

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE SAÚDE MATERNO-INFANTIL
MESTRADO EM TOCGINECOLOGIA**

JOSÉ ANANIAS VASCONCELOS NETO

**PADRONIZAÇÃO DE MODELO DE LIGADURA DA ARTÉRIA UTERINA EM
RATAS NÃO-GRÁVIDAS, SEUS EFEITOS SOBRE A ISQUEMIA UTERINA
DIREITA E SUAS REPERCUSSÕES REPRODUTIVAS**

**FORTALEZA
2009**

JOSÉ ANANIAS VASCONCELOS NETO

**PADRONIZAÇÃO DE MODELO DE LIGADURA DA ARTÉRIA UTERINA EM
RATAS NÃO-GRÁVIDAS, SEUS EFEITOS SOBRE A ISQUEMIA UTERINA
DIREITA E SUAS REPERCUSSÕES REPRODUTIVAS**

Dissertação submetida à do Curso de Pós-Graduação
em Tocoginecologia, da Universidade Federal do
Ceará como requisito parcial para obtenção do grau
de Mestre em Tocoginecologia.

Orientador: Prof. Dr. Francisco das Chagas Medeiros

**FORTALEZA
2009**

JOSÉ ANANIAS VASCONCELOS NETO

**PADRONIZAÇÃO DO MODELO DE LIGADURA DA ARTÉRIA UTERINA EM
RATAS NÃO-GRÁVIDAS, SEUS EFEITOS SOBRE A ISQUEMIA UTERINA
DIREITA E SUAS REPERCUSSÕES REPRODUTIVAS**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Tocoginecologia.

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

Prof. Dalgimar Beserra de Menezes
Universidade Federal do Ceará - UFC
Livre Docente pela Universidade Estadual do Ceará - UECE

Prof. Dr. José Eleutério Júnior
Universidade Federal do Ceará - UFC

À minha esposa, Camila Vasconcelos

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, ao Senhor Deus, que pela sua misericórdia, graça e amor me arregimentou e me capacitou a fim de que eu possa exercer os planos que Ele tem para mim! Sei que em Suas mãos está o engrandecer e o dar força a tudo (I Crônicas 29. 12), por isso suportei esta jornada, afinal de contas, sem Ele nada podemos fazer (João 15, 5)! Obrigado, Senhor!

À minha amada esposa, Camila Vasconcelos, minha grande incentivadora, e auxiliadora idônea. Mesmo em momentos em que o desfalecimento queria me dominar, a sua compreensão, sabedoria e longanimidade arrebatavam a minha alma cansada, e seu amor, que destila ininterruptamente sobre mim, restabelecia meu corpo, renovava minha mente, transformando-me em um novo homem, todos os dias, vencedor de todas as batalhas.

À toda minha família, na qual encontro refúgio, apoio e amor incondicional. Agradeço à minha família em Cristo, na pessoa do Pastor Nélio Filho, por suas orações, exortações e seu apoio constantes.

Agradecimentos ao meu orientador, Prof. Medeiros, por ter aceitado o desafio de orientar um homem inexperiente em pesquisas científicas. Mesmo com seu tempo escasso, dedicou-se a este trabalho. Sua mente, privilegiada pelo abundante conhecimento, conduziu-me, de forma precisa, em um misto de orientações, admoestações e elogios que produziu grandes frutos em mim.

Prof. Dalgimar Beserra de Menezes, lembro-me das muitas tardes que passamos no Departamento de Patologia da UFC, coletando os dados. As paradinhas para tomar café (mesmo que fosse uma bala de café), o choque produzido pelo microscópio antigo, os artigos que pesquisávamos na internet, as conversas engraçadas do passado e do presente. Aprendi e cresci muito. Obrigado pela paciência e pela disponibilidade constantes.

À Dra Angelina e ao Dr Eleutério pela participação fundamental no trabalho, disponibilidade e atenção. Para mim foi uma grande honra tê-los como membros da banca avaliadora deste trabalho. Possuo grande admiração por ambos, que são verdadeiros arquétipos, em quem eu me espelho.

Ao Dr. Luiz Porto, por ceder gentilmente espaço no laboratório Saul Goldenberg para a realização das cirurgias experimentais. Este agradecimento se estende à secretária do GEEON, Rocilda, pela sua solicitude invariável.

Às minhas chefes Liana Rabelo (Chefe do setor de Ginecologia do HGF) e Rosilânia Magalhães (Coordenadora da Unidade Básica de Saúde Aída Santos e Silva) pela compreensão da grande importância do mestrado para mim, e pelo apoio absoluto que, sem o qual, não teria conseguido finalizar este sonho.

Aos Professores Ximenes e Paulo Cesar, pela disposição e dedicação no ensino da estatística.

Às acadêmicas de medicina Krasnalhia Lívia, Ilze, Luciana, Lívia e Luany pela contribuição essencial na coleta dos dados.

À Iranilde, Gracilene e Mônica, funcionárias do Departamento de Ginecologia, pela atenção, cuidado e amor demonstrados.

Ao Bento, pelo esmero no cuidado dos ratos e pela atenção e disponibilidade.

À Urânia pela sua contribuição fundamental na preparação das lâminas, sempre disposta a ajudar.

*“Não há sabedoria, nem inteligência,
nem conselho contra o SENHOR.”*

(Bíblia Sagrada, Provérbios 20:30)

RESUMO

A obstrução das artérias uterinas promove isquemia e/ou necrose no útero, no entanto não se conhece com que intensidade essas lesões ocorrem. Os objetivos deste estudo são: descrever e padronizar uma técnica de ligadura da artéria uterina (LAU) direita em ratas não grávidas e avaliar os efeitos deste modelo em úteros e ovários de ratas. Estudo experimental, utilizando 64 ratos, 48 fêmeas e 16 machos (*Rattus norvegicus*, variedade albina) maduros, de fertilidade comprovada. As ratas foram alocadas aleatoriamente em 8 grupos, de seis indivíduos. Quatro grupos foram submetidos à técnica de LAU direita e sacrificados nos dias 1, 7, 14 e 21 após o procedimento. Outros 3 grupos foram acasalados nos dias 1, 7 e 14 após a LAU, e comparados com o grupo controle quanto à fertilidade. Após o sacrifício, eram retirados, para análise histopatológica, os ovários, e os hemi-úteros. Realizou-se análise histológica, que avaliou o útero quanto à congestão, hemorragia, edema intersticial e perda de coesão celular através de um escore que varia de 0 a 3. Os ovários foram avaliados de acordo com o número de folículos em desenvolvimento e corpos lúteos. Para a análise estatística foi utilizado o software SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) versão 13.0, $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. O projeto de pesquisa foi enviado para a Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará, com protocolo de número 90/08. O modelo da técnica foi realizado em ratas não-grávidas utilizando a ligadura na porção inferior da artéria uterina direita, mantendo o hemi-útero esquerdo (HUE) como controle. Em nenhum momento dos dias de sacrifício, após a LAU (1, 7, 14 e 21 dias), houve diferença entre os escores histológicos de isquemia dos hemi-úteros direitos (HUD) distais e proximais ($p > 0,05$). Os escores histológicos de isquemia dos hemi-úteros direitos no decorrer do tempo aumentaram substancialmente a partir do 7º dia ($p=0,003$). Da mesma maneira ocorreu com os hemi-úteros esquerdos ($p=0,001$). A única diferença significativa observada na comparação dos escores dos hemi-úteros direito e esquerdo ocorreu no 1º dia após LAU ($p=0,026$), à custa de congestão. Os ovários esquerdos não apresentaram alterações no número de folículos e de corpos lúteos após LAU e, os ovários direitos apresentaram número de folículos e corpos lúteos semelhante ao controle a partir do 21º dia da LAU. A percentagem de ratas grávidas que foram submetidas a LAU foi de 44,4%, comparado com 100% das ratas controle que engravidaram ($p=0,024$). Observou-se ainda uma redução na média do número de fetos por rata ($p=0,029$). Pode-se concluir que o modelo estabelecido foi efetivo e de fácil reprodutibilidade, bem como as alterações histológicas encontradas no útero ocorrem de forma discreta. Em relação a função ovulatória, pode-se dizer que o número de folículos e corpos lúteos dos ovários direitos, a partir do 21º dia, permaneceram semelhantes aos dos esquerdos (controle). A fertilidade, porém, mostrou-se reduzida após o estabelecimento desta técnica.

Descritores: ratos; fertilidade; modelos animais; isquemia; útero

ABSTRACT

The obstruction of the uterine arteries promotes ischemia or necrosis in the uterus. However it is not known how strongly these injuries occur. The objectives of this study are to describe and standardize a technique of right uterine artery ligation (UAL) in non-pregnant rats and to evaluate the effects of this model in the uteri and ovaries of female rats. An experimental study using 64 rats, 48 females and 16 males (*Rattus norvegicus*, albino variety) mature, with proven fertility. The rats were randomly allocated into 8 groups of six individuals. Four groups were subjected to the technique of right UAL and sacrificed on days 1, 7, 14 and 21 after the procedure. Other 3 groups were mated on days 1, 7 and 14 after the UAL, and compared with the control group regarding fertility. After sacrifice, ovaries and the hemi-uteri, were removed for histological analysis which was carried out histological analysis, which evaluated the uteri and the congestion, hemorrhage, interstitial edema and loss of cell cohesion through a score ranging from 0 to 3. Ovaries were evaluated according to the number of follicles and corpora lutea. For statistical analysis we used SPSS software (Statistical Package for Social Sciences) version 13.0, $p < 0.05$ was considered statistically significant. The research project was submitted to the Ethics Committee on Animal Research (ECAR) Federal University of Ceará, under the number 90/08. The model of the technique was performed in non-pregnant rats using ligation in the lower portion of the right uterine artery, keeping the left hemi-uteri (LHU) as control. At no time during periods of ischemia established (1, 7, 14 and 21 days) there was any difference between the histological scores of ischemia of the right hemi-uteri (RHU) distal and proximal ($p > 0.05$). The histological scores of ischemia of the right hemi-uteri over time increased significantly from day 7 ($p = 0.003$), just as occurred with the left hemi-uteri ($p = 0.001$). The only significant difference observed when comparing the scores of the right hemi-uteri and left occurred on day 1 after UAL ($p = 0.026$), due to congestion. The left ovary showed no changes in the number of follicles and corpora lutea after UAL, and the right ovary showed a number of follicles and corpora lutea similar to control from the 21th day of UAL. The percentage of pregnant rats that were subjected to ischemia was 44.4%, compared with 100% of control rats that became pregnant ($p = 0.024$). There was also a reduction in the average number of fetuses per mother ($p = 0.029$). It can be concluded that the model established was effective and highly reproducible, and histological changes found in the uteri are mild. As to ovulatory function, one can say that the number of follicles and corpora lutea of the right ovaries, after 21 days, remained similar to the left (control). Fertility, however, was reduced after the establishment of this technique.

Keywords: rats; fertility; models, animal; ischemia; uterus

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	Suprimento sanguíneo útero-placentário na rata grávida após a LAU unilateral _____	21
FIGURA 2.	Infra-estrutura do centro cirúrgico _____	33
FIGURA 3.	Gaiolas de polipropileno que mantinham as ratas _____	34
FIGURA 4.	Operacionalização dos dias de sacrifício após a LAU _____	35
FIGURA 5.	Operacionalização dos dias de acasalamento no grupo controle e nos grupos teste após a LAU _____	36
FIGURAS 6 - 8.	Descrição da técnica de LAU segundo modelo proposto ____	40 - 42
FIGURA 9.	Comparação das médias dos escores de isquemia entre HUDD e HUDP após a LAU direita _____	43
FIGURA 10.	Médias dos escores de isquemia nos HUD no decorrer do tempo _____	45
FIGURA 11.	Médias dos escores de isquemia dos HUE no decorrer do tempo _____	46
FIGURA 12.	Comparação das médias dos escores de isquemia entre os HUE e HUD _____	47
FIGURA 13.	Médias dos escores das alterações histopatológicas isoladas nos HUE no decorrer do tempo _____	49
FIGURA 14.	Fotomicrografia mostrando congestão grau 2 no útero ____	50
FIGURA 15.	Médias dos escores de isquemia segundo as alterações histopatológicas isoladas nos HUD no decorrer do tempo ____	50
FIGURA 16.	Fotomicrografia mostrando congestão grau 1 no útero ____	52
FIGURA 17.	Comparação das médias dos escores de congestão entre os HUE e HUD _____	52
FIGURA 18.	Fotomicrografia mostrando congestão e edema grau 1 no útero _____	53
FIGURA 19.	Comparação das médias dos escores de edema entre os HUE e HUD _____	54

FIGURA 20.	Fotomicrografia mostrando hemorragia grau 2 no útero _____	54
FIGURA 21.	Comparação das médias dos escores de hemorragia entre os HUE e HUD _____	55
FIGURA 22.	Fotomicrografia mostrando congestão, edema e perda de coesão grau 1 no útero _____	56
FIGURA 23.	Comparação das médias dos escores de perda de coesão celular entre os HUE e HUD _____	57
FIGURA 24.	Avaliação da fertilidade através da porcentagem das ratas grávidas após a LAU direita _____	58
FIGURA 25.	Avaliação da fertilidade através da média do número de fetos após a LAU direita _____	59
FIGURA 26.	Fotomicrografia mostrando corpos lúteos e folículos _____	60
FIGURA 27.	Médias dos números de folículos e corpos lúteos dos ovários esquerdos no decorrer do tempo _____	61
FIGURA 28.	Médias dos números de folículos e corpos lúteos dos ovários direitos no decorrer do tempo _____	62
FIGURA 29.	Comparação das médias dos folículos ovarianos direitos e esquerdos no decorrer do tempo _____	63
FIGURA 30.	Comparação das médias dos corpos lúteos ovarianos direitos e esquerdos no decorrer do tempo _____	64
FIGURA 31.	Vascularização do útero e do ovário em mulheres _____	68
FIGURA 32.	Vascularização do útero e do ovário em ratas _____	68

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	Comparação das médias dos escores de isquemia entre HUDD e HUDP após a LAU direita _____	43
TABELA 2.	Médias dos escores de isquemia nos HUD no decorrer do tempo _____	45
TABELA 3.	Médias dos escores de isquemia dos HUE no decorrer do tempo _____	46
TABELA 4.	Comparação das médias dos escores de isquemia entre os HUE e HUD _____	47
TABELA 5.	Médias dos escores das alterações histopatológicas isoladas nos HUE no decorrer do tempo _____	48
TABELA 6.	Médias dos escores de isquemia segundo as alterações histopatológicas isoladas nos HUD no decorrer do tempo ____	49
TABELA 7.	Comparação das médias dos escores de congestão entre os HUE e HUD _____	51
TABELA 8.	Comparação das médias dos escores de edema entre os HUE e HUD _____	53
TABELA 9.	Comparação das médias dos escores de hemorragia entre os HUE e HUD _____	55
TABELA 10.	Comparação das médias dos escores de perda de coesão celular entre os HUE e HUD _____	57
TABELA 11.	Avaliação da fertilidade através da porcentagem das ratas grávidas após a LAU direita _____	58
TABELA 12.	Avaliação da fertilidade através da média do número de fetos após a LAU direita _____	59
TABELA 13.	Médias dos números de folículos e corpos lúteos dos ovários esquerdos no decorrer do tempo _____	60
TABELA 14.	Médias dos números de folículos e corpos lúteos dos ovários direitos no decorrer do tempo _____	61

TABELA 15.	Comparação das médias dos folículos ovarianos direitos e esquerdos no decorrer do tempo _____	62
TABELA 16.	Comparação das médias dos corpos lúteos ovarianos direitos e esquerdos no decorrer do tempo _____	63

LISTA DE ABREVIATURAS

CEPA	Comissão de Ética em Pesquisa Animal
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CL	Corpos lúteos
EAU	Embolização das artérias uterinas
Epm	Erro padrão da média
ET-1	Endotelina - 1
FL	Folículos
GEEON	Grupo de Educação e Estudos Oncológicos
HE	Hematoxilina e eosina
HUD	Hemi-útero direito
HUDD	Hemi-útero direito distal
HUDP	Hemi-útero direito proximal
HUE	Hemi-útero esquerdo
IL-1	Interleucina - 1
IR	Isquemia-reperfusão
LAU	Ligadura da artéria uterina
LTB4	Leucotrieno B4
PAF	Fator de agregação plaquetária
RCIU	Restrição do crescimento fetal intra-uterino
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
TXA2	Tromboxano A2
UFC	Universidade Federal do Ceará

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	17
1.1	Histórico da Ligadura das Artérias Uterinas (LAU)	17
1.2	Isquemia e Reperusão	25
2.	OBJETIVOS	32
3.	MATERIAIS E MÉTODO	33
3.1	Tipo e local de estudo	33
3.2	Animais	34
3.3	Coleta de dados	35
3.3.1	Instrumentos de Coleta de dados	35
3.3.2	Operacionalização do estudo	35
3.3.3	Descrição do modelo de LAU direita em ratas não-grávidas	36
3.3.4	Avaliação histológica do útero quanto à congestão, edema, hemorragia e perda de coesão celular	37
3.3.5	Avaliação do número de folículos e corpos lúteos	38
3.3.6	Efeitos da LAU direita sobre a fertilidade de ratas	38
3.4	Tratamento estatístico e análise dos dados	39
3.5	Procedimentos éticos para realização do estudo	39
4.	RESULTADOS	40
4.1	Descrição da técnica de LAU segundo modelo proposto	40
4.2	Comparação das médias dos escores de isquemia entre HUDD e HUDP após a LAU direita	42
4.3	Médias dos escores de isquemia nos HUD no decorrer do tempo	44
4.4	Médias dos escores de isquemia dos HUE no decorrer do tempo	45

4.5	Comparação das médias dos escores de isquemia entre os HUE e HUD _____	46
4.6	Médias dos escores das alterações histopatológicas isoladas nos HUE no decorrer do tempo _____	48
4.7	Médias dos escores de isquemia segundo as alterações histopatológicas isoladas nos HUD no decorrer do tempo _____	49
4.8	Comparação das médias dos escores de congestão entre os HUE e HUD _____	51
4.9	Comparação das médias dos escores de edema entre os HUE e HUD _____	52
4.10	Comparação das médias dos escores de hemorragia entre os HUE e HUD _____	54
4.11	Comparação das médias dos escores de perda de coesão celular entre os HUE e HUD _____	56
4.12	Avaliação da fertilidade através da porcentagem das ratas grávidas após a LAU direita _____	58
4.13	Avaliação da fertilidade através da média do número de fetos após a LAU direita _____	59
4.14	Médias dos números de folículos e corpos lúteos dos ovários esquerdos no decorrer do tempo _____	60
4.15	Médias dos números de corpos lúteos e folículos dos ovários direitos no decorrer do tempo _____	61
4.16	Comparação das médias dos folículos ovarianos direitos e esquerdos no decorrer do tempo _____	62
4.17	Comparação das médias dos corpos lúteos ovarianos direitos e esquerdos no decorrer do tempo _____	63
5.	DISCUSSÃO _____	65
6.	CONCLUSÕES _____	80
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	81
	APÊNDICES _____	92

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico da Ligadura das artérias uterinas (LAU)

A técnica da ligadura das artérias uterinas nasceu a fim de solucionar os casos emergenciais de sangramentos puerperais intensos, eventos que causam preocupação constante aos obstetras (SERGENT *et al.*, 2004; HANSCH *et al.*, 1999; HEBISCH; HUCH, 2002). Na França, no período de 1995 a 1997, a hemorragia puerperal foi responsável por 11,4% das mortes maternas (NIZARD *et al.*, 2003). Nas nações industrializadas, 13 a 16% das mortes maternas são devidas às hemorragias obstétricas, a maior parte ocorrendo no pós-parto (PHILIPPE; D'OREYE; LEWIN, 1997). Na maioria dos casos são tratadas facilmente através de condutas básicas primárias, como massagens uterinas e administração de drogas uterotônicas. No entanto o sangramento pode se tornar refratário à terapêutica inicial e requerer ação mais invasiva (DRIFE, 1997; SENTILHES *et al.*, 2008; SERGENT *et al.*, 2004; TAMIZIAN; ARULKUMARAN, 2002).

Historicamente, o único tratamento para esses sangramentos resistentes era a histerectomia abdominal pós-parto (NIZARD *et al.*, 2003; DRIFE, 1997; PHILIPPE; D'OREYE; LEWIN, 1997; MASON, 1998; TAMIZIAN; ARULKUMARAN, 2002). A incidência da histerectomia de emergência varia de 0,2 a 1,5 em cada 100 partos (ENGELSEN; ALBRECHTSEN; IVERSEN, 2001), aumentando a taxa de morbimortalidade (WINGPRAWAT; CHITTACHAROEN; SUTHUTVORAVUT, 2005). Esse método radical realizado em casos raros e extremos, com fins de cessar a perda sanguínea e resguardar a vida da paciente cobra altos preços: a infertilidade da paciente, e muitas vezes, pela dificuldade cirúrgica de remover o segmento uterino inferior, probabilidade aumentada de ocorrer lesões de bexiga e ureter (HACKETHAL, 2008; ENGELSEN; ALBRECHTSEN; IVERSEN, 2001).

A técnica preferencial a ser realizada deveria ser menos agressiva possível a ponto de: a) manter o útero, b) evitar o aumento de estresse no

equilíbrio da homeostase e c) diminuir o tempo de realização para reduzir o uso de fatores de coagulação. (PHILIPPE; D'OREYE; LEWIN, 1997). Surgiram, então, novos procedimentos com o intuito de evitar a histerectomia: utilização de balões (inflados na cavidade endometrial tamponando os vasos do endométrio), suturas uterinas (B-Lynch), e duas classes de técnicas que promovem isquemia uterina, a embolização das artérias uterinas (EAU) e as ligaduras vasculares (HEBISCH; HUCH, 2002; SERGENT *et al.*, 2004; DOUMOUCTSIS, 2007; SENTILHES *et al.*, 2008; DRIFE, 1997; HACKETHAL, 2008; HANSCH *et al.*, 1999; TAMIZIAN; ARULKUMARAN, 2002).

A EAU, desempenhada em obstetrícia para interromper hemorragia puerperal, surgiu em 1979 (MASON, 1998; PELAGE; LIMOT, 2008) mencionada através de um relato de caso em que foi utilizada como tratamento de última linha para o sangramento incontrolável. Com o passar do tempo, este procedimento deixou de ser a última opção e se tornou um dos métodos preferidos por muitos autores que indicavam sua utilização logo após a falha das condutas básicas em hemorragia pós-parto (SERGENT *et al.*, 2004; DOUMOUCTSIS; PAPAGEORGHIU; ARULKUMARAN, 2007; PHILIPPE; D'OREYE; LEWIN, 1997).

Um dos principais motivos da preferência por este método é o fato de ser minimamente invasivo e não necessitar de laparotomia, diminuindo a perda sanguínea. No entanto, a EAU só se torna um procedimento ideal nos casos de hemorragia puerperal que se enquadra em três critérios: paciente com estabilidade hemodinâmica, disponibilidade de uma unidade de embolização (SENTILHES, 2008; PHILIPPE; D'OREYE; LEWIN, 1997; SERGENT, 2004) e se a taxa de perda sanguínea não for excessiva (DOUMOUCTSIS; PAPAGEORGHIU; ARULKUMARAN, 2007). Esta técnica também está limitada devido a necessidade de instrumentos complexos especializados e de uma equipe de radiologistas intervencionistas à disposição diuturnamente (SENTILHES, 2008; DOUMOUCTSIS; PAPAGEORGHIU; ARULKUMARAN, 2007).

Quanto às ligaduras vasculares, Sentilhes (2008) afirma que a primeira técnica de ligadura de artéria pélvica citada foi a das artérias hipogástricas, no fim do século XIX, como terapêutica para hemorragias puerperais persistentes. Contudo, poucos profissionais estavam familiarizados com esta técnica, especialmente os obstetras, por não terem intimidade com o espaço retroperitoneal, não sendo, portanto, uma técnica tão bem sucedida quanto se esperava (SENTILHES, 2008; MAGANN; LANNEAU, 2005). As complicações eram mais freqüentes e muitas vezes desastrosas como ligadura inadvertida do suprimento sanguíneo arterial que alimenta os membros inferiores e lesão ureteral (MASON, 1998).

Em contrapartida, a LAU apresenta o mesmo objetivo de tratamento e oferece como vantagem menor taxa de morbimortalidade por ser um procedimento mais rápido, de fácil execução e facilmente reproduzível (TAMIZIAN; ARULKUMARAN, 2002; SENTILHES, 2008; AKINOLA et al, 2005; SERGENT, 2004; HEBISCH; HUCH, 2002). Quando comparada à EAU, mostra-se menos onerosa e pode ser realizada pelo ginecologista-obstetra no momento do parto, sem a necessidade do uso de instrumentos muito complexos, ou seja, técnica ideal para países em desenvolvimento (AKINOLA et al, 2005). Por causa dessas conveniências, a LAU é considerada a técnica de ligadura vascular mais rotineira quando comparada à ligadura das artérias hipogástricas (MASON, 1998).

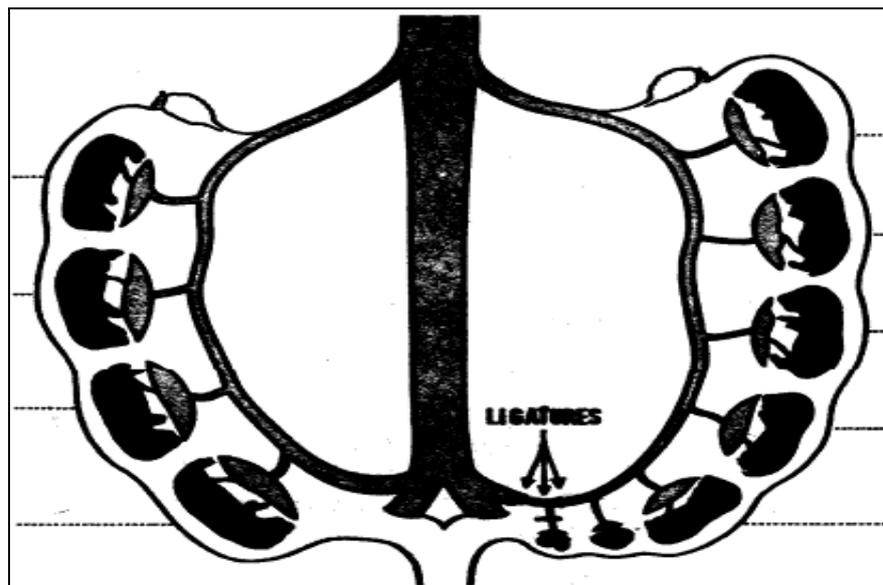
Descrita desde 1952, a LAU foi realizada, pela primeira vez, pela via abdominal (SERGENT *et al.*, 2004; HEBISCH; HUCH, 2002). A partir de então era utilizada geralmente em pacientes submetidas à cesariana que desenvolviam sangramento persistente (MASON, 1998).

Estudo realizado em puérperas com sangramento incontrolável, no ano de 1987, mostra um índice de insucesso da LAU equivalente a 20% das pacientes. Desse total de falhas, 60% ocorreram por defeitos de coagulação, e os outros 40%, devido à presença de placenta prévia acreta (FAHMY, 1987). Baseando-se neste estudo, em 1994, AbdRabbo utilizou a LAU associada à ligadura dos ligamentos útero-ováricos e redondos pela primeira vez, conseguindo evitar a histerectomia em 100% dos casos, não

havendo modificação no ritmo, na duração, nem no volume menstrual após este procedimento (SENTILHES *et al.*, 2008). Contudo, em 1995, O'Leary, demonstrou uma eficácia de 96% ao realizar apenas a LAU em uma série de 265 puérperas.

Apesar de Mason (1998) afirmar que a LAU deveria ser realizada necessariamente por via abdominal (durante uma cesariana ou através de uma laparotomia no período pós-parto); um ano antes, Philippe, D'Oreye, Lewin, (1997) descreveram, pela primeira vez, a LAU por via vaginal, em relato de caso de hemorragia puerperal intensa secundária a atonia uterina. Este procedimento obteve sucesso e evitou a histerectomia de emergência. Em 2002, Hebisch e Huch também realizaram esta técnica por via vaginal com o intuito de descontinuar sangramentos incontroláveis em puérperas, porém houve muitas críticas sobre a técnica descrita, devido ao risco de lesão ureteral em um campo operatório tão limitado (PALACIOS JARAQUEMADA, 2003; BAGGISH, 2003).

A utilização da LAU, como método de isquemia em úteros de ratas, para pesquisa, surgiu em 1964, a fim de demonstrar a importância do suprimento sanguíneo uterino como fator controlador do crescimento fetal (WIGGLESWORTH, 1974; BRUCE, 1972). A técnica foi aplicada no 17º dia de gravidez, realizando-se ligadura unilateral da artéria uterina, ou seja, apenas um corno uterino sofre isquemia, o outro corno servindo de controle. Como consequência, houve morte de alguns fetos e uma redução significativa do peso dos fetos do corno experimental, quando comparado com o peso dos fetos do corno controle. Interessante observar também que os fetos que foram mais seriamente afetados quanto à restrição do crescimento (alguns evoluindo para morte) estavam mais próximo da ligadura (**Figura 1**) (WIGGLESWORTH, 1974).



Fonte: Wigglesworth (1974).

Figura 1. Suprimento sanguíneo útero-placentário na rato grávida após a LAU unilateral.

Outro estudo mostrou que após a LAU, no 17º dia de gestação, houve morte e reabsorção parcial de 30% dos fetos (HUIZINGA *et al.*, 2004). Todavia, Bruce (1972) relata que a LAU realizada no dias 1, 2 e 7 de gestação não levou a nenhum efeito aparente no peso fetal. Observou-se então, que a LAU em ratas, no 17º dia de gestação, promoveu insuficiência placentária levando a restrição do crescimento fetal intra-uterino (RCIU). Desde então, muitos pesquisadores têm utilizado este modelo para o estudo das mudanças bioquímicas associadas com o retardo do crescimento fetal (WIGGLESWORTH, 1974; VELASCO *et al.*, 1973). Outro passo importante foi a utilização desta técnica de isquemia uterina em ratas não-grávidas, com o intuito de avaliar a ovulação (PEPPLER, 1976a). LAU, associada à ligadura das artérias ovarianas, foi realizada em cadelas e evidenciou-se que os tecidos permaneciam viáveis após a isquemia (O'LEARY, 1980)

Atualmente, a LAU em mulheres continua sendo uma das técnicas mais aceitas para tratamento da hemorragia puerperal incontrolável (TAMIZIAN; ARULKUMARAN, 2002; HANSCH *et al.*, 1999). Além de Doumouchtsis, Papageorghiou e Arulkumaran (2007) demonstrarem que não houve diferença estatística entre a eficácia da EAU (91,7%) e das ligaduras vasculares (84,6%), ainda afirmaram que a EAU está limitada aos grandes

centros devido ao alto grau de tecnologia e de especialização dos profissionais médicos. Magann e Lanneau (2005) reafirmam a importância da LAU mostrando uma eficácia de 90%.

Além da utilização da LAU para o tratamento de hemorragias puerperais, esta técnica tem alcançado outros objetivos na ginecologia, como no tratamento de miomas. A miomatose é uma patologia que afeta as mulheres a partir da terceira década, raramente antes dos 20 anos de idade. É a condição benigna mais frequentemente encontrada no útero (SAPMAZ, ÇELIK, 2003; RAVINA *et al.*, 1995; AKINOLA *et al.*, 2005) e seus sintomas causam impacto considerável na saúde e no bem-estar das mulheres (PRON *et al.*, 2003). Uma das maiores complicações da miomatose é sua associação com a infertilidade (TAYLOR; GOMEL, 2008).

Até o início do século XXI a maioria dos tratamentos de mioma, nas pacientes sintomáticas, era cirúrgico: miomectomia ou histerectomia (PRON *et al.*, 2003; SAPMAZ; ÇELIK, 2003; RAVINA *et al.*, 1995; MCCLUGGAGE *et al.*, 2000; AZIZ *et al.*, 1998; PARK *et al.*, 2003; HOLUB *et al.*, 2008). A miomectomia era utilizada quando a paciente desejava engravidar ou manter o útero, porém, esta técnica muitas vezes promovia algumas complicações que podiam prejudicar a fertilidade como hemorragias intensas no trans-operatório, evoluindo para histerectomia; e aderências pélvicas (SAPMAZ; ÇELIK, 2003; MCCLUGGAGE *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2005; PARK *et al.*, 2003).

Havia a necessidade de técnicas terapêuticas que tratassem do mioma sem afetar a viabilidade uterina e a fertilidade (PRON *et al.*, 2003; DONNEZ; JADOUL, 2002). Surgiram então técnicas, utilizadas para o tratamento das hemorragias puerperais, que promoviam a obstrução das artérias uterinas, interrompendo o suprimento sanguíneo do mioma, fazendo o mesmo involuir. Essas técnicas se tornaram alternativas seguras e eficazes para substituir a histerectomia e miomectomia no tratamento da miomatose uterina (VILOS; HOLLETT-CAINES; BURBANK, 2006; BURBANK, HUTCHINS, 2000)

Em 1995, foi relatado pela primeira vez o uso de EAU para tratamento de miomas (RAVINA *et al.*, 1995). Esta técnica está bem estabelecida na literatura, porém ainda apresenta como complicação maior a insuficiência ovariana que atinge níveis muitas vezes preocupantes (impedindo que seja realizada em mulheres na idade fértil) (DONNEZ; JADOUL, 2002; TAYLOR; GOMEL, 2008; WALKER; PELAGE, 2002; RAZAVI *et al.*, 2002; TROPEANO *et al.*, 2004), além das desvantagens já mencionadas anteriormente quanto ao custo para o sistema de saúde e a necessidade de profissionais de radiologia com materiais complexos (LAURENT *et al.*, 2008, SENTILHES *et al.*, 2008; AKINOLA *et al.*, 2005).

A LAU também passou a ser utilizada como um método alternativo para o tratamento dos leiomiomas, seja ela realizada através de laparoscopia (PARK *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2003), laparotomia (LIU *et al.*, 2006) ou por via vaginal (AKINOLA *et al.*, 2005; AKINOLA *et al.*, 2009).

A LAU por via vaginal é considerada uma técnica simples, de baixo custo, de recuperação rápida e sem exposição de irradiação sobre a pele e ovários (AKINOLA *et al.*, 2005; AKINOLA *et al.*, 2009). Pode também ser realizada em pacientes miomatosas durante a cesariana reduzindo o volume de perda de sangue puerperal e minimizando a necessidade futura de outra cirurgia para miomatose, seja miomectomia ou histerectomia (LIU *et al.*, 2006).

A fertilidade provavelmente não é comprometida após a LAU (LIU *et al.*, 2006; SENTILHES *et al.*, 2008; HOLUB *et al.*, 2008; HEBISCH; HUCH, 2002). Estudo recente realizado para avaliar a gravidez após a oclusão das artérias uterinas (EAU x LAU) mostrou que não houve diferença estatística no número de mulheres que engravidaram após a LAU (46,9%) e após a EAU (51,2%). As mulheres grávidas dos dois grupos não mostraram sinais de significante angústia fetal ou retardo do crescimento, com exceção de apenas dois casos. As mulheres deste estudo que engravidaram após LAU ou EAU para o tratamento de miomatose tiveram aumento do risco para partos pré-termos e cesariana. Gravidezes após EAU tiveram maiores taxas de abortamento espontâneo (56%) do que as gestações que ocorreram após

a LAU (10,5%) (HOLUB *et al.*, 2008). Assim sendo, as técnicas de LAU surgem como procedimento ideal para se tornar o método padrão-ouro de isquemia uterina, tanto para o tratamento das hemorragias puerperais, quanto para tratamento de úteros miomatosos, principalmente em países em desenvolvimento, onde há áreas em que o acesso a alta tecnologia médica é restrita (AKINOLA *et al.*, 2009).

Em relação aos estudos experimentais da LAU, na atualidade, tem-se observado a grande contribuição dessa técnica na observação dos fetos com RCIU, pois essa condição está associada com o desenvolvimento, nos ratos adultos, de patologias como doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2 e hipertensão arterial (HUIZINGA *et al.*, 2004; LAMARCA *et al.*, 2005), tornando-se, então, um dos métodos mais freqüentemente empregados para estudar experimentalmente as conseqüências destas doenças (HUIZINGA *et al.*, 2004; PAN; YU, 2002; THAETE; NEERHOF, 2006; ENGELBREGT *et al.*, 2002). Outros autores estabeleceram novos modelos experimentais que promoviam o RCIU em ratas (PAN; YU, 2002; HUIZINGA *et al.*, 2004; TANAKA *et al.* 1994).

Há também vários estudos da LAU em ratas não-grávidas apresentando muitos objetivos diferentes, dentre eles: avaliar as conseqüências da isquemia na ovulação (ZACKRISSON *et al.*, 2000; PRADO; AOKI; ALDRIGHI, 2007), avaliar alterações histológicas e bioquímicas em ovários isquemiados (TASKIN *et al.*, 1998), avaliar a direção do fluxo sanguíneo e mudanças na resistência em ovários de ratas grávidas (MASSA; BRUCE, 1997), avaliar a relação do aparecimento de apoptose no ovário com o fenômeno de isquemia-reperfusão (IR) (OKAZAKI *et al.*, 2005).

1.2. Isquemia e Reperfusão (IR)

A IR, que promove uma cascata de eventos (THAETE; NEERHOF, 2006), tem sido alvo de muitas pesquisas, e atualmente é um tema freqüente em artigos científicos, sendo cada vez mais necessário o aprofundamento no conhecimento deste mecanismo de lesão tecidual.

A isquemia ocorre devido a uma redução no fluxo sangüíneo, geralmente como conseqüência de obstrução mecânica no sistema arterial, mas às vezes como resultado de queda catastrófica da pressão arterial ou da perda de sangue. Por outro lado, hipóxia se refere a qualquer estado em que existe redução do oxigênio disponível. Pode ser causada pela redução na quantidade ou na saturação da hemoglobina (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; PEREIRA, 2000; MCCANCE, 1998; WALSH; D'AMORE, 2008).

Em contraste com a hipóxia, na qual a produção de energia glicolítica pode continuar, a isquemia compromete a distribuição de substratos para a glicólise. Dessa forma, nos tecidos isquêmicos, a geração anaeróbica de energia é interrompida depois que os substratos glicolíticos são exauridos, ou a função glicolítica é inibida pelo acúmulo de metabólitos que deveriam ter sido removidos pelo fluxo sangüíneo. Por essa razão, a lesão isquêmica apresenta tendência para lesionar os tecidos mais rápido do que a hipóxia (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; PEREIRA, 2000; MCCANCE, 1998; LICHTINGER *et al.*, 2003).

A lesão isquêmica é a expressão clínica mais comum da lesão celular causada pela privação de oxigênio. Alterações patológicas complexas ocorrem em diversos sistemas celulares durante a isquemia (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; PEREIRA, 2000; MCCANCE, 1998; WALSH; D'AMORE, 2008). Lesões induzidas pela deficiência de oxigênio podem ser reversíveis se não atingirem o chamado ponto crítico ou de não-retorno. Até um determinado ponto, por um período de tempo que varia entre as diversas células, a lesão pode ser reparada e células afetadas podem se recuperar se o oxigênio e os substratos dos metabólicos forem

disponibilizados pela restauração do fluxo sanguíneo (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; PEREIRA, 2000; MCCANCE, 1998).

Se a isquemia persistir, a estrutura celular continua a se deteriorar devido à extensão progressiva dos mecanismos lesionais. Com o tempo, os mecanismos energéticos da célula (a central oxidativa mitocondrial e a via glicolítica) são irreversivelmente danificados e a restauração do fluxo sanguíneo (reperfusão) não consegue recuperar a célula danificada, que evolui para morte celular por necrose ou por apoptose (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; PEREIRA, 2000; MCCANCE, 1998; STEMPIEN-OTERO *et al.*, 1999; CAMPOS; YOSHIDA, 2004; PARK *et al.*, 2003).

Em determinadas circunstâncias, quando o fluxo sanguíneo é restaurado para células previamente isquemiadas, mas que não morreram, a lesão é paradoxalmente exacerbada e continua de maneira acelerada. Como conseqüência, os tecidos reperfundidos podem perder mais células além das que estavam irremediavelmente danificadas ao final da isquemia (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; PEREIRA, 2000; MCCANCE, 1998; STEMPIEN-OTERO *et al.*, 1999; GILMONT *et al.*, 1998; GUIMARÃES, 2007). Por esse motivo, Celik (2004) considera o oxigênio como uma substância essencial para a vida e, ao mesmo tempo, como uma das mais tóxicas substâncias conhecidas do ser humano.

As conseqüências da lesão celular dependem do tipo, estado e grau de adaptação da célula lesionada (TRETYAKOV; FARBER, 1995; AGUILAR-SILVA *et al.*, 2002). Os mecanismos bioquímicos responsáveis pela lesão celular são complexos. A ativação de proteases e fosfolipases inespecíficas induzida pelo acúmulo de cálcio intracelular no período de reperfusão, leva à síntese de mediadores pró-inflamatórios: o fator de agregação plaquetária (PAF) e os compostos eicosanóides (leucotrienos, tromboxano e prostaglandinas) (CAMPOS; YOSHIDA, 2004; THAETE; NEERHOF, 2006).

Endotelina – 1 (ET-1) e PAF, ambos são importantes mediadores na fisiopatologia da isquemia e reperfusão induzida por restrição do crescimento fetal no rato, contribuindo para a restrição do crescimento fetal.

A ET-1 é o vasoconstritor endógeno mais potente que existe. (THAETE; NEERHOF, 2006). Kerrigan e Stotland (1993) descreveram que dentre os mediadores, os que teriam papel mais importante no fenômeno da isquemia e reperfusão seriam PAF, leucotrieno B4 (LTB4) e tromboxano A2 (TXA2), pois eles poderiam secundariamente ampliar a resposta inflamatória pelo aumento de mediadores peptídeos, por exemplo, citocinas, como o fator de necrose tumoral (TNF) (OKAZAKI *et al.*, 2005) e a interleucina-1 (IL-1).

O TXA2 e LTB4 são, respectivamente, subprodutos da ação da cicloxigenase e lipoxigenase sobre o ácido aracdônico. Segundo Knight *et al.* (1992), o LTB4 seria um potente quimiotático de leucócito que favoreceria a interação neutrófilo-célula endotelial com liberação de radicais livres e enzimas proteolíticas e o TXA2, além de induzir os neutrofilos a liberarem radicais livres, seria um potente vasoconstritor e agregador plaquetário, diminuindo o fluxo capilar após reperfusão. Da mesma forma, o PAF age sinergicamente com a ET-1 diminuindo a perfusão local (THAETE; NEERHOF, 2006)

Estudos *in vitro* mostram que a interação neutrófilo-célula endotelial seria a responsável pela liberação dos mediadores pró-inflamatórios que desencadeariam a lesão inflamatória da reperfusão (SCHMID-SCHÖNBEIN, 1993). Em estudo experimental de isquemia e reperfusão em miocárdio, Ashraf e Zhai (1995) mostraram que a relação entre neutrófilo e célula endotelial ativaria o neutrófilo a produzir o ânion superóxido. Segundo Welbourn *et al.* (1991), os metabólitos do ácido aracdônico, além de agirem como quimiotáticos, favoreceriam a interação neutrófilo-célula endotelial, ativariam neutrofilos a produzirem mais radicais livres de oxigênio e enzimas proteolíticas e afetariam o fluxo sanguíneo pela ação direta na microcirculação. Augustin *et al.* (1992) propuseram que os neutrofilos, além de aderirem à célula endotelial provocando lesão, poderiam se acumular na microcirculação (*plugging*), levando a uma obstrução do fluxo sanguíneo, fenômeno conhecido como *no reflow*, ou seja, dificuldade para restaurar a perfusão adequada da microcirculação, após a isquemia e reperfusão, fenômeno anteriormente descrito por Ames; Wright e Kowanda

(1968), na circulação cerebral e por May, Chait e O'Brien (1978), em retalhos livres experimentais.

A lesão celular resulta de anormalidades funcionais e bioquímicas em um ou mais componentes celulares essenciais. Os alvos mais importantes dos estímulos nocivos são: a) respiração aeróbica envolvendo a fosforilação oxidativa e a produção de adenosina trifosfato (ATP); b) integridade das membranas celulares, da qual depende a homeostasia iônica e osmótica das células e de suas organelas; c) síntese protéica; d) citoesqueleto; e e) integridade do componente genético da célula (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; PEREIRA, 2000; MCCANCE, 1998; TRETAKOV; FARBER, 1995; CELIK, *et al.*, 2004).

Todo esse mecanismo promove alterações histológicas como edema intersticial (um dos primeiros eventos da lesão isquêmica), perda de coesão celular, congestão, hemorragia, infiltrado neutrofílico (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; SAGSOZ; KISA; APAN, 2002; YAZICI *et al.*, 2007; GILMONT *et al.*, 1998; CELIK, *et al.*, 2004). Esses mesmos parâmetros (edema, perda de coesão celular, hemorragia e congestão) vêm sendo utilizados para avaliação do grau histopatológico de isquemia, através da atribuição de scores que variam de 0 a 3, no qual 0 significa ausência de lesão e o 3 lesão acima de 66% no tecido observado (SAGSOZ; KISA; APAN, 2002; YAZICI *et al.*, 2007). Por outro lado, a aparência macroscópica não se relaciona com o grau histopatológico de isquemia (TASKIN *et al.*, 1998), não sendo, por isso, um indicador confiável.

E para avaliar essas alterações histológicas necessita-se de um modelo ideal para realizar a técnica experimental. A pesquisa experimental cirúrgica tem se expandido nas últimas décadas devido a melhoria no suporte anestésico, qualidade da infra-estrutura para monitorização per e pós-operatória e uma busca incansável por modelos que mimetizem condições patológicas da espécie humana. Os alvos principais destas pesquisas são aprimorar o conhecimento que envolve os mecanismos fisiopatológicos de doenças, empreender ensaios terapêuticos com novos fármacos, estudar marcadores biológicos e avaliar novas técnicas com

perspectivas de aplicabilidade na espécie humana (SCHANAIDER; SILVA, 2004).

Escolher o modelo ideal não é simples. Quanto mais se aproxima, em suas características fisiológicas, anatômicas e orgânicas do ser humano, maior a aplicabilidade de suas conclusões. (SCHANAIDER; SILVA, 2004) Por estes motivos, foi eleito o rato (*Rattus norvegicus*, variedade Wistar albina), pois os modelos de IR são de fácil execução em animais de pequeno porte. Os ratos também são muito resistentes às infecções. (SCHANAIDER; SILVA, 2004) Além de tudo isso, os ratos são animais de fácil manipulação, possuem ciclos estrais e prenhez de curta duração, sendo por estes motivos mais utilizados em experimentos reprodutivos (BRUCE, 1976b). Existe outra semelhança com os seres humanos que justifica a utilização deste animal, o suprimento sanguíneo ovariano é derivado de dois maiores vasos: a artéria ovariana, que deriva da aorta abdominal ou da artéria renal; e o ramo ovariano derivado da artéria uterina (MASSA; BRUCE, 1997; ZACKRISSON *et al.*, 2000).

Especula-se, então, de que forma o útero pode permanecer viável após procedimentos que promovam a interrupção do principal suprimento sanguíneo, a artéria uterina (BANU *et al.*, 2007) e quando o fluxo colateral via ovário se desenvolve a ponto de suprir o útero (PARK *et al.*, 2003)

É admissível supor que a obstrução das artérias uterinas promova isquemia podendo até promover necrose no útero (BANU *et al.*, 2007; SHASHOUA *et al.*, 2002), no entanto não se conhece se há alguma localização mais freqüente para ocorrer alterações histopatológicas (porção proximal ou distal da ligadura da artéria uterina) e qual o período para o aparecimento destas lesões.

Dentre as características patológicas de miomas uterinos, sob isquemia, avaliadas após a EAU realizadas em dez pacientes, encontrou-se que em dois casos havia focos de necrose miometrial fora dos leiomiomas, sugerindo que necrose maciça e infarto no útero, embora raro, seja possível (MCCLUGGAGE *et al.*, 2000). Outros autores também relatam a necrose uterina após a isquemia por EAU, mostrando que as lesões isquêmicas

podem não ficar restritas somente ao mioma (COLGAN *et al.*, 2003; GODFREY; ZBELLA, 2002; SHASHOUA *et al.*, 2002; BANU *et al.*, 2007).

Há localizações do útero que sofrem de maneira diferente a isquemia promovida pela LAU. Estudo mostra que a LAU, quando realizada próximo ao colo uterino, causa completa obstrução do suprimento fetal localizado na porção mais próxima da ligadura, resultando em morte de 30% dos fetos (HUIZINGA *et al.*, 2004). O único suprimento do útero, após a ligadura, é derivado da artéria ovariana promovendo a sobrevivência dos fetos na porção distal à ligadura (HUIZINGA *et al.*, 2004). O crescimento dos fetos, após a ligadura, depende de sua posição no corno uterino, pois mecanismos compensatórios são providos aos fetos principalmente os que estão distante da ligadura (NÜSKEN *et al.*, 2007)

Indagam-se também as conseqüências da LAU sobre a ovulação, sabendo que o suprimento sanguíneo ovariano via artéria uterina é importante para uma resposta completa da ovulação (ZACKRISSON *et al.*, 2000). Estudos da ovulação *in vitro* e *in vivo* indicaram que um fluxo sanguíneo aumentado e constante associado ao aumento da permeabilidade vascular é muito importante durante os estágios dos processos ovulatórios imediatos à ruptura folicular. Ou seja, uma alta pressão de perfusão contínua se mostra essencial para o sucesso da ovulação (ZACKRISSON *et al.*, 2000). Por esse motivo, em ratas, a taxa de fluxo sanguíneo ao ovário é alta em relação a maioria dos outros órgãos do corpo (MASSA; BRUCE, 1997). Prado, Aoki e Aldrighi (2007) não encontraram diferenças entre os pesos dos úteros de ratas submetidas à ligadura no ramo ovariano do vaso uterino e as ratas do grupo controle, o que sugere que a função hormonal dos ovários das ratas talvez não dependa exclusivamente do fluxo sanguíneo proveniente dos ramos ováricos das artérias uterinas, já que se acredita que o estrogênio exerce uma função uterotrófica com efeito indireto no peso do útero.

O estudo da IR já está amplamente difundido em artigos e livros, apesar de seu mecanismo fisiopatológico permanecer pouco esclarecido. Muitos estudos histopatológicos, que pesquisam a isquemia, foram

realizados em órgãos e estruturas como ovários, fígado, rins, intestino, endotélio (YAZICI *et al.*, 2007; SAGSOZ; KISA; APAN, 2002; CELIK *et al.*, 2004; ÇAY *et al.*, 2006; TASKIN *et al.*, 1998; STEMPIEN-OTERO *et al.*, 1999; ROCOURT; MEHTA; BESNER, 2007; TRETYAKOV; FARBER, 1995; SABA *et al.*, 2007), todavia, até o momento, são escassas as pesquisas que buscam um modelo que quantifique o grau de isquemia uterina e, menos ainda, aquelas que quantificam o grau de isquemia através de avaliação histopatológica tanto em ratas quanto em mulheres (BANU *et al.*, 2007).

Há alguns estudos que avaliam complicações isquêmicas pós-EAU em mulheres, mas oferecem poucos detalhes sobre as características histológicas do útero, aprofundando-se, de fato, nas alterações isquêmicas microscópicas dos miomas (AZIZ *et al.*, 1998; MCCLUGGAGE *et al.*, 2000).

Por este motivo, fazem-se necessárias algumas respostas a respeito da isquemia do útero quanto às suas alterações histológicas, função ovariana e seu relacionamento com os vasos colaterais, com o intuito de permitir o estabelecimento permanente desta técnica minimamente invasiva no meio acadêmico, oferecendo mais segurança e conforto para as mulheres e menos ônus para o sistema de saúde e a sociedade.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

- ❖ Descrever e padronizar uma técnica de ligadura da artéria uterina unilateral direita em ratas não-grávidas;
- ❖ Avaliar os efeitos da ligadura da artéria uterina unilateral direita em úteros e ovários de ratas não-grávidas.

2.2. Específicos

- ❖ Descrever o modelo de isquemia realizando a ligadura da artéria uterina direita em ratas não-grávidas;
- ❖ Comparar as alterações histopatológicas relacionadas à isquemia entre as porções distal e proximal dos hemi-úteros direitos (HUD) nos dias 1, 7, 14 e 21 após a LAU direita;
- ❖ Comparar as alterações histopatológicas relacionadas à isquemia dos HUD (teste) nos dias 1, 7, 14 e 21 após a LAU direita;
- ❖ Comparar as alterações histopatológicas relacionadas à isquemia dos hemi-úteros esquerdos (HUE) (controle) nos dias 1, 7, 14 e 21 após a LAU direita;
- ❖ Comparar as alterações histopatológicas relacionadas à isquemia entre HUD (cujas uterinas foram ligadas) e HUE (controle) nos dias 1, 7, 14 e 21 após a LAU direita;
- ❖ Avaliar a função ovulatória dos ovários ipsilaterais e contralaterais à ligadura da artéria uterina direita contando o número de folículos em desenvolvimento e corpos lúteos nos dias 1, 7, 14 e 21 após a LAU;
- ❖ Avaliar a fertilidade após a LAU direita através do percentual de ratas grávidas e da média do número de fetos por rata ligada nos dias 1, 7 e 14 após a LAU, comparando com um grupo controle intacto.

3. MATERIAIS E MÉTODO

3.1. Tipo e local do estudo

Estudo experimental desenvolvido no Laboratório de Cirurgia Experimental Prof. Saul Goldenberg, no **GRUPO DE EDUCAÇÃO E ESTUDOS ONCOLÓGICOS (GEEON)**, Universidade Federal do Ceará (UFC). Neste laboratório são realizadas várias cirurgias experimentais desenvolvidas pela UFC em animais de pequeno e médio porte (**Figura 2**).



Fonte: Medeiros e cols.

Figura 2. Infra-estrutura do centro cirúrgico - GEEON
(Agradecimentos ao Dr. Luiz Gonzaga Porto Pinheiro)

3.2. Animais

Foram utilizados 64 ratos, 48 fêmeas e 16 machos, (*Rattus norvegicus*, variedade albina) maduros, de fertilidade comprovada, pesando entre 150 e 210 gramas, da linhagem Wistar, provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina da UFC, criados e mantidos sob condições ambientais e alimentares semelhantes.



Figura 3. Gaiolas de polipropileno que mantinham as ratas

Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (30 x 17 x 15 cm), providas de tampa com grade metálica de aço inoxidável e forradas com maravalhas, alojadas em dependências refrigeradas (**Figura 3**). A higienização das gaiolas foi realizada diariamente pelo técnico responsável.

Foram alimentados com ração padrão e água potável *ad libitum*, até 12 horas dos experimentos, promovendo-se alternância dos ciclos claro/escuro a cada 12 horas, sendo produzida iluminação artificial por lâmpada fluorescente de 40 watts, com fotoperíodo de luz das 7:00 as 19:00 horas.

3.3. Coleta de dados

3.3.1. Instrumentos de coleta de dados

Para a análise das lâminas foi desenvolvido, pelo pesquisador, um instrumento de coleta de dados para registro dos escores de isquemia uterina (dos segmentos hemi-útero direito distal (HUDD), hemi-útero direito proximal (HUDP) e HUE) de acordo com os seguintes critérios: congestão, edema, hemorragia e perda de coesão celular (**Apêndice A**). No mesmo instrumento, os dados referentes aos ovários também podiam ser registrados, havendo espaços para anotar o número de folículos em desenvolvimento e corpos lúteos dos três campos avaliados pelo patologista e os aumentos utilizados no microscópio.

Para a avaliação da fertilidade, utilizou-se outro instrumento no qual era registrado o número de recém nascidos por rata e quais ratas haviam engravidado (**Apêndice B**). Todos os instrumentos de coleta foram preenchidos pelo pesquisador.

3.3.2. Operacionalização do estudo

As 48 ratas foram distribuídas, ao acaso, em oito grupos. Inicialmente, foram selecionadas 24 ratas em quatro grupos (**Figura 4**).

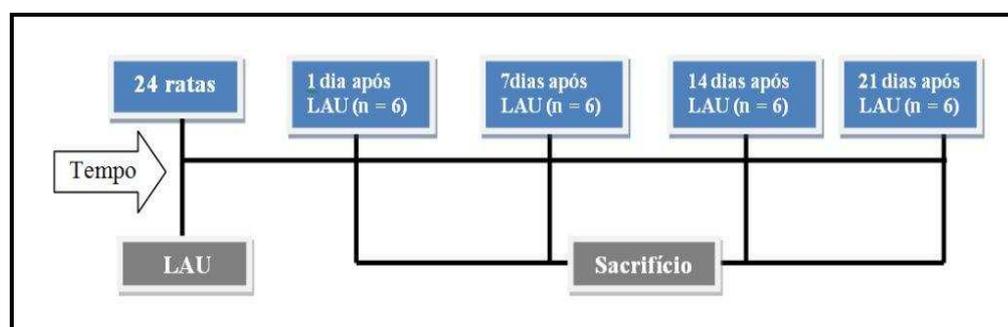


Figura 4. Operacionalização dos dias de sacrifício após a LAU

Posteriormente, outras 24 ratas foram distribuídas, ao acaso, em mais quatro grupos (**Figura 5**).

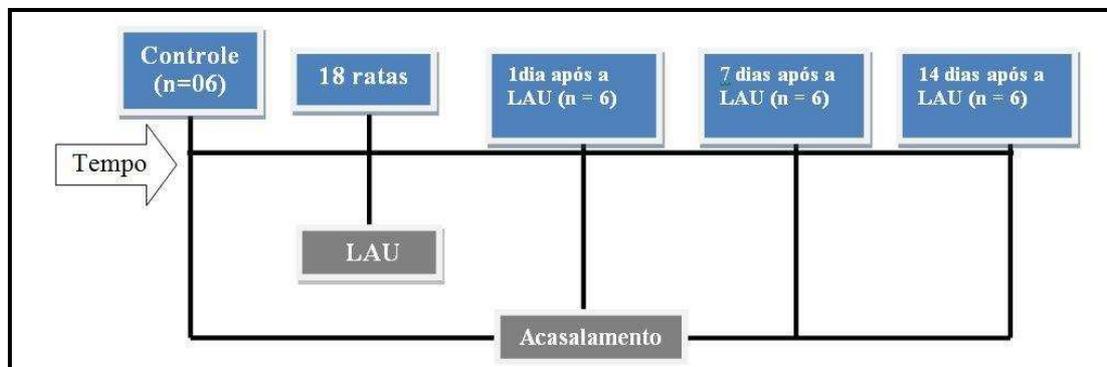


Figura 5. Operacionalização dos dias de acasalamento no grupo controle e nos grupos teste após a LAU

3.3.3. Descrição do modelo de LAU direita em ratas não-grávidas

As ratas ficaram em jejum de água e ração, a partir de 12 horas que antecederam o procedimento cirúrgico. O anestésico utilizado foi ketamina na dose de 40mg/kg, administrada por via intraperitoneal, mantendo um plano anestésico satisfatório à realização do procedimento cirúrgico.

Atingindo o plano anestésico satisfatório, o animal era submetido à depilação manual da região abdominal caudal em uma área de 3cm x 2cm, seguida por anti-sepsia com polivinil-pirrolidona-iodo e colocado em decúbito dorsal com as patas extendidas sobre uma prancha de madeira.

Uma incisão mediana de 2,5 a 3,0cm foi, então realizada com tesoura, acometendo pele, plano músculo-aponeurótico e peritônio, seguida de identificação dos órgãos intracavitários e exposição do útero, anexos e mesentério. O procedimento cirúrgico seguiu com apreensão do HUD e ligadura da artéria uterina direita usando fio de náilon 5-0 (Mononylon[®], Ethicon, São Paulo, Brasil) com três nós simples.

A síntese da parede abdominal foi realizada em dois planos de sutura contínua acometendo o plano músculo-aponeurótico e a pele com fio de náilon 5-0.

O sacrifício ocorreu nos dias 1, 7, 14 e 21 após a LAU. A morte foi caracterizada por parada respiratória e ausência completa de reflexos. A seguir, foi realizada uma abertura abdominal de larga exposição, expondo completamente a cavidade peritoneal.

Em seguida, realizou-se o inventário da cavidade peritoneal, seguida de identificação, apreensão e secção do corno uterino esquerdo e direito. Os hemi-úteros foram excisados e cada corno direito foi seccionado em duas porções: distal (HUDD) e proximal (HUDP) à ligadura. O hemi-útero esquerdo foi excisado integralmente, assim como os ovários esquerdo e direito.

3.3.4. Avaliação histológica do útero quanto à congestão, edema, hemorragia e perda de coesão celular

As peças foram identificadas e acondicionadas imediatamente em recipiente contendo formol a 10%, recebendo identificação. Os tecidos foram processados até parafina, cortados com espessura de 5µm e corados com hematoxilina e eosina (HE).

A análise histológica foi realizada no Departamento de Patologia e Medicina Legal da UFC, por um único patologista (Dalgimar Beserra de Menezes), que avaliou os espécimes quanto à congestão, hemorragia, edema intersticial e perda de coesão celular (aumentos de 100x e 400x) através de um escore que varia de 0 a 3, em que 0 representa nenhum achado patológico, 1, 2, e 3 representam achados patológicos menores que 33%, entre 33% e 66%, e maiores que 66% do tecido, respectivamente; Estes escores foram empregados em estudos anteriores (SAGSÖZ; KISA; APAN, 2002) para avaliar o tecido ovariano.

3.3.5. Avaliação do número de folículos e de corpos lúteos

As peças foram identificadas e acondicionadas imediatamente em recipiente contendo formol a 10%, recebendo identificação. Os tecidos foram processados como rotineiramente até inclusão em parafina, cortados com espessura de 5µm e corados com hematoxilina e eosina (HE).

Na área total abrangida pela secção histológica, foram avaliados, pelo mesmo patologista, três campos (aumentos de 100x e 400x) em que era quantificado o número total de folículos em desenvolvimento e o de corpos lúteos de cada campo. Em seguida, calculou-se a média dos três campos para utilização na análise estatística.

3.3.6. Efeitos da LAU direita sobre a fertilidade de ratas

As ratas testadas foram acasaladas com machos de fertilidade comprovada. O dia do acasalamento foi diferente para cada grupo. As ratas do grupo controle foram acasaladas imediatamente com os machos. Nos outros três grupos as ratas foram acasaladas com 1, 7 e 14 dias após a LAU direita, respectivamente.

Cada gaiola de acasalamento continha dois machos para três fêmeas. A ciclicidade reprodutiva de todas as ratas foi avaliada, pelo orientador da pesquisa, diariamente por esfregaços vaginais. O dia da concepção (dia 1) foi determinado pela presença de espermatozoides no esfregaço vaginal direto (a fresco). Os resultados foram dados em número de fetos que nasceram por rata e percentagem de ratas grávidas por grupo de animais testados e controle.

3.4. Tratamento estatístico e análise dos dados

Para a construção do banco de dados e análise estatística foi utilizado o software SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) versão 13.0. Foram utilizados os seguintes testes estatísticos:

(1) Teste não paramétrico *Wilcoxon*: comparação de dados ordinais em duas amostras relacionadas; (2) Teste não paramétrico *Kruskal-Wallis* (com teste *post hoc*): comparação de dados ordinais entre mais de duas amostras não relacionadas; (3) Qui-quadrado de *Pearson*: comparação de dados nominais; (4) *OneWay ANOVA* (*post hoc*: *Tukey*): comparação das médias (\pm epm) dos dados contínuos entre mais de dois grupos. Para todos esses cálculos, foi considerado significativo, quando p menor que 0,05 (HULLEY *et al.*, 2008; FIELD, 2009; SIEGEL, 2006).

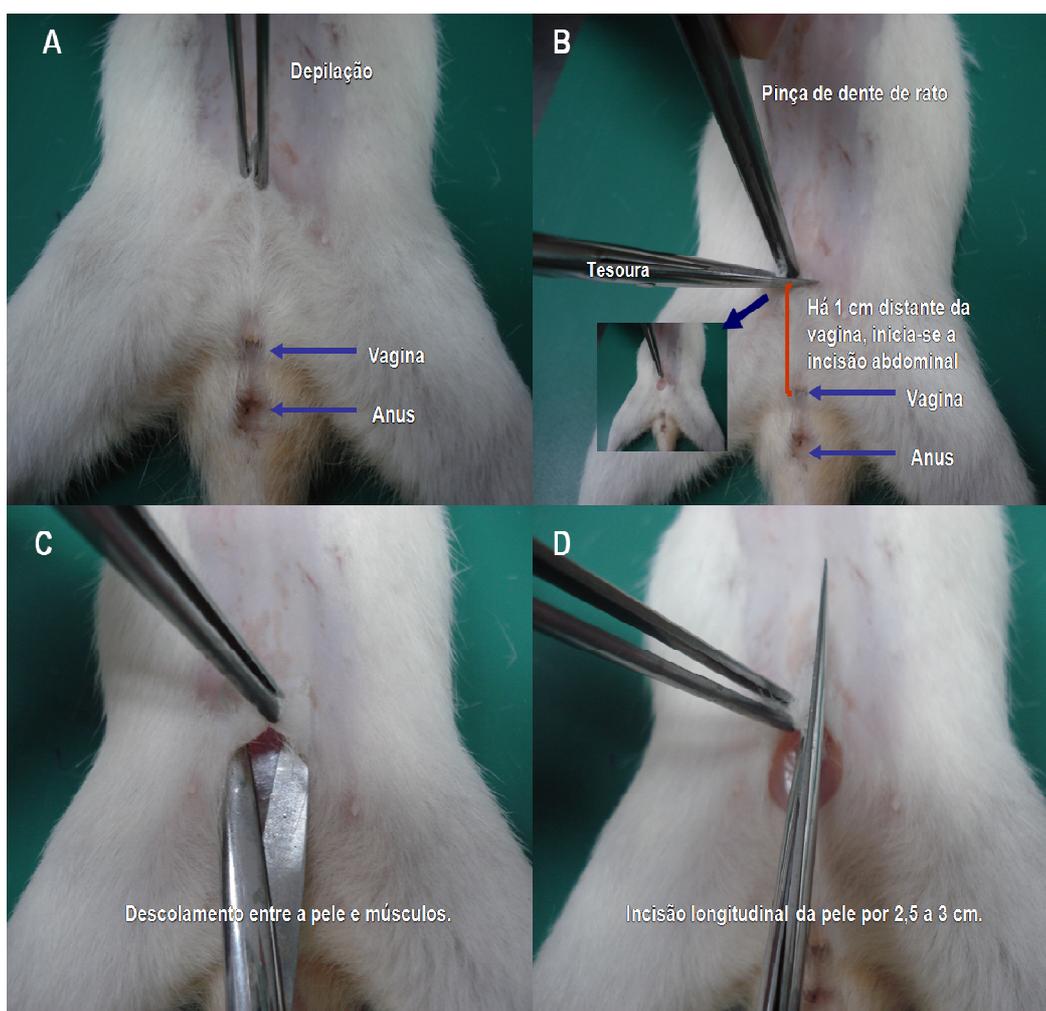
3.5. Procedimentos éticos para a realização do estudo

O projeto de pesquisa foi enviado para a Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da UFC, tendo recebido o número do protocolo 90/08. Foram respeitadas a legislação brasileira para o uso de animais de experimentação (Lei Federal nº 6.638/1979) e as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), instituição filiada ao *International Council for Laboratory Animal Science*.

4. RESULTADOS

4.1. Descrição da técnica de LAU segundo modelo proposto

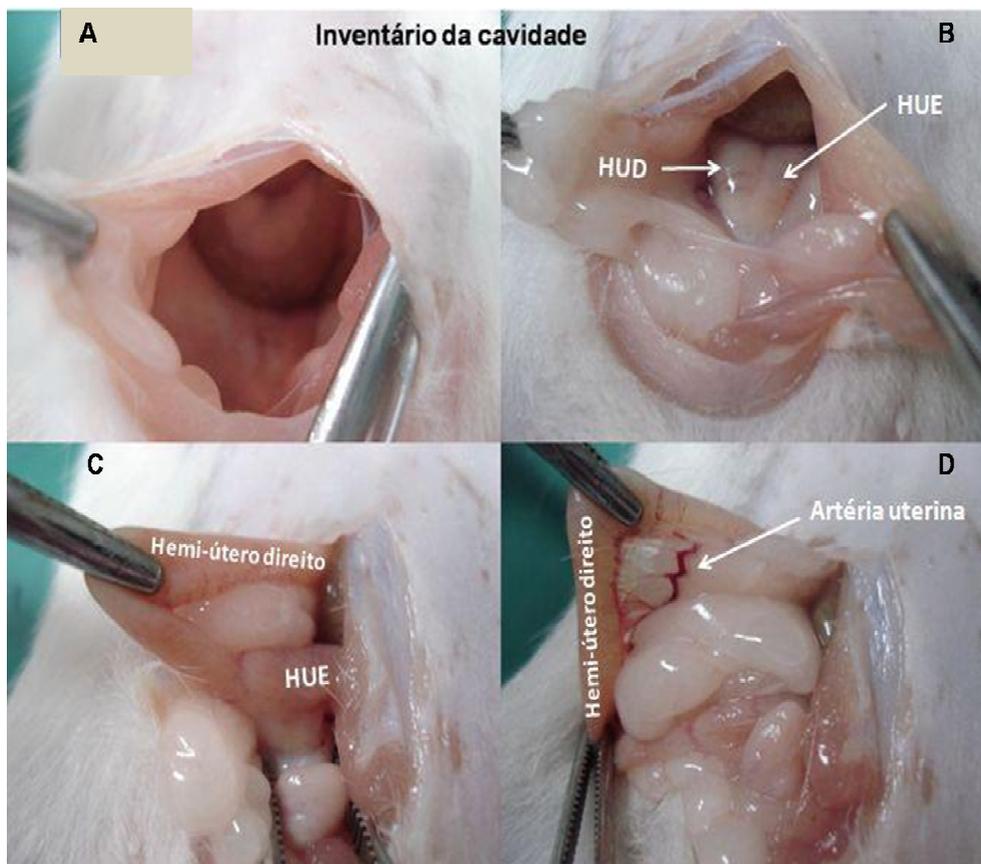
- 1) Depilação manual (**Figura 6A**);
- 2) Corte da pele 01cm acima do clitóris (**Figura 6B**);
- 3) Descolamento entre pele e músculos com tesoura (**Figura 6C**);
- 4) Incisão abdominal mediana medindo entre 2,5 e 3cm (**Figura 6D**);



Fonte: Medeiros e cols.

Figura 6 – (A) Abdomen após depilação; (B) corte da pele com tesoura; (C) descolamento entre a pele e músculos; (D) incisão longitudinal.

- 5) Abertura da parede abdominal com tesoura (**Figura 7A**);
- 6) Inventário da cavidade (localizar principais órgãos: bexiga, intestino, útero) (**Figura 7B**);



Fonte: Medeiros e cols.

Figura 7 – (A) Abertura da parede abdominal; (B) Inventário da cavidade; (C e D) exteriorização dos HUD e HUE.

HUD = hemi-útero direito HUE = hemi-útero esquerdo

- 7) Pinçamento (feito por um auxiliar) do corno uterino direito com pinças delicadas, uma sustentando a porção superior (próximo ao ovário) e outra a inferior (próximo ao colo), expondo ao cirurgião toda a rede vascular (artéria uterina) ligada ao útero (**Figuras 7C e 7D**);

- 8) Ligadura da artéria uterina na extremidade inferior com fio nylon 5.0 (**Figura 8B**);

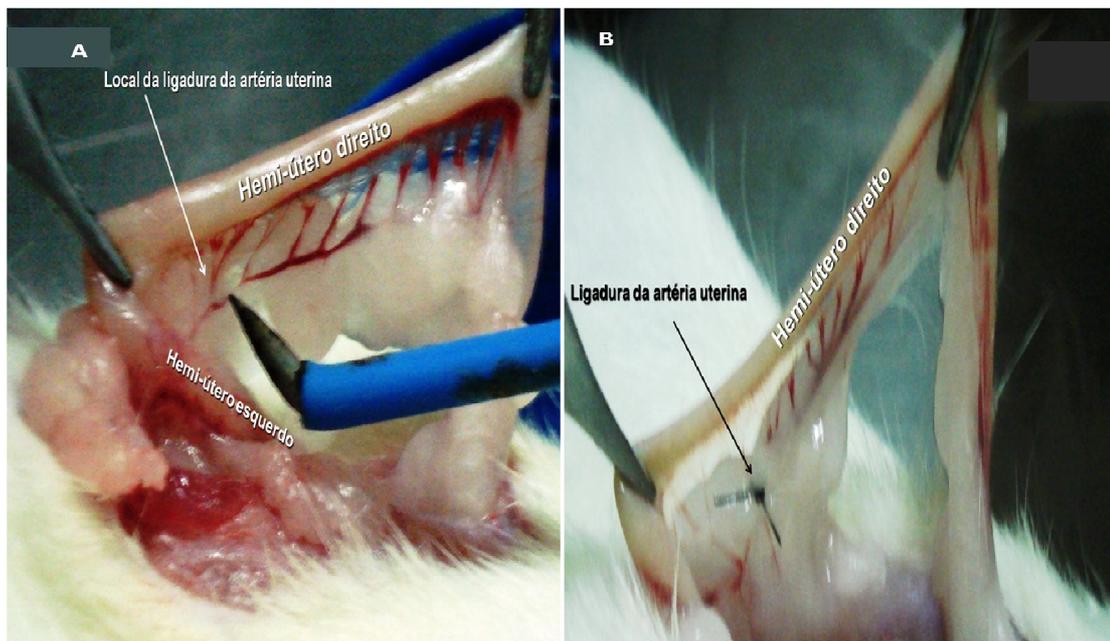


Figura 8 – (A) Local da ligadura da artéria uterina (seta); (B) Ligadura da artéria uterina direita (seta)

4.2. Comparação das médias dos escores de isquemia entre HUDD e HUDP após a LAU direita

A primeira análise realizada constou de comparação das alterações histológicas nos segmentos proximais e distais do HUD em cada grupo, com a finalidade de observar se havia diferença entre uma porção e outra, em relação à distância da ligadura. Todos os dados foram expostos na forma de tabelas e de figuras com o intuito de melhorar a percepção visual do leitor.

Ao observar essa comparação (**Tabela 1**), nota-se que as menores médias da soma dos escores foram encontradas no primeiro dia de isquemia, tanto no HUDP ($0,5 \pm 0,2$) quanto no HUDD ($1,5 \pm 0,3$). Nesse mesmo grupo (1 dia após a LAU), foi encontrada a maior diferença entre as médias dos dois segmentos uterinos, o valor encontrado no HUDD corresponde a quase o triplo do encontrado no HUDP, porém não houve diferença estatística ($p = 0,109$). Houve outra disparidade de valores, só que

dessa vez, no 21^o dia de isquemia, com a média do HUDP superando em quase o dobro a do HUDD, que também não se mostrou significativa ($p = 0,066$) (**Figura 9**).

TABELA 1. Comparação das médias dos escores de isquemia entre HUDD e HUDP após a LAU direita.

Tempo (dias)	Escores (média±epm)		
	HUDP	HUDD	p*
1 (n=06)	0,5 ± 0,2	1,5 ± 0,3	0,109
7 (n=06)	5,0 ± 0,6	3,8 ± 0,8	0,223
14 (n=06)	3,6 ± 0,4	4,0 ± 0,4	0,317
21 (n=06)	4,5 ± 0,2	2,5 ± 0,6	0,066

*Wilcoxon

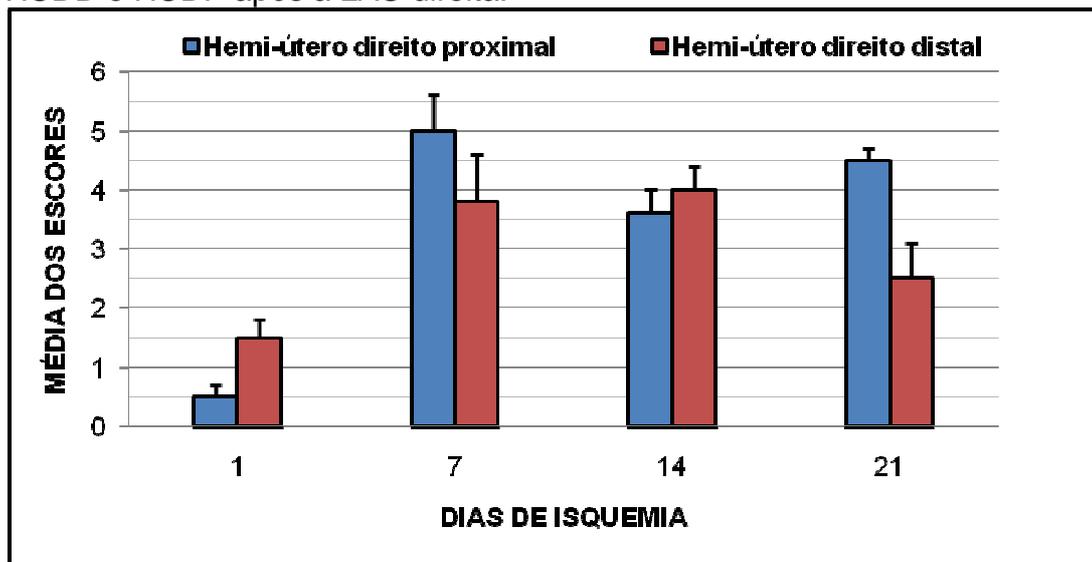
HUDP = hemi-útero direito proximal HUDD = hemi-útero direito distal

epm = erro padrão da média $p < 0,05$ = estatisticamente diferente

Escores de isquemia segundo Sagsoz; Kisa; Aspan (2002)

Observa-se inversão nos valores das médias: no primeiro dia, os escores do HUDD superam os do HUDP, e no 21^o dia de isquemia, o quadro se inverte (**Figura 9**).

Figura 9. Comparação das médias dos escores (\pm epm) de isquemia entre HUDD e HUDP após a LAU direita.



epm = erro padrão da média

Escores de isquemia segundo Sagsoz; Kisa; Aspan (2002)

Não houve diferença significativa entre os escores histopatológicos de isquemia de hemi-úteros distais e proximais do lado em que a artéria uterina foi ligada (hemi-útero teste). Em nenhum momento dos períodos de isquemia estabelecidos (1, 7, 14 e 21 dias) estes segmentos diferiram um do outro ($p > 0,05$) (**Tabela 1 e Figura 9**)

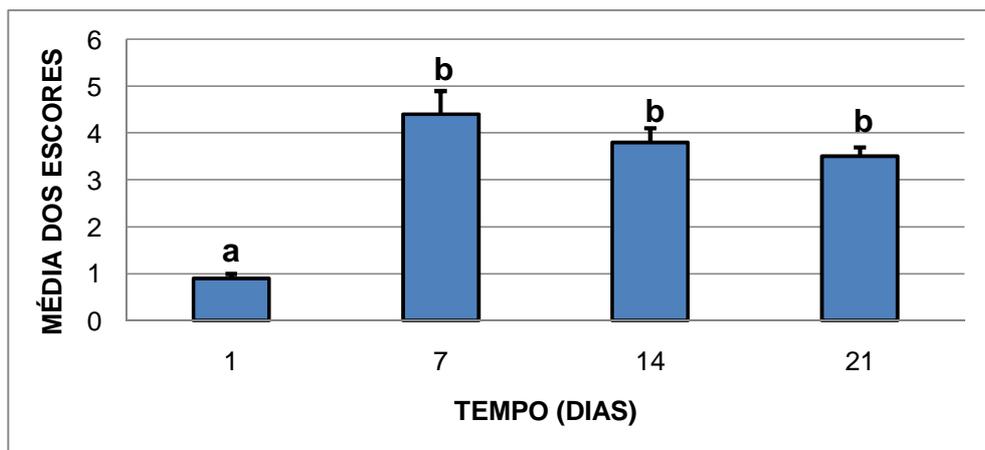
4.3. Médias dos escores de isquemia nos HUD no decorrer do tempo

Após o cálculo estatístico e a conclusão de que os tecidos distais e proximais do HUD eram iguais entre si, foi realizada uma média entre os escores dos HUDP e HUDD, e os resultados foram considerados como os dados do HUD como um todo. A partir deste ponto, então, todas as análises estatísticas serão realizadas com o HUD.

Avaliando a seção anterior, observa-se um aumento considerável dos escores histopatológicos de isquemia a partir do sétimo dia de isquemia, tanto no HUDP quanto no HUDD em comparação com o primeiro dia de isquemia (**Figura 9**).

Quando foram avaliados os escores histopatológicos de isquemia do HUD no decorrer do tempo, comprovou-se que realmente há um aumento substancial dos índices a partir do sétimo dia ($p = 0,003$), no qual se observou aumento de quase cinco vezes quando se comparado com o sétimo dia ($4,4 \pm 0,5$) com o primeiro ($0,9 \pm 0,1$) ($p < 0,05$). Após o sétimo dia de isquemia não há mais mudança no padrão histológico referente a alterações isquêmicas ($p > 0,05$) (**Figura 10**).

Figura 10. Médias dos escores de isquemia nos HUD no decorrer do tempo (dias).



Letras diferentes significam médias significativamente diferentes ($p < 0,05$)
 Escores de isquemia segundo Sagsoz; Kisa; Apan, 2002

Desde o primeiro dia de isquemia, observam-se alterações histológicas no HUD e há um leve decréscimo dos escores a partir do sétimo dia de isquemia ($p > 0,005$) (**Tabela 2 e Figura 10**).

Tabela 2. Médias dos escores de isquemia dos HUD no decorrer do tempo.

Tempo (dias)	Escores (média±epm)
1 (n = 12)	0,9 ± 0,1 ^a
7 (n = 12)	4,4 ± 0,5 ^b
14 (n = 12)	3,8 ± 0,3 ^b
21 (n = 12)	3,5 ± 0,2 ^b

Kruskal-Wallis ($p=0,003$)

Letras diferentes significam médias significativamente diferentes ($p < 0,05$) –

Comparação múltipla entre tratamentos (*Post hoc – Kruskal-Wallis*)

Escores de isquemia segundo Sagsoz; Kisa; Apan, 2002

4.4. Médias dos escores de isquemia de HUE no decorrer do tempo

Semelhantemente à comparação com o HUD, o HUE também apresentou um aumento nos escores a partir do sétimo dia de isquemia ($p = 0,001$). As médias dos dias 7 ($3,1 \pm 0,1$), 14 ($3,6 \pm 0,2$) e 21 ($3,3 \pm 0,4$)

permaneceram as mesmas entre si ($p > 0,05$), mas em comparação com o primeiro dia (0 ± 0), houve diferença deste grupo com todos os outros ($p < 0,05$) (**Tabela 3**).

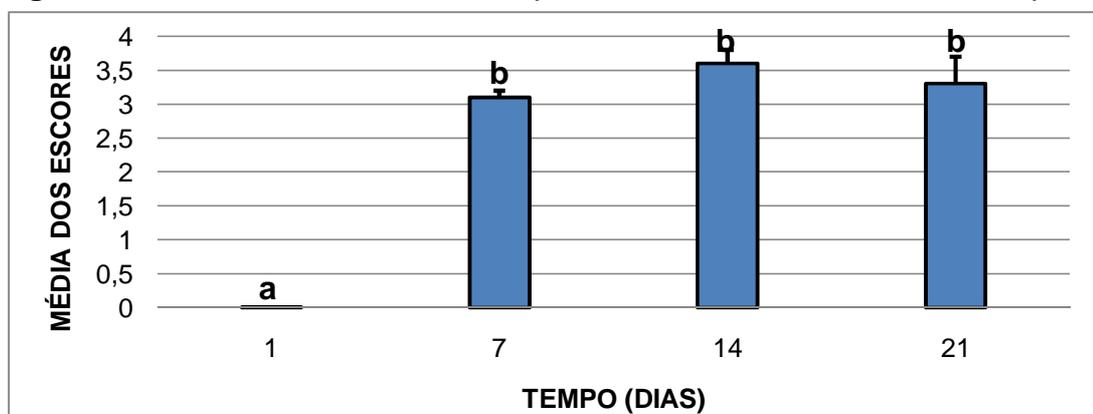
Tabela 3. Médias dos escores de isquemia de HUE no decorrer do tempo.

Tempo (dias)	Escores (média±epm)
1 (n = 6)	0,0 ± 0,0 ^a
7 (n = 6)	3,1 ± 0,1 ^b
14 (n = 6)	3,6 ± 0,2 ^b
21 (n = 6)	3,3 ± 0,4 ^b

* *Kruskal-Wallis* ($p=0,001$) HUE = Hemi-útero esquerdo
 Letras diferentes significam médias significativamente diferentes ($p<0,05$) –
 Comparação múltipla entre tratamentos (*Post Hoc – Kruskal-Wallis*)
 Escores de isquemia segundo Sagsoz; Kisa; Apan, 2002

No primeiro dia de isquemia, em HUE, não se observam as alterações histológicas pesquisadas (**Figura 11**).

Figura 11. Médias dos escores de isquemia de HUE no decorrer do tempo.



Letras diferentes significam médias significativamente diferentes ($P<0,05$)
 Escores de isquemia segundo Sagsoz; Kisa; Apan, 2002

4.5. Comparação das médias dos escores de isquemia entre HUE e HUD

A média máxima dos escores encontrada foi no HUD do sétimo dia de isquemia ($4,4 \pm 0,5$), já em HUE a maior média registrada foi no 14º dia ($3,6 \pm 0,2$) (**Tabela 4**).

Tabela 4. Comparação das médias dos escores de isquemia entre HUE (n=06) e HUD (n=12).

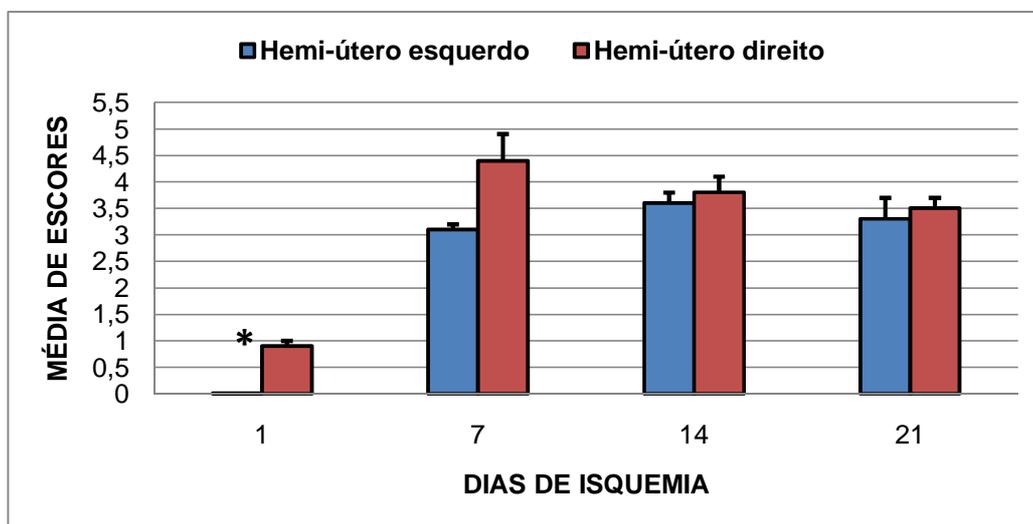
Tempo (Dias)	Escores (média±epm)		p*
	Hemi-útero esquerdo	Hemi-útero direito	
1	0,0 ± 0,0	0,9 ± 0,1	0,026
7	3,1 ± 0,1	4,4 ± 0,5	0,104
14	3,6 ± 0,2	3,8 ± 0,3	0,564
21	3,3 ± 0,4	3,5 ± 0,2	0,751

* *Wilcoxon* ($p < 0,05$)

Escores de isquemia segundo Sagsoz; Kisa; Apan, 2002

Observa-se que, em todos os períodos de tempo estudados, o valor dos escores do HUD é superior ao de HUE (**Figura 12**), porém tal só pode ser afirmado com dados estatísticos do primeiro grupo (1 dia após a LAU) em que a média dos escores de HUE não passou de zero (epm = 0) e a média dos escores do HUD foi de 0,9 (epm ± 0,1) com $p = 0,026$. (**Tabela 4**).

Figura 12. Comparação das médias dos escores de isquemia entre HUE e HUD.



* $p < 0,05$

Escores de isquemia segundo Sagsoz; Kisa; Apan, 2002

4.6. Médias dos escores das alterações histopatológicas isoladas em HUE no decorrer do tempo

Como observado em Figuras anteriores (**Figura 11 e 12**), no primeiro dia de isquemia, não foram observadas alterações isquêmicas em HUE.

A hemorragia foi a única alteração histológica que não apresentou um aumento significativo do 7º, 14º e 21º dia em relação ao primeiro dia, em HUE ($p = 0,447$), ou seja, o índice de hemorragia foi considerado semelhante a zero (**Tabela 5**).

Tabela 5. Médias dos escores \pm epm das alterações histopatológicas isoladas em HUE no decorrer do tempo.

Alterações Histológicas	Tempo (dias)				p*
	1 (n=6)	7 (n=6)	14 (n=6)	21 (n=6)	
Congestão	0,0 \pm 0,0 ^a	1,0 \pm 0,0 ^b	1,3 \pm 0,6 ^b	1,0 \pm 0,2 ^b	0,001
Edema	0,0 \pm 0,0 ^a	1,0 \pm 0,0 ^b	1,0 \pm 0,0 ^b	1,0 \pm 0,0 ^b	0,000
Hemorragia	0,0 \pm 0,0	0,1 \pm 0,1	0,3 \pm 0,2	0,3 \pm 0,2	0,447
Coesão	0,0 \pm 0,0 ^a	1,0 \pm 0,0 ^b	1,0 \pm 0,0 ^b	1,0 \pm 0,0 ^b	0,000

**Kruskal-Wallis* epm= erro padrão da média

Letras diferentes significam médias significativamente diferentes ($p < 0,05$)

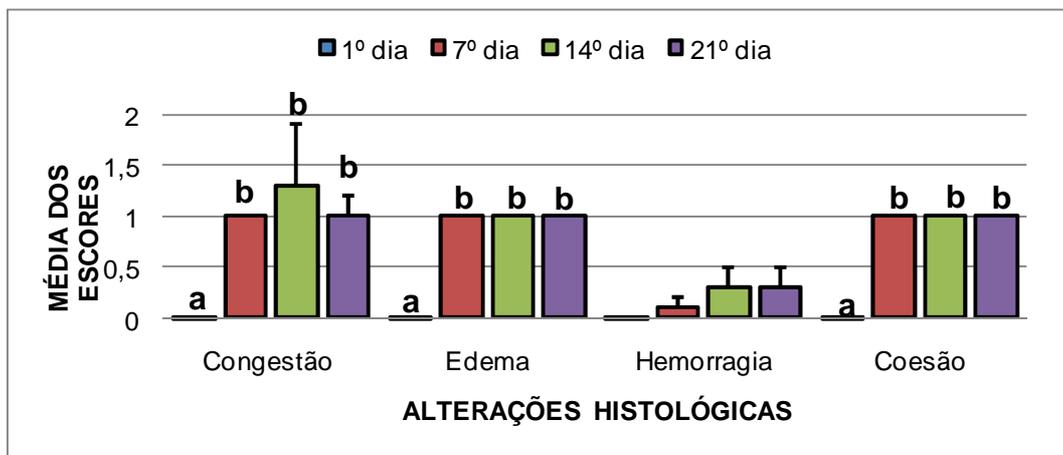
Comparação múltipla entre tratamentos (*Post Hoc – Kruskal-Wallis*)

Escores de isquemia segundo Sagsoz; Kisa; Apan, 2002

Após o 14º dia, as maiores médias encontradas foram: congestão (1,0 \pm 0,2); edema (1,0 \pm 0); hemorragia (0,3 \pm 0,2) e perda de coesão celular (1,0 \pm 0), ou seja, no 21º dia não houve média superior acima de 33% de lesão tecidual (**Tabela 5**).

Em HUE, em todos os grupos, as médias dos escores de edema, hemorragia e perda de coesão celular não ultrapassaram o valor 1, referente a menos de 33% de lesão tecidual. A maior média encontrada foi da congestão (1,3 \pm 0,6) no 14º dia de isquemia (**Figura 13**).

Figura 13. Médias dos escores das alterações histopatológicas isoladas em HUE no decorrer do tempo.



Letras diferentes significam médias significativamente diferentes ($p < 0,05$)
 Escores de isquemia segundo Sagsoz; Kisa; Apan, 2002

4.7. Médias dos escores de isquemia segundo as alterações histopatológicas isoladas nos HUD no decorrer do tempo

Assim como no HUE também é observado, no HUD, uma média de escore máxima igual a 1, no 21º dia: congestão ($1,0 \pm 0,1$); edema ($0,8 \pm 0,0$), hemorragia ($0,6 \pm 0,0$) e perda de coesão celular ($0,9 \pm 0,0$) (**Tabela 6**).

Tabela 6. Médias dos escores \pm epm de isquemia segundo as alterações histopatológicas isoladas nos HUD no decorrer do tempo

Alterações histológicas	Tempo (dias)				p*
	1 (n=12)	7 (n=12)	14 (n=12)	21 (n=12)	
Congestão	$0,7 \pm 0,0^a$	$1,4^b \pm 0,1^b$	$1,4 \pm 0,1^b$	$1,0 \pm 0,1$	0,030
Edema	$0,1 \pm 0,0^a$	$1,2 \pm 0,0^b$	$1,0 \pm 0,0^b$	$0,8 \pm 0,0$	0,000
Hemorragia	$0,0 \pm 0,0^a$	$0,5 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,0^b$	0,023
Coesão	$0,0 \pm 0,0^a$	$1,1 \pm 0,0^b$	$1,0 \pm 0,0^b$	$0,9 \pm 0,0$	0,000

**Kruskal-Wallis* epm= erro padrão da média

Escores de isquemia segundo Sagsoz; Kisa; Apan, 2002

Letras diferentes significam médias significativamente diferentes ($P < 0,05$)– Comparação múltipla entre tratamentos (Post Hoc – *Kruskal-Wallis*)

A maior média encontrada foi da congestão no sétimo e no 14º dias de isquemia ($1,4 \pm 0,1$) (**Figura 14 e 15**).

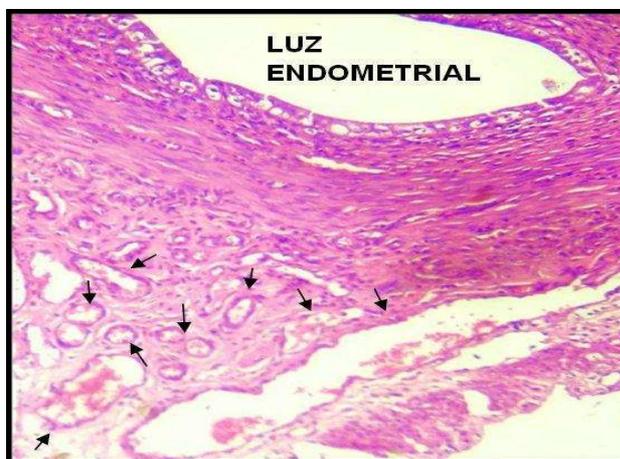
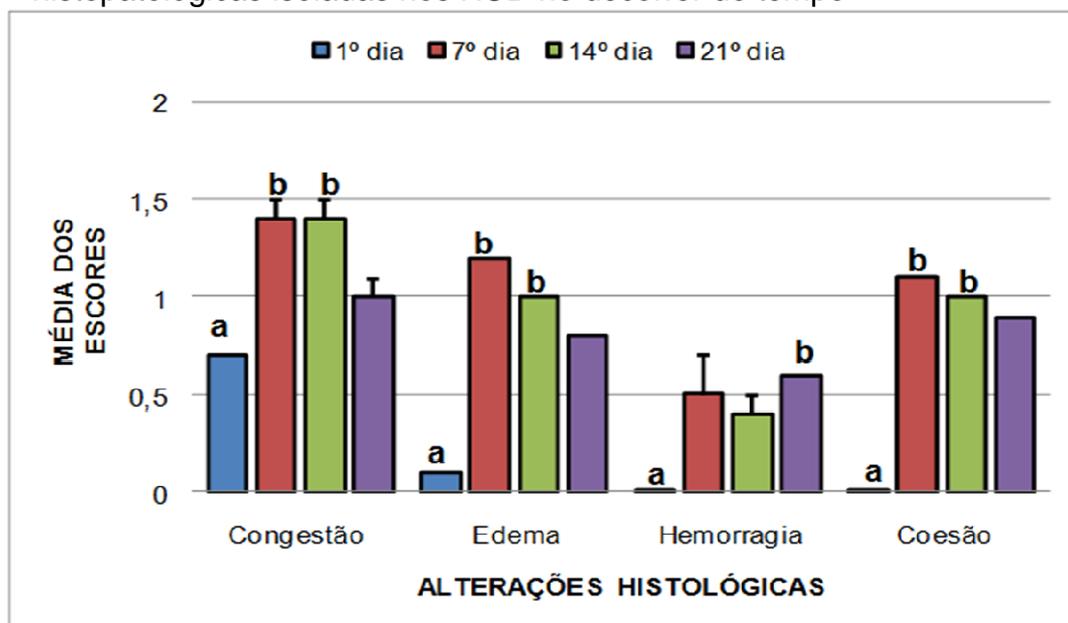


Figura 14 – Fotomicrografia (HE 100x) mostrando congestão grau 2 no útero (setas).

Figura 15. Médias dos escores de isquemia segundo as alterações histopatológicas isoladas nos HUD no decorrer do tempo



Letras diferentes significam médias significativamente diferentes ($P < 0,05$)
 Escores de isquemia segundo Sagsoz; Kisa; Apan, 2002

Observa-se que as médias dos escores decrescem a partir do sétimo dia, exceto quanto à hemorragia, que apresenta um crescimento

significativo no 21^o dia de isquemia em relação ao primeiro dia ($p < 0,05$) (**Tabela 6 e Figura 15**).

Esse decréscimo da congestão, edema e perda de coesão celular, no 21^o dia, acontece de tal maneira que quando comparado com as médias dos escores do primeiro dia, não há diferença estatística ($p > 0,05$), sendo os mesmos semelhantes entre si (**Tabela 6**).

4.8. Comparação das médias dos escores de congestão entre HUE e HUD

A partir desta seção, as alterações histológicas isoladas (congestão, edema, hemorragia e perda de coesão celular) de HUE são comparadas com as do HUD em cada grupo.

Tabela 7. Comparação entre as médias dos escores de congestão entre HUE (n=06) e HUD (n=12).

Tempo (dias)	Escore (média±epm)		
	Hemi-útero esquerdo	Hemi-útero direito	p*
1	0,0 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,03
7	1,0 ± 0,0	1,4 ± 0,1	0,12
14	1,3 ± 0,2	1,4 ± 0,1	1,00
21	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,1	1,00

* *Wilcoxon*

Escore de isquemia segundo Sagsoz; Kisa; Apan, 2002
 $p \leq 0,05$ – estatisticamente significativa

Congestão (**Figura 16**) no HUD tende ser superior à de HUE, exceto no 21^o dia de LAU, quando as médias se igualam (HUE: 1,0 ± 0,2; HUD: 1,0 ± 0,1). A maior diferença se encontra no 1^o dia (HUE: 0,0 ± 0,0; HUD: 0,7 ± 0,0) sendo estatisticamente significativa ($p = 0,03$). A comparação dos dias 7, 14 e 21 não mostrou diferença estatística ($p > 0,05$) (**Tabela 7 e Figura 17**).

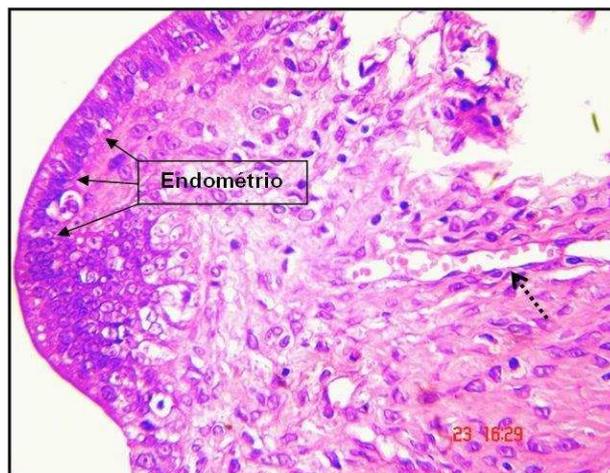
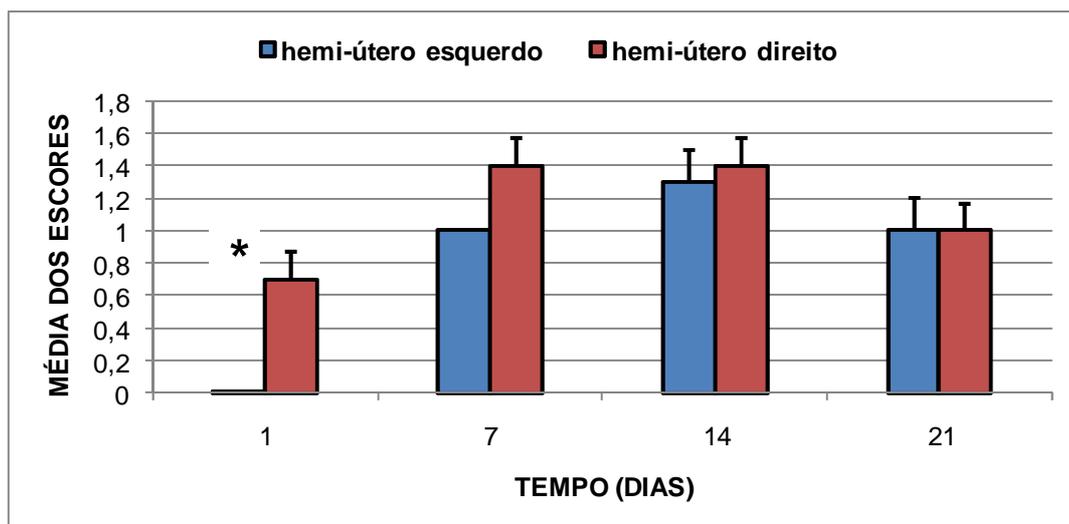


Figura 16. Fotomicrografia (HE 100x):mostrando congestão grau 1 no útero (seta tracejada).

Figura 17. Comparação das médias dos escores de congestão entre HUE e HUD.



* $p < 0,05$

Escores de isquemia segundo Sagsoz; Kisa; Apan, 2002

4.9. Comparação das médias dos escores de edema entre HUE e HUD

A média máxima de edema (**Figura 18**) observado em HUE foi 1 (lesão em menos de 33% do tecido observado), nos dias 7, 14 e 21 após a LAU. No entanto, no HUD, o máximo atingido foi de 1,2 (epm = 0,0) no sétimo dia, porém a partir deste dia a tendência do edema no HUD é

diminuir, já quando observado o HUE, nota-se que a média permanece a mesma (**Tabela 8, Figuras 19**).

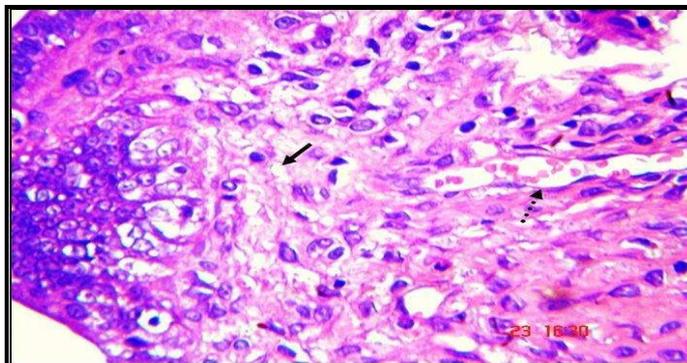


Figura 18. Fotomicrografia (HE 400x) mostrando congestão (seta tracejada) e edema (seta negra) grau 1 no útero.

Tabela 8. Comparação das médias dos escores de edema entre HUE (n=06) e HUD (n=12).

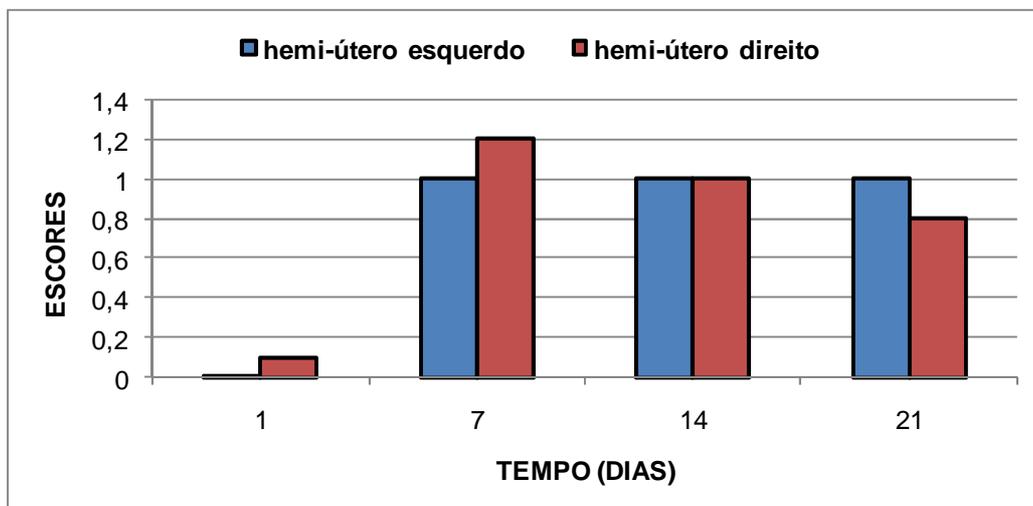
Tempo (dias)	Escore (média±epm)		p*
	Hemi-útero esquerdo	Hemi-útero direito	
1	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,50
7	1,0 ± 0,0	1,2 ± 0,0	0,25
14	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,00
21	1,0 ± 0,0	0,8 ± 0,0	0,50

**Wilcoxon*

Escore de isquemia segundo Sagsoz; Kisa; Apan, 2002
 $p < 0,05$ – estatisticamente significativa

Não houve nenhuma alteração significativa quando comparados os dados referentes ao edema. Os dois segmentos (HUE e HUD) foram semelhantes neste caso (**Tabela 8**).

Figura 19. Comparação das médias dos escores de edema entre HUE e HUD.



Escores de isquemia segundo Sagsoz; Kisa; Apan, 2002

4.10. Comparação das médias dos escores de hemorragia entre HUE e HUD

No primeiro dia após a LAU não se observa hemorragia (**Figura 20**) nos segmentos, porém com o decorrer do tempo é observado um pequeno índice (**Tabela 9**).

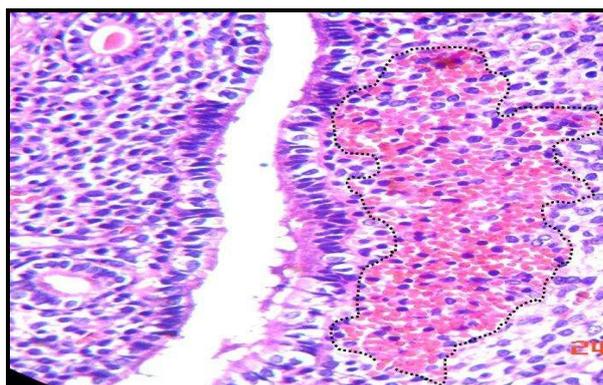


Figura 20. Fotomicrografia (HE 100x) mostrando hemorragia grau 2 (observe a demarcação em pontilhado) no útero.

Tabela 9. Comparação das médias dos escores de hemorragia entre HUE (n=06) e HUD (n=12).

Tempo (dias)	Escores (média±epm)		
	Hemi-útero esquerdo	Hemi-útero direito	p
1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,00
7	0,1 ± 0,1	0,5 ± 0,2	0,50
14	0,3 ± 0,2	0,4 ± 0,1	1,00
21	0,3 ± 0,2	0,6 ± 0,0	0,34

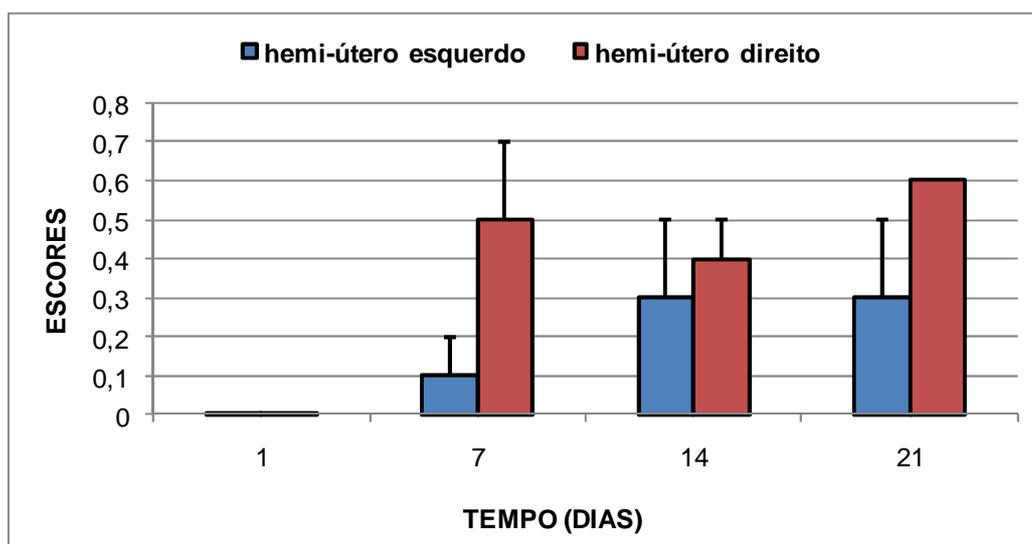
Wilcoxon

Escores de isquemia segundo Sagsoz; Kisa; Apan, 2002

* p < 0,05 – estatisticamente significante

Em HUE a maior média encontrada foi 0,3, nos 14^o e 21^o dias. No HUD a maior média encontra-se no 21^o dia após a LAU, e é o dobro da maior média de HUE, ou seja, 0,6. No entanto, a maior diferença encontrada entre a média de hemorragia de HUE e HUD foi ao sétimo dia, quando o índice do HUD (0,5 ± 0,2) superou em cinco vezes o de HUE (0,1± 0,1) (Tabela 9 e Figura 21).

Figura 21. Comparação das médias dos escores de hemorragia entre HUE e HUD.



Escores de isquemia segundo Sagsoz; Kisa; Apan, 2002

Apesar dessas grandes diferenças entre um segmento e outro, não houve nenhuma alteração significativa quando comparados os dados referentes à hemorragia (**Tabela 9**).

4.11. Comparação das médias dos escores de perda de coesão celular entre HUE e HUD

O comportamento da perda de coesão celular (**Figura 22**) nos tecidos foi muito semelhante ao comportamento do edema descrito na **Figura 18**.

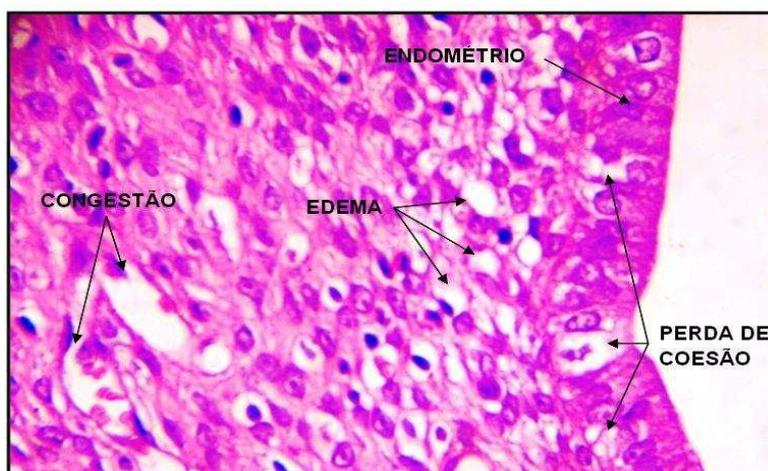


Figura 22. Fotomicrografia (HE 400x).mostrando congestão, edema e perda de coesão celular grau 1.

A média máxima de perda de coesão celular observado em HUE foi 1 (lesão em menos de 33% do tecido observado), nos dias 7, 14 e 21 após a LAU. No entanto, no HUD, o máximo atingido foi de 1,1 (epm = 0,0) no sétimo dia, porém a partir deste dia a tendência do edema no HUD é diminuir, já quando observado o HUE, nota-se que a média permanece a mesma (**Tabela 10, Figura 23**).

Tabela 10. Comparação das médias dos escores de perda de coesão celular entre HUE (n=06) e HUD (n=12).

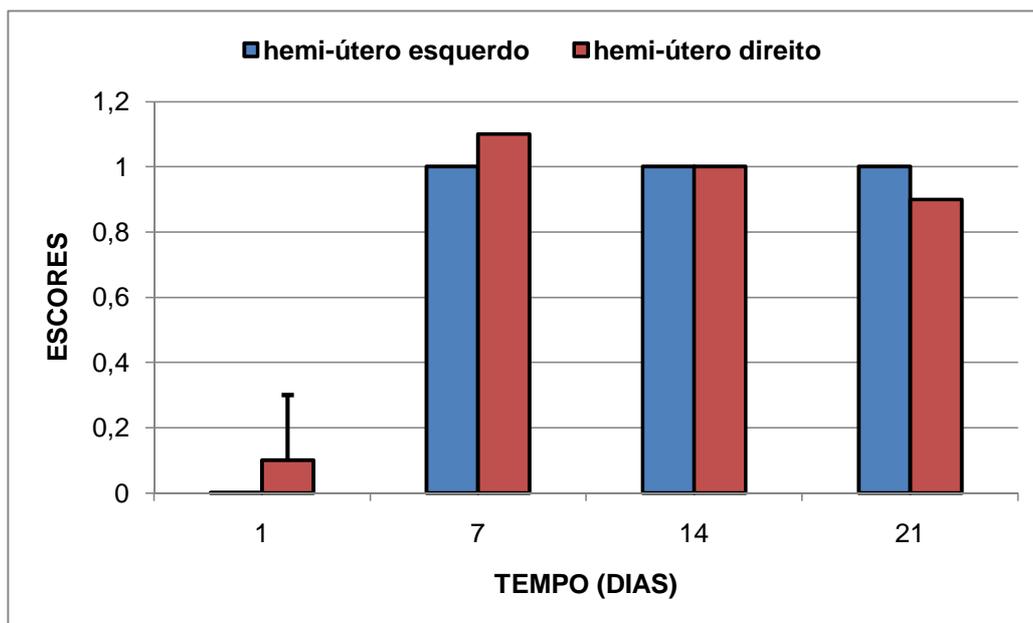
Tempo (dias)	Escores (média±epm)		p*
	Hemi-útero esquerdo	Hemi-útero direito	
1	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,2	1,00
7	1,0 ± 0,0	1,1 ± 0,0	0,50
14	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,00
21	1,0 ± 0,0	0,9 ± 0,0	1,00

**Wilcoxon*

Escores de isquemia segundo Sagsoz; Kisa; Apan, 2002

p < 0,05 – estatisticamente significativa

Figura 23. Comparação das médias dos escores de perda de coesão celular entre HUE e HUD.



Escores de isquemia segundo Sagsoz; Kisa; Apan, 2002

Não houve nenhuma alteração significativa quando comparados os dados referentes à perda de coesão celular. Os dois segmentos (HUE e HUD) foram semelhantes neste caso (**Tabela 10**).

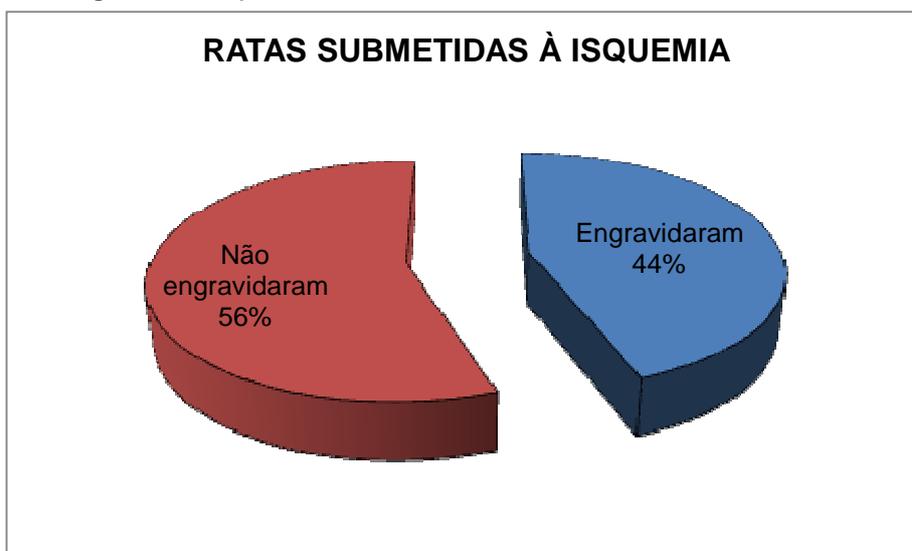
A única diferença significativa, portanto, observada quando comparados as alterações histológicas isoladas (congestão, edema, hemorragia e perda de coesão celular), foi encontrada no primeiro dia de

isquemia entre a congestão de HUE (0 ± 0) e a congestão do HUD ($0,7 \pm 0,0$) ($p = 0,031$) (Tabela 7).

4.12. Avaliação da fertilidade através da porcentagem das ratas grávidas após a LAU direita

A porcentagem de ratas grávidas que foram submetidas à isquemia foi de 44,4%, o restante (55,6%) não engravidou ($p = 0,024$) (Figura 24). Ao se analisar o grupo controle, observa-se que 100% das ratas que copularam engravidam (Tabela 11).

Figura 24. Avaliação da fertilidade através da porcentagem das ratas grávidas após a LAU direita.



$p = 0,024$

TABELA 11. Avaliação da fertilidade através da porcentagem das ratas grávidas após a LAU direita.

	Grupo LAU*	Grupo Controle
	N (%)	N (%)
Engravidaram	08 (44,4)	06 (100)
Não engravidaram	10 (55,6)	0 (0)

Qui-Quadrado de *Pearson*

$p = 0,024$ (Razão de verossimilhança)

* $n = 18$ (referente aos três grupos experimentais)

LAU = Ligadura da artéria uterina direita

4.13. Avaliação da fertilidade através da média do número de fetos após a LAU direita

Comparou-se também o número de recém-nascidos das ratas testadas que engravidaram com o grupo controle de ratas grávidas, observou-se uma redução na média de nascimentos ($p = 0,029$) (**Tabela 12**).

Tabela 12. Avaliação da fertilidade através da média do nº de fetos de ratas após a LAU direita.

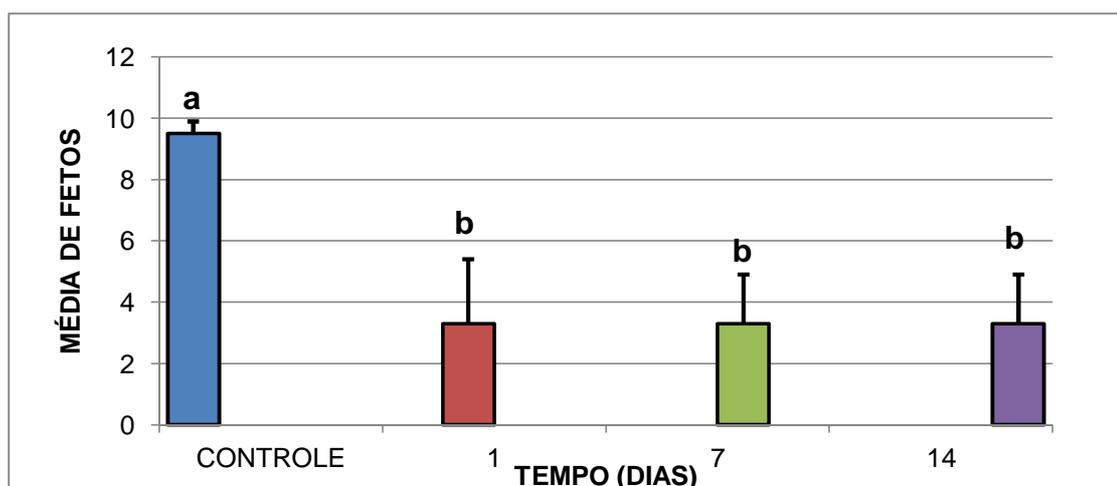
Tempo da ligadura (dias)	Média \pm epm
Controle (n=6)	9,5 \pm 0,4 ^a
1 (n=6)	3,3 \pm 2,1 ^b
7 (n=6)	3,3 \pm 1,6 ^b
14 (n=6)	3,3 \pm 1,6 ^b

*OneWay ANOVA

Letras diferentes significam médias significativamente diferentes ($p=0,029$) – Tukey

As ratas que foram submetidas à LAU, independente de quanto tempo ficaram após este procedimento, apresentaram uma mesma média do número de fetos nascidos (**Figura 25**).

Figura 25. Avaliação da fertilidade através da média do nº de fetos após a LAU direita.



Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$)

4.14. Médias dos números de folículos e corpos lúteos dos ovários esquerdos no decorrer do tempo

Não há diferenças entre os folículos e corpos lúteos do ovário esquerdo (controle) (**Figura 26**) no decorrer do tempo de LAU (**Tabela 13**), porém nota-se um aumento do número de folículos no decorrer do tempo (**Figura 27**).

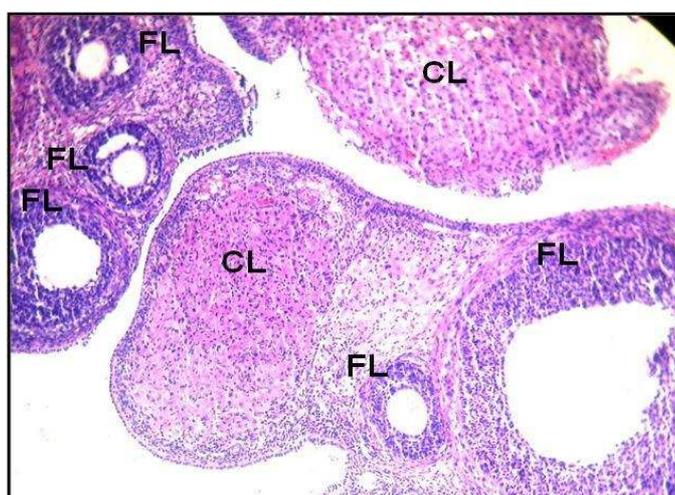


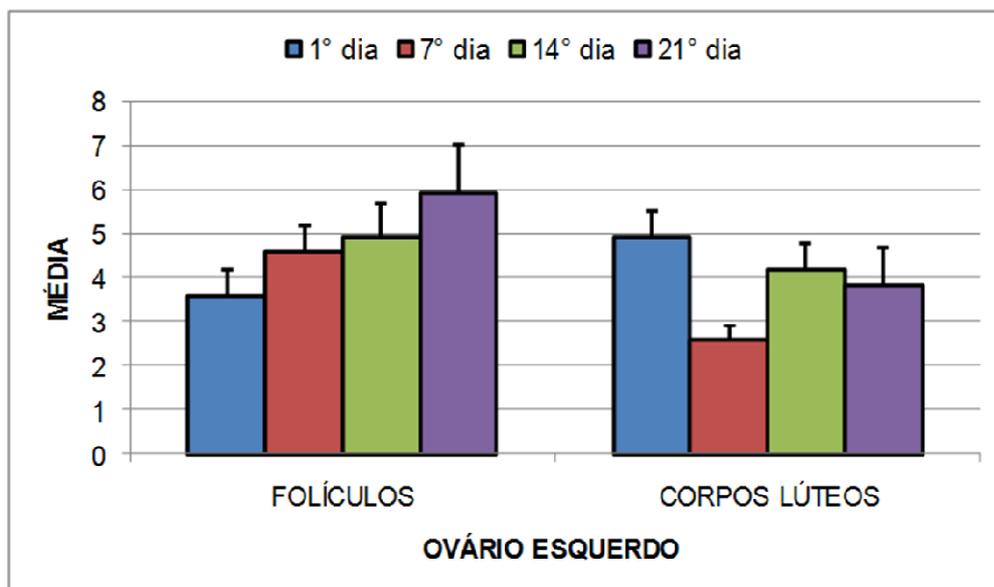
Figura 26. Fotomicrografia (HE 100x) mostrando corpos lúteos (CL) e folículos (FL).

Tabela 13. Médias \pm epm dos números de folículos e corpos lúteos dos ovários esquerdos no decorrer do tempo.

	Tempo (dias)				p*
	1 (n=06)	7 (n=06)	14 (n=06)	21 (n=04)	
Folículos	3,6 \pm 0,6	4,6 \pm 0,6	4,9 \pm 0,8	5,9 \pm 1,1	0,431
Corpos Lúteos	4,9 \pm 0,6	2,6 \pm 0,3	4,2 \pm 0,6	3,8 \pm 0,9	0,111

*Kruskal-Wallis

Figura 27. Médias dos números de folículos e corpos lúteos dos ovários esquerdos no decorrer do tempo.



epm= erro padrão da média

4.15. Médias dos números de corpos lúteos e folículos dos ovários direitos no decorrer do tempo

Há diferenças entre os folículos do ovário direito (teste) no decorrer do tempo de isquemia ($p = 0,04$). Da mesma forma, há diferenças entre os corpos lúteos no decorrer do tempo ($p = 0,028$). (**Tabela 14**).

Tabela 14. Médias \pm epm dos números de folículos e corpos lúteos dos ovários direitos no decorrer do tempo.

	Tempo (dias)				p*
	1 (n=06)	7 (n=05)	14 (n=06)	21 (n=05)	
Folículos	3,4 \pm 0,4 ^a	5,7 \pm 1,2	8,0 \pm 1,6 ^b	4,6 \pm 0,4	0,040
Corpos Lúteos	2,0 \pm 0,3 ^a	4,5 \pm 0,3 ^b	3,4 \pm 0,7	4,4 \pm 0,9	0,028

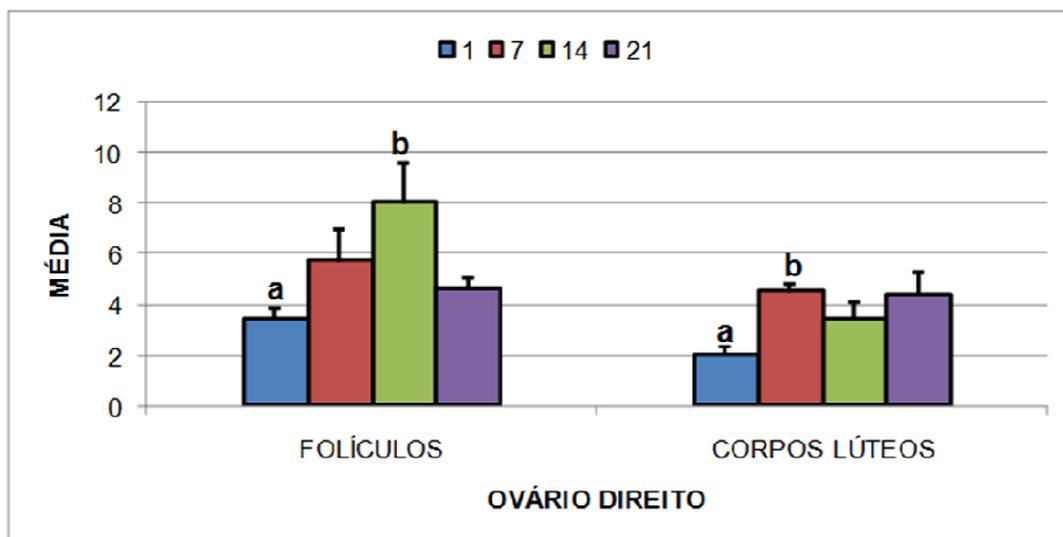
*Kruskal-Wallis

Letras diferentes significam médias significativamente diferentes ($P < 0,05$) – comparação múltipla entre tratamentos (*Post Hoc – Kruskal-Wallis*)

No 14^o dia de isquemia, observa-se um pico (**Figura 28**) no número de folículos dos ovários direitos ($8,0 \pm 1,6$), e quando comparado ao

número de folículos do primeiro dia ($3,4 \pm 0,7$) nota-se uma diferença significativa ($p < 0,05$) (Tabela 14).

Figura 28. Médias dos números de folículos e corpos lúteos dos ovários direitos no decorrer do tempo.



Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$)

4.16. Comparação das médias dos folículos ovarianos direitos e esquerdos no decorrer do tempo

Não há diferenças do número de folículos quando comparados ovários direito e esquerdo, mesmo no 14º dia de isquemia, em que a média do número de folículos do ovário direito ($8,08 \pm 1,16$) atingiu quase o dobro da média do número de folículos do ovário esquerdo ($4,91 \pm 0,8$) (Tabela 15 e Figura 29).

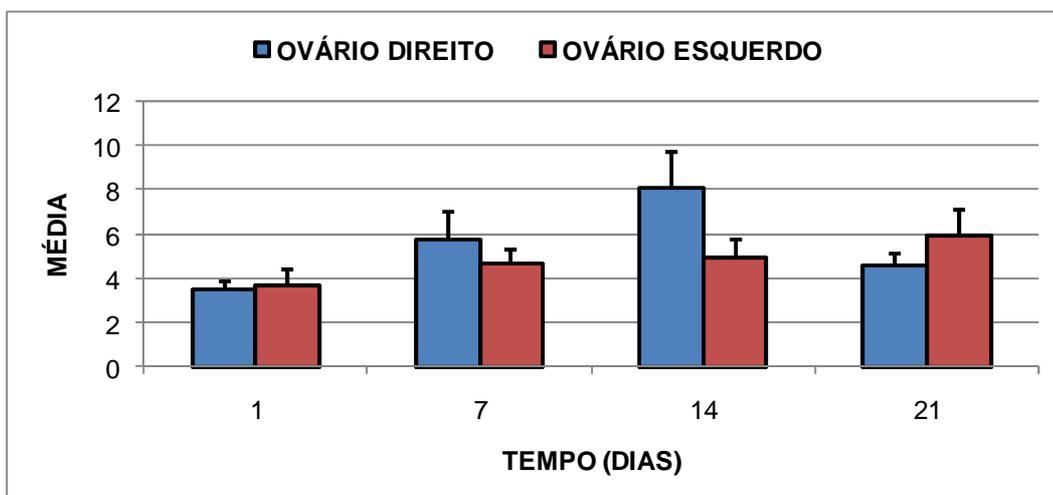
Tabela 15. Comparação das médias dos folículos ovarianos direitos e esquerdos no decorrer do tempo.

Tempo (dias)	Nº de folículos (média±epm)		p*
	Ovário Direito	Ovário Esquerdo	
1	$3,45 \pm 0,4$	$3,65 \pm 0,7$	0,684
7	$5,76 \pm 1,2$	$4,68 \pm 0,6$	0,138
14	$8,08 \pm 1,6$	$4,91 \pm 0,8$	0,400
21	$4,60 \pm 0,5$	$5,95 \pm 1,1$	0,109

*Wilcoxon

epm= erro padrão da média

Figura 29. Comparação das médias (\pm epm) dos folículos ovarianos direitos e esquerdos no decorrer do tempo.



epm= erro padrão da média

4.17. Comparação das médias dos corpos lúteos ovarianos direitos e esquerdos no decorrer do tempo

Quando os corpos lúteos são comparados entre os ovários direito e esquerdo, observam-se diferenças significativas nos dois primeiros dias de isquemia. No primeiro dia, a média dos corpos lúteos do ovário esquerdo ($4,9 \pm 0,6$) é maior que o dobro da média dos ovários direitos ($2,0 \pm 0,3$) ($p = 0,042$). No sétimo dia há, praticamente, uma inversão daqueles dados. A média dos corpos lúteos dos ovários esquerdos ($2,6 \pm 0,3$) se torna quase a metade da média dos ovários direitos ($4,5 \pm 0,3$) ($p = 0,043$) (Tabela 16 e Figura 30).

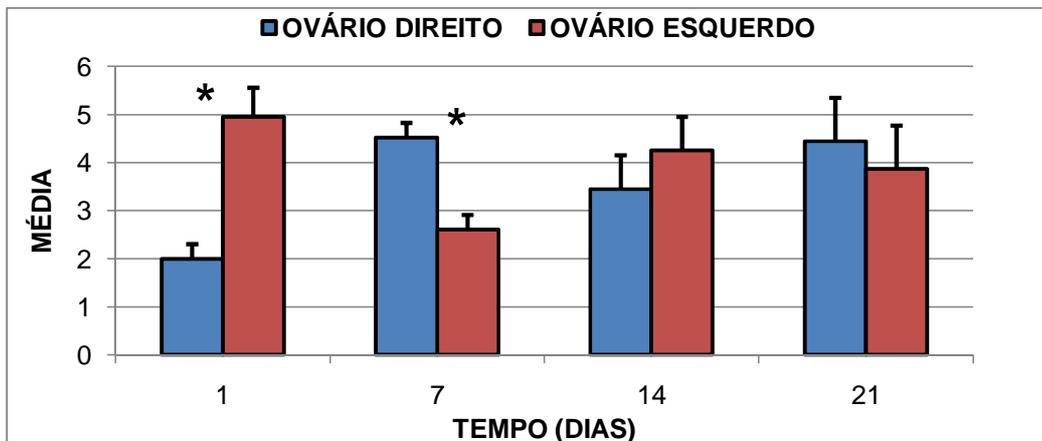
Tabela 16. Comparação das médias dos corpos lúteos ovarianos direitos e esquerdos no decorrer do tempo.

Tempo (dias)	Nº de corpos lúteos (média \pm epm)		
	Ovário Direito	Ovário esquerdo	p*
1	2,0 \pm 0,3	4,9 \pm 0,6	0,042*
7	4,5 \pm 0,3	2,6 \pm 0,3	0,043*
14	3,4 \pm 0,7	4,2 \pm 0,7	0,115
21	4,4 \pm 0,9	3,8 \pm 0,9	0,273

*Wilcoxon

epm= erro padrão da média

Figura 30. Comparação das médias dos corpos lúteos ovarianos direitos e esquerdos no decorrer do tempo.



* $p < 0,05$

5. Discussão

No presente estudo, o modelo da técnica da LAU, foi idealizado em ratas não-grávidas com o objetivo de avaliar a isquemia uterina através do exame histopatológico, e avaliação da fertilidade após a LAU. Inicialmente esta técnica, que utilizava ratas não-grávidas, foi desenvolvida com um único intuito: avaliar a ovulação após a isquemia (PEPPLER, 1976a). Atualmente muitos trabalhos são realizados com as mesmas finalidades. OKAZAKI *et al.* (2005) realizou a LAU a fim de avaliar a isquemia uterina buscando a presença de apoptose no útero isquemiado. ZACKRISSON *et al.*, 2000; PRADO; AOKI; ALDRIGHI, 2007 também utilizaram a LAU para avaliar as conseqüências da isquemia na ovulação, porém a ligadura se localizou na porção superior da artéria uterina, próximo à anastomose com a artéria ovariana.

Os primeiros modelos de LAU em animais experimentais surgiram em 1964 (WIGGLESWORTH, 1974; BRUCE, 1972; VELASCO *et al.*, 1973). A técnica normalmente era efetuada no 17º dia de gravidez, realizando-se ligadura unilateral da artéria uterina. Bruce (1972) desenvolveu técnicas de LAU realizadas no dias 1, 2 e 7 da gestação. LAU associada à ligadura das artérias ovarianas, foi realizada em cadelas em 1980 (O'LEARY, 1980). Pan e Yu (2002) desenvolveram a LAU só que no segmento medial da artéria e não mais no segmento inferior. Estudos mais modernos, utilizam a LAU, a fim de avaliar alterações bioquímicas em ovários isquemiados (TASKIN *et al.*, 1998), e avaliar a direção do fluxo sanguíneo e mudanças na resistência em ovários de ratas grávidas (MASSA; BRUCE, 1997).

A interrupção do fluxo sanguíneo na porção inferior da artéria uterina direita, mesmo atualmente, ainda é objeto de estudo e apreciação. Muitas questões permanecem pouco esclarecidas. Uma delas é quanto às alterações em HUD em relação à isquemia na porção inferior. Por este motivo, foi realizada a secção em HUD em duas porções (distal e proximal à ligadura) a fim de avaliar se havia alguma porção que sofreria um insulto

isquêmico maior que a outra. Após avaliação estatística, não se observou diferença significativa dos escores histopatológicos de isquemia entre o hemi-útero direito distal e o proximal em nenhum grupo estudado, ou seja, os segmentos são semelhantes entre si. Em concordância com esses dados, Bruce (1972) afirmou que quando a ligadura é realizada nos dias 1, 2 e 7 da gestação não se notou nenhum efeito aparente (não afetou a taxa de gravidez, nem o número de fetos vivos e nem a incidência de malformação fetal). Portanto, quando a ligadura ocorre no início da gestação, mesmo após a isquemia produzida, não há diferença no peso fetal em relação à proximidade da ligadura, sugerindo que se há alguma alteração isquêmica no útero, ela acontece de maneira uniforme em todo o órgão.

No entanto, a técnica realizada no 17º dia da gestação, consistindo de ligadura unilateral da artéria uterina teve como consequência, morte de alguns fetos e redução significativa do peso dos fetos do corno experimental ao nascer. Os fetos que foram mais seriamente afetados quanto à restrição do crescimento estavam mais próximos da ligadura da artéria (WIGGLESWORTH, 1974). Alguns autores afirmam que há diferença dos pesos de fetos de ratas ligadas em relação à proximidade da ligadura da artéria uterina (WIGGLESWORTH, 1974; HAUGAARD, BAUER, 2001; NÜSKEN *et al*, 2007). Huizinga (2004) afirma que a ligadura da artéria uterina na porção inferior do corno uterino causa uma obstrução completa de suporte sanguíneo aos fetos proximais à sutura e, neste mesmo estudo, mostrou que após a LAU, no 17º dia de gestação, houve morte e reabsorção parcial de 30% dos fetos. Tendo em vista este índice de mortalidade fetal quando se desempenha esta técnica, alguns autores sugeriram novas técnicas (PAN; YU, 2002; HUIZINGA *et al.*, 2004; TANAKA *et al.*, 1994; BRUCE, 1976a; PEPPLER, 1976a).

O fato de as alterações fetais, quanto à proximidade da ligadura, ocorrerem somente quando a LAU é realizada no final da gravidez, gera uma hipótese que talvez não haja uma alteração específica no útero. Deve-se lembrar que, em nível funcional, a placenta integra a fisiologia materno-fetal, os sistemas imunológicos e endocrinológicos. As complicações que se

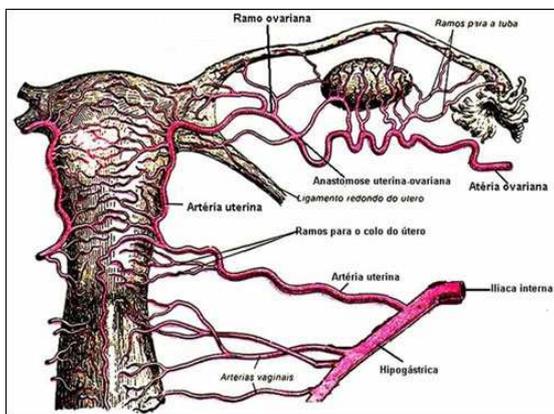
manifestam na gravidez podem refletir os erros que ocorreram no desenvolvimento placentário (NORWITZ; SCHUST; FISHER, 2001). A LAU, no final da gestação, pode afetar o desenvolvimento da placenta. Além disso, a restrição do crescimento fetal é secundária também à ação de mediadores circulantes e não somente ao insulto isquêmico local (THAETE; NEERHOF, 2006).

Quando se comparou a soma dos escores do HUD no decorrer do tempo, evidenciou-se diferença estatisticamente significativa nos critérios histopatológicos de isquemia, demonstrando que a partir do sétimo dia da LAU os escores aumentaram ($p = 0,003$) em comparação com as ratas do dia 1, reflexo da obstrução aguda da artéria uterina. Os vasos uterinos restantes, após a LAU unilateral, presumivelmente, compensam a perda precoce do suprimento de uma artéria uterina, embora seja provável que a ligadura prejudica, pelo menos temporariamente, a circulação uterina (BRUCE, 1976a; LICHTINGER *et al.*, 2003).

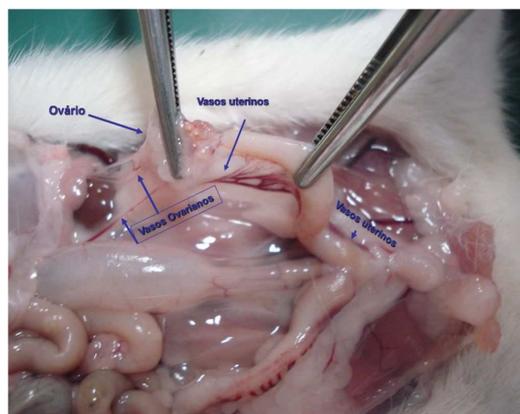
Observou-se, após o sétimo dia, que as somas dos escores eram similares, porém apresentando decréscimo com o decorrer do tempo ($p > 0,05$), mostrando uma diminuição ou até suspensão do efeito isquêmico. Confirmando este fato, de acordo com a literatura, a ligadura da artéria uterina na porção inferior do corno uterino causa uma obstrução completa de suporte sanguíneo, porém há um suprimento sanguíneo ao útero, após a ligadura uterina, que é derivada da artéria ovariana (HUIZINGA *et al.*, 2004; KIM; PAXTON; LEE, 2008; KIM *et al.*, 2006).

Neste aspecto, a interação das artérias uterina e ovariana se mostra como importante ferramenta na resposta do HUD à isquemia. A vascularização nas ratas se assemelha com a das mulheres. O suprimento sanguíneo ovariano é derivado de dois maiores sítios: a artéria ovariana, que deriva, principalmente, da aorta abdominal; e o ramo ovariano derivado da artéria uterina (MASSA; BRUCE, 1997; ZACKRISSON *et al.*, 2000; PRADO; AOKI; ALDRIGHI, 2007). A artéria uterina pode se originar como ramo da artéria hipogástrica (6%), como primeiro ramo da artéria glútea inferior (45%); segundo ou terceiro ramo da artéria glútea inferior (6%), e,

finalmente, as artérias uterinas, e as glúteas superiores e inferiores se trifurcam (43%) (GOMEZ-JORGE *et al.*, 2003).



Fonte: UNIFESP (www.unifesp.br)
Figura 31 – Vascularização do útero e do ovário em mulheres.



Fonte: Medeiros e cols.
Figura 32 – Vascularização do útero e do ovário em ratas.

É importante ressaltar o que descrevem Prado, Aoki e Aldrighi (2007), ou seja, que há uma grande variabilidade na irrigação dos ovários em mulheres. Há casos em que a irrigação dos ovários deriva da artéria ovariana, e em outros casos a irrigação depende exclusivamente de ramos da artéria uterina (PRADO; AOKI; ALDRIGHI, 2007), sendo provável que o mesmo possa acontecer com as ratas.

Vários autores sugerem que existe um suprimento arterial imediato ao útero após a oclusão da artéria uterina, pelo menos a porção proximal ao ovário, inicialmente (WIGGLESWORTH, 1974; HAUGAARD, BAUER, 2001; NÜSKEN *et al.*, 2007; KIM, PAXTON, LEE, 2008; KIM *et al.*, 2006). Para Kim *et al.* (2006) uma das principais causas de insucesso de EAU, no tratamento de miomatoses uterinas, é o rápido estabelecimento da circulação colateral uterina logo após este procedimento. Chait, Moltz e Nelson (1968) afirmam que após a oclusão de artérias pélvicas, as anastomoses funcionam imediatamente. Porém há autores que acreditam que a circulação colateral não assume seu papel de suprir o útero rapidamente, sugerem que o miométrio seria muito resistente à isquemia e,

com o decorrer do tempo, os vasos colaterais adotariam o seu papel na reperfusão (BANU *et al.*, 2007; BURBANK, HUTCHINS, 2000).

Essa reperfusão vem da circulação colateral típica da topografia. O miométrio tem um suprimento sanguíneo extremamente abundante; existem muitos cursos arteriais alternativos para garantir uma perfusão miometrial em caso de obstrução sanguínea (LICHTINGER *et al.*, 2003). Além da artéria ovariana, encontram-se pequenos ramos da artéria vesical (BRUCE, 1972). Há outros que descrevem, além das artérias ovarianas, as artérias vaginais (BANU *et al.*, 2007). Bruce (1976b) descreve como vasos colaterais do útero as artérias ovarianas, e as artérias vaginais e hipogástricas. Existem relatos de outras artérias que apresentam o potencial para suprir o útero: mesentérica inferior, lombar, vertebral, sacral média, circunflexa ilíaca profunda, epigástrica inferior, circunflexa femoral medial e circunflexa femoral lateral; além das inúmeras arteríolas do retroperitônio e do ligamento largo que alcançam o útero (LICHTINGER *et al.*, 2003).

Estes vasos colaterais podem prover um aumento no suprimento da circulação uterina através de mecanismos compensatórios como o aumento do fluxo (BRUCE, 1972; NÜSKEN *et al.*, 2007; KIM, PAXTON, LEE, 2008; KIM *et al.*, 2006; CHAIT; MOLTZ; NELSON, 1968). Além disso, Bruce (1972) afirma que as anastomoses formadas com o útero têm tempo suficiente para retomar e ajustar todas as demandas dos embriões nos casos em que a LAU é realizada até o sétimo dia da gravidez. Essas anastomoses são evidentemente importantes para promover um crescimento normal e manutenção dos conceptos durante a gravidez em ratas que foram submetidas à LAU, como também, têm valor fundamental na manutenção dos úteros submetidos à LAU em ratas não-grávidas.

Durante a gravidez há intensa angiogênese fisiológica deste período, que promovem, dentre outras ações, uma redução da resistência vascular nas arteríolas, maior circulação sanguínea e maior circulação de fatores endoteliais de crescimento (TEIXEIRA *et al.*, 2008; PAVELOCK, 2001). Portanto a gravidez é momento em que a formação de vasos colaterais se torna mais propícia.

O útero sofre adaptação dramática durante o ciclo reprodutivo e a gravidez. Há mudanças marcantes na permeabilidade vascular uterina, no crescimento, na vasodilatação, e no fluxo sanguíneo para acomodar as modificações celulares necessárias especialmente durante a gravidez. Muitos fatores angiogênicos têm sido propostos para mediar esses processos vasculares (PAVELOCK, 2001). Angiogênese é um benefício potencial em casos em que há alterações na perfusão podendo levar a danos teciduais (WALSHE; D'AMORE, 2008).

Além da avaliação dos HUD, houve a análise de HUE. Esperava-se que, à análise histológica, HUE estivessem sem nenhuma alteração (pois eram os controles) como de fato ocorreu no grupo que representa o primeiro dia após a LAU. No entanto, após o sétimo dia, surpreendentemente, houve um acréscimo nos escores ($p = 0,001$).

Os autores afirmam que a lesão por IR pode gerar danos às proteínas da membrana celular e aos endotélios dos capilares, gerando alterações como edema, congestão, perda de coesão celular e hemorragia (SAGSÖZ; KISA; APAN; 2002; GILMONT *et al.*, 1998; COLGAN *et al.*, 2003; CELIK *et al.*, 2004; PEREIRA, 2000; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; MCCANCE, 1998). Porém HUE não sofreram a interrupção do fluxo arterial.

Pode-se questionar quanto à manipulação de HUE no intra-operatório, porém se essas alterações (edema, congestão, hemorragia e perda de coesão celular) estivessem relacionadas com o manuseio dos úteros esquerdos através das pinças, era esperado que acontecessem a partir do grupo do dia 1. Como não foi o que ocorreu, demonstra-se que esses escores aumentados não foram desencadeados pela manipulação cirúrgica.

Okazaki *et al.* (2005) afirmam que, em seu estudo, o útero controle, após isquemia uterina unilateral, não sofreu alterações, entretanto a duração da isquemia foi de apenas 30 minutos. Havendo concordância com o presente estudo, pois a alteração isquêmica no útero controle só foi observada após 1 dia de isquemia. Thaete e Neerhof (2006) apresentam um estudo realizado em ratas as quais eram submetidas à interrupção do fluxo

sanguíneo de apenas um útero, no 17º dia de gravidez. Observaram que a cessação do suprimento sanguíneo unilateral levou à redução do crescimento fetal não só do útero teste, mas também do útero controle (contralateral à interrupção). Sugeriram que a redução do crescimento fetal foi causada não só pela interrupção do suprimento sanguíneo à unidade uteroplacentária, mas também por mediadores que são produzidos em resposta ao insulto isquêmico. Estes mediadores são a ET1 e o PAF, que agem sinergicamente produzindo uma diminuição do fluxo local. Neste mesmo trabalho, verificou-se que a expressão da ET1 e PAF se comportava de maneira similar nos dois úteros (teste e controle) reforçando a consideração de que a restrição do crescimento fetal é secundária também à ação de mediadores circulantes e não somente ao insulto isquêmico local. Existem vários outros tipos de mediadores que participam do mecanismo da IR: leucotrienos, tromboxano, prostaglandinas (CAMPOS, YOSHIDA, 2004); TNF, IL-1 (KERRIGAN; STOTLAND, 1993; OKAZAKI *et al.*, 2005)

Mesmo não tendo sido realizada pesquisa de mediadores no presente estudo, observou-se claramente que a isquemia produzida no útero direito, de alguma forma afetou o útero esquerdo. Sabe-se que o útero, apesar de bicorno, é um só, e é possível imaginar que o fato de um corno uterino entrar em isquemia e sofrimento possa promover alterações em todo o órgão. Por este mesmo motivo não se considera o útero direito e o útero esquerdo, de uma mesma rata, como variáveis independentes, e sim como variáveis relacionadas.

Após esse aumento inicial dos escores no sétimo dia, as médias, no decorrer do tempo, permaneceram semelhantes entre si ($p > 0,05$), mostrando uniformidade do tecido uterino esquerdo a partir da primeira semana de LAU, ou seja, do sétimo ao 21º dia após a LAU não se observou mais aumento da soma dos escores referentes à isquemia uterina, falando a favor da recuperação do suprimento sanguíneo uterino por meio de outros vasos (colaterais) e a conseqüente diminuição da produção de mediadores circulantes responsáveis pelo insulto no tecido uterino.

Depois de estudar HUD e HUE isoladamente, foi realizada a comparação os hemi-úteros teste com seus respectivos controles. A estratégia de utilizar um dos cornos uterinos como teste e o outro como controle foi extraída de outros estudos (WIGGLESWORTH, 1974; BRUCE, 1972; VELASCO *et al.*, 1973; TANAKA *et al.*, 1994; THAETE; NEERHOF, 2006; OKAZAKI *et al.*, 2005).

Observou-se que, em todos os períodos de tempo estudados, o valor dos escores do HUD é superior ao de HUE, porém só se pode afirmar isso de maneira significativa no grupo do dia 1 ($p < 0,026$), ou seja, depois do primeiro dia não existiu outro momento em que houve diferença do útero teste e seu controle referente. O agravo isquêmico, do ponto de vista histológico, não progrediu no útero teste no decorrer do tempo, semelhantemente ao que ocorreu com o útero controle. Esta informação estabelece uma idéia de conservação uterina após a isquemia ou a uma resolução espontânea dos efeitos isquêmicos através da circulação colateral, fornecendo uma boa expectativa quanto à fertilidade das ratas. O'Leary (1980) realizou LAU associado à ligadura das artérias ovarianas, em cadelas, e evidenciou que os tecidos uterinos permaneciam viáveis após a isquemia.

Estudos em mulheres mostram que a isquemia uterina para tratamento de miomas não prejudica a função uterina. Quando se realiza EAU a principal complicação é a insuficiência ovariana e não a necrose uterina (DONNEZ; JADOUL, 2002; TAYLOR; GOMEL, 2008; WALKER; PELAGE, 2002; RAZAVI *et al.*, 2002; TROPEANO *et al.*, 2004). Muitos autores também declaram LAU como uma técnica que mantém a funcionalidade uterina, ou seja, que não há lesões isquêmicas expressivas, mantendo então a fertilidade (LIU *et al.*, 2006; SENTILHES *et al.*, 2008; HOLUB *et al.*, 2008; HEBISCH; HUCH, 2002). Alguns afirmam que, em seus dados, o útero após a isquemia não mostrou qualquer sinal laboratorial detectável de isquemia, necrose ou inflamação (BANU *et al.*, 2007).

Ao se avaliar essas alterações histopatológicas de maneira isolada, percebe-se que a diferença significativa entre a soma dos escores

do HUD e HUE que ocorreu no grupo do dia 1 após a LAU, fez-se à custa da congestão, pois é a única alteração isolada que se diferencia estatisticamente do útero controle. Os escores referentes ao edema, a hemorragia e a perda de coesão celular não apresentaram diferenças estatísticas em relação ao útero controle.

Em HUE, as médias dos escores de edema, hemorragia e perda de coesão celular não ultrapassaram o valor 1 (máximo de 3). A maior média encontrada foi da congestão ($1,3 \pm 0,6$) no 14º dia de isquemia (máximo de 3), mas após o 14º dia, até as médias dos escores de congestão não ultrapassaram o valor 1 (máximo de 3), ou seja, no 21º dia não houve média de escore superior a lesões acima de 33% do tecido.

Os escores de edema e de perda de coesão celular se comportaram exatamente da mesma forma, em todos os dias avaliados, afetando menos de 33% dos tecidos isquemiados. Da mesma maneira, estudo realizado com a ligadura da artéria ovariana e ratas falsamente operadas, observou-se, em estudos histológicos, que não havia diferenças entre o edema e a perda de coesão celular nestes dois grupos (ZACKRISSON, 2000).

Assim como no HUE também foi observado, no HUD, uma média de escore máxima igual a 1 (máximo de 3), no 21º dia. A maior média encontrada foi da congestão no sétimo e no 14º dias de isquemia. Observa-se que as médias dos escores decrescem a partir do sétimo dia, exceto quanto à hemorragia, que apresenta um crescimento significativo no 21º dia de isquemia em relação ao primeiro dia ($p < 0,05$). Esse decréscimo da congestão, edema e perda de coesão celular, no 21º dia, acontece de tal maneira que quando comparado com as médias dos escores do primeiro dia, não há diferença estatística ($p > 0,05$), sendo os mesmos semelhantes entre si. Estudo avaliando o efeito da IR em ovários demonstrou que, no grupo que sofreu isquemia, mínimo a moderado edema, congestão, hemorragia e perda de coesão celular foram evidenciados (SAGSÖZ; KISA; APAN, 2002). Yazici *et al.* (2007) também demonstraram a presença destas quatro alterações em ovários isquemiados. Dados tais também podem ser

avaliados no útero sob isquemia. Outro estudo realizando transplante de úteros de ovelhas, em que foi promovido uma hora de isquemia, não se observaram também lesões graves de reperfusão (WRANNING *et al.*, 2008). Lichtinger *et al.* (2003) também afirmam que a oclusão das artérias uterinas, para tratamento de miomatose, extingue os miomas sem afetar permanentemente o endométrio.

A congestão e o edema foram as primeiras alterações histológicas, a serem identificadas após a isquemia, ocorrendo em um período de 24 horas após o procedimento (útero teste), alteração tal que só se tornou apresentável no útero controle a partir do 7º dia. Em estudo que utilizou clampeamento da artéria uterina em ratas observou-se, após 30 minutos de isquemia, seguida de seis horas de reperfusão, o aparecimento de congestão (OKAZAKI *et al.*, 2005). Noutro trabalho, que promovia a isquemia ovariana e em que se avaliavam as alterações histológicas, observou-se que a partir de 8 horas de isquemia, a primeira alteração que se apresentou foi a congestão. A segunda alteração que surgiu foi a hemorragia, sendo visualizada entre 12 e 24 horas de isquemia (TASKIN *et al.*, 1998). No presente estudo, a hemorragia só foi identificada após o primeiro dia, tanto no útero esquerdo quanto no direito.

Quando se avaliou a resposta dos ovários quanto a LAU na porção inferior da artéria uterina direita, observou-se que as médias do número de folículos e de corpos lúteos dos ovários esquerdos eram semelhantes entre si no decorrer do tempo. Mesmo ocorrendo lesões histológicas nos úteros controle, não houve diferença nos ovários controle. Assim como em um estudo que realizou torções anexiais unilaterais e comparou os ovários contralaterais (controles), estes ovários não apresentavam nenhuma alteração histológica ou bioquímica referente à isquemia (TASKIN *et al.*, 1998).

Comparando os ovários direitos entre si no decorrer do tempo, notou-se que há diferenças estatísticas entre os folículos ($p=0,04$), e entre os corpos lúteos ($p=0,028$). É importante lembrar que não houve ligadura da artéria ovariana, mas mesmo assim o ovário respondeu com alterações

significativas após a ligadura da artéria uterina. Fato que faz ponderar a respeito da importância da anastomose da artéria uterina com a artéria ovariana para a ovulação. Pepler (1976a) afirma que o ovário necessita da fonte sanguínea vinda da artéria uterina para promover o funcionamento adequado na ovulação; refere que o suprimento sanguíneo proveniente da artéria uterina é essencial para a complementação da ovulação.

Interessante observar, que no presente estudo, houve uma diferença significativa entre a média do número de folículos dos ovários direitos entre os grupos do dia 1 e do dia 14 após a LAU ($p < 0,05$), porém o que não se imaginava que acontecesse era que o número de folículos aumentasse. O mesmo evento ocorre com os corpos lúteos, porém entre os grupos do dia 1 e do dia 7 após a LAU ($p < 0,05$). Sabe-se que o corpo lúteo necessita de uma alta taxa de suprimento sanguíneo (BRUCE; MEYER; DHARMARAJAN, 1984), porém o que se observou, após a isquemia uterina, foi aumento do número desses corpos lúteos. Nota-se que no 21º dia tanto o número de folículos quanto o de corpos lúteos não faz diferença com o grupo do dia 1, o que mostra que após o pico de ovulação o ovário retorna ao mesmo estágio do 1º dia de isquemia.

Em relação ao aumento de folículos no 14º dia após LAU nos ovários direitos (após dois ciclos estrais), e o aumento dos corpos lúteos, após uma semana de LAU (após um ciclo estral) pode-se sugerir que a diminuição do fluxo uterino ao ovário promoveu aumento no recrutamento de folículos como uma maneira adaptativa ao estresse vivido pelo organismo, provavelmente por um aumento de FSH, pois Sperroff; Glass; e Kase (1995) afirmam que o número de folículos que amadurece depende da quantidade de FSH disponível.

Outras adaptações que o organismo pode ter realizado para melhorar fluxo ovariano seria a vasodilatação da artéria ovariana, permitindo um fluxo adequado ao ovário e o estabelecimento dos vasos colaterais no útero promovendo aumento do fluxo ovariano oriundo do útero. Kupesic e Kurjak (1997) afirmam que para haver crescimento folicular deve existir um desenvolvimento paralelo do suprimento sanguíneo.

Apesar de alguns autores afirmarem que a importância e a frequência das anastomoses das artérias uterinas com as ovarianas não estarem bem descritas (RAZAVI *et al*, 2002; PARK *et al.*, 2003), outros autores já estabelecem claramente como vasos colaterais do útero as artérias ovarianas e as vesicais (BRUCE, 1972; NÜSKEN *et al*, 2007). Existe também outro vaso que serve como circulação colateral ao ovário, proveniente do ligamento de suspensão deste órgão (ZACKRISSON, 2000). Em um estudo realizado em 1976, ratas foram histerectomizadas e o suprimento sanguíneo colateral do ovário que restou foi mantido intacto em um grupo e, no outro, foi interrompido. O grupo de ratas no qual a circulação colateral foi interrompida apresentou diminuição da ovulação, demonstrando a importância da circulação colateral (PEPPLER, 1976b).

Quando comparados ovários direitos com esquerdos (controle) em cada grupo, observou-se que não houve diferença entre os folículos e seus controles, apesar da diferença significativa quando correlacionados os folículos entre si nos ovários direitos. Isto mostra que os folículos dos ovários direitos se comportam de uma maneira quase homogênea aos folículos dos ovários controle, apresentando alterações bem discretas. Da mesma maneira, um estudo, realizado com ratas submetidas à ligadura dos ramos ovarianos dos vasos uterinos, avaliou o peso do útero como indicador de atividade estrogênica e quando comparadas ao grupo controle não apresentaram qualquer alteração no peso de seus úteros com normal desenvolvimento do peso corpóreo (PRADO; AOKI; ALDRIGHI, 2007).

Quando os corpos lúteos são comparados entre os ovários direito e esquerdo, observam-se diferenças significativas nos dois primeiros dias de isquemia. No primeiro dia, a média dos corpos lúteos do ovário esquerdo é maior que o dobro da média dos ovários direitos ($p = 0,042$); isto pode ser devido a uma resposta ovariana imediata à diminuição do fluxo proveniente da artéria uterina.

No sétimo dia há, praticamente, uma inversão daqueles dados. A média dos corpos lúteos dos ovários esquerdos se torna quase a metade da média dos ovários direitos ($p = 0,043$). Os outros grupos, 14^o e 21^o dias,

apresentam semelhança em comparação com os grupos controle. Pepler (1976a) realizou a LAU na porção inferior da artéria uterina unilateralmente, e observou, no 10º dia de isquemia, a diminuição da ovulação do ovário ipsilateral à ligadura em comparação com o ovário controle.

Segundo Zackrisson (2000) a ligadura dos ramos ovarianos da artéria uterina resulta na redução da taxa de ovulação quando a ligadura foi realizada há mais de três horas. Afirma também que nas ratas não-grávidas não há diferença entre os duas maiores artérias que suprem o fluxo ovariano, as quais são equivalentes. Porém, se houver uma obstrução individual na artéria uterina e, em outro caso, na artéria ovariana, a maior redução sanguínea, no ovário, seria no caso em que houve a obstrução da artéria ovariana.

Massa e Bruce (1997) afirmam que em ratas a artéria uterina sempre contribui com o fluxo sanguíneo ovariano, mas o contrário não ocorre. Afirma também que se houver uma obstrução na artéria uterina haverá uma redução significativa do fluxo ovariano. Da mesma maneira, Prado, Aoki e Aldrighi (2007) sugerem que a função hormonal do ovário das ratas dependa exclusivamente do fluxo sanguíneo proveniente dos ramos ovarianos dos vasos uterinos.

Observou-se que a ovulação retornou ao normal no período de 14 dias. Também foi notado que as alterações uterinas foram mínimas nesse processo isquêmico, lesando aproximadamente menos de 33% dos tecidos uterinos isquemiados. Por este motivo, necessita-se avaliar a funcionalidade uterina e a função ovariana para se poder analisar que tipos de conseqüências podem promover a isquemia sobre o útero.

Apesar de uma gama de artigos que avaliam a fertilidade após a LAU durante a gravidez, não havia estudos suficientes discutindo a respeito da fertilidade após a ligadura da artéria uterina realizada em ratas antes de gestação.

A percentagem de ratas grávidas que foram submetidas à isquemia foi de 44,4%, o restante (55,6%) não engravidou ($p = 0,024$). Nem todas as ratas testadas engravidaram, e as que o conseguiram engravidar

obtiveram médias menores às das ratas controle ($p = 0,029$). A redução da fertilidade foi de aproximadamente 65%, taxa muito alta de infertilidade, quando comparada com o estudo que realizou LAU, em ratas, no 17º dia da gravidez e houve morte e reabsorção de 30% dos fetos (HUIZINGA *et al.*, 2004). Em estudo realizado com LAU, em mulheres, das 10 mulheres submetidas ao procedimento, uma (10%) engravidou, porém os autores não informaram quantas destas mulheres tinham o desejo de engravidar (HEBISCH; HUCH, 2002).

A fertilidade em mulheres, após a LAU, segundo alguns autores, não é comprometida (LIU *et al.*, 2006; SENTILHES *et al.*, 2008; HOLUB *et al.*, 2008; HEBISCH; HUCH, 2002). No estudo de Sentilhes *et al.* (2008) das 16 mulheres que tinham o desejo de engravidar após a isquemia uterina, 13 (81%) tiveram parto a termo, uma taxa relativamente alta. Já o trabalho de Holub *et al.* (2008), realizado para avaliar a gravidez após a oclusão das artérias uterinas, mostrou uma taxa de gravidez, após LAU, de 46,9%, destas, 84,7% tiveram parto a termo.

Em outra pesquisa (com ligadura das artérias hipogástricas), os autores afirmam que não houve caso de infertilidade secundária. As pacientes, que desejavam uma nova gravidez, conseguiram em menos de 12 meses. Se a gestação ocorreu após 12 meses, entre o procedimento de ligadura e a gravidez subsequente, os pacientes disseram que era de sua própria escolha retardar a gravidez (NIZARD *et al.*, 2003).

Como a infertilidade pode resultar de uma falha de fertilização ou da perda do blastocisto fertilizado antes do implante. Uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares responsáveis para a implantação e placentação pode melhorar habilidade para o tratamento de transtornos relacionados a esses processos (NORWITZ; SCHUST; FISHER, 2001). Além disso, há certas semelhanças fundamentais entre os processos de implantação de embriões dos ratos e de humanos (PARIA *et al.*, 2000).

O fato de algumas ratas, após LAU, evoluírem para gestação normal, mesmo com um número menor de fetos nascidos, sugere que há uma boa função ovulatória. Ao se avaliar este índice de gravidez pode-se

levantar a hipótese de que haja alterações nos úteros de algumas ratas que estejam dificultando a gravidez das mesmas, talvez a expressão de mediadores circulantes (THAETE; NEERHOF, 2006), pois pela avaliação histopatológica, os escores encontrados foram, em sua grande maioria, de leve intensidade.

6. Conclusões

A técnica de LAU em ratas não-grávidas, descrita neste trabalho, mostrou-se efetiva para promoção da IR e de fácil reprodutibilidade.

As alterações histopatológicas provocadas pela LAU direita afetaram HUD de maneira uniforme.

As alterações histológicas decorrentes da LAU em HUD ocorreram de forma significativa a partir do sétimo dia, não progredindo após isto.

As alterações histopatológicas encontradas em HUE (controle) sugerem que há outros mecanismos que podem promover a alteração histopatológica uterina além do próprio insulto isquêmico.

As alterações histológicas promovidas no HUD foram de leve intensidade não diferindo dos controles, exceto no primeiro dia de isquemia.

Não houve alteração no número de folículos e corpos lúteos dos ovários esquerdos após LAU direita. Quanto aos ovários direitos, houve alterações leves que regrediram após o 14^o dia da realização da técnica.

A LAU direita, em ratas não-grávidas, provavelmente reduz a fertilidade das mesmas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGUILAR-SILVA, R. H. *et al.* Estado antioxidante do sangue como indicador da eficiência do treinamento em nadadores. **Rev. Bras. Ciên. e Mov.**, v. 10, n. 3, p. 7-11, jul. 2002.
2. AKINOLA, O. I. *et al.* Uterine artery ligation for management of uterine fibroids. **Int J of Gynaecol Obstetrics**, v. 91, n. 2, p. 137-40, 2005.
3. AKINOLA, O.I. *et al.* Uterine artery ligation for treatment of fibroids. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 88, n. 1, p. 59-62, 2009.
4. AMES, A.III.; WRIGHT, L.; KOWANDA, M. Cerebral ischemia II. The no-reflow phenomenon. **Am J Pathol**, n. 52, p. 437, 1968.
5. ASHRAF, M.; ZHAI, X. Pathophysiology myocardial reperfusion injury: role of oxygen free radicals. **Transplant Proc**, n. 27, p. 2800-1, 1995.
6. AUGUSTIN, A.J. *et al.* Influence of anti-inflammatory drugs and free radical scavengers on intestinal ischemia induced oxidant tissue damage. **Adv Exp Med Biol**, n. 361, p. 239-51, 1992.
7. AZIZ, A. *et al.* Transarterial embolization of the uterine arteries: patient reactions and effects on uterine vasculature. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v.77, n. 3, p. 334-40, mar. 1998.
8. BAGGISH, M.S. Vaginal uterine artery ligation avoids high blood loss and puerperal hysterectomy in postpartum hemorrhage. **Obstet Gynecol**, v.100, n.3, p.417-08, feb. 2003.
9. BANU, N. S. *et al.* Markers of muscle ischemia, necrosis, and inflammation following uterine artery embolization in the treatment of symptomatic uterine fibroids. **Am J Obstet Gynecol**, v. 196, n. 3, p. 213.e1-5, mar. 2007.
10. BRUCE, N. W. Resistance of the rat embryo to ligation of a uterine artery early in gestation. **J Reprod Fertil**, v. 28, n. 2, p. 265-7, feb. 1972.

11. BRUCE, N. W. The effect of ligating a uterine artery on fetal and placental development in the rat. **Biol Reprod**, v. 14, n. 3, p. 246-7, apr. 1976a.
12. BRUCE, N. W. The distribution of blood flow to the reproductive organs of rats near term. **J Reprod Fertil**, v. 46, p. 359-62, 1976b.
13. BRUCE, N. W.; MEYER, G.T.; DHARMARAJAN, A.M. Rate of blood flow and growth of the corpora lutea of pregnancy and of previous cycles throughout pregnancy in the rat. **J Reprod Fertil**, v. 71, p. 445-52, 1984.
14. BURBANK, F.; HUTCHINS, F.L.JR. Uterine artery occlusion by embolization or surgery for the treatment of fibroids: a unifying hypothesis-transient uterine ischemia. **J Am Assoc Gynecol Laparosc.** v. 7, p. 1-49, nov. 2000. Supplement 4.
15. CAMPOS, E. B. P de; YOSHIDA, W. B. O papel dos radicais livres na fisiopatologia da isquemia e reperfusão em retalhos cutâneos: modelos experimentais e estratégias de tratamento. **J Vasc Br**, v. 3, n. 4, p. 357-66, 2004.
16. ÇAY, A. *et al.* Does Anti-Oxidant Prophylaxis with Melatonin Prevent Adverse Outcomes Related to Increased Oxidative Stress Caused by Laparoscopy in Experimental Rat Model? **J Surg Res.** v. 135, n. 1, p. 2-8, sep. 2006.
17. CELIK, O. *et al.* The protective effect of caffeic acid phenethyl Ester on ischemia-reperfusion injury in rat ovary. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 117, n. 2, p183-8, dec. 2004.
18. CHAIT, A.; MOLTZ, A.; NELSON, J.H.JR. The collateral arterial circulation in the pelvis. an angiographic study. **Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med**, n. 102, p. 392-400, 1968.
19. CHEN, Y. J. *et al.* Pregnancy following treatment of symptomatic myomas with laparoscopic bipolar coagulation of uterine vessels. **Hum Reprod**, v. 18, n. 5, p. 1077-81, may. 2003.

20. COLGAN, T. J. *et al.* Pathologic features of uteri and leiomyomas following uterine artery embolization for leiomyomas. **Am J Surg Pathol**, v. 27, n. 2, p. 167-77, 2003.
21. DONNEZ, J.; JADOUL, P. What are the implications of myomas on fertility? A need for a debate? **Hum Reprod**, v. 17, n. 6, p. 1424-30, jun. 2002.
22. DOUMOCHTSIS, S, K.; PAPAGEORGHIOU, A. T.; ARULKUMARAN, S. Systematic Review of conservative management of postpartum hemorrhage: what to do when medical treatment fails. **Obstet Gynecol Surv**, v. 62, n. 8, p. 540-7, aug. 2007.
23. DRIFE, J. Commentary: management of primary postpartum haemorrhage. **Br J Obstet Gynaecol**, v. 104, n. 3, p. 275-7, mar. 1997.
24. ENGELBREGT, M. J. T. *et al.* Delayed first cycle in intrauterine growth-retarded and postnatally undernourished female rats: follicular growth and ovulation after stimulation with pregnant mare serum gonadotropin at first cycle. **Journal of Endocrinology**, v. 173, p. 297-304, 2002.
25. ENGELSEN, I. B.; ALBRECHTSEN, S.; IVERSEN, O. E. Peripartum hysterectomy - incidence and maternal morbidity. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 80, n. 5, p. 409-12, may. 2001.
26. FAHMY, K. Uterine artery ligation to control postpartum hemorrhage. **Int J Gynaecol Obstet**, v. 25, n. 5, p. 363-7, oct. 1987.
27. FIELD, A. **Descobrimo a estatística usando o SPSS**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 688 p.
28. GILMONT, R.R. *et al.* Effects of glutathione depletion on oxidant-induced endothelial cell injury. **J Surg Res**, v. 80, n. 1, p. 62-8, nov. 1998.
29. GODFREY, C. D; ZBELLA, E. A. Uterine necrosis after uterine artery embolization for leiomyoma. **Obstet Gynecol**, v. 98, n. 5 (part 2), p. 950-2, apr. 2001.

30. GOMEZ-JORGE J., *et al.* Uterine artery anatomy relevant to uterine leiomyomata embolization. **Cardiovasc Intervent Radiol.**, v. 26, n. 6, p. 522-7, Nov-Dec. 2003.
31. GUIMARÃES, S.B. *et al.* Oxidative stress induced by torsion of the spermatic cord in young rats. **Acta Cir. Bras.** v.22, n.1, p. 30-3, Jan./Feb. 2007.
32. HACKETHAL, A. *et al.* Uterine compression U-sutures in primary postpartum hemorrhage after cesarean section: fertility preservation with a simple and effective technique. **Hum Reprod**, v. 23, n. 1, p.74-9, jan. 2008.
33. HANSCH, E. *et al.* Pelvic arterial embolization for control of obstetric hemorrhage: a five-year experience. **Am J Obstet Gynecol**, v. 180, n. 6 (part 1), p. 1454-60, jun. 1999.
34. HAUGAARD, C.T.; BAUER, M.K. Rodent models of intrauterine growth restriction. **Scand. J. Lab. Anim. Sci.** v.28, n. 1, p. 10-22, 2001.
35. HEBISCH, G.; HUCH, A. Vaginal uterine artery ligation avoids high blood loss and puerperal hysterectomy in postpartum hemorrhage. **Obstet Gynecol**, v.100, n. 3, p. 574-8, sep. 2002.
36. HOLUB, Z. *et al.* Pregnancy outcomes after uterine artery occlusion: prospective multicentric study. **Fertil Steril**, v. 90, n.5, p. 1886-91, nov. 2008.
37. HUIZINGA, C. T. *et al.* Ligation of uterine artery and early postnatal food restriction – animal models for growth retardation. **Horm Res**, v. 62, n.5, p. 233-40, 2004.
38. HULLEY, S.B. *et al.* **Delineando a pesquisa clínica: uma abordagem epidemiológica.** 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 384 p.
39. KERRIGAN, C.L., STOTLAND, M.A. Ischemia reperfusion injury: a review. **Microsurgery**, n. 14, p. 165-75, 1993.

40. KIM, H.S. *et al.* Effects of utero-ovarian anastomoses on clinical outcomes and repeat intervention rates after uterine artery embolization. **J Vasc Interv Radiol**, n. 17, p. 783-9, 2006.
41. KIM, H.S.; PAXTON, B.E.; LEE, J.M. Long-term efficacy and safety of uterine artery embolization in young patients with and without uteroovarian anastomoses. **J Vasc Interv Radiol**, n. 19, p. 195-200, 2008.
42. Knight, K.R. *et al.*, Secondary ischemia in rabbit skin flap: the roles played by thromboxane and free radical. **Clin Sci**. n. 80, p. 235-40, 1992.
43. KUMAR, V; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. Adaptação, dano e morte celular. In: _____. **Robbins e Cotran Patologia - Bases Patológicas das Doenças**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 1616 p. Cap. 1, p. 3-48.
44. KUPESIC, S.; KURJAK, A. The assessment of uterine and ovarian perfusion in infertile patients, **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, n. 71, p. 151-4, 1997.
45. LAMARCA, B. B. D. *et al.* Hypertension produced by reductions in uterine perfusion in the pregnant rat. **Hypertension**, v.46, n.2, p.1022-25, 2005.
46. LAURENT, A. *et al.* Fertility after bilateral uterine artery embolization in a sheep model. **Fertil Steril**, v. 89, p. 1371-83, may. 2008. Supplement 3.
47. LICHTINGER, M. *et al.* The time course of myometrial ischemia and reperfusion after laparoscopic uterine artery occlusion – theoretical implications. **J Am Assoc Gynecol Laparosc**, v. 10, n. 4, p. 553-566, 2003.
48. LIU, W. N. *et al.* Uterine artery ligation for treatment of pregnant women with uterine leiomyomas who are undergoing cesarean section. **Fertil Steril**, v. 86, n. 2, p. 423-8, aug. 2006.
49. MAGANN, E. F.; LANNEAU, G. S. Third stage of labor. **Obstet Gynecol Clin N Am**, v. 32, n. 2, p. 323-32, jun. 2005.

50. MASON, B. A. Postpartum hemorrhage and arterial embolization. **Curr Opin Obstet Gynecol**, v. 10, n. 6, p. 475-9, dec. 1998.
51. MASSA, H. M.; BRUCE, N. W. Direction of blood flow and changes in resistance of major arteries supplying the ovary of the pregnant rat. **Biol Reprod**, v. 57, p. 43-8, 1997.
52. MAY JR, J.W.; CHAIT, L.A.; O'BRIEN, B.M. The no-reflow phenomenon in experimental free flaps. **Plast Reconstr Surg**, n. 61, p. 256-67, 1978.
53. MCCANCE, K. L. Altered cellular and tissue. In: _____. **Pathophysiology: The biologic basis for disease in adults and children**. 3. ed. Missouri: Mosby, 1998. Cap.2, p. 44-81.
54. MCCLUGGAGE, W. G. *et al.* Pathologic features of uterine leiomyomas following uterine artery embolization. **Int J Gynecol Pathol**, v. 19, n. 4, p. 342-7, oct. 2000.
55. NIZARD, J. *et al.* Fertility and pregnancy outcomes following hypogastric artery ligation for severe post-partum haemorrhage. **Hum. Reprod.**, v. 18, n. 4, p. 844-8, 2003.
56. NORWITZ, E.R.; SCHUST, D.J.; FISHER, S.J. Implantation and the survival of early pregnancy. **N Engl J Med.**, v. 345, n. 19, p. 1400-8, nov. 2001.
57. NÜSKEN, K.D. *et al.* Intrauterine growth after uterine artery ligation in rats: dependence on the fetal position in the uterine horn and need for prenatal marking of the animals. **J Hypertens**, v. 25, n. 1, p. 247-8, jan. 2007.
58. O'LEARY, J. A. Effects of bilateral ligation of the uterine and ovarian vessels in dogs. **Int J Gynaecol Obstet**, v. 17, n. 5, p. 460-1, mar/apr. 1980.
59. O'LEARY, J. A. Uterine artery ligation in the control of postcesarean hemorrhage. **J Reprod Med**, v. 40, n. 3, p. 189-93, mar. 1995.

60. OKAZAKI, M. *et al.* Induction of epithelial cell apoptosis in the uterus by a mouse uterine ischemia-reperfusion model: possible involvement of tumor necrosis factor- α . **Biol Reprod**, v. 72, p. 1282-8, jan. 2005.
61. PALACIOS JARAQUEMADA, J. M. P. Vaginal uterine artery ligation avoids high blood loss and puerperal hysterectomy in postpartum hemorrhage. **Obstet Gynecol**, v. 100, n. 3, p. 417-8, feb. 2003.
62. PAN, S. L.; YU, Y. H. Establishment of a new rat model of intrauterine growth retardation. **Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao**, v. 22, n. 4, p. 339-40, apr. 2002. [Abstract].
63. PARIA, B.C. *et al.* Molecular signaling in uterine receptivity for implantation. **Semin Cell Dev Biol**. v. 11, n. 2, p. 67-76, Apr. 2000.
64. PARK, K. H. *et al.* Treatment outcomes of uterine artery embolization and laparoscopic uterine artery for uterine myoma. **Yonsei Med J**, v. 44, v. 4, p. 694-702, may. 2003.
65. PAVELOCK, K. *et al.* Differential Expression and Regulation of the Vascular Endothelial Growth Factor Receptors Neuropilin-1 and Neuropilin-2 in Rat Uterus. **Endocrinology**, v. 142, n. 2, p. 613-622, 2001.
66. PELAGE, J. P.; LIMOT, O. Place actuelle de l'embolisation artérielle dans la prise en charge des hémorragies graves du post-partum immediate. **Gynecol Obstet Fertil**, v. 36, n. 7-8, p. 714-20, jul/aug. 2008.
67. PEPPLER, R. D. Effect of uterine artery ligation on ovulation in the rat. **Anat Rec**, v. 184, n. 2, p. 183-5, feb. 1976a.
68. PEPPLER, R. D. Hysterectomy in the rat: surgical disruption of the vascular channels reduces number of ova shed. **Am. J. Anat.**, v. 145, n. 1, p. 121-3, jan. 1976b.
69. PEREIRA, F. E. L. Etiopatogênese geral das lesões. In: BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo Patologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. Cap.3, p. 19-23.

70. PHILIPPE, H. J.; D'OREYE, D.; LEWIN, D. Case report: vaginal ligation of uterine arteries during postpartum hemorrhage. **Int J Gynaecol Obstet**, v. 56, n. 3, p. 267-70, mar. 1997.
71. PRADO, R. A. A.; AOKI, T.; ALDRIGHI, J. M. Peso do útero após ligadura no ramo ovariano do vaso uterino. **Rev Assoc Med Bras**, v. 53, n. 2, p. 166-70, mar/abr. 2007.
72. PRON, G. *et al.* The Ontario uterine fibroid embolization Trial. Part 1. Baseline patient characteristics, fibroid burden, and impact on life. **Fertil Steril**, v. 79, n. 1, p. 112-9, jan. 2003.
73. RAVINA, J. H. *et al.* Arterial embolisation to treat uterine myomata. **Lancet**, v. 346, n. 8976, p. 671-2, sep. 1995.
74. RAZAVI, M. K. *et al.* Angiographic classification of ovarian artery-to-uterine artery anastomoses: initial observations in uterine fibroid embolization. **Radiology**, v. 224, n. 3, p. 707-12, 2002.
75. ROCOURT, D.V.; MEHTA, V.B.; BESNER, G.E. Heparin-binding EGF-like growth factor decreases inflammatory cytokine expression after intestinal ischemia/reperfusion injury. **J Surg Res**, n.139, p.269-73, 2007.
76. SABA, H. *et al.* Manganese porphyrin reduces renal injury and mitochondrial damage during ischemia/reperfusion. **Free Radic Biol Med**, n.42, p.1571-8, 2007.
77. SAGSÖZ, N.; KISA, Ü.; APAN, A. Ischemia-reperfusion injury of rat ovary and the effects of vitamin C, mannitol and verapamil. **Hum. Reprod.**, v. 17, n. 11, p. 2972-6, 2002.
78. SAPMAZ, E.; ÇELİK, H. Comparison of the effects of the ligation of ascending branches of bilateral uterine arteries with tourniquet method on the intra-operative and post-operative hemorrhage in abdominal myomectomy cases. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 111, p. 74-7, 2003.
79. SCHANAIDER, A.; SILVA, P. C. Uso de animais em cirurgia experimental. **Acta Cir Bras**, v. 19, n. 4, p. 441-447, jul/ago. 2004.

80. SCHMID-SCHÖNBEIN, G.W. The damaging potential of leukocyte activation in the microcirculation. **Angiology**, n. 44, p. 45-56, 1993.
81. SENTILHES, L. *et al.* Fertility and pregnancy outcomes following uterine devascularization for severe postpartum haemorrhage. **Hum Reprod**, v. 23, n. 5, p. 1087-92, may. 2008.
82. SERGENT, F. *et al.* Les hémorragies graves de la délivrance: doit-on lier, hystérectomiser ou emboliser? **Gynecol Obstet Fertil**, v. 32, n. 4, p. 320-9, apr. 2004.
83. SHASHOUA, A.R. *et al.* Ischemic uterine rupture and hysterectomy 3 months after uterine artery embolization. **J Am Assoc Gynecol Laparosc**, v. 9, n. 2, p. 217-20, may 2002.
84. SIEGEL, S. **Estatística não-paramétrica para ciências do comportamento**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 448 p.
85. SILVA, A. L. B. *et al.* Miomas e infertilidade: bases fisiopatológicas e implicações terapêuticas. **Rev. Bras. Saude Mater. Infant.**, Recife, v. 5, n. 1, Mar. 2005.
86. SPEROFF, L.; GLASS, R.H.; KASE, N.G. O ovário – embriologia e desenvolvimento. In: _____. **Endocrinologia ginecológica clínica e infertilidade**. 5ª ed. Manole, 1995. Cap.3, p. 95-109.
87. STEMPIEN-OTERO, A. *et al.* Mechanisms of hypoxia-induced endothelial cell death. **J Biol Chem**. v.274, n.12, p.8039-45, 1999.
88. TAMIZIAN, O.; ARULKUMARAN, S. The surgical management of post-partum haemorrhage. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 16, n. 1, p. 81-98, feb. 2002.
89. TANAKA, M. *et al.* Fetus-placenta-newborn: experimental growth retardation produced by transient period of uteroplacental ischemia in pregnant Sprague-Dawley rats. **Am J Obstet Gynecol**, v. 171, n. 5, p. 1231-4, nov. 1994.

90. TASKIN, O. *et al.* The effects of twisted ischaemic adnexa managed by detorsion on ovarian viability and histology: an ischaemia-reperfusion rodent model. **Hum. Reprod.**, v. 13, n. 10, p.2823-7, 1998.
91. TAYLOR, E.; GOMEL, V. The uterus and fertility. **Fertil Steril**, v. 89, n. 1, p. 1-16, jan. 2008.
92. TEIXEIRA, P.G. *et al.* Relevância clínica dos fatores de angiogênese na pré-eclâmpsia. **Femina**, v. 36, n. 4, p. 231-235, abr. 2008.
93. THAETE, L. G.; NEERHOF, D. O. Endothelin and platelet-activating factor: significance in the pathophysiology of ischemia/reperfusion-induced fetal growth restriction in the rat. **Am J Obstet Gynecol**, v. 194, n. 5, p. 1377-83, may. 2006.
94. TRETAKOV, A. V.; FARBER, H. W. Endothelial cell tolerance to hypoxia: potential role of purine nucleotide phosphates. **J. Clin. Invest.**, v. 95, n. 2, p. 738-44, feb. 1995.
95. TROPEANO, G. *et al.* Uterine artery embolization for fibroids does not have adverse effects on ovarian reserve in regularly cycling women younger than 40 years. **Fertil Steril**, v.81, n.4, p.1055-61, 2004.
96. VELASCO, E. G. *et al.* Effects of vascular insufficiency on placental ribonuclease activity in the rat. **J. Nutr.**, v. 103, p. 213-7, 1973.
97. VILOS, G. A.; HOLLET-CAINES, J.; BURBANK, F. Uterine artery occlusion: what is the evidence? **Clin Obstet Gynecol**, v. 49, n. 4, p. 798-810, dec. 2006.
98. WALKER, W. J.; PELAGE, J. P. Uterine artery embolisation for symptomatic fibroids: clinical results in 400 women with imaging follow up. **BJOG**, v. 109, n. 11, p.1262-72, nov. 2002.
99. WALSHE, T.E.; D'AMORE, P.A. The role of hypoxia in vascular injury and repair. **Annu Rev Pathol.**, v.3, p. 615-43, 2008.

100. WELBOURN, C.R.B. *et al.* Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: central role of the neutrophil. **Br J Surg** , n. 78, p. 651-5, 1991.
101. WIGGLESWORTH, J.S. Fetal growth retardation. Animal model: uterine vessel ligation in the pregnant rat. **Am J Pathol**, v. 77, n. 2, p. 347-50, nov. 1974.
102. WINGPRAWAT, S.; CHITTACHAROEN, A.; SUTHUTVORAVUT, S. Risk factors for emergency peripartum cesarean hysterectomy. **Int J Gynaecol Obstet**, v. 90, n. 2, p. 136-7, aug. 2005.
103. WRANNING, C.A. *et al.* Transplantation of the uterus in the sheep : oxidative stress and reperfusion injury after short-time cold storage. **Fertil Steril**, v. 90, n. 3, p. 817-26, 2008.
104. YAZICI, G. *et al.* Genistein attenuates postischemic ovarian injury in a rat adnexal torsion-detorsion model. **Fertil Steril**, v.87, n.2, p.391-96, 2007.
105. ZACKRISSON, U. *et al.* Evidence for the involvement of blood flow-related mechanisms in the ovulatory process of the rat. **Hum. Reprod.**, v. 15, n. 2, p. 264-72, 2000.

APÊNDICE A

Útero direito proximal	Rata1	Rata2	Rata3	Rata 4	Rata 5	Rata 6
Congestão						
Hemorragia						
Edema instersticial						
Perda de coesão						
observações						

Útero direito distal	Rata1	Rata2	Rata3	Rata 4	Rata 5	Rata 6
Congestão						
Hemorragia						
Edema instersticial						
Perda de coesão						
observações						

Útero esquerdo	Rata1	Rata2	Rata3	Rata 4	Rata 5	Rata 6
Congestão						
Hemorragia						
Edema instersticial						
Perda de coesão						
observações						

Ovário direito	Rata1	Rata2	Rata3	Rata 4	Rata 5	Rata 6
No folículo/HPF						
Campo 1						
Campo 2						
Campo 3						
No de corpos lúteos						
Campo 1						
Campo 2						
Campo 3						

Ovário esquerdo	Rata1	Rata2	Rata3	Rata 4	Rata 5	Rata 6
No folículo/HPF						
Campo 1						
Campo 2						
Campo 3						
No de corpos lúteos						
Campo 1						
Campo 2						
Campo 3						

APÊNDICE B

Gravidez	Rata1	Rata2	Rata3	Rata 4	Rata 5	Rata 6
Sim						
Não						
Nº filhotes						