



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS MÉDICO-  
CIRÚRGICAS

PAULO WAGNER LINHARES LIMA FILHO

**ANÁLISE DE ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS  
EM RATAS SUBMETIDAS AO MODELO EXPERIMENTAL DE  
ENDOMETRIOSE INDUZIDA POR TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE  
TECIDO UTERINO**

FORTALEZA - CEARÁ

2018

PAULO WAGNER LINHARES LIMA FILHO

**ANÁLISE DE ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS  
EM RATAS SUBMETIDAS AO MODELO EXPERIMENTAL DE  
ENDOMETRIOSE INDUZIDA POR TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE  
TECIDO UTERINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Médico-Cirúrgicas, do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Francisco das Chagas Medeiros.

Co-Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Danielle Silveira Macêdo.

Área de Concentração: Metabolismo, Fisiologia e Biologia celular no estresse.

FORTALEZA - CEARÁ

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- L71a Lima Filho, Paulo Wagner Linhares.  
Análise de alterações comportamentais e neuroquímicas em ratas submetidas ao modelo experimental de endometriose induzida por transplante autólogo de tecido uterino. / Paulo Wagner Linhares Lima Filho. – 2018.  
85 f. : il.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, , Fortaleza, 2018.  
Orientação: Prof. Dr. Prof. Francisco das Chagas Medeiros..  
Coorientação: Prof. Dr. Prof.<sup>a</sup> Danielle Silveira Macêdo..
1. Endometriose. Depressão. Ansiedade. Hipocampo. I. Título.

CDD

---

PAULO WAGNER LINHARES LIMA FILHO

**AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL E NEUROQUÍMICA DE RATAS (*RATTUS NORVEGICUS* LINHAGEM *WISTAR*) SUBMETIDAS AO MODELO EXPERIMENTAL DE ENDOMETRIOSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Médico-Cirúrgicas, do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Dissertação aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Francisco das Chagas Medeiros – Orientador  
Universidade Federal do Ceará

---

Prof. Dra. Danielle Macêdo Gaspar – Co-orientadora  
Universidade Federal do Ceará

---

Prof. Dra. Maria Angelina da Silva Medeiros – Examinador  
Universidade de Fortaleza

## AGRADECIMENTOS

Ao DEUS, autor da vida, pelas graças derramadas todos os dias em minha vida, pela sabedoria a mim concedida para que eu possa distinguir o melhor caminho a ser seguido. A Ele, toda honra e toda glória!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Francisco das Chagas Medeiros, pela paciência e pelos ensinamentos que me proporcionaram amadurecimento profissional e belo exemplo de dedicação ao saber.

Ao Adriano José Maia Chaves Filho, pelo apoio, por ideias compactuadas, suporte técnico, compartilhamento nas pesquisas e por ser presente. Sua participação foi fundamental para concretização deste trabalho.

À Danielle Silveira Macêdo responsável pelo Laboratório de Neuropsicofarmacologia - Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM), meu muito obrigado, pela preciosa ajuda.

Agradeço aos membros da banca examinadora, que, com suas experiências e visões profissionais, agregaram valor com sugestões de correções e melhorias para o trabalho realizado.

A todos os professores do Mestrado em Ciências Médico-Cirúrgica, da Universidade Federal do Ceará, pelas sábias reflexões que nos ajudaram a compreender melhor a realidade.

A todos os funcionários do Mestrado em Ciências Médico-Cirúrgica, da Universidade Federal do Ceará, que, através da realização de seus trabalhos, colaboraram de forma significativa na realização dessa Dissertação, em especial ao “seu Bento”.

A todos os colegas do Mestrado em Ciências Médico-Cirúrgica, da Universidade Federal do Ceará, pela consideração e amizade.

A todos aqueles que, direta e indiretamente, vivenciaram o processo de produção deste trabalho, o meu reconhecimento e amizade.

Dedico,

à minha esposa Karine Germanowicz, que  
sempre me concedeu total apoio em todas  
as horas.

*“Ainda que eu fale as línguas dos homens e dos anjos, se não tiver amor, serei como o bronze que soa ou como o címbalo que retine. Ainda que eu tenha o dom de profetizar e conheça todos os mistérios e toda ciência; ainda que eu tenha tamanha fé, a ponto de transportar montes, se não tiver amor nada serei”.*

(1 Co 13, 1-2)

## RESUMO

A endometriose é uma doença ginecológica crônica e progressiva que afeta cerca de 10% das mulheres em idade reprodutiva. Altos índices de depressão, ansiedade e estresse emocional são frequentemente encontrados nessas pacientes. No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos subjacentes ao desenvolvimento e estabelecimento da endometriose e de suas comorbidades psiquiátricas. Os modelos animais fornecem uma ferramenta útil para estudar a sequência temporal e as vias biológicas envolvidas nesta doença, bem como nos estados comórbidos, como as alterações neuropsiquiátricas. No presente estudo, objetivou-se avaliar as principais alterações comportamentais e à sensibilização à dor no modelo animal de endometriose peritoneal. Também, foram avaliados os níveis de marcadores de dano oxidativo e neurotrofinas hipocâmpais. Para isso, ratas Wistar fêmeas adultas foram submetidas ao modelo de endometriose peritoneal induzido pelo transplante autólogo de tecido uterino. As ratas foram avaliadas semanalmente durante três semanas para o desenvolvimento de comportamentos tipo-ansiedade e tipo-depressivo, bem como alterações de sensibilização periférica e visceral à dor. Após os testes, os animais foram sacrificados e realizou-se a dissecação de hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado. Os resultados demonstraram que a administração de reserpina induziu um quadro comportamental de depressão-like, pelo aumento do tempo de imobilidade dos animais tanto no teste de suspensão de cauda quanto no nado forçado, sem alterar a atividade locomotora dos animais, essa ação foi revertida pela associação com sitagliptina, principalmente na maior dose (6 mg/kg). Reserpina apresentou efeitos oxidantes demonstrados pelo aumento de malondialdeído, SOD e MPO e redução de GSH nas áreas cerebrais estudadas. Foram mensurados os níveis séricos de corticosterona, e, no hipocampo, os marcadores de estresse oxidativo - concentração de glutathione (GSH) reduzida, níveis de peroxidação lipídica e atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) - bem como a expressão da neurotrofina fator cerebral derivado do cérebro (BDNF). De acordo com nossos resultados, as principais alterações comportamentais iniciaram-se 2 semanas após a indução do modelo. De fato, as ratas com endometriose no 14º dia de avaliação apresentaram alterações tipo-ansiedade no teste do campo aberto e do labirinto em cruz elevado, bem como no 14º dia também houve alteração tipo-depressiva, foram identificadas alterações tipo-depressivas no teste do nado forçado. As ratas com endometriose apresentaram redução simultânea do limiar de

sensibilidade periférica à dor a partir da segunda semana de indução, além de aumento dos níveis séricos de corticosterona em resposta a um evento estressor agudo. No hipocampo, dissecado nos dias 7, 14 e 21 do procedimento cirúrgico, o modelo de endometriose peritoneal causou um acentuado aumento do dano oxidativo, demonstrado pela diminuição das concentrações GSH, aumento da peroxidação lipídica e aumento da atividade da enzima MPO. Também foi induzida uma redução tempo-dependente dos níveis de BDNF no hipocampo das ratas submetidas ao modelo de endometriose. A maioria dessas alterações oxidativas e neuroquímicas ocorreu de acordo com o tempo, sendo mais evidentes na terceira semana de indução, quando também ocorreram as principais alterações comportamentais. Portanto, este estudo demonstra que o presente modelo de endometriose mimetiza vários sintomas neuropsiquiátricos evidenciados no âmbito clínico das pacientes com endometriose. Também, nossos achados advogam para a participação de um desequilíbrio do estado oxidativo e do suporte trófico hipocampal para o surgimento dessas alterações. Com isso, o presente modelo constitui uma ferramenta valiosa para investigar novas estratégias terapêuticas, tanto para os sintomas álgicos relacionados à endometriose como para suas comorbidades neuropsiquiátricas.

**Palavras-chave:** Endometriose. Depressão. Ansiedade. Hipocampo.

## **ABSTRACT**

*Endometriosis is a chronic and progressive gynecological disease that affects about 10% of women of reproductive age. High rates of depression, anxiety and emotional stress are often found in these patients. However, little is known about the mechanisms underlying the development and establishment of endometriosis and its psychiatric comorbidities. Animal models provide a useful tool for studying the temporal sequence and biological pathways involved in this disease, as well as in comorbid states, such as neuropsychiatric disorders. Therefore, in the present study, we aimed to evaluate the main behavioral changes and pain sensitization in the animal model of peritoneal endometriosis. Also, levels of markers of oxidative damage and hippocampal neurotrophins were evaluated. For this, adult female Wistar rats were submitted to the model of peritoneal endometriosis induced by autologous uterine tissue transplantation. The rats were evaluated weekly for three weeks for the development of anxiety-type and depressive-type behaviors, as well as changes in peripheral and visceral sensitization to pain. The results demonstrated that the administration of reserpine induced a depression-like behavioral pattern, by increasing the immobility time of the animals in both the tail suspension test and forced swimming, without altering the locomotor activity of the animals. associated with sitagliptin, especially at the highest dose (6 mg / kg). Serum levels of corticosterone were measured and, in the hippocampus, the markers of oxidative stress - reduced glutathione concentration (GSH), levels of lipid peroxidation and myeloperoxidase activity (MPO) - as well as neurotrophin brain factor expression brain (BDNF). According to our results, the major behavioral changes started 2 weeks after the induction of the model. In fact, the rats with endometriosis on the 14th day of evaluation presented type-anxiety changes in the open field test and the high cross labyrinth, but only on the 21st day, type-depressive changes were identified in the forced swimming test. Rats with endometriosis presented a simultaneous reduction in the peripheral sensory pain threshold from the second week of induction, in addition to an increase in serum corticosterone levels in response to an acute stressor event. In the hippocampus, dissected on days 7, 14 and 21 of the surgical procedure, the peritoneal endometriosis model caused a marked increase in oxidative damage, demonstrated by the decrease in GSH concentrations, increase of lipid peroxidation and increase of MPO enzyme activity. A time-dependent reduction of BDNF levels in the*

*hippocampus of rats submitted to the endometriosis model was also induced. Interestingly, most of these oxidative and neurochemical changes occurred in a time-related manner, being more evident in the third week of induction of the model, when also the main behavioral changes occurred. Therefore, this study demonstrates that the present model of endometriosis mimics several neuropsychiatric symptoms evidenced in the clinical setting of patients with endometriosis. Also, our findings advocate for the participation of an imbalance of the oxidative state and hippocampal trophic support for the appearance of these alterations. Thus, the present model constitutes a valuable tool to investigate new therapeutic strategies for both the endometriosis-related pain symptoms and its neuropsychiatric comorbidities.*

**Keywords:** *Endometriosis. Depression. Anxiety. Hippocampus*

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Incisão da pele da parede abdominal.....	40
Figura 2 -	Túnel para implante do fragmento uterino.....	40
Figura 3 -	Cavidade peritoneal aberta.....	40
Figura 4 -	Identificação do hemi-útero esquerdo.....	40
Figura 5 -	Exérese do hemi-útero esquerdo.....	41
Figura 6 -	Abertura longitudinal do hemi-útero esquerdo.....	41
Figura 7 -	Fragmento de 4x4mm de área do hemi-útero esquerdo da rata.....	41
Figura 8 -	Momento do implante no subcutâneo.....	41
Figura 9 -	Aspecto final da cirurgia.....	41
Figura 10 -	Teste do campo aberto.....	43
Figura 11 -	Teste do nado forçado.....	45

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Efeito do modelo de endometriose ao longo do tempo no número de entradas no quadrante central no teste do campo aberto durante 5 minutos.....	53
Gráfico 2 -	Efeito do modelo de endometriose ao longo do tempo na permanência no quadrante central no teste do campo aberto durante 5 minutos.....	53
Gráfico 3 -	Efeito do modelo de endometriose ao longo do tempo no número de cruzamentos no teste do campo aberto durante 5 minutos.....	54
Gráfico 4 -	Efeito do modelo de endometriose ao longo do tempo no número de levantamentos no teste do campo aberto durante 5 minutos.....	55
Gráfico 5 -	Efeito da cirurgia de indução de endometriose no percentual de tempo nos braços abertos (A), no percentual de entradas nos braços abertos (B) e no número total de entradas (C).....	57
Gráfico 6 -	Efeito do modelo de endometriose ao longo do tempo na duração de imobilidade no teste do nado forçado durante 5 minutos.....	59
Gráfico 7 -	Efeito do modelo de endometriose no limiar de latência para dor (em segundos) no decorrer de 3 semanas.....	60
Gráfico 8 -	Efeito do modelo de endometriose no número de contorções abdominais no decorrer de 3 semanas.....	61
Gráfico 9 -	Efeito do modelo de endometriose nos níveis séricos de corticosterona no decorrer de 3 semanas.....	62
Gráfico 10 -	Efeito do modelo de endometriose nos níveis malondialdeído (MDA) no Hipocampo no decorrer de 3 semanas.....	63
Gráfico 11 -	Efeito do modelo de endometriose nos níveis de glutathiona (GSH) reduzida no Hipocampo no decorrer de 3 semanas.....	64
Gráfico 12 -	Efeito do modelo de endometriose nos níveis de atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO) no Hipocampo no decorrer de 3 semanas.....	65

Gráfico 13 - Efeito do modelo de endometriose nos níveis da proteína BDNF (E) no hipocampo.....	66
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA -	Análise da Variância
BSA -	Albumina Bovina Sérica
COBEA -	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CEE -	Célula do Estroma Endometrial
DTNB -	Ditiobisnitrobenzoato
ER -	Receptores de Estrogênio
EUA -	Estados Unidos da América
FAMED -	Faculdade de Medicina
FO -	Falso Operados
GnRH -	<i>Gonadotropin-Releasing Hormone</i>
HPA -	Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
KCl -	Cloreto de Potássio
MDA -	Malondialdeído
MPO -	Mieloperoxidase
OTR -	Receptor de Oxitocina
PR -	Receptor de Progesterona
QV -	Qualidade de Vida
RM -	Ressonância Magnética
SCM -	Célula Muscular Lisa
SF -	<i>Short Form Health Survey</i>
TBARS -	Ácido Tiobarbitúrico
TCDD -	<i>Tetrachlorodibenzo-p-dioxin</i>
UFC -	Universidade Federal do Ceará

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1 ASPETOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	16
<b>1.1.1 Idade</b> .....	<b>17</b>
<b>1.1.2 Redução da taxa de fecundidade</b> .....	<b>17</b>
<b>1.1.3 Ritmo circadiano</b> .....	<b>17</b>
<b>1.1.4 Toxinas e poluentes ambientais</b> .....	<b>18</b>
<b>1.1.5 Autoimunidade</b> .....	<b>18</b>
1.2 ASPECTOS CLÍNICOS-DIAGNÓSTICOS.....	19
<b>2 FISIOPATOLOGIA</b> .....	<b>21</b>
2.1 TEORIA DO FLUXO MENSTRUAL RETRÓGRADO.....	21
2.2 TEORIA DA METAPLASIA CELÔMICA.....	22
2.3 TEORIA DA METÁSTASE LINFOVASCULAR.....	23
2.4 TEORIA DO RESTO EMBRIONÁRIO.....	23
2.5 TEORIA DAS CÉLULAS MUSCULARES LISAS.....	24
2.6 MECANISMOS CELULARES ENVOLVIDOS NA PATOGÊNESE DA ENDOMETRIOSE.....	24
<b>2.6.1 Proliferação e apoptose</b> .....	<b>24</b>
<b>3 ENDOMETRIOSE E SAÚDE MENTAL</b> .....	<b>26</b>
3.1 IMPACTO NA QUALIDADE DE VIDA.....	26
3.2 IMPACTO NAS RELAÇÕES ÍNTIMAS E VIDA SEXUAL.....	27
3.3 IMPACTO NA EDUCAÇÃO E VIDA PROFISSIONAL.....	28
<b>4 RELAÇÃO ENTRE ENDOMETRIOSE E TRANSTORNOS PSIQUIÁTRICOS</b> .....	<b>30</b>
<b>5 POSSÍVEIS MECANISMOS ASSOCIADOS ÀS COMORBIDADES PSIQUIÁTRICAS DA ENDOMETRIOSE</b> .....	<b>34</b>

<b>6 OBJETIVOS</b> .....	38
6.1 GERAL.....	38
6.2 ESPECÍFICOS.....	38
<b>7 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	39
7.1 ANIMAIS.....	39
7.2 MODELO CIRÚRGICO DE ENDOMETRIOSE.....	39
7.3 DESENHO EXPERIMENTAL.....	42
7.4 ANÁLISE COMPORTAMENTAL.....	43
<b>7.4.1 Teste de campo aberto</b> .....	<b>43</b>
<b>7.4.2 Teste de labirinto em cruz elevado</b> .....	<b>43</b>
<b>7.4.3 Teste do nado forçado</b> .....	<b>44</b>
<b>7.4.4 Teste da placa quente</b> .....	<b>45</b>
<b>7.4.5 Contorções abdominais induzidas por ácido acético</b> .....	<b>45</b>
7.5 EXTRAÇÃO CIRÚRGICA DO HIPOCAMPO.....	46
7.6 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA..	46
7.7 DETERMINAÇÃO DOS MARCADORES OXIDATIVO.....	47
<b>7.7.1 Determinação dos níveis de peroxidação lipídica</b> .....	<b>47</b>
<b>7.7.2 Determinação das concentrações de glutatona reduzida</b> .....	<b>47</b>
<b>7.7.3 Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase</b> .....	<b>48</b>
7.8 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS HIPOCAMPAIS DE BDNF.....	48
<b>7.8.1 Preparação do extrato total de proteínas</b> .....	<b>48</b>
<b>7.8.2 Método Bradford para dosagem de proteína</b> .....	<b>49</b>
<b>7.8.3 Eletroforese em gel de SDS-PAGE e eletrotransferência</b> .....	<b>49</b>
7.9 DESTINO DOS ANIMAIS APÓS O EXPERIMENTO.....	50
7.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
<b>8 RESULTADOS</b> .....	<b>52</b>
8.1 ALTERAÇÕES TIPO-ANSIEDADE NAS RATAS A PARTIR	

DA SEGUNDA SEMANA.....	52
<b>8.1.1 Teste de campo aberto.....</b>	<b>52</b>
<b>8.1.2 Teste de labirinto em cruz elevado.....</b>	<b>55</b>
8.2 ALTERAÇÕES TIPO-DEPRESSIVAS A PARTIR DA TERCEIRA SEMANA.....	58
<b>8.2.1 Teste do nado forçado.....</b>	<b>58</b>
8.3 DIMINUIÇÃO PROGRESSIVA DA SENSIBILIDADE À DOR NAS RATAS.....	59
<b>8.3.1 Sensibilidade térmica periférica: teste de placa quente.....;</b>	<b>59</b>
<b>8.3.2 Sensibilidade visceral: contorções abdominais induzidas por ácido acético.....</b>	<b>60</b>
8.4 AUMENTO NOS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA NA TERCEIRA SEMANA PÓS-INDUÇÃO.....	61
8.5 ALTERAÇÕES PRÓ-OXIDATIVAS NO HIPOCAMPO DAS RATAS.....	62
<b>8.5.1 Peroxidação lipídica.....</b>	<b>62</b>
<b>8.5.2 GSH reduzida.....</b>	<b>63</b>
<b>8.5.3 Atividade da enzima mieloperoxidase.....</b>	<b>64</b>
8.6 REDUÇÃO PROGRESSIVA DE BDNF NO HIPOCAMPO.....	65
<b>9 DISCUSSÃO.....</b>	<b>67</b>
<b>10 CONCLUSÕES .....</b>	<b>75</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>76</b>
<b>ANEXO A – Certificado de aprovação do projeto.....</b>	<b>88</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A endometriose é uma doença que apresenta queixas clínicas relacionadas com frequência da dor pélvica e infertilidade, geralmente diagnosticada na 4ª década da vida das pacientes, devendo sempre ser questionada para orientar a hipótese diagnóstica (ANDRADE et al., 2016).

### 1.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

Endometriose é definida pela presença de glândulas e estroma endometriais fora do útero. Essa doença foi descrita há mais de um século, quando Russel (1899 apud TEIXEIRA, 2012, p.23) escreveu em seu pioneiro manuscrito: “No estudo microscópico do ovário, ficamos surpresos em encontrar áreas nas quais há um exato protótipo das glândulas uterinas e da matriz extracelular interglandular”.

Durante décadas, a endometriose foi descrita como um achado incidental em cirurgias laparoscópicas para outras causas ginecológicas. Somente após o desenvolvimento do endoscópio, no final da década de 1960, as lesões de endometriose começaram a ser reconhecidas como uma observação frequente em mulheres com queixa de dor pélvica e infertilidade (MOWERS et al., 2015).

Apesar de ser considerada uma condição ginecológica benigna, a endometriose pode cursar com sintomas severos, como dor pélvica crônica, dor durante a menstruação, dor durante a cópula e dismenorreia. Ela é a terceira causa mais frequente de internações ginecológicas, nos Estados Unidos da América (EUA), e uma das principais causas de infertilidade em mulheres jovens (BUTRICK, 2003).

A prevalência exata da endometriose é difícil especificar, especialmente em países como o Brasil, onde carecem de dados epidemiológicos de abordagem universal e atualizados. Entretanto, nos EUA, a prevalência dessa doença varia grandemente, conforme a população amostral avaliada. Por exemplo, entre mulheres assintomáticas, estima-se em cerca de 1% a prevalência da endometriose, entretanto, em mulheres portadoras de dor crônica pélvica, essa prevalência atinge valores tão altos quanto 60% da população (SOUSA et al., 2016).

Em uma revisão sistemática recente envolvendo mais de 15 ensaios clínicos, Janssen et al. (2013) demonstraram prevalências tão altas quanto 62% em

adolescentes com queixas de dor pélvica crônica e dismenorreia.

Nas últimas décadas, têm sido reconhecidos importantes fatores de risco para o desenvolvimento e agravamento da endometriose, como listados abaixo:

### **1.1.1 Idade**

Como uma patologia hormônio-responsiva, a endometriose é predominantemente diagnosticada em mulheres em idade reprodutiva. Ela é raramente encontrada em meninas pré-púberas, com incidência de 0,05% em pacientes sintomáticas dessa faixa etária. As mulheres mais acometidas por essa doença encontram-se entre 35-44 anos, com uma prevalência de 0,4% e risco relativo de 6,3%, mesmo na ausência de sintomas (ANDRADE et al., 2016).

Entretanto, a endometriose também pode acometer mulheres em idades mais avançadas, como no período pós-menopausa (com uma incidência estimada em 2,55% em pacientes sintomáticas). Portanto, em parte, o crescimento na prevalência dessa doença tem sido atribuído ao envelhecimento global da população (ANDRADE et al., 2016).

### **1.1.2 Redução da taxa de fecundidade**

A queda drástica das taxas de fecundidade como resultado direto do estilo de vida da mulher contemporânea tem contribuído sobremaneira para o aumento das taxas de endometriose. Isso pode ser uma explicação, pois, na ausência de gestações, o endométrio prolifera continuamente e descama sob o controle do ciclo menstrual (ESHRE CAPRI WORKSHOP GROUP; COLLINS; CROSIGNANI, 2007).

### **1.1.3 Ritmo circadiano**

O ciclo menstrual e o endométrio são, ambos, fortemente responsivos às variações dos níveis sistêmicos de estrógenos. O ritmo circadiano parece ser um importante fator regulador da secreção e manutenção dos níveis circulantes de estrógenos em mulheres com idade reprodutiva. Nesse ínterim, o trabalho noturno tem sido associado a alterações marcantes da secreção de estrógenos e,

consequentemente, a irregularidades menstruais e ao aumento do risco de endometriose. Recentemente, foi demonstrado que qualquer trabalho noturno em geral aumenta o risco de endometriose em 50% (LOPES et al., 2011 apud COSTA; MEJIA, 2018).

#### **1.1.4 Toxinas e poluentes ambientais**

Diversas toxinas ambientais possuem impacto reconhecido sobre as funções reprodutivas, imunes e endócrinas. Nesse contexto, 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) e os compostos bifenílicos são poluentes industriais produzidos em grande escala globalmente, principalmente pela indústria elétrica e de automóveis (FONTENELE et al., 2010).

Esses compostos em especial as dioxinas são liberados no ar e podem se acumular no ambiente. As pessoas podem se expor a eles diretamente como também pela ingestão de produtos contaminados, uma vez que esses compostos são capazes de se acumular no tecido adiposo de animais. Por exemplo, nos EUA, 93% de toda a exposição humana, as dioxinas têm sido atribuídas a alimentos contaminados. Consistentes evidências apontam que esses poluentes são capazes de comprometer a atividade dos estrógenos, em alguns casos, causando um efeito pró-estrogênico seguido de um efeito antiestrogênico (CORREIA; FONTOURA, 2015).

Esse impacto é ainda maior quando afeta fases importantes do desenvolvimento, como o período gestacional. Nas últimas décadas, uma associação clara tem sido estabelecida entre a exposição a esses poluentes e o desenvolvimento de endometriose. De fato, animais de experimentação desenvolvem lesões endometrióticas ectópicas após exposição a dioxinas. Além disso, no campo clínico, diversos estudos globalmente têm vinculado o risco aumentado de endometriose a níveis séricos elevados de dioxinas (BELLELIS; PODGAEC; ABRÃO, 2011).

#### **1.1.5 Autoimunidade**

O desenvolvimento de um estado inflamatório local é reconhecido na fisiopatologia da endometriose, o que sugere a participação importante do sistema imune. Um mecanismo sugerido é que focos endometrióticos ectópicos se

desenvolvam por um escape do sistema imune, que se mostra ineficaz no combate a essas lesões. Outra hipótese não excludente é a participação de mecanismos autoimunes. Foi demonstrado que em pacientes com endometriose existem alterações imunes, como ativação policlonal de linfócitos B, anormalidades na função de linfócitos T e dano a vários órgãos (PORFÍRIO et al., 2017).

## 1.2 ASPECTOS CLÍNICO-DIAGNÓSTICOS

O quadro clínico da paciente com endometriose é bastante variável. A paciente pode ser assintomática, referir apenas infertilidade ou ter sintomas como dismenorreia severa, dispareunia profunda, dor pélvica crônica, dor ovulatória, sintomas urinários ou evacuatórios perimenstruais e fadiga crônica (NÁCUL; SPRITZER, 2010).

As lesões endometrióticas usualmente têm sido classificadas de acordo com sua extensão e morfologia em grandes subdefinições. Nesse ínterim, a primeira subdefinição é de endometriose sútil. É caracterizada pela presença de implantes muito pequenos e, por vezes, não pigmentados, formando lesões polipóides, vesículas, ou lesões em chama. Algumas dessas lesões são microscópicas e originam a hipótese de que lesões dessa dimensão podem estar presentes em um espectro muito maior de pacientes, causando alterações funcionais importantes. Por exemplo, foi demonstrado que lesões pequenas não pigmentadas são morfologicamente muito ativas e podem liberar ativamente mediadores inflamatórios e endócrinos nos fluidos peritoneais, o que poderia justificar a dor, e, por vezes, o aumento das taxas de infertilidade (LOPES, 2007).

Esses achados têm levado à proposição de se julgar a severidade da endometriose pela atividade das lesões mais do que sua extensão. Apesar do termo suave, essas lesões contêm glândulas e estroma endometriais, e se encaixam completamente na definição de endometriose. Persiste como grande desafio o reconhecimento dessas lesões, uma vez que necessitam de atenção e treinamento de profissionais cirurgiões, afora os problemas técnicos inerentes ao processamento e detecção de lesões de pequeno tamanho em biópsias (KAMERGORODSKY, 2007).

A ultrassonografia transvaginal para o diagnóstico de endometriose de bexiga também tem sido relatada como método eficaz, com sensibilidade de 71,4% e

especificidade de 100% (ZOMER et al., 2013).

A urografia excretora poderá evidenciar estreitamentos ureterais, sendo esta um complemento para a endometriose vesical ou ureteral, tendo como sugestão a ultrassonografia. Pode-se fazer uma avaliação de dilatações do sistema coletor renal através da uorressonância como um método alternativo. A ressonância magnética (RM) pode avaliar, com melhor precisão, alterações sugestivas de doença do septo retovaginal, ligamentos uterossacros ou do retossigmoide podem ser confirmadas por ecoendoscopia retal ou RM. Apesar dos exames de imagem disponíveis apresentarem boa acurácia no diagnóstico da endometriose, a videolaparoscopia com biópsia das lesões para análise anatomopatológica ainda é o padrão-ouro no diagnóstico dessa condição, a presença de massas ovarianas com diagnóstico duvidoso (MENDONÇA; OLIVEIRA, 2012).

Pode-se confirmar por ecoendoscopia retal ou RM doença do septo retovaginal, ligamentos uterossacros ou do retossigmoide. A videolaparoscopia com biópsia das lesões para análise anatomopatológica ainda é o padrão no diagnóstico dessa condição. Os exames de imagem disponíveis apresentam também boa acurácia no diagnóstico da endometriose (NACUL; SPRITZER, 2010).

## 2 FISIOPATOLOGIA

Apesar dos avanços no entendimento da fisiopatologia da endometriose, uma teoria unificante para essa doença continua como um ponto pouco esclarecido. De fato, várias teorias têm surgido a partir de evidências relacionadas à patogênese da endometriose e elas podem ser genericamente categorizadas: a) naquelas que suportam que os implantes endometrióticos se originam do endométrio uterino; e, b) naquelas que defendem que os implantes derivam de tecidos distantes do útero. Além disso, o papel de fatores genéticos e fatores predisponentes ambientais estão sendo melhor compreendidos e considerados no contexto da reprogramação das células do trato reprodutivo feminino (SANTOS et al., 2012).

### 2.1 TEORIA DO FLUXO MENSTRUAL RETRÓGRADO

Proposta por Sampson, em 1920, essa teoria propõe que as lesões ectópicas de endometriose originam-se do fluxo menstrual retrógrado que acontece regularmente nos ciclos menstruais. Esses fluidos conteriam células tronco endometriais anormais que teriam capacidade de implantação e angiogênese para formar novos focos quando expostos à cavidade peritoneal. Essa teoria é suportada pelo fato de que cerca de 75-90% das mulheres experienciam algum grau de fluxo retrógrado durante os períodos peri-menstrual do ciclo (SILVA et al., 2013; PODGAEC, 2014).

Outras evidências que corroboram com essa teoria são os estudos envolvendo obstrução dos tratos de drenagem / saída do aparelho genital feminino. Nesse contexto, em mulheres jovens com obstrução congênita, como septo uterino ou estenose cervical, a prevalência de endometriose é mais elevada. De forma semelhante, a obstrução iatrogênica do fluxo uterino em modelos murinos resulta no desenvolvimento de lesões endometrióticas peritoneais. Essas evidências advogam que mesmo o comprometimento leve do fluxo anterógrado fisiológico da menstruação pode favorecer sobremaneira a formação de focos ectópicos (VISCOMI et al., 2004).

A localização anatômica dos implantes também reforça essa teoria. A localização mais frequente de implantes endometrióticos é no compartimento posterior da pelvis e na hemipelvis esquerda. A propensão para a implantação de

lesões na porção posterior da pelvis advém que nessa região tende a haver um maior acúmulo de fluido menstrual a favor da gravidade. Também a posição retrovertida do útero facilita esse acúmulo. Da mesma forma, agindo como um obstáculo para a drenagem do fluido menstrual da trompa uterina esquerda, o cólon sigmóide promove a estase do fluido favorecendo a geração de implantes na hemipelve esquerda (CARAÇA et al., 2011; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2016).

Recentemente, achados de um modelo murino de endometrioses têm fornecido evidências adicionais para a teoria do fluxo retrógrado. Nesse estudo, a ativação do oncogene K-ras em células endometrióticas translocadas para o peritônio foi capaz de induzir focos endometrióticos típicos. Por outro lado, a mesma ativação do gene K-ras em células peritoneais não induziu sua diferenciação para células endometrióticas nem a formação subsequente de implantes. Portanto, esses achados experimentais favorecem a hipótese da origem dos implantes ser o endométrio uterino (CARAÇA et al., 2011; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2016).

Embora a teoria do fluxo retrógrado seja consideravelmente atrativa e explique parte da distribuição e desenvolvimento dos focos endometrióticos, condições adicionais são necessárias para o estabelecimento dos implantes. Escape do sistema imune, adesão ao epitélio peritoneal, invasão do epitélio e formação de suporte neurovascular são condições necessárias para que o implante se origine e continue a crescer após o fluxo retrógrado menstrual. Portanto, outros fatores predisponentes parecem determinar dentre as mulheres que apresentam esse processo tão comum de fluxo retrógrado as quais desenvolveram endometriose (ZANATTA et al., 2010).

## 2.2 TEORIA DA METAPLASIA CELÔMICA

Embora a menstruação retrógrada seja o mecanismo mais amplamente aceito, ela não pode explicar casos raros de endometriose na ausência de útero funcional. A teoria da metaplasia celômica propõe que a endometriose se desenvolve como resultado da transformação de células mesoteliais nas células do ovário para células de glândula endometriótica. De fato, as inclusões mesoteliais foram associadas à endometriose nos ovários, trompas de falópio e parede pélvica. Casos raros de endometriose descritos entre homens, meninas puberais e endometriose distante na

cavidade torácica apoiam esta teoria particular. Além disso, um modelo experimental *in vitro* de endometriose humana demonstrou que lesões ectópicas podem resultar da metaplasia do epitélio da superfície ovariana (CACCIATORI; MEDEIROS, 2015).

### 2.3 TEORIA DA METÁSTASE LINFOVASCULAR

A teoria da disseminação linfática e hematogênica tem sido considerada, para explicar a ocorrência remota de implantes endometrióticos. De acordo com essa teoria, as células endometriais esfoliadas são varridas para a drenagem venosa do útero, com posterior deposição possível em qualquer parte do corpo. A presença de implantes em locais distantes da pélvis, como na cavidade torácica e pulmões, assim como a detecção de tecido endometrial nos vasos uterinos de pacientes com adenomiose favorecem a proposição dessa teoria. Portanto, apesar de ser um mecanismo plausível, principalmente para focos distantes, as metástases linfovasculares não parecem ser o mecanismo primário da endometriose, mas que ocorrem no decorrer dos processos fisiopatológicos que culminam na doença (ANTON, 2015; CACCIATORI; MEDEIROS, 2015).

### 2.4 TEORIA DO RESTO EMBRIONÁRIO

Durante a embriogênese, algumas células endometriais que devem crescer no útero se desenvolvem no abdômen. Essas células seriam, então, ativadas na puberdade sob os efeitos tróficos do estrogênio e da progesterona. A embriogênese é controlada e dirigida por um sistema fetal sofisticado, mas ainda incompleto. Este sistema de controle de desenvolvimento fetal pode ser o análogo fetal do sistema imunológico do adulto. Anormalidades do sistema de controle do desenvolvimento fetal podem ser preservadas na vida adulta, dando origem a anormalidades detectáveis do sistema imunológico do adulto. O grau de anormalidade residual do sistema imunológico do adulto pode controlar a agressividade da endometriose que se desenvolve, de modo que alguns pacientes podem desenvolver doenças invasivas ou adesões, enquanto outros não (SANTOS et al., 2012; CACCIATORI; MEDEIROS, 2015).

## 2.5 TEORIA DAS CÉLULAS MUSCULARES LISAS

As células do estroma endometrial (CEEs) são o tipo de célula mais prevalente nas lesões endometrióticas. No entanto, células musculares lisas (SMCs) também são frequentemente encontradas e foram relatadas em endometriose peritoneal, ovariana e infiltrante profunda. As SMCs peritoneais expressam receptores de oxitocina (OTRs), receptores de estrogênio (ERs) e receptores de progesterona (PRs), que são componentes necessários das células do miométrio uterino. Em contrapartida, a capacidade das SMC de produzir contrações não foi demonstrada. É plausível que as contrações de SM peritoneais possam estimular os nociceptores peritoneais levando à geração de dor associada à endometriose. No entanto, se estes SMCs são derivados de células-tronco basais ou células epiteliais coelomic reativadas ainda não está claro (BRITO et al., 2012).

## 2.6 MECANISMOS CELULARES ENVOLVIDOS NA PATOGÊNESE DA ENDOMETRIOSE

A endometriose tem sido entendida como uma doença do crescimento descontrolado e aberrante do tecido endometrial. No entanto, os mecanismos celulares e moleculares que são interrompidos nesta doença ainda não estão definidos. As vias de sinalização celular envolvidas podem ser divididas naquelas envolvidas na proliferação e apoptose, adesão e invasão, angiogênese e função imune (SANTOS, 2014).

### 2.6.1 Proliferação e apoptose

Os mecanismos que regulam a proliferação celular endometrial são principalmente controlados por interações entre os esteróides sexuais e seus receptores. É bem conhecido que as alterações nas moléculas do ciclo celular, como a ciclina e quinases dependentes de ciclina, são controlados por hormônios esteróides, e estão alterados na patogênese da endometriose. Por exemplo, um fator de transcrição envolvido no controle do ciclo celular e apoptose é regulado pela progesterona e sua expressão é significativamente reduzida no tecido endometrial de mulheres com endometriose (CARVALHO et al., 2004).

Outra proteína reguladora do ciclo celular, ErbB-2 (TOB1) também é conhecida por ter regulação negativa em mulheres com endometriose, o que parece estar relacionada com a via de sinalização regulada pela interleucina (IL) -1 $\beta$  (SUBTIL; TORGAL; DIAS, 2016).

### 3 ENDOMETRIOSE E SAÚDE MENTAL

A endometriose deve ter como tratamento uma abordagem mais ampla e que não contemple apenas as queixas ginecológicas, mas que aborde a mulher procurando-se diagnosticar e tratar distúrbios ligados à saúde mental.

#### 3.1 IMPACTO NA QUALIDADE DE VIDA

A endometriose é uma das principais causas de incapacidade e qualidade de vida prejudicada em mulheres em idade fértil. Além de sua natureza crônica e progressiva, seu impacto na fertilidade e nas relações conjugais, o atraso no autoreconhecimento dos sintomas e diagnóstico e os frequentes erros no cuidado médico dessa condição tornam o impacto psicossocial da endometriose um ponto de relevante importância no contexto da promoção e prevenção de saúde. Além disso, a endometriose tem sido associada a importantes custos econômicos diretos e indiretos à sociedade, em uma perspectiva próxima a outras doenças crônicas prevalentes, como o diabetes, que se estendem do impacto na saúde do indivíduo a custos elevados nos serviços de saúde à sociedade, como absenteísmo e perda de anos produtivos de vida (NASCIMENTO, 2017).

Nesse sentido, existem pelo menos 17 estudos na literatura que demonstram o impacto da endometriose em índices de qualidade de vida e funcionalidade nas atividades cotidianas. Esses trabalhos, majoritariamente, utilizaram instrumentos gerais de avaliação da qualidade de vida (QV), como o *Short Form Health Survey-36* e-12 (SF-36 e SF-12), mais que instrumentos específicos para endometriose. Em consenso, foi reportado que mulheres com endometriose apresentam índices reduzidos de QV, em comparação com mulheres sem endometriose, e na parcela de mulheres com sintoma mais severos foi identificado uma percepção do atual estado de saúde pior que a morte (BERNUI; EBERT; HALIS, 2011; TRIPOLI et al., 2011; SIMÕES; HASHIMOTO, 2012).

Ademais, a endometriose também exerce efeito negativo nas atividades domésticas e familiares. Por exemplo, Fourquet et al. (2010) e Bernuit et al. (2011) reportaram que 23% e 71% das mulheres com endometriose experienciam déficits em atividades como cozinhar, fazer compras, limpeza, jardinagem e cuidado dos filhos.

Mulheres com endometriose também apresentam menores índices de energia e vitalidade.

Fourquet et al. (2010) identificaram que 23% das pacientes com endometriose em seu grupo amostral reportam níveis reduzidos de energia e fadiga. Mulheres com endometriose apresentam níveis importantemente reduzidos de escores de vitalidade no SF-36. Impacto negativo nos níveis de exercício e atividades desportivas também foi relatado.

Comprometimento na vida social também é um fator marcante nas mulheres com endometrioses. Mulheres com endometrioses e dor pélvica crônica apresentam níveis reduzidos de habilidades sociais com controles saudáveis e se expõem menos a situações sociais devido à dor, fadiga, necessidade de acesso ao *toilette*, ou preocupação em relação ao início dos sintomas (NAVARRO; BARCELOS; SILVA, 2006).

Além disso, o impacto psicossocial da endometriose é dinâmico, sofrendo alterações em diferentes estágios da vida, segundo evidências recentes. Nesse contexto, um estudo retrospectivo seguiu mulheres com endometriose por 15 anos e identificaram que a maioria das mulheres que não possuem queixas algícas as experienciam pós-diagnóstico e que o perfil dos sintomas se modifica após a menopausa na maioria dessas mulheres. De fato, 96,9% das pacientes relataram ausência de dor pélvica após a menopausa, comparado com apenas 19% em mulheres no período fértil. Apesar disso, pós-menopausa prevalecem os sintomas urinários e intestinais (BOTÃO, 2016).

### 3.2 IMPACTO NAS RELAÇÕES ÍNTIMAS E VIDA SEXUAL

Em relação à dispareunia, um largo e multicêntrico estudo reportou que cerca de 25% das pacientes com endometriose possuem queixas de dispareunia no momento do diagnóstico. Entretanto, em estudos menores, essas estimativas podem ser tão altas quanto 50-100% das pacientes (sexualmente ativas) (BELLELIS *et al.*, 2010).

Além disso, Tripoli et al. (2011) descreveram que 69% das pacientes experienciam dor por horas e até mesmo dias após o intercursos sexual. Diversas respostas comportamentais têm sido associadas à dispareunia, como interrupção do

intercurso sexual, mudança de posições, redução da duração, mas, consensualmente, a maioria das mulheres que se refere à dispareunia, subseqüentemente, evitam ou limitam sua atividade sexual. Isso tem sido associado a um importantes sentimento de culpa e autodepreciação entre as pacientes, como também dificuldades na relação com seus parceiro(a)s.

No contexto dos serviços de saúde, essa é uma questão muitas vezes negligenciada. Pesquisas qualitativas demonstram que muitas pacientes referem que a saúde sexual é uma questão não abordada pelos profissionais de saúde. Apesar disso, cerca de 47% das mulheres com endometriose referem-se procurar os serviços de saúde por queixas de dispareunia (MARINO, 2016).

No âmbito conjugal, diversos estudos relataram que as mulheres com endometriose apresentaram impacto negativo em seus relacionamentos, e, por vezes, aumento dos términos. Foram avaliadas 78 pacientes com endometriose e reportaram que 50 (51%) relataram problemas conjugais pontuais relacionados aos sintomas da doença, 22 reportaram problemas constantes relacionados à endometriose e 6 experienciaram términos atribuídos aos sintomas da endometriose. Por outro lado, também tem sido relatado que o parceiro conjugal pode ser uma fonte de suporte e fator importante para boas taxas de sucesso nas medidas terapêuticas implementadas (TRIPOLI et al., 2011).

### 3.3 IMPACTO NA EDUCAÇÃO E VIDA PROFISSIONAL

Poucos estudos têm tentado delinear o impacto da endometriose na vida educacional das mulheres. Nesse sentido, enquanto alguns autores relatam que a endometriose afeta de forma contundente a educação das pacientes acometidas, levando a menores taxas de términos de curso e abandonos, outros apontam que apenas uma minoria das pacientes sofre esse impacto (BERNUIT et al., 2011; FOURQUET et al., 2011).

Mais comumente, os trabalhos têm se focado na relação da endometriose com a vida laboral das mulheres acometidas. Tem sido proposto que as pacientes percam cerca de 7,41 horas por semana na vigência de seus sintomas e tenham uma perda de cerca de 13% do seu tempo total de trabalho. De forma semelhante, foi demonstrado que as pacientes com endometriose sofram um impacto importante na sua efetividade

no trabalho, mais do que absenteísmo, que pode ser quantificado em uma perda de cerca de 10,8 horas semanalmente (NNOAHAM et al., 2011).

Muitos trabalhos sugerem que os sintomas da endometriose, em especial, os relacionados à dor pélvica, comprometam a produtividade do trabalho. Cerca de 23% a 66% das mulheres acometidas referem-se a limitações na sua habilidade de executar atividades relacionadas ao trabalho devido às queixas algícas. Esses achados são acompanhados por uma redução na qualidade do trabalho, que pode ser evidenciado por uma redução geral da efetividade de cerca de 65% (FOURQUET et al., 2010).

Além disso, o custo total da perda de produtividade é estimado em 6.298 dólares por ano por mulher com endometriose, o dobro dos custos diretos com serviços de saúde. Uma questão que tem sido foco de discussão é da adequação do ambiente de trabalho a essa condição. Nesse contexto, muitas mulheres não sentem confiança de informar aos seus empregadores sobre sua condição de saúde, por razões presumíveis de acesso ao trabalho, bem como pelas dificuldades de discutir essas questões com empregadores, muitas vezes, homens (SIMÕES; HASHIMOTO, 2012).

Simões e Hashimoto (2012) reportaram diferentes padrões de resposta de empregadores, por exemplo, alguns foram compreensivos, empáticos e procuraram fazer ajustes no ambiente de trabalho para a condição das mulheres acometidas, enquanto outros agiram de forma a negligenciar ou desacreditar nos sintomas das pacientes.

#### 4 RELAÇÃO ENTRE ENDOMETRIOSE E TRANSTORNOS PSIQUIÁTRICOS

A endometriose tem sido extensivamente associada com altas prevalências de sintomas psiquiátricos como depressão, ansiedade, e comprometimento geral da funcionalidade e qualidade de vida. Quadros psiquiátricos podem influenciar na percepção da endometriose, tendo em vista que podem complicar a experiência dos sintomas dolorosos, como também podem repercutir no sucesso das medidas terapêuticas propostas (LAGANÀ et al., 2015).

Nesse íterim, depressão e ansiedade são quadros psiquiátricos comumente associados à endometriose. Por exemplo, Smorgick et al. (2013) relataram uma alta força de associação entre essas condições e a presença de endometriose em mulheres jovens ( $r = 0.41$ ,  $P < 0.001$ ).

Outro estudo importante relatou que em uma amostra de 104 pacientes com endometriose pélvica, cerca de 64% apresentavam sintomas depressivos moderados a severos e cerca de 36% apresentavam sintomas ansiosos severos. Nessa amostra, interessantemente, a idade foi um fator que se correlacionou de forma importante com o surgimento de sintomas depressivos nas pacientes com endometriose, o que não aconteceu para os sintomas ansiosos. Mulheres com endometriose apresentaram altos níveis de ansiedade e introversão do que mulheres com outras condições ginecológicas (SILVA; MEDEIROS; MARQUI, 2016).

Outro fator que tem sido fortemente relacionado a sintomas depressivos em pacientes com endometriose é a presença de dor pélvica crônica. De fato, a prevalência de depressão é maior em mulheres que tem dor crônica pélvica do que em mulheres sem sintomas álgicos (BAPTISTA; CARNEIRO, 2011).

Baptista e Carneiro (2011) relataram que 26,86% e 38% das mulheres com endometrioses respectivamente sem e com sintomas de dor pélvica fechavam critério para depressão. Não só isso, sintomas somáticos e tendência à catastrofização foram relacionados à intensidade da dor em mulheres que experienciam dor pélvica crônica. Portanto, alguns pesquisadores acreditam que não seria a endometriose *per si* responsável pelas taxas de sintomas depressivos, mas a experiência da dor crônica.

De fato, nenhuma diferença no nível de sintomas depressivos ou quadros afetivos foram encontrados quando comparadas mulheres com dor pélvica crônica

associada à endometriose e dor pélvica associada a outras condições somáticas. Foram comparadas pacientes com endometriose com pacientes portadoras de outra forma de dor crônica (cefaleia do tipo migraine) e encontraram que as primeiras apresentavam percepção mais sensibilizada da dor e da carga estressora diária, sugerindo que fatores relacionados à dor especificamente tenham implicações importantes para o desenvolvimento de quadros psiquiátricos (JIA et al., 2013).

Outro aspecto importante é a relação entre endometriose e transtorno afetivo bipolar. Dois estudos têm apontado associação positivas entre as duas condições. O transtorno afetivo bipolar é caracterizado por alternâncias cíclicas entre quadros de humor, mania (humor elevado) e depressão (rebaixamento do humor). Nesse contexto, relação semelhante também tem sido estabelecida com fator dor pélvica. Mulheres com endometriose acompanhada de dor pélvica crônica foram significativamente mais propensas a receberem o diagnóstico de transtorno bipolar, do que mulheres com endometriose sem queixas de dor pélvica (LORENÇATTO et al., 2002).

De forma interessante, Lorençatto *et al.* (2002) encontraram em seu estudo ausência de associação entre endometriose e esse transtorno. Entretanto, quando avaliado seu grupo amostral, mais da metade das pacientes com endometriose encontravam-se sem queixas álgicas. Portanto, esses achados sugerem que a associação entre endometriose e transtorno bipolar esteja fortemente relacionada à vivência da dor pélvica crônica.

No manejo dessas pacientes, os sintomas da endometriose são frequentemente confundidos com somatização ou dor menstrual normal. Isso muitas vezes faz com que o diagnóstico da endometriose seja negligenciado e atrasado anos a fio após o início dos primeiros sintomas. A média entre o início dos primeiros sintomas e o diagnóstico definitivo da doença varia entre 3,5 a 12 anos. Isso permite que as pacientes sejam submetidas à dor prolongada, insatisfação sexual, perda de produtividade e redução da autoestima, o que aumenta o risco de quadros psiquiátricos, como transtornos afetivos. Outro aspecto importante, é que apesar da terapêutica instituída, seja ela clínica ou cirúrgica, há uma grande taxa de permanência dos sintomas pélvicos álgicos, o que sugere que possíveis mecanismos inflamatórios, nociceptivos e neuropáticos, de origem central e periférica, possam estar envolvidos na gênese desses sintomas (SILVA; MEDEIROS; MARQUI, 2016).

Além da dor pélvica crônica, outros fatores elencados que contribuem para a emergência de quadros psiquiátricos são a infertilidade e a disfunção sexual. Também tem sido proposto que a endometriose e os transtornos de humor possam fazer parte de um espectro de doenças autoimunes em algumas pacientes. Apesar disso, o conhecimento atual da relação entre endometriose e transtornos psiquiátricos tem sido limitado pela heterogeneidade metodológica na literatura existente e no número reduzido de estudos controlados. Outro aspecto importante é que o diagnóstico de endometriose só é definitivamente confirmado com abordagens cirúrgicas, o que dificulta a confirmação de controles saudáveis para inclusão nos estudos (SILVA; MEDEIROS; MARQUI, 2016).

Pelo fato de a endometriose ser uma doença estrógeno-dependente, tradicionalmente, são empregados tratamentos para redução da atividade estrogênica. Infelizmente, medidas que suprimem a produção de estrógenos pelos ovários possuem efeitos variáveis e muitas vezes insuficientes para o controle da dor nessas pacientes. Não apenas isso, muitas das medidas terapêuticas empregadas na endometriose têm sido associadas à emergência de sintomas adversos neuropsiquiátricos. Têm sido reportados sintomas, como abstinência sexual e humor deprimido. Uma história prévia de depressão, sintomas afetivos pré-menstruais, e transtornos ansiosos aumentam consideravelmente o risco de sintomas adversos psiquiátricos pós-uso de contraceptivos orais (PODGAEC, 2014).

Além dos contraceptivos orais, agonistas de *Gonadotropin-Releasing Hormone* (GnRH) também têm sido utilizados para o tratamento das lesões endometrióticas e sintomas associados. Entretanto, esses fármacos também podem causar sintomas como labilidade emocional e depressão. Os sintomas adversos psiquiátricos associados aos agonistas de GnRH têm sido associados à redução nos níveis plasmáticos de estrógenos e testosterona. Nos últimos anos, tem sido indicado o tratamento combinado com antidepressivos ao iniciar fármacos dessa classe, a fim de reduzir a incidência de transtornos psiquiátricos nessas pacientes (CARDOSO et al., 2011).

Ademais, quadros afetivos não corretamente tratados podem influenciar a capacidade dos pacientes de lidar com a dor e comprometer mais ainda seu funcionamento diário. Desse modo, muitos pesquisadores têm sugerido o tratamento adjuntivo com antidepressivos para o tratamento da dor pélvica crônica na

endometriose, independentemente do tratamento instituído. Apesar disso, considerando a associação positiva entre endometriose e transtorno afetivo bipolar, a correta avaliação dessa condição deve ser realizada antes da prescrição de antidepressivos, sob o risco de induzir quadros maníacos (NOGUEIRA; REIS; POLI NETO, 2006).

Embora os achados sejam relativamente esparsos e por vezes conflitantes, no conjunto, parece ser consistente a relação positiva entre endometriose e risco aumentado de sintomas e transtornos psiquiátricos, em especial quadros afetivos. Até evidências mais definitivas, é sugerido que mulheres com endometriose, em especial, aquelas com dor pélvica crônica, sejam avaliadas rotineiramente para a presença de sintomas psiquiátricos. Também é importante, após o início do tratamento para endometriose, que sintomas adversos neuropsiquiátricos sejam averiguados, tendo em vista o potencial de algumas drogas os induzirem (NOGUEIRA et al., 2006).

## **5 POSSÍVEIS MECANISMOS ASSOCIADOS ÀS COMORBIDADES PSQUIÁTRICAS DA ENDOMETRIOSE**

Apesar de, nas últimas décadas, importantes avanços no entendimento da fisiopatologia da endometriose tenham ocorrido, os mecanismos subjacentes à relação entre endometriose e quadros psiquiátricos comórbidos permanecem como ponto a ser esclarecido. Alguns estudos recentes têm fornecido evidências de possíveis vias e marcadores envolvidos, os quais serão discutidos adiante (SILVA et al., 2015).

Inicialmente, partindo do pressuposto de que mulheres com endometriose comumente experienciam situações de dor crônica e problemas de autoestima, associados, por exemplo, à dispareunia, redução da fertilidade, dismenorreia, esses fatores podem ser considerados estressores crônicos. Não apenas isso, eles também podem ser considerados incontroláveis. Tomando isso como evidência, eles podem causar alterações estruturais, funcionais e neurogênicas no cérebro que se aproximam de indivíduos submetidos a eventos estressores crônicos e que culminam com quadros de transtornos de humor (MARQUI, 2014).

Nesse contexto, é largamente conhecido que eventos estressores crônicos causam uma disfunção do eixo de resposta ao estresse: o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), levando a uma hipersecreção de corticóides e a uma perda do controle de inibição retrógrada desse eixo. Pacientes com transtornos afetivos, como depressão unipolar ou bipolar e síndromes ansiosas, usualmente apresentam alterações dessa natureza (MONSIVAIS et al., 2016).

Donatti et al. (2017) avaliaram medições repetidas do cortisol sérico (8h-12-16h) em 93 pacientes com endometriose e sua percepção da dor e do estresse. Eles encontraram que as mulheres com sintomas de dor pélvica moderada a severa apresentam altos níveis de percepção do estresse, bem como redução de funcionalidade e alterações do ritmo de cortisol diário. Essas evidências, portanto, sugerem fortemente que em pacientes com endometriose, sobretudo naquelas com quadros mais severos há uma importante desregulação do eixo de resposta ao estresse, o que pode participar dos mecanismos indutores dos quadros psiquiátricos associados.

No campo pré-clínico, as ratas com implantes endometriais no peritônio desenvolviam endometriose após serem submetidos a um protocolo de estresse crônico (14 dias) por exposição a um predador. Esses animais de forma relacionada apresentavam importantes alterações do eixo HPA e níveis elevados de corticosterona sérica (MEDEIROS, 2005).

Outro achado interessante do estudo de Medeiros (2005) foi relacionado ao sistema de catecolaminas endógenas. O sistema catecolaminérgico, noradrenalina e dopamina compõem e são integrados com o eixo HPA na resposta a eventos estressores. Eles mediam as reações de luta ou fuga perante situações de risco eminente.

Existem consideráveis evidências que mostram um hiperativação do sistema de transmissão catecolaminérgico, em especial noradrenérgico, em áreas límbicas, como amígdala, ínsula, e hipocampo, em transtornos afetivos, como síndromes ansiosas, bem como bloqueadores dos receptores desses neurotransmissores parecem desempenhar importante efeito ansiolítico (SEROVA et al., 2010).

No estudo de Gama (2015), foi pioneiramente demonstrado que ratas que desenvolviam endometriose e eram submetidos a estresse crônico apresentavam um aumento da expressão dos receptores  $\beta 2$  adrenérgicos e D2- dopaminérgicos nas lesões ectópicas endometriais, bem como alterações epigenéticas nas subregiões CA1 e giro denteado do hipocampo. Portanto, esse estudo foi pioneiro ao demonstrar que, em animais submetidos a estresse crônico, o desenvolvimento de lesões endometrióticas é relacionado a uma ativação catecolaminérgica que estimula a angiogênese e crescimento das lesões, bem como é acompanhado por alterações epigenéticas em áreas reguladoras do humor, como o hipocampo.

Previamente, foi demonstrado que mulheres com endometriose e dor crônica pélvica apresentavam reduções regionais do volume da substância cinzenta em regiões cerebrais envolvidas com a integração dos sinais dolorosos, como tálamo, giro cingulado, putamen e ínsula. Estudos recentes têm focado na avaliação da conectividade de áreas cerebrais relevantes para o processo de percepção da dor e emoções (GAMA, 2015).

Nesse contexto, um estudo conduzido por Beissner et al. (2016) avaliou a conectividade cerebral por ressonância magnética funcional de 67 pacientes com

endometriose associada a sintomas pélvicos severos. Esses pesquisadores focaram no hipocampo anterior por ser essa área, além da memória, participante dos circuitos integradores da imaginação, emoções, ansiedade e especialmente estar envolvida na transição da dor aguda para crônica. Outro aspecto importante é que o hipocampo anterior é um substrato neural importante para o comportamento de ansiedade e que essa área regula a atividade do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HPA), por meio de suas conexões com núcleos hipotalâmicos, como o núcleo periventricular. Nesse estudo, esses pesquisadores identificaram que as pacientes com endometriose apresentavam um aumento da conectividade do hipocampo anterior com o núcleo septal.

Esse núcleo recebe e emite projeções para o bulbo olfatório, amígdala, hipocampo, hipotálamo, habênula e tálamo, e parece ser fundamental para os circuitos de resposta ao prazer. Interessantemente, esses pacientes quando submetidos às sessões de psicoterapia e estimulação somatosensorial apresentam melhora dos níveis de ansiedade e normalização do hipersinal da conectividade hipocampo anterior-septal (BEISSNER et al., 2016).

Nesse ínterim, outro elegante estudo foi conduzido por Donatti et al., (2017) aonde investigaram as alterações de conectividade e os níveis dos neurotransmissores glutamato e glutamina em diferentes regiões cerebrais de 17 pacientes com endometriose e dor pélvica severa e 13 pacientes com endometriose sem dor pélvica, em relação aos controles saudáveis. Eles encontraram que as pacientes com dor pélvica severa apresentavam um aumento da conectividade entre a região da ínsula anterior e córtex prefrontal medial, além do aumento das taxas de glutamina/glutamato na ínsula anterior. Interessantemente, esses achados neurobiológicos apresentaram forte correlação com os parâmetros clínicos de ansiedade, ( $r=0.61$ ,  $p=0.02$ ), depressão ( $r=0.60$ ,  $p=0.03$ ), e percepção da intensidade da dor ( $r=0.55$ ,  $p=0.05$ ).

Em síndromes dolorosas crônicas, importantes alterações estruturais e funcionais têm sido descritas nas regiões cerebrais reguladoras da dor. A ínsula é uma região cerebral envolvida na integração dos sinais de natureza sensorial (interoceptiva), afetiva e cognitiva, tendo assim sua importância destacada em estudos com síndromes dolorosas crônicas. Além disso, a ínsula juntamente aos circuitos hipocampais parecem ser as regiões mais consistentemente ativadas durante a

transição da dor aguda para a crônica. Níveis elevados de aminoácidos neurotransmissores excitatórios, como o glutamato, e redução de neurotransmissores inibitórios tem sido descritos na ínsula anterior em pacientes com quadros álgicos, como fibromialgia (DONATTI et al., 2017).

Portanto, um estudo recente indica pioneiramente que nos pacientes com endometriose o desenvolvimento de quadros psiquiátricos do humor e de dor crônica podem estar fortemente relacionados às alterações funcionais e neuroquímicas no hipocampo (BEISSNER et al, 2017).

Além disso, tendo em vista o papel da neurogênese hipocampal na fisiopatologia dos transtornos de humor e do efeito de fármacos antidepressivos. Os mecanismos subjacentes a essa neurotransmissão disfuncional ainda precisam ser melhor esclarecidos e a participação de possíveis fatores, como a produção de radicais livres e estresse oxidativo e neuroinflamação, necessitam serem demonstrados no desenvolvimento das alterações psiquiátricas que acompanham a endometriose (LEE; KIM, 2010).

## 6 OBJETIVOS

No presente capítulo, serão abordados os objetivos da pesquisa.

### 6.1 GERAL

Avaliar alterações comportamentais e neuroquímicas tempo-dependentes em ratas adultas submetidas ao modelo de endometriose peritoneal induzido pelo transplante autólogo de tecidos uterinos.

### 6.2 ESPECÍFICOS

- Analisar o efeito do tempo no desenvolvimento de alterações comportamentais relacionadas à ansiedade e depressão em ratas submetidas ao modelo de endometriose induzida;
- Entender o efeito do tempo no desenvolvimento de alterações de sensibilização periférica e visceral à dor em ratas submetidas ao modelo de endometriose induzida;
- Estudar o efeito do tempo no desenvolvimento de alterações sobre os níveis séricos de corticosterona em ratas submetidas ao modelo de endometriose induzida;
- Aferir o efeito do tempo no desenvolvimento de alterações sobre os níveis de marcadores de estresse oxidativo – glutathiona reduzida (GSH), peroxidação lipídica, atividade da enzima MPO – no hipocampo em ratas submetidas ao modelo de endometriose induzida;
- Determinar o efeito do tempo no desenvolvimento de alterações sobre os níveis de expressão da neurotrofina fator cerebral derivado do cérebro no hipocampo em ratas submetidas ao modelo de endometriose induzida.

## 7 MATERIAL E MÉTODOS

No presente capítulo, abordaremos aspectos relacionados aos materiais e métodos utilizados na presente pesquisa.

### 7.1 ANIMAIS

Ratos Wistar fêmeas adultos (9-10 semanas de idade, com peso entre 150-180 gramas), fornecidas pelo Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC) foram utilizadas nos experimentos. Os animais (total de 60 ratas) foram alojados em três por caixa de policarbonato padrão (42 x 20,5 x 20 cm), em condições ambientais padrões ( $22 \pm 1$  ° C, umidade de  $60 \pm 5\%$ ; ciclo de luz de 12 horas claro/escuro com livre à água e ração padrão (FRI-LAB Rato II, FRI-Ribe). Todos os procedimentos experimentais foram realizados entre 8:00 e 14:00. Este protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê Local de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará (sob número 35/2017) - Anexo A e foi conduzido de acordo com o Guia do NIH para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (NIH, 2011) e o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

### 7.2 MODELO CIRÚRGICO DE ENDOMETRIOSE

O modelo de transplante autólogo da endometriose foi realizado de acordo com o método previamente descrito em ratas (VERNON; WILSON, 1985).

Resumidamente, os animais foram anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina e xilazina (80 e 60 mg / kg, intraperitonealmente, respectivamente). Uma resposta anestésica adequada foi avaliada pela ausência de reatividade ao estímulo de pinçamento da cauda. Em seguida, uma pequena incisão na linha média (cerca de 1 cm) acima da abertura vaginal foi feita. Posteriormente, a área ao redor da incisão foi cuidadosamente dissecada, em movimentos lentos com tesoura, de modo a destacar suficientemente a pele da parede abdominal. Usando uma pequena pinça, foi localizado o corno uterino esquerdo, e uma pequena incisão medial foi feita com cuidado para não causar danos a outras estruturas pélvico-abdominais. Suavemente, o corno uterino foi puxado para cima e com dois fragmentos de sutura de fio de seda

trançado (6-8 cm/cada) foram ligados firmemente às junções útero-tubular e utero-cervicais esquerdas. Após alguns minutos de ligadura, a secção uterina entre as ligações foi cortada e colocada em placa de Petri estéril com 500 µl de PBS contendo penicilina (100 U / ml) e estreptomicina (100 µg / ml). Três secções iguais foram obtidas a partir do corno uterino extraído utilizando uma pinça de biópsia (Miltex 33-31, York, PA). Em seguida, as amostras uterinas foram suturadas ao peritônio parietal usando suturas Vicryl 4.0. O abdômen dos animais foi então fechado com fio absorvível 5.0 e a pele foi fechada com sutura não absorvível 4.0. As ratas alocadas no grupo falso-operado (F.O.) foram tratadas de forma idêntica as ratas nos quais foi induzido o modelo de endometriose, com exceção de apenas a sutura isolada ter sido colocada no peritônio desses animais.

**Figura 1 – Incisão da pele da parede abdominal.**



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

Fonte: Pereira (2013, p.37).

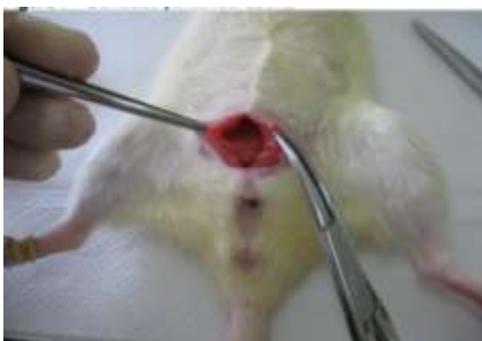
**Figura 2 – Túnel para implante do fragmento uterino.**



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

Fonte: Pereira (2013, p.37).

**Figura 3 – Cavidade peritoneal aberta.**



Identificação do útero após abertura da cavidade peritoneal.

Fonte: Pereira (2013, p.38).

**Figura 4 – Identificação do hemi-útero esquerdo.**



Exposição do útero para identificação do hemi-útero esquerdo (seta).

Fonte: Pereira (2013, p.38).

**Figura 5 – Exérese do hemi-útero esquerdo.**



Ligadura dos pedículos vasculares para exérese do hemi-útero esquerdo.  
Fonte: Pereira (2013, p.39).

**Figura 6 – Abertura longitudinal do hemi-útero esquerdo.**



Abertura longitudinal do hemi-útero esquerdo para confecção de fragmento de 4x4mm de área.  
Fonte: Pereira (2013, p.39).

**Figura 7 – Fragmento de 4x4mm de área do hemi-útero esquerdo da rata.**



Fragmento de 4x4mm de área a ser implantado no subcutâneo da região inguinal direita da rata.  
Fonte: Pereira (2013, p.40).

**Figura 8 – Momento do implante no subcutâneo.**



Fragmento de 4x4mm de área sendo implantado no subcutâneo da região inguinal direita da rata.  
Fonte: Pereira (2013, p.40).

**Figura 9 – Aspecto final da cirurgia.**



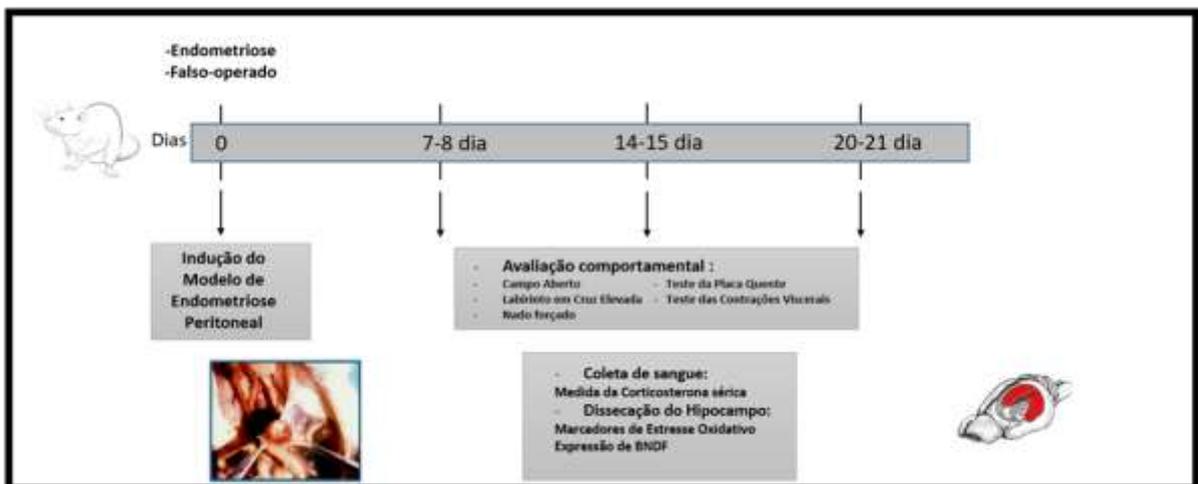
Aspecto final da cirurgia após sutura contínua da parede abdominal em dois planos.  
Fonte: Pereira (2013, p.41).

### 7.3 DESENHO EXPERIMENTAL

As ratas foram divididas randomicamente entre os grupos endometriose e F.O. Após o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos em repouso em suas gaiolas até o 7º, 14º e 21º dias, após a cirurgia, quando foram submetidas aos testes comportamentais por dois observadores independentes cegados para a divisão entre os grupos. Também, para evitar a re-exposição dos animais ao mesmo teste comportamental, eles foram divididos igualmente em três subgrupos diferentes (com endometriose e grupos falso-operados) para cada avaliação temporal (no 7º, 14º e 21º dia). Os testes comportamentais foram, então, organizados em sequência do menos para o mais estressante descrito por (PAYLOR et al., 2006).

A endometriose foi confirmada no momento do sacrifício através da identificação de lesões ectópicas na cavidade abdominal. Adicionalmente, após a decapitação, foram colhidas amostras de sangue do tronco cervical (cerca de 1 ml para cada rata) em microtubos. Posteriormente, o hipocampo bilateralmente dos animais foi dissecado e armazenado imediatamente em freezer  $-70^{\circ}\text{C}$  até os ensaios neuroquímicos.

**Diagrama 1: Delineamento experimental do estudo.**



Fonte: Elaborado pelo pesquisador/2018.

## 7.4 ANÁLISE COMPORTAMENTAL

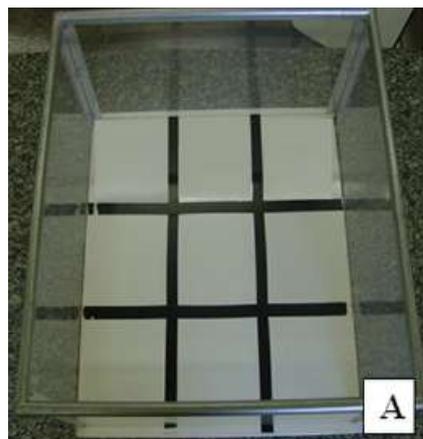
No presente subcapítulo, serão abordadas questões relacionadas com a análise comportamental.

### 7.4.1 Teste de campo aberto

A atividade locomotora e o comportamento exploratório foram medidos em uma área de campo aberto, que consiste em um aparato de acrílico quadrado (40 x 40 cm, paredes com 40 cm de altura) dividido em nove quadrados, com base no modelo descrito em outro lugar (ARCHER, 1973).

Sob a luz vermelha (28 lx no centro), cada rata foi colocada em um canto da área e observada por 5 min após 1 minuto de habituação. Entre duas ratas, o aparelho foi limpo com solução de etanol a 20%. Os parâmetros registrados durante o teste foram: o número de cruzamentos de animais com quatro patas (locomoção espontânea), o número de levantamentos (comportamento exploratório vertical), entradas no quadrante central e o tempo gasto no quadrante central (em segundos).

**Figura 10: Teste do campo aberto.**



Fonte: Disponível em: <<http://www.google.com.br/figuras.>> Acesso em: 12 nov. 2017.

### 7.4.2 Teste de labirinto em cruz elevado

O aparelho labirinto em cruz elevado, descrito por Lister (1987), consiste em

dois braços abertos (50x10 cm, paredes de 40 cm de altura) e dois braços fechados (50x10cm, paredes de 40 cm de altura) conectados por um quadrante central (10x10 cm) e elevado a uma altura de 50 cm. O rato foi colocado no centro do aparelho de frente para um dos braços abertos e permitido explorar durante 5 min sob condições de luz vermelha (28 lx no centro). Para cada animal, foi considerado ter entrado em um braço quando todos os quatro membros estavam dentro desse braço. Cada rata foi testada uma vez e, entre duas delas, o aparelho foi limpo com solução de etanol a 20%. Os parâmetros comportamentais observados durante o teste foram o número de entradas em braços abertos e fechados e o tempo gasto em cada uma dessas seções. Estes dados foram utilizados para calcular o número de entradas totais, a % de entradas nos braços abertos (isto é, entradas abertas / entradas totais  $\times$  100) e a % de tempo nos braços abertos (isto é, tempo em braços abertos / duração total  $\times$  100).

#### **7.4.3 Teste do nado forçado**

O teste de natação forçada foi realizado durante 2 dias, como descrito anteriormente (PORSOLT; LePICHON; JALFRE, 1977). No primeiro dia, na sessão de pré-natação, as ratas foram colocadas individualmente por 15 min em um cilindro de acrílico (40 cm de altura, 22 cm de diâmetro) contendo 20 cm de água mantida a  $23 \pm 1^\circ$  C. Vinte e quatro horas depois, as ratas foram submetidas a sessão de teste. Elas foram novamente colocadas em cilindros cheios de água, e a duração da imobilidade foi registrada por 5 min. O tempo de imobilidade foi definido como o tempo gasto pela rata na ausência de comportamentos ativos, orientados para a fuga, como nadar, saltar, criar, cheirar ou mergulhar, fazendo apenas os movimentos necessários para manter a cabeça acima da água (BORSINI; MELI, 1988).

**Figura 11: Teste do nado forçado.**



Fonte: Disponível em: <<http://www.google.com.br/figuras.>> Acesso em: 12 nov. 2017.

#### **7.4.4 Teste da placa quente**

O teste da placa quente é um teste amplamente utilizado para avaliar o limiar da dor aos estímulos térmicos em roedores (BANNON; MALMBERG, 2007; CARVALHO et al., 2018).

Para isso, foi usado com um medidor de placa quente comercialmente disponível, consistindo de um cilindro de acrílico transparente colocado em uma placa de aquecimento. As ratas foram colocadas para andar na chapa ( $53,0 \pm 1^\circ\text{C}$ ) por até 45s (latência máxima permitida; para evitar danos nos tecidos). A latência para pular, lambe a pata ou lambe a pata traseira foi registrada, até o máximo de 45s (se o animal não emitisse tal resposta). Cada animal foi testado apenas uma vez em cada sessão.

#### **7.4.5 Contorções abdominais induzidas por ácido acético**

O modelo de dor visceral induzida por ácido acético foi conduzido conforme descrito por Koster et al. (1959) e repetidamente reproduzido (LEWTER et al., 2017; CARVALHO et al., 2018).

Resumidamente, as ratas foram habituadas em gaiolas individuais durante 1

hora. Em seguida, receberam uma injeção intraperitoneal (i.p.) de ácido acético a 0,6% - 1 ml. O número de contorções induzidas por ácido foi observado durante 20 minutos, começando 5 minutos após a administração. A contorção foi definida como uma contração do abdome após um alongamento dos membros posteriores. O número de contorções foi classificado cumulativamente por um observador experiente. Para não estender o sofrimento dos animais, imediatamente, ao final dos 20 minutos de duração do teste, os animais foram rapidamente sacrificados.

### 7.5 EXTRAÇÃO CIRÚRGICA DO HIPOCAMPO

Imediatamente após a realização dos testes comportamentais e retirada de sangue para avaliação laboratorial, os animais foram sacrificados por decapitação em guilhotina. Após isso, alocados em gelo fresco, os cérebros dos animais foram removidos do crânio, e a área cerebral, o hipocampo, foi microdissecada. Para a retirada do hipocampo, a porção anterior dos lobos frontais (em torno de 1,5mm a partir do bulbo olfatório) foi removida por meio de uma secção bilateral com o auxílio de uma tesoura de microdissecção (MACHADO, 1985 apud LIMA, 2011).

Após a retirada do hipocampo acompanhando a fissura sagital mediana, a camada cortical cerebral foi rebatida das meninges com o auxílio de uma pinça reta de microdissecação, a qual, progredindo delicada e tangencialmente aos ventrículos laterais, divulsionou-se o córtex em toda a sua extensão fronto-occipital. Após isso, foi possível expor a região hipocampal (HC). O hipocampo foi isolado das estruturas circunjacentes por divulsionamento com uma tesoura de microdissecação, sendo a retirada orientada pelo diâmetro da porção tuberosa visível desses núcleos. As amostras foram então mantidas em freezer -70°C até a data das análises moleculares.

### 7.6 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA

A determinação da corticosterona foi realizada de acordo com o método de fluorescência descrito anteriormente por (MATTINGLY, 1962; BUTTE et al., 1978).

Resumidamente, as amostras de sangue fresco foram centrifugadas (1700 xg, 10 min, 4°C) para separar o soro. Os corticosteróides livres de soro foram extraídos

por reação de diclorometano, sob rotação moderada (33 rpm, 20 minutos, 4°C). A fase orgânica foi recolhida e incubada com reagente de fluorescência (7 volumes de ácido sulfúrico a 3 volumes de álcool etílico purificado) durante 13 minutos, protegido da luz e aquecendo a 4°C. A fluorescência foi medida em *Cytation*<sup>TM</sup> 3 *Plate Reader* (Biotek, EUA) usando os comprimentos de onda de 470 µm para excitação e 540 µm para emissão. A corticosterona sérica foi expressa em µg de corticosterona / ml de soro utilizando uma curva padrão de corticosterona variando de 100 a 0,5 µg de corticosterona / ml de soro.

## 7.7 DETERMINAÇÃO DE MARCADORES OXIDATIVOS

Nesta seção, abordaremos aspectos relacionados à determinação de marcadores oxidativos.

### 7.7.1 Determinação dos níveis de peroxidação lipídica

O grau de peroxidação lipídica nas amostras hipocâmpais foi medido através da determinação dos níveis de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme o método de Draper e Hadley (1990), seguindo o protocolo: foram preparados homogenatos das áreas cerebrais a 10% em solução de cloreto de potássio (KCl) 1,15%, 0,25 µL do homogeneizado será misturado a 1 mL de solução de ácido tricloroacético a 10% e acrescido de 1 mL de solução de ácido tiobarbitúrico 0,6%. Após a agitação, essa mistura foi mantida em um banho de água fervente (95-100°C) por 15 minutos, adicionado o n-butanol (2:1 v/v), a seguir resfriada em banho de gelo por alguns minutos e, posteriormente, centrifugada (800xg, 5 minutos).

Após o resfriamento, a peroxidação lipídica foi determinada por absorvância a 535 nm e foi expressa como mmol tecido malonaldeído (MDA)/mg de proteína (OHKAWA et al., 1979).

### 7.7.2 Determinação das concentrações de glutathiona reduzida

As concentrações de glutathiona reduzida foram avaliadas para estimar defesas endógenas contra o estresse oxidativo. O método é baseado na reação de reagente de

Ellman (DTNB), com grupos tiol livres. Foram preparados homogenatos das áreas cerebrais a 10% em EDTA 0,02M, retirados 400 $\mu$ L desse homogenato e adicionados a 320 $\mu$ L de água destilada e mais 80 $\mu$ L de ácido tricloroacético a 50%. O material foi agitado e centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos. Em seguida, recolhido 400 $\mu$ L do sobrenadante e acrescidos 800 $\mu$ L de tampão Tris-HCl 0,4M, pH 8,9 e mais 20 $\mu$ L de DTNB 0,01M e após 1 minuto da reação foi feita a leitura da coloração em 412nm através de espectrofotômetro. A concentração de glutathiona reduzida foi expressa em nanogramas de GSH/g de tecido, tendo por base uma curva padrão (SEDLAK; HANUS, 1982).

### **7.7.3 Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase**

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente nos grânulos de neutrófilos. Essa enzima é utilizada como indicador de processo inflamatório, mais especificamente, como marcador de migração de neutrófilos dos tecidos. Nesse ensaio, imediatamente após a decapitação, as amostras hipocâmpais foram homogeneizadas (50 mg/ml) em uma solução de brometo de hexadeciltrimetilamônio 0,5% (HTAB) em tampão fosfato 50 mM, pH 6,0. Em seguida, os homogenatos foram centrifugados (14000 rpm, 4°C) por 2 minutos. Foram retirados 30 $\mu$ L do sobrenadante da amostra e adicionados a placa de 96 poços juntamente com 200 $\mu$ L da solução contendo 0,167 mg/ml de hidrocloreto de  $\theta$ -dianisidina e 0,0005% de peróxido de hidrogênio. A absorbância foi medida nos tempos 0 e 3 minutos com comprimento de onda de 460nm (BRADLEY et al., 1982).

## **7.8 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS HIPOCÂMPAIS DE BDNF**

Nesta seção, serão abordados assuntos relacionados com a determinação dos níveis hipocâmpais de BDNF.

### **7.8.1 Preparação do extrato total de proteínas**

Os tecidos hipocâmpais foram homogeneizados manualmente em 2 mL de tampão de lise RIPA 01X (25 mM Tris-HCl pH 7,6; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1%

NP-40; 1% triton-X-100; 1% deoxicolato de sódio; 0,1% SDS) e inibidor de protease (*Sigma Aldrich*, EUA, 1 $\mu$ L de inibidor de protease: 100 $\mu$ L de RIPA) usando um pistão de vidro (Potter). Os homogenatos foram centrifugados a 12000 rpm por 10 minutos, sendo os sobrenadantes, contendo o extrato de proteínas de todos os compartimentos celulares, coletados. Os pellets residuais foram descartados. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford descrito a seguir. Todos os procedimentos foram realizados com as amostras imersas em gelo, e em condições de boa refrigeração e condicionamento.

### **7.8.2 Método Bradford para dosagem de proteína**

A concentração de proteínas totais na amostra foi determinada pelo emprego de reagente de Bradford (Bio-Rad Protein Assay – Dye Reagent Concentrate - BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). A ligação à proteína ocorre quando a absorção máxima da solução ácida Coomassie Brilliant Blue G-250 muda de 465 para 595 nm. Foram pipetados 160  $\mu$ L de amostra e 40  $\mu$ L de solução de Bradford nas placas e a leitura foi feita por espectrofotômetro (595 nm), utilizando-se uma curva de calibração de albumina bovina sérica (BSA) de 0,2 a 1,0 mg / mL.

### **7.8.3 Eletroforese em gel de SDS-PAGE e eletrotransferência**

Inicialmente, preparou-se 50  $\mu$ g de proteína referente a cada amostra, adicionando tampão da amostra (BioRad, EUA 65,8 mM Tris-HCl, pH 6,8; 26,3% glicerol; 2,1% SDS; 0,01% azul de bromofenol) e  $\beta$ -mecaptoetanol (BioRad, EUA), vortexando por 10s, aquecendo no banho maria (95°C, 5 min) e centrifugando (10000 rpm, 4°C, 30s). Em seguida, realizou-se a eletroforese vertical de proteínas em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) a 60V nos primeiros 15 min para deposição das amostras no fundo do poço e 120V para o restante da corrida, onde foi utilizado o gel a 10% e tampão de corrida (25 mM Tris; 192 mM glicina; 1% SDS). Foi usado o *Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™* (Biorad, EUA) como padrão de peso molecular de proteínas. Após a corrida, efetuou-se a transferência por eletroforese das proteínas do gel para a membrana de PVDF (BioRad, EUA, Fluoreto de polivinilideno) a 100V por duas horas em tampão de transferência (25mM Tris; 192mM glicina; 20% metanol). Após esta etapa, as membranas foram bloqueadas por

uma hora em agitação constante, para reduzir as ligações inespecíficas, com 5% BSA (Sigma-Aldrich, EUA) diluído em tampão salina Tris-HCl suplementado com Tween 20 (TBST- 20 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1% Tween 20).

Em seguida, realizou-se a lavagem das membranas com TBST, sendo três lavagens por 10 minutos cada. Na etapa seguinte, as membranas foram incubadas, *overnight* a 4°C sob agitação constante, com o anticorpo primário *mouse rabbit* anti-BDNF monoclonal IgG (1:1000, ANT-010, Alomone Labs, Israel) diluído em 1% de BSA em TBS-T. Após esta etapa, realizaram-se três lavagens de 10 min cada com TBS-T. As membranas foram incubadas com o anticorpo secundário HRP-goat anti-rabbit IgG (1:2000, Invitrogen, USA) por duas horas em temperatura ambiente. Decorrido este tempo, as membranas foram lavadas 4 vezes, duração de 10 minutos cada, com TBS-T. Enfim, adicionou-se o reagente de quimioluminescência (BioRad, EUA, *Clarity western ECL blotting substrate*) e as membranas foram agitadas por 5 minutos. As imagens das bandas foram capturadas por um sistema de ChemiDoc MP System (Biorad, EUA). A densidade das bandas foi mensurada por meio do *software* ImageLab Biorad (Biorad, EUA).

## 7.9 DESTINO DOS ANIMAIS APÓS O EXPERIMENTO

Após a decapitação e extração cerebral para análise neuroquímica, os animais foram devolvidos ao Biotério Setorial DFF da Faculdade de Medicina (FAMED). As carcaças foram entregues ao Biotério Setorial DFF-FAMED.

## 7.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM), e comparados por análise de variância regular de duas vias (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey (para os dados paramétricos) e Fisher LSD (para os dados não-paramétricos) como teste *post hoc* (análise comparações múltiplas). Na análise ANOVA, os fatores utilizados foram “endometriose” (grupos endometriose e F.O.) e “tempo” (7°, 14° e 21° dia pós-indução do modelo). O nível de significância foi estabelecido em  $P < 0,05$ . O programa estatístico utilizado para realizar a análise

foi o GraphPad Prism versão 7.0 para *Windows*, GraphPad *Software* (San Diego, CA, EUA).

## 8 RESULTADOS

No presente capítulo, apresentaremos os resultados das análises.

### 8.1 ALTERAÇÕES TIPO-ANSIEDADE NAS RATAS A PARTIR DA SEGUNDA SEMANA

O modelo de endometriose causou alterações tipo-ansiedade nas ratas a partir da segunda semana pós-indução do modelo.

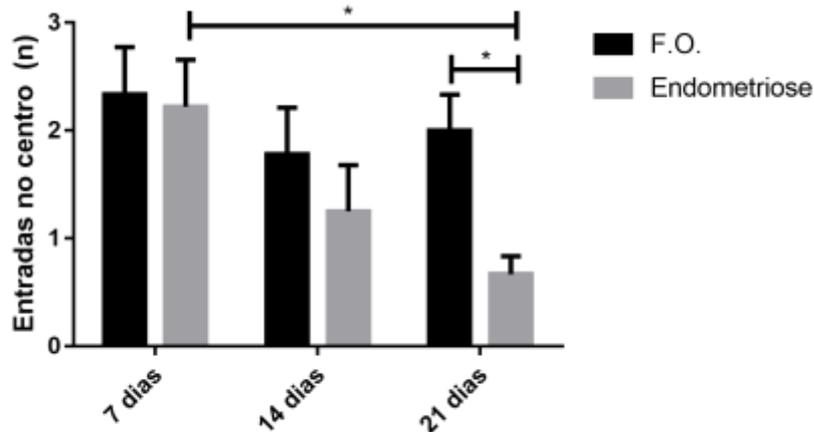
#### 8.1.1 Teste de campo aberto

Em relação às entradas no centro, a análise ANOVA revelou efeito significativo do fator “endometriose” isoladamente [ $F(1, 51) = 4,12, P = 0,0476$ ]. A interação entre os fatores [ $F(2, 51) = 1,179, P = 0,3158$ ] ou o fator “tempo” isoladamente [ $F(2, 51) = 3,093, P = 0,0540$ ] não alcançaram significância estatística.

No teste de comparações múltiplas, foi possível observar uma redução desse parâmetro no grupo endometriose em relação a seu controle pareado no dia 21 após a cirurgia ( $P < 0,05$ ). Também, foi notável uma redução significativa do tempo dependente desse parâmetro quando comparado o grupo endometriose no dia 21 com o dia 7 após a cirurgia ( $P < 0,05$ ) (Gráfico 1).

Finalmente, no parâmetro tempo gasto no centro, a análise ANOVA demonstrou um forte efeito significativo para o fator “endometriose” isoladamente [ $F(1, 44) = 22,89, P < 0,0001$ ]. A interação [ $F(2, 44) = 1,543, P = 0,2250$ ] ou o fator “tempo” [ $F(2, 44) = 0,5618, P = 0,5742$ ] isoladamente não tiveram efeito significativo. No teste *post hoc*, observamos uma tendência à redução desse parâmetro em todos os cortes temporais testados no grupo endometriose em relação aos controles F.O., porém obteve significância estatística apenas no 14º ( $P < 0,01$ ) e no 21º pós-operatório ( $P < 0,05$ ) (Gráfico 2).

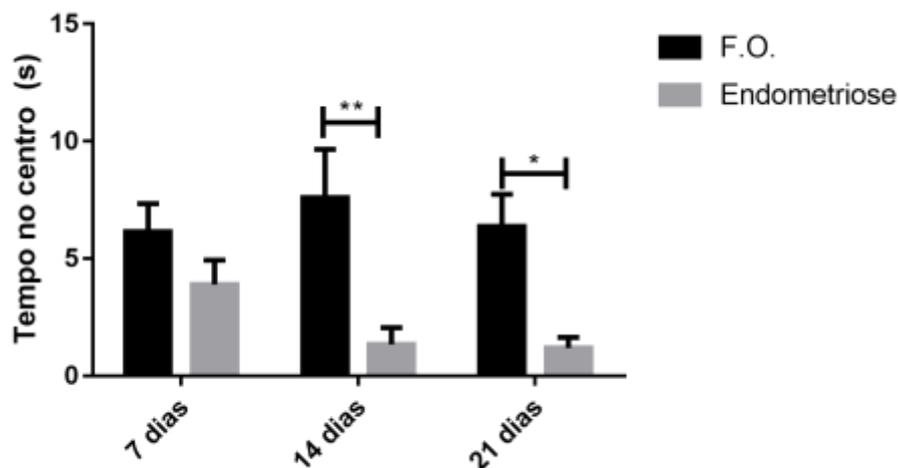
**Gráfico 1 - Efeito do modelo de endometriose ao longo do tempo no número de entradas no quadrante central no teste do campo aberto durante 5 minutos.**



Fonte: Elaborado pelo pesquisador/2018.

Barras representam médias  $\pm$  SEM (n = 8 animais / grupo). Os dados foram analisados usando ANOVA dupla via, seguido pelo teste post hoc de Fisher LSD. \* P <0,05, \*\* P <0,01.

**Gráfico 2 - Efeito do modelo de endometriose ao longo do tempo na permanência no quadrante central no teste do campo aberto durante 5 minutos.**



Fonte: Elaborado pelo pesquisador/2018.

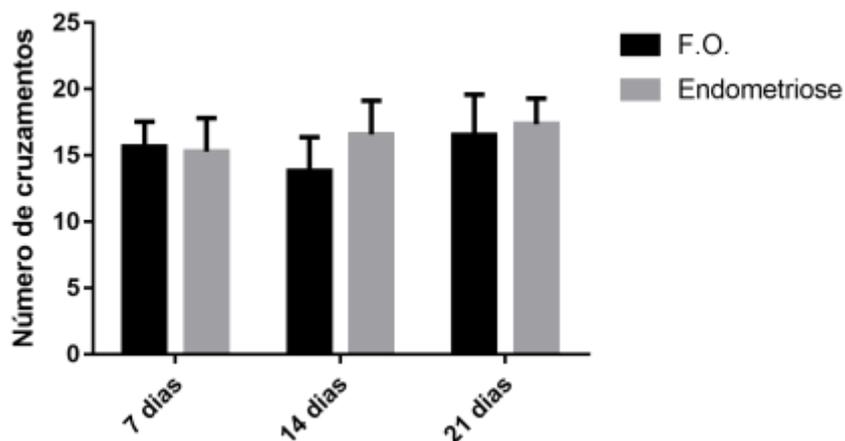
Barras representam médias  $\pm$  SEM (n = 8 animais / grupo). Os dados foram

analisados usando ANOVA dupla via, seguido pelo teste post hoc de Fisher LSD. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ .

Em relação ao número de cruzamentos, nossa análise ANOVA não revelou efeito significativo da interação ou de cada fator isoladamente [interação:  $F(2, 62) = 0,2109$ ;  $P = 0,8104$ ; “Tempo”:  $F(2, 62) = 0,2934$ ;  $P = 0,7468$ ; “endometriose”:  $F(1, 62) = 0,2853$ ,  $P = 0,5952$ ]. Além disso, não houve diferença significativa na análise de comparação múltipla entre os grupos analisados (Gráfico 3).

Da mesma forma, no número de levantamentos, nossa análise ANOVA não revelou nenhum efeito significativo da interação ou fatores isoladamente: [interação:  $F(2, 54) = 0,2227$ ,  $P = 0,8011$ ; “Tempo”:  $F(2, 54) = 0,7573$ ;  $P = 0,4738$ ; “Modelo de endometriose”:  $F(1, 62) = 0,2853$ ,  $P = 0,9452$ ]. O teste de comparação múltipla também não mostrou diferença significativa entre os grupos (Gráfico 4).

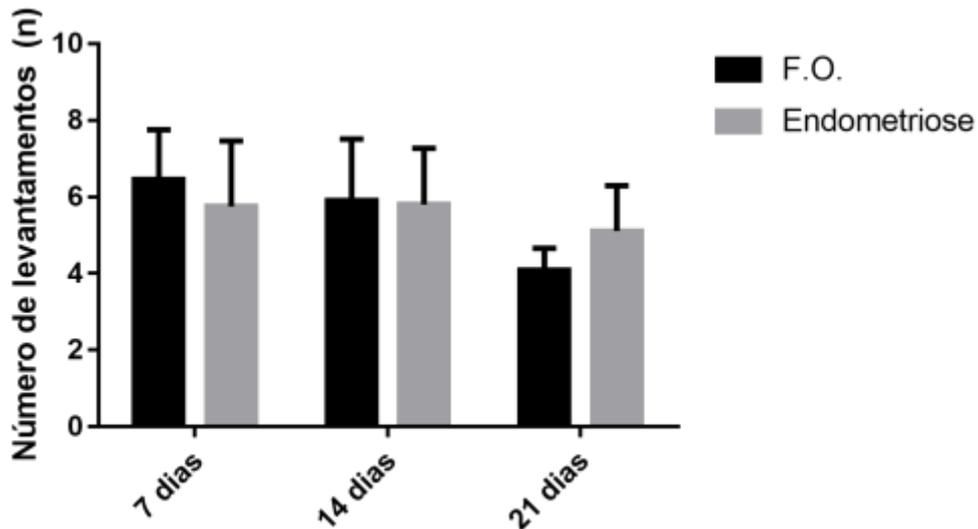
**Gráfico 3 – Efeito do modelo de endometriose ao longo do tempo no número de cruzamentos no teste do campo aberto durante 5 minutos.**



Fonte: Elaborado pelo pesquisador/2018.

Barras representam médias  $\pm$  SEM ( $n = 8$  animais / grupo). Os dados foram analisados usando ANOVA dupla via seguido pelo teste post hoc de Tukey.

**Gráfico 4 - Efeito do modelo de endometriose ao longo do tempo no número de levantamentos no teste do campo aberto durante 5 minutos.**



Fonte: Elaborado pelo pesquisador/2018.

Barras representam médias  $\pm$  SEM (n = 8 animais / grupo). Os dados foram analisados usando ANOVA dupla via seguido pelo teste post hoc de Tukey.

### 8.1.2 Teste de labirinto em cruz elevado

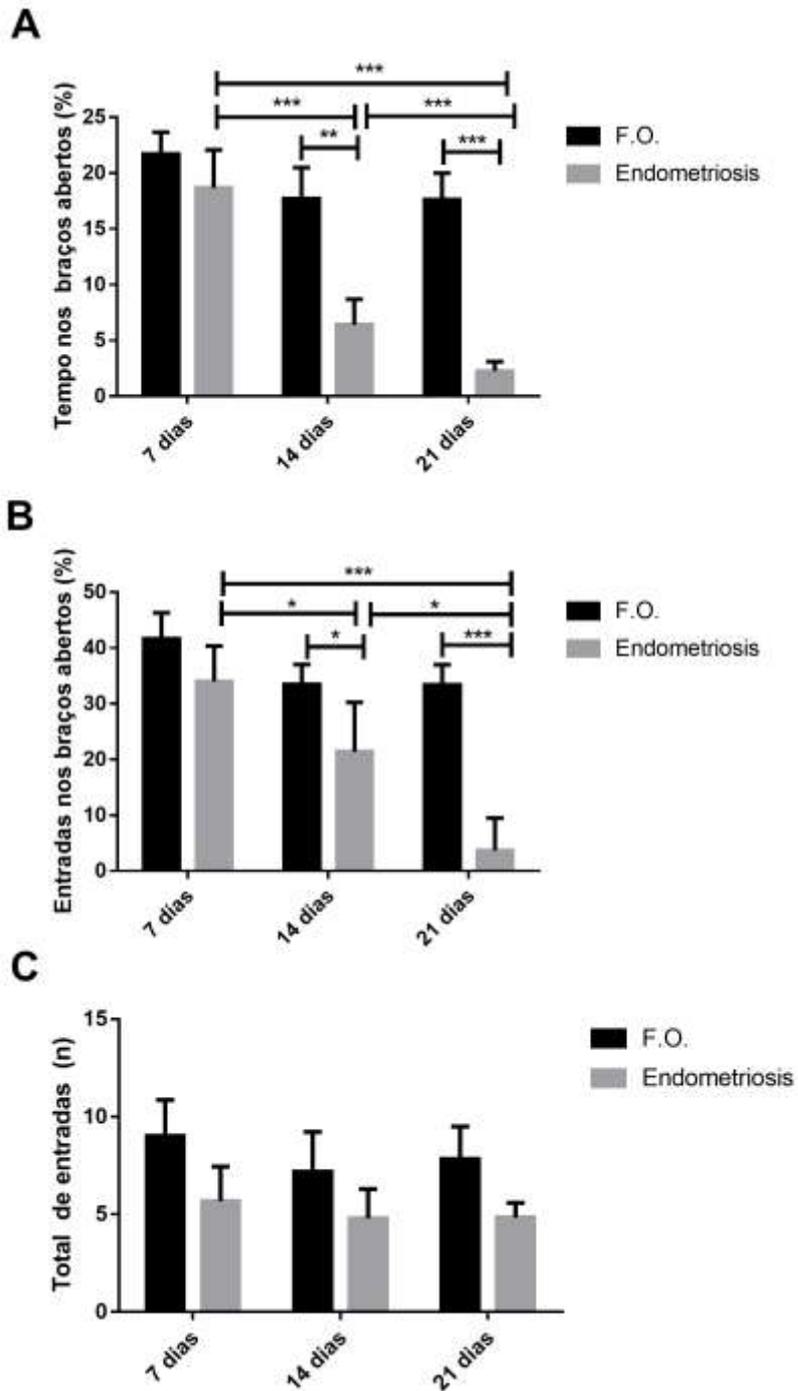
Na porcentagem de tempo em braços abertos, a análise ANOVA revelou um efeito significativo de cada fator isoladamente, bem como sua interação [interação:  $F(2, 29) = 3,458$ ,  $P = 0,0450$ ; “endometriose”:  $F(1, 29) = 25,15$ ,  $P < 0,0001$ , “tempo”:  $F(2, 29) = 10,28$ ,  $P = 0,0004$ ]. Na análise de comparações múltiplas, notamos uma diminuição significativa neste tempo no grupo da endometriose tanto no 14º dia ( $P < 0,001$ ) como no 21º dia de avaliação ( $P < 0,001$ ) em comparação com os respectivos controles F.O. Além disso, observa-se uma redução relacionada ao tempo nesse parâmetro ao comparar os grupos: 7º dia (Média: 21,72%) *versus* 14º (Média: 6,4%), 7º dia (Média: 21,72%) *versus* 21º dia (Média: 3,25%) ( $P < 0,001$ ), e 14º *versus* 21 dias ( $P < 0,001$ ) (Gráfico 5 A).

Semelhantemente, no percentual de entradas nos braços abertos, a análise ANOVA mostrou efeito significativo de cada fator isoladamente e sua interação [interação:  $F(2,28) = 5,159$ ,  $P = 0,0124$ ; “endometriose”:  $F(1, 28) = 31,61$ ,  $P$

<0,0001; “Tempo”:  $F(2, 28) = 14,13$ ,  $P < 0,0001$ ]. No teste de comparações múltiplas, observamos uma diminuição significativa neste parâmetro no grupo endometriose tanto no 14º quanto ( $P < 0,05$ ) no 21º dia ( $P < 0,001$ ) em comparação com seus respectivos controles F.O. Comparando diferentes intervalos de tempo, observamos uma diminuição progressiva desta porcentagem no grupo de endometriose da seguinte forma: 7º dia (Média: 34,02%) *versus* 14º (Média: 21,39%), 7º dia (Média: 34,02%) *versus* 21º dia (Média: 3,70%) ( $P < 0,001$ ), e 14º (Média: 21,39%) *versus* 21 dias ( $P < 0,001$ ) (Gráfico 5 B).

Em relação ao total de entradas, um parâmetro relacionado locomoção total dentro do aparato, apesar de evidente um efeito significativo do fator “endometriose” isoladamente [ $F(1, 29) = 4,513$ ,  $P = 0,0423$ ], não houveram diferenças significativas entre os grupos no teste de comparações múltiplas (Gráfico 5 C).

Gráfico 5 - Efeito da cirurgia de indução de endometriose no percentual de tempo nos braços abertos (A), no percentual de entradas nos braços abertos (B) e no número total de entradas (C).



Fonte: Elaborado pelo pesquisador

Barras representam médias  $\pm$  SEM (n = 8 animais / grupo). Os dados foram

analisados usando ANOVA dupla via seguido por LSD de Fisher como teste *post hoc* para a porcentagem de entradas de braços abertos e tempo nos braços abertos. Para o total de entradas, o teste de Tukey como teste *post hoc* foi realizado.  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ , \*\*\*\*  $P < 0,0001$ .

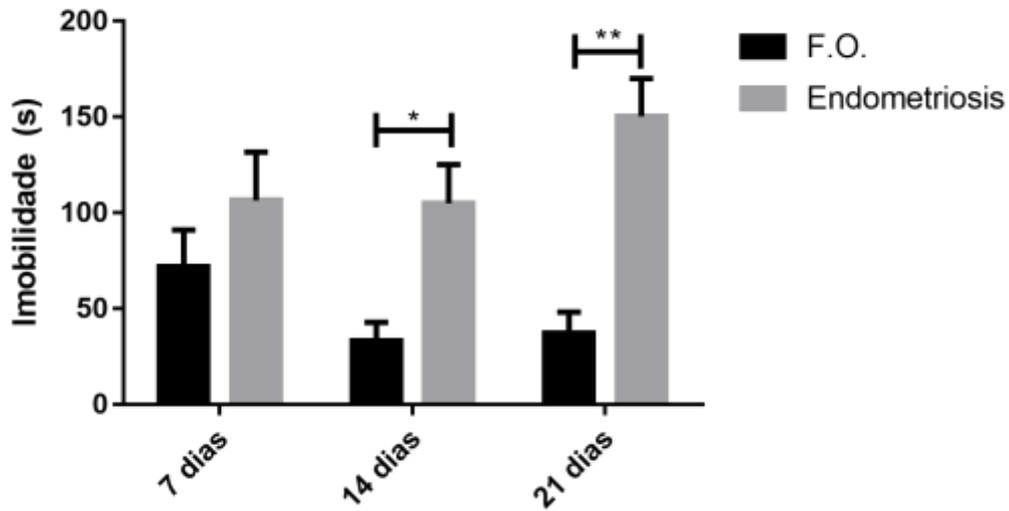
## 8.2 ALTERAÇÕES TIPO-DEPRESSIVAS A PARTIR DA TERCEIRA SEMANA

O modelo de endometriose causou alterações tipo-depressivas nas ratas a partir da terceira semana pós-indução do modelo.

### 8.2.1 Teste do nado forçado

Em relação ao tempo total de imobilidade, a análise ANOVA revelou apenas um efeito significativo do fator “endometriose” isoladamente [ $F(1, 51) = 25,17$ ,  $P < 0,0001$ ]. Nem a interação [ $F(2, 51) = 2,432$ ,  $P = 0,0980$ ] ou o fator “tempo” [ $F(2, 51) = 1,112$ ,  $P = 0,3366$ ] alcançaram significância estatística. No teste de comparações múltiplas, é notável um aumento acentuado na imobilidade no grupo endometriose comparado ao controle F.O no 14º ( $P < 0,05$ ) e 21º dia de avaliação ( $P < 0,01$ ). (Gráfico 6).

**Gráfico 6 - Efeito do modelo de endometriose ao longo do tempo na duração de imobilidade no teste do nado forçado durante 5 minutos.**



Fonte: Elaborado pelo pesquisador/2018.

Barras representam médias  $\pm$  SEM (n = 8 animais / grupo). Os dados foram analisados usando ANOVA dupla via seguido por teste *post hoc* de Tukey. \* P <0,05, \*\* P <0,01.

### 8.3 DIMINUIÇÃO PROGRESSIVA DA SENSIBILIDADE À DOR NAS RATAS

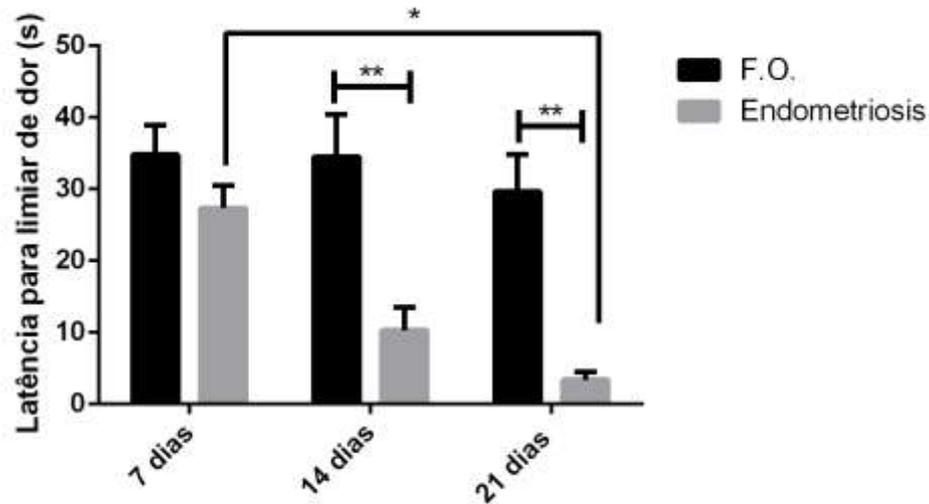
O modelo de endometriose diminui progressivamente o limiar de sensibilidade à dor nas ratas.

#### 8.3.1 Sensibilidade térmica periférica: teste de placa quente

Neste teste, a análise ANOVA mostrou que, isoladamente, ambos os fatores apresentam efeito significativo, porém sua interação não “endometriose”: [F (1, 28) = 29,19, P <0,0001; “tempo”: F (2, 28) = 5,499, P = 0,0097; “Interação”: F (2, 28) = 2,844, P = 0,0751]. No teste de comparações múltiplas, obtivemos uma redução significativa na latência para a reação dolorosa no grupo endometriose no 14º (P <0,01) e no 21º dia (P <0,01) de avaliação em comparação com os respectivos controles F.O. Também, encontramos uma redução progressiva desse parâmetro no

grupo endometriose em diferentes avaliações temporais: 7° versus 21° dia ( $P < 0,05$ ) (Gráfico 7).

**Gráfico 7 - Efeito do modelo de endometriose no limiar de latência para dor (em segundos) no decorrer de 3 semanas.**



Fonte: Elaborado pelo pesquisador/2018.

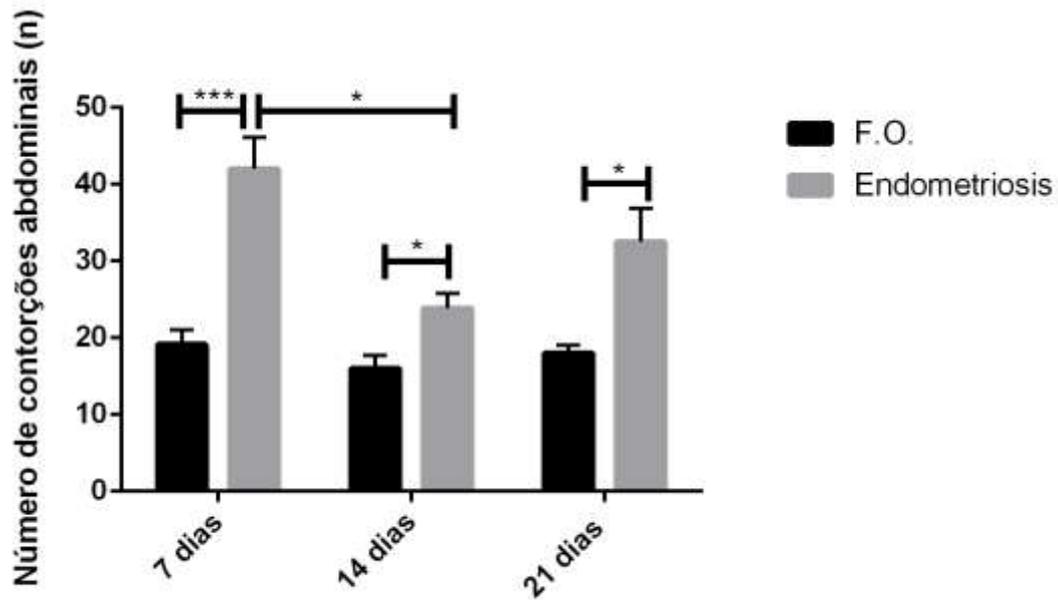
Barras representam médias  $\pm$  SEM ( $n = 8$  animais / grupo). Os dados foram analisados usando ANOVA dupla via seguido por teste *post hoc* de Tukey. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ .

### 8.3.2 Sensibilidade visceral: contorções abdominais induzidas por ácido acético

Em relação ao número de contorções induzidas por ácido acético, a ANOVA mostrou que tanto a interação como cada fator isoladamente atingiram um efeito significativo neste parâmetro: [interação:  $F(2, 30) = 3,582$ ,  $P = 0,0403$ ; “tempo”:  $F(2, 30) = 7,216$ ,  $P = 0,0028$ ; “endometriose”:  $F(1, 30) = 43,12$ ,  $P < 0,0001$ ]. No teste *post hoc*, observamos um aumento significativo no número de contorções nas ratas do grupo endometriose em todos os cortes temporais avaliados: 7° dia ( $P < 0,001$ ), 14° dia ( $P < 0,05$ ) e 21° dia ( $P < 0,05$ ) em relação a seus respectivos controles. Adicionalmente, no curso temporal do modelo, ocorreu redução significativa no número de contorções nos grupos endometriose entre o 7° e o 14° dia de avaliação ( $P$

<0,05), que, no entanto, voltou a aumentar entre o 14º e o 21º dia pós-cirurgia (não significativo) (Gráfico 8).

**Gráfico 8 – Efeito do modelo de endometriose no número de contorções abdominais no decorrer de 3 semanas.**



Fonte: Elaborado pelo pesquisador/2018.

Barras representam médias  $\pm$  SEM (n = 8 animais / grupo). Os dados foram analisados usando ANOVA dupla via seguido por teste *post hoc* de Tukey. \* P <0,05, \*\* P <0,01, \*\*\* P <0,001.

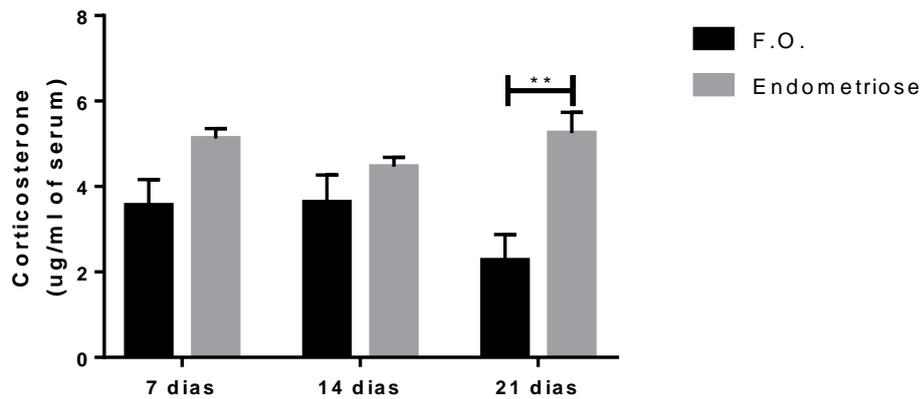
#### 8.4 AUMENTO NOS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA NA TERCEIRA SEMANA PÓS-INDUÇÃO

O modelo de endometriose causou um aumento acentuado nos níveis séricos de corticosterona na terceira semana pós-indução.

Em relação aos níveis séricos de corticosterona, observamos, na análise ANOVA, um efeito principal do fator “endometriose” isoladamente [“endometriose”: F (1, 33) = 17,65, P = 0,0002; “Tempo”: F (2, 33) = 0,6149, P = 0,5468; interação: F (2, 33) = 2,184, P = 0,1286]. O teste de comparações múltiplas mostrou um aumento

significativo nos níveis de corticosterona no grupo endometriose em comparação com os controles F.O. no 21º dia de avaliação ( $P < 0,01$ ). Uma tendência não significativa de aumentar também foi observada nos outros cortes temporais de avaliação no grupo com endometriose em comparação com seus respectivos controles (Gráfico 9).

**Gráfico 9 - Efeito do modelo de endometriose nos níveis séricos de corticosterona no decorrer de 3 semanas.**



Fonte: Elaborado pelo pesquisador/2018.

Barras representam médias  $\pm$  SEM ( $n = 6-7$  animais / grupo). Os dados foram analisados usando ANOVA dupla via seguido por teste post hoc de Tukey. \*\*  $P < 0,01$ .

## 8.5 ALTERAÇÕES PRÓ-OXIDATIVAS NO HIPOCAMPO DAS RATAS

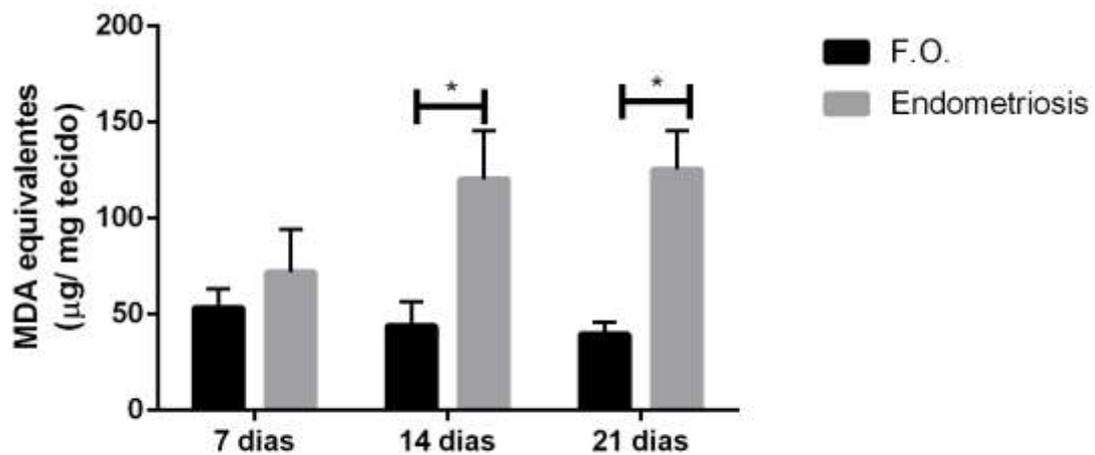
O modelo de endometriose promoveu várias alterações pró-oxidativas no hipocampo das ratas.

### 8.5.1 Peroxidação lipídica

Na peroxidação lipídica, a ANOVA mostrou um único efeito significativo do fator “endometriose” isoladamente [ $F (1, 27) = 18,2, P = 0,0002$ ]. Nem os fatores

interação nem o fator “tempo” alcançaram significância estatística [interação:  $F(2, 27) = 2,325$ ,  $P = 0,1170$ ; “Tempo”:  $F(2, 27) = 0,905$ ;  $P = 0,4165$ ]. No teste *post hoc*, observamos um aumento significativo nos níveis de MDA nos animais do grupo endometriose em comparação com controles F.O. no 14° ( $P < 0,05$ ) e 21° dia de avaliação ( $P < 0,05$ ). Nenhuma diferença significativa adicional pôde ser notada entre os grupos (Gráfico 10).

**Gráfico 10 - Efeito do modelo de endometriose nos níveis malondialdeído (MDA) no Hipocampo no decorrer de 3 semanas.**



Fonte: Elaborado pelo pesquisador

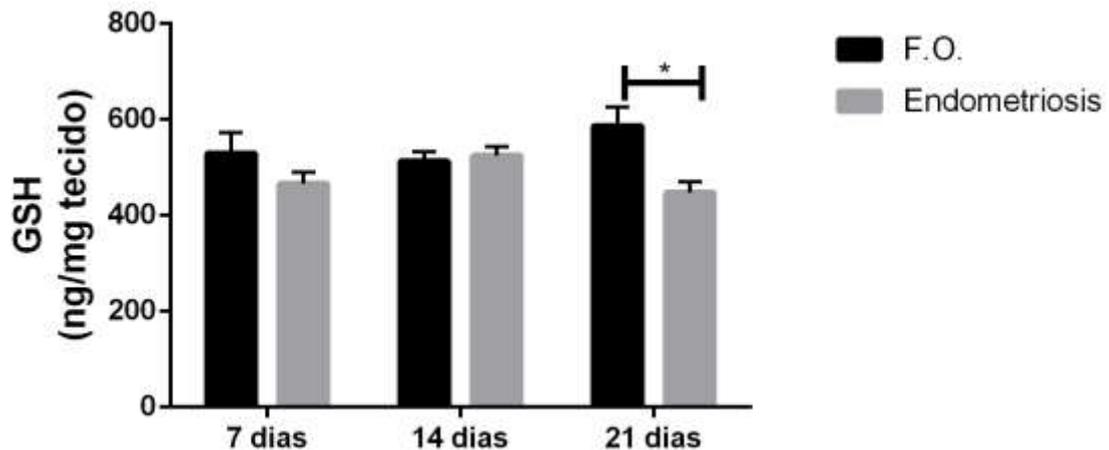
Barras representam médias  $\pm$  SEM ( $n = 6-7$  animais / grupo). Os dados foram analisados usando ANOVA dupla via seguido por teste *post hoc* de Tukey. \*  $P < 0,05$ .

### 8.5.2 GSH reduzida

Nossa análise revelou um efeito principal significativo do fator “endometriose” isoladamente. Nem o fator “tempo” ou interação entre os fatores alcançaram significância estatística [“endometriose”:  $F(1, 28) = 6,703$ ,  $P = 0,0151$ ; “Tempo”:  $F(2, 28) = 0,307$ ,  $P = 0,7381$ ; interação:  $F(2, 28) = 3,072$ ,  $P = 0,0622$ ]. O teste de comparação múltipla demonstrou uma redução significativa nos níveis de GSH nas ratas do grupo endometriose em comparação com o grupo F.O. apenas no

21º dia de avaliação ( $P < 0,05$ ). Nenhuma diferença significativa adicional pode ser notada entre os grupos (Gráfico 11).

**Gráfico 11 - Efeito do modelo de endometriose nos níveis de glutathiona (GSH) reduzida no Hipocampo no decorrer de 3 semanas.**



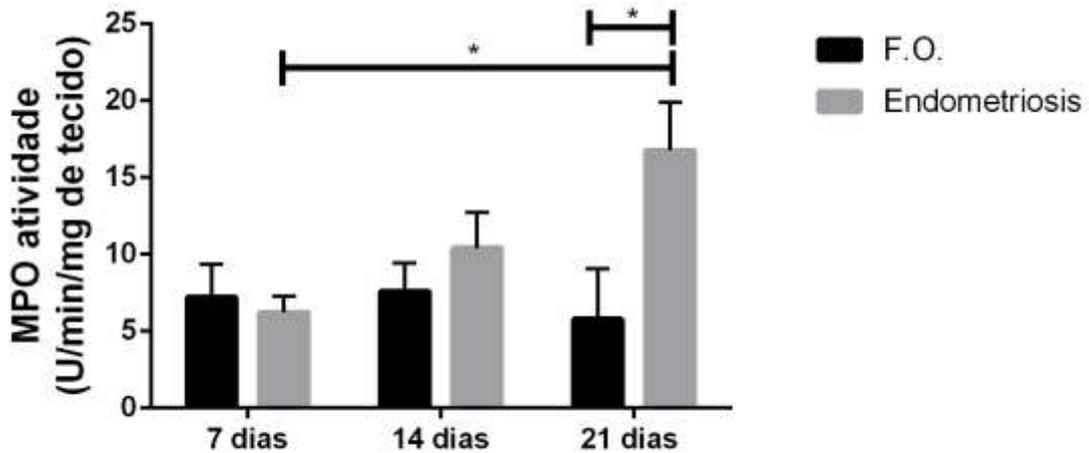
Fonte: Elaborado pelo pesquisador.

Barras representam médias  $\pm$  SEM ( $n = 6-7$  animais / grupo). Os dados foram analisados usando ANOVA dupla via seguido por teste post hoc de Tukey. \*  $P < 0,05$ .

### 8.5.3 Atividade da enzima mieloperoxidase

Na atividade da MPO, a análise de ANOVA mostrou que apenas a interação entre os fatores alcançou efeito estatístico [ $F(2, 34) = 3,912$ ,  $P = 0,0296$ ]. Nenhum dos fatores isoladamente teve um efeito significativo [“endometriose”:  $F(1, 34) = 2,7$ ,  $P = 0,1096$ ; “Tempo”:  $F(2, 34) = 2,089$ ,  $P = 0,1394$ ]. O teste de comparação múltipla demonstrou um aumento significativo nesta atividade enzimática no grupo endometriose em comparação com controles no 21º dia pós-cirurgia ( $P < 0,05$ ). Curiosamente, um aumento significativo também foi notável no grupo de endometriose, comparando o 21º dia com o 7º dia de avaliação ( $P < 0,05$ ) (Gráfico 12).

**Gráfico 12 - Efeito do modelo de endometriose nos níveis de atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO) no Hipocampo no decorrer de 3 semanas.**



Fonte: Elaborado pelo pesquisador/2018.

Barras representam médias  $\pm$  SEM (n = 6-7 animais / grupo). Os dados foram analisados usando ANOVA dupla via seguido por teste post hoc de Tukey. \* P <0,05.

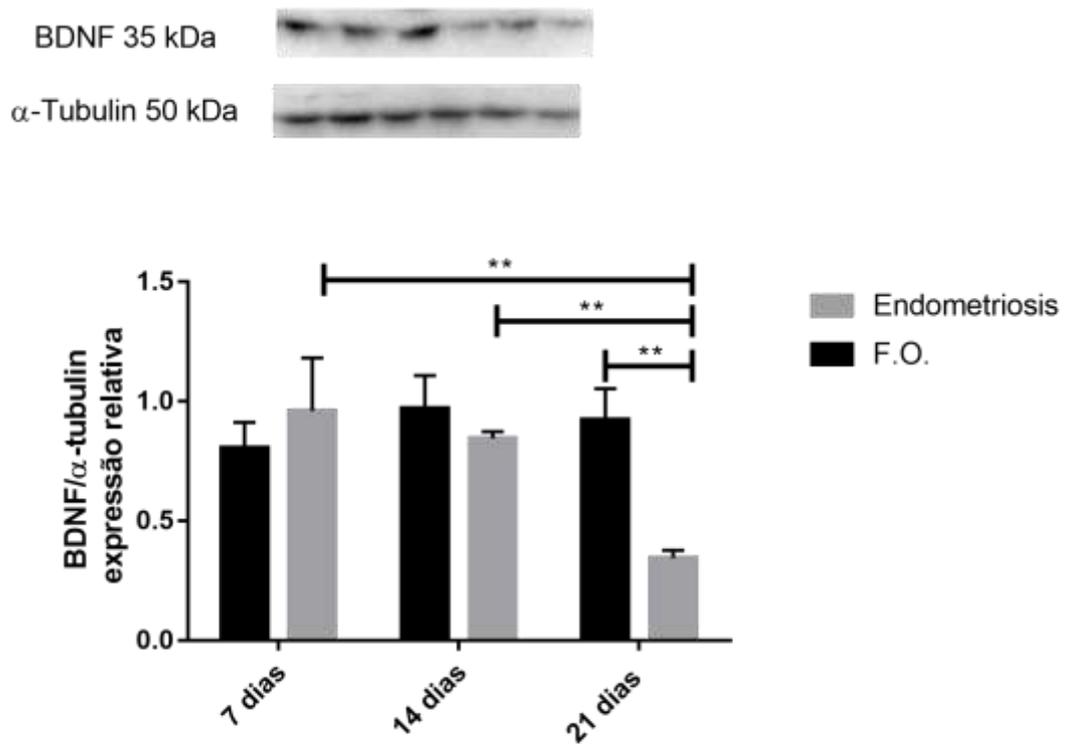
## 8.6 REDUÇÃO PROGRESSIVA DE BDNF NO HIPOCAMPO

O modelo de endometriose reduziu progressivamente a expressão de BDNF no hipocampo.

Quanto aos níveis de expressão de BDNF, foi notado apenas um efeito significativo da interação entre os fatores [F (2, 17) = 3,873, P = 0,0411]. Nenhum dos fatores isoladamente teve efeito significativo [“endometriose”: F (1, 17) = 2,668, P = 0,1208; “Tempo”: F (2, 17) = 2,507, P = 0,1111]. No teste de comparações múltiplas, observamos uma diminuição significativa nos níveis de BDNF no grupo da endometriose no 21º dia em comparação com o mesmo grupo no 7º e 14º dia de avaliação (P <0,01). Observou-se também uma diminuição acentuada nos níveis de BDNF no grupo da endometriose em comparação com a F.O. controles no 21º dia

(MD: 0,5772 ou 62,64%) (P <0,01). (Gráfico 13).

**Gráfico 13 - Efeito do modelo de endometriose nos níveis da proteína BDNF (E) no hipocampo.**



Fonte: Elaborado pelo pesquisador/2018.

As ratas foram submetidas a endometriose cirurgicamente induzida ou cirurgia simulada (cirurgia de controle). As determinações neuroquímicas foram conduzidas no hipocampo de animais dissecados no 7º, 14º e 21º dias após a indução. Barras representam médias  $\pm$  SEM (n = 4 animais / grupo). Os dados foram analisados usando ANOVA dupla via seguido por teste post hoc de Fisher LSD para a análise dos níveis de BDNF. \*\* P <0,01.

## 9 DISCUSSÃO

No presente estudo, foi realizada uma análise pioneira na literatura baseado na relação entre alterações comportamentais decorrente da endometriose com alterações oxidativas/neurotróficas centrais, ampla e semanal, de ratas submetidas ao modelo de endometriose induzido por auto-transplante peritoneal de tecidos uterinos. Aqui, as ratas com endometriose exibiram importantes alterações comportamentais relacionadas ao tempo e à sensibilidade à dor. É importante ressaltar que a endometriose causou alterações do tipo-ansiosas e de sensibilização à dor desde o 14º dia de avaliação, mas apenas no 21º dia um espectro completo de alterações semelhantes à depressão foram induzidas. Além disso, a endometriose aumentou os níveis séricos de corticosterona e induziu marcantes alterações pró-oxidativas no hipocampo.

Esses achados foram seguidos por uma redução relacionada ao tempo (progressiva) na expressão do BDNF no hipocampo que atingiu os níveis mais baixos no 21º dia pós-indução. Portanto, este estudo fornece dados de que o presente modelo mimetiza aspectos importantes dos sintomas neuropsiquiátricos vistos nas pacientes com endometriose, e pode representar uma ferramenta importante para estudar a base fisiopatológica desses sintomas, bem como para testar novos tratamentos potenciais.

A endometriose é uma condição ginecológica enigmática. Apesar de poder apresentar prevalência estimada em até 17% da população feminina, não há cura disponível e o manejo médico enfoca, principalmente, o alívio dos sintomas (BURNEY; GIUDICE, 2012).

Além disso, a endometriose é um distúrbio severamente incapacitante. Afeta negativamente os aspectos sociais e psicológicos da vida das mulheres acometidas. De fato, mulheres com endometriose apresentaram escores de qualidade de vida (QV) reduzidos por meio de diversos instrumentos de avaliação e prejuízo em suas atividades diárias (como dormir, comer, movimentar e cuidar de si). A endometriose também tem sido fortemente associada à baixa qualidade de vida sexual e relações íntimas (POPE et al., 2015; PLUCHINO et al., 2016; CULLEY et al., 2017).

Alguns estudos também apontam para o impacto considerável dos sintomas da endometriose na educação e na carreira profissional dessas pacientes. Levando isso em consideração, não é de surpreender que as pacientes com endometriose tenham taxas consideravelmente mais altas de comorbidades neuropsiquiátricas e problemas de saúde mental (FOURQUET et al., 2010; NNOAHAM et al., 2011; POPE et al., 2015; LAGANA et al., 2017).

Apesar do valor dos modelos animais para estudar a fisiopatologia da endometriose e as novas estratégias de tratamento, poucos estudos avaliaram consistentemente a presença de sintomas neuropsiquiátricos e seus mecanismos biológicos correlatos nesses modelos (TIRADO-GONZÁLEZ et al., 2010).

Nesse contexto, Li et al. (2018) relataram recentemente que camundongas submetidas a um modelo similar de endometriose ao ser realizado nesse estudo apresentaram alterações tipo-ansiosas no teste de campo aberto em 2 semanas de indução e aumentaram a imobilidade no teste da suspensão na cauda a partir de 4 semanas. Esses achados foram seguidos por alterações importantes na eletrofisiologia e expressão gênica de áreas cerebrais relacionadas à regulação do humor, como ínsula, amígdala e hipocampo.

Aqui, primeiramente, realizamos uma ampla avaliação comportamental de ratas submetidas a um modelo semelhante de endometriose peritoneal. Neste contexto, observamos que as ratas submetidas ao modelo de endometriose demonstraram comportamento tipo-ansioso, como demonstrado nos testes OFT e EPM. Essas alterações iniciaram a partir da 2ª semana após a cirurgia de indução e foram mantidas até o 21º dia de modelo. Além disso, na terceira semana do modelo, as ratas com endometriose desenvolveram outras alterações comportamentais que se assemelham a sintomas depressivos como demonstrado no teste do nado forçado.

Algumas discrepâncias aparentes entre as nossas e as descobertas anteriores poderiam estar associadas às diferentes espécies de roedores utilizadas, uma vez que é relatado que ratas são mais vulneráveis a desenvolver comportamento tipo-depressivo em condições estressantes (KOOLHAAS et al., 1997; WILLNER, 2017; LI et al., 2018).

Além disso, além de realizarmos uma avaliação comportamental mais ampla, existem algumas diferenças intrínsecas nos testes comportamentais usados aqui e

neste estudo anterior que também poderiam contribuir para essas discrepâncias, por exemplo, o teste de natação forçada parece ser mais sensível para avaliar os sintomas tipo-depressivos do que o teste de suspensão da cauda (CHATTERJEE; JAISWAL; PALIT, 2012).

Vale ressaltar que a dor, notadamente, a dismenorreia, a dispareunia e a dor pélvica crônica, são características centrais e destrutivas da endometriose, tendo forte impacto negativo no estado de saúde mental dessas pacientes (CARVALHO et al., 2015).

Alguns estudos relatam que a experiência da dor mais do que a própria endometriose é decisiva para o sofrimento emocional e o surgimento de sintomas neuropsiquiátricos (SOUZA et al., 2011).

Entretanto, é difícil separar esses aspectos (dor e endometriose em si), uma vez que ambos se influenciam mutuamente e poderiam compartilhar mecanismos comuns, como mecanismos neurais e imune-oxidativos, para o desenvolvimento de alterações comportamentais. Além disso, os sintomas neuropsiquiátricos e os próprios traços de personalidade poderiam influenciar significativamente a percepção e o limiar da dor nesses pacientes. Portanto, mais estudos são necessários para se traçar relações causativas (CUEVAS et al., 2012; WALKER et al., 2014; FACCHIN et al., 2016).

No presente estudo, avaliamos a percepção da dor nas ratas através de dois testes diferentes para sensibilidade visceral e periférica, respectivamente, no desenvolvimento do modelo de endometriose. É interessante mencionar que, na endometriose, ambos os processos de sensibilização periférica e central são relatados. Nessa condição, inicialmente o sistema nociceptivo periférico é sensibilizado pela presença de lesão tecidual ou inflamação, resultando em diminuição do limiar de dor e aumento do estímulo sensorial amplificado ao SNC. No entanto, com esses estímulos dolorosos contínuos, as ações centrais podem tornar-se independentes de quaisquer insumos periféricos devido a adaptações de longo prazo do funcionamento do SNC no processo denominado sensibilização central (LATREMOLIERE; WOOLF, 2009; AS-SANIE et al., 2013).

Em nossos resultados, observamos que as ratas com endometriose apresentaram um aumento da sensibilidade visceral em todos os intervalos de tempo

avaliados, mas especialmente no 7º dia após a indução do modelo. Esse achado está de acordo com o intenso ambiente pró-inflamatório em torno das lesões endometriais e dos órgãos peritoneais, já demonstrados estar presente no início do desenvolvimento dos implantes neste modelo (PELCH et al., 2012).

Por sua vez, o aumento da sensibilidade térmica só se tornou aparente após a segunda semana, defendendo um processo contínuo de sensibilização central no desenvolvimento do modelo. Nossos achados estão de acordo com estudos anteriores mostrando diminuição do limiar de dor térmica e mecânica em camundongos e ratas em um modelo semelhante de endometriose, e com os achados de Li et al. (2018) mostrando que as principais mudanças na sensibilidade térmica começaram em 2 semanas após a cirurgia de indução (LIU; LIU; GUO, 2012; SIMSEK et al., 2014).

O cortisol, em humanos, e a corticosterona, em roedores, é o ponto final hormonal do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e um regulador primário da resposta do corpo a condições estressantes. Foi hipotetizado que o estresse induzido pela endometriose seja capaz de induzir uma desregulação da resposta do eixo HPA. De fato, tanto hipo quanto hipercortisolismo foram descritos em várias condições de dor crônica, incluindo a endometriose. Os resultados dos estudos que examinam os níveis de cortisol em indivíduos deprimidos são variados, mas indivíduos severamente deprimidos mostraram níveis elevados de cortisol matinal e um alto padrão de secreção de cortisol diário (HOLSBOER, 2000; GUR et al., 2004; LIMA et al., 2006; CARROLL et al., 2007; TARIVERDIAN et al., 2010; CUEVAS et al., 2012; DIENES et al., 2013; HANNIBAL; BISHOP, 2014; KELLER et al., 2017).

A secreção de cortisol em resposta a um evento estressor psicossocial mais do que o cortisol basal tem sido usado para prever eficientemente a reatividade do eixo HPA. Evidências convincentes demonstraram que os indivíduos deprimidos e de alto risco para depressão apresentam níveis mais elevados de cortisol durante a recuperação de um estressor social. Em modelos de roedores, é possível submeter animais a um estressor agudo típico, como natação forçada ou estresse de contenção. Vários estudos mostraram que animais cronicamente estressados têm uma alta resposta de corticosterona sérica a eventos estressores do que controles saudáveis (BURKE et al., 2005; COX et al., 2011; O'MAHONY et al., 2011; DIENES et al., 2013).

Aqui, mostramos que as ratas do grupo endometriose apresentaram uma

resposta aumentada de corticosterona frente a um estressor agudo no 21º dia de avaliação, apontando para um estado hiper-reativo do eixo HPA quando esses animais manifestam as principais alterações de tipo-depressivas. Curiosamente, esses achados estão de acordo com um trabalho anterior que, apesar de não avaliar diretamente os níveis de corticosterona séricos, mostrou que o modelo de endometriose peritoneal causou uma redução acentuada na expressão do fator liberador de corticotropina (CRH) no hipocampo de ratos, um marcador de ruptura da alça de retroalimentação do eixo HPA (CUEVAS et al., 2012).

O estresse oxidativo ocorre quando o equilíbrio entre a produção de ROS e as defesas antioxidantes é interrompido. Evidências consideráveis sustentam o papel do estresse oxidativo e ROS no desenvolvimento da endometriose. De fato, mais de 20 diferentes biomarcadores de estresse oxidativo, como ânions / radicais livres, atividade enzimática, peroxidação lipídica, marcadores de danos no DNA e carbonilação de proteínas, mostraram-se marcadamente elevados no soro de pacientes com endometriose em relação a controles saudáveis. Esses achados sugerem que a endometriose está associada a um estado de estresse oxidativo sistêmico. No entanto, nenhum estudo até o presente momento avaliou o estado oxidativo cerebral de pacientes com endometriose (através de medições de marcadores oxidativos no líquido ou amostras post-mortem de cérebro dessas pacientes) ou de animais submetidos a modelos de endometriose (NGÔ et al., 2009; AGARWAL et al., 2012; SCUTIERO et al., 2017).

O hipocampo, além da memória, é uma área anatômica central envolvida na regulação do humor e da ansiedade. Além disso, o hipocampo é uma das principais regiões reguladoras da transição da dor aguda para a crônica. O estresse oxidativo no hipocampo é um achado biológico bem estabelecido na fisiopatologia da depressão, como demonstrado por vários modelos pré-clínicos e em estudos clínicos com amostras post-mortem de pacientes. Recentemente, foi demonstrado que pacientes com endometriose apresentavam conectividade anormal no hipocampo anterior e em suas comunicações para o córtex somatossensorial e fronto-insular, áreas importantes para o processamento de estímulos ansiosos e dolorosos. Esses pesquisadores também demonstraram uma forte correlação positiva entre os achados no hipocampo e a presença de sintomas de depressão / ansiedade nesses pacientes (BANNERMAN et al., 2004; CHE et al., 2010; MORETTI et al., 2012; MUTSO et al., 2014; RÉUS et

al., 2015; BEISSNER et al., 2017).

Aqui, nós mostramos que a endometriose causou um desequilíbrio acentuado no estado oxidativo hipocampal das ratas. Isso foi demonstrado pela diminuição dos níveis de GSH concomitante ao aumento dos níveis de peroxidação lipídica. Curiosamente, as principais alterações oxidativas ocorreram no 21º dia de avaliação, quando as principais alterações afetivas e relacionadas à dor também estão presentes.

Neste contexto, o GSH reduzido é o principal agente tiol intracelular e representa o mecanismo primário de defesa antioxidante contra ROS e eletrófilos em células de mamíferos. A glutatona desempenha uma participação estratégica na ativação e controle da morte da célula, uma vez que quando as concentrações de GSH são criticamente reduzidas, a membrana mitocondrial torna-se altamente sensível à permeabilização e à liberação de proteínas pró-apoptóticas para ativar mecanismos de morte celular (RIBAS et al., 2014; SONG et al., 2014).

Além disso, entre os marcadores de dano oxidativo celular, a peroxidação lipídica tem uma relevância especial. Lípidos peroxidados, como o malondialdeído, são produzidos quando o hidroperóxido lipídico (peroxidação lipídica em estágio inicial) não é reduzido pelas defesas antioxidantes endógenas, como o GSH, e continua reagindo para formar lipídios peroxidados em estágio avançado. Esses lipídios podem não apenas exacerbar o dano oxidativo atingindo diretamente outras biomoléculas, mas também comprometem a sinalização lipídica e a neurotransmissão monoaminérgica (CHALON, 2006; OTAKI et al., 2010; SULTANA et al., 2013; BAKUNINA; PARIANTE; ZUNSZAIN, 2015).

No campo de pesquisa sobre depressão, vários estudos relatam aumento dos marcadores de peroxidação lipídica e níveis reduzidos de GSH no soro de pacientes depressivos. Uma meta-análise recente incluindo aproximadamente 857 pacientes com MDD e 782 controles demonstrou uma correlação positiva entre a severidade dos sintomas depressivos e os níveis de peroxidação lipídica. Além disso, em consonância com nossos achados, vários estudos mostraram níveis aumentados de peroxidação lipídica e diminuição dos níveis de GSH em áreas de regulação do humor, como o hipocampo, em modelos de depressão, como o estresse crônico imprevisível comportamento tipo-depressivo induzido por lipopolissacarídeo (Tomaz et al., 2014) e bulbectomia olfatória (TÚNEZ et al., 2010; BLACK et al., 2015; MAZEREEUW et al., 2015; RÉUS et al., 2015).

O estresse oxidativo e a inflamação são processos fisiopatológicos intimamente relacionados. A MPO é uma enzima chave do sistema imune inato que é ativada em células fagocíticas em condições inflamatórias. A MPO gera radicais oxidantes fortes, em especial, o ácido hipocloroso (HOCl), que pode modificar covalentemente lípidos e proteínas. Em consonância com esta evidência, estudos importantes relataram um aumento da atividade e expressão de MPO no soro de pacientes depressivos (VACCARINO et al., 2008; ARNHOLD; FLEMMIG, 2010; PATTISON; DAVIES; HAWKINS, 2012; TALAROWSKA; SZEMRAJ; GAŁECKI, 2015; BISWAS, 2016).

Esses achados foram reproduzidos em estudos experimentais mostrando aumento da atividade da MPO no cérebro de animais submetidos a modelos de depressão. No presente estudo, portanto, demonstramos que o modelo de endometriose promoveu um aumento na atividade da MPO no hipocampo das ratas, atingindo os níveis mais elevados no 21º dia pós-indução. Em conjunto, nossos achados defendem a indução de um microambiente inflamatório-oxidativo no hipocampo das ratas submetidos ao modelo de endometriose, o que poderia representar um potencial mecanismo subjacente para o surgimento das alterações afetivas e de sensibilização à dor aqui observadas (MAES et al., 2011; MELLO et al., 2018).

Finalmente, os fatores neurotróficos são reguladores fundamentais da neurogênese e da plasticidade sináptica. Nesse contexto, o BDNF é um importante fator neurotrófico, cuja expressão é estritamente regulada pela atividade sináptica. Evidências convincentes relatam que o estresse crônico impacta a expressão e sinalização de BDNF no hipocampo de roedores, e que esse efeito pode ser revertido pelo tratamento com vários agentes antidepressivos (XU et al., 2000; MURAKAMI et al., 2005; LEE; KIM, 2010; BAJ et al., 2012).

De acordo com o nosso conhecimento, nenhum estudo investigou diretamente os níveis de BDNF no cérebro de ratas em modelo de endometriose, bem como sua possível associação com o surgimento de alterações neuropsiquiátricas relacionadas à endometriose. Aqui, nós demonstramos, pioneiramente, que as ratas com implantes endometriais demonstraram uma redução progressiva nos níveis de BDNF no hipocampo no curso temporal do modelo. Considerando em conjunto, esse resultado está de acordo com os outros achados imuno-oxidativos observados aqui, permitindo-

nos propor que um ambiente oxidativo / degenerativo se desenvolve no hipocampo de ratas após a indução do modelo de endometriose.

Nesse contexto, uma interação interessante entre o BDNF e o estresse oxidativo foi recentemente descrita. De fato, Bouvier et al. (2017) demonstraram que o BDNF controlava constitutivamente a translocação nuclear do fator mestre de transcrição Nrf2 sensível ao redox, que regulam a expressão de várias defesas antioxidantes. Não só isso, esses autores mostraram que o estado persistente de estresse oxidativo observado em animais vulneráveis ao estresse foi devido à diminuição das concentrações de BDNF no hipocampo.

Portanto, podemos propor que o comprometimento induzido pela endometriose na expressão de BDNF no hipocampo representa um mecanismo central subjacente ao surgimento das mudanças comportamentais e pró-oxidativas que seguem este modelo. Entretanto, mais dados são necessários para firmar associações causativas neste modelo.

## 10 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos deste experimento nos permitiram retirar as seguintes conclusões:

1. Observou-se que o modelo experimental de endometriose causou importantes alterações comportamentais, como é possível notar pelo aumento do comportamento tipo ansiedade a partir da segunda semana de indução e marcantes alterações tipo depressivas a partir da terceira semana do modelo.

2. O modelo experimental de endometriose pelo método proposto promoveu um aumento marcante da sensibilidade visceral, especialmente nos primeiros dias que sucederam a cirurgia (7 dias após), e periférica a partir do 14º de indução.

3. O modelo experimental de endometriose foi capaz de aumentar significativamente as concentrações séricas de corticosterona frente a um evento estressor agudo a partir da 3ª semana pós-cirurgia, advogando para um estado de hiper-reatividade do eixo HPA.

4. O modelo experimental de endometriose impactou significativamente os marcadores de estresse oxidativo - níveis de peroxidação lipídica, concentrações de GSH reduzida e atividade da MPO - no hipocampo dos animais em todos os cortes temporais, mas, principalmente, na 3ª de indução.

5. O modelo experimental de endometriose induziu uma redução progressiva dos níveis de expressão da neurotrofina BDNF no grupo endometriose, ao se comparar a 1ª com a 3ª semana de avaliação, indicando o desenvolvimento de alterações tempo-dependentes no presente modelo de endometriose.

Portanto, nossos achados trazem uma nova evidência relevante para o campo, por caracterizar o comportamento tipo depressivo e ansioso de ratas submetidas ao presente modelo de endometriose, bem como mostrar seus efeitos sobre o estado oxidativo hipocampal e os níveis de expressão de BDNF. Além disso, este estudo abre perspectivas para o uso desse modelo animal como uma plataforma útil para testar potenciais novos candidatos para o tratamento tanto da endometriose quanto dos sintomas neuropsiquiátricos relacionados.

## REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A.; APONTE-MELLADO, A.; PREMKUMAR, B.J.; SHAMAN, A.; GRUPTA, S. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 10, n. 1, p. 49, jun. 2012.
- ANDRADE, A.G.; NOGUEIRA, B.; REIS, J.; FAUSTINO, F.; VERÍSSIMO, C. Tratamento cirúrgico da endometriose profunda: série de 16 casos. **Acta Obstétrica e Ginecológica Portuguesa**, Coimbra, v.10, n.1, p.15-20, mar. 2016.
- ANTON, C. **Avaliação do risco de metástases linfonodais no câncer do endométrio, através de parâmetros clínicos, laboratoriais, radiológicos e anatomopatológicos**. 2015. 106f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal Behaviour**, v.21, n.2, p.205–235, maio 1973.
- ARNHOLD, J.; FLEMMIG, J. Human myeloperoxidase in innate and acquired immunity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 500, n. 1, p. 92–106, 1 ago. 2010.
- AS-SANIE, S.; HARRIS, R.E.; HARTE, S.E.; TU, F.F.; NESHEWAT, G.; CLAUW, D.J. Increased pressure pain sensitivity in women with chronic pelvic pain. **Obstetrics & Gynecology**, v.122, n.5, p.1047–1055, nov. 2013.
- BAJ, G.; D’ALESSANDRO, V.; MUSAZZI, L.; MALLEI, A.; SARTORI, C.R. et al. Physical exercise and antidepressants enhance BDNF targeting in hippocampal ca3 dendrites: further evidence of a spatial code for BDNF splice variants. **Neuropsychopharmacology**, v.37, n.7, p. 1600–1611, jun. 2012.
- BAKUNINA, N.; PARIANTE, C. M.; ZUNSZAIN, P. A. Immune mechanisms linked to depression via oxidative stress and neuroprogression. **Immunology**, jan. 2015.
- BANNERMAN, D.M.; RAWLINS, J.N.; McHUG, S.B.; DEACON, R.M.; YEE, B.K.; BAST, T.; ZHANG, W.N.; POTHUIZEN, H.H.; FELDON, J. Regional dissociations within the hippocampus-memory and anxiety. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v.28, n.3, p.273–283, maio 2004.
- BANNON, A. W.; MALMBERG, A. B. Models of nociception: hot-plate, tail-flick, and formalin tests in rodents. In: HOBOKEN, N.J. **Current protocols in neuroscience**. USA: John Wiley & Sons, Inc., 2007. p.891-8916.
- BAPTISTA, M.N.; CARNEIRO, A.M. Validade da escala de depressão: relação com ansiedade e stress laboral. **Estudos de Psicologia**, Campinas, v.28, n.3, p.345-352, 2011.
- BEISSNER, F.; PREIBISCH, C.; SCHWEIZERÁRAU, A.; POPOVICI, R.M.; MEISSNER, K. Psychotherapy with somatosensory stimulation for endometriosis-associated pain: the role of the anterior hippocampus. **Biological Psychiatry**, v.3223, n.17, p. 1–9, jan. 2017.

- BELLELIS, P.; DIAS JR., J.A.; PODGAEC, S.; GONZALES, M.; BARACAT, E.C.; ABRÃO, M.S. Aspectos epidemiológicos e clínicos da endometriose pélvica: uma série de casos. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.56, n.4, p.467-471, 2010.
- BELLELIS, P.; PODGAEC, S.; ABRÃO, M.S. Fatores ambientais e endometriose. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.57, n.4, p.456-461, 2011.
- BERNUIT, D.; EBERT, A.; HALIS, G. Female perspectives on endometriosis: findings from the uterine bleeding and pain women's research study. **Journal of Endometriosis**, v.3, n.2, p.73-85, 2011.
- BISWAS, S. K. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 17–19, 2016.
- BLACK, C. N.; BOT, M.; SCHEFFER, P.G.; CUJIPERS, P.; PENNINX, B.W. Is depression associated with increased oxidative stress? A systematic review and meta-analysis. **Psychoneuroendocrinology**, v. 51, p. 164–175, jan. 2015.
- BORSINI, F.; MELI, A. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? **Psychopharmacology**, v.94, n.2, p.147-160, Feb. 1988.
- BOTÃO, R.B.S. **Endometriose**: reflexões analítico comportamentais acerca do contexto da doença. 2016. 117f. Dissertação (Mestrado em Análise do Comportamento) – Departamento de Psicologia Geral e Análise do Comportamento, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR, 2016.
- BOUVIER, E.; BROULLARD, F.; MOLET, J.; CLAVERIE, D.; CABUNGAL, J.H. et al. Nrf2-dependent persistent oxidative stress results in stress-induced vulnerability to depression. **Molecular Psychiatry**, v. 22, n. 12, p. 1701–1713, 2017.
- BRADLEY, P.P.; CHRISTENSEN, R.D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood Journal**, v.60, n.3, p.618-622, set. 1982.
- BRITO, L.G.O.; RODRIGUES, H.L.P.; REIS, F.J.C.; FARIA, F.M.; FREITAS, M.M.S. Tumor misto de células musculares lisas e do estroma endometrial uterino: relato de caso. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.48, n.6, p.459-462, dez. 2012.
- BURKE, H. M.; DAVIS, M.C.; OTTE, C.; MOHR, D.C. Depression and cortisol responses to psychological stress: A meta-analysis. **Psychoneuroendocrinology**, v. 30, n.9, p.846–856, out. 2005.
- BURNEY, R.O.; GIUDICE, L.C. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. **Fertility and Sterility**, v.98, n.3, p.511-519, Sep. 2012.
- BUTRICK, C.W. Interstitial cystitis and chronic pelvic pain: new insights in neuropathology, diagnosis, and treatment. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v.46, n.4, p.811-823, Dec. 2003.

- BUTTE, J. C.; KAKIHANA, R.; NOBLE, E. P. The fluorometric assay of rat plasma corticosterone: evaluation of nonspecific fluorescence. **Steroids**, v.32, n.5, p. 607-614, dez. 1978.
- CACCIATORI, F.A.; MEDEIROS, J.P.F. Endometriose: uma revisão da literatura. **Revista de Iniciação Científica**, v.13, n.1, p.56-66, 2015.
- CARAÇA, D. B.; PODGAEC, S.; BARACAT, E.C.; ABRÃO, M.S. Mecanismos fisiopatológicos da dor pélvica na endometriose profunda. **Diagnóstico & Tratamento**, v.16, n.2, p.57-61, 2011.
- CARDOSO, E.P.S.; ANSELMO, N.M.; MIGUEL, K.J.; SILVA, A.B.C. Endometriose em diferentes faixas etárias: perspectivas atuais no diagnóstico e tratamento da doença. **Ciência et Praxis**, v.4, n.8, p.53-58, 2011.
- CARROLL, B. J.; CASSIDY, F.; NAFTOLOWITZ, D.; TATHAM, N.E.; WILSON, W.H.; et al. Pathophysiology of hypercortisolism in depression. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v.115, n.433, p.90–103, fev. 2007.
- CARVALHO, A.C.F.; POLI NETO, O.B.; CRIPPA, J.A.S.; HALLAK, J.E.C.; OSÓRIO, F.L. Associations between chronic pelvic pain and psychiatric disorders and symptoms. **Archives of Clinical Psychiatry**, São Paulo, v.42, n.1, p.25–30, jan./fev. 2015.
- CARVALHO, A.M.R.; VASCONCELOS, L.F.; ROCHA, N.F.M.; RIOS, E.R.V.; DIAS, M.L. et al. Antinociceptive activity of Riparin II from *Aniba riparia*: further elucidation of the possible mechanisms. **Chemico-Biological Interactions**, v.287, p.49–56, May 2018.
- CARVALHO, C.V.; D'AMORA, P.; SATO, H.; GIRÃO, M.J.B.C.; LIMA, G.R.; SILVA, I.D.C.G.; SCHOR, E. Polimorfismo do gene do receptor de progesterona (PROGINS) em mulheres com endometriose pélvica. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v.26, n.8, p.613-617, set. 2004.
- CHALON, S. Omega-3 fatty acids and monoamine neurotransmission. Prostaglandins, **Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 75, n. 4–5, p. 259–269, out. 2006.
- CHATTERJEE, M.; JAISWAL, M.; PALIT, G. Comparative evaluation of forced swim test and tail suspension test as models of negative symptom of schizophrenia in rodents. **ISRN Psychiatry**, v. 2012, p. 595141, Jan. 2012.
- CHE, Y.; WANG, J.F.; SHAO, L.; YOUNG, T. Oxidative damage to RNA but not DNA in the hippocampus of patients with major mental illness. **Journal of Psychiatry & Neuroscience**, v.35, n.5, p.296–302, set. 2010.
- CORREIA, C. C.; FONTOURA, M. A influência da exposição ambiental a disruptores endócrinos no crescimento e desenvolvimento de crianças e adolescentes. **Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo**, v.10, n.2, p.186-192, jul./dez. 2015.

COSTA, A.J.S.; MEJIA, D.P.M. Atuação da acupuntura no tratamento da endometriose: revisão de literatura. Disponível em: <[http://portalbiocursos.com.br/ohs/data/docs/13/43\\_-\\_AtuaYo\\_da\\_acupuntura\\_no\\_tratamento\\_da\\_endometriose\\_revisYo\\_de\\_literatura..pdf](http://portalbiocursos.com.br/ohs/data/docs/13/43_-_AtuaYo_da_acupuntura_no_tratamento_da_endometriose_revisYo_de_literatura..pdf)> Acesso em: 27 jul. 2018.

COX, B.M.; ALSAWAH, F.; McNEILL, P.C.; GALLOWAY, M.P.; PERRINE, S.A. Neurochemical, hormonal, and behavioral effects of chronic unpredictable stress in the rat. **Behavioural Brain Research**, v. 220, n. 1, p. 106–111, jun. 2011.

CUEVAS, M.; FLORES, I.; THOMPSON, K.J.; RAMOS-ORTOLAZA, D.L.; TORRES-REVERON, A.; APPEYARD, C.B. Stress exacerbates endometriosis manifestations and inflammatory parameters in an animal model. **Reproductive Sciences**, v.19, n.8, p.851–862, ago. 2012.

CULLEY, L.; LAW, C.; HUDSON, N.; MITCHELL, H.; DENNY, E.; RAINE-FENNING, N. A qualitative study of the impact of endometriosis on male partners. **Human Reproduction** (Oxford, England), v.32, n.8, p.1667-1673, Aug. 2017.

DIENES, K. A.; HAZEL, N. A.; HAMMEN, C. L. Cortisol secretion in depressed, and at-risk adults. **Psychoneuroendocrinology**, v.38, n.6, p. 927–940, jun. 2013.

DONATTI, L.; RAMOS, D.G.; ANDRES, M.P.; PASSMAN, L.J.; PODGAEC, S. Pacientes com endometriose que utilizam estratégias positivas de enfrentamento apresentam menos depressão, estresse e dor pélvica. **Einstein**, v.15, n.1, p.65-70, 2017.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, New York, v.186, p.421-431, 1990.

ESHRE Capri Workshop Group; COLLINS, J.; CROSIGNANI, P.G. Endometrial bleeding. **Human Reproduction Update**, v.13, n.5, p.421-431, sep./oct. 2007.

FACCHIN, F.; BARBARA, G.; SAITA, E.; ERZEGOVSI, S.; MARTONI, R.M.; VERCELLINI, P. Personality in women with endometriosis: temperament and character dimensions and pelvic pain. **Human Reproduction**, v.31, n.7, p.1515–1521, jul. 2016.

FONTENELE, E.G.P.; MARTINS, M.R.A.; QUIDUTE, A.R.P. et al. Contaminantes ambientais e interferentes endócrinos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.54, n.1, p.6-16, 2010.

FOURQUET, J.; GAO, X.; ZAVALA, D.; ORENGO, J.C.; ABAC, S.; et al. Patients' report on how endometriosis affects health, work, and daily life. **Fertility and Sterility**, v.93, n.7, p.2424–2428, maio 2010.

GAMA, M.C.S. Avaliação de duas formulações para o diagnóstico por imagem da endometriose utilizando anticorpo anti VEGF-A (Bevacizumabe) radiomarcado. 2015. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia Nuclear) – Instituto de Engenharia Nuclear, Brasília, 2015.

GUR, A.; CEYIK, R.; SARAC, A.J.; COLPAN, L.; EM, S. Hypothalamic-pituitary-gonadal axis and cortisol in young women with primary fibromyalgia: the potential roles of depression, fatigue, and sleep disturbance in the occurrence of hypocortisolism. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v.63, n.11, p. 1504–1506, nov. 2004.

HANNIBAL, K. E.; BISHOP, M. D. Chronic stress, cortisol dysfunction, and pain: a psychoneuroendocrine rationale for stress management in pain rehabilitation. **Physical Therapy**, v.94, n.12, p.1816–1825, dez. 2014.

HOLSBOER, F. The corticosteroid receptor hypothesis of depression. **Neuropsychopharmacology**, v. 23, n. 5, p. 477–501, nov. 2000.

JANSSEN, E. B.; RIJKERS, A.C.; HOPPENBROUWERS, K.; MEULEMAN, C.; D’HOOGHE, T.M. Prevalence of endometriosis diagnosed by laparoscopy in adolescents with dysmenorrhea or chronic pelvic pain: a systematic review. **Human Reproduction Update**, v. 19, n. 5, p.570–582, sep./oct. 2013.

JIA, S.Z.; LENG, J.H.; SUN, P.R.; LANG, J.H. Prevalence and associated factors of female sexual dysfunction in women with endometriosis. **Obstetrics & Gynecology**, v.121, n.3, p.601-606, 2013.

KAMERGORODSKY, G.; RIBEIRO, P.A.A.; GALVÃO, M.A.L.; ABRÃO, M.S.; LEMOS, N.B.; DONALDIO, N.; AOKI, T. Avaliação da classificação histológica da endometriose observada em implantes de mulheres portadoras de endometriose pélvica superficial e profunda. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.29, n.11, p.568-574, 2007.

KELLER, J.; GOMEZ, R.; WILLIAMS, G.; LEMBKE, A.; LAZZERONI, L.; MURPHY JR., G.M.; SCHATZBERG, A.F. HPA axis in major depression: cortisol, clinical symptomatology and genetic variation predict cognition. **Molecular Psychiatry**, v. 22, n.4, p. 527–536, Abr. 2017.

KOOLHAAS, J. M.; DE BOER, S.F.; DE RUTTER, A.J.; MEERLO, P.; SGOIFO, A. Social stress in rats and mice. **Acta Physiologica Scandinavica. Supplementum**, v.640, p.69–72, 1997.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, E.J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings**, v.18, p.412-418, 1959.

KUMAR, V.; ABBAS, A.; ASTER, J. **Robbins & Cotran, patologia: bases patológicas das doenças**. Tradução de Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 9.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

LAGANÀ, A.; CONDEMI, I.; RETTO, G.; MUSCATELLO, M.; BRUNO, A.; ZOCCALI, R. et al. Analysis of psychopathological comorbidity behind the common symptoms and signs of endometriosis. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v.194, p.30-33, nov. 2015.

LAGANA, A.S.; La ROSA, V.L.; RAPISARDA, A.M.C.; VALENTI, G.; SAPIA, F. et al. Anxiety and depression in patients with endometriosis: impact and management challenges. **International Journal of Women’s Health**, v.16, n.9, p.323-330, 2017.

- LATREMOLIERE, A.; WOOLF, C. J. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. **The Journal of Pain**, v.10, n.9, p.895–926, set. 2009.
- LEE, B.-H.; KIM, Y.-K. The roles of BDNF in the pathophysiology of major depression and in antidepressant treatment. **Psychiatry Investigation**, v. 7, n. 4, p.231–235, dez. 2010.
- LEWTER, L.A.; FISHER, J.L.; SIEMIAN, J.N.; METHUKU, K.R.; POE, M.M.; COOK, J.M.; LI, J.X. Antinociceptive effects of a novel  $\alpha 2/\alpha 3$ -subtype selective GABA<sub>A</sub> receptor positive allosteric modulator. **ACS Chemical Neuroscience**, v.8, n.6, p.1305–1312, jun. 2017.
- LI, T.; MAMILLAPALLI, R.; DING, S.; CHANG, H.; LIU, Z.W.; GAO, X.B.; TAYLOR, H.S. Endometriosis alters brain electro-physiology, gene expression and increased pain sensitization, anxiety, and depression in female mice. **Biology of Reproduction**, v.99, n.2, p.349-359, Aug. 2018.
- LIMA, A. P.; MOURA, M. D.; ROSA E SILVA, A. A. M. Prolactin and cortisol levels in women with endometriosis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.39, n.8, p. 1121–1127, ago. 2006.
- LIMA, C.N.C. **Potencial convulsivante de carbapenêmicos em diferentes modelos experimentais de convulsão**: avaliação comparativa, comportamental e neuroquímica. 2011. 182f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.
- LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v.92, n 2, p.180-185, jan. 1987.
- LIU, M.; LIU, X.; GUO, S.W. Valproic acid and progesterin inhibit lesion growth and reduce hyperalgesia in experimentally induced endometriosis in rats. **Reproductive Sciences**, v.19, n.4, p.360–373, abr. 2012.
- LOPES, A.C. (Org.). **Diagnóstico e tratamento**. Barueri, SP: Manole, 2007. V.3.
- LORENÇATTO, C.; NAVARRO, M.J.; PINTO, C.L.B.; PETTA, C.A. Evolução e frequência de depressão em pacientes com endometriose e dor pélvica. **Revista da Associação Médica Brasileira**, 2002; v.48, n.3, p.217-221, 2002.
- MAES, M.; GALECKI, P.; CHANG, Y.S.; BERK, M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 35, n.3, p.676–692, abr. 2011.
- MARINO, F.F.L.O. **Aspectos da sexualidade em mulheres com endometriose**. 2016. 106f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.
- MARQUI, A.B.T. Endometriose: do diagnóstico ao tratamento. **Revista de Enfermagem e Atenção à Saúde**, v.3, n.2, p.97-105, jul./dez. 2014.

MATTINGLY, D. A simple fluorometric method for the estimation of free 11-hydroxycorticoids in human plasma. **Journal of Clinical Pathology**, v.15, n.4, p.374–379, Jul. 1962.

MAZEREEUW, G.; HERMANN, N.; ANDREAZZA, A.; KHAN, M.; LANCTOT, K.L. A meta-analysis of lipid peroxidation markers in major depression. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 11, p. 2479–2491, 2015.

MEDEIROS, F. das C. **Envolvimento do 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.** 2005. 180f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

MELLO, B. S. F.; CHAVES FILHO, A.J.M.; CUSTÓDIO, C.S.; CORDEIRO, R.C.; MIYALIMA, F.; SOUSA, F.C.F. et al. Sex influences in behavior and brain inflammatory and oxidative alterations in mice submitted to lipopolysaccharide-induced inflammatory model of depression. **Journal of Neuroimmunology**, v.320, p. 133–142, jul. 2018.

MENDONÇA, J.V.; OLIVEIRA, M.A.P. Desempenho da ultrassonografia transvaginal no diagnóstico da endometriose infiltrativa profunda de compartimento posterior. **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v.11, n.1, p.85-91, jan./mar. 2012.

MONSIVAIS, D.; DYSON, M.T.; YIN, P.; NAVARRO, A.; COON, J.S.; PAVONE, M.E.; BULUN, S.E. Estrogen receptor  $\beta$  regulates endometriotic cell survival through serum and glucocorticoid-regulated kinase activation. **Fertility and Sterility**, v.105, p.1266–1273, 2016.

MORETTI, M.; COLLA, A.; OLIVEIRA, B.; SANTOS, D.B.; BUDNI, J.; FREITAS, A.F.; FARINA, M.; SEVERO RODRIGUES, A.L. Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. **Journal of Psychiatric Research**, v. 46, n. 3, p.331–340, mar. 2012.

MOWERS, E. L.; LIM, C.S.; SKINNER, B.; MAHNERT, N.; KAMDAR, N.; MORGAN, D.M. Prevalence of endometriosis during abdominal or laparoscopic hysterectomy for chronic pelvic pain. **Obstetrics & Gynecology**, v.127, n.6, p.1045-1053, jun. 2016.

MURAKAMI, S.; IMBE, H.; MORIKAWA, Y.; RUBO, C.; SENBA, E. Chronic stress, as well as acute stress, reduces BDNF mRNA expression in the rat hippocampus but less robustly. **Neuroscience Research**, v.53, n.2, p.129–139, out. 2005.

MUTSO, A. A.; PETRE, B.; HUANG, L.; BALIKI, M.N.; TORBEY, S.; HERMANN, K.M.; et al. Reorganization of hippocampal functional connectivity with transition to chronic back pain. **Journal of Neurophysiology**, v.111, n.5, p.1065–1076, mar. 2014.

NÁCUL, A.P.; SPRITZER, P.M. Aspectos atuais do diagnóstico e tratamento da endometriose. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.32, n.6, p.298-307, 2010.

NASCIMENTO, C.S.L. **Psicopatologia e qualidade de vida na endometriose**. 2017. 146f. Tese (Doutorado em Psicologia) – Universidade da Beira Interior, Covilhã/Portugal, 2017.

NAVARRO, P.A.A.S.; BARCELOS, I.D.S.; SILVA, J.C.R. Tratamento da endometriose. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v.28, n.10, p.612-623, out. 2006.

NGÔ, C.; CHPEREAU, C.; NICCO, C.; WEILL, B.; CHAPRON, C.; BATTEUX, F. Reactive oxygen species controls endometriosis progression. **The American Journal of Pathology**, v. 175, n. 1, p.225–234, jul. 2009.

NNOAHAM, K. E.; HUMMELSHOJ, L.; WEBSTER, P.; D’HOOGHE, T. et al. Impact of endometriosis on quality of life and work productivity: a multicenter study across ten countries. **Fertility and Sterility**, v. 96, n. 2, p. 366–373, ago. 2011.

NOGUEIRA, A.A.; REIS, F.J.C.; POLI NETO, O.B. Abordagem da dor pélvica crônica em mulheres. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v.28, n.12, p.733-740, dez. 2006.

O’MAHONY, C. M.; CLARKE, G.; GIBNEY, S.; DINAN, T.G.; CRYAN, J.F. Strain differences in the neurochemical response to chronic restraint stress in the rat: relevance to depression. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.97, n.4, p.690–699, fev. 2011.

OHKAWA, H.; OHISHI, H.; YAGI, K. Assay for lipid peroxyde in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, Japão, v.95, p.351358, 1979.

OTAKI, N.; CHIKAZAWA, M.; NAGAE, R.; SHIMOZY, Y.; SHIBATA, T.; ITO, S.; et al. Identification of a lipid peroxidation product as the source of oxidation-specific epitopes recognized by anti-DNA autoantibodies. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 44, p. 33834–33842, out. 2010.

PATTISON, D. I.; DAVIES, M. J.; HAWKINS, C. L. Reactions and reactivity of myeloperoxidase-derived oxidants: Differential biological effects of hypochlorous and hypothiocyanous acids. **Free Radical Research**, v. 46, n. 8, p. 975–995, ago. 2012.

PAYLOR, R.; SPENCER, C.M.; YUVA-PAYLOR, L.A.; PIEKE-DAHI, S. The use of behavioral test batteries, II: effect of test interval. **Physiology and Behavior**, v.87, n.1, p.95-102, jan. 2006.

PELCH, K. E.; SHARPE-TIMMS, K. L.; NAGEL, S. C. Mouse model of surgically-induced endometriosis by auto-transplantation of uterine tissue. **Journal of Visualized Experiments**, v.6, n.59, p.3396, Jan. 2012.

- PEREIRA, F.E.X.G. **Desenvolvimento e validação de um modelo de endometriose subcutânea em ratas para estudo de prováveis mecanismos fisiopatológicos e do efeito de drogas.** 2013. 78f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médico-Cirúrgicas) – Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.
- PLUCHINO, N.; WENGER, J.M.; PETIGNAT, P.; TAL, R.; BOLMONT, M.; TAYLOR, H.S.; BIANCHI-DEMICHELI, F. Sexual function in endometriosis patients and their partners: effect of the disease and consequences of treatment. **Human Reproduction Update**, v.22, n.6, p.762-774, Nov. 2016.
- PODGAEC, S. **Endometriose.** Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. 279p.
- POPE, C.J.; SHARMA, V.; SHARMA, S.; MAZMANIAN, D. A systematic review of the Association Between Psychiatric Disturbances and Endometriosis. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada**, v.37, n.11, p.1006-1015, Nov. 2015.
- PORFÍRIO, G.P.; IRIE, G.R.F.; BATISTA, L.C.; MARQUI, A.B.T. O papel da dieta na etiologia da endometriose. **BRASPEN J.**, v.32, n.2, p.183-188, 2017.
- PORSOLT, R. D.; LePICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, London, v.266, n.5604, p.730- 732, 1977.
- RÉUS, G. Z.; ABELAIRA, H.M.; MACIEL, A.L.; SANTOS, M.A.; CARLESSI, A.S. et al. Minocycline protects against oxidative damage and alters energy metabolism parameters in the brain of rats subjected to chronic mild stress. **Metabolic Brain Disease**, v.30, n.2, p.545–553, abr. 2015.
- RIBAS, V.; GARCÍA-RUIZ, C.; FERNÁNDEZ-CHECA, J. C. Glutathione and mitochondria. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5, p. 151, jul. 2014.
- SANTOS, D.B.; SOARES, I.A.; FAVERO FILHO, L.A.; FERNANDES, M.D.B.; MORESCO, N.M. et al. **Uma abordagem integrada da endometriose.** Cruz das Almas/BA: UFRB, 2012. 120p.
- SANTOS, M. Endometriose no Brasil: o retrato da doença que atinge mais de seis milhões de mulheres. **Revista da Sociedade Brasileira de Endometriose**, v.16, n.4, p. 34-36, out./nov./dez. 2014.
- SCUTIERO, G.; IANNONE, P.; BERNARDI, G.; BONACCORSI, G.; SPADARO, S.; VOLTA, C.A.; GRECO, P.; NAPPI, L. Oxidative stress and endometriosis: a systematic review of the literature. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p.1-7, 2017.
- SEDLAK, J.; HANUS, L. Changes of glutathione and protein bound SH-groups concentration in rat adrenals under acute and repeated stress. **Endocrinol Exp**, v.16, n.2, n.103-109, 1982.
- SEROVA, L.I.; HARRIS, H.A.; MAHARJAN, S.; SABBAN, E.L. Modulation of responses to stress by estradiol benzoate and selective estrogen receptor agonists. **Journal of Endocrinology**, v.205, n.3, p.253–262, jun. 2010.

- SILVA, I.D.C.; HERMOSO, P.V.; NAKATANI, C.H.; RAMOS, E.R.P. Aspectos fisiopatológicos, diagnósticos e terapêuticos da endometriose na atenção farmacêutica: um estudo de revisão. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 6, n. 1, p.99-108, jan./abr. 2013.
- SILVA, J.C.R.; FORTUNATO, G.G.; ZANARDI, J.; MEOLA, J.; NOGUEIRA, A.A. Effect of cabergoline in experiental endometriosis in rats. **Journal of Minimally Invasive Gynecology**, v.22, n.6S, p.S168, nov./dez. 2015.
- SILVA, M.P.C.; MEDEIROS, B.Q.; MARQUI, A.B.T. Depressão e ansiedade em mulheres com endometriose: uma revisão crítica da literatura. **Interação Psicológica**, Curitiba, v.20, n.2, p.226-233, maio/ago. 2016.
- SIMÕES, F. I. W.; HASHIMOTO, F. Mulher, mercado de trabalho e as configurações familiares do século XX. **Revista Vozes dos Vales: Publicações Acadêmicas**, v.1, n.2, p.1-25, 2012.
- SIMSEK, Y.; GUI, M.; YILMAZ, E.; OZEROL, I.H.; OZEROL, E.; PARLAKPINAR, H. Atorvastatin exerts anti-nociceptive activity and decreases serum levels of high-sensitivity C-reactive protein and tumor necrosis factor- $\alpha$  in a rat endometriosis model. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v.290, n.5, p.999-1006, nov. 2014.
- SMORGICK, N.; MARSH, C.A.; As-SANIE, S.; SMITH, Y.R.; QUINT, E.H. Prevalence of pain syndromes, mood conditions, and asthma in adolescents and young women with endometriosis. **Journal of Pediatric & Adolescent Gynecology**, v.26, n.3, p.171-175, Jun 2013.
- SONG, J.; KANG, S.M.; LEE, W.T.; PARK, K.A.; LEE, K.M. et al. Glutathione protects brain endothelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidative stress by increasing nrf2 expression. **Experimental Neurobiology**, v.23, n.1, p.93–103, mar. 2014.
- SOUSA, T.R.; QUEIROZ, A.P.; BARON, R.A.; SPERANDIO, F.F. Prevalência dos sintomas da endometriose: revisão sistemática. **Revista CES Medicina**, v.29, n.2, p.211-226, jul/dez. 2015.
- SOUZA, C. A.; OLIVEIRA, L.M.; SCHEFFEL, C.; GENRO, V.K.; ROSA, V.; CHAVES, M.F.; CUNHA FILHO, J.S. Quality of life associated to chronic pelvic pain is independent of endometriosis diagnosis-a cross-sectional survey. **Health and Quality of Life Outcomes**, v.9, n.1, p.41, jun. 2011.
- SUBTIL, S.; TORGAL, I.; DIAS, M. Apoptose e proliferação celular na endometriose: estado da arte. **Acta Obstétrica e Ginecológica Portuguesa**, v.10, n.1, p.34-42, 2016.
- SULTANA, A.; AWAN, A.; TEHSEEN, I. Sanitation practices among food handlers working in street restaurants in rawalpindi. **Pakistan. Rawal Medical Journal**, Pakistan, v. 38, n. 4, p. 425-427, 2013.
- TALAROWSKA, M.; SZEMRAJ, J.; GAŁECKI, P. Myeloperoxidase gene expression and cognitive functions in depression. **Advances in Medical Sciences**, v.

60, n. 1, p. 1–5, mar. 2015.

TARIVERDIAN, N.; RÜCKE, M.; SZEKERES-BARTHO, J.; BLOIS, S.M.; KARPF, E.F. et al. Neuroendocrine circuitry and endometriosis: progesterone derivative dampens corticotrophin-releasing hormone-induced inflammation by peritoneal cells in vitro. **Journal of Molecular Medicine**, v.88, n.3, p.267–278, mar. 2010.

TEIXEIRA, A.C. **Novas contribuições da ultrassonografia transvaginal no diagnóstico da endometriose ovariana**. 2012. 154f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

TIRADO-GONZALEZ, I.; BARRIENTOS, G.; TARIVERDIAN, N.; ARCK, P.C.; GARCIA, M.; KLAPP, B.F.; BLOIS, S.M. Endometriosis research: animal models for the study of complex disease. **Journal of Reproductive Immunology**, v.86, n.2, p.141–147, Nov. 2010.

TRIPOLI, T.M.; SATO, H.; SARTORI, M.G.; ARAUJO, F.F.; GIRÃO, M.J.; SCHOR, E. Evaluation of quality of life and sexual satisfaction in women suffering from chronic pelvic pain with or without endometriosis. **Journal of Sexual Medicine**, v.8, n.2, p.497-503, Feb. 2011.

TÚNEZ, J.I.; CAPPOZZO, H.L.; NARDELLI, M.; CASSINI, M.H. Population genetic structure and historical population dynamics of the South American sea lion, *Otaria flavescens*, in north-central Patagonia. **Genetica**, v.138, p.831-841, 2010.

VACCARINO, V.; McCLURE, C.; JOHNSON, D.; SHEPS, D. S.; BITTNER, V.; RUTLEDGE, T.; et al. Depression, metabolic syndrome and cardiovascular disease. **Psychosomatic Medicine**, v.70, n.1, p.40-48, 2008.

VERNON, M.W.; WILSON, E.A. Studies on the surgical inductions of endometriosis in the rats. **Fertility and Sterility**, v.44, n.5, p.684-687, 1985.

VISCOMI, F.A.; DIAS, R.; LUCA, L.; FRANCO, M.F.; IHLENFELD, M.F.K. Correlação dos aspectos laparoscópicos com as alterações histológicas glandulares das lesões endometrióticas peritoneais. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v.50, n.3, p.344-348, jul./set. 2004.

WALKER, A. K.; KAVELAARS, A.; HEIJNEN, C.J.; DANTZER, R.. Neuroinflammation and comorbidity of pain and depression. **Pharmacological Reviews**, v.66, n.1, p.80–101, jan. 2014.

WILLNER, P. The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. **Neurobiology of Stress**, v.6, p.78–93, fev. 2017.

XU, B.; GOTTSCHALK, W.; CHOW, A.; WILSON, R.I.; SCHNELL, E.; ZANG, K. et al. The role of brain-derived neurotrophic factor receptors in the mature hippocampus: modulation of long-term potentiation through a presynaptic mechanism involving TrkB. **The Journal of Neuroscience**, v.20, n.18, p. 6888–6897, Sep. 2000.

ZANATTA, A.; ROCHA, A.M.; CARVALHO, F.M.; PEREIRA, R.M.; TAYLOR, H.S.; MOTTA, E.L.; BARACAT, E.C.; SERAFINI, P.C. The role of the

Hoxa10/HOXA10 gene in the etiology of endometriosis and its related infertility: a review. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.27, n.12, p.701-710, Dec. 2010.

ZOMER, M.T.; RIBEIRO, R.; TRIPPICIA, C.H.; CAVALCANTI, T.C.S.; HAYASHI, R.M.; KONDO, W. Correlação entre os níveis de Ca-125 séricos e os achados cirúrgicos em mulheres com sintomas sugestivos de endometriose. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v.35, n.6, p.262-267, jun. 2013.

**ANEXO A – Certificado de Aprovação do Projeto.**



Universidade Federal do Ceará  
 Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA  
 Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
 Cep: 60430-270 Fortaleza-CE

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto *intitulado* **"AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL E NEUROQUÍMICA DE RATAS (*RATTUS NORVEGICUS* LINHAGEM WISTAR) SUBMETIDOS AO MODELO EXPERIMENTAL DE ENDOMETRIOSE"**, protocolo nº 35/2017, sob responsabilidade do Prof. Dr. Francisco das Chagas Medeiro, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de nº8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 17 de agosto de 2017.

Vigência do projeto	15/04/2017 a 15/04/2018
Espécie/Linhagem	Rattus norvegicus Wistar
Nº de Animais	60
Peso/Idade	150 a 180g / 3 meses
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central da UFC

Fortaleza, 18 de agosto de 2017

*Alexandre Havt Bindá*

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá  
 Coordenador do CEUA - UFC

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
 ALEXANDRE HAVT BINDÁ  
 COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E USO COM  
 ANIMAIS - CEUA/UFC - MATRÍCULA SIAPE: 100002