UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

JULIO CESAR ROSA E SILVA

Avaliação de marcadores de proliferação celular e apoptose em tecido endometrial eutópico e ectópico em modelo experimental de endometriose em coelhas

RIBEIRÃO PRETO
2007

JULIO CESAR ROSA E SILVA

Avaliação de marcadores de proliferação celular e apoptose em tecido endometrial eutópico e ectópico em modelo experimental de endometriose em coelhas

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina.

Área de concentração: Tocoginecologia
Orientador: Prof. Dr. Antonio Alberto Nogueira

RIBEIRÃO PRETO
2007

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Rosa e Silva, Julio Cesar. *Avaliação de marcadores de proliferação celular e apoptose em tecido endometrial eutópico e ectópico em modelo experimental de endometriose em coelhas*. Ribeirão Preto, 2007.

61p. : il. ; 29,7cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Tocoginecologia.

Orientador: Nogueira, Antonio Alberto

1. Proliferação celular. 2. Apoptose. 3. Endometriose.
4. Homeostase tecidual. 5. Coelha.

DEDICO ESSE TRABALHO:

Ao meu pai, **JAYRO**, que sempre foi um grande exemplo de cientista e professor para mim (no verdadeiro sentido destas palavras), e que com muita dedicação, construiu uma família exemplar da qual muito me orgulho.

À minha mãe, **LILIAN**, que muita falta nos faz e que com muito amor e serenidade sempre nos mostrou o melhor caminho da vida a seguir, da honestidade e do amor. Agradeço a ela tudo o que sou hoje.

À minha esposa, **ANA CAROLINA**, que se transformou no principal motivo da minha vida, e que sempre esteve ao meu lado durante toda minha trajetória profissional e pessoal nestes últimos 9 anos.

Ao meu filho, **MATHEUS**, que desde os seus primeiros dias de vida intra-uterina já se tornou o ser mais amado deste mundo.

À minha família, que sempre esteve presente em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antônio Alberto Nogueira, meu orientador, meu professor e responsável por este trabalho e por grande parte da minha formação profissional e pessoal. Exemplo profissional e pessoal a ser seguido.

Ao Prof. Dr. Sérgio Britto Garcia, pela grande contribuição neste trabalho e pela grande amizade que nos aproximou desde o início da minha vida nesta instituição.

Ao Prof. Dr. Francisco José Cândido dos Reis, que contribuiu enormemente para este trabalho, e também na minha formação profissional, do qual muito me orgulho.

Ao Prof. Dr. Rui Alberto Ferriani, pelos ensinamentos, pelo exemplo que é e deve ser seguido como professor, pesquisador e como pessoa, e principalmente pelas oportunidades abertas.

Ao Prof. Dr. Omero Benedicto Poli Neto, pela amizade e grande colaboração neste e em todos os nos nossos projetos de pesquisa em conjunto.

Ao Prof. Dr. Antonio Pellicer Martinez, pela oportunidade do conhecimento de um novo serviço e pelos ensinamentos.

Ao Setor de Reprodução Humana deste Departamento, pelos inúmeros ensinamentos e pelas oportunidades proporcionadas ao meu crescimento acadêmico e profissional, em especial aos Professores Rui Alberto Ferriani, Rosana Maria dos Reis, Marcos Felipe Silva de Sá, Marcos Dias de Moura e Maria Matheus de Sala.

Ao Setor de Vídeo-endoscopia Ginecológica deste Departamento, pelo convívio marcante, pela amizade, pelos constantes ensinamentos e pela contribuição neste trabalho, Professores Antônio Alberto Nogueira, Francisco José Cândido dos Reis, Omero Benedicto Poli Neto, Médico Assistente Hermes de Freitas Barbosa, Pós-graduandas Debora Machado, Mary Lourdes Montenegro, Liana Gomide, Adriana Peterson, Paula de Souza.

A todos os professores e médicos assistentes deste e de outros Departamentos que muito contribuíram para a minha formação profissional.

Às Sras. Ilza, Taísa e Rosane, que sempre presentes, contribuíram e seguem contribuindo de maneira decisiva para o desenvolvimento de toda a pós-graduação deste Departamento e pela amizade sempre presente.

À todos os funcionários do Setor de Cirurgia Experimental deste hospital, pela ajuda durante a execução deste trabalho.

Às Sras. Rose e Aline pela ajuda e grande disponibilidade no preparo do material para análise histológica.

Aos funcionários do laboratório de Ginecologia e Obstetrícia, Albina, Auxiliadora, Cidinha, Marilda, Cristina, Sandra e Roberta, pela amizade dispensada a mim.

À todos funcionários do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela disponibilidade em ajudar quando necessário.

Ao amigo Hermes, pela amizade e grande colaboração profissional no Setor de Video-endoscopia Ginecológica deste Departamento.

Aos demais amigos pós-graduandos e médicos assistentes deste departamento, pela amizade e companheirismo durante estes anos todos, em especial para Adriana Peterson, Alberto Trapp, Ângela Cury, Alessandra Marcolin, Carolina Sales, Cláudia Baraldi, Conrado Coutinho, Daniel Tiezzi, Daniela Michelazzo, Davidson Alvarenga, Débora Machado, Elaine Moisés, Fernanda Rodovalho, Flávia Aguiar, Francisco Magário, Joaquim Sarmento, Laura Santana, Liana Gomide, Luiz Manetta, Maria Rita Bagio, Mariana Kefalás, Mary Lourdes Montenegro, Patrícia Reis, Paula Andrea Navarro, Paula de Souza, Rodrigo Ferreira, Stael Porto.

À minha esposa, Ana Carolina, pelo amor vivido em todos estes anos e pelos próximos que seguramente virão.

Ao meu filho, Matheus, por existir, pois somente assim consolidei em meu coração o exato significado da palavra AMOR.

À toda minha família, Jayro, Lisete, Fernando, Lucilene, Craig, Jairo Jr., Ana Julieta, Liana, Jarson, Ana Rita, Leandra, Eduardo, Thiago, Guilherme, Mariana, Ana Carolina, Leonardo, Pedro, Felipe, Letícia, Lívia, Nathália pela presença constante e decisiva durante toda minha vida, nos bons e principalmente nos maus momentos.

À minha nova família, Marcos Felipe, Marina, Guilherme, Andréa, Leonardo e Fernanda pelos grandes momentos vividos juntos e pela amizade criada nestes anos de convívio.

Ao meu tio César, pela presença sempre marcante desde a minha infância, pelos momentos juntos e pelo amor sempre dedicado a todos nós. Um grande exemplo como cientista e professor.

A todos os que contribuíram, direta ou indiretamente, para realização desse trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS EXTRAS ix

LISTA DE TABELAS x

LISTA DE ABREVIATURAS xi

RESUMO ..... **xii**

ABSTRACT ..... **xv**

1 INTRODUÇÃO 18

2 JUSTIFICATIVA 24

3 OBJETIVOS 26

4 ARTIGO 28

4.1 Introdução 29

4.2 Material e Métodos 32

4.3 Resultados 35

4.4 Discussão 36

4.5 Referências Bibliográficas 41

4.6 Tabelas 46

4.7 Figuras 50

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 51

6. ANEXOS 55

Figuras extras

Aprovação do Comitê de Ética em experimentação animal da FMRP

Artigo publicado do mestrado

LISTA DE FIGURAS EXTRAS

Figura 1E – 56

Figura 2E – 56

Figura 3E – 57

Figura 4E – 57

Figura 5E - 58

Figura 6E - 58

Figura 7E - 59

Figura 8E - 59

Figura 9E - 60

Figura 10E - 60

Figura 11E - 61

Figura 12E - 61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 46

Tabela 2 47

Tabela 3 48

Tabela 4 49

LISTA DE ABREVIATURAS

PCNA: Antígeno nuclear celular proliferativo

IPC: Índice de proliferação celular

IA: Índice de apoptose

IHT: Índice de homeostase tecidual

MMP: Metaloprotease

TIMP: Inibidor tecidual de metaloprotease

VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular

DNA: Ácido desóxi-rubonucléico

TNF: Fator de necrose tumoral

HE: Hematoxilina-eosina

TGF: Fator de crescimento tumoral

EGF: Fator de crescimento epidermal

CPI: Cell Proliferation Index

AI: Apoptotic Index

HTI: Homeostatic Tissue Index

Resumo

RESUMO

Rosa e Silva, J.C. ***Avaliação de marcadores de proliferação celular e apoptose em tecido endometrial eutópico e ectópico em modelo experimental de endometriose em coelhas.*** 2007. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

Objetivo: Caracterizar o padrão de homeostase (proliferação celular e apoptose) de tecido endometrial eutópico e ectópico de coelhas submetidas à indução de lesões de endometriose por modelo experimental já conhecido, quatro e oito semanas após o procedimento de implantação endometrial.

Material e Métodos: Estudo experimental animal sendo utilizado 20 coelhas adultas Nova Zelândia, fêmeas e virgens, submetidas à laparotomia para indução da lesão de endometriose, através da ressecção de um corno uterino e fixação no peritônio pélvico de fragmento de 5mm. As coelhas foram divididas em dois grupos de 10 animais, sendo os animais do grupo 1, sacrificados após 4 semanas da indução da lesão endometrial ectópica e os do grupo 2 após 8 semanas. A lesão foi excisada para análise histológica juntamente com o corno uterino contralateral, comprovando a presença de tecido endometrial glandular e estromal. Reações de imunohistoquímica foram realizadas, no tecido endometrial eutópico e ectópico, para proliferação celular através do PCNA e para apoptose através do *fas*, na glândula e estroma, sendo obtido o índice de proliferação celular (IPC) e de apoptose (IA) através do número de células marcadas por 1000 contadas, e o índice de homeostase tecidual através do coeficiente entre o IPC e IA.

Resultados: Observou-se maior índice de proliferação no tecido ectópico, tanto glandular como estromal, quando comparado com o endométrio eutópico, com 4 e 8 semanas após a

indução da lesão. Contudo, quando as lesões ectópicas foram comparadas entre si, com 4 e 8 semanas, não foi observada diferença significativa. Quando comparamos o índice de apoptose, observamos que não houve diferença entre o tecido ectópico e o eutópico, tanto glandular como estromal nas lesões induzidas e analisadas com 4 semanas, porém no tecido glandular das lesões analisadas com 8 semanas houve diferença significativa entre a lesão ectópica e o tecido endometrial eutópico 0,0819 ± 0,0213 e 0,0995 ± 0,01336, respectivamente (p=0,04). A homeostase tecidual foi calculada e observou-se uma tendência destes tecidos a proliferação, sempre com índices de homeostase tecidual (IPC/IA) acima de 1.

Conclusão: As lesões ectópicas parecem ter uma proliferação celular maior que o endométrio eutópico levando a uma tendência ao crescimento tecidual descontrolado nas lesões de endometriose induzidas.

Palavras-chave: endometriose experimental, proliferação celular, apoptose, homeostase tecidual, coelha

Abstract

ABSTRACT

Rosa e Silva, J.C. ***Evaluation of cell proliferation and apoptosis markers on eutopic and ectopic endometrium in a rabbit experimental model.*** Thesis (Doctoral) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

Objective: To characterize the pattern of tissue homeostasis (cell proliferation and apoptosis) of eutopic and ectopic endometrium in rabbits four and eight weeks after endometrium implantation for induction of endometriotic lesions by experimental standardized method.

Material and methods: Animal experimental study with 20 female, virgins and adult New Zeland rabbits, submitted to laparotomy for endometriosis induction by resection of one uterine horn, isolation of the correspondent endometrium and fixation of a 5mm tissue segment to the pelvic peritoneum. The animals were divided in two groups of 10, group 1 was sacrificed after 4 weeks of endometriosis induction and group 2 eight weeks after the procedure. The lesion was excised for later histological analysis together with the opposite uterine horn, just to verify the presence of endometrial gland and stroma. Immunohistochemistry reactions were performed in order to study cell proliferation (by PCNA technique) and apoptosis (by *fas* technique) in the eutopic and ectopic endometrium, and a Cell Proliferation Index (CPI) and an Apoptotic Index (AI) were calculated based on these findings, considering the number of marked cells per 1000 counted cells. The Homeostatic Tissue Index (HTI) was considered to be the relation between CPI and AI (CPI/AI). Gland and stroma were analyzed separately.

Results: There was an increase in the CPI of the ectopic tissue, considering gland and stroma, after four and eight weeks of endometriosis induction when comparing to the eutopic one. However, when comparing the ectopic lesions, there was no difference between four and eight

weeks of induction. Analyzing the only the AI, there was no difference between the eutopic and the ectopic endometrium with four weeks, nevertheless there was a significant difference in the glandular tissue of the lesions with eight weeks when comparing eutopic and ectopic tissues (0.0819 ± 0.0213 e 0.0995 ± 0.01336, respectively (p=0,04)). Based on HTI there was a tendency to cell proliferation on these tissues, always with and HTI (CPI/AI) higher than 1.

Conclusions: Ectopic lesions seem to have a higher cell proliferation than the eutopic endometrium, tending to present an uncontrolled tissue growth in the endometriotic inducted lesions.

Key words: Experimental endometriosis**,** cell proliferation, apoptosis, tissue homeostasis, rabbit

1. Introdução

A etiopatogenia da endometriose continua controversa e várias são as teorias atuais para explicá-la, embora nenhuma delas o faça completamente quando isolada. A mais aceita é a teoria de Sampson que aponta a presença de células endometriais viáveis no fluxo menstrual retrógrado como causador das lesões (Sampson, 1927), porém praticamente 90% das mulheres têm trompas pérvias (Halme et al, 1984) e apresentam fluxo retrógrado e, no entanto, a maioria não apresenta endometriose. Há também a teoria da metaplasia celômica (Suginami, 1991), e, mais recentemente, a teoria imunológica (Chung et al, 2002; Braun et al, 2002; Witz et al, 2002 e Nogueira & Abrão, 2000). Hoje se acredita na confluência destas teorias para a verdadeira explicação da etiopatogenia da endometriose, haveria realmente um fluxo menstrual retrógrado associado a uma predisposição imunológica no micro-ambiente peritonial que facilitaria o implante de células endometriais viáveis e com potencial para implantação.

Alguns fatores que justificariam a predisposição de algumas pacientes à formação de implantes de endometriose estariam relacionadas com alterações no micro-ambiente peritonial. Já é descrito por alguns autores o provável mecanismo de invasão do tecido endometrial descamado no peritônio abdominal. A adesão entre o tecido endometrial e o peritônio ocorreria por meio das integrinas, que são receptores heterodiméricos trans-membrana de adesão celular (Witz et al, 2002). O peritônio ao qual está aderido o fragmento de endométrio teria sua matriz extracelular invadida. Acredita-se que esta invasão ocorra devido a um desequilíbrio entre enzimas de degradação de componentes da matriz extracelular e seus reguladores. As metaloproteases (MMPs) são enzimas zinco-dependentes como as colagenases, gelatinases e as enzimas estromais, que tem expressão mutagênica, com capacidade de promover a remodelação da matriz extracelular quando associados a seus inibidores (TIMPs- *tissue inhibitors of metalloproteases*). Vários estudos têm observado um aumento na quantidade de algumas MMPs e redução de TIMPs produzidos pelo endométrio

eutópico e ectópico de paciente com endometriose em comparação com o endométrio de pacientes sem a doença, o que justificaria uma maior capacidade invasora deste tecido no fluxo menstrual retrógrado (Chung et al, 2002). Após a invasão peritonial a viabilidade do foco endometriótico seria mantida pela neo-formação vascular local desenvolvida sob estímulo de substâncias angiogênicas como o VEGF (Fator de crescimento endotelial vascular). O VEGF seria produzido e secretado no fluido peritonial por macrófagos ali presentes, e teria capacidade de promover crescimento endotelial, aumento da permeabilidade vascular e modulação da secreção de enzimas proteolíticas relacionadas a angiogênese (Nogueira & Abrão, 2000). Há estudos descrevendo a presença de VEGF aumentado no fluido peritonial e no soro de pacientes com endometriose (Oliveira et al, 2005).

A "Homeostase Tecidual" é dada por um equilíbrio entre células em proliferação e células em processo de degradação (morte celular programada - apoptose). Acredita-se que nestas pacientes haveria alterações nesta homeostase tecidual dada por uma maior viabilidade das células endometriais descamadas secundárias a um aumento na capacidade de proliferação tecidual e pela diminuição dos processos de apoptose. A apoptose é um processo de morte celular programada que acontece após estímulo específico, no qual há condensação da cromatina e fragmentação do DNA, do núcleo e da célula em si, com posterior fagocitose por macrófagos. A apoptose é controlada pela proporção de BCL2 e BAX, duas proteínas intracelulares, sendo que a BCL2 tem função de bloquear a apoptose, aumentando a sobrevida da célula e a BAX tem função contra-reguladora, acelerando o processo de apoptose (Nogueira & Abrão, 2000). No endométrio, a proteína BCL-2 tem sua máxima expressão durante a fase proliferativa, gradualmente diminuindo até a fase secretora, quando praticamente não é encontrada, coincidindo com o aumento da incidência de apoptose nessa fase do ciclo menstrual.

Tem sido observado um aumento de macrófagos BCL2+ em tecido endometrial ectópico analisado por imunohistoquímica, sugerindo maior "resistência" do tecido (Nogueira & Abrão, 2000). Além disso, também tem sido descrita uma redução do número de macrófagos e de células apoptóticas no endométrio eutópico de pacientes com endometriose quando comparado com endométrio de pacientes sem a doença, podendo justificar um aumento na viabilidade deste tecido para implantação futura (Braun et al, 2002).

Mc Laren et al mediram as proteínas BCL-2 e BAX em tecido endometrial e em macrófagos de líquido peritoneal de pacientes com endometriose e concluíram que, em tecido endometrial eutópico ou ectópico, a expressão do BCL-2 acompanha o ciclo menstrual, com aumento na fase proliferativa e declínio até níveis não mensuráveis na segunda metade da fase secretora, enquanto a expressão do BAX não se altera, independente da fase do ciclo ou tecido endometrial eutópico ou ectópico. Adicionalmente, macrófagos expressando a proteína BCL-2 estavam presentes em número significativamente maior em pacientes com endometriose e apresentavam variação cíclica, com declínio de seu número até próximo de valores encontrados em pacientes sem endometriose, na fase secretora. Nas pacientes sem endometriose, não houve variação cíclica destes macrófagos. Em relação aos macrófagos que expressavam proteína BAX, um número expressivamente maior deles foi encontrado em pacientes sem endometriose, porém em ambos os grupos, sem alterações com a fase do ciclo. O estudo imunohistoquímico revelou população de macrófagos BCL-2 positivo e BAX negativo presentes apenas em tecido ectópico endometrial (presentes em todas as fases do ciclo, sem descrição de variações quantitativas de acordo com a fase do ciclo). Especula-se que a expressão da proteína BCL-2 com a ausência da proteína BAX poderia conferir a estas células maior resistência a estímulos apoptóticos, aumentando a expectativa de vida destas células, ou seja, a viabilidade deste tecido. Os autores postularam ainda que, apesar de ser reconhecido que a ativação de macrófagos freqüentemente resulte em apoptose, a maior

quantidade de macrófagos BCL-2 positivos em pacientes com endometriose pode resultar em maior número de células que sobrevivam ao processo de ativação e, portanto, ser um dos mecanismos pelo qual se observa maior quantidade de macrófagos ativados no líquido peritoneal de pacientes com endometriose (Mc Laren et al, 1997).

A apoptose pode ser regulada através da ativação de sinais chamados sinais de morte ("*death signals")*, que aumentam a expressão de proteína p53 e ativam receptores de membrana como as proteínas do sistema *fas-fas* ligante. O receptor *fas*, também chamado CD95, é uma proteína de membrana que pertence à família TNF, que está expressa em uma grande variedade de tipos celulares. Seu ligante, *fas*L, também é uma proteína de membrana, mais restrita a linfócitos T. A interação destas proteínas desencadeia mecanismos intracelulares que culminam com o processo de apoptose através do estímulo da enzima caspase-8 (Nagara, 1997).

Alguns marcadores de proliferação celular estão sendo implicados na gênese da endometriose. O PCNA (*proliferative cell nuclear antigen*) é avaliado através de estudo imunohistoquímico e está sendo bastante estudado em neoplasias, estando relacionado a neoplasias mais indiferenciadas. Fujishita et al., em 1999, avaliando o PCNA em endometriose mostrou maior expressão do PCNA entre lesões vermelhas, quando comparadas a lesões brancas e negras (Fujishita et al, 1999).

A complexidade na fisiopatologia da endometriose e a heterogeneidade da doença levaram ao desenvolvimento de alguns modelos experimentais. O achado de endometriose espontânea em 25% de animais primatas não humanos (D'Hooghe et al, 1991) com histologia e localização semelhantes às encontradas em humanos (Cornillie et al, 1985; Clement, 1990; Cornillie, 1990; Vernon & Wilson, 1985), levou à utilização destes animais como modelo experimental, porém sua utilização vem sendo progressivamente reduzida devido às dificuldades éticas e pela heterogeneidade das lesões. A utilização de coelhas passa a ser uma

boa opção de modelo experimental, pois se caracteriza pelo desenvolvimento de lesões homogêneas, geralmente massas sólidas hemorrágicas, facilmente obtidas através de autotransplante de fragmentos endometriais ou abertura e exposição da cavidade endometrial (Manyak et al, 1990; Hahn et al, 1986; Rosa e Silva et al, 2004). Além disso, a escolha da coelha como animal para experimentação se deve ao baixo índice de infecção, sem necessidade de utilização de antibióticos (Schor et al, 1999) e pela ausência de ciclo estral, o que dispensa a necessidade de programação dos procedimentos de acordo com a fase do ciclo do animal.

Em modelo experimental desenvolvido em nosso serviço por Rosa e Silva em 2004, o desenvolvimento das lesões após o implante do tecido endometrial foi de 100% após quatro e oito semanas, com presença de estroma e glândulas à histologia (Rosa e Silva et al, 2004), fato também relatado em outros estudos experimentais (Schor et al, 1999; Schenken & Asch, 1980). Os implantes eram bem vascularizados e bem delimitados, com incremento substancial de tamanho após oito semanas da fixação ao peritônio quando comparado com as lesões de quatro semanas. Esta facilidade de implantação do tecido endometrial ectópico traduz a alta eficácia deste modelo experimental para desenvolvimento da endometriose. A utilização deste tecido para avaliação de marcadores de proliferação tecidual e apoptose pode ser extremamente útil para identificar o padrão de comportamento destas lesões, elucidando alguns pontos na etiopatogenia da endometriose. A verdadeira correlação destes focos de tecido endometrial implantado na parede abdominal das coelhas com a endometriose humana não é conhecida, por isso estudos comparativos são necessários para que os resultados destes experimentos possam ser extrapolados para humanos.

2. Justificativa

Sendo a endometriose uma doença de grande importância clínica e com tantos pontos obscuros em sua etiopatogenia, o desenvolvimento de modelos experimentais passa a ter papel fundamental na descoberta de características e padrões de comportamento da doença e para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas, permitindo o teste de novas medicações. Com base em estudos anteriores que sugerem haver alterações na capacidade de proliferação e apoptose do tecido endometrial em pacientes com endometriose, o que justificaria a maior viabilidade do tecido e o desenvolvimento dos focos de lesão peritonial, este estudo propõe a avaliação da homeostase destes tecidos através de marcadores de multiplicação celular e apoptose.

3. Objetivos

Objetivos gerais:

Caracterizar o padrão de homeostase (proliferação celular e apoptose) de tecido endometrial eutópico e ectópico de coelhas submetidas à indução de lesões de endometriose por modelo experimental já conhecido, quatro e oito semanas após o procedimento de implantação endometrial.

A avaliação das lesões em dois tempos tem a finalidade de verificar se existe modificação tecidual ao longo da evolução das lesões assim como se existe crescimento das mesmas.

Objetivos específicos:

Avaliar marcadores de proliferação celular e apoptose em tecido endometrial eutópico e ectópico de coelhas após quatro e oito semanas de implantação das lesões:

- índice de proliferação celular através da marcação do PCNA (*proliferative cell nuclear antigen*).
- Índice de apoptose através da marcação do anticorpo *fas*.
- Índice de Homeostase tecidual, caracterizado pelo coeficiente entre o índice de proliferação celular e apoptótico.

4. Artigo

4.1 Introdução

A etiopatogenia da endometriose continua controversa e várias são as teorias atuais para explicá-la, embora nenhuma delas o faça completamente quando isolada. A mais aceita é a teoria de Sampson que aponta a presença de células endometriais viáveis no fluxo menstrual retrógrado como causador das lesões (Sampson, 1927), porém praticamente 90% das mulheres têm trompas pérvias (Halme et al, 1984) e apresentam fluxo retrógrado e, no entanto, a maioria não apresenta endometriose. Há também a teoria da metaplasia celômica (Suginami, 1991), e, mais recentemente, a teoria imunológica (Chung et al, 2002; Braun et al, 2002; Witz et al, 2002 e Nogueira & Abrão, 2000). Hoje se acredita na confluência destas teorias para a verdadeira explicação da etiopatogenia da endometriose, haveria realmente um fluxo menstrual retrógrado associado a uma predisposição imunológica no micro-ambiente peritonial que facilitaria o implante de células endometriais viáveis e com potencial para implantação.

A "Homeostase Tecidual" é dada por um equilíbrio entre células em proliferação e células em processo de degradação (morte celular programada - apoptose). Acredita-se que nestas pacientes haveriam alterações nesta homeostase tecidual dada por uma maior viabilidade das células endometriais descamadas secundárias a um aumento na capacidade de proliferação tecidual e pela diminuição dos processos de apoptose.

A apoptose pode ser regulada através da ativação de sinais chamados sinais de morte ("*death signals")*., que aumentam a expressão de proteína p53 e ativam receptores de membrana como as proteínas do sistema *fas-fas* ligante. O receptor *fas*, também chamado CD95, é uma proteína de membrana que pertence à família TNF, que está expressa em uma grande variedade de tipos celulares. Seu ligante, *fas*L, também é uma proteína de membrana, mais restrita a linfócitos T. A interação destas proteínas desencadeia mecanismos

intracelulares que culminam com o processo de apoptose através do estímulo da enzima caspase-8 (Nagara, 1997).

Alguns marcadores de proliferação celular estão sendo implicados na gênese da endometriose. O PCNA (*proliferative cell nuclear antigen*) é avaliado através de estudo imunohistoquímico e está sendo bastante estudado em neoplasias, estando relacionado a neoplasias mais indiferenciadas. Estudos avaliando o PCNA em endometriose ainda são escassos, mas um estudo de Fujishita, em 1999, mostrou maior expressão do PCNA entre lesões vermelhas, quando comparadas a lesões brancas e negras (Fujishita et al, 1999).

A complexidade na fisiopatologia da endometriose e a heterogeneidade da doença levaram ao desenvolvimento de alguns modelos experimentais. A utilização de coelhas passa a ser uma boa opção de modelo experimental, pois se caracteriza pelo desenvolvimento de lesões homogêneas, geralmente massas sólidas hemorrágicas, facilmente obtidas através de autotransplante de fragmentos endometriais ou abertura e exposição da cavidade endometrial (Manyak et al, 1990; Hahn et al, 1986; Rosa e Silva et al, 2004). Além disso, a escolha da coelha como animal para experimentação se deve ao baixo índice de infecção, sem necessidade de utilização de antibióticos (Schor et al, 1999) e pela ausência de ciclo estral, o que dispensa a necessidade de programação dos procedimentos de acordo com a fase do ciclo do animal.

Em modelo experimental desenvolvido em nosso serviço por Rosa e Silva em 2004, o desenvolvimento das lesões após o implante do tecido endometrial foi de 100% após quatro e oito semanas, com presença de estroma e glândulas à histologia (Rosa e Silva et al, 2004), fato também relatado em outros estudos experimentais (Schor et al, 1999; Schenken & Asch, 1980). Os implantes eram bem vascularizados e bem delimitados, com incremento substancial de tamanho após oito semanas da fixação ao peritônio quando comparado com as lesões de quatro semanas. Esta facilidade de implantação do tecido endometrial ectópico

traduz a alta eficácia deste modelo experimental para desenvolvimento da endometriose. A utilização deste tecido para avaliação de marcadores de proliferação tecidual e apoptose pode ser extremamente útil para identificar o padrão de comportamento destas lesões, elucidando alguns pontos na etiopatogenia da endometriose. A verdadeira correlação destes focos de tecido endometrial implantado na parede das coelhas com a endometriose humana não é conhecida, por isso estudos comparativos são necessários para que os resultados destes experimentos possam ser extrapolados para humanos.

Este estudo tem por objetivo caracterizar o padrão de homeostase (proliferação celular e apoptose) de tecido endometrial eutópico e ectópico de coelhas submetidas à indução de lesões de endometriose por modelo experimental já conhecido, quatro e oito semanas após o procedimento de implantação endometrial. A avaliação das lesões em dois tempos tem a finalidade de verificar se existe modificação tecidual ao longo da evolução das lesões assim como existe crescimento das mesmas.

4.2 Material e Métodos

1. Animais: o estudo foi realizado no setor de cirurgia experimental do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto e no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, laboratório de Oncopatologia.

Foram utilizadas 20 coelhas adultas Nova Zelândia, fêmeas, virgens do biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. As coelhas foram mantidas em gaiolas apropriadas sob controle de temperatura, umidade e luminosidade do ambiente por três dias antes da indução das lesões cirurgicamente e alimentadas com água e ração *ad libitum*. Todas foram submetidas à laparotomia para indução da lesão de endometriose, após anestesia geral endovenosa com 3ml de tionembutal associado a 1ml de xilestasina. O procedimento foi realizado com todos os cuidados de anti-sepsia e sempre pelo mesmo pesquisador.

2. Técnica de indução das lesões de endometriose: a abertura da cavidade pélvica foi realizada com incisão longitudinal mediana de aproximadamente 2cm, a 2 cm do púbis do animal. Posteriormente foi ressecado cerca de 4 cm do corno uterino direito seguido de seu fechamento. A porção uterina ressecada foi imersa em soro fisiológico 0,9% a 4°C por cerca de 2 minutos e então incisada longitudinalmente, sendo retirado um fragmento de 5 x 5mm. Este fragmento de tecido endometrial foi suturado ao peritônio próximo ao trato reprodutivo da coelha utilizando-se o fio Vicryl 6.0 com a face endometrial livre voltada para a cavidade abdominal, com posterior fechamento da incisão cirúrgica abdominal. Nenhuma suplementação hormonal foi administrada antes ou após a laparotomia.

3. Obtenção das lesões para análise histológica: as coelhas foram divididas em dois grupos de 10 animais, sendo os animais do grupo 1, sacrificados após 4 semanas da indução da lesão endometrial ectópica e os do grupo 2 após 8 semanas. A lesão foi excisada para análise histológica juntamente com o corno uterino esquerdo (contralateral) (Figuras 1E e 2E). Os tecidos retirados foram fixados em formol 10%, processados para inclusão em parafina e

corados por hematoxilina e eosina (HE) para análise histológica comprovando a presença de tecido endometrial glandular e estromal (Figura 3E e 4E).

4. Técnicas de imunohistoquímica: as reações de imunohistoquímica foram realizadas nos cortes histológicos com 4 a 5μm através de reação antígeno-anticorpo seguida de revelação da reação com marcador visível ao microscópio. As lâminas desparafinadas e hidratadas foram recuperadas antigenicamente através de incubação em panela a vapor em meio tamponado por 40 minutos. Após resfriamento do material, as peroxidases teciduais endógenas foram removidas pela adição de peróxido de hidrogênio e ligações inespecíficas do anticorpo primário foram evitadas por adição de soro de cavalo. As lâminas foram então incubadas com anticorpo primário por 12 horas em câmara úmida. Em seguida, houve a incubação com anticorpo secundário e, por último, a etapa avidina-biotina. A reação foi identificada após a revelação por tratamento com DAB (Sigma-Aldrich Inc., USA) por cinco minutos e contra coloração com Hematoxilina de Harris seguida de montagem das lâminas.

5. Quantificação da proliferação celular: na avaliação do PCNA, que apresenta marcação nuclear, utilizamos método quantitativo, com contagem de células marcadas pela imunohistoquímica em 1000 células contadas na lâmina, procurando contar células nos quatro quadrantes de cada lâmina. Com base neste cálculo, obtivemos o Índice de Proliferação Celular (IPC): número de células marcadas para o PCNA em 1000 células contadas, tanto no tecido glandular como estromal, que foram analisadas separadamente (Figuras 5E, 6E, 7E e 8E).

6. Quantificação da apoptose: na avaliação do *fas*, que apresenta marcação citoplasmática, utilizamos o mesmo método quantitativo e obtivemos o Índice de apoptose (IA) tanto glandular como estromal (Figuras 9E, 10E, 11E e 12E).

7. Índice de Homeostase tecidual: caracterizado pelo coeficiente entre o índice de proliferação celular e apoptótico.

8. Análise estatística: foi realizada através da utilização do software GraphPad Prism® 2.01 32 Bit Executable (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA), utilizando-se Teste t pareado e considerando-se nível de significância de 5%.

Todas as lâminas foram analisadas por dois patologistas com experiência em imunohistoquímica, sem identificação do tipo de tecido analisado.

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

4.3 Resultados

Observou-se maior índice de proliferação no tecido ectópico, tanto glandular como estromal, quando comparado com o endométrio eutópico, com 4 e 8 semanas após a indução da lesão (Tabela 1). Contudo, quando as lesões ectópicas foram comparadas entre si, com 4 e 8 semanas, não foi observada diferença significativa (Tabela 2).

Quando comparamos o índice de apoptose, observamos que não houve diferença entre o tecido ectópico e o eutópico, tanto glandular como estromal nas lesões induzidas e analisadas com 4 semanas (Tabela 3), porém no tecido glandular das lesões analisadas com 8 semanas houve diferença significativa entre a lesão ectópica e o tecido endometrial eutópico 0,0819 ± 0,0213 e 0,0995 ± 0,0133, respectivamente (p=0,002) (Tabela 3). Ao compararmos os índices apoptóticos das lesões ectópicas de 4 e 8 semanas, observamos que tanto no tecido glandular como estromal houve mais apoptose no grupo de lesões analisadas com 4 semanas (Tabela 2).

A homeostase tecidual foi calculada e observou-se uma tendência destes tecidos a proliferação, sempre com índices de homeostase tecidual (IPC/IA) acima de 1. A análise comparativa entre os tecidos mostrou que o tecido ectópico tem uma tendência maior a proliferação que o tecido eutópico, tanto estromal quanto glandular (Tabela 4). Contudo a comparação entre a homeostase tecidual da glândula entre 4 e 8 semanas não mostrou-se diferente significativamente (Tabela 2), ao contrário, no estroma houve diferença entre as lesões analisadas com 4 e 8 semanas (Tabela 2).

4.4 Discussão

Os padrões de proliferação celular e apoptose no endométrio eutópico de pacientes normais sofrem variações ao longo do ciclo. A proliferação do tecido glandular da camada funcional do endométrio tem um padrão cíclico, com proliferação máxima na fase proliferativa tardia, com decréscimo importante ao longo da fase secretora, até praticamente ausente na fase menstrual. O tecido estromal, ao contrário, apresenta dois picos de proliferação celular, um na fase proliferativa e outro na fase pré-menstrual. Este mesmo padrão é mantido em mulheres com endometriose, tanto no tecido glandular quanto estromal, quando consideramos o tecido endometrial eutópico (Li et al, 1993; Wingfield et al, 1995; Jurgensen et al, 1996; Nisolle & Donnez, 1997; Beliard et al, 2004). Entretanto, os focos ectópicos de tecido parecem perder esta ciclicidade (Jones et al, 1995; Nisolle et al, 1997; Scotti et al, 2000; Beliard et al, 2004). No desenvolvimento deste modelo experimental em coelhas, um dos fatores considerados foi a ausência de ciclo estral nestes animais, o que facilitaria a padronização da técnica, permitindo que o procedimento fosse realizado em qualquer época e mantendo uma característica de similaridade com o tecido endometrial ectópico.

A teoria de Sampson do fluxo menstrual retrógrado justifica a presença do tecido endometrial na cavidade pélvica (Sampson, 1927). Entretanto, cerca de 90% das mulheres têm trompas pérvias (Halme et al, 1984) e apresentam fluxo menstrual retrógrado, sem no entanto desenvolverem endometriose. Complementando a etiopatogenia da doença, inúmeros estudos vêm demonstrando uma maior viabilidade deste tecido refluído naquelas pacientes portadoras da doença. Gebel et al, verificaram que existe uma diminuição da susceptibilidade à apoptose espontânea no endométrio eutópico de pacientes com endometriose (Gebel et al, 1998), dados estes que foram corroborados por Meresman et al, em 2000 (Meresman et al, 2000). Além disso, a capacidade de proliferação celular também se encontra aumentada no endométrio

eutópico de pacientes com endometriose quando comparado a pacientes do grupo controle, em parte secundário à diminuição das concentrações de TGF beta, um regulador de proliferação e diferenciação das células endometriais. Nas células de linhagem epitelial o TGF beta mantém a homeostase tecidual limitando seu crescimento através da supressão de fatores de crescimento promotores de transcrição, como o cMyc, um proto-oncongene, que no tecido endometrial das pacientes com endometriose encontra-se aumentado (Johnson et al, 2005).

Este aumento na proliferação celular e redução de apoptose descrito para o endométrio eutópico de pacientes com endometriose se mantêm no comportamento do tecido ectópico, inclusive de maneira mais proeminente. Como já mencionado, as lesões perdem sua ciclicidade (Jones et al, 1995; Nisolle et al, 1997; Scotti et al, 2000; Beliard et al, 2004) e mantém índices de proliferação celular aumentado (Li et al, 1993). Em nosso estudo verificamos um aumento da capacidade proliferativa do tecido implantado quando o comparamos ao tecido eutópico, independente do tempo de duração do implante, mostrando um padrão de comportamento semelhante ao das lesões endometrióticas humanas. Estas alterações foram verificadas tanto para o componente glandular quanto estromal do tecido ectópico.

Como a origem do implante é a mesma do tecido eutópico, acreditamos que a exposição do tecido implantado ao micro-ambiente peritoneal promoveu alterações locais que culminaram com o desbalanço na homeostase tecidual. Na composição do fluido peritoneal humano encontramos a presença de substâncias inflamatórias, mesmo em situações normais, livre de doença, apesar de níveis menos elevados que no fluido peritoneal de pacientes com endometriose (Kats et al, 2002; Akoum et al, in press).

Em pacientes com endometriose já é bem documentada a presença aumentada de substâncias inflamatórias e fatores de crescimento no fluido peritoneal (Kats et al, 2002;

Akoum et al, in press), bem como o aumento da concentração de macrófagos peritoneais, com aumento da atividade dos fagócitos mononucleares (Oral & Arici, 1997). Este efeito foi demonstrado através de medidas de biossíntese de citocinas, metabolismo oxidativo e funções de citotoxicidade (Zeller et al, 1987; Braun DP et al, 1992; Taketani et al, 1992 e Braun DP et at, 1996). Braun et al, utilizando cultivo de células endometriais de pacientes com e sem endometriose, acrescentando fluido peritoneal autólogo ou heterólogo entre os grupos, verificaram que em pacientes com endometriose o acréscimo de fluido peritoneal autólogo promovia aumento da proliferação celular, enquanto que o fluido de pacientes férteis controles produzia redução na proliferação. Em contrapartida em cultura de células endometriais de pacientes férteis normais, independente do fluido acrescentado, não houve variação do índice de proliferação celular. Portanto, o aumento da capacidade de proliferação do tecido em pacientes com endometriose está relacionado não só a alterações específicas do endométrio, mas também à mudanças no micro-ambiente peritoneal (Braun et al, 2002).

Com o intuito de verificar o impacto de diversos mediadores inflamatórios secretados por macrófagos sobre a proliferação celular em cultivo de células estromais de endométrio humano, Hammond et al verificaram a existência de uma resposta pró-proliferativa dose-dependente destas células *in vitro*. Diversos fatores foram testados, como o fator de crescimento epidermal (EGF), o fator de crescimento tumoral alfa (TGF-α), o fator de crescimento tumoral beta (TGF-β) e o fator de crescimento de fibroblastos (Hammond et al, 1993). A presença de uma maior população de macrófagos ativados na cavidade pélvica de pacientes com endometriose promove o aumento de secreção destes mediadores, provavelmente tendo papel importante na etiopatogenia de doença.

Em relação à apoptose, neste estudo, não foi observada diferença entre os tecidos eutópicos e ectópicos nos implantes de 4 semanas, tanto para estroma como para o tecido glandular. Em contrapartida, após 8 semanas de implante o tecido glandular apresentou maior

índice de apoptose quando comparado ao endométrio eutópico. Este achado talvez possa ser explicado pelo maior tempo de exposição do tecido implantado ao fluido peritoneal, o que promoveu mudança na homeostase do tecido. Em consonância com o que ocorre no tecido ectópico das lesões de endometriose a apoptose espontânea passa a estar supressa (Gebel et al, 1998; Meresman et al, 2000; Szymanowski et al, 2006). O tecido estromal não sofreu modificações em relação aos índices de apoptose após 8 semanas.

De qualquer maneira, no cômputo geral, o índice de homeostase tecidual (IPC/IA) apresentou uma tendência dos implantes à proliferação celular, com IHT maiores que 1 em ambos os componentes histológicos: glândula e estroma.

A teoria inflamatória, uma das teorias para a etiopatogenia da endometriose, propõe que um ambiente peritoneal pró-inflamatório propiciaria o implante do tecido menstrual refluído no peritônio pélvico (Chung et al, 2002). Em compensação, a própria presença do implante poderia promover uma agressão local com conseqüente recrutamento de macrófagos pélvicos (Oral & Arici, 1997) e ativação de fibroblastos peritoneais (Buckley et al, 2001), os quais levam a secreção de substâncias inflamatórias, gerando assim um círculo vicioso . Este estudo vem de encontro à estas dúvidas, os dados aqui verificados indicam que realmente existe um papel ambiental promovendo uma mudança no comportamento do tecido endometrial e permitindo a formação das lesões de endometriose. Todavia, não podemos afirmar que esta transformação se deva à presença de substâncias inflamatórias no fluido peritoneal, visto que este não foi o objetivo deste estudo e portanto seu desenho não nos permite tirar tal conclusão.

A boa reprodutibilidade e eficácia do modelo experimental proposto em coelhas já havia sido confirmada em estudos anteriores (Schor et al, 1999; Rosa e Silva et al, 2004), embora o comportamento histológico das lesões não houvesse sido estudado. Aqui foi

possível caracterizar o padrão de proliferação celular e apoptose do tecido implantado e verificar que o comportamento das lesões em termos de homeostase tecidual é semelhante àquele encontrado no tecido eutópico e ectópico de portadoras de endometriose. Portanto, este modelo experimental de endometriose reproduz satisfatoriamente a endometriose humana e pode ser utilizado para testes terapêuticos com diferentes classes de droga, com resultados bastante compatíveis com a realidade clínica.

4.5 Referências

- Akoum A, Al-Akoum M, Lemay A, Maheux R, Leboeuf M. Imbalance in the peritoneal levels of interleukin 1 and its decoy inhibitory receptor type II in endometriosis women with infertility and pelvic pain. Fertil Steril 2007, in press.
- Beliard A, Noel A, Joidart JM. Reduction of apoptosis and proliferation in endometriosis. Fertil Steril 2004; 82(1): 80-85.
- Braun DP, Ding J, Dmowski WP. Peritoneal fluid–mediated enhancement of eutopic and ectopic endometrial cell proliferation is dependent on tumor necrosis factor-α in women with endometriosis. Fertil Steril 2002; 78(4): 727-732.
- Braun DP, Ding J, Shen J, Rana N, Fernandez BB, Dmowski WP. Relationship between apoptosis and the number of macrophages in eutopic endometrium from women with and without endometriosis. Fertil Steril 2002; 78(4): 830-835.
- Braun DP, Gebel H, House R, Rana N, Dmowski WP. Spontaneous and induced synthesis of cytokines by peripheral blood monocytes in patients with endometriosis. Fertil Steril 1996; 65(6):1125–1129.
- Braun DP, Gebel H, Rotman C, Rana N, Dmowski WP. The development of cytotoxicity in peritoneal macrophages from women with endometriosis. Fertil Steril 1992; 57(6):1203–1210.
- Buckley CD, Pilling D, Lord JM, Akbar AN, Scheel-Toellner D, Salmon M. Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation. Trends Immunol 2001; 22(4):199-204.
- Chung HW, Lee JY, Moon HS, Hur SE, Park MH, Wen Y, Polan ML. Matrix metalloproteinase-2, membranous type 1 matrix metalloproteinase, and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression in ectopic and eutopic endometrium. Fertil Steril 2002; 78(4):787-795.

- Fujishita A; Hasuo A; Khan KN; Masuzaki H; Nakashima H; Ishimaru T. Immunohistochemical study of angiogenic factors in endometrium and endometriosis. Gynecol Obstet Invest 1999; 48(Suppl 1):36-44.
- Gebel HM, Braun DP, Tambur A, Frame D, Rana N, Dmowski WP. Spontaneous apoptosis of endometrial tissue is impaired in women with endometriosis. Fertil Steril 1998; 69(6):1042-1047.
- Hahn DW, Carraher RP, Foldesy RG, McGuire JL. Development of an animal model for quantitatively evaluating effects of drugs on endometriosis. Fertil Steril 1985; 44(3):410-415.
- Halme J, Hammond MG, Hulka JF, Raj SG, Talbert LM. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. Obstet Gynecol 1984; 64(2):151-154.
- Hammond MG, Oh ST, Anners J, Surrey ES, Halme J. The effect of growth factors on the proliferation of human endometrial stromal cells in culture. Am J Obstet Gynecol 1993; 168(4):1131-1136.
- Johnson MC, Torres M, Alves A, Bacallao K, Fuentes A, Vega M, Boric MA. Augmented cell survival in eutopic endometrium from women with endometriosis: expression of c-myc, TGF-beta 1, and bax genes. Reprod Biol Endocrinol 2005; 3:45.
- Jones RK, Bulmer JN, Searle RF. Immunohistochemical characterization of proliferation, oestrogen receptor and progesterone receptor expression in endometriosis: comparison of eutopic and ectopic endometrium with normal cycling endometrium. Human Reprod 1995; 10(12):3272-3279.
- Jurgensen A, Mettler L, Volkov NI, Parwaresch R. Proliferative activity of the endometrium throughout the menstrual cycle in infertile women with and without endometriosis. Fertil Steril 1996; 66(3):369-375.

- Kats R, Collette T, Metz CN, Akoum A. Marked elevation of macrophage migration inhibitory factor in the peritoneal fluid of women with endometriosis. Fertil Steril 2002; 78(1):69-76.
- Li SF, Nakayama K, Masuzawa H, Fujii S. The number of proliferating cell nuclear antigen positive cells in endometriotic lesions differs from that in the endometrium. Analysis of PCNA positive cells during the menstrual cycle and in post-menopause. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol 1993; 423(4):257-263.
- Manyak MJ, Nelson LM, Solomon D, Degraff W, Stillman RJ, Russo A. Fluorescent detection of rabbit endometrial implants resulting from monodispersed viable cell suspensions. Fertil Steril 1990; 54(2):356-359.
- Meresman GF, Vighi S, Buquet RA, Contreras-Ortiz O, Tesone M, Rumi LS. Apoptosis and expression of BCL-2 and BAX in eutopic endometrium from women with endometriosis. Fertil Steril 2000; 74(4):760-766.
- Nagata S. Apoptosis by death factor. Cell 1997; 88(3):355-365.
- Nisolle M, Casanas-Roux F, Donnez J. Immunohistochemial analysis of proliferative activity and steroid receptor expression in peritoneal and ovarian endometriosis. Fertil Steril 1997; 68(5):912-919.
- Nisolle M, Donnez J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. Fertil Steril 1997; 68: 585-596.
- Nogueira AP, Abrão MS. Endometriose: as hipóteses etiopatogênicas atuais. In: Abrão MS (Eds). Endometriose: uma visão contemporânea. Livraria e Editora Revinter Ltda. 2000;13-26.
- Oral E, Arici A. Pathogenesis of endometriosis. Obstet Gynecol Clin North Am 1997; 24(2):219–233.

- Rosa e Silva JC, Rosa e Silva ACJS, Coltro PS, Garcia SB, Candido dos Reis FJ, Nogueira AA. Modelo experimental para endometriose em coelhas com seguimento evolutivo das lesões. Rev Bras Ginecol Obstet 2004; 26(9):715-719.
- Sampson JA. Peritonial endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritonial cavity. Am J Obstet Gynecol 1927; 14:422-469.
- Schenken RS, Asch RH. Surgical induction of endometriosis in the rabbit: Effects on fertility and concentration of peritoneal fluid prostaglandins. Fertil Steril 1980; 34(6):581-587.
- Schor E, Freitas V, Soares Jr JM, Simões MJ, Baracat EC. Endometriose: Modelo Experimental em Ratas. Rev Bras Ginecol Obstet 1999; 21(5):281-284.
- Scotti S, Regidor PA, Schindler AE, Winterhager E. Reduced proliferation and cell adhesion in endometriosis. Mol Hum Reprod 2000; 6(7):610-617.
- Suginami H. A Reappraisal of the coelomic metaplasia theory by reviewing endometriosis occurring in unusual sites and instance. Am J Obstet Gynecol 1991; 165(1):214-218.
- Szymanowski K. Apoptosis pattern in human endometrium in women with pelvic endometriosis. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2007; 132(1):107-110.
- Taketani Y, Kuo TM, Mizuno M. Comparison of cytokine levels and embryo toxicity in peritoneal fluid in infertile women with untreated or treated endometriosis. Am J Obstet Gynecol 1992; 167(1):265–270.
- Wingfield M, Macpherson A, Healy DL, Rogers PA. Cell proliferation is increased in the endometrium of women with endometriosis. Fertil Steril 1995; 64(2):340-346.
- Witz CA, Cho S, Montoya-Rodriguez IA, Schenken RS. The alpha(2) beta(1) and alpha(3) beta(1) integrins do not mediate attachment of endometrial cells to peritoneal mesothelium. Fertil Steril 2002; 78(4):796-803.

- Zeller JM, Henig I, Radwanska E, Dmowski WP. Enhancement of human monocyte and peritoneal macrophage chemiluminescence activities in women with endometriosis. Am J Reprod Immunol Microbiol 1987; 13(3):78–82.

4.6 Tabelas

Tabela 1. Índice de Proliferação Celular nas diferentes estruturas histológicas após 4 e 8 semanas:

	Ectópico	*Eutópico*	
IPC	*Média ± SD*	*Média ± SD*	*p*
Glândula 4 sem	0.2505 ± 0.0452	0.1830 ± 0.0450	0.001
Estroma 4 sem	0.2026 ± 0.0553	0.1443 ± 0.0379	0.001
Glândula 8 sem	0.2210 ± 0.0368	0.1696 ± 0.0334	0.0003
Estroma 8 sem	0.2010 ± 0.0359	0.1632 ± 0.0320	0.0002

IPC= Índice de Proliferação Celular

Tabela 2. Comparação entre IPC, IA e IHT nas diferentes estruturas histológicas após 4 e 8 semanas:

	4 semanas	*8 semanas*	
	Média ± SD	*Média ± SD*	*p*
IPC Glândula	0.2505 ± 0.0452	0.2210 ± 0.0368	0.127
IPC Estroma	0.2026 ± 0.0553	0.2010 ± 0.0359	0.939
IA Glândula	0.1182 ± 0.0379	0.0819 ± 0.0213	0.049
IA Estroma	0.1291 ± 0.0356	0.0921 ± 0.0184	0.0049
IHT Glândula	2.311 ± 0.826	2.935 ± 1.141	0.184
IHT Estroma	1.681 ± 0.608	2.328 ± 0.855	0.0159

IPC= Índice de proliferação celular; IA= Índice de apoptose; Índice de homeostase tecidual

Tabela 3. Índice de Apoptose nas diferentes estruturas histológicas após 4 e 8 semanas:

	Ectópico	*Eutópico*	
IA	*Média ± SD*	*Média ± SD*	*p*
Glândula 4 sem	0.1182 ± 0.0379	0.1132 ± 0.0162	0.589
Estroma 4 sem	0.1291 ± 0.0356	0.1272 ± 0.0374	0.707
Glândula 8 sem	0.0819 ± 0.0213	0.0995 ± 0.0133	0.002
Estroma 8 sem	0.0921 ± 0.0184	0.0959 ± 0.0156	0.393

IA= Índice de Apoptose

Tabela 4. Índice de Homeostase Tecidual (IPC/IA) nas diferentes estruturas histológicas após 4 e 8 semanas:

	Ectópico	*Eutópico*	
IHT	*Média ± SD*	*Média ± SD*	*p*
Glândula 4 sem	2.311 ± 0.826	1.659 ± 0.534	0.0043
Estroma 4 sem	1.681 ± 0.608	1.262 ± 0.569	0.0181
Glândula 8 sem	2.935 ± 1.141	1.749 ± 0.486	0.0027
Estroma 8 sem	2.328 ± 0.855	1.750 ± 0.500	0.0029

IHT= Índice de Homeostase Tecidual (IPC/IA)

4.7 Figuras

Figura 1. Marcação pelo PCNA em endométrio ectópico

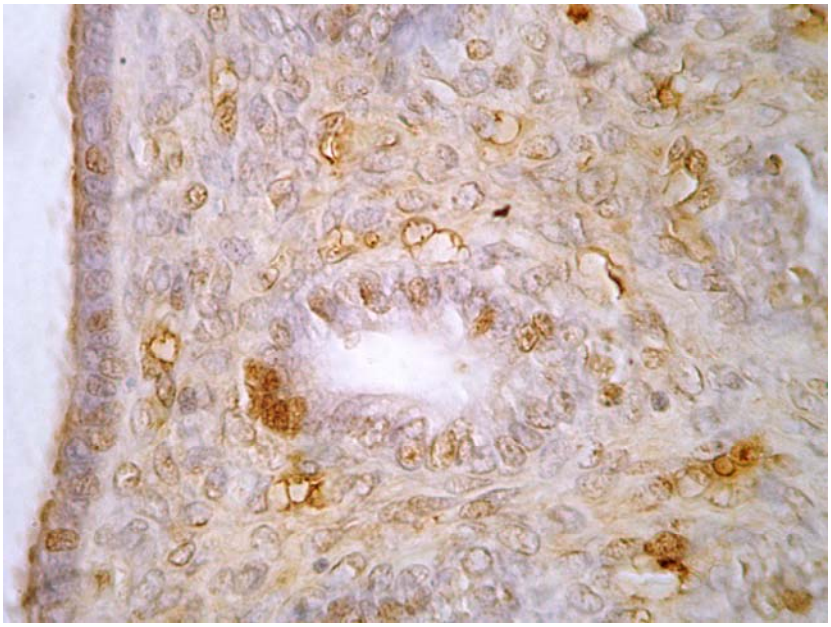
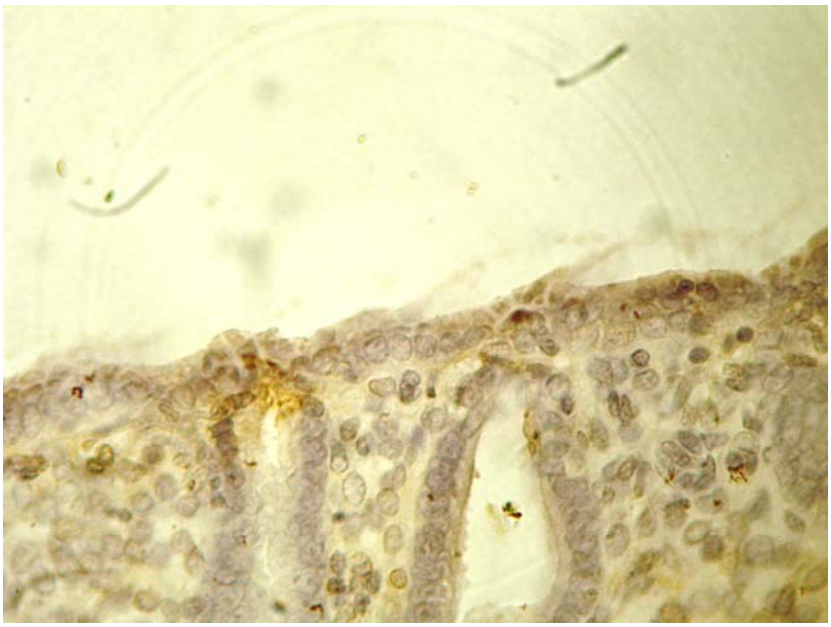


Figura 2. Marcação pelo *fas* em endométrio ectópica



5. Referências Bibliográficas

- Braun DP, Ding J, Shen J, Rana N, Fernandez BB, Dmowski WP. Relationship between apoptosis and the number of macrophages in eutopic endometrium from women with and without endometriosis. Fertil Steril 2002; 78(4): 830-835.
- Chung HW, Lee JY, Moon HS, Hur SE, Park MH, Wen Y, Polan ML. Matrix metalloproteinase-2, membranous type 1 matrix metalloproteinase, and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression in ectopic and eutopic endometrium. Fertil Steril 2002; 78(4):787-795.
- Clement PB. Pathology of endometriosis. Pathol. Annu 1990; 25(Pt 1): 245-295.
- Cornillie FJ, Lauweryns JM, Brosens IA. Normal human endometrium. An ultrastructural survey. Gynecol Obstet Invest 1985; 20(3):113-129.
- Cornillie FJ. Peritoneal endometriosis; In: Brosens I., Gordon E. (eds): Tubal infertility. London, Gower Medical, 1990:3-8.
- D'Hooghe TM, Bambra CS, Cornillie FJ, Isahakia M, Koninckx PR. Prevalence and laparoscopic appearance of spontaneous endometriosis in the babbon (papio anubis, papio cynocephalus). Biol Reprod 1991; 45(3):411-416.
- Fujishita A; Hasuo A; Khan KN; Masuzaki H; Nakashima H; Ishimaru T. Immunohistochemical study of angiogenic factors in endometrium and endometriosis. Gynecol Obstet Invest 1999; 48(Suppl 1):36-44.
- Hahn DW, Carraher RP, Foldesy RG, McGuire JL. Development of an animal model for quantitatively evaluating effects of drugs on endometriosis. Fertil Steril 1985; 44(3):410-415.
- Halme J, Hammond MG, Hulka JF, Raj SG, Talbert LM. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. Obstet Gynecol 1984; 64(2):151-154.

- Manyak MJ, Nelson LM, Solomon D, Degraff W, Stillman RJ, Russo A. Fluorescent detection of rabbit endometrial implants resulting from monodispersed viable cell suspensions. Fertil Steril 1990; 54(2):356-359.
- McLaren J; Prentice A; Charnock-Jones DS; Sharkey AM; Smith SK. Immunolocalization of the apoptosis regulating proteins BCL-2 and BAX in human endometrium and isolated peritoneal fluid macrophages in endometriosis. Hum Reprod 1997; 12(1):146-152.
- Nagata S. Apoptosis by death factor. Cell 1997; 88(3):355-365.
- Nogueira AP, Abrão MS. Endometriose: as hipóteses etiopatogênicas atuais. In: Abrão MS (Eds). Endometriose: uma visão contemporânea. Livraria e Editora Revinter Ltda. 2000;13-26.
- Oliveira VA, Abreu LG, Ferriani RA, Reis RM, Moura MD. Vascular endothelial growth factor in the plasma, follicular fluid and granulosa cells of women with endometriosis submitted to in vitro fertilization-a pilot study. Gynecol Endocrinol 2005; 20(5): 284-288.
- Rosa e Silva JC, Rosa e Silva ACJS, Coltro PS, Garcia SB, Candido dos Reis FJ, Nogueira AA. Modelo experimental para endometriose em coelhas com seguimento evolutivo das lesões. Rev Bras Ginecol Obstet 2004; 26(9):715-719.
- Sampson JA. Peritonial endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritonial cavity. Am J Obstet Gynecol 1927; 14:422-469.
- Schenken RS, Asch RH. Surgical induction of endometriosis in the rabbit: Effects on fertility and concentration of peritoneal fluid prostaglandins. Fertil Steril 1980; 34(6):581-587.
- Schor E, Freitas V, Soares Jr JM, Simões MJ, Baracat EC. Endometriose: Modelo Experimental em Ratas. Rev Bras Ginecol Obstet 1999; 21(5):281-284.

- Suginami H. A Reappraisal of the coelomic metaplasia theory by reviewing endometriosis occurring in unusual sites and instance. Am J Obstet Gynecol 1991; 165(1):214-218.
- Szymanowski K. Apoptosis pattern in human endometrium in women with pelvic endometriosis. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2007; 132(1):107-110.
- Vernon MW, Wilson EA. Studies on the surgical induction of endometriosis in the rat. Fertil Steril 1985; 44(5):684-694.
- Witz CA, Cho S, Montoya-Rodriguez IA, Schenken RS. The alpha(2) beta(1) and alpha(3) beta(1) integrins do not mediate attachment of endometrial cells to peritoneal mesothelium. Fertil Steril 2002; 78(4):796-803.

Este trabalho foi elaborado de acordo com: Universidade de São Paulo. Sistema Integrado de Bibliotecas. Grupo Diteses. Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: documento eletrônico e impresso / Vânia M. B. de Oliveira Funaro, coord. [et al.]. São Paulo: SIBi-USP, 2004.

As referências bibliográficas foram normatizadas de acordo com: *International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver Style).* Updated Oct 2001: http://www.icmje.org/index.html.

6. Anexos

Figuras extras

Figura 1E. Lesão macroscópica após 4 semanas da indução:

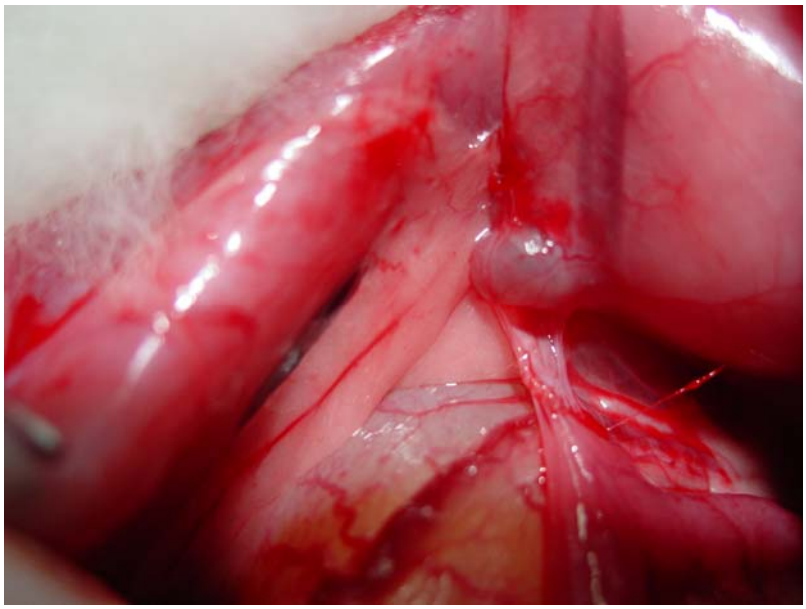


Figura 2E. Lesão macroscópica após 8 semanas da indução:

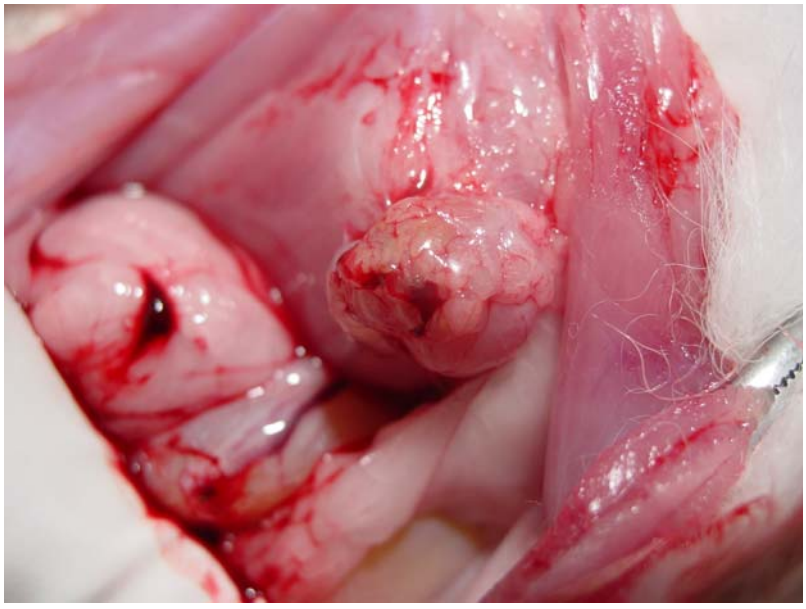


Figura 3E. Lesão microscópica após 4 semanas da indução:

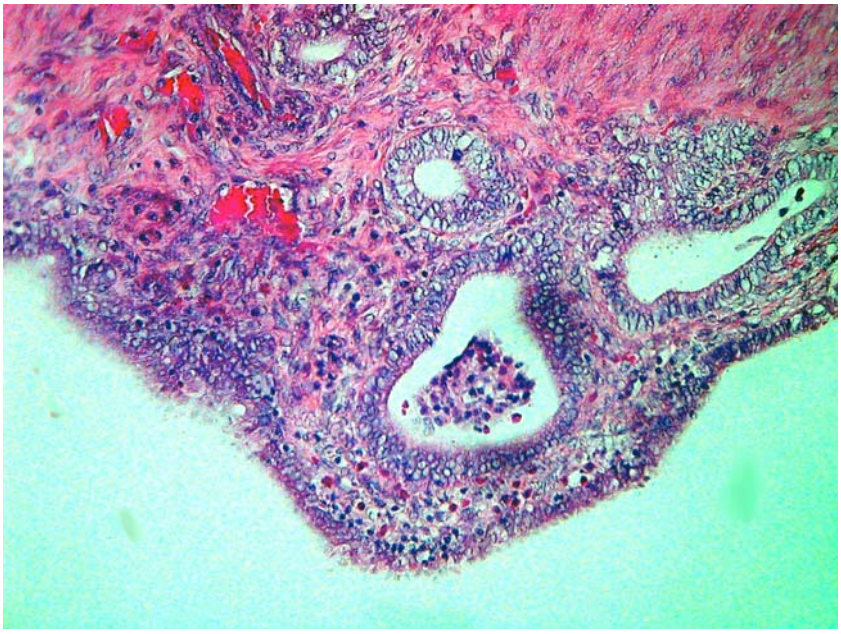


Figura 4E. Lesão microscópica após 8 semanas da indução:

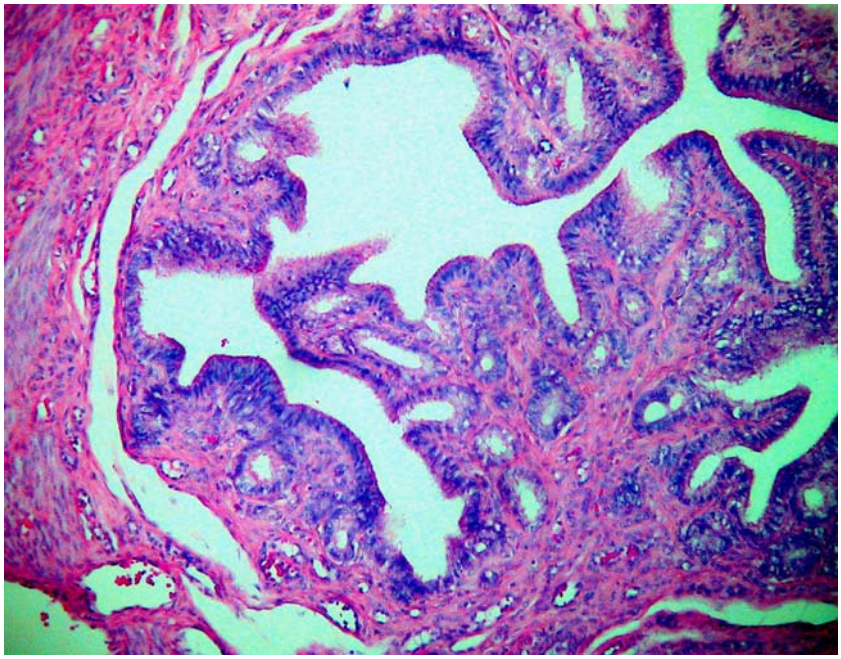


Figura 5E. Marcação pelo PCNA em lesão ectópica com 4 semanas de evolução:

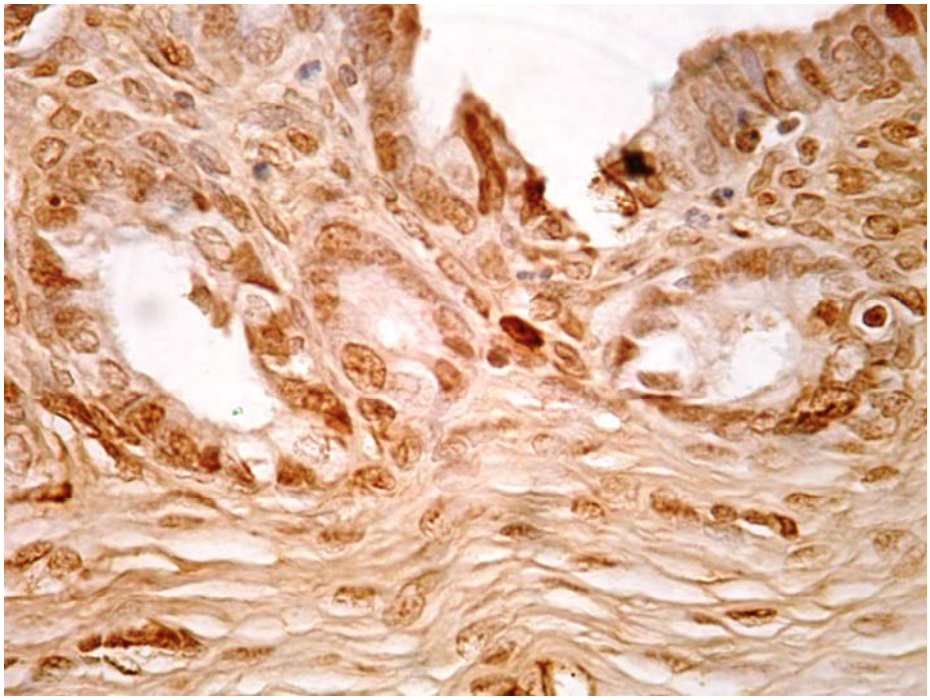


Figura 1 e 6E. Marcação pelo PCNA em lesão ectópica com 8 semanas de evolução:

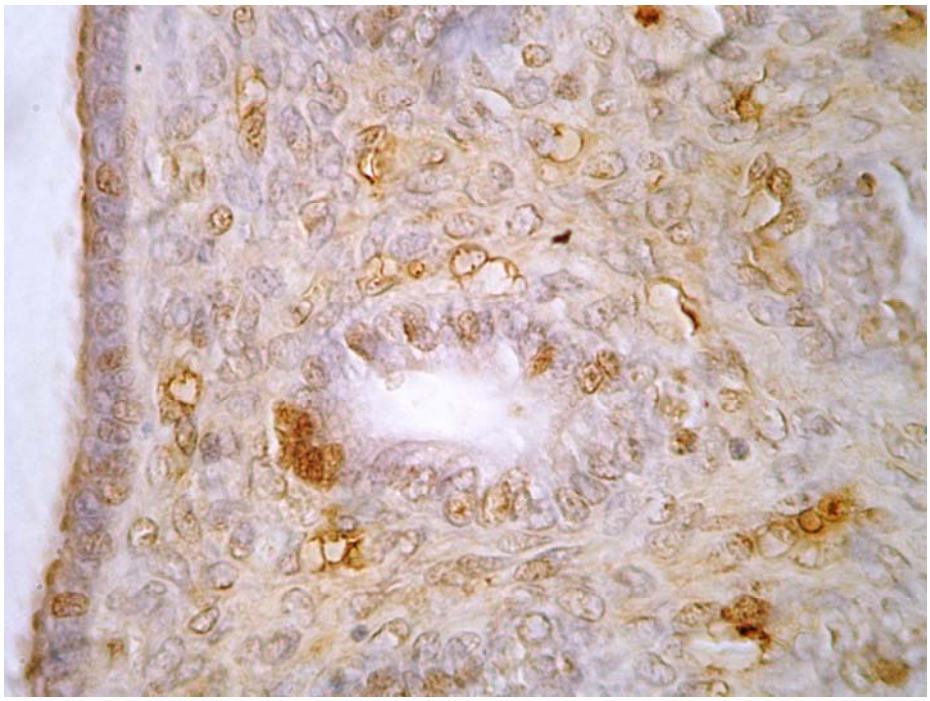


Figura 7E. Controle positivo da marcação pelo PCNA:

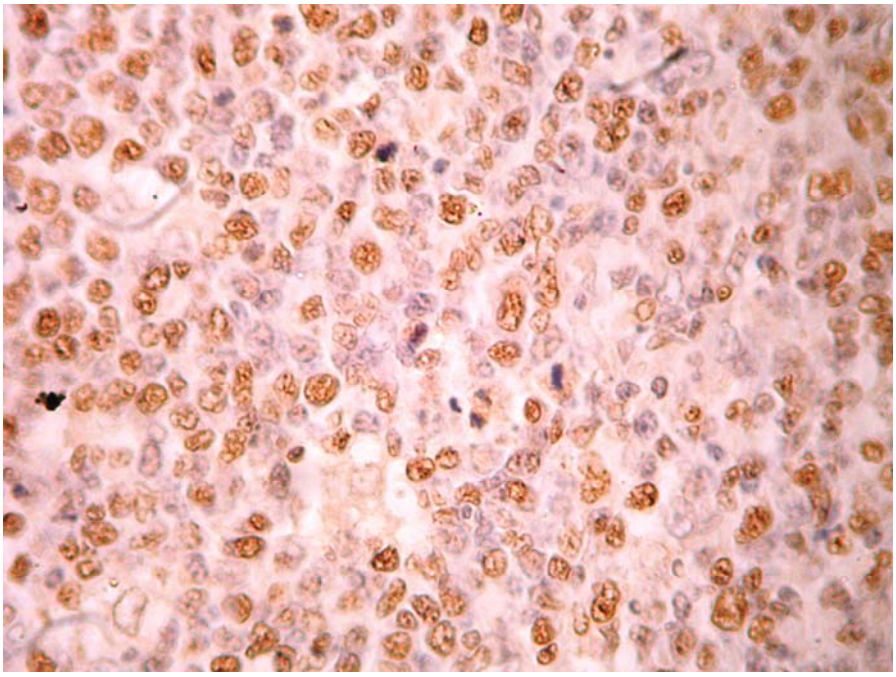


Figura 8E. Controle negativo da marcação pelo PCNA:

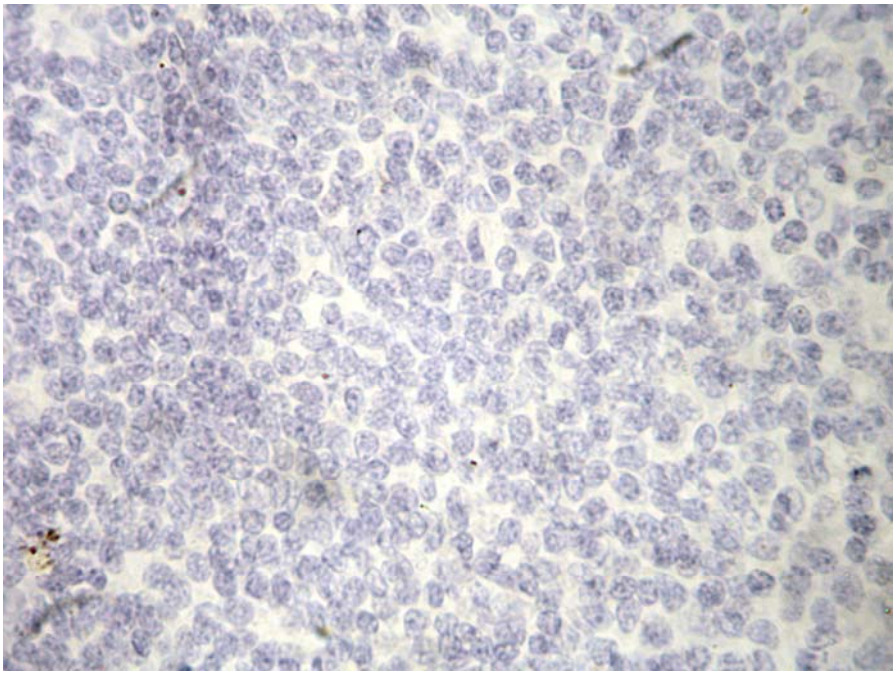


Figura 2 e 9E. Marcação pelo *fas* em lesão ectópica com 4 semanas de evolução:

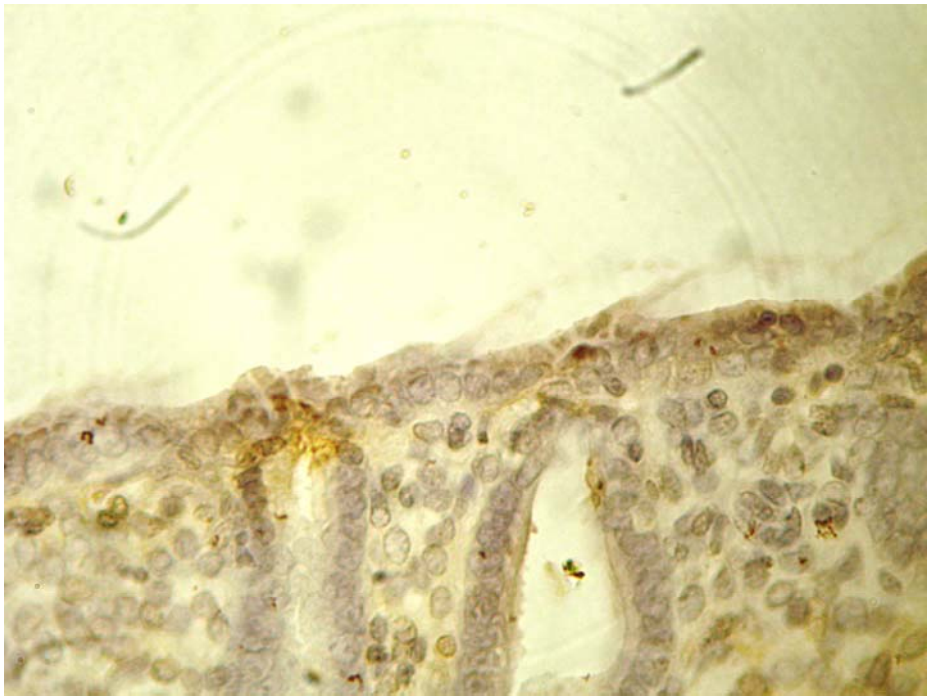


Figura 10E. Marcação pelo *fas* em lesão ectópica com 8 semanas de evolução:

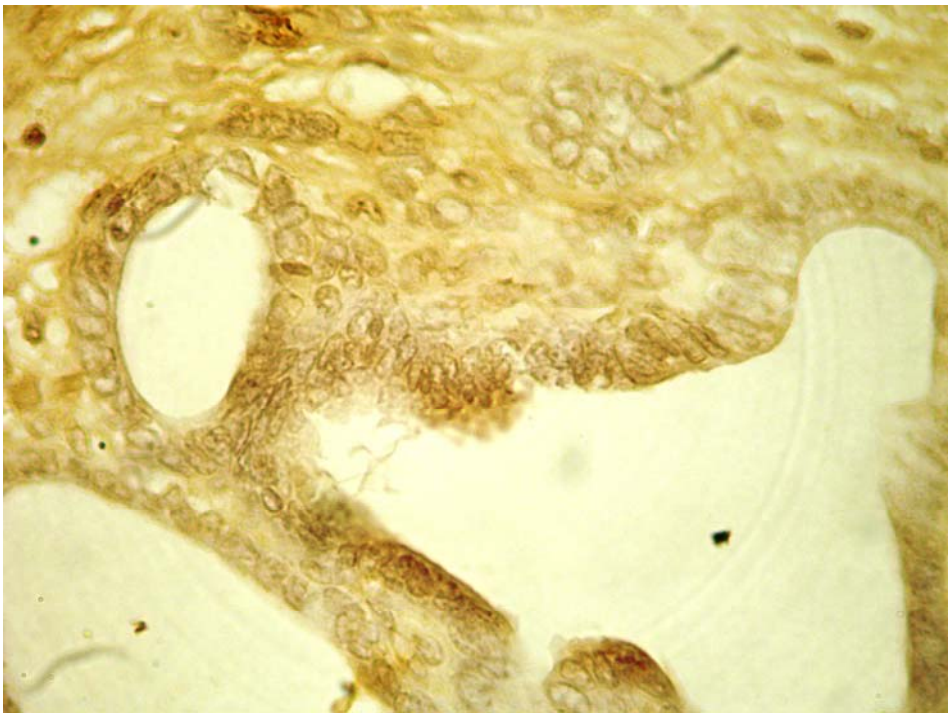


Figura 11E. Controle positivo da marcação pelo *fas*:

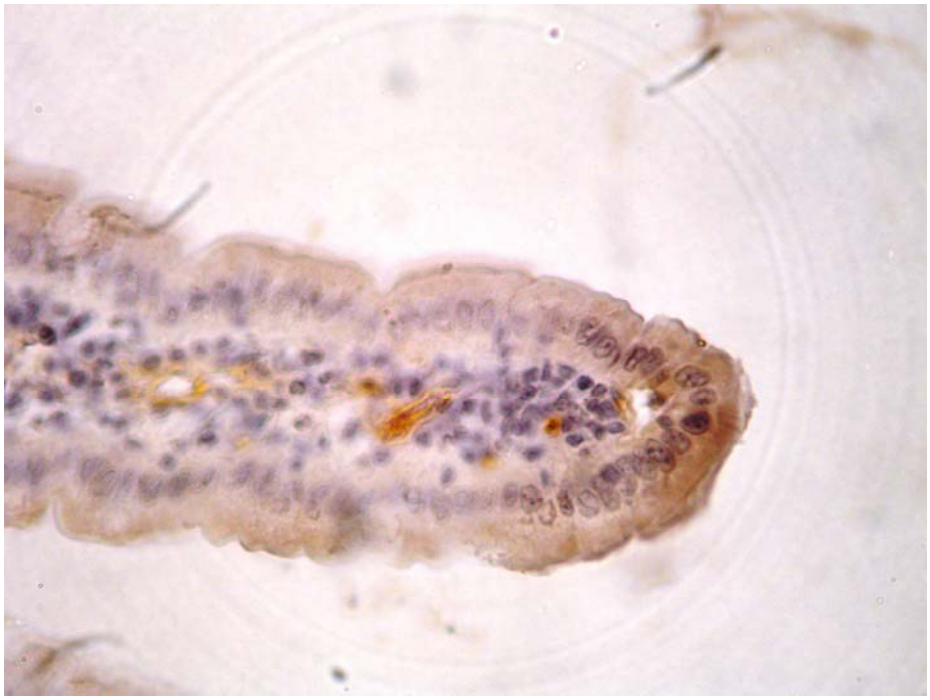
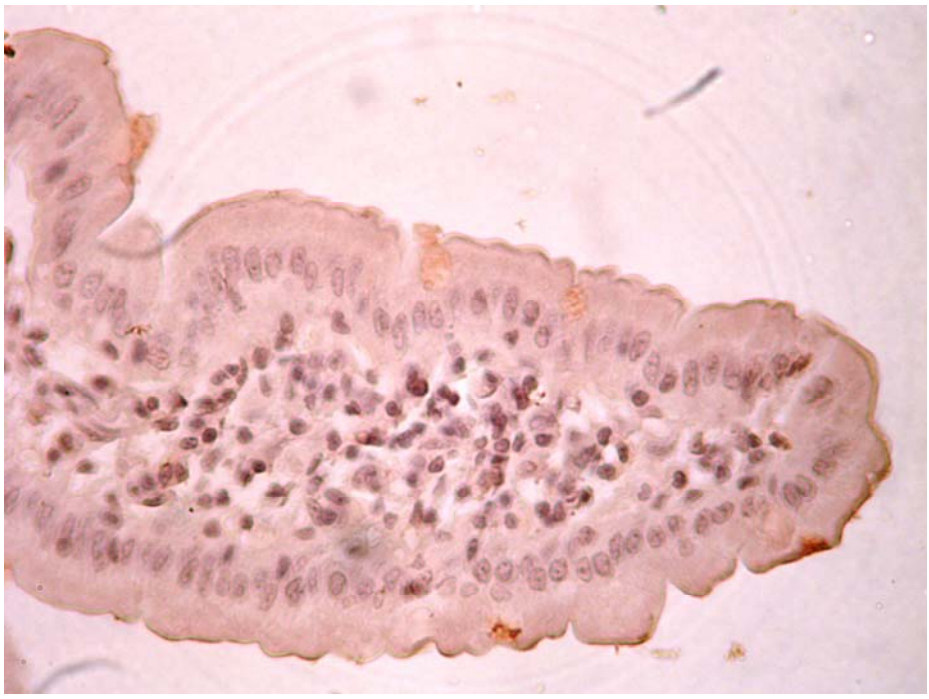


Figura 12E. Controle negativo da marcação pelo *fas*:



Modelo Experimental para Endometriose em Coelhas com Seguimento Evolutivo das Lesões

Experimental Endometriosis Model in Rabbits with Follow-up of the Lesions

Julio César Rosa e Silva[1], Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva[1], Pedro Soler Coltro[1], Sérgio Britto Garcia[2], Francisco Cândido dos Reis[1], Antônio Alberto Nogueira[1]

RESUMO

Objetivos: *desenvolvimento de modelo experimental de endometriose em coelhas avaliando a evolução temporal da doença macro e microscopicamente.*

Métodos: *foram utilizadas 30 coelhas nas quais induziu-se lesão de endometriose por fixação de fragmento do corno uterino no peritônio da parede pélvica. Após 4 ou 8 semanas verificou-se a viabilidade da lesão por laparoscopia. Foi documentado o aspecto visual endoscópico e feita avaliação anatomopatológica. Os grupos foram comparados quanto à presença de lesão visual à laparoscopia, seu maior diâmetro, presença de aderências e histologia da mesma. Na análise estatística foram utilizados os testes* t *de Student e de Mann-Whitney, com significância estatística de 5%.*

Resultados: *em todos os casos foi identificada a presença de lesão visual à laparoscopia após 4 semanas, sendo 64% císticas, e em 80% dos casos após 8 semanas, 66% císticas. As aderências estavam presentes em 71% das coelhas após 4 semanas (sendo ausentes nos implantes) e em 80% das coelhas após 8 semanas (13% nos implantes). O diâmetro das lesões após 8 semanas de implante foi maior que após 4 semanas ($p<0,0001$). A análise histológica mostrou 100% de tecido endometrial (glândula e estroma) em atividade nos 2 grupos.*

Conclusão: *a utilização desse modelo experimental de endometriose em coelhas mostrou ser possível reproduzir a doença nesse animal, sendo viável e de fácil execução. Permitiu documentar as características e a progressão dos implantes, o crescimento e o desenvolvimento histopatológico. Embora com mesmo aspecto histológico, as lesões após oito semanas foram maiores que após 4 semanas da implantação.*

PALAVRAS-CHAVE: *Endometriose. Endometriose: modelo experimental. Laparoscopia.*

Introdução

A endometriose é, atualmente, uma das doenças ginecológicas mais estudadas. Sua incidência é variável de acordo com a população analisada, desde 2 a 7,5% em pacientes assintomáticas submetidas à laqueadura tubária[1,2] até 50% nas pacientes com dor pélvica associada à infertilidade[3]. Caracteriza-se pela presença de tecido endometrial, seja ele glandular ou estromal, fora da cavidade uterina[4]. As lesões de endometriose podem ter aspectos variáveis, podendo ser classificadas em típicas e atípicas. As lesões típicas são as negras e as atípicas as vesiculares, brancas, vermelhas e marrons. Alguns autores defendem a teoria de que estas seriam manifestações evolutivas de doença progressiva[5,6].

A etiopatogenia da endometriose continua controversa e várias são as teorias atuais para explicá-la, embora nenhuma delas o faça completamente quando isolada. A mais aceita é a teoria

[1]Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP
[2]Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

Correspondência:
Antônio Alberto Nogueira
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo
Av. Bandeirantes, 3900 – Campus da USP
14049-900 – Ribeirão Preto – SP

de Sampson[4], que aponta a presença de células endometriais viáveis no fluxo menstrual retrógrado como causador das lesões. No entanto, praticamente 90% das mulheres têm trompas pérvias e apresentam fluxo menstrual retrógrado[7] e a maioria não apresentará endometriose. Há também a teoria da metaplasia celômica[8] e, mais recentemente, a teoria imunológica[9-11]. Hoje se acredita na confluência destas teorias para a explicação da etiopatogenia da endometriose. Haveria realmente fluxo menstrual retrógrado associado a predisposição imunológica no microambiente peritoneal que facilitaria o implante de células endometriais viáveis e com potencial para implantação.

A complexidade na sua fisiopatologia e a heterogeneidade da doença em humanos faz da endometriose uma das doenças mais estudadas da atualidade. Para facilitar estes estudos alguns modelos experimentais vêm sendo propostos. O achado de endometriose espontânea em 25% de animais primatas não humanos[12] com histologia e localização semelhantes às encontradas em humanos[3,13-15] levou à utilização destes animais como modelo experimental, porém sua utilização vem sendo progressivamente reduzida devido às dificuldades éticas e pela heterogeneidade das lesões. As ratas seriam modelos experimentais bem mais acessíveis com lesões homogêneas e manejo fácil[16], mas o pequeno porte do animal dificulta a abordagem cirúrgica com material laparoscópico. Assim, a utilização de coelhas passa a ser boa opção de modelo experimental, pois apresenta baixo índice de infecção, sem necessidade, portanto, de utilização de antibióticos[17]. O porte do animal facilita o acesso por vídeo-laparoscopia se comparado com ratas, e a ausência de ciclo estral dispensa a necessidade de programação dos procedimentos de acordo com a fase do ciclo do animal. Além disso, apresentam lesões homogêneas, geralmente massas sólidas hemorrágicas, facilmente obtidas por meio de autotransplante de fragmentos endometriais ou abertura e exposição da cavidade endometrial[18]. A opção pela técnica cirúrgica de colocação do implante na parede abdominal foi feita pela necessidade de visualização fácil da lesão à laparoscopia.

A padronização e validação de técnica facilmente reprodutível tornam-se extremamente importantes para o desenvolvimento deste tipo de pesquisa, permitindo simular novas propostas diagnósticas e terapêuticas para a abordagem desta doença. Não encontramos na literatura nenhuma descrição de modelo experimental para endometriose em coelhas com seguimento evolutivo das lesões utilizando-se da técnica laparoscópica e acreditamos ser este um modelo prático, que permitiria caracterizar e documentar as lesões induzidas com baixas taxas de aderências pélvicas por ser método pouco invasivo. A proposta deste estudo é de produzir lesões endometrióticas com o emprego de laparotomia e realizar o seguimento evolutivo da lesão por videolaparoscopia e estudo histológico comparativo das lesões com quatro e oito semanas após o implante.

Materiais e Métodos

Trata-se de estudo experimental realizado no setor de cirurgia experimental do Hospital das Clínicas do Departamento de Cirurgia e Anatomia e no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Foram utilizadas 30 coelhas adultas Nova Zelândia, fêmeas, virgens, com peso aproximado de 2,5 kg. As coelhas foram mantidas em gaiolas apropriadas sob controle de temperatura, umidade e luminosidade do ambiente por três dias antes da indução cirúrgica das lesões, alimentadas com água e ração *ad libitum*. As coelhas eram pesadas no dia do procedimento inicial.

Todas foram submetidas a laparotomia para indução da lesão de endometriose, após anestesia geral endovenosa com 3 mL de tionembutal associado a 1 mL de xilestasina. Procedeu-se à tricotomia da parede abdominal dos animais, seguida dos cuidados de anti-sepsia. As luvas de látex foram lavadas com soro fisiológico 0,9% exaustivamente para redução da formação de aderências e o mesmo pesquisador realizou todos os procedimentos.

A abertura da cavidade pélvica foi realizada com incisão longitudinal mediana de aproximadamente 2 cm, iniciando 2 cm cranialmente ao púbis do animal. Posteriormente foi ressecado segmento de cerca de 4 cm do corno uterino direito, seguido de seu fechamento. A porção uterina ressecada foi imersa em soro fisiológico 0,9% a 4ºC por cerca de 2 minutos e então incisada longitudinalmente, sendo retirado fragmento de 5 por 5 mm. Este fragmento de tecido endometrial foi suturado ao peritônio próximo ao trato reprodutivo da coelha, utilizando-se fio Vicryl 6.0, com a face endometrial livre voltada para a cavidade abdominal, com posterior fechamento da incisão cirúrgica abdominal. Nenhuma suplementação hormonal foi administrada antes ou após a laparotomia.

As coelhas foram divididas em dois grupos, sendo o primeiro denominado grupo 8 semanas, constituído de 15 animais, que foram submetidos a laparoscopia diagnóstica para pesquisa de lesões de endometriose, documentação da lesão por meio de vídeo e medida da lesão após oito semanas de sua indução. O outro grupo, chamado grupo 4 semanas, também composto de 15 animais, foi submetido aos mesmos procedimentos porém somente após quatro semanas de seguimento. A

laparoscopia foi realizada utilizando-se óptica de 6 mm e 30° e trocarte de 7 mm. Após incisão longitudinal na pele e tecido subcutâneo de 7,0 mm, sobre a linha mediana e 6,0 cm abaixo do esterno, foi introduzido de maneira direta um trocarte de 7 mm. Procedeu-se à insuflação de gás CO_2 com fluxo constante de um litro por minuto e pressão máxima de aproximadamente 3 mmHg e realizada a inspeção da cavidade abdômino-pélvica, com registro das imagens por meio de vídeo super VHS. Após a inspeção pélvica, identificação e documentação da lesão, as coelhas foram sacrificadas e a lesão foi excisada para análise histológica. Os tecidos retirados foram fixados em formol 10%, processados para inclusão em parafina e corados por hematoxilina e eosina (HE).

Os grupos foram analisados quanto ao peso médio das coelhas, ganho de peso total ao longo do seguimento e tempo cirúrgico da laparotomia durante indução da lesão endometriótica para homogeneização das amostras e padronização para posterior comparação. A análise estatística utilizou o programa GraphPad Prism® 2.01 32 Bit Executable (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA), utilizando-se o teste estatístico *t* de Student para as variáveis peso e tempo de cirurgia, que seguiram padrão de distribuição normal sem diferença à análise de variância. O teste de Mann-Whitney foi empregado para a comparação do ganho de peso ao longo de seguimento, pois esta variável não apresentou distribuição gaussiana. Os grupos foram então comparados quanto ao aspecto visual da lesão e tamanho da mesma; para esta comparação foi utilizado o teste de Mann-Whitney, apesar da distribuição normal, já que os grupos apresentavam variâncias diferentes. Considerou-se o nível de significância de 5%.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo.

Resultados

Os grupos apresentaram-se homogêneos quanto ao peso no início do experimento e ganho de peso ao longo do seguimento. O peso inicial foi de 2493,0±231,4 g no grupo 8 semanas e de 2453,0±269,6 g no grupo 4 semanas, com p=0,66, e o ganho de peso foi de 440,0±284,9 g e de 293,3±301,1 g para os grupos 8 e 4 semanas, respectivamente (p=0,18). O tempo cirúrgico médio da realização da laparotomia para indução da endometriose, no grupo 8 semanas, foi de 18,6 minutos e no grupo 4 semanas, de 16,0 minutos (p=0,02).

Na comparação entre os achados cirúrgicos da videolaparoscopia verificamos que a lesão foi visualizada em 80% das coelhas do grupo 8 semanas e em 100% do grupo 4 semanas, embora após o sacrifício do animal e exploração do peritônio via aberta tenham sido encontradas lesões em todos os animais, de ambos os grupos. Das lesões visíveis na laparoscopia, 66% foram caracterizadas como de aspecto cístico no grupo 8 semanas, semelhante ao achado do grupo 4 semanas, em que este aspecto foi descrito em 64% das lesões.

As aderências estavam presentes em 71% das coelhas após 4 semanas, porém em locais distintos dos implantes endometriais, e em 80% das coelhas após 8 semanas, sendo 13% no local dos implantes.

Na avaliação da medida das lesões encontramos diferença significante entre os dois grupos, sendo maiores as lesões após 8 semanas de seguimento. A média do maior diâmetro das lesões do grupo 8 semanas foi de 1,82±0,73 cm (variando de 0,7 a 3,5 cm) e do grupo 4 semanas, de 0,96±0,17 cm (variando de 0,7 a 1,3 cm) (p<0,0001) (Figura 1).

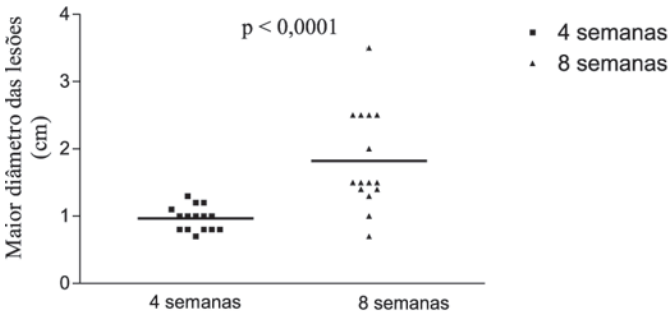


Figura 1 - Distribuição dos diâmetros das lesões das coelhas de acordo com o período de avaliação.

A análise histológica mostrou que todas as amostras eram compostas de tecido endometrial (glândula e estroma) em atividade nos dois grupos, com características morfológicas similares entre eles. As lesões caracterizaram-se por cistos de paredes finas localizados sobre a musculatura estriada da parede abdominal, projetando-se para a cavidade abdominal. A parede destes cistos era formada por camada delgada de tecido conjuntivo, rica em células e revestida por epitélio pavimentoso simples. O estroma era rico em fibroblastos e apresentava alguns macrófagos e eosinófilos, além de grande quantidade de glândulas endometriais típicas. Portanto, o tecido da lesão de endometriose não sofreu alterações em sua composição e arquitetura ao longo do tempo, porém apresentou aumento de suas dimensões.

Discussão

O desenvolvimento das lesões após o implante do tecido endometrial ocorreu em todos os animais, com presença de estroma e glândulas à histologia, fato também relatado em outros estudos experimentais. Schor et al.[17] e Schenken e Asch[19] descrevem inclusive os implantes como bem vascularizados e bem delimitados, com incremento substancial de tamanho após sete semanas da fixação ao peritônio. Esta facilidade de implantação do tecido endometrial ectópico traduz a alta eficácia deste modelo experimental para desenvolvimento da endometriose, o que talvez permitisse realização do estudo com menor número de animais, apesar de que a demonstração da evolução significativa no diâmetro da lesão não teria sido possível com casuística menor.

A avaliação videolaparoscópica da lesão, por ser menos invasiva que a laparotomia, possibilita a avaliação e documentação seriada do aspecto macroscópico das lesões e a demonstração de sua evolução temporal. Esta evolução é bastante evidente em nosso estudo, no qual houve incremento significativo no maior diâmetro da lesão entre a 4ª e a 8ª semana após o implante do tecido endometrial. A progressão do tecido endometrial ectópico sugere viabilidade do implante e provável evolução da doença, e a predominância do aspecto cístico das lesões caracteriza atividade secretora destes focos. Não houve, porém, mudança nas características histológicas do tecido endometrial ectópico quando analisado 4 e 8 semanas após o implante, sem mudança na cor ou aspecto visual das lesões à macroscopia e sem alterações no padrão de distribuição glandular ou estromal à microscopia. Esses dados são concordantes com os da literatura, que não fazem menção a nenhuma mudança na histologia dos implantes e, sim, crescimento das lesões medidas pelo maior diâmetro ou pelo volume.

Um quinto das lesões endometrióticas encontradas após a abertura da cavidade abdominal das coelhas do grupo 8 semanas não haviam sido vistas durante a laparoscopia, pois encontravam-se aderidas a estruturas adjacentes. A visualização a céu aberto e a lise destas aderências permitiram identificação de todas as lesões.

O peso das coelhas não diferiu entre os grupos, mostrando, provavelmente, que foram mantidas sob mesmas condições de alimentação, luz e temperatura, não havendo, portanto, interferências das condições ambientais no tamanho das lesões entre eles.

As primeiras coelhas submetidas à indução de lesão de endometriose foram as do grupo 8 semanas, o que talvez justifique o maior tempo cirúrgico encontrado nos procedimentos deste grupo em relação ao grupo 4 semanas; não acreditamos, porém, que isto possa ter influenciado na evolução dos implantes.

A utilização dos modelos experimentais para testes terapêuticos com drogas já existentes no mercado, como o danazol, os agonistas do GnRH e inibidores da aromatase, e com novas substâncias ainda em fase de experimentação já vem sendo empregada por alguns autores, com sucesso[20-25]. A verdadeira equivalência destes focos de tecido endometrial implantado na parede de ratas e coelhas com a endometriose humana não é conhecida, por isso estudos comparativos são necessários para que os resultados destes experimentos possam ser extrapolados para humanos.

Com base nos achados deste estudo concluímos que este modelo experimental mostrou-se eficaz no desenvolvimento de focos de endométrio ectópico na parede abdominal de coelhas, mantendo características evolutivas que sugerem progressão da lesão ao longo do tempo e viabilidade do tecido implantado. A possibilidade de realização de laparoscopias ou microlaparoscopias seriadas permite a avaliação macroscópica do aspecto evolutivo da lesão, registro das imagens e coleta de material para exame histológico quando necessário, de maneira minimamente invasiva.

Abstract

Purpose: *development of a new experimental model of endometriosis induction in rabbits evaluating its temporal evolution both macro-and microscopically.*
Methods: *thirty female rabbits were submitted to endometriosis induction through the fixation of a piece of the left uterine horn to the abdominal peritoneum. After four or eight weeks the viability of the lesions was verified by laparoscopy. The lesions were observed endoscopically. The implants were measured and histological analyses were made. The groups were compared for the presence of endometriotic lesion on laparoscopy, presence of adhesions, implant size and histological aspects. For statistical analyses we utilized Student's* t *and Mann-Whitney's tests, with a statistical significance of 5%.*
Results: *endometriotic lesions were identified in all cases submitted to laparoscopy after 4 weeks of induction, 64% of them cystic, and in 80% of the rabbits after eight weeks, 66% of which cystic. The adhesions were present in 71% of the rabbits after 4 weeks (none in the implants) and in 80% of the rabbits after 8 weeks (13% in the implants). The lesions were significantly larger after 8 weeks ($p<0,0001$). The histological analyses showed 100% of endometrial tissue in both groups.*
Conclusion: *this experimental model showed that it is possible to simulate endometriosis in rabbits with a viable and simple technique, also allowing to record the characteristics and development of the implants macro-and microscopically.*

Although the histological aspects were similar, the lesions after eight weeks were larger than after four, making their manipulation easier.

KEYWORDS: *Endometriosis. Endometriosis: experimental model. Laparoscopy.*

Referências

1. Strathy JH, Molgaard CA, Coulam CB, Melton LJ 3rd. Endometriosis and infertility: a laparoscopic study of endometriosis among fertile and infertile women. Fertil Steril 1982; 38:667-72.

2. Kirshon B, Poindexter AN 3rd, Fast J. Endometriosis in multiparous women. J Reprod Med 1989; 34:215-7.

3. Cornillie FJ. Peritoneal endometriosis. In: Brosens I, Gordon E, editors. Tubal infertility. 1st ed. London: Gower Medical; 1990. p. 3-8.

4. Sampson JA. Peritonial endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritonial cavity. Am J Obstet Gynecol 1927; 14:422-69.

5. Redwine DB. The distribution of endometriosis in the pelvis by age groups and fertility. Fertil Steril 1987; 47:173-5.

6. Koninckx PR, Meuleman C, Demeyere S, Lesaffre E, Cornillie FJ. Suggestive evidence that pelvic endometriosis is a progressive disease, whereas deeply infiltrating endometriosis is associated with pelvic pain. Fertil Steril 1991; 55:759-65.

7. Halme J, Hammond MG, Hulka JF, Raj SG, Talbert LM. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. Obstet Gynecol 1984; 64:151-4.

8. Suginami H. A reappraisal of the coelomic metaplasia theory reviewing endometriosis occurring in unusual sites and instances. Am J Obstet Gynecol 1991; 165:214-8.

9. Chung HW, Lee JY, Moon HS, et al. Matrix metalloproteinase-2, membranous type 1 matrix metalloproteinase, and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression in ectopic and eutopic endometrium. Fertil Steril 2002; 78:787-95.

10. Braun DP, Ding J, Shen J, Rana N, Fernandez BB, Dmowski WP. Relationship between apoptosis and the number of macrophages in eutopic endometrium from women with and without endometriosis. Fertil Steril 2002; 78:830-5.

11. Witz CA, Cho S, Montoya-Rodriguez IA, Schenken RS. The a2 b1 and a3 b1 integrins do not mediate attachment of endometrial cells to peritoneal mesothelium. Fertil Steril 2002; 78:796-803.

12. D'Hooghe TM, Bambra CS, Cornillie FJ, Isahakia M, Koninckx PR. The prevalence and laparoscopic appearance of spontaneous endometriosis in the baboon (Papio anubis, Papio cynocephalus). Biol Reprod 1991; 45:411-6.

13. Cornillie FJ, Lauweryns JM, Brosens IA. Normal human endometrium. An ultrastructural survey. Gynecol Obstet Invest 1985; 20:113-29.

14. Clement PB. Pathology of endometriosis. Pathol Annu 1990; 25:245-95.

15. Vernon MW, Wilson EA. Studies on the surgical induction of endometriosis in the rat. Fertil Steril 1985; 44:684-94.

16. Berthet J, Pasquier D, Racinet C. An original model of experimental endometriosis in the rabbit. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris) 1992; 21:625-8.

17. Schor E, Freitas V, Soares Júnior JM, Simões MJ, Baracat EC. Endometriose: modelo experimental em ratas. Rev Bras Ginecol Obstet 1999; 21:281-4.

18. Manyak MJ, Nelson LM, Solomon D, DeGraff W, Stillman RJ, Russo A. Fluorescent detection of rabbit endometrial implants resulting from monodispersed viable cell suspensions. Fertil Steril 1990; 54:356-9.

19. Schenken RS, Asch RH. Surgical induction of endometriosis in the rabbit: effects on fertility and concentrations of peritoneal fluid prostaglandins. Fertil Steril 1980; 34:581-7.

20. Hahn DW, Carraher RP, Foldesy RG, McGuire JL. Development of an animal model for quantitatively evaluating effects of drugs on endometriosis. Fertil Steril 1985; 44:410-5.

21. Jones RC. The effect of a luteinizing hormone releasing hormone (LRH) agonist (WY-40, 972), levonorgestrel, danazol and ovariectomy on experimental endometriosis in the rat. Acta Endocrinol (Copenh) 1984; 106:282-8.

22. Sakata M, Terakawa N, Mizutani T, et al. Effects of danazol, gonadotropin releasing hormone agonist, and a combination of danazol and gonadotropin-releasing hormone agonist on experimental endometriosis. Am J Obstet Gynecol 1990; 163:1679-84.

23. Zanagnolo VL, Beck R, Schlaff WD, Damewood MD, Bobbie D, Rock JA. Time-related effects of a gonadotropin releasing hormone analog treatment in experimentally induced endometriosis in the rat. Fertil Steril 1991; 55:411-5.

24. Tjaden B, Galetto D, Woodruff JW, Rock JA. Time-related effects of RU486 treatment in experimentally induced endometriosis in the rat. Fertil Steril 1993; 59:437-40.

25. Zanella SR, Tsuruda RH, Guzzoni SR, Trautwein VW, Beck RT. Endometriose: tratamento com agonista do GnRH a partir de lesão induzida em ratas. Rev Bras Ginecol Obstet 1994; 16:125-8.

Recebido em: 16/8/04
Aceito com modificações em: 16/9/04