

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

João Nogueira Neto

**ANÁLISE MACROSCÓPICA E HISTOLÓGICA DO EFEITO DA
SINVASTATINA NA ENDOMETRIOSE EXPERIMENTAL EM RATAS**

São Luís
2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

João Nogueira Neto

**ANÁLISE MACROSCÓPICA E HISTOLÓGICA DO EFEITO DA
SINVASTATINA NA ENDOMETRIOSE EXPERIMENTAL EM RATAS**

Dissertação apresentada ao curso de
Mestrado em Ciências da Saúde, da
Universidade Federal do Maranhão,
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências da Saúde.

Orientadora:
Prof. Dr. Orlando Jorge Martins Torres

São Luis
2007

Nogueira Neto, João

Avaliação macroscópica e histológica do efeito da sinvastatina na endometriose experimental em ratas [manuscrito] / João Nogueira Neto. – 2007.

Vii, 30 f; il.

Orientador(a): Prof. Dr. Orlando Jorge Martins Torres.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal do Maranhão, 2007. Dissertação orientada pela Prof. Dr Orlando Jorge Martins Torres.

1. Endometriose experimental – Uso da sinvastatina. 2 Ratas I. Martins, Orlando Jorge. II. Título

CDU 618.145 (047.31)

JOÃO NOGUEIRA NETO

Análise macroscópica e histológica do efeito da sinvastatina na endometriose experimental em ratas.

A comissão Julgadora dos trabalhos de defesa da dissertação de mestrado, em sessão pública realizada em 02/ 02/ 2007, considera o candidato aprovado.

Presidente: Prof. Dr. Orlando Jorge Martins Torres
(Orientador)

1º Examinador: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos

2º Examinador: Prof. Dr. Antônio Carlos Romão Borges

3º Examinador : Prof^a. Dr^a. Luciane Maria Oliveira Brito

Dedico este trabalho a Deus, pelo dom da vida;
Aos meus pais José João Nogueira e Reginalda da
Silva Nogueira, pelo amor e esforço ilimitado dado a
educação de seus filhos;
A Lyvia , minha esposa e amada companheira da
vida;
Aos meus irmãos, Célia, Júnior, Silva, Silvana e
Simone pela amizade, carinho e apoio;
Ao João Gabriel, meu filho e minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha saúde, paz e disposição para lutar.

Ao professor Dr. Orlando Jorge Martins Torres, pela orientação, estímulo, dedicação, respeito e grande formador de mestres.

A professora Dr^a. Marilene Oliveira da Rocha Borges, pela organização, apoio e incentivo no Mestrado em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão .

Ao Prof. Dr. Tarcísio Mota Coelho, sempre a disposição em momentos de dúvidas e dificuldades.

A colega patologista Dr^a. Ana Giselia Portela de Araújo Cortes do Departamento de Patologia da Universidade Federal do Maranhão, por sua colaboração e paciência.

Ao Prof. Dr. Eduardo Schor da Escola Paulista de Medicina, por sua colaboração e interesse na busca de novos tratamentos da endometriose.

Aos membros da Liga Acadêmica de Cirurgia Experimental da Universidade Federal do Maranhão, onde a sua existência foi parte indispensável para realização do nosso trabalho, agradeço em especial aos acadêmicos: Joel Nunes Nogueira e Gabriel Lacerda.

A todos os funcionários, professores e colegas do Mestrado em Ciências da Saúde, em especial aos colegas de pós-graduação: Waston Gonçalves Ribeiro, Elizabeth Texeira Nogueira Servin, Aluísio do Rego Melo Filho e ao Prof. José Magno Fonseca.

Ao Prof. Jader Cavalcante pela revisão gramatical da língua portuguesa; Francisco Queiroz pela revisão gramatical da língua inglesa; Dr^a. Prof^a. Alcione

Miranda dos Santos pela orientação na análise estatística e ao profissionalismo de Carlos Palhano pelo apoio na área de informática.

Ao casal, Ezon Vinícius Pinto Ferraz e Izabela Carvalho Ferreira Ferraz, por sua amizade fraterna.

Aos colegas de plantão da Maternidade Marly Sarney, e dos Serviços e Diretoria do Hospital São Domingos, pelo apoio, paciência e companheirismo incondicional.

A todos que de forma direta ou indiretamente colaboraram para realização deste trabalho.

Por fim, agradeço a minha esposa Lyvia Maria Rodrigues de Sousa Gomes e ao meu filho João Gabriel Rodrigues Gomes Nogueira, pela paciência nos momentos de ausência física, porém que estiveram em todos os momentos deste trabalho no meu coração.

"A inteligência irmanada com a força de vontade e com a esperança produz uma idéia."

Clóvis Bevilácqua

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUÇÃO.....	3
MÉTODOS.....	6
RESULTADOS.....	9
DISCUSSÃO.....	10
REFERÊNCIAS.....	14
ANEXO 1.....	23
ANEXO 2	26

RESUMO

Objetivo: analisar alterações macroscópicas e histológicas que ocorrem com o uso da sinvastatina em endometriose experimental em ratas. Métodos: quarenta ratas da linhagem Wistar foram submetidas à técnica de autotransplante uterino em mesentério. Após três semanas, vinte e quatro ratas desenvolveram endometriose experimental grau III e foram divididas em dois grupos: sinvastatina (dado 20 mg/Kg/dia/via oral) e controle (dado cloreto de sódio a 0,9% na quantidade de 1 mL/100 g de peso corpóreo via oral), que receberam gavagem durante 14 dias seguido de morte. Os volumes dos implantes foram calculados $[4\pi \text{ (comprimento/2) } \times \text{ (largura/2) } \times \text{ (altura/2) } / 3]$ nas intervenções cirúrgicas e após a morte dos animais. Os autotransplantes foram retirados, corados com a hematoxilina-eosina e analisados à microscopia de luz. Foram usados o teste de Mann-Whitney para amostras independentes e o teste de Wilcoxon para amostras relacionadas. Para avaliação histológica, foi usado o teste Exato de Fisher, adotando-se um nível de significância de 5%. Resultados: a diferença entre os volumes médios iniciais dos autotransplantes nos dois grupos foi insignificante ($p=1,00$), e, entre os volumes médios finais, significativa ($p=0,04$). Houve um aumento significativo ($p=0,01$) entre os volumes médios iniciais e finais do grupo controle e uma redução insignificante no grupo sinvastatina ($p=0,95$). Histologicamente ($p=0,64$) o grupo sinvastatina ($n=9$) mostrou a parede epitelial moderadamente preservada em sete casos (77,80%) e dois casos com camada epitelial bem preservada (22,2%) e o grupo controle ($n=12$) com sete casos (58,30%) moderadamente preservado e cinco casos (41,70%) bem preservado. Conclusão: a sinvastatina impediu o crescimento dos focos de endometriose experimental. São promissores os estudos com uso da sinvastatina por período mais prolongado.

Palavras-chave: Sinvastatina; Endometriose experimental; Ratas.

ABSTRACT

Objective: to analyse macroscopic and histologic changes occurring with the use of simvastatin in experimental endometriosis in rats. Method: forty Wistar female rats underwent uterine self-transplantation in mesenterium; after three weeks, twenty-four rats developed experimental endometriosis level III and were divided into two groups: simvastatin (applied 20 mg/Kg/day/orally) e control (applied sodium chloride at 0,9%/mL/100g of body weight orally), was orally administered every day until 14 days, death following. The implant volumes were calculated $[4\pi \text{ (length/2) x (width/2) x (height/2) / 3}]$ during the surgical procedures after the animals' death. The self-transplantation were removed, blushed with hematoxilin-eosine and analysed at light microscopy. The Mann-Whitney test was used for independent samples, while Wilcoxon test was used for related samples; for histological evaluation, Fisher exact test was used, when a 5% significance level was adopted. Results: the difference among the initial volumes of the groups' self-transplantation was insignificant ($p=1,00$), and, among the final volumes, significant ($p=0,40$). There was a significant increase ($p=0,01$) of the volumes in the control group, and reduction in the simvastatin group ($p=0,95$). Histologically, the simvastatin group presented a greater engagement of epithelial cells of the self-transplantations ($p=0,64$). Conclusion: simvastatin kept experimental endometriosis focus from growing. We find very promising the studies utilizing simvastatin for a longer period and a deeper analysis of the action mechanism of that drug in the phisiopatology of experimental endometrioses.

KEYWORDS: Simvastatin, Experimental Endometriosis, Rats.

Introdução

A endometriose é uma doença caracterizada pela presença de tecido estrutural e funcionalmente semelhante ao tecido endometrial fora da cavidade uterina. O tratamento pode ser clínico e ou cirúrgico, cuja terapêutica medicamentosa são preferencialmente aquelas que interferem no ciclo menstrual induzindo pseudogravidez, pseudomenopausa ou anovulação crônica, proporcionando melhora clínica, porém seus efeitos não são curativos, o que justifica a busca de novos tratamentos¹.

As pesquisas experimentais sobre endometriose ganharam grande impulso após estudos experimentais que descreveram a técnica cirúrgica do autotransplante de tecido uterino em ratas para desenvolver endometriose experimental peritoneal². Desde então, várias drogas objetivando o tratamento da endometriose foram testadas naquele modelo^{3,4}.

Em estudo sobre o efeito individual e combinado da triptorelina e gestrinona em endometriose experimental em ratas, os autores apresentaram uma classificação macroscópica dos autotransplantes, baseada fundamentalmente na formação cística do autotransplante. Essa classificação macroscópica tornou-se um parâmetro para avaliar o sucesso ou não de tratamentos com medicamentos experimentais⁵.

A classificação histológica da endometriose experimental mais usada, apesar de subjetiva, objetiva avaliar de forma semiquantitativa a persistência de células epiteliais dos autotransplantes pós-tratamento experimental, em que as camadas podem estar ausente, pobre, moderada ou bem-preservada⁶.

As estatinas representam uma classe de drogas que efetivamente podem baixar os níveis séricos de colesterol, sendo largamente usadas no tratamento de hipercolesterolemia, através da inibição competitiva da 3-hidroxi-3-metilglutaril

coenzima A (HMG- CoA) redutase, enzima da via de síntese do colesterol no fígado e outros tecidos⁷. Estudos experimentais mostram que essas drogas diminuem efetivamente processos inflamatórios^{8,9}, têm efeito inibitório na multiplicação celular¹⁰, modulam negativamente a proliferação endometrial e a angiogênese¹¹. A presença de fatores de angiogênese é observada em maior quantidade na pelve de mulheres com endometriose¹².

O estresse oxidativo contribui na etiopatogenia da endometriose¹³, uma vez que as mulheres com endometriose apresentam níveis elevados de auto-anticorpos marcadores do estresse oxidativo¹⁴. As estatinas possuem atividade antioxidante intrínseca, sendo a sinvastatina citada como a mais efetiva¹⁵.

Diante desses aspectos, objetivou-se analisar, sob aspectos macroscópicos e histológicos, a repercussão do emprego da sinvastatina via oral sobre endometriose experimental induzida através de autotransplantes em ratas.

Métodos

Este estudo foi experimental, realizado durante o período compreendido entre junho e setembro de 2006, com amostra de 40 ratas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), adultas, fêmeas, virgens, pesando entre 180 e 250 gramas, com 60 dias de vida, cedidas pela central do Biotério da Universidade Federal do Maranhão (UFMA).

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Cirurgia Experimental do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão. Foram respeitadas a legislação brasileira para o uso de animais de experimentação (Lei Federal nº 6.638/1979) e as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), instituição filiada ao *International Council for Laboratory Animal Science*. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEEA-UEMA), protocolo 05/2006.

Os animais foram agrupados em número de cinco por gaiola de polipropileno com tampa de grade metálica inoxidável, medindo 46 cm x 31 cm x 16 cm com fundo forrado com papel, que era trocado a cada 48 horas. Os animais foram divididos em oito grupos mantidos em condições ambientais constantes, recebendo ração para ratos (Purina®, São Paulo, Brasil) e água *ad libitum* durante sete dias de adaptação, com controle de ruídos, temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa 40% a 60%, ciclos claro/escuro de 12/12 horas. Paralelamente foram realizadas coleta e análise de esfregaço vaginal diariamente. Somente aquelas ratas que apresentaram quatro ou mais ciclos estrais a cada cinco dias foram incluídas no estudo¹⁶.

Após jejum de 12 horas, os animais foram pesados com balança eletrônica (Marte®, modelo A500, 110–200, Indústria Brasileira) e anestesiados com uma mistura

de xilazina 2% e ketamina 5% na proporção de 1:1, na dose de 0,2 mL para cada 100g de peso via intramuscular, com agulha hipodérmica de 13 mm x 4,5 mm (Becton Dickinson, Paraná, Brasil), na borda posterior da coxa esquerda¹⁷. Os animais foram considerados anestesiados na ausência de reflexos corneanos e interdigitais. Foi realizada a epilação manual da região abdominal caudal do animal com área de 5 cm x 4 cm, anti-sepsia com Polivinil-pirrolidona-iodo (Povidine Tópico®, São Paulo – SP) e colocação de campo fenestrado. Nesta fase não foi avaliado o ciclo estral.

Uma incisão mediana de 3 cm foi realizada com bisturi de lâmina nº 15, acometendo pele, plano músculo-aponeurótico e peritônio, seguido de identificação dos órgãos intracavitários e exposição do útero, anexos e mesentério. O procedimento cirúrgico seguiu com identificação, apreensão, ligadura e secção do terço médio do corno uterino esquerdo usando fio de náilon 6-0 (Mononylon®, Ethicon, São Paulo, Brasil) com três pontos simples e hemostasia. Concomitantemente, foi realizado fatiamento da peça extraída do útero em cortes longitudinais, seguido de cortes transversais, formando retalhos com medidas de 4 mm x 4 mm, em meio líquido com Ringer Lactato®, onde foi transpassado ponto com fio náilon 6-0 na região central da superfície serosa do retalho e mantido reparado.

O retalho foi autotransplantado para o mesentério, próximo ao vaso que irriga o *cecum*, mantendo-se a superfície serosa em contato com o mesentério e a superfície endometrial voltada para a luz da cavidade peritoneal. A fixação foi confeccionada com um ponto simples do retalho reparado acima. A cavidade peritoneal ficou coberta com gaze embebida com cloreto de sódio a 9% durante todo o procedimento (Figura 1).

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

animais permaneceram no laboratório por um período de 21 dias. Após esse período, as ratas foram reoperadas; realizou-se o inventário da cavidade peritoneal com identificação e medida do foco de autotransplante com paquímetro digital, seguido do cálculo do volume $[4\pi (\text{comprimento}/2) \times (\text{largura}/2) \times (\text{altura}/2)/3]^{18}$. Foi usado o Sistema de Classificação dos Implantes em Grau de Crescimento de acordo com Quereda et al.⁵, e somente aquelas que desenvolveram grau de crescimento 3, ou seja, com diâmetro $\geq 4,5$ mm, seguiram no estudo (Figura 2).

Após o procedimento cirúrgico, as ratas classificadas em grau 3 foram identificadas e divididas em dois grupos de doze ratas, distribuídas aleatoriamente. O grupo controle (GC) recebeu gavagem com solução de cloreto de sódio a 0,9% na quantidade de 1 mL/100g de peso corpóreo do animal, e o grupo sinvastatina (GS) recebeu gavagem com 20 mg/kg de peso corpóreo de sinvastatina (Galena, São Paulo, Brasil). Os dois grupos receberam gavagem uma vez ao dia em torno das 19h, com pesagem diária das ratas para correção da dose, por um período de 14 dias.

Os animais de cada grupo GC e GS foram mortos no 14º dia após o início das gavagens. Os animais foram pesados e colocados em vaporizador de éter até a morte, caracterizada por parada respiratória e ausência completa de reflexos¹⁹. A seguir, toda a área ventral abdominal foi epilada, seguido da realização de duas incisões transversais: acima, margeando o rebordo costal; e abaixo, margeando os ossos pélvicos, seguindo com uma terceira incisão longitudinal lateral esquerda, unindo as incisões transversais, expondo completamente a cavidade peritoneal.

Realizou-se o inventário da cavidade peritoneal e anotaram-se as medidas do volume do autotransplante, seguido de sua excisão. A peça retirada foi limpa com cloreto de sódio a 0,9% e acondicionada em recipiente contendo formol tamponado a 10%, recebendo identificação. A avaliação histológica foi realizada no Serviço de

Anatomia Patológica do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão. As lâminas foram coradas pela Hematoxilina-Eosina (HE). A análise histológica foi realizada por uma única patologista, que levou em consideração a persistência de células epiteliais dos autotransplantes semiquantitativamente e classificou em grau três a parede bem-preserveda; grau dois, a parede epitelial moderadamente preservada, com infiltração de leucócitos; grau um, a parede epitelial pobremente preservada, com uma célula epitelial ocasional; e grau zero, sem camada epitelial⁶.

A análise estatística utilizou o programa Biostat 3.0 em Windows XP, em que o nível de significância (α) utilizado para se rejeitar a hipótese de nulidade foi de 5% ($p < 0,05$). Aplicado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, os dados não apresentaram uma distribuição normal; sendo assim, foi usado o teste de Mann-Whitney para amostras independentes e o teste de Wilcoxon para amostras relacionadas. Para comparação dos achados histológicos, foi usado o teste Exato de Fisher.

Resultados

Houve três óbitos de ratas no grupo sinvastatina por bronco-aspiração, restando uma amostra experimental de nove ratas. As médias dos volumes em mm³ do grupo controle iniciais e do grupo sinvastatina inicial foram respectivamente 38,1 mm³ e 48,9 mm³ (p=1,00). Após o período de duas semanas, com administração da sinvastatina e cloreto de sódio, as médias volumétricas finais foram respectivamente 75,7 mm³ e 45,3 mm³ com diferença significativa (p=0,04) (Tabela 1).

A comparação das médias volumétricas em mm³ do grupo controle inicial, e após duas semanas de gavagem com solução fisiológica, mostrou 45,3 mm³ e 75,7 mm³, respectivamente (p=0,01). No grupo sinvastatina, a média volumétrica inicial foi de 48,9 mm³ e final de 45,3 mm³, mostrando uma média volumétrica semelhante (p=0,95), portanto no grupo tratado o volume dos implantes ficou estável enquanto no grupo controle houve aumento significativo (Tabela 1)

Na avaliação histológica, quanto à preservação da camada epitelial (p=0,64), em todas as amostras, houve preservação da camada epitelial, no total de nove ratas do grupo sinvastatina (n=9) houve sete casos (77,80%) com a camada moderadamente preservada e dois casos (22,20%) com a camada epitelial bem preservada. O grupo controle (n=12) apresentou sete casos (58,30%) com a camada moderadamente preservada, e cinco casos (41,70%) com a camada epitelial bem-preservada. As camadas bem-preservadas (Figura 3) apresentaram a célula epitelial com citoplasma bem-desenvolvido e as camadas moderadamente preservadas mostraram uma célula com citoplasma bastante reduzido (Figura 4).

Discussão

A endometriose é uma doença cuja terapia ideal ainda está por vir. As drogas mais usadas atualmente, que são os progestagênios, danazol, anticoncepcionais orais e análogos de GnRH, têm resultados benéficos nos episódios de dores, mas interferem na fertilidade, e a interrupção do uso são sucedidas de recorrência da endometriose²⁰.

Várias drogas vêm sendo pesquisadas em estudos experimentais como opção terapêutica da endometriose. As alternativas para supressão estrogênica são inibidores de aromatase e moduladores seletivos de receptores estrogênicos (SERM). Outros são os imunomoduladores, agentes antiinflamatórios²¹ e a vacina de BCG²², porém o uso de estatinas é pouco citado na literatura^{11,24,25,26}. Paralelamente, a procura por drogas que possuem efeitos contrários ao desenvolvimento da endometriose nos permitiu chegar até as estatinas, por possuírem efeitos antiinflamatórios, principalmente pela interferência na produção de citocinas pró-inflamatórias²³, efeitos inibitórios na multiplicação celular¹⁰ e modulação negativa na proliferação celular e na angiogênese¹¹. Estudo constatou que ativadores de angiogênese são mais comuns em fluido peritoneal de mulheres com endometriose que em grupo controle¹², e por fim que o efeito antioxidante das estatinas, dando destaque à sinvastatina, deu suporte para se acreditar que poderiam ser pesquisadas como possíveis drogas úteis no combate à endometriose¹³.

O autotransplante da endometriose experimental permitiu o uso experimental de várias drogas no combate à endometriose². Exemplo marcante é o estudo¹⁸ que analisou o efeito do inibidor de aromatase YM511 em endometriose experimental de ratas e observou no grupo controle um aumento do volume médio de

33,0 mm³ para 41,0 mm³. Comparando com o nosso estudo, observamos um aumento do volume médio do grupo controle inicial de 38,1 mm³ para 75,7 mm³ no final, mostrando um maior crescimento em nossa amostra, além do menor tempo de observação: 14 dias, contra 21 daquele estudo. Os grupos experimentais deste autor usaram YM511 nas doses de 0,04; 0,2 e 1 mg/Kg e apresentaram uma redução volumétrica dos autotransplantes significativa quando comparados com o grupo controle e ao grupo que foi submetido a ooforectomia bilateralmente do mesmo estudo. No nosso estudo, não tivemos o grupo de ooforectomia, nem várias doses, apenas uma dose de 20 mg/Kg/dia de sinvastatina no grupo experimental, o que, na comparação dos volumes finais entre os grupos controle e experimental, mostrou uma redução volumétrica significativa, e, na comparação dos volumes inicial e final do grupo experimental, não houve uma evolução da endometriose experimental.

A dose de 20mg/Kg/dia utilizada em nossa pesquisa foi baseada em estudo que constatou uma atenuação de lesões isquêmicas cerebrais por hipóxia em ratos recém-nascidos, através das reduções de resposta inflamatória, ativação de caspase-3 e da morte celular por apoptose⁹. Esses autores fizeram uso da mesma posologia de sinvastatina a 20 mg/Kg por via subcutânea por período de duas semanas. A escolha da via oral por gavagem em nossa pesquisa foi devido a ser essa via mais comumente utilizada para o uso das estatinas na prática diária.

O uso de estatina como um potencial agente terapêutico no tratamento da endometriose é sugerido em estudo que avaliou o efeito dessa droga na interleucina-8 (IL-8) em células e estroma endometrial de mulheres com patologia benigna *in vitro*, em que foram utilizadas mevastatina e sinvastatina nas doses de 3µM, 10µM e 30µM, após uma exposição de 24h. Ambas as drogas apresentaram uma redução significativa da IL-8 na dosagem de 30µM²⁵. O efeito da inibição do crescimento das células e estroma

endometrial exposto à mevastatina e sinvastatina seriam devido à inibição da síntese de DNA²⁴.

O uso de atorvastatina em modelo experimental de endometriose foi avaliado em quatro grupos: grupo I (baixa dose de atorvastatina, oito ratas) foi dado 0,5 mg/Kg/dia via oral; grupo II (alta dose de atorvastatina, 10 ratas) foi dado 2,5 mg/Kg/dia via oral; grupo III (acetato de leuprolide, nove ratas) foi dado 1 mg/Kg/subcutânea e grupo IV (grupo controle sem medicação), sendo avaliado o nível peritoneal de Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), macroscopia e histologia após o período de 21 dias. A regressão do nível do VEGF e dos implantes foram significantes nos grupo II e III²⁶. Em nosso estudo, usamos apenas uma dose (sinvastatina, 20 mg/kg/dia via oral) pelo período de 14 dias com uma redução de 48,98 mm³ para 45,98 mm³, contra 41,2 mm² para 13,1 mm² do grupo II e de 43,0 mm² para 50,5 mm³ no grupo I, e no grupo controle não significante contrastando com nosso estudo, que foi significante, apesar da forma de medição do volume diferente, essa comparação sugere a necessidade de um maior período de exposição, outras dosagens e controle sem medicação.

Histologicamente, a atrofia da camada epitelial poderia acontecer devido à maior pressão intravesical, porém a menor média volumétrica do grupo experimental e menor quantidade proporcional de epitélio bem-preservedo afastaram essa hipótese. O maior comprometimento epitelial, apesar de insignificante, e a maior redução volumétrica média do grupo experimental abrem caminho para a suposição de que a sinvastatina deva ser mais investigada como uma possível opção ao tratamento da endometriose.

O uso dos imuno-moduladores loxoribina e levamisole foram analisados em endometriose experimental de ratas, devido a evidências que comprovam fatores imunológicos envolvidos na fisiopatologia e etiologia da endometriose¹¹. Esse estudo

mostrou na avaliação histológica, quanto à preservação da camada epitelial, uma diferença significativa entre a loxoribina e o grupo controle; também houve diferença significativa entre loxoribina e levamisola e não significativa entre o grupo controle e a levamisola⁶. Na avaliação histológica, após a exposição com atorvastatina, houve um maior comprometimento da camada epitelial nos grupos com alta dose de atorvastatina (2,5 mg/kg/dia) e acetato de leuprolide²⁶. Nosso estudo mostrou, na sua análise histológica, um maior comprometimento da camada epitelial insignificante no grupo sinvastatina, sugerindo a necessidade de um período de maior exposição à sinvastatina.

Como conclusão, os dados mostram uma manutenção dos volumes médios iniciais e finais dos autotransplantes do grupo sinvastatina. O grupo controle apresentou um aumento volumétrico de forma significativa. A comparação dos volumes médios finais dos dois grupos mostra uma diferença significativa, apontando que a sinvastatina interferiu no desenvolvimento da endometriose experimental e traz a necessidade de exposição dos autotransplantes à sinvastatina por período mais prolongado e análise mais profunda para identificar o mecanismo de ação dessa droga na fisiopatologia da endometriose experimental.

Referências

1. Oliver DL, Pritts AE. Treatment of endometriosis. *N Engl J Med.* 2001;345(4): 266-75.
2. Vernon MW, Wilson E. A. Studies on the surgical induction of endometriosis in the rat. *Fertil Steril.* 1985;44(5): 684-93.
3. Fortin M, Lépine M, Pagé M, Osteen K, Massie B, Hugo PE, Steff A. An improved mouse model for endometriosis allows noninvasive assessment of lesion implantation and development. *Fertil Steril.* 2003;80(suppl. 2): 248-32.
4. Beliard NA, Goffin F, Frankenne FE, Foidart JM. Role of endocrine status and cell type in adhesion of human endometrial cells to the peritoneum in nude mice. *Fertil Steril.* 2002;78(5):973-78.
5. Quereda F, Barroso J, Acien P. Individual and combined effects of triptoreline and gestrinone on experimental endometriosis in rat. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1996;67: 35-40.
6. Keenan JA, William-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.
7. Weitz-Schmidt G. Statins as anti-inflammatory agents. *Farmacol Scien.* 2002; 23(10): 482-86.

8. Barsante MM, Roffê E, Yokoro CM, Tafuri WL, Souza GS, Pinho V, Castro MSDA, Texeira, MM. Anti-inflammatory and analgesic effects of atorvastatin in a rat model of adjuvant-induced arthritis. *Eur J Pharmacol.* 2005;516: 282-89.
9. Carloni S, Mazzoni E, Cimino M, De Simoni MG, Perego C, Scopa C, Balduini W. Simvastatin reduces caspase-3 activation and inflammatory markers induced by hypoxia-ischemia in the newborn rat. *Neurol Dis.* 2006; 21(1): 119-26.
10. Corsini A, Raiteri M, Soma MR, Bernini F, Fumagali R, Paoletti R. Pathogenesis of atherosclerosis and the role of 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzima A reductase inhibitors. *Am J Cardiol.* 1995;76:21A-28A.
11. Estefandiari N, Ai J, Khazaei M, Javed M, Gotlieb L, Casper RF. Effect of a statin on an *in vitro* model of endometriosis. *Fertil Steril.* 2005;84(suppl.1): S123.
12. Taylor RN, Lebovic DI, Mueller MD. Angiogenic factors in endometriosis. *Ann N Y Acad Sci.* 2002; 955:89-100.
13. Van Langendonck A, Casanas-Roux F, Donnez J. Oxidative stress and peritoneal endometriosis. *Fertil Steril.* 2002; 77(5): 861-70.
14. Shanti A, Santanam N, Morales AJ, Parthasarathy S, Murphy AA. Autoantibodies to markers of oxidative stress are elevated in women with endometriosis. *Fertil Steril.* 1999; 71(6): 1115-18
15. Franzoni F, Quinones-Galvan A, Regoli F, Ferrannini E, Galetta F. A comparative study of the *in vitro* antioxidant activity of statin. *Int J Cardiol.* 2003;90(2-3): 317-21.

16. Marcondes FK, Bianchi FJE, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol.* 2002;62 (4A): 609-14.
17. Braz F, Rahal SC, Rocha NS, Taga E, Biasi F. Emprego de matriz óssea orgânica bovina e hidroxiapatita no reparo de defeito induzido em crânio de ratas. *Act Cir Bras.* 2003;18(1):15-19.
18. Kudon M, Susuki Y, Ideyama Y, Nanya T, Mori M, Shikama H. Inhibitory effects of a novel aromatase inhibitor, YM511, on growth of endometrial explants and insulin-like growth factor –I gene expression in rats with experimental endometriosis. *J Steroid Biochem Molec Biol.* 1997; 63(1-3): 75-80.
19. Brito MVH, Brito NMB, Almeida AJB, Santos MRLC. Vaporizador artesanal de éter para cirurgia experimental em pequenos roedores. *Act Cir Bras.* 1998,13(1):3-7.
20. Dogan E, Saygili U, Posaci C, Tuna B.; Regression of endometrial explants in rats treated with the cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib. *Fertil Steril.* 2004;82(3):1115-20.
21. Vignali M, Infantino M, Matrone R, Chiodo I, Somigliana E, Busacca M, Vignano P. Endometriosis: novel etiopathogenetic concepts and clinical perspectives. *Fertil Esteril.* 2002; 8(4): 665-78.
22. Gul A, Yasar T, Ugras S. BCG vaccination to prevent implantation of endometriosis: an experimental study in rats. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2001; 98:209-12.

23. Kwak BR, Mulhaupt F, Mach F. Atherosclerosis: anti-inflammatory and immunomodulatory activities of statins. *Autoimmunity reviews*. 2003, 2:332-38.
24. Piotrowski PC, Kwintkiewicz J, Rzepczynska IJ, Seval Y, Cakmak H, Arici A, et al. Statin inhibit growth of human endometrial stromal cell independently of cholesterol availability. *Biol Reprod*. 2006, 75:107-111.
25. Seval Y, Luk J, Kwintkiewicz J, Duleba AJ, Arici A. Statin down-regulate interleukin-8 expression in endometrial stromal cells in vitro. *Fertil Steril*. 2004, 82 (suppl 2):167-168.
26. 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): 1474-1480.

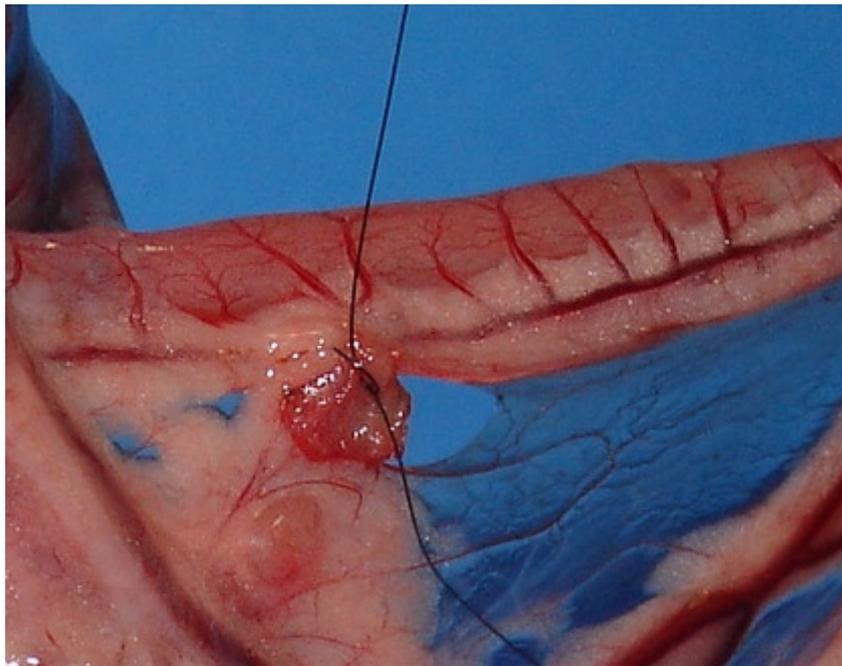


Figura 1 – Fotomicrografia mostrando retalho com medidas de 4 mm x 4 mm do corno uterino esquerdo com fio náilon 6-0 na superfície serosa após autotransplante em mesentério de rata Wister, deixando a superfície mucosa do retalho voltado para a luz da cavidade peritoneal.

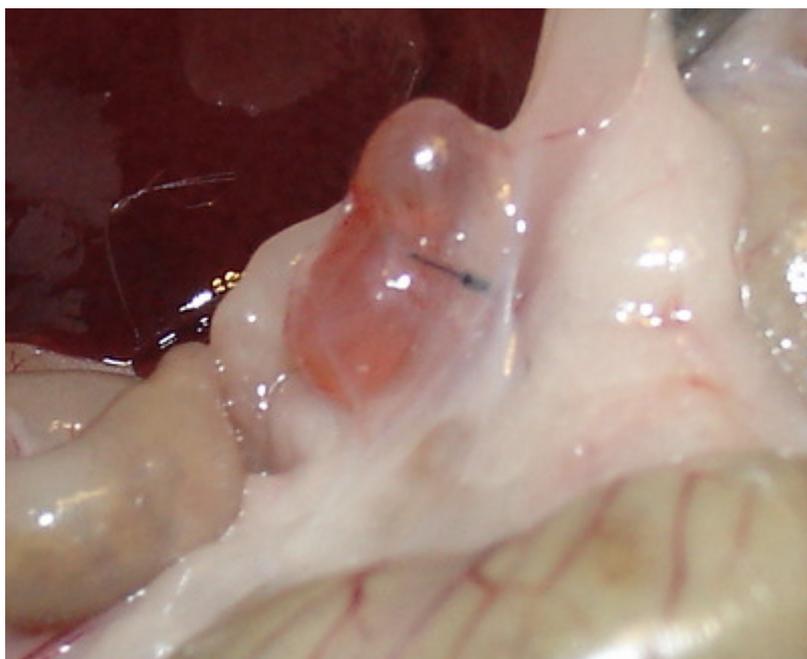


Figura 2 – Fotomicrografia mostrando autotransplante com maior diâmetro maior que 4,5 mm e classificado como grau III de Quereda et al⁵.

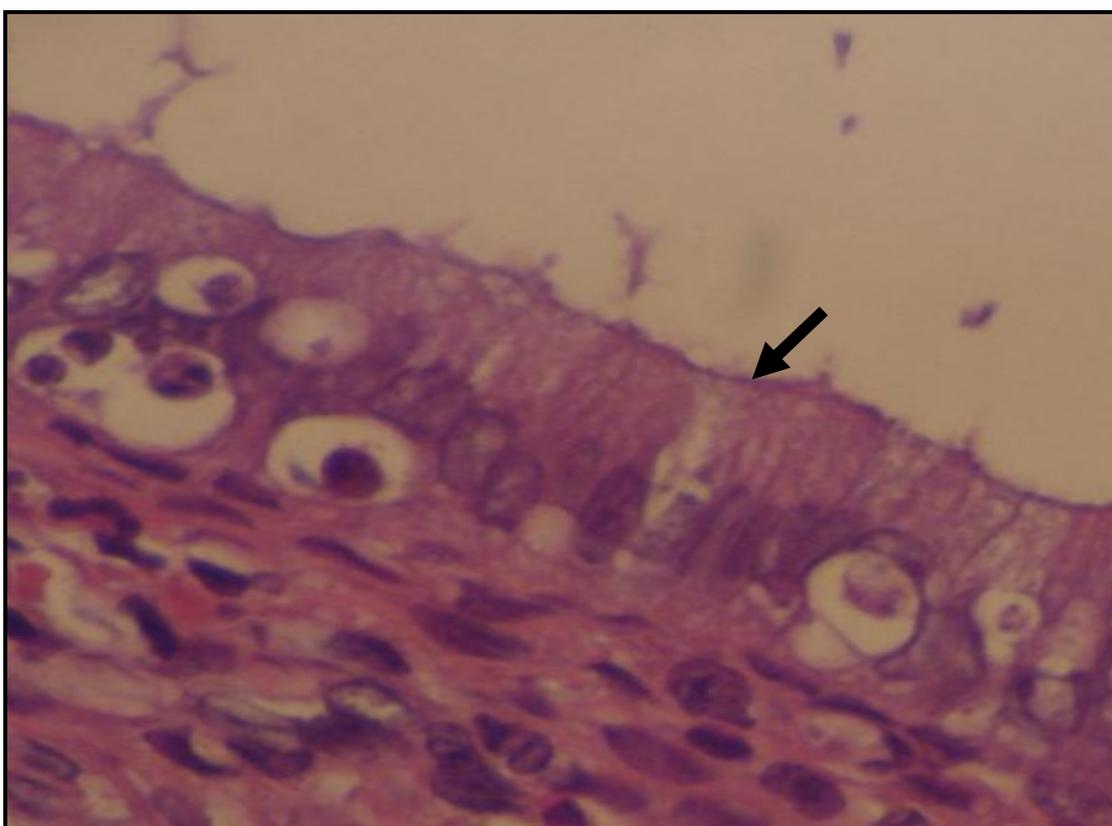


Figura 3 – Fotomicrografia de célula epitelial bem-preservada, com citoplasma (seta) bem-desenvolvido (X 40) do grupo de ratas tratadas com cloreto de sódio (1 mL/100g de peso corpóreo) via oral durante 14 dias.

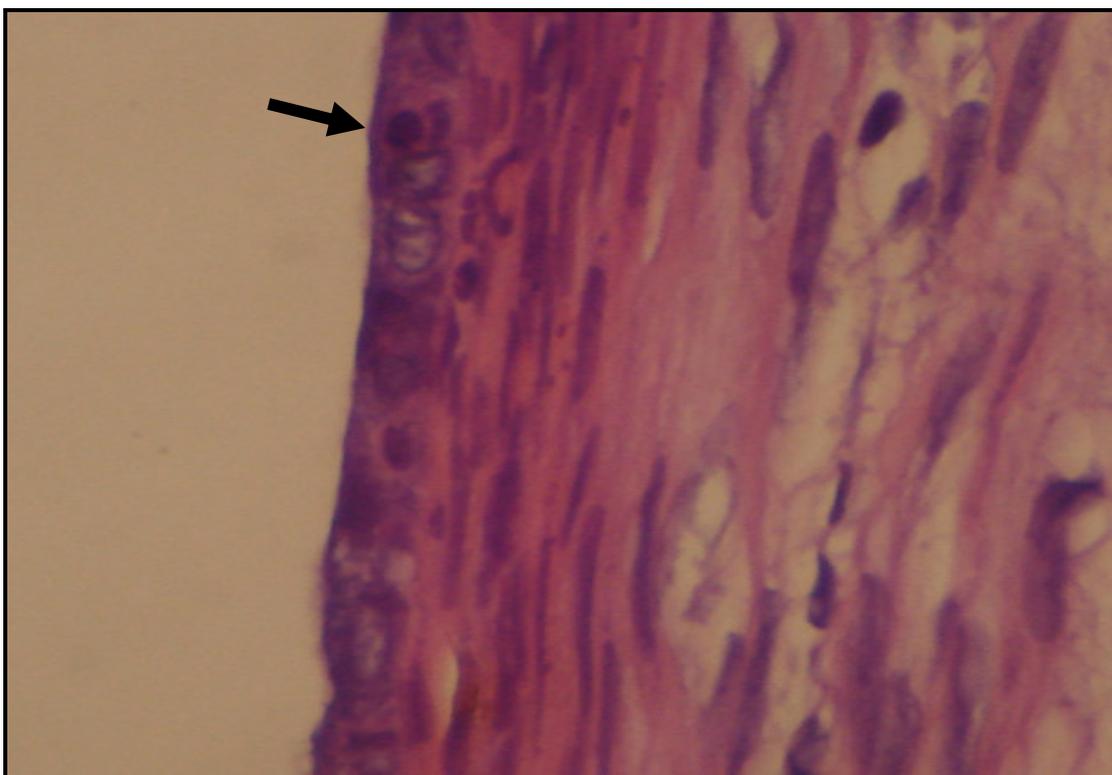


Figura 4 – Fotomicrografia de célula epitelial moderadamente preservada com citoplasma (seta) pouco desenvolvido (X 40), do grupo de ratas tratadas com sinvastatina (20 mg/Kg/dia) via oral durante 14 dias.

Tabela 1 – Característica e resultado de grupos de ratas tratadas com sinvastatina (20 mg/Kg/dia) e cloreto de sódio (1 mL/100g de peso corpóreo) via oral durante 14 dias, mostrando que no grupo tratado o volume dos implantes ficou estável enquanto no grupo controle houve aumento significativo.

Grupo	Média volume inicial	Média volume final	p*
Sinvastatina	48,98 mm ³	45,36 mm ³	0,95
Controle	38,10 mm ³	75,70 mm ³	0,01
p**	1,00	0,40	

p* Teste de Wilcoxon, para amostra relacionadas com $p < 0,05$ para rejeitar a hipótese de nulidade na comparação das médias dos volumes iniciais e finais dentro dos grupos sinvastatina e dentro do grupo controle.

p** Teste de Mann-Whitney para amostra independentes com $p < 0,05$ para rejeitar a hipótese de nulidade na comparação dos volumes médios iniciais entre os grupos sinvastatina e controle, e volumes médios finais entre esses grupos.

ANEXO 1

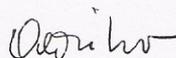
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
COMITÊ DE ÉTICA E EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

TÍTULO DO PROJETO:
AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA E MICROSCÓICA DA SINVASTATINA NA
ENDOMETRIOSE INDUZIDA EM RATAS WISTAR

Protocolo: P05/2006

PARECER DO CEEA

O projeto atende às exigências do CEEA/UEMA, em observância com os princípios éticos da Experimentação Animal elaborado pelo COBEA, satisfazendo desta forma as condições necessárias à sua execução.



Prof. Dr. Ana L. Abreu Silva
Mat. 9322

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO

Cidade Universitária PAULO VI - C.G.C. 06.352.421/0001-68 - FONE: 245 1500 - FAX:(098) 245 5882
 Criada nos Termos da Lei Nº 4.400 de 30.12.81 Vinculada à Gerência de Desenvolvimento Humano
 - Caixa Postal 09 - São Luís - Maranhão

N.º do Protocolo CEEA 05/06

11. Termo de Responsabilidade

Eu asseguro à CEEA/CMV/UEMA que:

11.1 Li os Princípios Éticos da Experimentação Animal elaborado pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e concordo plenamente com suas exigências durante a vigência deste protocolo;

11.2 Este estudo não é desnecessariamente duplicativo, tem mérito científico e que a equipe que participa deste projeto foi treinada e é competente para executar os procedimentos descritos nesse protocolo;

11.3 Comprometo-me a solicitar nova aprovação deste protocolo sempre que ocorra alteração significativa nos experimentos aqui descritos;

11.4 Tudo o que foi declarado nesse protocolo é a absoluta expressão da verdade. Estou ciente que o não cumprimento das condições aqui especificadas é de minha total responsabilidade (pesquisador principal) e que estarei sujeito às punições previstas na legislação em vigor.

Nome do executor:

Data: 21/08/2006

Assinatura

Nome do orientador:

Data: 21/08/2006

Assinatura

DECISÃO DA CEEA/CMV/UEMA

Projeto: Avaliação macroscópica e microscópica da ação da sinvastatina na endometriose induzida em ratas Wistars

Autor: João Nogueira Neto e Joel Nicolau Nogueira Nunes Júnior

Data da Reunião: 18/08/06 Protocolo: 05106

Aprovado () Aprovado com recomendação

() Com pendências () Reprovado

Arina

Presidente

Prof. Drª Ana L. Abreu Silva
Mat. 9322

ANEXO 2

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO E INSTRUÇÕES AOS AUTORES

A publicação da Revista é financiada com recursos da Federação das Associações de Ginecologia e Obstetria (FEBRASGO). É uma publicação especializada dirigida a obstetras, ginecologistas e profissionais de áreas afins. É aberta a contribuições nacionais e internacionais. O propósito da Revista é o de publicar contribuições originais submetidos à análise e que versem sobre temas relevantes no campo da ginecologia, da obstetria e áreas correlatas.

As Instruções para Autores da Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetria incorporam as normas contidas na última versão do "Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals" (Ann Intern Med 1997; 126:36-47). Consultar a versão completa do texto citado (www.icmje.org) para outras informações.

Todo o conteúdo da Revista está disponível em Português no site da FEBRASGO e do SciELO que são de livre acesso.

SEÇÕES DA REVISTA

A Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetria publica:

1. Artigos originais completos sejam prospectivos, experimentais ou retrospectivos. Manuscritos contendo resultados de pesquisa clínica ou experimental original terão prioridade para publicação.
2. Notas prévias de trabalhos em fase final de coleta de dados, mas cujos resultados sejam relevantes e que exijam urgência na sua publicação.
3. Relatos de casos de grande interesse e bem documentados do ponto de vista clínico e laboratorial.
4. Apresentação de inovações em diagnóstico, técnicas cirúrgicas e tratamentos, desde que não sejam, clara ou veladamente, propaganda de drogas ou outros produtos.
5. Resumos de Teses apresentadas e aprovadas nos últimos 12 meses, contadas da data do envio do Resumo.
6. Fascículos especiais com anais, coletâneas de trabalhos apresentados nos Congressos Brasileiros patrocinados pela FEBRASGO e Suplementos com trabalhos versando sobre tema de grande interesse.
7. Artigos de revisão, inclusive meta-análises e comentários editoriais, quando solicitados a membros do Conselho Editorial.
8. Cartas dos leitores versando sobre matéria editorial ou não. As cartas poderão ser resumidas pela editoria, mas com manutenção dos pontos principais. No caso de críticas a trabalhos publicados a carta será enviada aos autores para que sua resposta possa ser publicada simultaneamente.

INFORMAÇÕES GERAIS

1. Os trabalhos enviados para publicação não devem ter sido publicados ou enviados para análise, em outras revistas, no todo ou parcialmente.
2. O material publicado passa a ser propriedade da Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetria e da FEBRASGO, só podendo ser reproduzido, total ou parcialmente, com a anuência destas entidades.
3. A FEBRASGO não se obriga a devolver os originais enviados mesmo em caso de recusa.
4. A revista não aceitará material editorial com objetivos comerciais.
5. O autor será informado, por carta, do recebimento dos trabalhos e o seu número de protocolo na Revista. Os trabalhos que estiverem de acordo com as Instruções para Autores e se enquadrarem na política editorial da Revista, serão submetidos a análise por dois revisores indicados pelo Editor. Todo o processo de análise será feito de forma anônima. Dentro do prazo de 80 dias, os autores serão informados a respeito da aceitação e das modificações eventualmente sugeridas. Cópias dos pareceres dos revisores serão enviados aos autores. Os manuscritos aceitos e os aceitos condicionalmente serão enviados para os autores para que sejam efetuadas as modificações e para que os mesmos tomem conhecimento das alterações a serem introduzidas no processo de edição. Os autores deverão retornar o texto com as modificações solicitadas o mais rapidamente possível, devendo justificar na carta de encaminhamento, se for o caso, o motivo do não atendimento de sugestões. Não havendo retorno do trabalho após seis meses se considerará que os autores não têm mais interesse na publicação.
6. O número de autores de cada manuscrito fica limitado a sete. Trabalhos de autoria coletiva (institucionais) deverão ter os responsáveis especificados. Trabalhos do tipo colaborativo e estudos multicêntricos deverão ter como

autores os investigadores responsáveis pelos protocolos aplicados (no máximo cinco). Os demais colaboradores poderão ser citados na seção de agradecimentos ou como "Informações Adicionais sobre Autoria", no fim do artigo. O conceito de co-autoria é baseada na contribuição substancial de cada um seja para a concepção e planejamento do trabalho, análise e interpretação dos dados, ou para a redação ou revisão crítica do texto. A inclusão de nomes cuja contribuição não se enquadre nos critérios citados não é justificável. Todos os autores deverão aprovar a versão final a ser publicada.

7. Conflito de interesses: devem ser mencionadas as situações que poderiam influenciar de forma inadequada o desenvolvimento ou as conclusões do trabalho. Entre estas situações estão a participação societária nas empresas produtoras das drogas ou equipamentos citadas ou empregadas no trabalho, assim como em concorrentes. São também consideradas fontes de conflito os auxílios recebidos, as relações de subordinação no trabalho, consultorias, etc.
8. Para trabalhos originais, não ultrapassar 25 páginas de texto digitado. Limitar o número de Tabelas e Figuras ao necessário para apresentação dos resultados que serão discutidos (como norma geral, limitar a cinco). Para manuscritos do tipo Relato de Caso e Equipamentos e Técnicas, não ultrapassar quinze páginas, reduzindo também o número de figuras e/ou tabelas. As Notas Prévias deverão ser textos curtos com até 800 palavras, cinco referências e duas ilustrações (ver preparo do manuscrito - resultados).
9. Os originais em desacordo com essas instruções serão devolvidos aos autores para as adaptações necessárias, antes da avaliação pelo Conselho Editorial.
10. As cópias dos trabalhos devem vir acompanhadas de carta de encaminhamento assinada por todos os autores. Nesta, deve ficar explícita a concordância com as normas editoriais, com o processo de revisão e com a transferência de *copyright* para a FEBRASGO e RBGO.
11. Envie disquete devidamente identificado com o arquivo contendo texto, tabelas, gráficos e as legendas de outras figuras (fotos). Encaminhar também três cópias impressas do manuscrito. O envio por e-mail deve ser feito quando solicitado pela editoria para o trabalho completo ou partes do mesmo após a revisão.

Endereço:

Jurandyr Moreira de Andrade
Rua Doutor Diogo de Faria, 1087 - Conj. 1103/1105
04037-003 - São Paulo - SP

A versão final pode ser enviada diretamente para:

RBGO - Editoria
Av. Bandeirantes, 3900 - 8º andar - Campus Universitário
14049-900 - Ribeirão Preto - SP
Fone (016) 602-2803 - FAX (016) 633-0946

PREPARO DO MANUSCRITO

Os trabalhos devem ser digitados em espaço 2 em todas as seções, da página de rosto às Referências, Tabelas e legendas. Cada página deve conter aproximadamente 25 linhas em uma coluna. Usar preferencialmente o processador de texto Microsoft Word® e a fonte Times New Roman 12. Não dar destaque a trechos do texto: não sublinhar e não usar negrito. Numerar todas as páginas iniciando pela página de rosto. Não usar maiúsculas nos nomes próprios (a não ser a primeira letra) no texto ou nas referências bibliográficas. Não utilizar pontos nas siglas (DPP em vez de D.P.P.). Quando usar siglas, explicá-las na primeira vez que surgirem.

Para impressão, utilize folhas de papel branco, deixando espaço mínimo de 2,5 cm em cada margem. Inicie cada uma das seções em uma nova página: página de rosto; resumo e palavras ou expressões-chave; *abstract* e *key words*; texto; agradecimentos; referências bibliográficas; tabelas individuais e legendas das figuras não digitadas.

Página de rosto. Apresentar o título do trabalho em português e em inglês; nomes completos dos autores; nome da Instituição onde o trabalho foi desenvolvido ou e informações sobre auxílios recebidos sob forma de financiamento, equipamentos ou fornecimento de drogas. Indicar o nome, endereço, telefone, fax e e-mail do autor para o qual a correspondência deverá ser enviada.

Resumo do trabalho na segunda página. Para trabalhos completos, redigir um resumo estruturado que deverá ser dividido em seções identificadas: objetivos, métodos, resultados e conclusões. Deverá ter aproximadamente 250 palavras. O resumo deverá conter as informações relevantes, permitindo ao leitor ter uma ideia geral do trabalho. Deverá incluir descrição resumida dos métodos e da análise estatística efetuada. Expor os resultados numéricos mais relevantes não apenas indicação da significância estatística encontrada. As conclusões devem ser baseadas nos resultados do trabalho e não da literatura. Evitar o uso de abreviações e símbolos. Não citar referências bibliográficas no Resumo. O Resumo de Casos Clínicos não deve ser estruturado e será limitado a 100 palavras. Para Notas Prévias, não há necessidade do Resumo.

Na mesma página do Resumo citar pelo menos três palavras ou expressões-chave que serão empregadas para compor o índice anual da Revista. Podem ser empregados termos ou expressões conhecidas e relacionadas ao trabalho.

Em outra página deve ser impresso **Abstract** como versão fiel do texto do Resumo. Deve ser também acompanhado da versão para o inglês das palavras ou expressões-chave.

Os **Resumos de Teses** deverão conter aproximadamente 250 palavras e seguir as normas habituais quanto à forma e ao conteúdo, incluindo título em português e inglês e no mínimo três palavras ou expressões-chave. O resumo deve ser enviado em disquete com uma cópia impressa. Em arquivo separado, apresentar: nome completo do autor e do orientador; membros da banca; data de apresentação e a identificação do Serviço ou Departamento onde a Tese foi desenvolvida e apresentada.

Introdução: repetir no topo da primeira página da introdução o título completo em português e inglês. Nessa seção mostre a situação atual dos conhecimentos sobre o tópico em estudo, divergências e lacunas que possam eventualmente justificar o desenvolvimento do trabalho, mas sem revisão extensa da literatura. Para Relatos de Casos apresentar um resumo dos conhecimentos a respeito da condição relatada e uma justificativa para a apresentação como caso isolado. Exponha claramente os objetivos do trabalho.

Material e Métodos ou Pacientes e Métodos: iniciar esta seção indicando o planejamento do trabalho: se prospectivo ou retrospectivo; ensaio clínico ou experimental; se a distribuição dos casos foi aleatória ou não etc. Descrever os critérios para seleção das pacientes ou grupo experimental, inclusive dos controles. Identifique os equipamentos e reagentes empregados. Se a metodologia aplicada já tiver sido empregada anteriormente, dê as referências, além da descrição resumida do método. Descreva também os métodos estatísticos empregados e as comparações para as quais cada teste foi empregado. É imprescindível a menção à aprovação do projeto pela Comissão de Ética em Pesquisa da instituição onde o trabalho foi executado. Os trabalhos que apresentem como objetivo a avaliação da eficácia ou tolerabilidade de tratamento ou droga, deve necessariamente incluir grupo controle adequado. Para informações adicionais sobre o desenho de trabalhos deste tipo, consultar ICH Harmonized Tripartite Guideline – Choice of Control Group and Related Issues in Clinical Trials (http://www.hc-sc.gc.ca/hpb-dgpsa/tpd-dpt/e10_e.html).

Resultados: apresente os resultados em seqüência lógica, com texto, tabelas e figuras. Apresente os resultados relevantes para o objetivo do trabalho e que serão discutidos. Não repita no texto dessa seção todos os dados das Tabelas e Figuras, mas descreva e enfatize os mais importantes sem interpretação dos mesmos.

As tabelas deverão ser apresentadas separadamente do texto. Numerar com algarismos arábicos e acrescentar legenda explicativa do conteúdo. A legenda deverá conter informações que permitam ao leitor entender o conteúdo das tabelas e figuras, mesmo sem a leitura do texto do trabalho. As linhas horizontais devem ser simples e limitadas a duas no topo e uma no final da tabela. Não empregar linhas verticais. Não usar funções de criação de tabelas, comandos de justificação, tabulações decimais ou centralizadas. Utilizar comandos de tabulação (*tab*) e não o espaçador para separar as colunas e para nova linha, a tecla *enter*.

Não deverão ser enviadas originais de radiografias, registros em papel termosensível e outras formas de registro. Estes devem ser enviados sob forma de fotos de boa qualidade (três jogos) que permitam boa reprodução. O número de figuras fica limitado ao necessário para entendimento do texto. Todas as fotos devem ser identificadas no verso com o uso de etiqueta colante. Nos Relatos de Caso as seções Material e Métodos e Resultados serão substituídas pela descrição do caso, mantendo-se as demais.

Discussão: devem ser realizadas as informações novas e originais obtidas na investigação. Não repetir dados e informações já mencionadas nas seções Introdução e Resultados. Evitar citação de tabelas e figuras. Ressaltar a adequação dos métodos empregados na investigação. Compare e relacione as suas observações com as de outros autores, comentando e explicando as

diferenças que ocorrerem. Explique as implicações dos achados, suas limitações e faça as recomendações decorrentes. Para Relatos de Casos, basear a discussão em ampla e atualizada revisão da literatura. Eventualmente tabular informações coletadas da literatura para comparação.

Agradecimentos: dirigidos a pessoas que tenham colaborado intelectualmente, mas cuja contribuição não justifique co-autoria, ou para os que tenham dado apoio material.

Referências: todos os autores e trabalhos citados no texto devem constar dessa seção e vice-versa. Numere as referências por ordem de entrada no trabalho e use esses números para as citações no texto. Evite número excessivo de referências bibliográficas, selecionando as mais relevantes para cada afirmação, dando preferência para os trabalhos mais recentes. Não empregue citações de difícil acesso aos leitores da Revista, como resumos de trabalhos apresentados em congressos ou outras publicações de circulação restrita. Não empregue referências do tipo "observações não publicadas" e "comunicação pessoal". Artigos aceitos para publicação podem ser citados acompanhados da expressão: aceito e aguardando publicação, ou *in press* indicando-se o periódico. Para citações de outras publicações dos autores do trabalho, selecionar apenas os originais (não citar capítulos ou revisões) impressas em periódicos com revisão e relacionados ao tema em questão. O número de referências bibliográficas deverá ser limitado a 25. Para Notas Prévias, no máximo 10. Os autores são responsáveis pela exatidão dos dados constantes das referências bibliográficas. Abaixo são expostos alguns exemplos da forma de citação

Artigos em revistas:

You CH, Lee KY, Chey RY, Menguy R. Electrogastrographic study of patients with unexplained nausea, bloating and vomiting. *Gastroenterology* 1980; 79:311-4.

Bedone AJ, Monteiro IMU, Pedrotti MA. Hiperprolactinemia tumoral e não tumoral: análise de algumas características clínicas e laboratoriais. *Rev Bras Ginecol Obstet* 1994; 16:105-10.

Artigos com mais de 3 autores: Se o número de autores for maior que 6, citar os três primeiros acrescentando *et al.* Até 6 autores citar todos.

Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, et al. Epidemiologic evidence showing that human papilloma virus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1993; 71:236-40.

Capítulos de Livro:

Eisen HN. *Immunology: an introduction to molecular and cellular principles of the immune response* 1st ed. New York: Harper and Row; 1974. p.406.

Rodrigues Lima G. Neoplasias malignas do corpo uterino. In: Baruffi I, editor. *Tratado de Oncologia Tocoginecológica e Mamária*. 1^ª ed. São Paulo: Rocca; 1985. p.150-69.

Artigo de periódico ou citação de sites em formato eletrônico: apenas para informações estatísticas oficiais. Indicar a entidade responsável, o endereço eletrônico e o nome do arquivo ou entrada. Incluir data e hora do acesso no qual foram obtidas as informações citadas.

Antes de enviar o trabalho, confira se as Instruções para preparo do manuscrito foram seguidas e verifique o atendimento dos itens listados a seguir:

- 1) Carta de encaminhamento assinada por todos os autores;
- 2) Citação da aprovação do projeto do trabalho por Comissão de Ética em Pesquisa (na Seção Paciente e Métodos);
- 3) Conflito de Interesses: quando aplicável, foi mencionado, sem omissão de informações relevantes?
- 4) Página de rosto com todas as informações solicitadas;
- 5) Resumo e Abstract estruturados e compatíveis com o texto do trabalho;
- 6) Três ou mais Palavras chave relacionadas ao texto e respectivas *key words*;
- 7) Disquete contendo arquivo com o texto integral tabelas e gráficos e corretamente identificado;
- 8) Tabelas e Figuras: todas estão corretamente citadas no texto e numeradas. As legendas permitem o entendimento das Tabelas e das Figuras;
- 9) Fotos devidamente identificadas e anexadas à correspondência;
- 10) Referências: numeradas na ordem de aparecimento e corretamente digitadas. Todos os trabalhos citados estão na lista de Referências e todos os listados estão citados no texto.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)