

## ANÁLISE HISTOLÓGICA DA ENDOMETRIOSE EM RATAS DURANTE AS FASES DO CICLO ESTRAL

**A.P.M. Conceição, A.P.C. Batista, A.C.C. de Araújo, F.C.A. da Silva, V. Wanderley-Teixeira, A.A.C. Teixeira**

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Laboratório de Histologia, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/nº, CEP 52171-900, Recife, PE, Brasil. E-mail: anapawlla@ig.com.br

### RESUMO

A presente pesquisa teve como objetivo analisar morfologicamente os sítios de implantes endometriais sobre a região externa da musculatura da parede abdominal anterior de ratas, durante o ciclo estral. Para tanto foram utilizadas 16 ratas albinas (*Rattus norvegicus albinus*), da linhagem Wistar com 90 dias de idade, obtidas do biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE, as quais foram submetidas à indução da endometriose. A análise histológica dos implantes foi realizada por meio da microscopia de luz, utilizando-se técnicas de colorações pela Hematoxilina - Eosina (H-E) e pelo Tricrômico de Mallory. O material coletado foi fixado em líquido de Bouïn e processado para inclusão em "paraplast". Os resultados mostraram que as fases de proestro, estro e diestro foram mais favoráveis para o desenvolvimento dos implantes endometriais em ratas, quando comparadas ao metaestro.

**PALAVRAS-CHAVE:** Útero, endometriose, ciclo estral.

### ABSTRACT

**HISTOLOGICAL EVALUATION OF ENDOMETRIOSIS IN RATS, DURING THE PHASES OF THE ESTROUS CYCLE.** The present research was aimed to morphologically analyze the endometrial implant sites of on the external area of the musculature of the abdominal wall of female rats, during the estral cycle. Sixteen albino female rats were used (*Rattus norvegicus albinus*), of the lineage Wistar with 90 days of age, obtained from the lab. animal rearing facilities of the Department of Morphology and Animal Physiology of UFRPE, which were submitted to the induction of the endometriosis. The histologic analysis of the implants was accomplished by means of light microscopy, using Hematoxylin-Eosin (H-E) and Mallory's Trichrome staine. The collected material was fixated in Bouïn's liquid and processed for inclusion in paraplasts. The results showed that the proestrus, estrus and diestrus phases were more favorable for the development of the endometrial implants in female rats, when compared to the metaestrus phase.

**KEY WORDS:** Uterus, endometriosis, estrous cycle.

### INTRODUÇÃO

Na espécie humana o útero é um órgão oco, visceral, em forma de pêra, localizado na pelve entre a bexiga e o reto (DI DIO, 2002). Segundo JUNQUEIRA & CARNEIRO (2004), o útero apresenta 3 túnicas: interna, média e externa, denominadas respectivamente de endométrio, miométrio e serosa ou adventícia.

O endométrio passa por uma seqüência de alterações morfológicas e funcionais a cada ciclo menstrual; essas alterações ocorrem em decorrência dos hormônios estrógenos e progesterona (HAM, 1967; GAMBRELL, 1976; BARACAT, 1991).

Durante o ciclo menstrual o endométrio constitui-se de duas camadas: funcional e basal. A camada funcional é mais superficial, sendo desprendida na menstruação, enquanto que a camada basal é mais

delgada e profunda, permanecendo para que suas células proliferem e regenerem a camada a cada ciclo menstrual (GARTNER & HIATT, 1999).

Durante a menstruação pode haver eliminação, através das tubas uterinas, de material endometrial viável, o qual teria capacidade de implantação, e conseqüentemente, originar um quadro clínico denominado de endometriose (SAMPSON, 1927).

A endometriose é uma doença que acomete as mulheres em idade reprodutiva, caracterizando-se pela presença de tecido endometrial ectópico ou estroma fora da cavidade uterina, foi observada pela primeira vez em 1869 por Rokitansky, em material de necropsia. Mais tarde, SAMPSON (1927) definiu a endometriose como um achado de tecido com aspectos histológicos e funcionais ao endométrio tópico, em outros locais, tendendo a se desenvolver no fundo do

saco de Douglas, ovários, ligamento redondo, tubas uterinas, cérvix e vagina. (TOBIAS-MACHADO *et al.*, 2001).

Os principais sintomas são: dismenorréia, dor pélvica crônica, esterilidade, irregularidade menstrual e dispareunia de profundidade, adicionalmente alterações urinárias e intestinais cíclicas tais como dor à evacuação, diarreia, disúria perimetral, polaciúria, urgência miccional e hematúria (ABESHOUSE & ABESHOUSE, 1960; ARAP, NETO *et al.*, 1984).

Segundo TOBIAS-MACHADO *et al.* (2001), existem várias teorias para explicar as causas da endometriose, tais como: regurgitação transtubária do material menstrual; metaplasia celômica; disseminação linfática ou sanguínea; deficiência imunológica e herança genética.

O diagnóstico da endometriose é feito através da história clínica, ultra-som endovaginal, exame ginecológico, e alguns exames de laboratório. A certeza só é dada através do exame de biópsia, esta pode ser feita por cirurgia, laparotomia ou preferencialmente laparoscopia que é um exame o qual manipula a cavidade abdominal através de instrumentos de óptica e vídeo juntamente com instrumentos cirúrgicos delicados que são introduzidos através de pequenos orifícios no abdome. É um procedimento geralmente realizado com anestesia geral (NEZHAT *et al.*, 1990).

Os roedores são animais de fácil manipulação, possuem ciclos estrais e prenhez de curta duração, sendo por estes motivos mais utilizados em experimentos reprodutivos (SIMÕES, 1979).

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 (WITZ *et al.*, 1999; BOUCHER *et al.*, 2000; PIVA *et al.*, 2001). No entanto, pouco se conhece sobre os aspectos histológicos da endometriose em resposta às fases hormonais do ciclo estral. Portanto, diante do exposto e considerando a escassez de literatura que relate os aspectos histológicos da endometriose, o presente trabalho teve como objetivo analisar a morfologia dos sítios de implantes endometriais, sobre a região externa da musculatura da parede abdominal anterior de ratas, durante o ciclo estral.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas 16 ratas albinas (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar com 90 dias de idade, procedentes do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE. Para a

indução da endometriose, foi utilizada a técnica preconizada por VERNON & WILSON (1985). Para tanto os animais foram pré-anestesiados com sulfato de atropina administrado a dose de 0,05 mg/kg i.p. Em seguida foram anestesiados com xilazina (20 mg/kg) e quetamina (10 mg/kg), também por via i.p. Posteriormente, por tração manual, foi realizada a tricotomia da região abdominal e em seguida a abertura da cavidade abdominal. Foi ressecado aproximadamente 1 cm do corno uterino 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. 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 sanguíneos, tomando-se o cuidado para que a porção do endométrio ficasse em contato com a musculatura, procedendo-se em seguida, a sutura da cavidade abdominal e da pele. Após esses procedimentos os animais foram divididos, ao acaso, em 4 grupos, cada um constituído por quatro animais, a saber: Grupo I - ratas induzidas a endometriose e avaliadas após 21 dias na fase de proestro; Grupo II - ratas induzidas a endometriose, e avaliadas após 21 dias na fase de estro; Grupo III - ratas induzidas a endometriose, e avaliadas após 21 dias na fase de metaestro; Grupo IV - ratas induzidas a endometriose, e avaliadas após 21 dias na fase de diestro.

Após 21 dias de pós-operatório (PO), período necessário para o desenvolvimento dos implantes de endometriose e para plena recuperação dos animais, foi realizado exames colpocitológicos, com o objetivo de determinar as fases do ciclo estral. Os animais que apresentaram as fases de proestro, estro, diestro e metaestro, dentro do seu respectivo grupo, foram eutanasiados. O procedimento anestésico seguiu a mesma metodologia da cirurgia para a indução da endometriose. A seguir, foi realizada uma incisão na pele, de aproximadamente 4 cm, para perfeita visualização e retirada dos implantes, que foram clivados longitudinalmente e mergulhados em líquido de Bouin, permanecendo no mesmo por 48h. Para a eutanásia dos animais, foi utilizado o aprofundamento da anestesia. Os fragmentos foram desidratados em álcool etílico (concentrações crescentes), diafanizados pelo xilol, impregnados e incluídos pelo paraplax. A seguir os blocos foram cortados em micrótomo do tipo Minot (Leica RM 2035) ajustados para 5mm. Em seqüência, os cortes foram submetidos à técnica de coloração pela hematoxilina-eosina (H.E), e pelo tricômico de Mallory, sendo posteriormente analisados em microscópio de luz, marca Olympus BX-41, e fotografados em fotomicroscópio Olympus BX-50.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na fase de proestro a análise morfológica revelou implantes endometriais bem desenvolvidos, com presença de cistos. Esses implantes apresentaram-se aderidos à camada muscular da cavidade

abdominal (Fig. 1). Foi observada grande quantidade de tecido de granulação caracterizado pela infiltração leucocitária. O estroma apresentou-se pouco fibroso, bastante celular e sem glândulas (Fig. 2). Não foi evidenciada a presença de epitélio de revestimento.

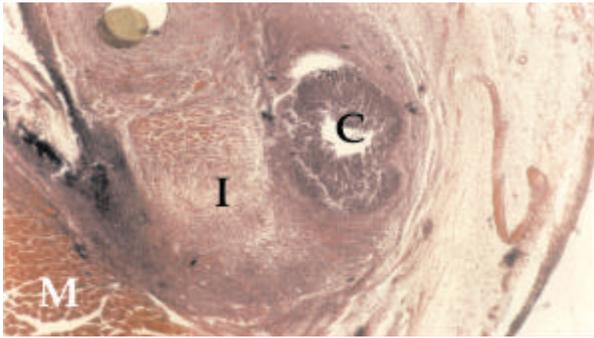


Fig. 1 - Endometriose em ratas do grupo I. Notar implante (I) totalmente aderido à camada muscular (M), além de cisto (C). Coloração H.E.  $\pm$  42X.

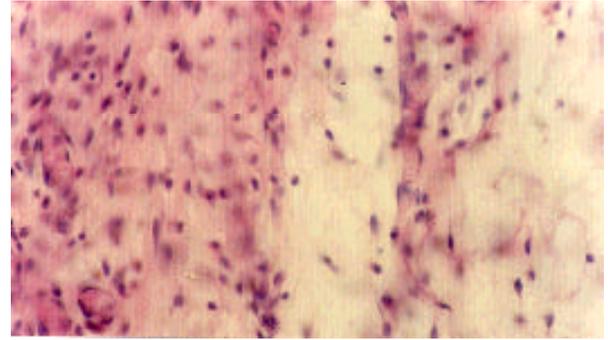


Fig. 2 - Notar estroma pouco fibroso e mais celular. Coloração H.E.  $\pm$  428X.

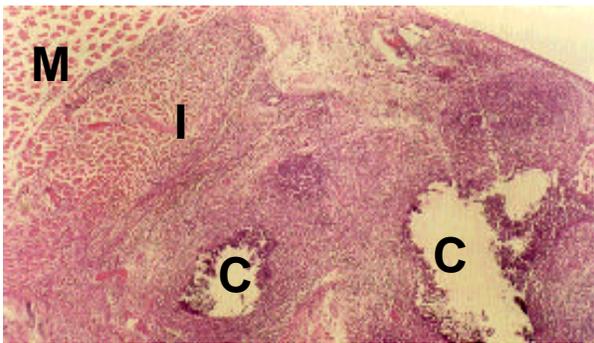


Fig. 3 - Endometriose em ratas do grupo II. Notar implante (I) totalmente aderido à camada muscular (M), além de cisto (C). Coloração H.E.  $\pm$  42X.

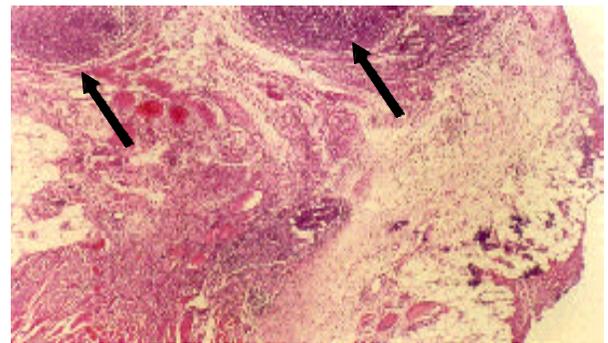


Fig. 4 - Notar tecido de granulação (setas). Coloração H.E.  $\pm$  107X.

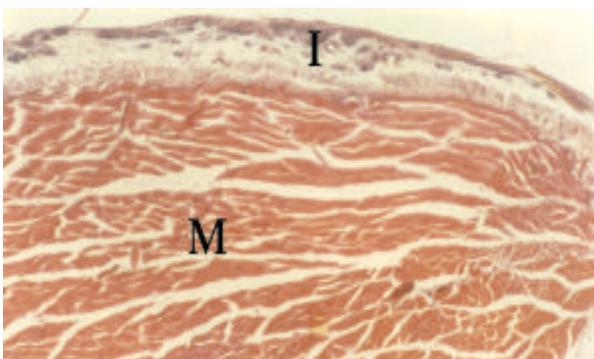


Fig. 5 - Endometriose em ratas do grupo III. Notar implante (I) pouco desenvolvido e totalmente aderido à camada muscular (M). Coloração H.E.  $\pm$  42X.

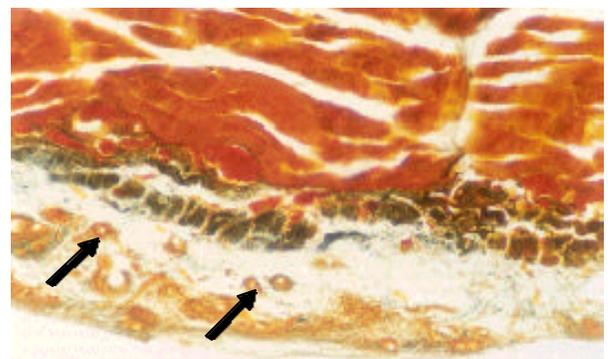


Fig. 6 - Notar estroma pouco fibroso, menos celular e com glândulas pouco desenvolvidas (setas). Coloração Tricrômico de Mallory  $\pm$  107X.

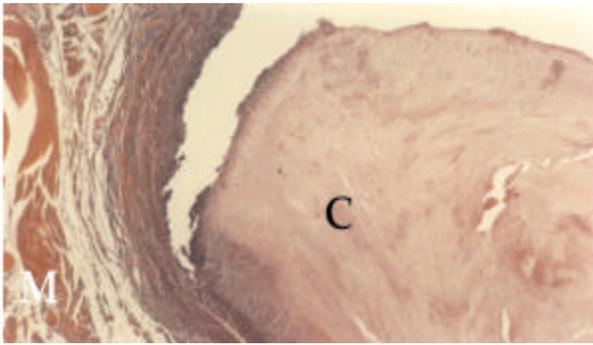


Fig. 7 - Endometriose em ratas do grupo IV. Notar no implante cisto bastante desenvolvido (C) e totalmente aderido à camada muscular (M). Coloração H.E.  $\pm$  42X.

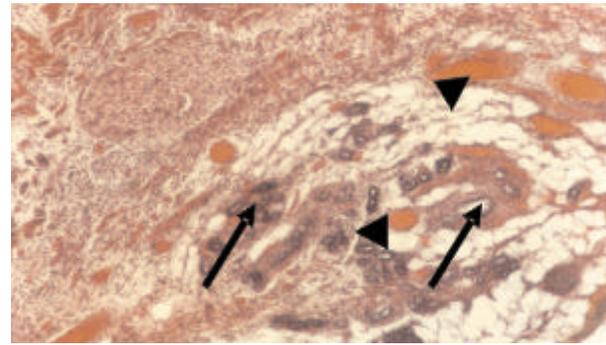


Fig. 8 - Notar estroma com vasos sanguíneos (cabeça de setas) e glândulas (setas). Coloração H.E.  $\pm$  107X.

Os implantes endometriais na fase de estro desenvolveram-se semelhantemente aos do grupo I, aderindo-se totalmente a musculatura abdominal, além de conter cistos (Fig. 3). Nesses implantes também foram observados tecidos de granulação (Fig. 4). O estroma mostrou-se bastante celular com poucas fibras, no entanto foi evidenciada uma rica vascularização, tecido adiposo e algumas glândulas. Também não foi evidenciada a presença de epitélio de revestimento.

Na fase metaestro, verificou-se que os implantes endometriais apresentaram-se pouco desenvolvidos e sem cistos, porém totalmente aderidos à musculatura abdominal (Fig. 5). Não foi evidenciado tecido de granulação e no seu estroma encontramos algumas glândulas endometriais pouco desenvolvidas, além de poucas células e fibras (Fig. 6).

A análise histológica na fase de diestro revelou que os implantes endometriais estavam bastante desenvolvidos, apresentando um aspecto de vesículas, normalmente preenchidas por líquido (Fig. 7). Esses implantes apresentaram pouco tecido de granulação, e um estroma ricamente vascularizado e com várias glândulas circundadas por tecido adiposo (Fig. 8).

## DISCUSSÃO

O endométrio normal e os implantes endometriais apresentam 3 classes de receptores hormonais esteróides: receptores estrogênicos, progesterônicos e androgênicos. Assim sendo, pode ocorrer uma série de possíveis respostas ao endométrio, destacando-se: 1. estados hipostrogênicos que resultam em atrofia; 2. estados hiperandrogênicos que também produzem atrofia; 3. doses farmacológicas de progesterona levam a atrofia endometrial em meio hipostrogênico (SALTIEL & GARABEDIAN-RUFFALO, 1991). Nos animais dos grupos I e II os implantes apresentaram-se bastante desenvolvidos, indicando assim uma influência marcante do

hormônio estrógeno, pois de acordo com ALMEIDA (1999) as fases de proestro e estro estão sobre a influência desse hormônio. Além disso, SCHOR *et al.* (1999) relataram a presença de estroma, glândulas e cistos em implantes endometriais de ratas ooforectomizadas e tratadas com estrógeno. Devemos mencionar ainda que as células endometriais ectópicas se assemelham ao endométrio normal, respondendo aos mesmos estímulos hormonais, porém possuindo atividades enzimáticas e níveis de receptores que diferem em concentração e resposta (VYAS & GANGAR, 1995). É conhecido ainda que o estrógeno estimula o crescimento de tecido endometrial ectópico, pois não se encontra endometriose antes da menarca, bem como após a menopausa (ROCK & MARKHAM, 1992). Os implantes endometriais do grupo III mostraram-se pouco desenvolvidos e sem cistos. Esses achados podem estar relacionados com o declínio do estrógeno e início da liberação da progesterona (ALMEIDA, 1999). O maior desenvolvimento dos implantes endometriais foi observado na fase de diestro, os quais apresentaram um aspecto de vesículas, normalmente preenchidas por líquido, com pouco tecido de granulação, um estroma ricamente vascularizado e com várias glândulas circundadas por tecido adiposo. Segundo ALMEIDA (1999) esta fase está sob a exclusiva influência da progesterona. Entretanto, vários autores relatam que a exposição a progesterona inibe o aparecimento da endometriose (CHWALISZ *et al.*, 2002; LOCKHART *et al.*, 2004; CHWALISZ *et al.*, 2005). Porém, pesquisas recentes sugerem que uma falha na ação da progesterona poderia ser um componente crítico na instalação da endometriose (MULAC-JERICEVIC *et al.*, 2000; OSTEN *et al.*, 2002; OSTEN *et al.*, 2005).

## CONCLUSÃO

As fases de proestro, estro e diestro são mais favoráveis para o desenvolvimento dos implantes endometriais em ratas, quando comparadas ao metaestro.

## REFERÊNCIAS

- ABESHOUSE, B.S. & ABESHOUSE, G. Endometriosis of the urinary tract: a review of the literature and a report of four cases of vesical endometriosis. *The Journal of the International College of Surgeons*, v.34, n.1, p.43-58, 1960.
- ALMEIDA, J. M. *Embriologia veterinária comparada*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p.10-11.
- ARAP NETO, W.; LOPES, R. N.; CURY, M.; MONTELATTO, N. I. D.; ARAP, S. Vesical endometriosis. *Urology*, v.24, n.3, p.271-274, 1984.
- BARACAT, E. C. *Aspectos morfológicos e morfométricos do endométrio humano na pós menopausa, antes e pós estrogênio-terapia oral e transdermica*. 1991. 76p. Tese (Livro-docência) – Escola Paulista de Medicina, São Paulo, São Paulo, 1991.
- BOUCHER, A.; LEMAY, A.; A KOU, 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.969-975, 2000.
- CHWALISZ, K.; GARG, R.; BRENNER, R. M.; SCHUBERT, G.; ELGER, W. Selective Progesterone Receptor Modulators (SPRMs): A Novel Therapeutic Concept in Endometriosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.955, p.373-388, 2002.
- CHWALISZ, K.; PEREZ, M. C.; DEMANNO, D.; WINKEL, C.; SCHUBERT, G.; ELGER, W. Selective Progesterone Receptor Modulator Development and Use in the Treatment of Leiomyomata and Endometriosis. *Endocrine Reviews*, v.26, n.3, p.423-438, 2005.
- DI DIO, L.J.A. *Tratado de anatomia sistêmica aplicada*. 2.ed. Rio de Janeiro: Atheneu. 2002. p.666-667.
- GAMBRELL, R.D. *Estrogens, progestagens and endometrial cancer*. In: BEARD, R.J. (Ed.). Consensus on menopause research. Lancaster: MTP Press, 1976. p.15-153.
- GARTNER, L.P. & HATT, J.L. *Tratado de histologia*. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 1999. p.365-369.
- HAM, A.W. *Histologia*. 3.ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 1967. p. 846-847.
- JUNQUEIRA, L.C. & CARNEIRO, J. *Histologia básica*. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p.390-448.
- LOCKHAT, F.B.; EMEMBOLU, J.O.; KONJE, J.C. The evaluation of the effectiveness of an intrauterine administered progestogen (levonorgestrel) in the symptomatic treatment of endometriosis and in the staging of the disease. *Human Reproduction*, v.19, n.1, p.179-184, 2004.
- MULAC-JERICEVIC, B.; MULLINAX, R.A.; DE MAYO, F.J.; LYDON, J.P.; CONNEELY, O.M. Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science*, v. 289, p.1751-1754, 2000.
- NEZHAT, C.; NEZHAT, F.; METZGER, D.A.; LUCIANO, A.A. Adhesion reformation after reproductive surgery by videolaseroscopy. *Fertility and Sterility*, v.53, p.1008-1011, 1990.
- OSTEEN, K.G.; BRUNER-TRAN, K.L.; KELLER, N.R.; EISENBERG, E. Progesterone-Mediated Endometrial Maturation Limits Matrix Metalloproteinase (MMP) Expression in an Inflammatory-like Environment. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.955, p.37-47, 2002.
- OSTEEN, K.G.; BRUNER-TRAN, K.L.; EISENBERG, E. Reduced progesterone action during endometrial maturation: a potential risk factor for the development of endometriosis. *Fertility and Sterility*, v.83, p.529-537, 2005.
- 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. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v.86, n.6, p.2553-2561, 2001.
- ROCK, J.A. & MARKHAM, S.M. Pathogenesis of endometriosis. *Lancet*, v.340, p.1264-1267, 1992.
- SALTIEL, E. & GARABEDIAN-RUFFALO, S.M. Pharmacologic management of endometriosis. *Clinical Pharmacy*, v.10, p.518-530, 1991.
- SAMPSON, J.A. Peforating hemorrhagic cysts of the ovary. Their importance and especially their relation to pelvic adenomas of the endometrial type (adenoma of the uterus rectovaginal septum, sigmoid, etc.) *Archives of Surgery*, v.3, p.245-323, 1927.
- SIMÕES, M.J. *Aspecto morfológicos e morfométricos de endométrio de ratas da colônia 2 BAW, nas subfases intermediárias e final do estro e diestro*. 1979. 97p. Dissertação (Mestrado em Histologia) - Escola Paulista de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1979.
- SCHOR, E.; BARACAT, E.C.; SIMÕES, M.J.; FREITAS, V. de; FILHO, O.G.; RODRIGUES, D.E.; LIMA, G. Effects of conjugated estrogens and progestogen in surgically induced endometriosis in oophorectomized. *Clinical and Experimental Obstetrics & Gynecology*, v.26, n.3/4, p.158-161, 1999.
- TOBIAS-MACHADO, M.; DI GIUSEPPE, R.; BARBOSA, C.P.; BORRELLI, M.; WROCLAWSKI, E. R. Endometriose vesical: aspectos diagnósticos e terapêuticos. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v.47, n.1, p.37-40, 2001.
- VERNON, M.W. & WILSON, E.A. Studies on the surgical induction of endometriosis in the rat. *Fertility and Sterility*, v.44, p.684-694, 1985.
- VYAS, S. & GANGAR, K. Postmenopausal oestrogens and arteries. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, v.102, n.12, p.942-946, 1995.
- 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.

Recebido em 11/10/05

Aceito em 15/12/05