endométrio. Nesse estado o útero produz fatores de crescimento tais como o fator de crescimento epidérmico, EGF ligado a heparina e fator inibitório da leucemia. Essas proteínas, na presença de Hoxa-10 levam a expressão das enzimas ciclo-oxigenases (COX). Essas enzimas parecem ser críticas nesse processo desde que o endométrio de camundongos deficientes em COX não são capazes de receber embriões (LIM ET AL. 1997; PARIA ET AL. 2000). As prostaglandinas, especialmente as prostaciclina são críticas na receptividade endometrial do blastocisto por mecanismos ainda não completamente desvendados.

Estudos têm demonstrado em várias espécies animais que a inibição da síntese de prostaglandinas inibe a ovulação. Após a fertilização, o desenvolvimento do embrião durante o estágio de blastócito e a diferenciação sincronizada do útero depende da harmonia e coordenação dos efeitos entre estrógenos, progesterona e prostaglandinas. As prostaglandinas estão envolvidas em numerosos processos importantes na reprodução de mamíferos, inclusive no início da parturição. As prostaglandinas são sintetizadas a partir do ácido aracdônico pelas enzimas ciclo-oxigenases. Há duas isoformas dessas enzimas: ciclo-oxigenase 1 (COX-1), forma constitutiva e a COX-2, forma induzida. A COX-2 tem sido recentemente categorizada como um gene imediato-precoc e está associada ao crescimento e à diferenciação celular (TJANDRAWINATA ET AL. 1997), necessários tanto para o crescimento folicular e ovulação como para a receptividade endometrial, nidadação e desenvolvimento embrionário.

CHARPIGNY ET AL. (1997) encontraram a expressão das duas isoformas de ciclo-oxigenases no útero de ovelhas e demonstraram que as duas isoformas exibiam diferentes padrões de expressão: COX-1 em níveis constantes no endométrio durante o ciclo estral e estágios comparáveis de gravidez; a COX-2, ao contrário, mostrava-se alta e transitoriamente expressa entre os dias 12 e 15 do ciclo estral e declinava daí em diante a níveis indetectáveis. Isso reforça a importância da expressão de COX no endométrio para a recepção embrionária

(nidação). O endométrio na gravidez precoce mostrava expressões similares da COX-2. O tratamento de animais ovariectomizadas com esteróides indicava que a expressão de COX-1 não se modificava, enquanto que a COX-2 era altamente induzida por tratamento com progesterona. O estradiol também aumentava a expressão dessa enzima, mas só após o uso de progestágenos. Esses resultados sugerem que a síntese de PG no útero é devida à indução da COX-2 por aqueles hormônios naquela ordem.

No roedor, um aumento da permeabilidade vascular uterina no sítio de aposição do blastocisto é um dos eventos mais precoces requeridos para o processo da implantação. Esse evento é precedido por um edema uterino generalizado que leva a um fechamento luminal e coincide com a reação de “atracamento” entre o trofotoderma e o epitélio luminal. As prostaglandinas vasoativas estão implicadas nesse processo. CHAKRABORTY ET AL. (1996) demonstraram que os genes das COXs são diferentemente induzidos no útero de camundongo no período peri-implantação. Durante o período pré-implantação (dias 1 a 4), o gene da COX-1 estava expresso no epitélio uterino principalmente no dia 4 até a iniciação da reação de “atracamento”; na noite seguinte, a expressão estava sub-regulada. Essa expressão da COX-1 coincide com o edema uterino generalizado requerido para o fechamento luminal. Em contraste, o gene da COX-2 estava expresso no epitélio luminal e células estromais sub-epiteliais no pólo anti-mesometrial exclusivamente ao redor do blastocisto no momento da reação de atracamento, no dia 4, e persistiu até a manhã do dia seguinte. Esse gene uterino não estava expresso no sítio de aposição do blastocisto durante a implantação retardada tratada com progesterona (P_4), mas foi prontamente verificada ao redor do blastocisto ativado após o término do retardo pelo 17 beta-estradiol (E_2). Os resultados acima sugerem que a síntese de PG catalisada por COX-2 é importante para o aumento da permeabilidade vascular localizada e reação de atracamento. O gene da COX-1 “sub-regulado” (down-regulated) a partir da reação de atracamento (dia 4) estava então expresso novamente na decídua mesometrial e anti-mesometrial, nos leitos deciduais secundários nos dias 7 e 8. Esses resultados sugerem que a geração de PGs por COX-1 está envolvida na decidualização e/ou permeabilidade vascular endometrial localizada e continuada, observada durante esse período. Ao contrário, o gene da COX-2, expressa no pólo anti-mesometrial nos dias 4 e 5, troca de sítio de expressão para o pólo mesometrial dia 6 em diante. Resultados que sugerem que as PGs produzidas nesse sítio pela COX-2 estão envolvidos na angiogênese para o estabelecimento da placenta. No camundongo ovariectomizado, o gene da COX-1 foi induzido no epitélio por um tratamento combinado com P_4 e E_2 . Entretanto, o tratamento com P_4 e/ou E_2 não influencia o gene uterino da COX-2. De uma maneira geral, esses autores concluíram que o gene uterino da COX-1 é influenciado pelos esteróides ovarianos, enquanto os da COX-2 é regulado pelo blastocisto durante a sua implantação e durante a gravidez precoce. Nossos resultados mostraram uma piora da fertilidade em ratas com implantes peritoneais de endométrio com o uso de inibidores de COX-1 (Piroxicam e Indometacina), com exceção da Aspirina. E uma melhora quando do uso de drogas inibidoras da COX-2 como Nabumetona e Meloxicam. Por outro lado, quando

avaliados os efeitos dessas drogas sobre a fertilidade de ratas normais, intactas, o número de implantes ovulares por ratas intactas teve queda significativa com o uso de Indometacina e Piroxicam e não foram alterados pelo uso de Aspirina, Nabumetona ou Meloxicam (Figura 17). Por outro lado quando se avaliou a percentagem de ratas grávidas, interferiram significativamente negativas, além do Piroxicam e Indometacina, o Meloxicam pareceu ter efeito dependente da dose (0,4 e 0,8 mg/Kg), com diminuição significativa de respectivamente 60 e 40% (Figura 18). Isso sugere que sobre a fertilidade, os inibidores da COX-1 parecem ter efeitos deletérios sobre a fertilidade de ratas normais (intactas) como de ratas endometrióticas. Já as inibidoras da COX-2 parecem ter efeitos benéficos sobre a fertilidade de ratas endometrióticas e não interferir negativamente nas ratas intactas. A exceção se faz com o uso da Aspirina, talvez por mecanismos diversos da inibição da COX.

Acreditamos que, agentes que modulam os mecanismos inflamatórios e imunes proverão o melhor potencial no controle dos sintomas associados a endometriose e poderiam ser usados como adjuvantes dos tratamentos específicos dessa desordem ou preferenciais quando o objetivo for o alívio da dor. Nesse grupo, os inibidores da COX-2, além de alívio da dor, não interfeririam na fertilidade e muito provavelmente evitariam o desenvolvimento de endometriomas. Como segunda droga, a Aspirina poderia ter seu lugar, já que epidemiologicamente, a dose utilizada como profilático de doenças cardiovasculares e de tumores de colon são baixas.

A discussão se dará agora em torno do segundo módulo estudado.

Desta vez, a expressão da NO-sintase em implantes peritoneais de endométrio (endometriomas) foi demonstrada em ratas. A NO-sintase induzida (iNOS) foi expressa nos endometriomas com valores que crescia significativamente até o 10º dia do implante e então decrescia para o 15º dia assim como a NO-sintase constitutiva (cNOS) que decrescia de forma tempo-dependente do 5º para o 15º dia. Os resultados são mostrados na Figura 24.

Para verificar a modulação da NO-sintase, os animais foram tratados com L-Nitroarginina metiléster (L-Name), L-arginina e com a associação dos dois (LN-LA), um grupo funcionou como controle e foi tratado com salina. Os animais tratados com L-NAME (20mg/Kg) tiveram significativa diminuição no peso dos endometriomas quando comparados ao controle. Essa diminuição pareceu ser dose dependente. O tratamento com L-Arginina isoladamente tendeu ao aumento no peso dos endometriomas e a associação de L-Arginina com L-NAME reverteu parcialmente o processo.

Houve um aumento significativo na percentagem de ratas grávidas no grupo tratado com L-Name (20 mg/Kg) e uma diminuição significativa no número de contorções abdominais.

O óxido nítrico, derivado da L-arginina pela ação da sintase de óxido nítrico (NOS) tem sido mostrado como mediador de vários processos fisiológicos e pode estar alterado em algumas condições patológicas. Estudos recentes têm identificado NOS em tecidos de órgãos reprodutivos humanos incluindo as tubas de Falópio, ovários e útero (TELFER ET AL. 1995; ROSSELLI ET AL. 1996; ANTEBY ET AL, 1996; TSENG ET AL. 1996; TELFER ET AL.1997; KHORRAM ET AL. 1999). Além disso, WU ET AL. (1999) demonstraram um aumento na síntese de NO pelos macrófagos peritoneais em mulheres com endometriose. No nosso experimento, mostramos que o NO endógeno está envolvido na proliferação de implantes endometriais ectópicos e na sua associação com dor e infertilidade avaliadas no 15º dia de indução cirúrgica como demonstrada pelas seguintes observações: a) L-NAME, um inibidor da NOS, inibiu de forma dependente da dose o peso úmido dos implantes endometriais ectópicos, essa inibição foi parcialmente revertida pela L-arginina, o único doador fisiológico de nitrogênio para as reações catalisadas pela NOS. b) O pré-tratamento com L-NAME também foi capaz de restabelecer parcialmente a fertilidade em ratas com endometriose de forma dependente da dose, e também parcialmente revertido pelo co-tratamento com L-arginina. c) O pré-tratamento com L-NAME reduziu significativamente a resposta nociceptiva elicitada pelo ácido acético em ratas com endometriose experimental, como foi demonstrado pela diminuição do número de contorções abdominais. A expressão das enzimas NOS constitutivas e induzíveis reforça a hipótese do envolvimento do óxido nítrico na fisiopatologia da endometriose e incrementa a idéia da importância de sua modulação através da inibição da enzima (como foi realizada pela pentoxifilina, por exemplo) no tratamento da endometriose peritoneal, além do mais, avigora nosso modelo de endometriose induzida com auto-transplante de útero (endométri). A atividade decrescente com o tempo de implante da endometriose da sintase de óxido nítrico constitutiva, pode ter sido devida, provavelmente ao achatamento das células endometriais intra-císticas com perda parcial da sua função ou ao desgarramento do endométrio (como simulando uma menstruação hipotética) que naturalmente ocorre no decorrer da doença humana ou ainda pela fibrose que rodeia ou toma totalmente o tecido endometrial, como se uma resolução da doença. O aumento relativo da sintase de óxido nítrico induzida pode ser devido ao processo inflamatório peritoneal e a reação tecidual que é freqüentemente encontrada na endometriose.

A participação do NO nos eventos fisiopatológicos associados com a endometriose (proliferação, dor e sub-fertilidade) é consistente com trabalhos que reportam a evidência do envolvimento do sistema L-arginina/NO nos eventos tróficos do útero induzidos pelo estradiol em ratas imaturas (RAO ET AL. 1995). Reforçando esses dados, foi demonstrado que o efeito proliferativo do estrogênio sobre o endométrio pode ser em parte associado com ou mediado através do aumento da expressão da NOS (KHORRAM ET AL. 1999). É provável que esses efeitos sejam dependentes de um aumento da permeabilidade vascular e do fluxo de sangue no útero.

As citocinas tem sido implicadas no controle da implantação e no crescimento de células endometriais fora do útero (GIUDICE ET AL. 1994; OOSTERLYNCK ET AL. 1993; HALME, 1989). As citocinas pro inflamatórias interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) têm sido detectadas em líquido peritoneal de pacientes com endometriose em altas concentrações comparadas a líquido peritoneais de mulheres sadias (HALME, 1989; FAKIH ET AL. 1987; OVERTON, 1996). Como essas citocinas são capazes de induzir NOS em células inflamatórias (NATHAN, 1992; MONCADA ET AL. 1991), é provável que elas também possam contribuir para a indução da produção de NO em tecidos endometriais ectópicos. Podemos especular, então, que a modulação da síntese de NO poderia resultar na “sub-regulação” de toda a cascata inflamatória – provavelmente iniciada pelas citocinas e outros mediadores como prostaglandinas – envolvidas na fisiopatologia da endometriose. Essa hipótese poderia ser reforçada pelas evidências obtidas em nosso laboratório que um inibidor preferencial de uma isoforma induzida da ciclo-oxigenase (COX-2) (MEDEIROS ET AL. 1999) e inibidores da produção do TNF- α (talidomida e pentoxifilina) foram efetivos em inibir o crescimento/desenvolvimento de implantes endometriais ectópicos e seus efeitos relacionados a dor e sub-fertilidade. Ao mesmo tempo, tem sido descrito um papel nociceptivo para o caminho L-arginina/Óxido nítrico/Guanosina monofosfato cíclico $\{L\text{-arg/NO/cGMP}\}$ (HALEY ET AL. 1992; FERREIRA ET AL. 1999) indicando que o NO poderia estar implicado na dor relacionada a endometriose.

Demonstramos um efeito benéfico sobre a sub-fertilidade relacionada a endometriose ainda não muito bem entendida. Tem-se reportado que o NO tem um papel importante na regulação da esteroidogênese ovariana, ruptura folicular, no desenvolvimento embrionário precoce e na implantação embrionária (YAMAUCHI ET AL. 1997; BISWAS ET AL. 1998). É possível que esses dois últimos eventos possam ser mediados pelo NO na “supra-regulação” de receptores para fatores de crescimento tais como o fator de crescimento epidérmico (EGF) assim como para as proteínas e integrinas envolvidas na ancoragem embrionária (HATTORI ET AL. 1996; DUBEY ET AL. 1997). O NO também regula a atividade contrátil das trompas (EKERHOVD ET AL. 1997). Em certas circunstâncias patológica, tais como infecção ou endometriose, um aumento na geração de NO dentro do oviduto poderia influenciar o transporte embrionário, a fertilização e poderia conseqüentemente resultar em abortamento (ROSSELLI ET AL. 1998) ou gravidez ectópica.

As concentrações excessivas de óxido nítrico podem levar a rejeição aguda de órgãos, devido à supra-regulação de NOS induzível por citocinas, nessas circunstâncias, considerou-se que a inibição da síntese de NO prolonga a sobrevivência do enxerto em animais experimentais. O óxido nítrico também desempenha um papel na inflamação tanto aguda como crônica. Em modelos experimentais de inflamação aguda, a inibição de NOS exercem um efeito

protetor dose-dependente, sugerindo que o óxido nítrico promove edema e permeabilidade vascular (THOMAS ET AL. 1986).

Estudos recentes mostraram que o óxido nítrico estimula a síntese de prostaglandinas inflamatórias ao ativar a iso-enzima II da ciclo-oxigenase (NOVARO ET AL. 1996). (FIGURA 37)

O óxido nítrico (NO) é produzido por varias células em diferentes órgãos, entre elas, células musculares lisas, células mesangeais, neurônios, plaquetas, hepatócitos, macrófagos, fibroblastos e células epiteliais. O NO regula o tônus das células musculares lisas, agregação e aderência plaquetária, crescimento celular, apoptose, neurotransmissão e lesões como as reações imunes induzidas por infecção. Como esses eventos estão também associados com a biologia, a fisiologia e a fisiopatologia dos vários processos reprodutivos, vem-se demonstrando o papel do NO na reprodução (ROSSELLI ET AL. 1998). Mostramos que a inibição da NOS por L-NAME reduziu significativamente o tamanho dos implantes endometrióticos. Vários mecanismos podem ser propostos para esse evento.

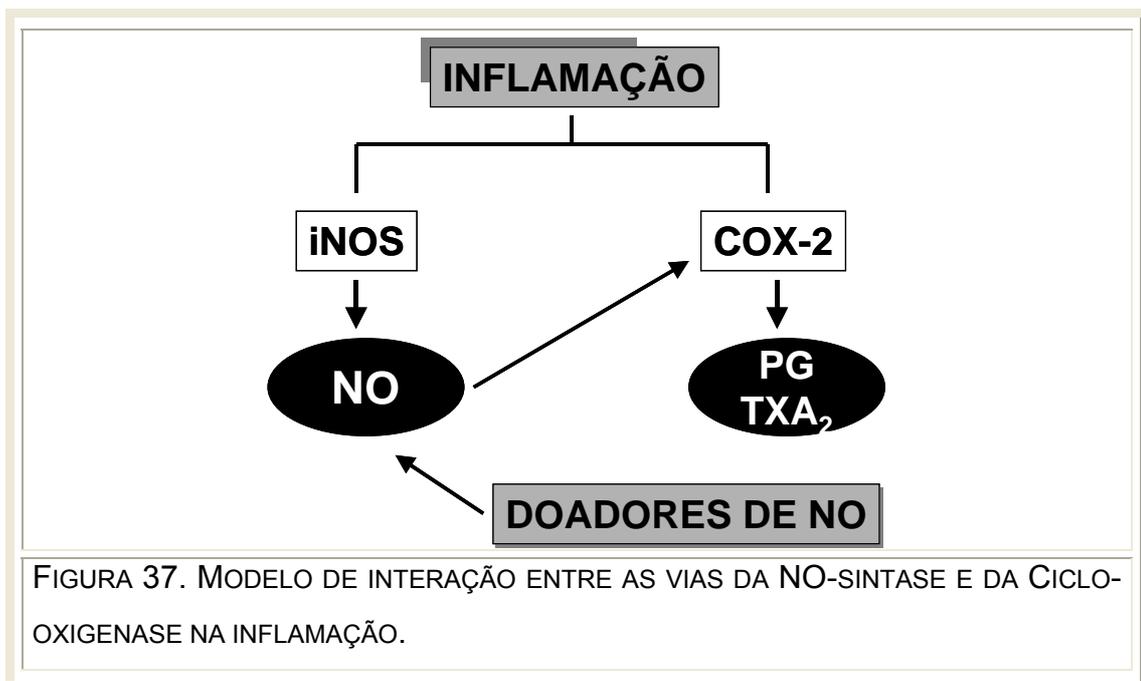


FIGURA 37. MODELO DE INTERAÇÃO ENTRE AS VIAS DA NO-SINTASE E DA CICLO-OXIGENASE NA INFLAMAÇÃO.

1. O papel do NO na regulação da função ovariana fica evidente pela observação que a síntese de NO aumenta com o desenvolvimento folicular, além disso, o papel dos hormônios na regulação da síntese de NO durante o desenvolvimento folicular e ovulação ficou estabelecido pela observação de que o aumento do NO se correlacionou com o aumento de estrogênio (ROSSELLI ET AL. 1996). Por outro lado SHUKOVSKI & TSAFRIRI (1995) demonstraram que inibidores de NOS levaram a anovulação em ratas, apesar desse achado não ter ficado claro se a anovulação se deve a mediação pelo NO de origem vascular ou neuronal, ovariana ou ainda se de origem de outras células ovarianas. BONELO ET AL. (1996) investigando o papel do NO sobre a ovulação mostraram que o uso de L-NAME levou a menor número de ovulações, reduzindo assim a produção de estradiol enquanto que a produção de progesterona permanecia inalterada.

Esses fatos podem justificar a deficiência de estrogênio pelo uso do L-NAME e uma conseqüente diminuição do endometrioma (implante peritoneal de endométrio), de crescimento sabidamente estrogênio-dependente ou ainda pela manutenção das concentrações de progesterona e diminuição de estrogênio aumentaria o efeito hipoestrogênico relativo.

2. O NO derivado da NOS α age como uma molécula reguladora do crescimento. Nesse sentido nota-se efeito duplo sobre o crescimento celular; NO isoladamente inibe o crescimento de células musculares lisas, como exemplo, mas, por outro lado, na presença de fatores de crescimento, como o fator de crescimento de fibroblasto, NO é um potente mitógeno e induz a crescimento celular (DUBEY ET AL. 1997), da mesma forma a síntese de NO mediada por IL-1 β na presença do fator de crescimento fibroblasto β também induz a crescimento celular (DUBEY ET AL. 1997). Devido o fato de a IL-1 e o Fator de crescimento fibroblástico, entre outros estarem envolvidos na fisiopatologia da endometriose, é provável que a inibição do NO tenha tido um efeito anticrescimento endometriótico.

3. A inibição da geração do óxido nítrico no ovário pela administração de inibidores de NOS reduz a taxa de ovulação em ratos *in vivo* e *in vitro*. O

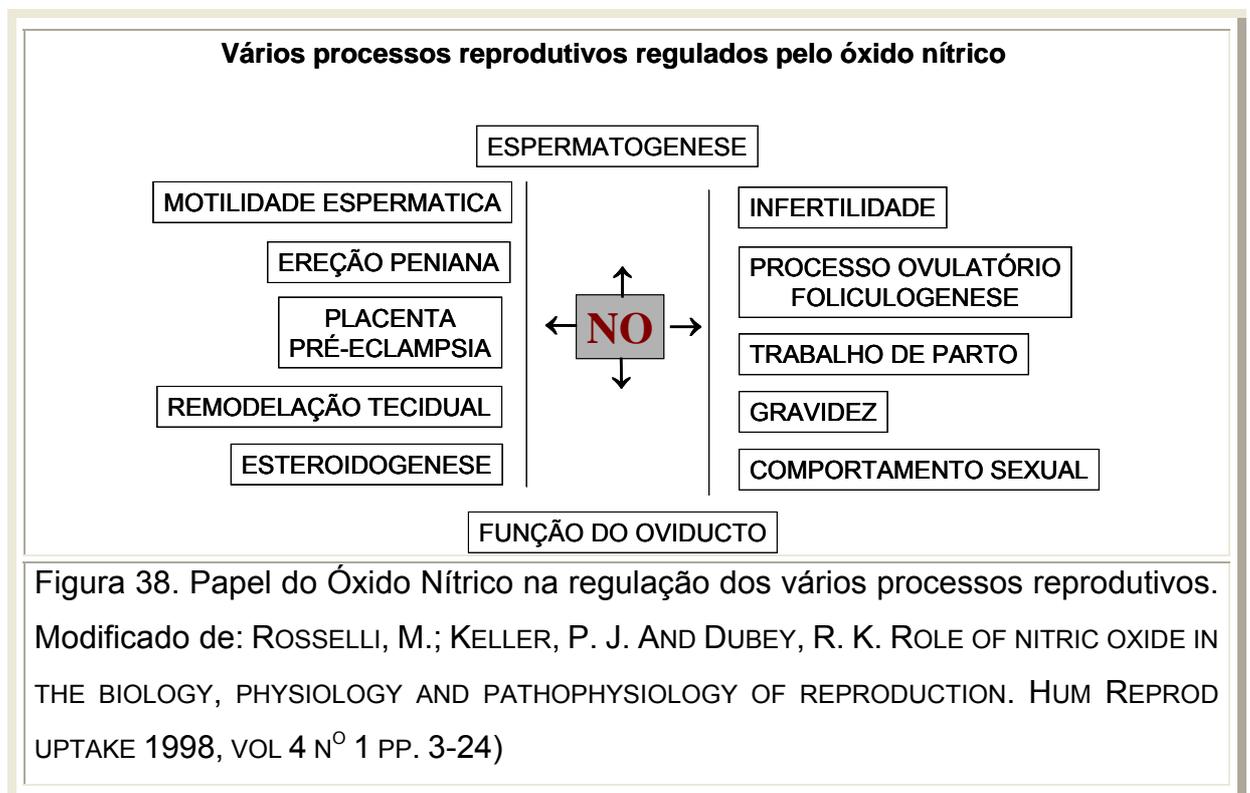
controle do relaxamento dos vasos ovarianos para acomodar as mudanças necessárias no fluxo sanguíneo, no volume de sangue e da exsudação plasmática que acompanha a ruptura folicular aparentemente é o mais importante papel do NO na ovulação (YAMAUCHI ET AL. 1997). Dessa forma é de se esperar que tanto o controle da ovulação como o controle do fluxo vascular de um tumor (endometrioma) proceda da mesma forma, daí com a vasoconstrição pela inibição do NO pode levar a inibição do crescimento tumoral.

4. Quando ambos os sistemas da NOS e ciclo-oxigenases estão presentes, existe um aumento na produção de prostaglandinas que podem exacerbar uma resposta inflamatória e proliferativa (NOVARO, ET AL. 1996). Ambos inflamação e proliferação poderiam levar a um aumento dos endometriomas, já que estes são compostos não só de células endometriais (glândulas e estroma), mas de células inflamatórias, principalmente macrófagos e geralmente envolvidas em fibrose (fibroblastos).

O óxido nítrico é uma molécula simples, mas quimicamente reativa que age como um mensageiro biológico e efector imune. Como última molécula efetora, o óxido nítrico, que é principalmente liberado por macrófagos ativados, mata ou inibe o crescimento de células tumorais, células transplantadas e patógenos diversos. Além disso, ou em consequência da ativação macrofágica, o NO pode lesar células do hospedeiro em doenças autoimunes nas quais o NO é inapropriadamente induzido. O papel do NO em infertilidade foi investigado por numerosos autores, entre eles DONG ET AL (1996) encontrou uma concentração maior de Óxido nítrico no líquido peritoneal de mulheres com endometriose ou com infertilidade quando comparadas com controles.

Encontramos uma diminuição da fertilidade de ratas com implantes peritoneais de endométrio avaliadas pela percentagem de ratas grávidas e pelo número de implantes ovulares por corno uterino. A fertilidade foi significativamente melhorada com o uso do L-NAME. A cavidade peritoneal é um ambiente imunologicamente dinâmico (HILL ET AL. 1988).

Reporta-se que o número aumentado de células imunes e suas atividades, das quais os macrófagos são os principais componentes, aumentam a liberação de citocinas e outros mediadores inflamatórios (imunes) e que são responsáveis pela fisiopatologia da endometriose. Grande quantidade de NO (nanomoles) podem ser liberados dessas células imunes ativadas, principalmente macrófagos com a catalise da NOSi. Como efector inespecífico, o NO não só elimina antígenos, mas também mata ou lesa células do hospedeiro, o que resultara em dano celular, tecidual, inflamação e aderências como conseqüência. Devido à conexão com o sistema reprodutivo, a cavidade peritoneal, como ambiente imunologicamente dinâmico, tem efeitos importantes sobre a reprodução e pode estar associado à falha reprodutiva (HILL ET AL. 1988). O sistema imunológico e suas alterações bioquímicas/metabólicas além do aumento de radicais livres no liquido peritoneal deve estar associado de perto com a infertilidade através de interferências nos vários níveis, incluindo a função do gameta, fertilização, implantação e desenvolvimento embrionário (Figura 38).



Espécies reativas de oxigênio têm sido implicadas em muitas doenças. Em algumas condições, os radicais livres têm um papel significativo na fisiopatologia, envolvendo o Ferro como facilitador da formação de (O_2^-) e de radicais hidroxilas (.OH) altamente tóxico que lesam proteínas, carboidratos, nucleotídeos e lipídios. Como resultado, teríamos lesão tecidual e novas aderências ocorrem. Mulheres com endometriose apresentam menstruação retrógrada e as lesões peritoneais endometrióticas da mesma forma “menstruam”, daí sugerir-se que o ferro liberado da hemoglobina é responsável pelas reações aos radicais in vivo (HO ET AL. 1997). Isso leva a crer que o óxido nítrico tem papel importante na endometriose e é reforçado pelo fato de PORTZ ET AL. (1991) terem demonstrado que o uso de antioxidantes protegeria contra a formação de aderências em modelo de endometriose, um dos mecanismos fisiopatológicos da infertilidade.

O fato de que a produção endógena de óxido nítrico e agentes liberadores de NO inibirem a esteroidogênese tanto na granulosa como nas células luteais (JABLONKA-SHARIFF ET AL. 1999) pode ser significativa na infertilidade de causa ou perdas gravídicas relacionadas a insuficiência lútea. O NO libera prostaglandinas que levam ou exacerbam o processo inflamatório (NOVARO, ET AL. 1996). Esse mecanismo poderia interferir na ovulação, inibindo-a ou alterando a função tubária ou nidatória, desde que as prostaglandinas estão envolvidas nesse processo. O óxido nítrico modula a contratilidade uterina e tubária durante a gravidez (YALIMPALLI ET AL. 1994) e relaxa o músculo liso vascular aumentando assim o aporte sanguíneo ao útero e embrião. Paralelamente, o RNA da sintase de óxido nítrico constitutiva foi detectado no endométrio (TELFER ET AL. 1995). OTA ET AL. (1998) mostraram que existe uma expressão exagerada de NO sintase endotelial no endométrio durante todo o ciclo menstrual de mulheres com endometriose, com adeniose e com infertilidade. Durante a fase secretora média do ciclo menstrual, o endométrio mostra mudanças sobre a influência tanto do estrogênio como da progesterona.

Em particular, o estroma é abundante e edematoso. O edema estromal é provavelmente dependente de um aumento da permeabilidade vascular e do fluxo sanguíneo. RAO ET AL. (1995) mostraram que a administração de estradiol a ratas imaturas induz ao edema uterino e que é reduzido pelo co-tratamento com inibidor da NOS.

Portanto, é possível que o NO tenha papel importante na fertilidade e em especial, neste caso a nidação que depende do “processo inflamatório endometrial” (fisiológico) para ocorrer. Daí as disfunções pelo excesso de NO na endometriose poderiam ter sido melhorado pelo uso do inibidor na NOS.

Outro mecanismo que deve ser levado em conta para entendermos como o excesso de NO pode ser danoso à fertilidade foi demonstrado por que se injetando doador de NO na cavidade amniótica de ratas, resultou em embriões malformados (LEE & JUNCHAU, 1994).

PURCELL ET AL. (1999) evidenciaram a importância do óxido nítrico na implantação de camundongos quando quantificaram por técnicas de *Western blotting* as isoformas da NOS no sítio de implantação entre os dias 4 a 8 da gravidez. No dia 6 a iNOS estava significativamente elevada no sítio da implantação quando comparadas nas regiões inter-implantações e localizava-se imunohistoquimicamente na decídua, ao redor dos vasos miometriais e dentro do cone ecto-placentário. O mesmo aconteceu com a eNOS, mostrada adjacente ao embrião, nos vasos da decídua primária. A nNOS localizada no miométrio, não se modificou. Esses resultados podem demonstrar o papel de remodelação tecidual, imunossupressão e vasoregulação. Qualquer alteração no balanço do NO, poderia interferir no processo de nidação, especificamente e a correção dessa alteração pelo uso de inibidores da NOS poderiam regular esse processo, como nas relações de sub-fertilidade e endometriose, por exemplo. Cautela deve ser tomada quando da decisão de extrapolar esses achados para a área terapêutica clínica visto que o uso de L-NAME em ratas grávidas, por via oral ou através de bombas de infusão intra-peritoneal levou a hipertensão materna e diminuição da perfusão útero-placentária. Causou

malformação por redução dos membros e outras dismorfogêneses disruptivas em casos de diminuição severa da perfusão útero-placentária (NOVA ET AL. 1991).

O NO por si só parece não interferir na dismenorréia, comumente encontrada em mulheres com endometriose. Ao contrário, O NO parece participar da iniciação e do controle do fluxo menstrual. Além disso, ele toma parte na inibição da agregação plaquetária no endométrio, onde a menostasia parece ocorrer primariamente por vasoconstricção mais que por formação de coágulos. O NO derivado do endométrio também pode suprimir a contratilidade miometrial, relaxando-a, mesmo fora da gravidez. Entretanto em animais não grávidos, apesar do NO inibir as contrações uterinas espontânea, a administração de nitroprussiato de sódio ao útero quiescente resultou em aumento da contratilidade uterina que foi bloqueada por indometacina. OTA ET AL. (1998) demonstrando uma maior quantidade de NOS no endométrio de mulheres com endometriose em qualquer fase do ciclo menstrual, avança a possibilidade de que o NO em excesso poderia levar a um distúrbio das contrações peristálticas uterina. De uma outra visão, LEYENDECKER ET AL. (1996) reportaram hiperperistalse e disperistalse uterina em pacientes com endometriose, significativamente diferente de controles, o que provavelmente poderia levar a dismenorréia além de alterar a função de transporte tubário dos espermatozoides ou ovo e redução da fertilidade.

O NO está envolvido numa serie de mecanismos de dor. Parece estar envolvido na dor neuropática crônica (MAYER ET AL. 1999) e o L-NAME, um inibidor NOS parece modelar a antinocicepção colinérgica (JAIN & KULKARNI, 1999).

O NO também está envolvido na transmissão de dor em humanos. A dor crônica parece aumentar os níveis de nitrito/nitrato no líquido cefalorraquidiano ao contrario da dor aguda de uma apendicite, por exemplo, (KIMURA ET AL. 1999).

Em conclusão, nossos resultados sugerem que o NO endógeno esteja envolvido na fisiopatologia da endometriose e na sua sintomatologia e que a modulação dos processos inflamatórios e/ou imunes, sob a ação do NO possa municiar mais um método terapêutico para essa condição.

Neste “set” experimental e terceiro módulo, redemonstramos que os fragmentos de tecido uterino transplantados ao peritônio de ratas formavam consistentemente lesões que macroscopicamente e microscopicamente assemelhavam-se a implantes endometrióticos. A endometriose induzida cirurgicamente foi considerada como danosa a fertilidade, promovendo a sub-fertilidade ou infertilidade, causando dor crônica, portando causando uma resposta nociceptiva significativamente diferente dos animais controles e que podem levar a um aumento, entre outros, dos níveis peritoneais de TNF. Além disso, Utilizou-se inicialmente a Talidomida, Pentoxifilina e Dexametasona como inibidoras de TNF e Indometacina como liberadora ou promotora. As doses iniciais e vias de administração foram respectivamente 5 mg/Kg por via oral; 30 mg/Kg por via subcutânea; 0,2mg/Kg sc e a Indometacina teve a dose de 2 mg/Kg via oral.

Mostramos que o tratamento com Pentoxifilina, um inibidor não seletivo do TNF, foi efetivo em atenuar o desenvolvimento (crescimento) dos “endometriomas” assim como aliviar a dor e melhorar a fertilidade demonstrada pelas seguintes observações: a) a Pentoxifilina inibiu o crescimento de tecido endometrial ectópico de maneira dependente da dose; b) a Pentoxifilina restabeleceu parcialmente a sub-fertilidade encontrada em ratas com implantes endometrióticos e c) a Pentoxifilina (30mg/kg) exibiu efeito analgésico, reduzindo significativamente a resposta nociceptiva elicitada pelo ácido acético em ratas com endometriose experimental e ainda diminuindo os níveis peritoneais de TNF nesses animais.

Da mesma forma o tratamento com Talidomida reduziu significativamente o peso dos endometriomas (implantes ectópicos) de forma independente da dose (Figura 28). O mesmo aconteceu com o uso de dexametasona.

Fatores angiogênicos tais como, TNF, IL-8 e fator de crescimento endotelial vascular foram encontrados em titulações aumentadas no líquido peritoneal de mulheres com endometriose (SERAFIN, 1996; MCLAREN ET AL. 1995, 1996 e 1998; IWABE ET AL. 1998). Essa observação é importante desde que ela pode sugerir/corroborar que a atividade inibidora do crescimento do tecido ectópico implantado possa ser indiretamente imputado a pentoxifilina como tendo uma atividade anti-angiogênica. Os efeitos da pentoxifilina podem também ser resultados da capacidade da droga de bloquear a enzima óxido nítrico sintase e a produção de IL-1 (LOFTIS, MEALS & ENGLISH, 1997; VAN FURTH ET AL. 1997). Essa hipótese é fortalecida pela evidência que sugere um papel do óxido nítrico na progressão da endometriose (WU ET AL. 1999; OTA ET AL. 1998). Além do mais, a IL-1 estimula a proliferação dos fibroblastos, que

poderiam contribuir tanto para a proliferação do implante assim como para a formação de aderências e fibrose (MASS-SZABOWSKI & FUSENIG 1996), muito freqüentemente encontradas nos indivíduos que apresentam endometriose.

Hipotetizamos que a pentoxifilina tem uma influencia favorável sobre a performance reprodutiva como conseqüência de suas propriedades imunomoduladoras sobre o “*milieu*” inflamatório (particularmente sobre os níveis de TNF- α e IL-1) encontrado na pélvis feminina acometida de endometriose. Além dos fatos relevantes do aumento dos níveis de muitas citocinas no líquido peritoneal (EISERMANN ET AL. 1988; HARADA ET AL., 1997; KHORRAM ET AL. 1993; HARADA ET AL. 1999; KONINCKX, 1998), alterações hormonais no meio ambiente folicular e na qualidade embrionária podem também estar implicadas na sub-fertilidade associada a endometriose (PELLICER ET AL. 2000).

Recentes evidências têm reforçado o possível papel do TNF- α nesse processo. LEE ET AL. (2000) mostraram que as concentrações foliculares de TNF- α eram significativamente maiores nos ovócitos de qualidade pobre. As células da granulosa de mulheres com endometriose mostraram uma elevação significativa na expressão de TNF- α (CARLBERG ET AL. 2000). Além do mais, engatilha a produção local de prostaglandinas derivadas de ciclooxigease-2 (DAWOOD, 1997), que podem ter papel importante no desenvolvimento da endometriose experimental (MEDEIROS ET AL. 1999) e tem um efeito potencial no desenvolvimento da sub-fertilidade associada a endometriose pelas evidencias de interferirem na captação ovular, disfunção ovulatória e implantação embrionária (DAWOOD, 1997). Inibindo a produção não-seletiva de TNF- α (NEUNER ET AL. 1994; VAN FURTH ET AL. 1997), a pentoxifilina pode melhorar todos esses eventos reprodutivos. É também possível que a efetividade da pentoxifilina nos eventos reprodutivos sejam também devidas a sua capacidade de melhorar o acoplamento do espermatozóide a zona pelúcida e diretamente melhorar a mobilidade espermática (YOGEV ET AL. 1995; STONE ET AL. 1999).

A pentoxifilina melhorou a fertilidade no nosso modelo avaliada pelo numero de ratas grávidas e pelo numero de implantes embrionários por corno uterino e não interferiu na fertilidade de ratas intactas sem endometriomas.

O efeito anti-nociceptivo significativo demonstrado com relação a pentoxifilina é provavelmente devido à inibição da cascata de citocinas inflamatórias que precedem a liberação de prostaglandinas e aminas simpaticomiméticas (mediadores finais da hiperalgesia inflamatória) por macrófagos residentes (FERREIRA, LORENZETTI & CORREA, 1978; LEVINE ET AL. 1986; NAKAMURA & FERREIRA 1987). Evidências adicionais e indiretas favorecem essa hipótese, aquelas que a inibição seletiva do TNF- α , como com o uso de

talidomida é capaz de reduzir a resposta nociceptiva induzida pelo ácido acético (a. RIBEIRO ET AL. 2000 , b. RIBEIRO ET AL. 2000).

Os resultados desse experimento confirmam e expandem achados previos demonstrando que a administração de drogas imunomoduladoras poderiam ser efetivas na modulação do crescimento ectópico do endométrio e melhorar os eventos reprodutivos em modelos animais de endometriose (STEINLEITNER ET AL. 1991; NOTHNICK, CURRY & VERNON, 1994).

A angiogênese tem sido reportada como uma nova teoria para a endometriose (HEALY ET AL. 1998). A angiogênese endometrial excessiva é importante na fisiopatologia da endometriose. Evidências têm mostrado que o endométrio de mulheres com endometriose tem uma maior capacidade de proliferar, implantar e crescer na cavidade peritoneal por uma maior proliferação de células endoteliais e pela expressão de moléculas de integrinas como a alfa-beta3 mais evidente em vasos de mulheres com endometriose que em vasos de mulheres controle. A endometriose assim como tumores sólidos, artrite reumatóide, psoríase e retinopatia diabética fazem parte de uma família de doenças angiogênicas. Isso sugere que novos agentes anti-angiogênese poderiam ser utilizados no tratamento da endometriose.

A talidomida é um agente sedativo que foi retirado do mercado em virtude dos seus efeitos teratogênicos catastróficos quando administradas durante a gravidez. Entretanto a talidomida apresenta um efeito imunomodulador muito importante e está sendo aceita devido seu amplo espectro de usos clínicos como no eritema nodoso e lepra e nas manifestações cutâneas do lupus eritematoso. Seu mecanismo de ação permanece desconhecido, mas pode estar relacionado a um desvio no padrão de respostas de células T a antígenos e mitógenos, favorecendo um tipo de resposta TH2 (com supra-regulação de interleucina-4 e 5) em relação à resposta TH1. Foi ainda constatada que suprime a produção de TNF-alfa e que teria ação antiangiogênica. Essa ultima atividade esta levando a pesquisas de uso da talidomida em cânceres de pulmão, ovário, próstata e mieloma múltiplo (DHARIA, STEINKAMPF & CATER, 2004).

O fator de necrose tumoral é um potente ativador do fator nuclear KappaB (NF-kappaB), caminho que leva a uma super-regulação de proteínas anti-apoptóicas (SLEIJFER, KRUIT & STOTER. 2004).

A angiogênese é fator importante na embriogênese, cicatrização tecidual e progressão de tumores como mieloma múltiplo, por exemplo. A talidomida, como droga imunomoduladora, pode inibir a angiogênese e induzir a apoptose de modelos experimentais de neovascularização estabelecida. Por estas razões, drogas inibidoras de angiogênese além de úteis para o tratamento de cânceres poderiam também tratar a endometriose que também depende de neovascularização (SINGHAL ET AL. 1999) Vascularização proeminente ocorre na endometriose onde várias citocinas angiogênicas como fatores de crescimento fibroblásticos e fatores de crescimento endotelial vascular são encontrados em níveis elevados no peritônio.

A talidomida é uma dessas drogas antiangiogênicas além de ser imunomoduladora e cujo nome químico é alfa-(N-phthalimido)glutarimido de forma empírica $C_{13}H_{10}N_2O_4$. Entre seus mecanismos de ação descreve-se uma diminuição do TNF-alfa pela aceleração da degradação da proteína que codifica o seu RNAm. Esse mecanismo difere daquele proposto para a pentoxifilina e corticoesteróides, que suprimem a transcrição e translação do RNA do TNF-alfa induzidas pelo lipopolissacarídeo (LPS). A Talidomida, por seus efeitos sobre o Sistema Nervoso Central (propriedades sedativo-hipnóticas), possivelmente ativando o centro do sono, causa redução na atividade motora, mas é desprovida de ação analgésica. A toxicidade mais seria associada com a talidomida está na teratogenicidade já amplamente documentada (SYSTEM FOR THALIDOMIDE EDUCATION AND PRESCRIBING SAFETY, 2003).

Nossos resultados mostraram que a talidomida teve uma substancial atividade anti-endometriose em um modelo experimental de autotransplante de útero em ratas. A Talidomida tem uma variedade de propriedades que poderiam explicar sua atividade: ela pode alterar a expressão de moléculas de adesão (GEITZ ET AL. 1996), suprimir a produção do fator de necrose tumoral alfa (SAMPAIO ET AL. 1991), aumento na produção de interleucina-10 (CORRAL ET AL. 1996) e incrementar a imunidade mediada pela célula, estimulando

diretamente as células T citotóxicas (HASLETT ET AL. 1998). Suas interações com as células T helper tipo 1 e tipo 2 produzem efeitos complexos nos níveis de citocinas como interleucina 4, IL-5 e interferon gama (MCHUGH ET AL. 1995). A talidomida é potente inibidor da angiogênese induzida pelo fator de crescimento fibroblástico e fator de crescimento endotelial vascular (D'AMATO ET AL. 1994; KENYON ET AL. 1997). Tem-se demonstrado ainda que a talidomida causa apoptose em tumores estabelecidos associados a angiogênese em modelos experimentais (KENYON ET AL. 1997).

A Indometacina induz a liberação de TNF-alfa enquanto a pentoxifilina, um derivado da metilxantina, previne aderências de leucócitos ao endotélio vascular e protege órgãos de choque reduzindo as concentrações de TNF-alfa (SANTUCCI ET AL. 1994).

Acredita-se que os glicocorticóides interfiram no ciclo celular de células linfóides ativadas. Eles interagem com uma série de receptores amplamente distribuídos e membros da superfamília de receptores esteróides, esteroide (vitamina D), hormônio tireoideano, ácido retinóico e muitos outros receptores que interagem com os promotores dos genes-alvo, regulando a sua transcrição. Além de sua ligação ao GRE (elemento de resposta ao glicocorticóides), o receptor ligado a ligante também forma complexos com outros fatores de transcrição e influencia a sua função, como AP1 e NF- κ B, que atuam sobre diferentes promotores, contribuindo para a regulação da transcrição dos seus genes responsivos. Esses fatores de transcrição possuem amplas ações sobre a regulação de fatores de crescimento, citocinas pró-inflamatórias e que em grande parte medeiam os efeitos anticrescimento, antiinflamatórios e imunossupressores dos antiinflamatórios.

Os corticóides reduzem radicalmente as manifestações da inflamação. Essa propriedade resulta dos seus efeitos sobre as concentrações e distribuição e função dos leucócitos periféricos, assim como dos seus efeitos supressores sobre as citocinas e quimiocinas inflamatórias e outros mediadores lipídicos e glicolipídicos da inflamação. Os glicocorticóides também inibem as funções dos macrófagos teciduais e de outras células apresentadoras de antígenos. Há limitação da capacidade de fagocitose bem

como a de produzir o fator de necrose tumoral alfa, a interleucina-1, 12 e interferon gama entre outros que são importantes indutores da atividade das células TH1 e da imunidade celular. Eles também reduzem a expressão da COX-2. A eficácia dos glicocorticóides no controle da rejeição de transplantes é aumentada pela sua capacidade de reduzir a expressão de antígenos do tecido enxertado, de retardar a revascularização e de interferir na sensibilização dos linfócitos T citotóxicos e na gênese de células formadoras de anticorpos (HARDMAN & LIMBRID, 2003).

Até o momento, o uso de inibidores da angiogênese em endometriose tem sido restrito a um modelo em camundongo, onde vários inibidores foram utilizados tais como a endostatina, o TNP-470 e o rosaglitazone que foram efetivos em reduzir o número e tamanho das lesões (LEVINE ET AL. 2002). Em Humanos, o único estudo foi com a talidomida no alívio da dor (SCARPELLINI ET AL. 2002).

Em conclusão, esses resultados fortalecem a necessidade de investigações no possível uso de imunomoduladores para o tratamento alternativo da endometriose e seus sintomas associados assim como co-adjuvantes no tratamento cirúrgico e hormonal vigente. Entre os inibidores de TNF, salientamos a efetividade e segurança, ao contrário dos efeitos colaterais dos corticosteróides e as repercussões da talidomida na fertilidade em humanos.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

1. Os METABÓLITOS DAS CICLOOXIGENASES 1 E 2 (COX-1 E COX-2) TEM PAPEL IMPORTANTE NA FISIOPATOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO DE IMPLANTES ECTÓPICOS (PERITONEAIS) DE ENDOMÉTRIO EM RATAS E SUAS REPERCUSSÕES SOBRE A DOR E A FERTILIDADE.

1. 1. Todos os tratamentos instituídos (inibidores da COX-1 e 2) aliviaram significativamente a dor quando consideradas pelo teste de contorções abdominais.

1. 2. Os endometriomas (implantes peritoneais de endométrio) tiveram a média dos seus pesos úmidos diminuídos pela aspirina, nabumetona e meloxicam. Por outro lado, o piroxicam e a indometacina aumentaram a média dos pesos desses tumores.

1. 3. Com relação à fertilidade, a percentagem de ratas grávidas foi aumentada pelo uso de meloxicam, aspirina e nabumetona.

1. 4. Os tratamentos com aspirina e nabumetona diminuíram significativamente o desenvolvimento dos endometriomas assim como contribuíram para o alívio da dor e incrementaram a fertilidade. Logo, estes resultados sugerem o papel da COX-1 e -2 na fisiopatologia da dor relacionada a endometriose assim como na infertilidade e no crescimento dos endometriomas por diferentes mecanismos.

2. O ÓXIDO NÍTRICO MOSTROU SEU PAPEL NA FISIOPATOLOGIA DA ENDOMETRIOSE DESDE QUE:

2. 1. A atividade da sintase de óxido nítrico (iNOS e cNOS) realizada através da citrulina marcada é expressa nos endometriomas.

2. 2. A modulação da Óxido nítrico-sintase (por L-name e L-Arginina) influenciou sobre a evolução (desenvolvimento) do transplante peritoneal de endométrio em ratas.

2.2.1. O uso do L-NAME fez diminuir os pesos úmidos dos endometriomas assim como melhorou a fertilidade e aliviou a dor de forma dose-dependente.

2.2.2. A Pentoxifilina (30mg/Kg/day) administrada entre o 5º e o 14º dia da indução da endometriose foi efetiva na diminuição da expressão da sintase de óxido nítrico, ambas constitutiva como induzida.

2. 3. Os resultados desse estudo sugerem o envolvimento do óxido nítrico no desenvolvimento da endometriose experimental assim como nas suas repercussões: dor e infertilidade.

3. O ENVOLVIMENTO DO TNF SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE IMPLANTES ECTÓPICOS PERITONEAIS DE ENDOMÉTRIO EM RATAS E SUAS REPERCUSSÕES SOBRE A DOR E A FERTILIDADE FORAM DEMONSTRADOS PELOS SEGUINTE FATOS:

3. 1. Os níveis de TNF- α aumentaram no líquido peritoneal de ratas endometrióticas de forma tempo dependente quando comparadas com ratas intactas.

3. 2. Drogas que modulam o TNF (talidomida, pentoxifilina e dexametasona) foram efetivas em reduzir o crescimento de endometriomas experimentais.

3. 3. Essas drogas também aliviaram a dor e incrementaram a fertilidade nesse modelo animal.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AKERLUND, M. Pathophysiology of dysmenorrhea. *Acta Obstet Gynecol Scand* (Suppl) 87:27, 1979.
- ANTEBY, E. Y., HURWITZ, A., KORACH, O., REVEL, A., SIMON, A., FINCI-YEHESKEL, Z., MAYER, M., LAUFER, N. Human follicular nitric oxide pathway: relationship to follicular size, oestradiol concentrations and ovarian blood flow. *Human Reproduction* 11:1947-1951, 1996.
- ARICI, A., ORAL, E. The peritoneal environment in endometriosis. In: DIAMOND, M. P., OSTEEEN, K. G. (Eds.) *Endometrium and endometriosis*. Massachusetts: Blackwell Science. 161-173, 1997.
- ASSREUY, J., CUNHA, F. Q., LIEW, F. Y., MONCADA, S. Feedback inhibition of nitric oxide. *British Journal of Pharmacology* 108:833-837, 1993.
- BADAWY, S. Z., MARSHALL, L., CUENCA, V. Peritoneal fluid prostaglandins in various stages of the menstrual cycle: role of infertile patients with endometriosis. *Int J Fertil* 30:48-52, 1985.
- BAKHLE, Y. S., BOTTING, R. M. Cyclooxygenase-2 and its regulation in inflammation. *Mediators Inflammation* 5:305-23, 1996.
- BARBUL, A. Arginine Biochemistry, physiology and therapeutic implications. *J Parenteral Nutrition* 10:227-238, 1986.
- BARNES, C. J., CAMERON, I. L., HARDMEN, W. E., LEE, M. Non-steroidal Anti-inflammatory drug effect on crypt cell proliferation and apoptosis during initiation of rat colon carcinogenesis. *Br J Cancer* 77(4):573-80, 1998.

- BÉLIAR, A; NOEL, A AND FOIDART, JEAN-MICHEL. Reduction in apoptosis and proliferation in endometriosis. *Fertil Steril* 82 (1): 80-85, 2004.
- BENEDETTO, C. Eicosanoids in primary dysmenorrhea, endometriosis and menstrual migraine. *Gynecol Endocrinol* 3(1):71-94, 1989.
- BERGQVIST, A, JEPPSSON, S, LJUNGBERG, O. Histochemical demonstration of estrogen and progesterone binding in endometriotic tissue and in uterine endometrium. *J Histochem Cytochem* 33:155-161, 1985.
- BERGQVIST, A., FERNO, M. Estrogen and progesterone receptors in endometriotic tissue and endometrium: comparison according to localization and recurrence. *Fertil Steril* 60:63-68,1993.
- BISWAS, S., KABIR, S. N., PAL, A. K. The role of nitric oxide in the process of implantation in rats. *Journal of Reproduction and Fertility* 114:157-161, 1998.
- BONELLO, N., MCKIE, K., JASPER, M., ANDREW, L., ROSS, N., BRAYBON, E., BRANNSTROM, M., NORMAN, R. J. Inhibition of nitric oxide: effects on interleukin-1 enhanced ovulation rate, steroid hormone, and ovarian leukocyte distribution at ovulation in the rat. *Biology of Reproduction* 54:436-445, 1996.
- BRAUN D. P., DMOWSKI, W. P. Endometriosis: abnormal endometrium and dysfunctional immune response. *Curr Opin Obstet Gynecol* 10:365-9, 1998.
- BRAUN, D. P., GEBEL, H., ROTMAN, C., RANA, N. DMOWSKI, W. P. The development of cytotoxicity in peritoneal macrophages from women with endometriosis. *Fertil Steril* 57(6):1203-10, 1992.

- BRAUN, D. P., GEBEL, H., HOUSE, R., RANA, N., DMOWSKI, N. P. Spontaneous and induced synthesis of cytokines by peripheral blood monocytes in patients with endometriosis. *Fertility and Sterility* 65(6):1125-9, 1996.
- BROSSENS, I., DONNEZ, J. (eds). The current status of endometriosis. Research and management. The Parthenon Publishing Group, New York, 1992.
- BUHIMSCHI, I., GAADE, G. R., GARFIELD, R. E. The nitric oxide pathway in pre-eclampsia: pathophysiological implication. *Human Reproduction Update* 4:24-42, 1997.
- BULUN, S.E., ZEITOUN, K. M., TAKAYAMA, K. AND SASANO, H. Estrogen biosynthesis in endometriosis: molecular basis and clinical relevance. *Journal of Molecular Endocrinology* 25: 35-42, 2000.
- CAI, W., HU, L., FOULKES, J. G. Transcription-modulating drugs: mechanism and selectivity. *Curr Opin Biotechnol* 7(6): 608-615, 1996.
- CAO, Y., PRESCOTT, S. M. Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. *J Cell Physiol* 190:279-86, 2002.
- CARLBERG, M., NEJATY, J., FROYSA, B., GUAN, Y., SODER, O., BERGQVIST, A. Elevated expression of tumor necrosis factor alpha in cultured granulosa cells from women with endometriosis. *Human Reproduction* 15(6):1250-5, 2000.
- CHAKRABORTY, I; DAS, S. K.; WANG, J.; DEY, S.; K. Developmental expression of cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2 genes in the peri-implantation mouse uterus and their differential regulation by the blastocyst and ovarian steroids. *J Mol Endocrinol* 16(2):107-22, 1996.

- CHANTLER, E. N., WILLIAMS, C. A., ELSTEIN, M. Sperm survival studies in peritoneal fluid from infertile women with endometriosis and unexplained infertility. *Clin Reprod Fertil* 3:297, 1985.
- CHARPIGNY, G., REINAUD, P., TAMBY, J. P., CREMINON, C., GUILLOMOT, M. Cyclooxygenase-2 unlike cyclooxygenase1 is highly expressed in ovine embryos during the implantation period. *Biol Reprod* 57(5):1032-40, 1997.
- CHEGINI, N.; GOLD, L. I.; WILLIAMS, R. S. Localization of transforming growth factor beta isoforms TGF-beta 1, TGF-beta 2, and TGF-beta 3 in surgically induced endometriosis in the rat. *Obstet Gynecol* 83(3):455-61, 1994.
- CHRISTMAN, B. W., MCPHERSON, C. D., NEWMAN, J. H., KING, G. A., BERNARD, G. R., GROVES, B. M., LOYD, J. E. An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 327(2):70-5, 1992.
- COBELLIS, L., RAZZI, S., DE SIMONE, S., SARTINI, A. ET AL. The treatment with a cox-2 specific inhibitor is effective in the management of pain related to endometriosis. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* disponível em www.elsevier.com/locate/ejogrb, 2004.
- COLLIER, H. O. J., DINNEEN, J. C., JOHNSON, C. A., SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy* 32:295-310, 1968.
- CORRAL, L. G, MULLER, G. W., MOREIRA, A. L. ET AL. Selection of novel analogs of thalidomide with enhanced tumor necrosis factor alpha inhibitory activity. *Mol Med* 2:506-15, 1996.

- COUTINHO, E. M., MAIA, H. S. The contractile response of the human uterus, fallopian tubes and ovary to prostaglandins in vivo. *Fertil Steril* 22:539-543, 1971.
- COUTINHO, E. M., SPÍNOLA, P., MOURA, LH. Progress in the management of Endometriosis. The Parthenon Publishing Group, London, 1995. 447pp.
- CROFFORD, L. J. Expression and regulation of cyclooxygenase-2 in synovial tissues of arthritic patients. *New Targets in Inflammation: inhibitors of COX-2 or adhesion molecules*, Kluwer Acad Publishers and William Harvey Press, 1996.
- CUNHA, F. Q., BOUCLE, M. A., MOTTO, J. I. B., VARGAFTIG, B. B., FERREIRA, S. H. Blockade by fenspiride of endotoxin-induced neutrophil migration in the rat. *Eur J Pharmacol* 238:47-52, 1993.
- D'AMATO, R. J., LOUGHNAN, M. S., FLYNN, E., FOLKMAN, J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:4082-5, 1994.
- DARGENIO, R., CORBUCCI, M. G., LAMANNA, M. A., GARCEA, N. Indomethacin and fertility in experimental endometriosis. *Acta Eur Fertil* 23(2):85-8, 1992.
- DAWOOD, M. Y. Prostaglandins metabolites in peritoneal fluid in women with and without endometriosis. In: DIAMOND, M. P., OSTEEEN, K. G. (eds). *Endometrium and endometriosis*. Massachusetts: Blackwell Science. 146-160, 1997.
- DAWOOD, M. Y., KHAN-DAWOOD, F., WILSON, L. Peritoneal fluid prostaglandins and prostanoids in women with endometriosis, chronic pelvic inflammatory disease, and pelvic pain. *Am J Obstet Gynecol* 148:391, 1984.
- DHARIA, SP; STEINKAMPF, MP & CATER, C. Thalidomide-induced amenorrhea: case report and literature review. *Fertil Steril* 82(2):460-62, 2004.

- DIAMOND, M. P., OSTEEN, K. G. (Eds.) Endometrium and endometriosis. Massachusetts: Blackwell Science. 1997.
- DIZEREGA, G. S., BARBER, D. L., HODGEN, G. D. Endometriosis: Role of ovariansteroids in initiation, maintenance and supressio. Fertil Steril 33: 649, 1980.
- DMOWSKI, W. P., GEBEL, H. M., BRAUN, D. P. The role of cell-mediated immunity in pathogenesis of endometriosis. Acta Obstet Gynecol Scand (Suppl) 159:7-14, 1994.
- DOHERTY, G. M., JENSEN, J. C., ALEXANDER, H. R., BURESH, C. M., NORTON, J. A. Pentoxifylline suppression of tumor necrosis factor gene transcription. Surgery 110(2):192-8, 1991.
- DONG, Y. L., GANGULA, P. R., FANG, L., YALLAMPALLI, C. Differential expression of cyclooxygenase 1 and 2 protein in rat uterus and cervix during the estrous cycle, pregnancy, labour and myometrial cells. Prostaglandins 52(1):13-34, 1996.
- DUARTE, I. D. G., NAKAMURA, M., FERREIRA, S. H. Participation of the sympathetic in acetic acid-induced writhing in mice. Braz J Med Biol Res 21:341-3, 1988.
- DUBEY, R. K., JACKSON, E. K., RUPPRECHT, H. D., STERZEL, R. B. Factors controlling growth and matrix production in vascular smooth muscle and glomerular mesangial cells. Current Opinion in Nephrology and Hypertension 6:88-105, 1997.
- EISERMANN, J., GAST, M. J., PINEDA, J., ET AL. Tumor necrosis factor in peritoneal fluid of women undergoing laparoscopic surgery. Fertil Steril 50:573-9, 1988.

- EKERHOVD, E., BRAENNSTROEM, M., ALEXANDERSSON, M., NORSTROEM, A.
Evidence for nitric oxide mediated contractile activity in isolated strips of human Fallopian tube. *Human Reproduction* 12:301-305, 1997.
- ELLMAN, C., CORBETT, J. A., MISKO, T. P., MCDANIEL, M., BECKERMAN, K. P. Nitric oxide mediates interleukin-1-induced cellular cytotoxicity in the rat ovary: A potential role for nitric oxide in the ovulatory process. *Journal of Clinical Investigation* 92:3053-3056, 1993.
- EVERS, J. L. Pathogenesis and aetiology: questions, questions, questions. In: Shaw RW (ed). *Endometriosis Current Understanding and management*. Blackwell Science Ltd, London, pp 3-15, 1995.
- FAKIH, H., BAGGETT, B., HOLTZ, G., TSANG, K. Y., LEE, J. C., WILLIAMSON, H. O. Interleukin-1: possible role in the infertility associated endometriosis. *Fertil Steril* 47:213-7, 1987.
- FEDELE, L., MARCHINI, M., BIANCHI, S. ET AL. Structural and ultrastructural defects in preovulatory endometrium of normo-ovulating infertile women either minimal or mild endometriosis. *Fertil Steril* 53:989-993, 1990.
- FEDELE, L., PARAZZINI, F., BOCCIOLONE, L. ET AL. Pain symptoms associated with endometriosis. *Obstet Gynecol* 179:796, 1992.
- FERREIRA, S. H., CUNHA, F. Q., HYSLOP, S. Role of the inducible forms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase in inflammatory pain. In: WILLOUGHBY, D. A., TOMLINSON, A. (eds). *Inducible enzymes in the inflammatory response*. pp 149-167. Birkäuser Verlag Basel, Switzerland, 1999.
- FERREIRA, S. H., LORENZETTI, B. B., CORREA, F. M. A. Central and peripheral antialgesic action of aspirin-like drugs. *Eur J Pharmacol* 53:39-48, 1978.

- FRASER, I. S. Prostaglandins, prostaglandin inhibitors and their roles in gynaecological disorders *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 6(4):829-57, 1992.
- FUJIMOTO, J., HORI, M., ICHIGO, S., ITOH, T., SAIO, M. ET AL. Induction of M-CSF receptor and its mRNA, and activation of tyrosine kinase in peripheral monocytes by oestradiol-17-beta and progesterone. *Ann Clin Biochem* 32, 399-404. 1995.
- FUKAYA, T., SUGAWARA, J., YOSHIDA, H., YAJIMA, A. The role of macrophage colony stimulating factor in the peritoneal fluid in infertile patients with endometriosis. *Tohoku J Exp Med* 172(3): 221-6, 1994.
- FUKUTO, J. M., CHAUDHURI, A. Inhibition of constitutive and inducible nitric oxide synthase: potential selective inhibition. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 35:165-194, 1995.
- GEITZ, H., HANDT, S., ZWINGELINBERGER, K. Thalidomide selectively modulates the density of cell surface molecules involved in the adhesion cascade. *Immunopharmacology* 31:213-21, 1996.
- GIUDICE, L. C., DUSPIN, B. A., GARGOSKY, S. E., ROSENFELD, R. G., IRWIN, J. C. The insulin-like growth factor system in human peritoneal fluid: its effects on endometrial stromal cells and its potential relevance to endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 79:1284-93, 1994.
- GRIFFITH, O. W., STUEHR, D. J. Nitric oxide synthase properties and catalytic mechanism. *Annual Review of Physiology* 57:707-736, 1995.
- HALEY, J. E., DICKENSON, A. H., SCHATER, M. Electrophysiological evidence for a role of nitric oxide in prolonged chemical nociception in the rat. *Neuropharmacology* 31: 251-258, 1992.

- HALME, J. Release of tumor necrosis factor-alpha by human peritoneal macrophages in vivo and in vitro. *Am J Obstet Gynecol* 161:1718-25, 1989.
- HALME, J. Role of peritoneal inflammation in endometriosis-associated infertility. *Ann N Y Acad Sci* 622: 266-74, 1991.
- HALME, J., BECKER, S., HAMMOND, M. G. ET AL. Increased activation of pelvic macrophages in infertile women with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 145:333, 1983 (a).
- HALME, J., BECKER, S., WING, R. Accentuated cyclic activation of peritoneal macrophages in patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 148:85, 1983 (b).
- HALME, J., BECKER, S., WING, R. Accentuated cyclic activation of peritoneal macrophages in patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 148:85-90, 1984.
- HALME, L., BECKER, S., HASKILL, S. Altered maturation and function of peritoneal macrophages: Possible role in pathogenesis of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 156:783, 1987.
- HANEY, A. F., MUSCATO, J. J., WEINBERG, J. B. Peritoneal fluid cell population in infertility patients. *Fertil Steril* 35:696-8, 1981.
- HARADA, T., ENATSU, A., MITSUNARI, M., NAGANO, Y., ITO, M., TSUDO, T., TANIGUCHI, F., IWABE, T., TANIKAWA, M., TERAKAWA, N. Role of cytokines in progression of endometriosis. *Gynecol Obstet Invest* 47(1):34-40, 1999.
- HARADA, T., YOSHIOKA, H., YOSHIDA, S., IWABE, T., ONOHARA, Y., TANIKAWA, M., TERAKAWA, N. Increased interleukin-6 levels in peritoneal fluid of infertile

- patients with active endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 176(3):593-7, 1997.
- HARDMAN, J. G. & LIMBRID, L. E. GOODMAN & GILMAN, As Bases Farmacológicas da Terapeutica, 10^a edição, Editora McGraw Hill, Rio de janeiro. 2003.
- HASLETT, P. A. J., CORRAL, L. G., ALBERT, M., KAPLAN, G. Thalidomide co-stimulates primary human T lymphocytes, preferentially inducing proliferation, cytokine production, and cytotoxic responses in the CD8+ subset. *J Exp Med* 187:1885-92, 1998.
- HATTORI, M., SAKAMOTO, K., FUJIHARA, N., KOJIMA, I. Nitric oxide a modulator for the epidermal growth factor receptor expression in developing ovarian granulosa cells. *American Journal of Physiology* 270: C812-C818, 1996.
- HEALY, D. L., ROGERS, P, A., HII, L., WINGFIELD, M. Angiogenesis: a new theory for endometriosis. *Hum Reprod Update* 4(5):736-40, 1998.
- HILL, J. A., FARIS, H. M., SCHIFF, I. & ANDERSON, D. J. Characterization of leukocyte subpopulation in the peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertil Steril* 50:216-222, 1988.
- HO, H. N., WU, M. Y., YANG, Y. S. Peritoneal cellular immunity and endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 38:400-12, 1997.
- HO, H. N., WU, M. Y., CHEN, S. U. ET AL Total antioxidant status and nitric oxide do not increase in peritoneal fluids from women with endometriosis. *Human Reproduction* 12(12):2810-15, 1997.
- HUA L., XU, X., BIAN, D. The measurement of natural killer cell activity in peripheral blood and peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 31(10): 586-9. 1996.

- HUANG, J. C., PAPASAKELARIOU, C., DAWOOD, M. Y. Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertil Steril* 65(5): 931-4, 1996.
- HUANG, J. C., YEH, J. Quantitative analysis of epidermal growth factor receptor gene expression in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 79(4): 1097-101, 1994.
- HURST, B. S, ROCK, J. A. The peritoneal environment in endometriosis. In: Thomas, R. J., Rock, J. A, eds. *Modern approaches to endometriosis*. Norwell, M. A. Kluwer Academic 79-96, 1991.
- IALENTI, A., MONCADA, S., DI ROSA, M. Modulation of adjuvant arthritis by endogenous nitric oxide. *Br J Pharmacol* 110:701-706, 1993.
- IWABE, T., HARADA, T., TSUDO, T., TANIKAWA, M., ONOHARA, Y., TERAOKAWA, N. Pathogenetic significance of increased levels of interleukin-8 in peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Fertil Steril* 69:924-30, 1998.
- IWASAKI, K., MAKINO, T., MARUYAMA, T., MATSUBAYASHI, H., NOZAWA, S., YOKOKURA, T. Leukocyte subpopulations and natural killer activity in endometriosis. *Int J Fertil Menopausal Stud* 38(4):229-34, 1993.
- JABLONKA-SHARIFF, A., RAVI, S., BELTOS, A. N. ET AL. Abnormal estrous cyclicity after disruption of endothelial and inducible nitric oxide synthase in mice. *Biol Reprod* 61(1):171-77, 1999.
- JAIN, N. K., KULKARNI, S. K. L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor, modulates cholinergic antinociception. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 21(3):161-5, 1999.

- KANZAKI, H., WANG, H. S., KARIYA, M., MORI, T. Suppression of natural killer cell activity by sera from patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 167(1):257-61, 1992.
- KAUPPILA, A., RAJANIEMI, H., ROMBERG, L., VIHKO, R. Receptor disorders in endometriosis. *Contr Gynec Obstet* 16:40-47. 1987.
- KEENAN, J. A., CHEN, T. T., CHADWELL, N. L., TORRY, D. S., CAUDLE, M. R. IL-1 beta, TNF-alpha, and IL-2 in peritoneal fluid and macrophage-conditioned media of women with endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 34(6): 381-5, 1995.
- KEENAN, J. A., CHEN, T. T., CHADWELL, N. L., TORRY, D. S.; CAUDLE, M. R. Interferon-gamma (IFN-gamma) and interleukin-6 (IL-6) in peritoneal fluid and macrophage-conditioned media of women with endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 32(3): 180-3, 1994.
- KENYON, B. M., BROWNE, F., D'AMATO, R. J. Effects of thalidomide and related metabolites in a mouse corneal model of neovascularization. *Exp Eye Res* 64:971-8, 1997.
- KHORRAM, O., GARTHWAITE, M., MAGNESS, R. R. Endometrial and myometrial expression of nitric oxide synthase isoforms in pre- and postmenopausal women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 84: 2226-32, 1999.
- KHORRAM, O., TAYLOR, R. N., RYAN, I. P., SCHALL, T. J., LANDERS, D. V. Peritoneal fluid concentrations of the cytokine RANTES correlate with the severity of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 169(6):1545-9, 1993.

- KIKUCHI, Y., ISHIKAWA, N., HIRATA, J., IMAIZUMI, E., SASA, H., NAGATA, I. Changes of peripheral blood lymphocyte subsets before and after operation of patients with endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 72(3):157-61, 1993.
- KIMURA, S., WATANABE, K., YAJIRI, Y. ET AL. Cerebrospinal fluid nitric oxide metabolites in painful diseases. *Neuroreport* 10(2):275-9, 1999.
- KIRK, S. J., REGAN, M. C., BARBUL, A. Cloned murine T lymphocytes synthesize a molecule with the biological characteristics of nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 173:660-665, 1991.
- KLEIN, N. A., PÉRGOLA, G. M., RAO-TEKMAL, R., DEY, T. D., SCHENKEN, R. S. Enhanced expression of resident leukocyte interferon gamma mRNA in endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 30(2-3):74-81, 1993.
- KLEIN, N. A., PERGOLA, G. M., TEKMAL, R. R., MONTOYA, I. A., DEY, T. D., SCHENKEN, R. S. Cytokine regulation of cellular proliferation in endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 30; 734: 322-32, 1994.
- KOIKE, H., EGAWA, H., OHTSUKA, T., YAMAGUCHI, M., IKENOUE, T., MORI, N. Correlation between dysmenorrhic severity and prostaglandin production in women with endometriosis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 46(2):133-7, 1992.
- KOIKE, H., IKENOUE, T., MORI, N. Studies on prostaglandin production relating to the mechanism of dysmenorrhea in endometriosis. *Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi* 70(1):43-56, 1994.
- KONINCKX, P. R. Endometriotic disease: the role of peritoneal fluid. *Hum Reprod Update* 4(5):741-51, 1998.

- KONINCKX, P. R., MEULEMAN, C. DEMEYERE, S. ET AL. Suggestive evidence that pelvic endometriosis is a progressive disease, whereas a deeply infiltrating endometriosis is associated with a pelvic pain. *Fertil Steril* 55:759-62, 1991.
- KOYAMA, N., MATSUURA, K., OKAMURA, H. Cytokines in the peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Int J Gynaecol Obstet* 43(1):45-50, 1993.
- KUPKER, W., FELBERBAUM, R., BAUER, O., DIEDRICH, K. Significance of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) in endometriosis [ORIGINAL TITLE: Die Bedeutung des Tumornekrosefaktors Alpha (TNF-Alpha) bei der Endometriose]. *Geburtshilfe-Frauenheilkd* 56(5): 239-42, 1996.
- KWON, G., HILL, J. R., CORBETT, J. A., MCDANIEL, M. L. Effects of aspirin on nitric oxide formation and de novo protein synthesis by RNINm5F cells and rat islets. *Mol Pharmacol* 52(3):398-405, 1997.
- LEBOVIC, D. I., MUELLER, M. D., HORNUNG, D., ROBERT, N., TAYLOR, R. N. Immunology of endometriosis. *Immunology and Allergy Clinics of North America* 22 (3) 2002.
- LEE, K. S., JOO, B. S., NA, Y. J., YOON, M. S., CHOI, O. H., KIM, W. W. Relationships between concentrations of tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide in follicular fluid and oocyte quality. *J Assist Reprod Genet* 17(4):222-8, 2000.
- LEE, Q. P., JUNCHAU, M. R. Dysmorphogenic effects of nitric oxide (NO) and NO-Synthase inhibition: studies with intraamniotic injections of sodium nitroprussiate and NG-monomethyl-L-arginine. *Teratology* 49:452-64, 1994.

- LEVINE, J. D., LAM, D., TAIWO, W. O., DONATONI, P., GOETZL, E. J. Hyperalgesic properties of 15-lipoxygenase products of arachidonic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:5331-4, 1986.
- LEVINI, Z. EFSTATHIOU, J. A., SAMPSON, D. A. ET AL. Angiogenesis inhibitors suppress endometriosis in a murine model. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 9:264a, 2002.
- LEWIS, R. "Cox Fighting". *The Scientist* 14(11):1, 2000.
- LEYENDECKER, G., KUNZ, G., WILDT, L. ET AL. Uterine hyperperistalsis and dysperistalsis as dysfunctions of the mechanism of rapid sperm transport in patients with endometriosis and infertility. *Human Reproduction* 7:1542-51, 1996.
- LI, M., WU, X., XU, X. C. Induction of apoptosis in colon cancer cells by cyclooxygenase-2 inhibitor NS398 through a cytochrome c dependent pathway. *Clin Cancer Res* 7 (4):1010-6, 2001.
- LIANG, X. S., HU, L. N., WU, P. Tumor necrosis factor in peritoneal fluid of infertile women with endometriosis and its relation to sperm motility. *Chung-Hua-Fu-Chan-Ko-Tsa-Chih* 29(9):524-6, 1994.
- LIM, H., PARIJA, B. C., DAS, S. K., DINCHUK, J. E., LANGENBACH, R., TRZASKOS, J. M., DEY, S. K. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase-2-deficient mice. *Cell* 91:197-208, 1997.
- LOFTIS, L. L., MEALS, E. A., ENGLISH, B. K. Differential effects of pentoxifylline and interleukin-10 on production of tumor necrosis factor and inducible nitric

- oxide synthase by murine macrophages. *J Infect Dis* 175(4):1008-11, 1997.
- MASS-SZABOWSKI, N., FUSENIG, N. Interleukin-1-induced growth factor expression in post-mitotic and resting fibroblasts. *J Invest Dermatol* 187:849-55, 1996.
- MATSUZAKI, S., CANIS, M., POULY, JEAN-LUC, WATTIEZ, A. ET AL. Cyclooxygenase-2 expression in deep endometriosis and matched eutopic endometrium. *Fertil Steril* 82(5): 1309-15, 2004.
- MAYER, D. J., MAO, J., HOLT, J, PROCE, D. D. Cellular mechanisms of neuropathic pain, morphine tolerance, and their interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(14): 7731-6, 1999.
- MCHUGH, S. M., RIFKIN, I. R., DEIGHTON, J., ET AL. The immunosuppressive drug thalidomide induces T helper cell type 2 (Th2) and concomitantly inhibits Th1 cytokine production in mitogen- and stigen-stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures. *Clin Exp Immunol* 99:160-7, 1995.
- MCLAREN, J., PRENTICE, A., CHARNOCKJONES, D. S., SMITH, S. K. Vascular-endothelial growth factor (VEGF) concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Human Reproduction* 11:220-3, 1996.
- MCLAREN, J., PRENTICE, A., CHARNOCK-JONES, D. S., MILLICAN, S. A., MULLER, K. H., SHARKEY, A. M., SMITH, S. K. Vascular endothelial growth factor is produced by peritoneal fluid macrophages in endometriosis and is regulated by ovarian steroids. *J Clin Invest* 98 (2): 482-9, 1996.
- MEDEIROS, F. C. Endometriose experimental em ratos, um novo modelo para o estudo dos sintomas endometriose-símile: Dor, Tumor e Infertilidade. Thesis

of Master Degree. Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil, 1992.

MEDEIROS, F. C., CARNEIRO-FILHO, B. A., CUNHA, F. Q., RIBEIRO, R. A. Effects of COX-1 and COX-2 inhibitors on the development of experimental endometriomas and its related pain and infertility in female rats. In: Coutinho, E., Spínola, P. (eds.) Proceedings of the 10th World Congress on Human Reproduction. Bologna: Monduzzi Editore, 147-51, 1999.

MONCADA, S., PALMER, R. M. J., HIGGS, E. A. Nitric oxide physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacological Reviews* 43:109-142, 1991.

MORI, H., NAKAGAWA, M., ITOH, N., WADA, K., TAMAYA, T. Danazol suppresses the production of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor by human monocytes. *Am J Reprod Immunol* 24(2):45-50, 1990.

MORI, H., SAWAIRI, M., NAKAGAWA, M., ITOH, N., WADA, K., TAMAYA, T. Peritoneal fluid interleukin-1 beta and tumor necrosis factor in patients with benign gynecologic disease. *Am J Reprod Immunol* 26(2):62-7, 1991.

MORRIS, S. M., BILLIAR, T. R. New insights into regulation of inducible nitric oxide synthesis. *American Journal of Physiology* 266:E829-E839, 1994.

NAKAMURA, M., FERREIRA, S. H. A peripheral sympathetic component in the inflammatory hyperalgesia. *Eur J Pharmacol* 135:145-53, 1987.

NAKANISHI, Y., KAMIJO, R., TAKIZAWA, K., HATORI, M., NAGUMO, M. Inhibitors of cyclooxygenase-2 (COX-2) suppressed the proliferation and differentiation of human leukaemia cell lines. *Eur J Cancer* 37(12):1570-8, 2001.

- NATHAN, C. F. Nitric oxide as a secretory product of mamalian cells. *FASEB Journal* 6:3051-3064, 1992.
- NATHAN, C. F. Secretory products of macrophages. *Journal of Clinical Investigation* 79:319-326, 1987.
- NEUNER, P., KLOSNER, G., SCHAUER, E., POURMOJIB, M., MACHEINER, W., GRUNWALD, C., KNOBLER, R., SCHWARZ, A., LUGER, T. A., SCHWARZ, T. Pentoxifylline in vivo down-regulates the release of IL-1 α , IL-6, IL-8 and tumor necrosis factor- α by human peripheral blood mononuclear cells. *Immunology* 83:262-7, 1994.
- NISOLLE, M. DONNEZ, J. Peritoneal, ovarian and recto-vaginal endometriosis, The identification of three separate disease. The Parthenon Publishing group, London, 189pp. 1997.
- NOTHNICK, W. B., CURRY, T. E., VERNON, M. W. Immunomodulation of rat endometriotic implant growth and protein production. *Am J Reprod Immunol* 31(2-3):151-159, 1994.
- NOVA, A., SIBAI, B. M., BARTON, J. R. ET AL. Maternal plasma level of endothelin is increased in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 165:724-27, 1991.
- NOVARO, V., RETTORI, V., GONZALEZ, E. T. ET AL. Interaction between uterine PGE and PGF2 alpha production and the nitridergic system during embryonic implantation in the rat. *Prostaglandins* 51(6):363-76, 1996.
- OOSTERLYNCK, D. J., MEULEMAN, C., SOBIS, H., VANDEPUTTE, M., KONINCKX, P. R. Angiogenic activity of peritoneal fluid from women with endometriosis. *Fertil Steril* 59:778-825, 1993.

- ORLICKY, D. J., LIEBERMAN, R., WILLIAMS, C., GERSCHENSON, L. E. Requirement for prostaglandin F_{2alpha} in 17-beta-estradiol stimulation of DNA synthesis in rabbit endometrial cultures. *J Cell Physiol* 130:292-300, 1987.
- OTA, H., IGARASHI, S., HATAZAWA, J., TANAKA, T. Endothelial nitric oxide synthase in the endometrium during the menstrual cycle in patients with endometriosis and adenomyosis. *Fertil Steril* 69:303-308, 1998.
- OTA, H., IGARASHI, S., SASAKI, M., TABNAKA, T. Distribution of cyclooxygenase-2 in eutopic and ectopic endometrium in endometriosis and adenomyosis. *Human Reproduction* 16:561-6, 2001.
- OVERTON, C. Peritoneal fluid cytokines and the relationship with endometriosis and pain. *Human Reproduction* 11(2):360-380, 1996.
- PAIRET, M., CHURCHILL, L., ENGELHARDT, G. Differential inhibition of Cyclooxygenases 1 and 2 by NSAIDs. *New Targets in Inflammation: inhibitors of COX-2 or adhesion molecules*. Kluwer Acad Publishers and William Harvey Press, 1996.
- PARIA, B. C., LIM, H., DAS, S. K., REESE, J., DEY, S. K. Molecular signaling in uterine receptivity for implantation. *Semin Cell Devel Biol* 11:67-76, 2000.
- PELLICER, A., ALBERT, C., GARRIDO, N., NAVARRO, J., ET AL. The pathophysiology of endometriosis-associated infertility: follicular environment and embryo quality. *J Reprod Fertil (Suppl.)* 55:109-19, 2000.
- PITTAWAY, D. E., WENTZ, A. C. Endometriosis and corpus luteum function. Is there a relationship? *J Reprod Med* 29(10):712-6, 1984.

- PORTZ, D. M., ELKINS, T. E., WHITE, R. ET AL. Oxygen free radicals and pelvic adhesions formation. I. Blocking oxygen free radical toxicity to prevent adhesion formation in an endometriotic model. *Int J Fertil* 36:39-42, 1991.
- PURCELL, T. L., GIVEN, R., CHWALISZ, K. & GARFIELD, R. E. Nitric oxide synthase distribution during implantation in mouse. *Mol Hum Reprod* 5(5): 467-75, 1999.
- RAMEY, J. W., ARCHER, D. F. Peritoneal fluids: its relevance to the development of endometriosis. *Fertil Steril* 60:1-14, 1993.
- RANA, N., BRAUN, D. P., HOUSE, R., GEBEL, H., ROTMAN, C., DMOWSKI, W. P. Basal and stimulated secretion of cytokines by peritoneal macrophages in women with endometriosis. *Fertil Steril* 65(5):925-30, 1996.
- RAO, V. S. N., CHAVES, M. C., RIBEIRO, R. A. Nitric oxide synthase inhibition and the uterotrophic response to oestrogen in immature rats. *Journal of Reproduction and Fertility* 105:303-306, 1995.
- RAO, V. S. N., CHAVES, V. C., HEUER, H. O., FONTELES, M. C. Effects of WEB 2170, a new platelet-activating factor (PAF)-receptor antagonist in rat reproduction. *J Lipid Mediators Cell Signalling* 10:165-167, 1994.
- RASPOLINI, M. R., AMUNNI, G., VILLANUCCI, A. ET AL. Expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in ovarian cancer: correlation with clinical outcome. *Gynecologic oncology* 92:806-12. 2004.
- RIBEIRO, R. A., VALE, M. L., FERREIRA, S. H., CUNHA, F. Q. Analgesic effect of thalidomide on inflammatory pain. *Eur J Pharmacol* 391(1-2):97-103, 2000 (a).
- RIBEIRO, R. A., VALE, M. L., THOMAZZI, S. M., PASCHOALATO, A. B. P., POOLE, S., FERREIRA, S. H., CUNHA, F. Q. Involvement of resident macrophages and

- mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *Eur J Pharmacol* 387(1):111-8, 2000 (b).
- RICHTER, O., MALLMANN, P., VAN DER VEM, H., KREBS, D. TNF-alpha secretion by peritoneal macrophages in endometriosis. *Zentralbl Gynakol* 120(7):332-6, 1998.
- RIER, S. E., PARSONS, A. K., BECKER, J. L. Altered interleukin-6 production by peritoneal leukocytes from patients with endometriosis. *Fertil Steril* 61:294-9, 1994
- RIVERO, M., SANTIAGO, B., GALINHO, M., BREHMER, M. T., PABLOS, J. L. Cyclooxygenase-2 inhibition lacks immunomodulatory effects on T cells. *Clin Exp Rheumatol* 20(3):379-85, 2002.
- ROCK, J. A. The revised American Fertility Society classification of endometriosis: reproducibility of scoring. ZOLADEX Endometriosis Study Group. *Fertil Steril* 63(5):1108-10, 1995.
- ROCK, J. A., DUBIN N. H. GHODGAONKA, B. B. ET AL. Cul-de-sac Fluid in women with endometriosis: fluid volume and prostanoid concentration during the proliferative phase of the cycle-days 8 to 12. *Fertil Steril* 37:747-750, 1982.
- RODRIGUEZ-BURFORD, C., BARNES, M. N., OELSCHLAGER, D. K. ET AL. Effect of non steroidal anti-inflammatory (NSAIDs) on ovarian cell lines: preclinical evaluation of NSAIDs as chemopreventive agents. *Clin Cancer Res* 8:202-9, 2002.

- ROSSELLI, M., DUBEY, R. K., ROSSELLI, M. A., MAEAS, E., FINK, D., LAUPER, U., KELLER, P. J. IMTHERN, B. Identification of nitric oxide synthase in human and bovine oviduct. *Molecular Human Reproduction* 2:607-612, 1996.
- ROSSELLI, M., KELLER, P. J., DUBEY, K. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Human Reproduction Update* 4:3-24, 1998.
- RYAN, I. P., TSENG, J. F., SCHRIOCK, E. D., KHORRAM, O., LANDERS, D. V., TAYLOR, R. N. Interleukin-8 concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertil Steril* 63(4): 929-32, 1995.
- SALHAB, W. A., SHAUL, P. W., COX, B. E. AND ROSENFELD, C. R. Regulation of types I and III NOS in ovine uterine arteries by daily and acute estrogen exposure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278:H2134-H2142, 2000.
- SAMPAIO, E. P., SARNO, E. N., GALILLY, R., COHN, Z. A., KAPLAN, G. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes. *J Exp Med* 173:699-703, 1991.
- SAMPSON, J. A. Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 14:422-469, 1927.
- SANO, M., MORISHITA, T., NOZAKI, M., YOKOYAMA, M., WATANABE, Y., NAKANO, H. Elevation of the phospholipase A2 activity in peritoneal fluid cells from women with endometriosis. *Fertil Steril* 61(4):657-62, 1994.

- SANTUCCI, L., FIORUCCI, S., GIANANTI, M. ET AL. Pentoxifylline prevents indomethacin induced acute gastric mucosal damage in rats: Role of tumour necrosis factor alpha. *Gut* 35:7, 1994.
- SCARPELLINI, F., SBRACIA, M., LECCHINI, S. & SCARPELLINI, L. Anti-angiogenesis treatment with thalidomide in endometriosis: a pilot study. *Fertil Steril* 78:S87, 2002.
- SCHENKEN, R. S., ASCH, R. H., WILLIAMS, R. F., HODGEN, G. D. Etiology of infertility in monkeys with endometriosis: measurement of peritoneal fluid prostaglandins. *Am J Obstet Gynecol* 150:349-355, 1984.
- SCHENKEN, R. S., WILLIAMS, R. F. & HODGEN, G. D. Effect of pregnancy on surgically induced endometriosis in cynomolgus monkey. *Am J Obstet Gynecol*. 157:1392-6, 1987.
- SCHRÖDER, W., GAETJE, R., BAUMANN, R. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor in peritoneal fluid and serum of patients with endometriosis. *Clin Exp Obstet Gynecol* 23(1):10-4, 1996.
- SELI, E. & ARICI, A. Sex steroids and the immune system. *Immunology and Allergy Clinics of North America* 22 (3) 2002.
- SELI, E., BERKKANOGLU, M., ARICI, A. Pathogenesis of endometriosis. *Obstetrics and Gynecology Clinics* 30 (1), 2003.
- SERAFIN, W. E. Drugs used in the treatment of asthma. In: HARDIMAN, J. G., LIMBIRD, L. T. (eds.) *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. New York: McGraw-Hill, 676-7, 1996.
- SHARMA, S. C., BARRY-KINSELLA, C., COTTELL, E., HARRISON, R. F. A mid-luteal phase comparison of peritoneal fluid volume and its content of PGF2 alpha

and PGE2 in women with minimal stage endometriosis and a normal pelvis. *Prostaglandins* 47(1):9-16, 1994.

SHARPE-TIMMS, K. L., BRUNO, P. L., PENNEY, L. L., BICKEL, J. T.
Immunohistochemical localization of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in matched endometriosis and endometrial tissues. *Am J Obstet Gynecol* 171(3): 740-5, 1994.

SHUKOVSKI, L., TSAFRIRI, T. The involvement of nitric oxide in the ovulatory process in the rat. *Endocrinology* 135:2287-290, 1995.

SINGHAL, S., MEHTA, J., DESIKAN, R. ET AL. Antitumor activity of Thalidomide in refractory multiple myeloma. *N Engl J Med* 341:1565-71, 1999.

SLEIJFER, S., KRUIT, W. HJ., & STOTER, G. Thalidomide in solid tumours: The resurrection of an old drug. *European Journal of Cancer* 40:2377-82, 2004.

SNYDER, S. H. Nitric oxide: NO endothelial NO. *Nature* 377:196-197, 1995.

STEINLEITNER, A., LAMBERT, H., SUAREZ, M., SERPA, N., ROY, S.
Immunomodulation in the treatment of endometriosis-associated subfertility: use of pentoxifylline to reverse the inhibition of fertilization by surgically induced endometriosis in a rodent model. *Fertil Steril* 56(5):975-9, 1991.

STONE, B. A., VARGYAS, J. M., RINGLER, G. E., STEIN, A. L., MARRS, R. P.
Determinants of the outcome of intrauterine insemination: analysis of

- outcomes of 9963 consecutive cycles. *Am J Obstet Gynecol* 180:1522-34, 1999.
- STRIETER, R. M., REMICK, D. G., WARD, P. A., SPENGLER, R. N., LYNCH, J. P., LARRICK, J., KUNKEL, S. L. Cellular and molecular regulation of tumor necrosis factor production by pentoxifylline. *Biochem Biophys Res Commun* 155(3):1230-6, 1988.
- SYSTEM FOR THALIDOMIDE EDUCATION AND PRESCRIBING SAFETY. [http://www.celgene.com/images/pdf/\\$FILE/Balancing.pdf](http://www.celgene.com/images/pdf/$FILE/Balancing.pdf). Disponivel em 19 de janeiro de 2003.
- TANAKA, E., SENDO, F., KAWAGOE, S., HIROI, M. Decreased natural killer cell activity in women with endometriosis. *Gynecol Obstet Invest* 34(1):27-30, 1992.
- TELFER, J. F., IRVINE, G. A., KOHNEN, G., CAMPBELL, S., CAMERON, I. T. Expression of endothelial and inducible nitric oxide synthase in non-pregnant and decidualized human endometrium. *Molecular Human Reproduction* 3:69-75, 1997.
- TELFER, J. F., LYALL, F., NORMAN, J. E., CAMERON, I. T. Identification of nitric oxide synthase in human uterus. *Human Reproduction* 10:19-23, 1995.
- THOMAS, E. J., LENTON, E. A., COOKE, I. D. Follicle growth patterns and endocrinological abnormalities in infertile women with minor degrees of endometriosis. *Br J Obstet Gynaecol* 93:852, 1986.
- Tjandrawinata, R. R., Dahiya, R., Hughes-Fulford, M. Induction of cyclo-oxygenase-2 mRNA by prostaglandin E2 in human prostatic carcinoma cells. *Br J Cancer* 75(8): 1111-8, 1997.

- TSENG, L., ZHANG, J., PERESLENI, T. Y., GOLIGORSKY, M. S. Cyclic expression of endothelial nitric oxide synthase mRNA in the epithelial glands of human endometrium. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 3:33-38, 1996.
- UEKI, M., TSURUNAGA, T., USHIROYAMA, T., UEDA, M. Macrophage activation factors and cytokines in peritoneal fluid from patients with endometriosis. *Asia Oceania J Obstet Gynaecol* 20(4):427-31, 1994.
- VAN FURTH, A. M., VERHARD-SEIJMONSBERGEN, E. M., VAN FURTH, R., LANGERMANS, J. A. M. Effect of lisofylline and pentoxifylline on the bacterial-stimulated production of TNF, IL-1 and IL-10 by human leucocytes. *Immunology* 91:193-6, 1997.
- VERCELLINI, P., DE-BENEDETTI, F., ROSSI, E., COLOMBO, A., TRESPIDI, L., CROSIGNANI, P. G. Tumor necrosis factor in plasma and peritoneal fluid of women with and without endometriosis. *Gynecol Obstet Invest* 36(1):39-41, 1993.
- VERNON, M. W., BEARD, J. S., GRAVES, K., WILSON, E. A. Classification of endometriotic implants by morphological appearance and capacity to synthesize prostaglandin F. *Fertil Steril* 46:801-805, 1986.
- VIGNALI, M. Treatment of pelvic pain associated with minimal and mild endometriosis. In: COUTINHO, E. M. SPÍNOLA, P., MOURA, L.H. Progress in the management of Endometriosis. The Parthenon Publishing Group, London 1995 447pp PP 379-383
- VIGANÒ, P, PARAZZINI, F, SOMIGLIANA, E, VERCELLINI, P. Endometriosis: epidemiology and aetiological factors. *Best practice & Research Clinical Obstetrics and Gynecology* 18(2):177-200, 2004.

- VIJAYAKUMAR, R., WALTERS, W. A. W. Human luteal tissue prostaglandin, 17-beta-estradiol and progesterone in relation to the growth and senescence of the corpus luteum. *Fertil Steril* 23:298-303, 1983.
- VON ROKINTANSKY, C. Ueber Uterusdrusen-Neubildung in Uterus and Ovarialsarcomen. *Zkk Gesellsch zu Wien* 37:577, 1860.
- WU, M. Y., HO, H. N., CHEN, S. U., CHAO, K. H., CHEN, C. D., YANG, Y. S. Increase in the production of interleukin-6, interleukin-10, and interleukin-12 by lipopolysaccharide-stimulated peritoneal macrophages from women with endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 41:106-11, 1999.
- YALLAMPALLI, C., BYAM-SMITH, M., SHARON, M. S., GARFIELD, R. E. Steroid hormones modulate the production of nitric oxide and CGMP in the rat uterus. *Endocrinology* 134:1971-4, 1994.
- YALLAMPALLI, C., DONG, Y. L., WIMALAWANSA, S. J. Calcitonin gene-related peptide reverses the hypertension and significantly decreases fetal mortality in pre-eclampsia rats induced by N-nitro-L-arginine methyl ester. *Human Reproduction* 11:895-899, 1996.
- YAMAUCHI, J., MIYAZAKI, T., IWASAKI, S. ET AL. Effects of nitric oxide on ovulation and ovarian steroidogenesis and prostaglandin production in the rabbit. *Endocrinology* 138(9):3630-7, 1997.
- YANO, Y. Effect of dietary supplementation with eicosapentaenoic acid on surgically induced endometriosis in the rabbit. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 44(3):282-8, 1992.

YOGEV, L., GAMZU, R., BOTCHAN, A., HOMONNAI, Z. T., AMIT, A., LESSING, J. B.,
PAZ, G., YAVETZ, H. Pentoxifylline improves sperm binding to the zona
pellucida in the hemizona assay. *Fertil Steril* 64(1):146-9, 1995.