

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA
MESTRADO EM PATOLOGIA**

**ANÁLISE HISTOQUÍMICA E MORFOMÉTRICA DO ESTROMA E DAS
GLÂNDULAS ENDOMETRIAIS DE RATAS TRATADAS COM
DEXAMETASONA**

ANA PAULA CASTOR BATISTA

**RECIFE
2008**

ANA PAULA CASTOR BATISTA

**ANÁLISE HISTOQUÍMICA E MORFOMÉTRICA DO ESTROMA E DAS
GLÂNDULAS ENDOMETRIAIS DE RATAS TRATADAS COM
DEXAMETASONA**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Patologia na área de concentração
em Patologia Geral do Centro de
Ciências da Saúde da Universidade
Federal de Pernambuco, como
requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Patologia.

ORIENTADORA: Prof^{fa}. Dr^a Paloma Lys de Medeiros - UFPE

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr^o Álvaro Aguiar Coelho Teixeira - UFRPE

RECIFE

2008

Batista, Ana Paula Castor

Análise histoquímica e morfométrica do estroma e das glândulas endometriais de ratas tratadas com dexametasona / Ana Paula Castor Batista. – Recife : O Autor, 2008.

30 folhas. Il: fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Patologia, 2008.

Inclui bibliografia.

1. Endometriose - Tratamento. 2. Dexametasona – Ação na endometriose. I. Título.

**618,14-002
618.142**

**CDU (2. ed)
CDD (22.ed.)**

**UFPE
CCS2008-058**



Universidade Federal de Pernambuco
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE MESTRADO EM PATOLOGIA

AUTOR: ANA PAULA CASTOR BATISTA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PATOLOGIA GERAL

NOME DA TESE: "Análise histoquímica e morfométrica do estroma e das glândulas endometriais de ratas tratadas com dexametasona."

ORIENTADORA: PALOMA LYS DE MEDEIROS

TESE DEFENDIDA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM PATOLOGIA

DATA: 31 de março de 2008

BANCA EXAMINADORA:

PROFA. SILVIA REGINA ARRUDA DE MORAES

PROF. NICODEMOS TELES DE PONTES FILHO

PROF. ALVARO AGUIAR COELHO TEIXEIRA.

myones

N. T. P. Filho

A. A. C. Teixeira

ANA PAULA CASTOR BATISTA

**ANÁLISE HISTOQUÍMICA E MORFOMÉTRICA DO ESTROMA E DAS
GLÂNDULAS ENDOMETRIAIS DE RATAS TRATADAS COM
DEXAMETASONA**

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Drº Álvaro Aguiar Coelho Teixeira
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (UFRPE)

Prof. Drº Nicodemos Teles de Pontes Filho
Departamento de Patologia (CCS/UFPE)

Profª. Drª Silvia Regina Arruda de Moraes
Departamento de Anatomia (CCB/UFPE)

A DEUS, que me cinge de força e aperfeiçoa o meu caminho. Salmos 18:32.

OFEREÇO

Aos meus queridos e amados pais: Vicente Antônio Batista e Diana de Lourdes Castor Batista, as minhas irmãs, ao meu noivo e aos meus sobrinhos, pois sem a ajuda deles as dificuldades e os obstáculos encontrados em meu caminho seriam mais difíceis.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter me dado o Dom da vida;

Aos meus queridos e amados pais, Vicente Antônio Batista e Diana de Lourdes Castor Batista, as minhas irmãs Verônica e Vânia, aos meus sobrinhos fofinhos Pedro Castor e Carlos Castor, ao meu e querido noivo Valdecir Júnior. Sem a ajuda de vocês deles as dificuldades e os obstáculos encontrados em meu caminho seriam mais difíceis.

Aos meus parentes queridos, que não estão mais perto de mim.

Aos professores e amigos da UFPE e UFRPE, Paloma Lys de Medeiros, Álvaro Aguiar Coelho Teixeira e Valéria Wanderley Teixeira, pois sem a ajuda e a dedicação de vocês eu não conseguiria terminar este trabalho.

Aos Amigos do mestrado Heitor Arôxa, George Luiz, Zenóbio Oliveira, Uilly Dias, Fábio Torres, Juliana Barros, João Hermógenes, Iracema Melo e aos amigos da minha querida turma, em especial para Ana Paula Maria, Iana Marcionila, Nairlene Santos, Paulo Leonardo, Paulo Ronaldo, Renato Cândido e Sylviane Caxias, pois estes foram e sempre serão inesquecíveis.

Aos amigos do Laboratório de Histotecnologia, Silvania Tavares Paz e Sidicley Araújo, por toda atenção.

À Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, pela oportunidade única de realização do Curso de Mestrado em Patologia.

Ao Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Área de Histologia-UFRPE, por ter cedido as instalações para realização desse trabalho.

Aos Coordenadores do Mestrado em Patologia, Prof. Dr. Roberto José Vieira de Melo e Prof^a. Dr^a. Silvia Regina Arruda de Moraes, pelo incentivo e apoio no meu crescimento profissional.

As secretárias do Mestrado em Patologia, pela dedicação e serviços prestados durante o curso.

Aos funcionários da biblioteca, pela atenção e dedicação.

Aos Professores da UFPE e UFRPE que participaram direta ou indiretamente da minha formação.

RESUMO

Durante a menstruação pode ocorrer a passagem, através das tubas uterinas, de material endometrial viável, com capacidade de implantação o que, conseqüentemente, originaria um quadro clínico denominado de endometriose. Estudos têm demonstrado que dentre os glicocorticóides, a dexametasona é capaz de inibir o crescimento de uma forma geral e seus efeitos podem ser observados nas funções reprodutivas, por bloquear várias respostas induzidas pelos estrogênios no útero de ratas. Portanto, a presente pesquisa teve por objetivo analisar histomorfometricamente os sítios de implantes endometriais sobre a região externa da musculatura da parede abdominal anterior de ratas tratadas com dexametasona (0,8 mg/Kg/dia). Para tanto, foram utilizadas 40 ratas albinas (*Rattus norvegicus albinus*), da linhagem *Wistar* com 90 dias de idade, pesando aproximadamente 150g, as quais foram submetidas à indução da endometriose (implante cirúrgico), através da técnica preconizada por Vernon e Wilson (1985) e divididas nos seguintes grupos: Grupo I - ratas induzidas a endometriose e avaliadas após 34 dias (controle I); Grupo II - ratas induzidas a endometriose e avaliadas após 47 dias (controle II); Grupo III - ratas induzidas a endometriose e após 21 dias do pós-operatório, os animais foram tratados com dexametasona por 13 dias e eutanasiados no dia seguinte ao término do tratamento; Grupo IV - ratas induzidas a endometriose e após 21 dias do pós-operatório, os animais foram tratados com dexametasona por 13 dias e eutanasiados após um período de 13 dias contados a partir do término do tratamento com dexametasona. Nossos resultados mostraram que a dexametasona administrada aos grupos III e IV foi capaz de promover redução do processo inflamatório em ratas com endometriose induzida e também do teor de colágeno estromal; além do que, propiciou considerável diminuição nas áreas ocupadas pelas glândulas.

PALAVRAS-CHAVE: Histoquímica; morfometria; endometriose; ratas *Wistar*; dexametasona.

ABSTRACT

During the menstruation it can have passage, through the uterine tuba, of endometrial viable material, which would have implantation capacity and, consequently, originate a clinical denominated situation endometriosis. Studies have been demonstrating that the glucocorticoids, among which the dexamethasone, inhibit the growth in a general way and its effects can be observed in the reproductive functions, for blocking several answers induced by the estrogens in the uterus of female rats. Therefore, the present research had the purpose to analyze morphologically and morphometrically the sites of endometrial implants on the external area of the musculature of the anterior abdominal wall of female rats, treated with dexamethasone (0.8 mg/Kg/day). For so, this 40 albino female rats were used (*Rattus norvegicus albinus*), of the lineage *Wistar* with 90 days of age, weighing 150g approximately, which they were submitted to the induction of the endometriosis, through the technique described for Vernon and Wilson (1985) and divided in the following groups: Group I - induced female rats to endometriosis and evaluated after 34 days (control I); Group II - induced female rats to endometriosis and evaluated after 47 days (control II); Group III - induced female rats to endometriosis and after 21 days, treated with dexamethasone by 13 days with scarification one day after treatment ; Group IV - induced female rats to endometriosis, and after 21 days, treated with dexamethasone by 13 days and the animal went sacrificed 13 days after. Our results showed that the dexamethasone administrated for the groups III and IV was able to promote the reduction of the endometrial implants in female rats and too of the stromal collagen density; besides propitiated considerable decrease in the areas occupied by the glands.

KEY-WORDS: Histochemistry analysis; morphometric analysis; endometriosis; *Wistar* rats; dexamethasone.

LISTA DE FIGURAS

Figura

Página

1. Fotomicrografia mostrando implante endometrial em ratas do grupo I.
Notar implante (I) totalmente aderido à camada muscular (M). H.E.: 107X. **11**
2. Fotomicrografia mostrando implante endometrial em ratas do grupo I.
Verificar grande quantidade de glândulas com leucócitos no lume (setas). H.E. :428X. **11**
3. Fotomicrografia mostrando implante endometrial em ratas do grupo I.
Notar a presença de numerosas glândulas (setas). H.E.: 428X. **12**
4. Fotomicrografia mostrando implante endometrial em ratas do grupo I.
Glândula hiperplásica formando cisto (*). H.E. : 107X. **13**
5. Fotomicrografia mostrando implante endometrial em ratas do grupo I.
Notar a presença de numerosas fibras colágenas (FC), Tricrômico de Malory: 428X. **14**
6. Fotomicrografia mostrando implante endometrial (I) em ratas do grupo IV,
totalmente aderido a camada muscular (M). HE: 107X. **15**
7. Fotomicrografia mostrando implante endometrial (I) em ratas do grupo IV,
notar a presença de numerosas glândulas agrupadas em formato de cacho (setas). H.E.: 428X. **15**
8. Fotomicrografia mostrando implante endometrial em ratas do grupo III.
Notar numerosos macrófagos (círculo) com citoplasma corado em marrom, fibroblastos (seta pequena) e leucócitos (seta grossa). H.E.: 428X. **16**
9. Fotomicrografia mostrando implante endometrial em ratas do grupo III.
Macrófago ampliado (dentro do círculo). H.E.: 1000x. **16**
10. Fotomicrografia mostrando implante endometrial em ratas do grupo IV.
Verificar a presença de fibras colágenas (F). Tricrômico de Malory: 107X. **17**

TABELA

Tabela

Página

Tabela 1 – Média das áreas (%) ocupada pelas glândulas nos implantes endometriais.

17

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	6
2.1 Geral	6
2.2 Específicos	6
3. MATERIAL E MÉTODOS	7
3.1. Manutenção dos animais e formação dos grupos experimentais	7
3.2. Procedimento cirúrgico para indução da endometriose	8
3.3. Tratamento com dexametasona	8
3.4. Análise morfológica e histoquímica	9
3.5 Análise morfométrica	10
3.6. Análise estatística	10
3.7. Comitê de ética	10
4. RESULTADOS	11
4.1 Análise histoquímica e morfológica	11
4.2 Análise morfométrica das glândulas nos implantes endometriais	17
5. DISCUSSÃO	18
6. PESPECTIVAS	20
7. CONCLUSÕES	21
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22

1. INTRODUÇÃO

A endometriose é uma das mais intrigantes enfermidades que o ginecologista encontra na sua prática diária, sendo caracterizada pela presença de tecido endometrial ativo (glândulas e/ou estroma) dentro ou fora da cavidade uterina (NAP et al., 2004).

Segundo Hurst e Rock (1989) a endometriose pode ser classificada em intra e extra-uterina, sendo a primeira denominada de adenomiose e a extra-uterina de endometriose.

Robins (2005) descreveu a endometriose como o surgimento de tecido endometrial dentro do miométrio devido a processos de metaplasia do estroma conectivo mesenquimatoso ou devido à presença de resquícios dos ductos de Wolff ou de Müller podendo resultar em pólipos endometriais

Os locais mais afetados na pelve são os ovários, o peritônio, os ligamentos útero-sacrais, e o fundo de saco de Douglas (JENKINS et al, 1986 STANLEY; ROBINS 2000), podendo também ser encontrada em localizações extrapélvicas (MUSE, 1988). Segundo Nisole e Donnez (1997) para cada localização, esta afecção constitui uma entidade distinta, com características e comportamentos diversos.

Os sintomas mais comuns incluem a dismenorréia, dor pélvica crônica, irregularidade menstrual e dispareunia. Adicionalmente, alterações urinárias e intestinais cíclicas são freqüentes e referidas como dor à evacuação, diarreia, disúria, poliúria, urgência miccional e hematúria (MISSMER et al, 2004), não existindo correlação entre o tamanho das lesões e a sintomatologia (ULCOVÁ-GALLOVÁ et al, 2002). A implicação clínica mais

freqüente é a perda da fertilidade, que estaria diminuída em virtude de uma redução na fecundidade e possivelmente em consequência de alterações do desenvolvimento folicular e de alterações imunológicas (NAVARRO et al., 2003).

Koninckx (1994) considerou a hipótese de que a endometriose não seria uma doença, mas um fenômeno habitual que ocorre na pélvis da mulher, onde implantações ou metaplasias são estimuladas, inibidas ou eliminadas periodicamente. Estima-se que esteja presente em aproximadamente 10 a 15% das mulheres em idade fértil (BARTKOWIAK et al., 2000), e em cerca de 30% das mulheres com dor pélvica crônica e infertilidade (FOSTER et al., 1997), com aumento destes valores para até 50% quando estes grupos são avaliados em propedêutica específica destes agravos (CARVALHO; ABRÃO 2000).

Os mecanismos que levam ao implante do tecido endometrial ectópico permanecem obscuros. Várias hipóteses foram formuladas para explicar a fisiopatologia das lesões, e a mais aceita é a teoria do fluxo retrógrado, quando durante a menstruação, através das tubas uterinas, o endométrio atingiria o seu sítio ectópico. Outras hipóteses como a da disseminação linfática/hematogênica e a da metaplasia celômica também são aceitas e fazem parte das várias concepções que tentam explicar a etiopatogenia da endometriose (D'HOOGHE; HILL 1996). Dmowski et al. (1981) sugeriram ainda que a imunidade celular deficiente ou a falta de habilidade do organismo em reconhecer o tecido endometrial ectópico poderiam explicar o desenvolvimento da doença.

Uma das principais razões que limita os avanços no estudo da endometriose em humanos é a dificuldade de se diagnosticar as lesões, pois, é

difícil monitorizar sua prevalência e progressão sem a utilização procedimentos invasivos. Sendo assim, os modelos animais são extremamente importantes na elucidação dos aspectos da fisiopatologia dessa doença (STORY; KENNEDY 2004). Segundo Rossi et al. (2000) o modelo de endometriose em ratas é considerado simples e válido pela maioria dos investigadores.

Os roedores são animais de fácil manipulação, possuem ciclos estrais e prenhez de curta duração, sendo por isso utilizados em experimentos reprodutivos (SIMÕES, 1979). Esses animais são do tipo poliestro, ou seja, apresentam ciclo estrais regulares e sucessivos, que se manifestam por mudanças morfológicas, nos ovários, no útero, na vagina e nas glândulas mamárias. Essas características são facilmente observadas e duram de quatro a seis dias em ratas, na dependência dos hormônios sexuais (LONG; EVANS, 1922; ASTWOOD, 1939; GRIFFITH; FARRIS, 1942; MANDL, 1951; BERTALANFFY; LAU, 1963; MOZANSKA, 1972; SIMÕES, 1979, 1984).

É sabido que durante o ciclo estral de ratas, bem como em outros animais, são observadas fases de atuação do estrógeno (proestro e estro) e da progesterona (metaestro e diestro). Deste modo, vários modelos experimentais de endometriose em ratas (endometriose induzida), que reproduzem histologicamente e endocrinamente essa patologia têm sido elaborados, proporcionando um melhor entendimento sobre os aspectos fisiológico e bioquímico (MORI; KYOKUWA; NAGASAWA 1998; WITZ; MONOTOYA-RODRIGUEZ; SCHENKEN R 1999; BOUCHER; LEMAY; AKOUM 2000; PIVA; HOROWITZ; SHARPE-TIMMS 2001).

A literatura relata que os implantes endometriais possuem receptores para hormônios esteróides, sendo estimulados principalmente pelo estrógeno,

porém o mecanismo preciso para esse estímulo é ainda desconhecido (OLIVEIRA; BARUFFI; FRANCO Jr. 1991; BULUN et al., 2002). De acordo com Conceição et al. (2005) as fases de proestro, estro e diestro são mais favoráveis para o desenvolvimento dos implantes endometriais em ratas, quando comparadas ao metaestro.

As estratégias de tratamento da endometriose têm sido baseadas nas necessidades das pacientes. Embora a endometriose seja parte da prática clínica durante quase um século, fatores considerados em um tratamento incluem a idade reprodutiva da paciente, a fase da doença, e, na maioria, os sintomas. Opções terapêuticas incluem desde nenhum tratamento, como também terapia médica, cirurgia, ou terapia de combinação. Medicamentos como acetato de leuprolide, acetato de goserelina, e acetato de nafarelina são todos agentes efetivos. Terapia cirúrgica é também apropriada, especialmente para fases avançadas da doença (OLIVE; PRITTS 2002; VALLE; SCIARRA 2003).

Outras estratégias têm sido propostas em modelos experimentais, pois há muitos mecanismos reguladores que mediam ou regulam a ação do estrógeno nos tecidos, um desses fatores são os glicocorticóides sintéticos com, por exemplo, a dexametasona (GUNIN, et al. 2001; SUZUKI; HANDA 2004; BATISTA et al., 2006; RHEN; CIDLOWSKI 2006) Os glicocorticóides sintéticos, desenvolvidos pela indústria farmacêutica, são muito semelhantes aos naturalmente sintetizados no córtex da glândula adrenal, se considerada a sua estrutura química. Porém, a diferença básica deve-se ao fato de que todos os glicocorticóides sintéticos apresentam duas ligações duplas no anel "A" do ciclopentanoperhidrofenantreno, núcleo básico dos hormônios glicocorticóides

(GILMAN; HARDMAN; LIMBRID 2003).

Estudos têm demonstrado que a dexametasona inibe o desenvolvimento do processo inflamatório de uma forma geral e seus efeitos podem também ser observados nas funções reprodutivas, ao bloquear várias respostas induzidas por hormônios estrogênicos no útero de ratas (SZEGO; ROBERTS, 1953; SZEGO; DAVIS, 1969; CAMPBELL, 1978; BIGSBY; CUNHA 2004).

Análises histológicas de implantes endometriais na parede pélvica de animais experimentais revelaram a presença de glândulas bem desenvolvidas, onde algumas dessas caracterizaram-se por apresentarem a forma cística. Batista et al. (2006) administrando dexametasona na dosagem de 0,8 mg/kg/dia em ratas observaram que o processo inflamatório crônico da endometriose não diminuiu após 10 dias de tratamento, enquanto que o tratamento por 15 dias consecutivos reverteu o processo inflamatório, porém com persistência de glândulas endometriais. Esses autores relataram ainda a alta mortalidade neste último tratamento, além de realizarem as análises logo após o tratamento, sugerindo que há uma tendência de regressão dos implantes com o prolongamento do tratamento. Assim, no intuito de avaliar histoquimicamente e morfometricamente a progressão da endometriose em um período pós-tratamento com dexametasona, o presente estudo teve os seguintes objetivos:

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Analisar histomorfometricamente os sítios de implantes endometriais na região externa da musculatura da parede abdominal anterior de ratas *Wistar* tratadas com dexametasona na dosagem de 0,8mg/Kg/dia.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar histoquimicamente os aspectos histológicos da interação entre o endométrio e a musculatura estriada esquelética da cavidade abdominal sob a ação da dexametasona.
 - Quantificar morfometricamente o número de glândulas presentes no processo de reversão da endometriose, após tratamento com dexametasona.
- a) Avaliar se ocorre redução do processo inflamatório em ratas com endometriose induzida. Tratadas com dexametasona na dosagem 0,8 mg/Kg/dia.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Manutenção dos animais e formação dos grupos experimentais

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Histologia, do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE. Foram utilizadas 40 ratas albinas (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem *Wistar* com 90 dias de idade, pesando aproximadamente 150g, procedentes do Biotério do Departamento de Biofísica da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE. Estas foram mantidas com alimentação e água *ad libitum*, em local com temperatura de 22°C e iluminação artificial com lâmpadas fluorescentes (marca Philips) modelo luz do dia, 40W, para um fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro, considerando-se o período de luz das 6:00 às 18:00 horas.

Após adaptação ao novo ambiente, foram realizados esfregaços vaginais das ratas para a determinação do ciclo estral. As fêmeas que apresentaram três ciclos estrais regulares foram divididas, ao acaso, em quatro grupos, cada um constituído por dez animais.

Grupo I - ratas com endometriose (induzida), sem tratamento e avaliadas após 34 dias (controle I);

Grupo II - ratas com endometriose (induzida), sem tratamento e avaliadas após 47 dias (controle II);

Grupo III - ratas com endometriose (induzida). Tratadas após 21 dias do pós-operatório (P.O.) com dexametasona por 13 dias e eutanasiados no dia seguinte ao término do tratamento;

Grupo IV - ratas com endometriose (induzida). Tratadas após 21 dias do P.O., com dexametasona por 13 dias e eutanasiadas depois de 13 dias após o tratamento.

3.2. Procedimento cirúrgico para indução da endometriose

Para a indução da endometriose, foi utilizada a técnica preconizada por Vernon e Wilson (1985). Os animais foram anestesiados com sulfato de atropina (1mL) diluída em 1mL de água destilada, sendo administrado 0,2mL da solução via intraperitoneal. Em seguida foi administrado 0,1mL de xilazina (20mg/mL) e 0,1mL de quetamina (50mg/mL), também por via intraperitoneal. Posteriormente, foi realizada a tricotomia da região abdominal. Após estes procedimentos procedeu-se a abertura da cavidade abdominal por incisão longitudinal na linha alba de mais ou menos 2cm, para a identificação dos cornos uterinos. Uma vez individualizados, foi ressecado aproximadamente 1cm do terço médio do corno uterino direito e realizada a ligadura dos vasos. O segmento uterino retirado foi imediatamente imerso em soro fisiológico, aberto longitudinalmente, e em seguida fragmentado em dois retângulos medindo aproximadamente de 4 a 5mm de arestas. Estes fragmentos foram fixados, com fio de sutura de nylon 6.0, na região externa da musculatura da parede anterior da cavidade abdominal, um de cada lado da linha alba, sempre sobre vasos sangüíneos, tomando-se o cuidado para que a porção do endométrio mantivesse o contato com a musculatura. Após estes procedimentos foi realizada a sutura da cavidade abdominal, e em seguida, da pele.

3.3. Tratamento com dexametasona

Após 21 dias de pós-operatório (PO), período necessário para o desenvolvimento dos implantes endometriais e plena recuperação dos animais do processo cirúrgico, foi iniciado o tratamento com a dexametasona. O fosfato disódico de dexametasona (Decadrom), foi utilizado na concentração de 4 mg/mL, sendo administrado por meio de injeções intraperitoniais na dosagem de 0,8 mg/Kg/dia, durante treze dias, de acordo com metodologia descrita por Cruz, Smaniotto e Simões (1996).

3.4. Análise histológica e histoquímica

Ao final dos experimentos os animais foram eutanasiados. Para tanto, foram anestesiados com sulfato de atropina (1mL) diluída em 1mL de água destilada, sendo administrado 0,2mL da solução via intraperitoneal. Em seguida foi administrado 0,1mL de xilazina (20mg/mL) e 0,1mL de quetamina (50mg/mL). Posteriormente foi realizada uma incisão na pele, de aproximadamente 4cm, para perfeita visualização e retirada dos implantes, que foram clivados longitudinalmente e mergulhados em líquido de Bouin, permanecendo neste fixador por 48 horas. No procedimento de eutanásia dos animais, foi utilizado o aprofundamento da anestesia.

Os fragmentos foram desidratados em álcool etílico (concentrações crescentes), diafanizados pelo xilol, impregnados e incluídos em paraplast. Posteriormente, os blocos foram cortados em micrótomo do tipo Minot (Leica RM 2035) ajustados para 5 μ m. Os cortes assim obtidos foram colocados em lâminas previamente untadas com albumina de Mayer e mantidos em estufa regulada a 37° C, durante 24 horas, para secagem. Os cortes foram submetidos às técnicas de coloração pela hematoxilina-eosina (H.E.) e

tricroômico de Mallory, sendo posteriormente analisados em microscópio de luz, marca CARL ZEISS, e fotografados em fotomicroscópio OLYMPUS BX-50.

3.5. Análise morfométrica

Para a realização desse procedimento foi utilizada uma ocular de 10X contendo internamente um retículo de WEIBEL com 25 pontos (WEIBEL; KISTLER; SCHERLE 1996) através da qual foram contados quatro campos, todos aleatórios e em sentido horário, levando-se em consideração apenas os pontos que incidiram sobre a área das glândulas. A observação foi realizada através da microscopia de luz da marca OLYMPUS BX-50. Este procedimento foi realizado utilizando-se a objetiva de 40X, obtendo-se um aumento final de 400X. Foram contados 100 pontos por animal totalizando 300 pontos por grupo

3.6. Análise estatística

A análise do número de glândulas foi realizada através de teste não paramétrico de Tukey-Kramer ($p \leq 0,05$).

3.7. Comitê de ética

O referido estudo foi aprovado pelo Conselho Técnico Administrativo (CTA/UFRPE, nº. 012872/2006) segundo recomendação ética do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e do National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals.

4. RESULTADOS

4.1 Análise histológica e histoquímica

- *Grupos I e II*

A análise morfológica revelou que os implantes apresentaram-se bem aderidos a camada muscular da parede abdominal (**Figura 1**). Nesses implantes foi possível observar que as glândulas apresentaram-se bastante numerosas, e em sua maioria, revestidas por epitélio simples cúbico e formato esférico, às vezes contendo leucócitos no seu lume (**Figuras 2 e 3**).

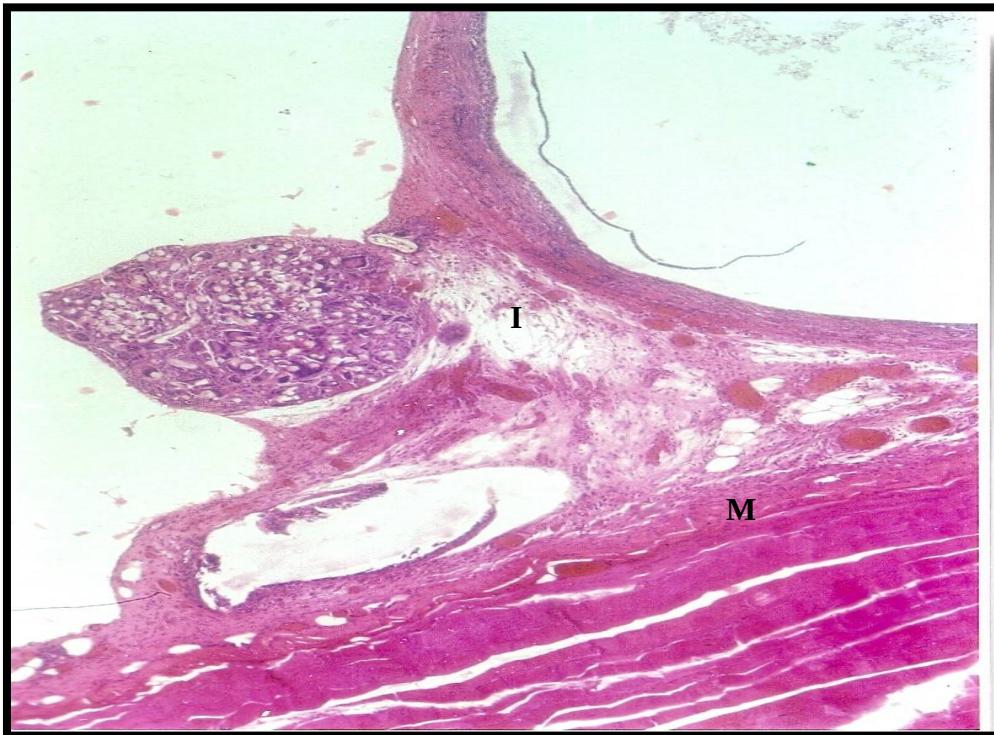


Figura 1 - Fotomicrografia mostrando implante endometrial em ratas do grupo I. Notar implante (I) totalmente aderido à camada muscular (M). H.E. 107X.

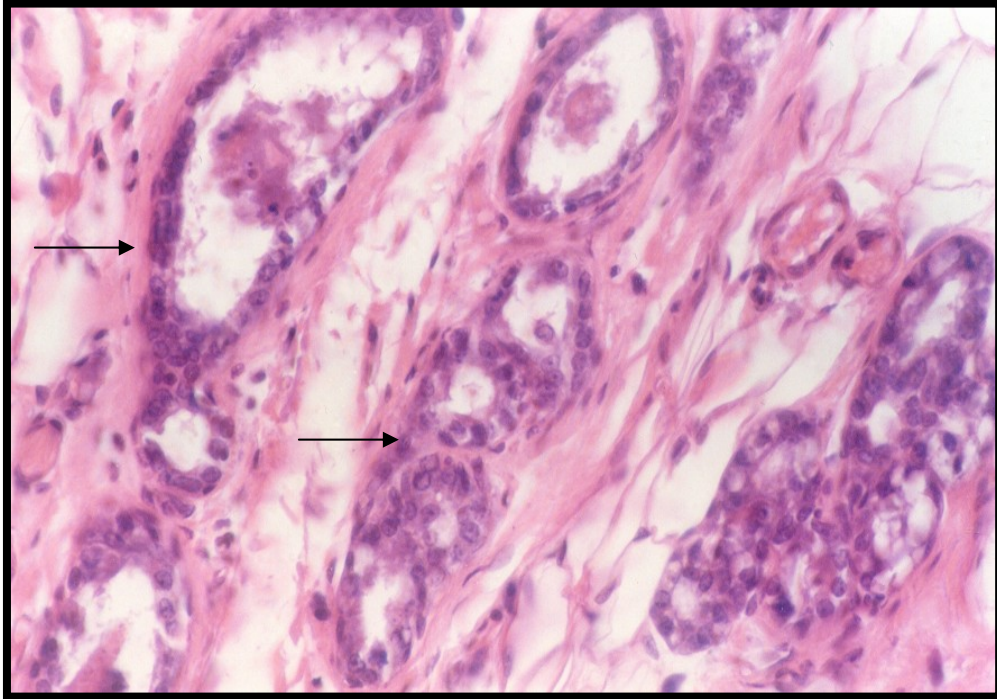


Figura 2 - Fotomicrografia mostrando implante endometrial em ratas do grupo I. Verificar grande quantidade de glândulas com leucócitos no lume (setas finas). H.E. 428X.

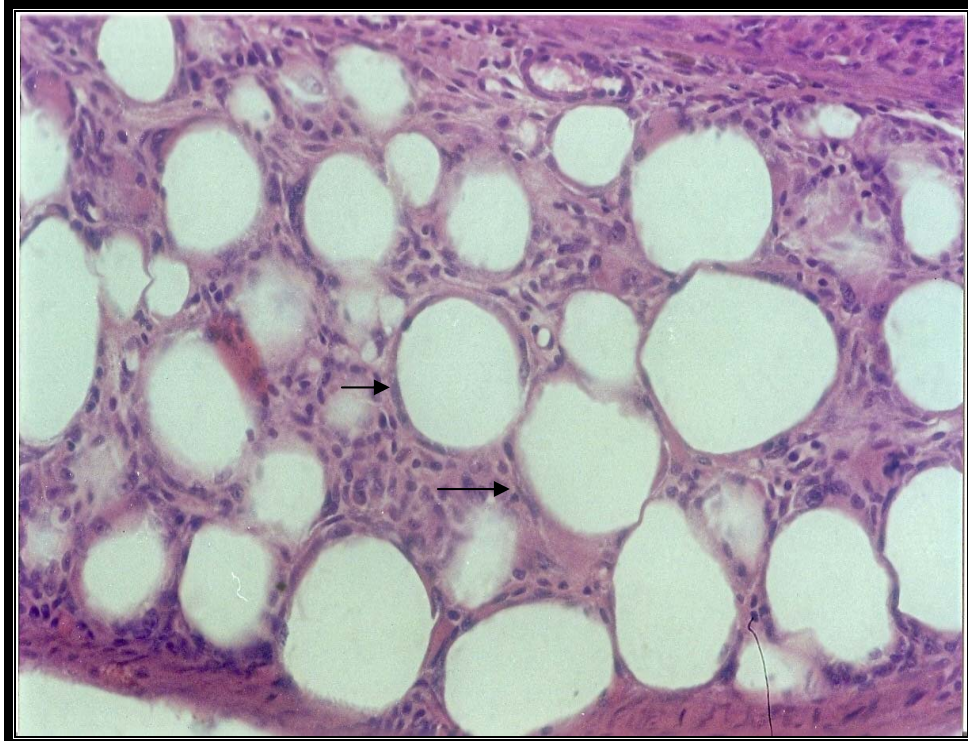


Figura 3: Fotomicrografia mostrando implante endometrial em ratas do grupo I. Notar a presença de numerosas glândulas (setas). H.E. 428X;

No entanto, algumas glândulas apresentaram acentuada hiperplasia, terminando por formar cistos (**Figura 4**).

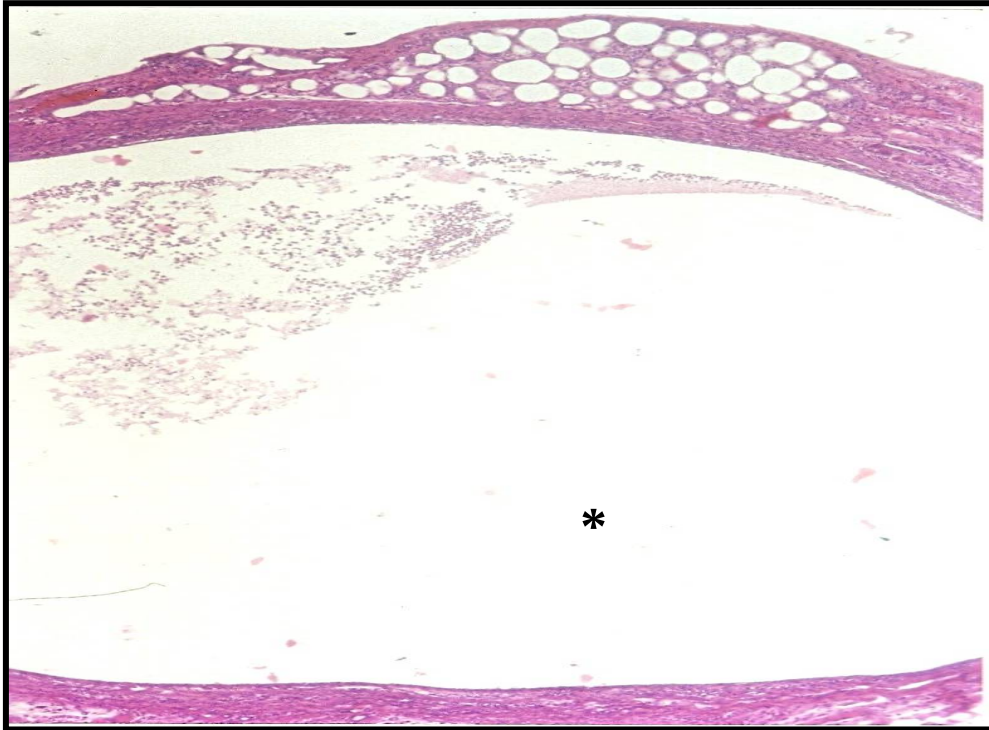


Figura 4 - Fotomicrografia mostrando implante endometrial em ratas do grupo I. Glândula hiperplásica formando cisto (*), H.E. 107X.

A análise histoquímica pelo tricrômico de Mallory foi positiva na região de adesão dos implantes com a parede abdominal, demonstrando assim presença de fibras colágenas, além de um estroma bastante celular (**Figura 5**).

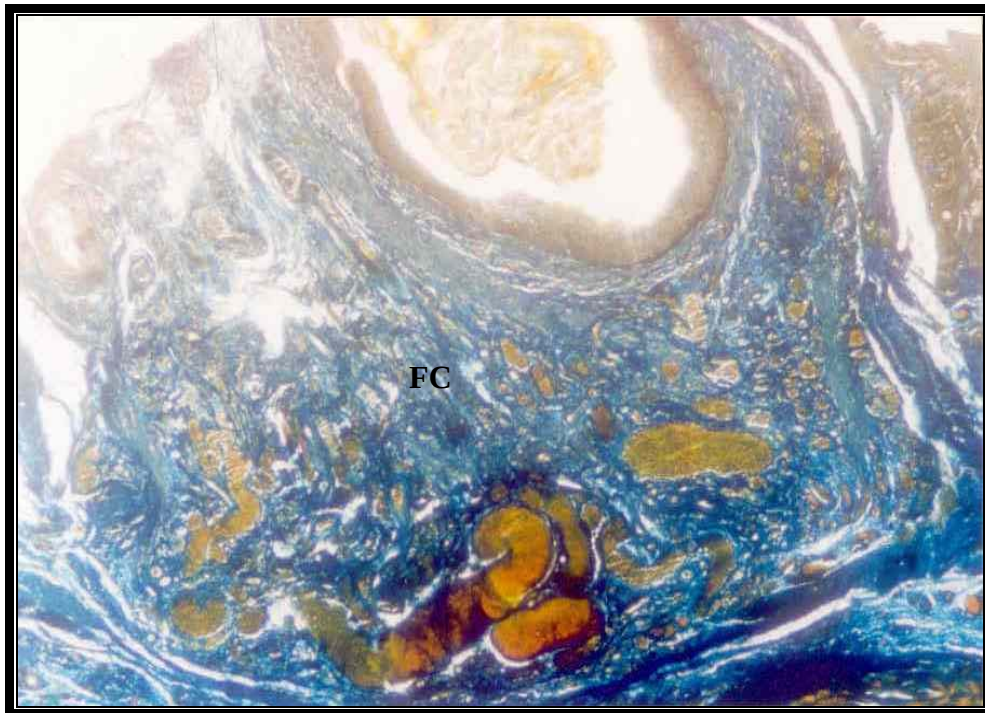


Figura 5 - Fotomicrografia mostrando implante endometrial em ratas do grupo I. Notar a presença de numerosas fibras colágenas (FC), Tricômico de Malory :428X,

- **Grupos III e IV**

Nesses grupos observou-se também que os implantes endometriais mostraram-se totalmente aderidos à musculatura abdominal (**Figura 6**). Notou-se ainda a presença de glândulas agrupadas em forma de cachos e separadas por tecido adiposo, numerosos vasos sanguíneos e um estroma bastante celular com presença de fibroblastos, macrófagos e leucócitos (**Figuras 7, 8 e 9**). A reação pelo tricrômico de Mallory também foi positiva, porém menos intensa que nos grupos controles (I e II), indicando assim, redução no teor de colágeno nos implantes (**Figura 10**).

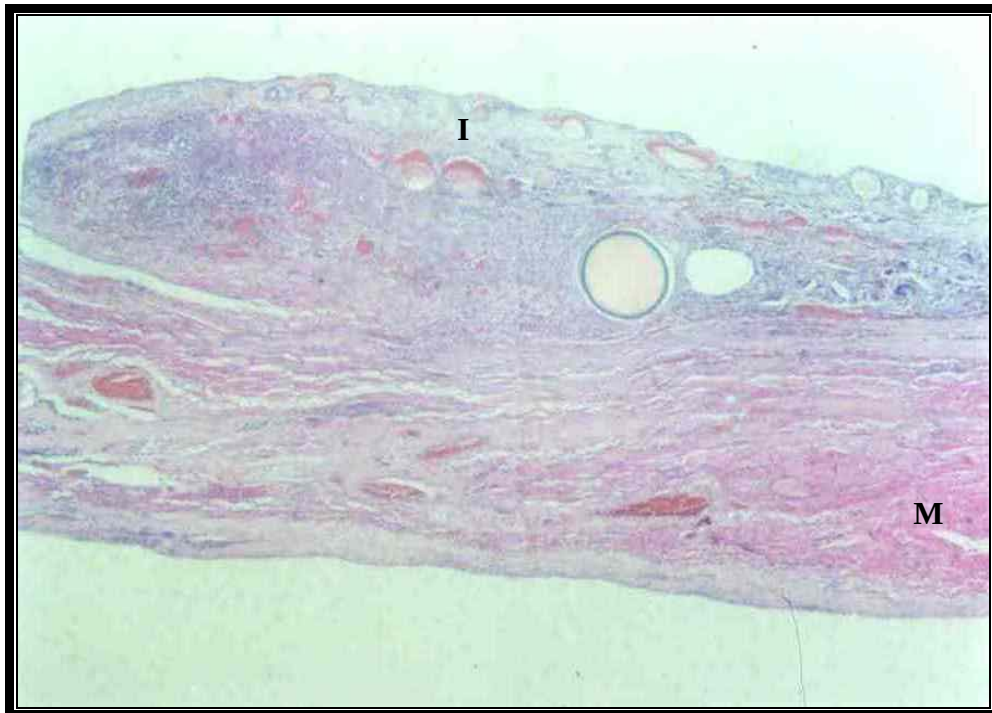


Figura 6 - Fotomicrografia mostrando implante endometrial (I) em ratas do grupo IV, totalmente aderido a camada muscular(M). Notar a ausência de cistos. HE $\pm$ 107X.

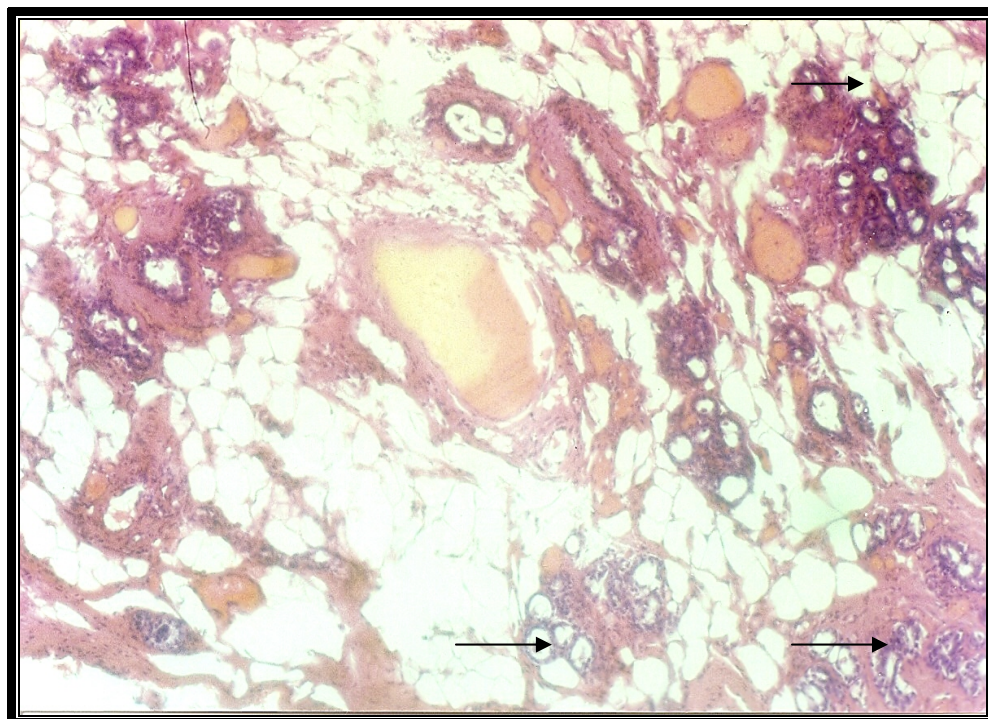


Figura 7 - Fotomicrografia mostrando implante endometrial (I) em ratas do grupo IV. Notar a presença de numerosas glândulas agrupadas em formato de cacho (setas).HE $\pm$ 428X.

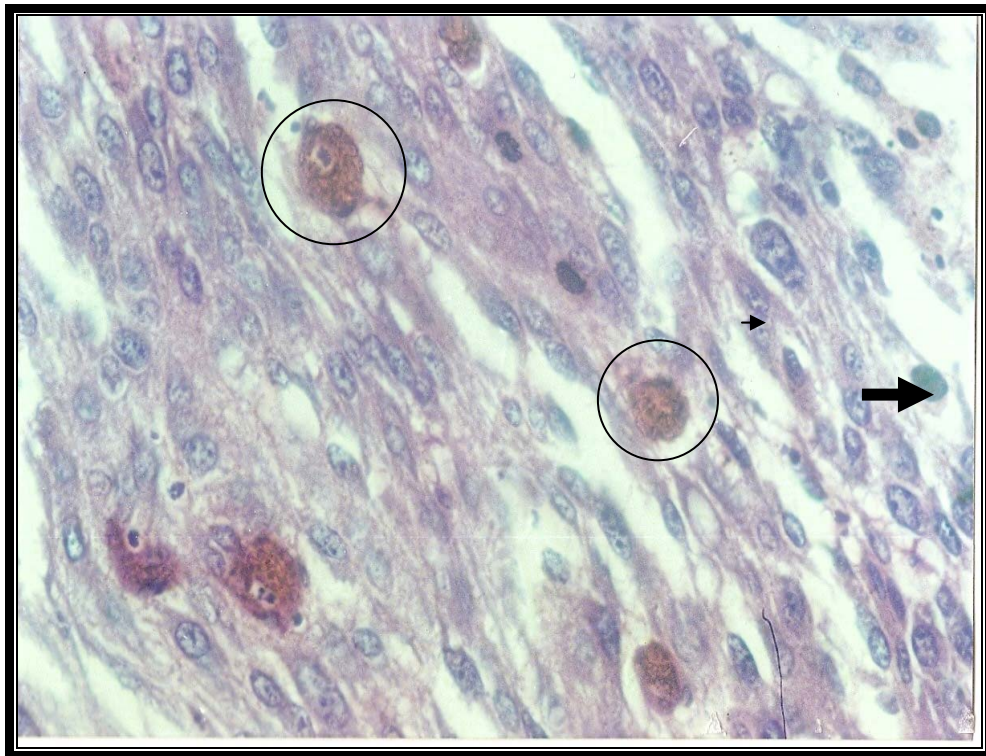


Figura 8 - Fotomicrografia mostrando implante endometrial em ratas do grupo III. Notar numerosos macrófagos (círculo) com citoplasma corado em marrom, fibroblastos (seta pequena) e leucócitos (seta grossa) H.E. $\pm$ 428X.



Figura 9 - Fotomicrografia mostrando implante endometrial em ratas do grupo III. Macrófago ampliado (dentro do círculo), H.E.: 1000X.

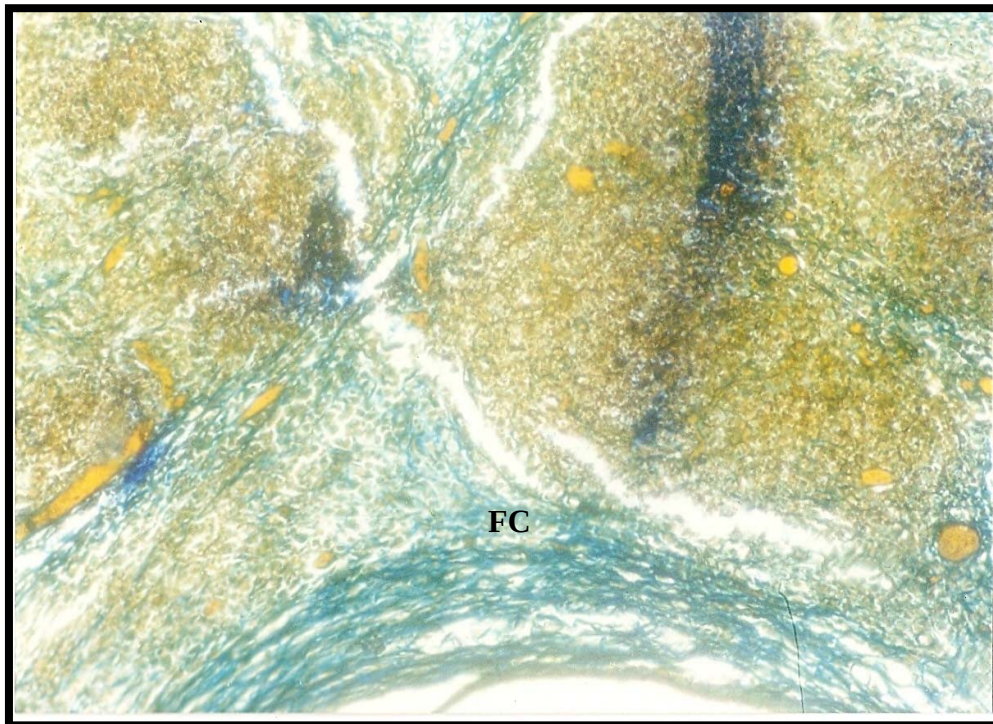


Figura 10- Fotomicrografia mostrando implante endometrial em ratas do grupo IV. Verificar a presença de fibras colágenas (FC). Tricrômico de Malory: 107X.

4.2 Análise morfométrica das glândulas nos implantes endometriais

A análise estatística revelou que os implantes endometriais nos animais do grupo III e IV, apresentaram redução significativa da área ocupada pelas glândulas quando comparados aos grupos I e II; no entanto, esses grupos não diferiram entre si (**Tabela 1**).

Tabela 1: Médias das áreas (%) ocupada pelas glândulas nos implantes endometriais

Grupos	Média ± Desvio Padrão
I	123,25 ± 6,44 ^a
II	113,00 ± 6,27 ^a
III	81,66 ± 3,05 ^b
IV	94,00 ± 6,24 ^b

¹ Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

5. DISCUSSÃO

O endométrio normal e os implantes endometriais apresentam três classes de receptores hormonais esteróides: estrogênicos, progesterônicos e androgênicos. Assim sendo, pode ocorrer uma série de possíveis respostas ao endométrio, destacando-se: 1) estados hipoestrogênicos que resultam em atrofia; 2) estados hiperandrogênicos que também produzem atrofia; 3) doses farmacológicas de progesterona levam a atrofia endometrial em meio hipoestrogênico (SALTIEL; GARABEDIAN-RUFFALO, 1991).

A análise morfológica revelou que os implantes endometriais dos grupos I e II apresentaram-se totalmente aderidos à camada muscular, com grande quantidade de tecido de granulação, caracterizado pela infiltração leucocitária e presença de glândulas adquirindo formato de cistos. Sabe-se que a presença de tecido de granulação é indicativo do estabelecimento de um processo inflamatório crônico e segundo alguns autores uma inflamação crônica caracteriza-se por dano tecidual persistente, onde os leucócitos polimorfonucleados são escassos ou podem estar ausentes, predominando os mononucleados como macrófagos e linfócitos (LANGUES 1987; BEJAMIN; COICO; SUNSHINE 2002). A presença de glândulas formando cisto pode estar relacionada à ação estrogênica, pois Schor et al. (1999) relataram a presença de estroma, glândulas e cistos em implantes endometriais de ratas ooforectomizadas e tratadas com estrógeno.

Nos grupos tratados com dexametasona foi evidente a redução do processo inflamatório nos implante endometriais, sugerindo uma eficiência do tratamento em comparação com os grupos controles. Segundo Bigsby e Cunha (1988) a dexametasona bloqueia a atividade mitótica no epitélio uterino, por

uma ação antagônica com o receptor de estrogênio. Outros autores ainda relatam que o estrógeno é capaz de causar infiltração eosinofílica e edemas no estroma e no miométrio, onde a dexametasona pode agir bloqueando esses efeitos (MACIEL et al., 2001; TURK et al., 2003; RHEN; CIDLOWSKI 2006)

A análise histoquímica dos implantes revelou redução do teor de colágeno nos implantes dos grupos tratados. Este fato pode estar relacionado à diminuição da atividade estrogênica pela dexametasona, já que os fibroblastos, responsáveis diretos pela síntese de colágeno, aumentam sua síntese em situações de elevados níveis estrogênicos, sendo, portanto células estrógeno-dependentes (MEDEIROS et al, 2001; TEIXEIRA et al., 2002)

Com relação à presença de glândulas nos implantes endometriais dos grupos tratados; sugere-se que esta condição esteja relacionada à ação da progesterona. Segundo Wang; Riley e Behrman (1993) a aplicação de dexametasona até 12 dias aumentaria significativamente o nível de progesterona e após dezenove dias de tratamento ocorreria uma redução desse hormônio. Este relato não condiz com os nossos resultados; uma vez que, a análise estatística realizada revelou que os implantes endometriais nos animais dos grupos tratados com dexametasona (III e IV) apresentaram redução significativa da área ocupada pelas glândulas quando comparado aos controles (I e II). Isso provavelmente pode está relacionado com à ação da dexametasona no hipotálamo diminuindo a produção do hormônio gonadotrófico (GnRh) e conseqüentemente a do hormônio luteotrófico (LH), essencial para a ruptura dos folículos ovarianos e formação dos corpos lúteos, resultando em uma diminuição da progesterona (OGUEH et al., 1999; VAN MERRIS; WEMMEL; CORTVRINDT 2006).

6. PESPECTIVAS

Os resultados da presente pesquisa ressaltam a necessidade da realização de outros modelos experimentais, como por exemplo, o acompanhamento morfológico e hormonal da progressão de implantes endometriais por um período mais longo, para determinar se estas lesões se tornam estáveis quando regredem e qual é a resposta em longo prazo da interação entre os implantes e a parede abdominal.

6. CONCLUSÕES

- b) A dexametasona na dosagem 0,8 mg/Kg/dia foi capaz de promover redução do processo inflamatório em ratas com endometriose induzida.
- c) A redução do teor de colágeno estromal foi evidente através da marcação com o tricrômico de Malory nos animais tratados com dexametasona (0,8 mg/Kg/dia).
- d) O tratamento com dexametasona na dosagem de 0,8mg/Kg/dia, propiciou uma diminuição das áreas ocupada pelas glândulas nos implantes endometriais.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ASTWOOD, E. B. Changes in the weight and water content of the uterus of normal rat. **American Journal of Physiology**, v.126, p.162-170, 1939.

BARTKOWIAK R.; ZIENIEWICZ K.; KAMINSKI P.; KRAWCZYK, M.; MARIANOWISKI, L.; SZYMANSKA, K. Diagnosis and Treatment of sigmoidal endometriosis: a case report. **Med Sci Monit**, v.6, n. 4, p. 787-7900, 2000.

BATISTA, A. P. C.; CONCEIÇÃO, A. P. M.; MORAES, E. F.; TEIXEIRA, A. A. C. & WANDERLEY-TEIXEIRA, V. Histological evaluation of the induced endometriosis in rats, after treatment with dexamethasone. **Int. J. Morphol.**, 24(4):565-570, 2006.

BENJAMINI, E.; COICO, R.; SUNSHINE, G. **Imunologia** 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,. p.13-14, 2002.

BERTALANFFY, F. D.; LAU, C. Mitotic rates, renewal times, and cytodynamics of the female genital tract epithelia in the rat. **Acta Anatomic**, Basel, v.54, p.39-81, 1963.

BIGSBY, R. M.; CUNHA, G. R. Progesterone and dexamethasone inhibition of uterine epithelial proliferation in models of estrogen – independent growth.

American Journal of Obstetric and Gynecology, v. 158, p. 646-650, 1988.

BOUCHER, A.; LEMAY, A.; AKOUM, A. Effect of hormonal agents on monocyte chemotactic protein-1 expression by endometrial epithelial cells of women with endometriosis. **Fertility and Sterility**. v. 74, n. 5, p. 969-75, 2000.

BULUN, S. E.; YANG, S.; FANG, Z.; GURATES, B.; TAMURA, M.; SEBASTIAN, S. Estrogen Production and Metabolism in Endometriosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 955, n. 1, p.75–85, 2002.

CAMPBELL, P. S. The mechanism of the inhibition of uterotrophic responses by acute dexamethasone pretreatment. **Endocrinology**, v.103, p.716-723, 1978.

CARVALHO, F. M.; ABRÃO, M. S. Histopatologia da endometriose: a importância da interação entre ginecologista e patologista. In: ABRÃO, M. S. Endometriose: uma visão contemporânea. **Rio de Janeiro: ed. Revinter**; 2000. p. 35-44.

D'HOOGHE, T. M.; HILL, J. A. Endometriose. Em: Novak Tratado de Ginecologia. Berek, J. S. **Guanabara Koogan**, 12^a. edição, 1998.

DMOWSKI, W. P.; STEELE, R. W.; BAKER, G. F. Deficient cellular immunity in endometriosis. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v 141, p 377-183, 1981.

FOSTER, W. G.; RUKA, M. P.; GAREAU, P.; FOSTER, R. A.; JANZEN, E. G.; YANG, J. Z. Morphologic characteristics of endometriosis in the mouse model: application to toxicology. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** v. 75, p. 1188-1196. 1997.

GRIFFITH Jr., J. Q.; FARRIS, E. J. **The rat in laboratory investigation.** Philadelphia: Lippencott Company, 1942.

*HURST, B. S.; ROCK, J. A Endometriosis: pathophysiology, diagnosis and treatment. **Obstet. gynecol. Surv.**, v.44, n. 5, p. 297 – 304, 1989.*

JENKINS, S.; OLIVE, D. L.; HANEY, A. F. Endometriosis: pathogenic implications of the anatomic distribution. **Obstetrics Gynecology**, v. 67, p. 335-338, 1986.

LONG, J.; EVANS, H. M. The estrus cycle in the rat and its associated phenomena. **Memory University**, California, v.6, p.1-148, 1922.

MACIEL, S.M.; CHAMBERLAIN, C.S.; WETTEMANN,R.P.;SPICER ,L.J. Dexamethasone Influences Endocrine and Ovarian Function. **Dairy Cattle J. Dairy Sci.** 84:1998–2009, 2001.

MANDL, A. M. The phases of oestrus cycle and adult white rat. **Journal of Experience Biological**, v.28, p.576-584, 1951.

MEDEIROS, J. P.; TEIXEIRA, Valéria Wanderley ; TEIXEIRA, Álvaro Aguiar Coelho ; BARATELLA-EVÊNCIO, Liriane ; EVÊNCIO NETO, J. . Ultrastructural analysis of pinealectomy and lack of lighth influence over collagen in the endometrium of rats. *Revista Chilena de Anatomía*, Chile, v. 21, n. 03, p. 231-235, 2003.

MISSMER, S. A.; HANKINSON, S. E.; SPIEGELMAN, D.; BARBIERI, R. L.; MALSPEIS, S.; WILLETT, W. C.; HUNTER, D. J. Reproductive history and endometriosis among premenopausal women. **Obstetrics Gynecology**. v. 104, n. 5, p. 965-974, 2004.

MORI, T.; KYOKUWA, M.; NAGASAWA, H. Animal model of uterine adenomyosis: induction of the lesion in rats by ectopic pituitary isografting. **Lab. Anim. Sci.**, v. 48, n. 1, p. 64-68, 1998.

MOZANSKA, T. Histological and histochemical studies on the uterus and vagina in the course of the estrous cycle in female white rats. **Ann. Med. Sect. Pol. Acad. Sci.**, v.17, p.75-131, 1972.

MUSE, K. Clinical manifestations and classifications of endometriosis. *Clin. Obstet. Gynecol.* v. 31, p 813-822, 1988.

NAP, A. W.; GRIFFIOEN, A. W.; DUNSELMAN, G. A. J.; BOUMA-TER STEEGE, J. C. A.; THIJSEN, V. L. J. L.; EVERS, J. L. H ; GROOTHUIS, P. G. Antiangiogenesis therapy for endometriosis. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** v. 89, n. 3, p. 1089-1095, 2004.

NAVARRO, J.; GARRIDO, N.; REMOHÍ, J.; PELLICER, A. How does endometriosis affect infertility? **Obstetrics and Gynecology Clinics of North America**, v. 30, p. 181-192, 2003.

NOGUEIRA, A. P.; ABRÃO, M.S. Endometriose: as hipóteses etiopatogênicas atuais. Em: Endometriose. Uma visão contemporânea. M.S. Abrão. Revinter, 2000.

*NISOLE, M; DONNEZ, J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. **Fertility Sterility**, v 68, p 585-596, 1997.*

OGUEH,O.;JONES,J.;MITCHELL,H.;ALAGHBAND-ZADEH, J.; JOHNSON, M.R. Effect of antenatal dexamethasone therapy on maternal plasma human chorionic gonadotrophin, oestradiol and progesterone. **Human Reproduction** vol.14 no.2 pp.303–306, 1999.

*OLIVEIRA, J. B. A; BARUFFI, R. L. R.; FRANCO JR., J. G. Endometriose: incidência, classificação, etiopatogenia, aspectos imunológicos, endometriose e esterilidade (parte 1). **Feminina.**, v. 19, p. 628 – 634, 1991.*

OLIVE, D. L.; PRITTS, E. The Treatment of Endometriosis. A Review of the

Evidence. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 955, n. 1, p. 360–372, 2002.

PIVA, M.; HOROWITZ, G. M.; SHARPE-TIMMS, K. L. Interleukin-6 differentially stimulates haptoglobin production by peritoneal and endometriotic cells in vitro: a model for endometrial-peritoneal interaction in endometriosis. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 86, n. 6, p. 2553-2561, 2001.

KONINCKX, P. R. *Is mild endometriosis a disease?* **Hum. Reprod.**, v. 9, 2202 - 2205, 1994.

RHEN, T.; GRISSOM, S.; AFSHARI, C.; CIDLOWSKI, J. Á. Dexamethasone blocks the rapid biological effects of 17beta-estradiol in the rat uterus without antagonizing its global genomic actions. **FASEB J**; v.17. n.13. p.1849-1870, 2003.

ROBINS, S.; COTRAN. Bases Patológicas das Doenças. **Editora**: Elsevier - 7ª Ed. 2005

ROSSI, G.; SOMIGLIANA, E.; MOSCHETTA, M.; SANTORSOLA, R.; COZZOLINO, S.; FILARDO, P.; SALMASO, A.; ZINGRILLO, B. Dynamic aspects of endometriosis in a mouse model through analysis of implantation and progression. **Arch Gynecol Obstet.**, v 263, p. 102-107, 2000.

RHEN, T.;JOHN, A.; CIDLOWSKI Estrogens and Glucocorticoids Have Opposing Effects on the Amount and Latent Activity of Complement Proteins in the Rat Uterus **BIOLOGY OF REPRODUCTION** 74, 265–274 (2006).

SALTIEL, E.; GARABEDIAN-RUFFALO, S. M. Phamacologic management of endometriosis. **Clinical Pharmacy.**, v. 10, p. 518 – 530, 1991.

SCHOR, E.; BARACAT, E. C.; SIMÕES, M. J.; de-FREITAS, V.; FILHO, O. G.; RODRIGUES DE LIMA, G. – *Effects of conjugated estrogens and progestogen in surgically induced endometriosis in oophorectomized.* **Clinical and Experimental Obstetrics and Gynecology.** v. 26, n. 3-4, p. 158-161, 1999.

SHOTARO SUZUKI AND ROBERT J. HANDA Regulation of Estrogen Receptor-Expression in the Female Rat Hypothalamus: Differential Effects of Dexamethasone and Estradiol. *Endocrinology.* 145(8): 3658–3670, 2004.

SIMÕES, M. J. **Aspectos morfológicos do endométrio de ratas da colônia 2BAW, nas subfases inicial, intermediária e final do estro e diestro.** São Paulo, 1979. [Tese de Mestrado – Escola Paulista de Medicina].

SIMÕES, M. J. **Aspectos morfológicos e morfométricos do endométrio de ratas albinas nas subfases inicial, intermediária e final do proestro e metaestro.** São Paulo, 1984. [Tese de Mestrado – Escola Paulista de Medicina].

STORY, L.; KENNEDY, S. Animal Studies in Endometriosis: A Review. **ILAR Journal.**, v. 45, n. 2, p. 132-138, 2004.

SZEGO, C. M.; DAVIS, J. S. Inhibition of estrogen induced cyclic AMP elevation in rat uterus. II : By glucocorticoids. **Life of Science**, v.8, p.1109-1116, 1969.

TEIXEIRA, A. A. C.; SIMÕES, M. J.; EVÊNCIO NETO, J.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V. Morphologic aspects of the endometrium, in the estrus phase, of pinealectomized rats. **Revista Chilena de Anatomia.** v. 20, n.2, p. 145-149, 2002.

ULCOVÁ-GALLOVÁ, Z.; BOUSE, V.; SVÁBEK, L.; TUREK, J.; ROKYTA, Z. *Endometriosis in reproductive immunology.* **Am J Obstet. Gynecol**, v 47, p. 269-274, 2002.

VALLE, R. F.; SCIARRA, J. J. Endometriosis: Treatment Strategies. **Annals of the New York Academy of Sciences.** v. 997, n. 1, p. 229–239, 2003.

VAN MERRIS, V.; VAN WEMMEL, K.; CORTVRINDT, R. Effects of dexamethasone on mouse ovarian function and pre- implantation embryo development. **Reproductive toxicology.**, v. 23, p. 32-41, 2006.

WITZ, C A; MONOTOYA-RODRIGUEZ, I. A.; SCHENKEN R, S. *Whole explants of peritoneum and endometrium: a novel model of the early endometriosis lesion.* **Fertility and Sterility.** v. 71, n. 1, p. 56-60, 1999.

WEIBEL, E. R.; KISTLER, G.S.; SCHERLE, W.F.- *practical stereological method for morphometrics cytology. J. cell Biol.*, v. 30, p. 23-38, 1966.