

Efeito do anti-TNF- α em implantes endometriais no peritônio de ratas

Effect of anti-TNF- α on peritoneal endometrial implants of rats

WILLIAM KONDO, ACBC-PR¹; EDUARDO ANDREAZZA DAL LAGO²; LUCIA DE NORONHA³; MARCIA OLANDOSKI⁴; PAULO GUSTAVO KOTZE⁵; VIVIAN FERREIRA DO AMARAL⁶

R E S U M O

Objetivo: Avaliar o efeito da terapia anti-TNF- α no tratamento de implantes endometriais no peritônio de ratas. **Métodos:** Os implantes endometrióticos foram induzidos cirurgicamente em 120 ratas Wistar-Albino. Os animais foram aleatoriamente distribuídos em 4 grupos. O grupo C (n=36) recebeu uma injeção intraperitoneal de 0,2ml de solução salina. O grupo L (n=41) recebeu uma injeção subcutânea de 1mg/kg de leuprolide. O grupo I5 (n=20) recebeu uma injeção subcutânea de 5mg/kg de anticorpo monoclonal anti-fator de necrose tumoral (TNF) α (infiximab). O grupo I10 (n=20) recebeu uma injeção subcutânea de 10mg/kg de infiximab. As ratas foram sacrificadas após 21 dias para se avaliar o tamanho dos implantes e a expressão do TNF- α . **Resultados:** O tratamento com leuprolide promoveu uma redução absoluta na área de superfície do implante comparado com o grupo C (+14mm vs. 0mm; $p=0,013$) e com o grupo I10 (+14mm vs. +5mm; $p=0,018$). Da mesma forma, uma redução percentual da área de superfície do implante foi observada comparando o grupo L com o grupo C (+33,3% vs. 0%; $p=0,005$) e com o grupo I10 (+33,3% vs. +18,3%; $p=0,027$). O tratamento com infiximab não foi capaz de diminuir a área de superfície do implante comparado com o grupo C. A expressão de TNF- α reduziu nos grupos L, I5 e I10 comparado com o grupo C (505,6 μ m² vs. 660,5 μ m² vs. 317,2 μ m² vs. 2519,3 μ m², respectivamente; $p<0,001$). **Conclusão:** A terapia anti-TNF- α reduziu a expressão de TNF- α nos implantes endometrióticos mas não reduziu a área de superfície da lesão.

Descritores: Endometriose. Fator de necrose tumoral alfa. Tumores do estroma endometrial. Peritônio. Experimentação animal.

INTRODUÇÃO

A endometriose é uma doença ginecológica benigna definida pela presença de tecido endometrial, consistindo de epitélio glandular e/ou estroma, fora da cavidade uterina^{1,2}. Esta condição é predominantemente encontrada em mulheres em idade reprodutiva e afeta 7 a 10% de todas as mulheres, 71 a 87% das mulheres com dor pélvica crônica, e 38% das mulheres inférteis³.

Embora a fisiopatologia da endometriose seja pouco compreendida, a habilidade dos implantes endometrióticos se desenvolverem em localizações ectópicas pode estar relacionada à imunoreatividade aberrante decorrente das próprias lesões⁴. O ambiente peritoneal das mulheres com endometriose contém um rico coquetel de citocinas, substâncias angiogênicas e fatores de crescimento⁵ que é produzido principalmente pelas células peritoneais imunes e pelas células endometrióticas⁶.

O fator de necrose tumoral α (TNF- α) é uma citocina chave em uma variedade de processos inflama-

tórios, e é provável que ele tenha um papel na patogênese da endometriose⁴. Numerosos investigadores têm mostrado que as concentrações de TNF- α estão elevadas no fluido peritoneal de pacientes com endometriose e que os níveis se correlacionam com o estágio da doença⁷.

Os efeitos anti-inflamatórios do bloqueio do TNF- α por anticorpos monoclonais (como o infiximab) ou por receptores solúveis do TNF- α (como o etanercept) têm sido demonstrados in vivo em modelos animais e também em humanos⁸. A efetividade clínica do bloqueio do TNF- α tem sido demonstrada em condições inflamatórias como a doença de Crohn e artrite reumatóide, mas não em endometriose acentuada⁹. Em babuínos com endometriose confirmada por laparoscopia, o bloqueio do TNF- α com receptores solúveis p55 de TNF- α resultou na inibição do desenvolvimento e do crescimento dos implantes de endometriose¹⁰. O tamanho das lesões peritoneais vermelhas diminuiu em comparação com o grupo controle¹¹, mas não houve aumento das taxas de gravidez¹².

Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR), Curitiba, Paraná, Brasil.

1. Ginecologista e Cirurgião Geral, Mestrando do Setor de Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR); 2. Estudante de Medicina da PUC-PR-BR; 3. Patologista do Laboratório de Patologia Experimental da PUC-PR-BR; 4. Estatística da PUC-PR -BR; 5. Cirurgião Geral e Coloproctologista; 6. Professora Adjunta de Ginecologia da PUC-PR e da Pós-Graduação em Ciências da Saúde da PUC-PR-BR.

Esta associação entre a endometriose e o aumento das citocinas abre a possibilidade para novas propostas de tratamento clínico, particularmente utilizando terapias anti-citocinas. A inflamação mediada pelo TNF- α pode ser um fator causal na dor associada com a endometriose e o bloqueio do TNF- α parece inibir o desenvolvimento da doença em modelos animais.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da terapia anti-TNF- α no tratamento de implantes endometriais cirurgicamente induzidos no peritônio de ratas.

MÉTODOS

Cento e vinte ratas Wistar-Albino com peso entre 200 e 250g foram utilizadas para o experimento. Os animais foram provenientes do Biotério Central da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR). As ratas foram mantidas em gaiolas apropriadas com cinco animais, sob controle de temperatura, umidade e luminosidade do ambiente, e alimentadas com água e ração *ad libitum*. Após um período de adaptação de uma semana, os implantes endometriais foram cirurgicamente induzidos nos animais.

O estudo experimental foi realizado no Setor de Ciências Biológicas da PUC-PR, obedecendo a Lei Federal 11794 e as orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. O protocolo experimental utilizado neste estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisas Animais do Setor de Ciências Biológicas da PUC-PR em 19 de agosto de 2008 (parecer número 243).

Procedimentos cirúrgicos

Primeira operação

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Laboratório de Cirurgia Experimental da Disciplina de Técnica Operatória do Setor de Ciências da Saúde da PUC-PR.

Os implantes endometriais foram induzidos cirurgicamente utilizando a técnica descrita por Jones¹³ em 1984. Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de 50mg/kg de ketamina e 7mg/kg de xilazina¹⁴. Os animais foram imobilizados à mesa cirúrgica em decúbito dorsal, com os membros em abdução.

Foi realizada a limpeza mecânica e a antisepsia da região operatória utilizando solução de povidone-iodine com 1% de iodo ativo. Após a colocação dos campos cirúrgicos, foi realizada uma incisão mediana de aproximadamente 3cm, iniciando 2cm acima do púbis do animal, para a exposição dos órgãos reprodutivos da rata. O útero bicorno foi identificado e os vasos sanguíneos do corno uterino esquerdo foram ligados com fio de vicryl 3-0. Um segmento de 10mm do terço médio do corno uterino esquerdo foi ressecado e imerso em solução salina 0,9% a 4°C por cerca de 2 minutos. Este segmento foi aberto na borda antimesentérica dando origem a um retalho, de onde foi removido um segmento de 5x5mm. O implante foi suturado à parede abdominal do lado direito da rata utilizando dois pontos simples de mononáilon 6-0, próximo a um vaso

sanguíneo, de modo que a face endometrial sempre ficasse voltada para a cavidade abdominal (Figura 1). Após checar a hemostasia do corno uterino esquerdo e promover a limpeza da cavidade abdominal, a parede abdominal foi suturada, sendo o plano músculo-aponeurótico com sutura contínua de poliglactina 3-0 e a pele com sutura contínua de mononáilon 3-0. Nenhuma suplementação hormonal foi administrada antes ou após a laparotomia.

Após a primeira operação, todos os animais foram observados por 21 dias no Biotério sem nenhuma medicação, exceto analgesia pós-operatória com injeção intraperitoneal de dipirona na dose de 1mg para cada 100 gramas de peso a cada oito horas.

Três ratas foram a óbito durante o período entre a primeira e a segunda cirurgia. Na manhã do segundo procedimento cirúrgico, os animais foram aleatoriamente distribuídos em quatro grupos: Grupo C, grupo controle (n=36), recebeu uma injeção intraperitoneal de 0,2ml de solução salina 0,9% próximo ao implante; Grupo L, grupo controle positivo (n=41), foi tratado com agonista de GnRH (hormônio liberador de gonadotropina) com uma injeção subcutânea única de acetato de leuprolide em formulação de depósito (1 mg/kg de peso corporal; Lucrin; Abbott, Brasil[®]). A dose do acetato de leuprolide foi baseada em estudo prévio em que 1 mg/kg foi encontrada como ótima para ratas¹⁵; Grupo I5, grupo anti-TNF- α 5mg/kg (n=20), recebeu uma injeção subcutânea de 5mg/kg de anticorpo monoclonal anti-TNF- α (infliximab)¹⁶; Grupo I10, grupo anti-TNF- α 10mg/kg (n=20), recebeu uma injeção subcutânea de 10mg/kg de anticorpo monoclonal anti-TNF (infliximab)¹⁶.

Segunda operação

Cada rata foi anestesiada e uma laparotomia mediana foi realizada para comprovar macroscopicamente o desenvolvimento da lesão e a viabilidade do implante endometriótico. A área de superfície dos implantes foi aferida (altura x largura) em milímetros e anotada.



Figura 1 - Transplante do endométrio no lado direito da cavidade peritoneal da rata.

O grupo C recebeu uma injeção intraperitoneal de 0,2ml de solução salina próximo ao implante, o grupo L recebeu uma injeção subcutânea de acetato de leuprolide (1mg/kg), o grupo I5 recebeu uma injeção subcutânea de anti-TNF- α (5mg/kg) e o grupo I10 recebeu uma injeção subcutânea de anti-TNF- α (10mg/kg).

A laparotomia foi fechada e todas as ratas foram observadas por mais 21 dias.

Terceira operação

Três semanas após a segunda operação, a terceira laparotomia foi realizada. O efeito dos tratamentos sobre o implante endometriótico foi avaliado por meio da medida da área de superfície dos implantes (Figura 2). Os implantes foram excisados, fixados em formalina a 10% e processados para inclusão em parafina, para posterior análise morfológica junto ao Laboratório de Patologia Experimental da PUC-PR. Após o procedimento cirúrgico, as ratas sofreram eutanásia com ketamina.

Análise histológica

O patologista designado para avaliar as amostras desconhecia os grupos de tratamento. Os implantes endometriais fixados em formalina foram preparados em blocos de parafina, seccionados em uma espessura de 5 μ m (4 cortes por amostra), corados com hematoxilina e eosina e avaliados com microscópio ótico. A persistência de células epiteliais nos implantes endometrióticos foi avaliada semiquantitativamente¹⁷: escore 3 = camada epitelial bem preservada; escore 2 = epitélio moderadamente preservado com infiltrado leucocitário; Escore 1 = epitélio mau preservado (apenas células epiteliais ocasionais); escore zero = nenhum epitélio (Figura 3).

Para a análise imuno-histoquímica das amostras foi utilizado o arranjo em matriz de amostras teciduais, ou *tissue microarray* (TMA), descrita por Kononen et al em 1998¹⁸. Trata-se da construção de um bloco de parafina contendo fragmentos cilíndricos de amostras teciduais obtidas de dezenas de blocos de parafina originais. Os cilindros teciduais são dispostos no bloco receptor seguindo uma ordem pré-determinada.

Para a confecção das lâminas de *tissue microarray*, o implante endometrial foi identificado no exame histológico e um *punch* de 4mm da parede do cisto endometriótico foi realizado. Cada lâmina eletricamente carregada foi preparada com o material obtido do *punch* de 15 animais. A expressão do TNF- α foi avaliada utilizando um kit de imuno-histoquímica disponível comercialmente (mouse anti-human TNF alpha, Sinapse Biotecnologia Ltda, São Paulo, SP, Brasil[®]) e contada utilizando avaliação morfométrica digital. As imagens foram digitalizadas com uma câmera digital colorida (TV 0.45x Nikon lens, Tokyo, Japan[®]) adaptada ao microscópio (Nikon Eclipse E600, Tokyo, Japan[®]). As imagens foram analisadas utilizando o Programa Image Pro (Media Cybernetics), possibilitando que a expressão do TNF- α pudesse ser contada e integrada por área.



Figura 2 - Medida da área do implante endometriótico na terceira cirurgia.

Análise estatística

Os quatro grupos foram comparados de acordo com as seguintes variáveis: redução absoluta da área da lesão, calculada pela subtração da área da lesão na terceira operação (após o tratamento) da área na segunda operação. Um valor positivo indicou uma redução na área da lesão e um valor negativo indicou um aumento da área; redução percentual da área da lesão, calculada dividindo a redução absoluta da área da lesão pela área na segunda cirurgia. O resultado foi multiplicado por 100. Um resultado positivo indicou uma redução na área da lesão e um resultado negativo indicou aumento da área; expressão do TNF- α na imuno-histoquímica.

Os resultados foram avaliados quanto à normalidade da distribuição pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As variáveis paramétricas com distribuição normal foram testadas por meio de análise de variância (ANOVA) e análise post hoc (correção de Bonferroni) para definir eventuais diferenças entre os grupos. Variáveis que não seguiram a distribuição normal foram analisadas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com correção de Bonferroni. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. As variáveis de distribuição normal foram expressas como média \pm desvio padrão. As variáveis que não seguiram a distribuição normal foram expressas como mediana (mínimo – máximo).

RESULTADOS

Os implantes endometriais produziram lesões viáveis em todos os animais. Eles estavam bem vascularizados e aderidos ao peritônio da parede abdominal na segunda laparotomia.

A área dos implantes foi aferida na primeira (área 1), na segunda (área 2) e na terceira (área 3) ope-

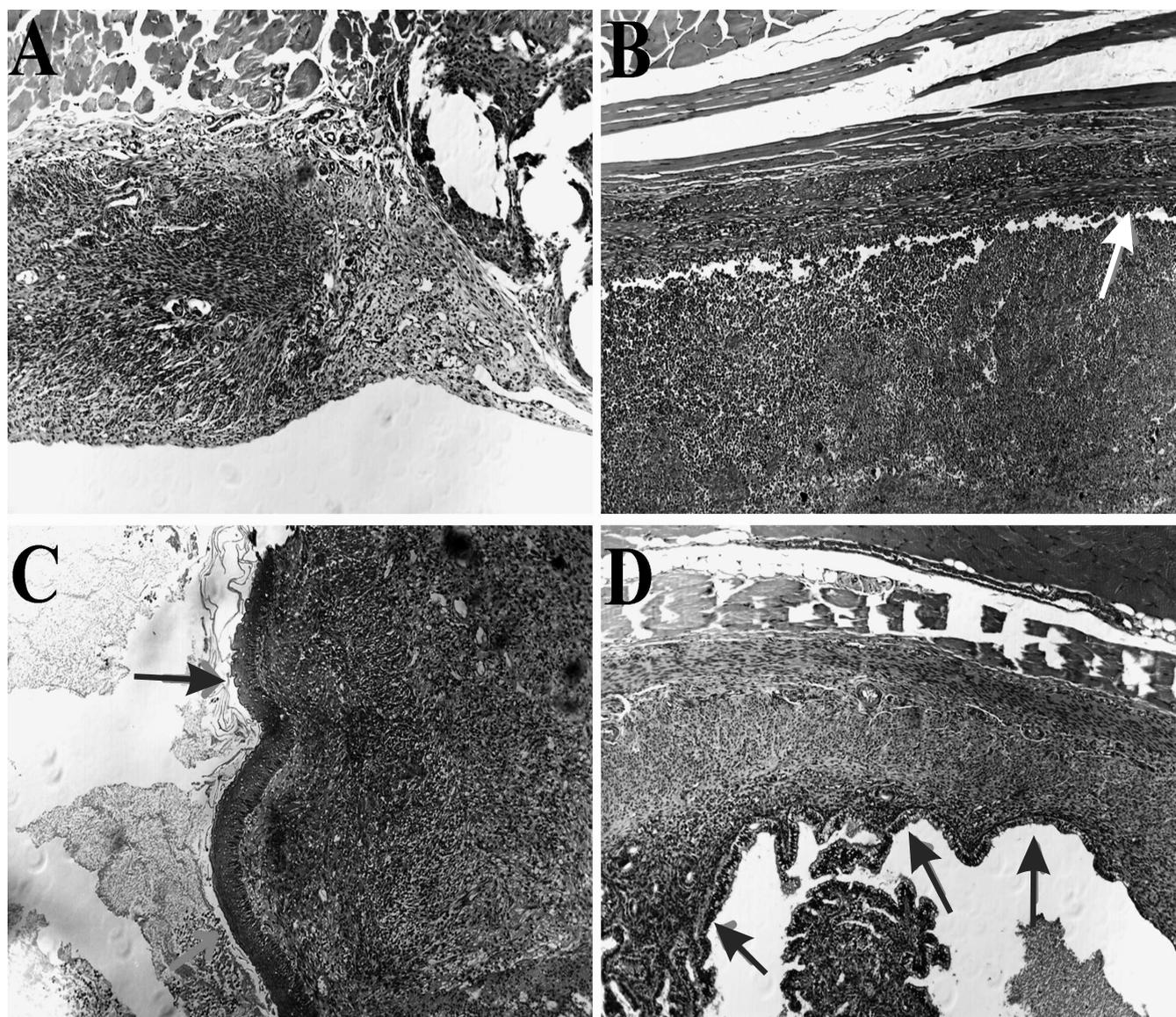


Figura 3 - Avaliação semiquantitativa do implante endometriótico (aumento de 10x). (A) Escore zero. (B) Escore 1. (C) Escore 2. (D) Escore 3. As flechas indicam áreas com epitélio preservado.

rações (Tabela 1). Não houve diferença na área do segmento transplantado de endométrio na primeira operação. Houve um aumento da área do implante da primeira para a segunda cirurgia, mas os implantes do grupo C e do grupo L cresceram mais do que os implantes dos grupos I5 e I10 ($p < 0,001$). Portanto, para fins de compa-

ração do tratamento com leuprolide e anti-TNF- α , a área absoluta da lesão no terceiro procedimento não foi utilizada, mas sim as reduções absoluta e percentual da área da lesão.

A análise semiquantitativa da persistência de células epiteliais nos implantes endometriais (Tabela 2) não

Tabela 1 - Área do implante endometriótico nos três procedimentos cirúrgicos.

	Área 1 (mm ²)	Área 2 (mm ²)	Área 3 (mm ²)
Grupo C	24 (24 a 25)	54 \pm 33,6	42 (6 a 204)
Grupo L	24 (24 a 25)	44,8 \pm 21,1	24 (2 a 100)
Grupo I5	25 (25 a 25)	27,8 \pm 11,1	22 (4 a 36)
Grupo I10	25 (25 a 25)	28,7 \pm 10,1	24,5 (9 a 56)
Valor de p	1	<0,001	0,001

Tabela 2 - Avaliação semiquantitativa da persistência de células epiteliais nos implantes endometrióticos.

	Escore 0	Escore 1	Escore 2	Escore 3	Total
Grupo C	4	5	7	20	36
Grupo L	5	4	1	31	41
Grupo I5	2	4	1	13	20
Grupo I10	2	1	7	10	20

Tabela 3 - Redução absoluta e percentual na área do implante.

	Redução absoluta (mm ²)		Redução percentual (%)	
Grupo C	0	(-51 a +56)	0	(-66,7 a +78,6)
Grupo L	+14	(-32 a +80)	+33,3	(-344,4 a +93,7)
Grupo I5	+6,5	(-4 a +25)	+23,3	(-20 a +73,3)
Grupo I10	+5	(-26 a +25)	+18,3	(-108,3 a +62,5)
Valor de <i>p</i>	0,04		0,02	

demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,06$).

Comparando os quatro grupos observamos redução absoluta e percentual estatisticamente significativa na área do implante da segunda para a terceira operação (Tabela 3). Houve uma redução absoluta estatisticamente significativa na área do implante apenas quando se comparou o grupo L com o grupo C ($p=0,013$) e com o grupo I10 ($p=0,018$). Do mesmo modo, houve uma redução percentual estatisticamente significativa na área do implante quando se comparou o grupo L com o grupo C ($p=0,005$) e com o grupo I10 ($p=0,027$). As demais comparações entre os grupos não revelaram diferença estatística na redução absoluta ou percentual da área dos implantes.

A análise imuno-histoquímica das amostras utilizando o arranjo em matriz de amostras teciduais permitiu a avaliação objetiva da expressão do TNF- α (Tabela 4). Houve uma redução estatisticamente significativa na expressão do TNF- α no implante endometriótico quando se comparou o grupo L com o grupo C ($p<0,001$), quando se comparou o grupo I5 ao grupo C ($p<0,001$) e quando se comparou o grupo I10 ao grupo C ($p<0,001$).

DISCUSSÃO

O tratamento clínico tem um papel substancial no tratamento da dor associada à endometriose^{19,20}. O acetato de medroxiprogesterona, o danazol, os anticoncepcionais orais e os análogos de GnRH são todos efetivos na redução da intensidade dos sintomas dolorosos causados pela endometriose. No entanto, a recorrência dos sintomas é comum após a interrupção do tratamento clínico^{19,20} e ele não tem benefício nenhum na infertilidade as-

Tabela 4 - Expressão do VEGFR e TNF- α no implante de endometriose.

	TNF- α (μm^2)	
Grupo C	2519,3	(109,4 a 13647,1)
Grupo L	505,6	(11,9 a 4811,1)
Grupo I5	660,5	(68 a 10678,2)
Grupo I10	317,2	(115,7 a 2037,2)
Valor de <i>p</i>	<0,001	

sociada à endometriose²¹. Portanto, novos tratamentos clínicos mais efetivos do que os tratamentos hormonais são necessários para um melhor controle e tratamento da doença.

Os modelos animais permitem o estudo de eventos envolvendo a fisiopatologia da endometriose assim como novas abordagens terapêuticas para esta doença^{15,22}. Modelos animais utilizando primatas e não primatas têm sido utilizados para o estudo da endometriose há anos. Não primatas, incluindo roedores, não apresentam endometriose espontânea, mas ela pode ser induzida utilizando tecido uterino autólogo ou endométrio humano. Os primatas desenvolvem endometriose espontaneamente, e a doença também pode ser induzida com propósito de pesquisa. As vantagens do modelo utilizando não primatas incluem a seu relativo baixo custo e a habilidade de se estabelecer lesões semelhantes à endometriose²². O autotransplante de segmentos uterinos à cavidade peritoneal é um método bem estabelecido para a indução de implantes endometriais em ratas²³⁻²⁶.

Embora a expressão "endometriose experimental" seja usada na literatura, o presente estudo envolveu o implante de fragmentos de endométrio na cavidade peritoneal de ratas sadias. A real correlação existente en-

tre estes implantes de tecido endometrial induzidos cirurgicamente e a endometriose que se desenvolve nas mulheres é incerta. No entanto, a ampla utilização de protocolos de pesquisa de "endometriose experimental" em modelos animais é justificada, uma vez que a avaliação completa e o acompanhamento das lesões de endometriose em humanos é difícil e muitas vezes não factível, pois os métodos diagnósticos são invasivos (laparoscopia ou laparotomia).

O presente estudo demonstrou que, em modelo animal utilizando ratas, o tratamento com anticorpo monoclonal anti-TNF- α (infiximab) diminuiu a expressão do TNF- α nos implantes endometrióticos, porém não foi efetivo em reduzir a área dos implantes endometriais. Apenas a terapia com leuprolide foi capaz de reduzir a área de superfície dos implantes endometriais.

Há evidência substancial de que fatores imunológicos têm um papel importante na patogênese da endometriose^{6,27}. O aumento das citocinas inflamatórias (IL-1a, IL-6, IL-8, IL-18, TNF- α) tem sido relatado em pacientes portadoras de endometriose^{6,28,29}. O TNF- α tem um papel chave em vários processos inflamatórios. É produzido pelos macrófagos, células natural killer, neutrófilos e várias células não hematopoiéticas, incluindo células endometrióticas epiteliais e estromais. Embora o TNF- α tenha sido inicialmente identificado por sua citotoxicidade contra certas linhagens celulares, sua função primária (associado à IL-1) é de iniciar a cascata de fatores associados à resposta inflamatória. Tem sido demonstrado que o TNF- α estimula a produção de prostaglandinas por células epiteliais endometriais em cultura³⁰ e promove a aderência de células estromais cultivadas às células mesoteliais³¹. Estes achados indicam que o TNF- α possa ser um fator do fluido pélvico mediador do estabelecimento dos implantes endometrióticos. Vários autores têm demonstrado que as concentrações do TNF- α no fluido peritoneal de mulheres com endometriose estão elevadas³²⁻³⁴. Alguns investigadores também sugerem que os níveis do TNF- α no fluido peritoneal podem estar correlacionados com a intensidade da dismenorréia³⁵.

Em nosso estudo, demonstramos a diminuição na expressão do TNF- α no implante endometriótico nos grupos L (505,6 μ m²; $p < 0.001$), I5 (660,5 μ m²; $p < 0.001$) e I10 (317,2 μ m²; $p < 0.001$) comparado com o grupo C (2519,3 μ m²). No entanto, a redução da expressão do TNF- α foi semelhante utilizando a terapia com leuprolide e com anti-TNF- α em ambas as doses. Apesar dessa redução da expressão do TNF- α , não houve redução absoluta ou percentual significativa na área de superfície dos implan-

tes endometrióticos no grupo tratado com anti-TNF- α comparado com o grupo controle. Apenas o tratamento com leuprolide reduziu a área de superfície dos implantes endometriais comparado com o grupo controle e com o grupo I10. O grupo tratado com a dose de 10mg/kg de anticorpo monoclonal anti-TNF apresentou a maior redução da expressão do TNF- α no implante e, mesmo assim, o tratamento com leuprolide apresentou redução estatisticamente significativa da área de superfície dos implantes endometriais comparado com este grupo, mostrando que apenas a redução da inflamação não é suficiente para reduzir a área das lesões endometrióticas. As doses de 5mg/kg e 10mg/kg foram baseadas em um estudo prévio utilizando o infiximab em modelo experimental de colite em ratos¹⁶.

Achados negativos já haviam sido encontrados com o uso da terapia anti-TNF- α em endometriose. Em 2008, Koninckx et al⁸ avaliaram 21 mulheres portadoras de endometriose, com sintomatologia dolorosa importante e nódulo retovaginal de pelo menos 1cm. Elas receberam infiximab (5mg/kg) (n=14) ou placebo (n=7) e foram operadas três meses mais tarde. Os autores não observaram redução da dor associada à endometriose no grupo tratado com infiximab comparado ao grupo placebo e também relataram que a falta de eficácia do infiximab como um tratamento para a dor associada à endometriose foi inesperada, uma vez que sempre se acreditou que a inflamação seria a maior causa de dor na endometriose. Falconer et al¹² estudaram o papel da inibição do TNF- α utilizando um anticorpo monoclonal anti-TNF na subfertilidade associada à endometriose em babuínos e observaram que não houve melhora significativa nas taxas de gravidez, taxas de fecundidade por ciclo, tempo mediano para a gravidez e taxa de gravidez cumulativa comparado ao grupo placebo. Uma revisão sistemática³⁶ que teve como objetivo determinar a efetividade e a segurança das drogas anti-TNF- α no manejo da dor pélvica associada à endometriose concluiu que não há evidência para embasar o uso dessas drogas no tratamento de mulheres com endometriose com o intuito de melhorar a dor pélvica.

Em nosso modelo animal, demonstramos a redução da expressão do TNF- α nos implantes endometrióticos com o uso de terapia anti-TNF- α e com leuprolide. No entanto, a redução do TNF- α promovida pela terapia anti-TNF- α não se correlacionou com a regressão da área de superfície da lesão, ao contrário do que foi observado com o uso de leuprolide. Conseqüentemente, a simples redução local da inflamação parece não ser suficiente para diminuir a área de superfície dos implantes endometrióticos.

A B S T R A C T

Objective: To evaluate the effect of anti-TNF- α in the treatment of endometrial implants in the peritoneum of rats. **Methods:** Endometrial implants were surgically induced in 120 female Wistar-Albino rats. The animals were randomly divided into four groups. Group C (n = 36) received an intraperitoneal injection of 0.2 ml of saline. Group L (n = 41) received a subcutaneous injection of 1mg/kg of leuprolide. Group I5 (n = 20) received a subcutaneous injection of 5mg/kg of monoclonal anti-tumor necrosis factor (TNF) α (infliximab). Group I10 (n = 20) received a subcutaneous injection of 10mg/kg of infliximab. The rats were sacrificed after 21 days to assess the size of the implants and the expression of TNF. **Results:** Treatment with leuprolide (group L) promoted an absolute reduction in the surface area of the implant when compared with group C (+14 mm vs. 0mm, $p = 0.013$) and group I10 (+14 mm vs. +5 Mm, $p = 0.018$). Likewise, a percentage reduction of surface area of the implant was observed comparing group L with group C (+33.3% vs. 0%, $p = 0.005$) and group I10 (+33.3% vs. +18.3%, $p = 0.027$). Treatment with infliximab was not able to decrease the surface area of the implants when compared with group C. The expression of TNF- α in groups L, I5 and I10 was lower than in group C (505.6 mm² vs. 660.5 mm² vs. 317.2 mm² vs. 2519.3 mm², respectively; $p < 0.001$). **Conclusion:** The anti-TNF- α therapy reduced the expression of TNF- α in endometriotic implants, but did not reduce the surface area of the lesion.

Key words: Endometriosis. Tumor necrosis factor alpha. Endometrial stromal tumors. Peritoneum. Animal experimentation.

REFERÊNCIAS

- D'Hooghe TM, Kyama C, Debrock S, Meuleman C, Mwenda JM. Future directions in endometriosis research. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1034:316-25.
- Kennedy S, Bergqvist A, Chapron C, D'Hooghe T, Dunselman G, Greb R, et al. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Hum Reprod* 2005; 20(10):2698-704.
- Amsterdam LL, Gentry W, Jobanputra S, Wolf M, Rubin SD, Bulun SE. Anastrozole and oral contraceptives: a novel treatment for endometriosis. *Fertil Steril* 2005; 84(2):300-4.
- Lebovic DI, Mueller MD, Taylor RN. Immunobiology of endometriosis. *Fertil Steril* 2001; 75(1):1-10.
- Harada T, Iwabe T, Terakawa N. Role of cytokines in endometriosis. *Fertil Steril* 2001; 76(1):1-10.
- Kyama CM, Debrock S, Mwenda JM, D'Hooghe TM. Potential involvement of the immune system in the development of endometriosis. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1:123.
- Eisermann J, Gast MJ, Pineda J, Odem RR, Collins JL. Tumor necrosis factor in peritoneal fluid of women undergoing laparoscopic surgery. *Fertil Steril* 1988; 50(4):573-9.
- Koninckx PR, Craessaerts M, Timmerman D, Cornillie F, Kennedy S. Anti-TNF-alpha treatment for deep endometriosis-associated pain: a randomized placebo-controlled trial. *Hum Reprod* 2008; 23(9):2017-23.
- Shakiba K, Falcone T. Tumour necrosis factor-alpha blockers: potential limitations in the management of advanced endometriosis ? A case report. *Hum Reprod* 2006; 21(9):2417-20.
- D'Hooghe TM, Nugent NP, Cuneo S, Chai DC, Deer F, Debrock S, et al. Recombinant human TNFRSF1A (r-hTBP1) inhibits the development of endometriosis in baboons: a prospective, randomized, placebo- and drug-controlled study. *Biol Reprod* 2006; 74(1):131-6.
- Barrier BF, Bates GW, Leland MM, Leach DA, Robinson RD, Propst AM. Efficacy of anti-tumor necrosis factor therapy in the treatment of spontaneous endometriosis in baboons. *Fertil Steril* 2004; 81(Suppl 1):775-9.
- Falconer H, Mwenda JM, Chai DC, Song XY, Cornillie FJ, Bergqvist A, et al. Effects of anti-TNF-mAb treatment on pregnancy in baboons with induced endometriosis. *Fertil Steril* 2008; 89(5 Suppl):1537-45.
- 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(2):282-8.
- Oktem M, Esinler I, Eroglu D, Haberal N, Bayraktar N, Zeyneloglu HB. High-dose atorvastatin causes regression of endometriotic implants: a rat model. *Hum Reprod* 2007; 22(5):1474-80.
- Dogan E, Saygili U, Posaci C, Tuna B, Caliskan S, Altunyurt S, et al. Regression of endometrial explants in rats treated with the cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib. *Fertil Steril* 2004; 82 (Suppl 3):1115-20.
- Triantafyllidis JK, Papalois AE, Parasi A, Anagnostakis E, Burnazos S, Gikas A, et al. Favorable response to subcutaneous administration of infliximab in rats with experimental colitis. *World J Gastroenterol* 2005; 11(43):6843-7.
- Keenan JA, Williams-Boyce PK, Massey PJ, Chen TT, Caudle MR, Bukovsky A. Regression of endometrial explants in a rat model of endometriosis treated with the immune modulators loxoribine and levamisole. *Fertil Steril* 1999; 72(1):135-41.
- Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998; 4(7):844-7.
- Vercellini P, Crosignani PG, Somigliana E, Berlanda N, Barbara G, Fedele L. Medical treatment for rectovaginal endometriosis: what is the evidence ? *Hum Reprod* 2009; 24(10):2504-14.
- Ferrero S, Remorgida V, Venturini PL. Current pharmacotherapy for endometriosis. *Expert Opin Pharmacother* 2010;11(7):1123-34.
- Hughes E, Brown J, Collins JJ, Farquhar C, Fedorkow DM, Vandekerckhove P. Ovulation suppression for endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2007; (3):CD000155.
- Story L, Kennedy S. Animal studies in endometriosis: a review. *ILAR J* 2004; 45(2):132-8.
- Vernon MW, Wilson EA. Studies on the surgical induction of endometriosis in the rat. *Fertil Steril* 1985; 44(5):684-94.
- Schor E, Freitas V, Soares Júnior JM, Simões MJ, Baracat EC. Endometriose: modelo experimental em ratas. *Rev bras ginecol obstet* 1999; 21(5):281-4.
- Nogueira Neto J, Torres OJM, Borges MOR, Coelho TM, Nascimento AGPAC, Nunes Júnior JNN, et al. Modificações do volume e da histologia de focos de endometriose em ratas tratadas com sinvastatina. *Rev bras ginecol obstet* 2007; 29(8):408-14.
- Amaral VF, Dal Lago EA, Kondo W, Souza LCG, Francisco JC. Desenvolvimento de modelo experimental de endometriose em ratas. *Rev Col Bras Cir* 2009; 36(3):250-5.
- Berkkanoglu M, Arici A. Immunology and endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 2003; 50(1):48-59.
- Iwabe T, Harada T, Tsudo T, Nagano Y, Yoshida S, Tanikawa M, et al. Tumor necrosis factor-alpha promotes proliferation of endometriotic stromal cells by inducing interleukin-8 gene and protein expression. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(2):824-9.
- Arici A, Matalliotakis I, Goumenou A, Koumantakis G, Vassiliadis S, Mahutte NG. Altered expression of interleukin-18 in the peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertil Steril* 2003; 80(4):889-94.

30. Chen DB, Yang ZM, Hilsenrath R, Le SP, Harper MJ. Stimulation of prostaglandin (PG) F2 alpha and PGE2 release by tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 alpha in cultured human luteal phase endometrial cells. *Hum Reprod* 1995; 10(10):2773-80.
31. Zhang RJ, Wild RA, Ojago JM. Effect of tumor necrosis factor-alpha on adhesion of human endometrial stromal cells to peritoneal mesothelial cells: an in vitro system. *Fertil Steril* 1993; 59(6):1196-201.
32. Bullimore DW. Endometriosis is sustained by tumour necrosis factor-alpha. *Med Hypotheses* 2003; 60(1):84-8.
33. Richter ON, Dorn C, Rösing B, Flaskamp C, Ulrich U. Tumor necrosis factor alpha secretion by peritoneal macrophages in patients with endometriosis. *Arch Gynecol Obstet* 2005; 271(2):143-7.
34. Gogacz M, Bogusiewicz M, Putowski L, Adamiak A, Wertel I, Jakowicki JA, et al. Expression of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) on peritoneal fluid mononuclear cells in women with endometriosis. *Ginekol Pol* 2008; 79(1):31-5.
35. Scholl B, Bersinger NA, Kuhn A, Mueller MD. Correlation between symptoms of pain and peritoneal fluid inflammatory cytokine concentrations in endometriosis. *Gynecol Endocrinol* 2009; 25(11):701-6.
36. Lv D, Song H, Shi G. Anti-TNF-alpha treatment for pelvic pain associated with endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2010;(3):CD008088.

Recebido em 05/08/2010

Aceito para publicação em 06/10/2010

Conflito de interesse: nenhum

Fonte de financiamento: nenhuma

Como citar este artigo:

Kondo W, Lago EA, Noronha L, Olandoski M, Kotza PG, Amaral VF. Eficácia do anti-TNF-alfa em implantes endometriais no peritônio de ratas. *Rev Col Bras Cir.* [periódico na Internet] 2011; 38(4). Disponível em URL: <http://www.scielo.br/rcbc>

Endereço para correspondência:

William Kondo

Site: drwilliamkondo.site.med.br

E-mail: williamkondo@yahoo.com