



Universidade Federal do Rio de Janeiro

ESTUDO DO PROCESSO DE ANGIOGÊNESE NA ENDOMETRIOSE EXPERIMENTAL:  
PAPEL DO FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF) E DE  
INIBIDORES DE CICLOOXIGENASE-2 (COX-2)

Daniel Escorsim Machado

2009

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Instituto de Ciências Biomédicas

Doutorado em Ciências Morfológicas

ESTUDO DO PROCESSO DE ANGIOGÊNESE NA ENDOMETRIOSE EXPERIMENTAL:  
PAPEL DO FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF) E DE  
INIBIDORES DE CICLOOXIGENASE-2 (COX-2)

DANIEL ESCORSIM MACHADO  
Tese de Doutorado

Orientador: Luiz Eurico Nasciutti

Rio de Janeiro 2009

ESTUDO DO PROCESSO DE ANGIOGÊNESE NA ENDOMETRIOSE EXPERIMENTAL:  
PAPEL DO FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF) E DE  
INIBIDORES DE CICLOOXIGENASE-2 (COX-2)

Daniel Escorsim Machado

Tese submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências Morfológicas.

Aprovada por:

Luiz Eurico Nasciutti (Orientador)  
Prof<sup>o</sup> Associado do Instituto de Ciências Biomédicas, UFRJ

Márcia Cury El-Cheikh (Revisora e Membro Suplente Interno)  
Prof<sup>o</sup> Associado do Instituto de Ciências Biomédicas, UFRJ

Radovan Borojevic (Membro Examinador Interno)  
Prof<sup>o</sup> Titular do Instituto de Ciências Biomédicas, UFRJ

Róbson de Queiroz Monteiro (Membro Examinador Externo)  
Prof<sup>o</sup> Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ

Sang Won Han (Membro Examinador Externo)  
Prof<sup>o</sup> Adjunto da Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP

Verônica Morandi (Membro Suplente Externo)  
Prof<sup>o</sup> Adjunto da Universidade Estadual do Rio de Janeiro, UERJ

Rio de Janeiro, setembro de 2009.

## FICHA CATALOGRÁFICA

Machado, Daniel Escorsim

ESTUDO DO PROCESSO DE ANGIOGÊNESE NA ENDOMETRIOSE EXPERIMENTAL: PAPEL DO FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF) E DE INIBIDORES DE CICLOOXIGENASE-2 (COX-2) / Daniel Escorsim Machado – Rio de Janeiro, 2009.

xxiii, 146 f.

Tese (Doutorado em Ciências Morfológicas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ. Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Ciências Biomédicas, 2009.

Orientador: Luiz Eurico Nasciutti

1. Endometriose 2. Angiogênese 3. VEGF 4. COX-2 – Dissertações.

I. Luiz Eurico Nasciutti (orientador). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Centro de Ciências da Saúde. Instituto de Ciências Biomédicas. III. Título.

Tese realizada no INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO – UFRJ, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Doutor em Ciências Morfológicas, sob a orientação do Professor Luiz Eurico Nasciutti.

“Defeitos e qualidades, somados são perfeitos.

É mais que um complemento...é essencial”.

Dedico este trabalho a minha querida esposa

Jamila.

## AGRADECIMENTOS

À Jamila, meu exemplo de como devemos batalhar pelas oportunidades na vida, sempre com pensamento positivo. O que posso dizer da pessoa que, além de ser minha companheira de todos os momentos, ajudou nos experimentos e nas análises estatísticas desta tese? Você é responsável por cada degrau subido nessa longa jornada, desde a chegada no Rio de Janeiro. Essa é uma de nossas muitas conquistas que virão pela frente, afinal, nós formamos uma bela dupla! Eu te amo!

Ao meu Pai e melhor amigo, mais uma etapa conquistada por nós, não tem palavras para expressar minha gratidão. Em toda minha vida sempre vou me espelhar em você, que não mediu esforços em garantir meu desenvolvimento pessoal, intelectual e profissional. Para mim, você é o cara! Joelma, obrigado pelas palavras de carinho e incentivo.

À minha mãe, que me ajudou muito aqui no Rio de Janeiro, sendo essencial desde os primeiros dias. Leila, depois de tantos momentos vividos, quero que saiba que sempre te amei muito...lembro de cada detalhe das histórias que você conta. Zé Paulo, valeu pela hospitalidade e pelos conselhos profissionais.

À minha querida irmã Thaís, grande parte do que sou devo a você, nunca esquecerei os bons tempos em Curitiba. Obrigado pelo carinho e incentivo, você contribuiu de maneira valiosa para essa conquista.

À minha amada Vó Alice (*in memorian*), que ajudou a formar a pessoa que hoje sou. Todas as etapas conquistadas em minha vida, à senhora terá enorme participação, pois plantou a árvore para que os frutos fossem colhidos. Tenho certeza de que independente de onde estiver estará olhando por mim.

Ao meu orientador, Dr. Luiz Eurico Nasciutti, que confiou no meu potencial e me incentivou nessa vida de pesquisador. Sem as suas preciosas orientações, esse trabalho não se realizaria. Chefe, ao senhor minha eterna gratidão.

À Prof. Márcia Cury El-Cheikh, pelas sugestões no trabalho de revisão desta tese.

Aos meus eternos amigos de Ponta Grossa, Hayglon (“Merhy”), Luiz Guilherme (“Jurema”), Luciano (“Cão”), Fernando (“Boulos”), Cristiano (“Béia”), Felipe (“Seco”), Glaudsthon (“Pato”), Rafael (“Cido”), Amaro (“ET”), Luiz Henrique (“Kike”) e outros; nossos encontros sempre são espetaculares. Vocês são a prova real de amizade.

Aos grandes amigos de trabalho Plínio e Renato, que me ajudaram muito desde o início dessa jornada. A linha de pesquisa da endometriose não aconteceria sem vocês. Valeu pelos conselhos e orientações.

Aos companheiros do laboratório de Interações Celulares da UFRJ: Antônio (“Palumbo”), Leonardo (“HP”), Célia, Michel, Leandro, Pedro, Carlos e todos os outros pelo companheirismo e discussões em seminários; em especial a Maria Aparecida, pela ajuda nos experimentos.

Aos amigos da Morfologia: Felipe (“Gordo”), Gustavo, Anderson, Guilherme (“Osama”), Prof. Cristiano e todos os outros pelos momentos de descontração fora do ambiente de trabalho.

Ao Tio Luizinho (*in memoriam*), você sempre será meu exemplo de como se deve lutar pela vida. Agradeço muito o privilégio de ter passado bons momentos com você. Descanse em paz meu amigo!

Aos colegas das Faculdades Integradas Maria Thereza: Fábio, Eduardo e Marco. Em pouco tempo já nos tornamos grandes amigos. Valeu pelas discussões!

As secretárias do Programa de Ciências Morfológicas da UFRJ, Maria da Graça e Tânia Regina Pontes Cordeiro pela disponibilidade sempre presente.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

## RESUMO

A endometriose é uma doença comum caracterizada pela presença de endométrio funcional fora da cavidade uterina, causando dor pélvica crônica, dismenorréia e infertilidade. A sobrevivência do endométrio ectópico está relacionada à aquisição de novos vasos sanguíneos, e o uso de agentes angiostáticos sugere uma nova opção terapêutica. A ciclooxigenase-2 (COX-2) é uma enzima que participa na síntese da prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), sendo expressa em níveis elevados no tecido endometriótico e resultando em um aumento na concentração de PGE<sub>2</sub>. Embora a inibição da COX-2 previna o estabelecimento e o crescimento de lesões endometrióticas em diferentes modelos animais, pouco se sabe sobre os mecanismos básicos desta regressão.

Neste estudo, estabelecemos um modelo experimental de endometriose peritoneal em rato para avaliar o processo de angiogênese e comparar com endométrio tópico. Além disso, investigamos os efeitos anti-angiogênicos do inibidor seletivo da COX-2 Parecoxib no crescimento de implantes endometriais no modelo experimental. Usando imunohistoquímica e RT-PCR, analisamos as características morfológicas dessas lesões e a densidade vascular, a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o seu receptor Flk-1, a distribuição de macrófagos, a expressão de MMP-9 e COX-2 e a concentração de prostaglandina nas lesões endometrióticas controles e tratadas com Parecoxib durante 30 dias.

Os resultados mostraram que o autotransplante de fragmentos de endométrio na cavidade peritoneal é um método bem estabelecido de indução da endometriose em ratos. As lesões foram císticas e vascularizadas, e demonstraram características histológicas semelhantes com a patologia humana, com glândulas e estroma endometrial. A densidade vascular e a presença de

VEGF, Flk-1 e MMP-9 foram significativamente mais altas em lesões endometrióticas do que no endométrio tópico, confirmando o potencial angiogênico dessas lesões. Também observamos um aumento no número de macrófagos ativos (células positivas para ED-1) nas lesões endometrióticas, mostrando uma correlação positiva com o VEGF. Nas lesões tratadas com Parecoxib, demonstramos uma redução significativa no tamanho dos implantes, e a análise histológica indicou presença de atrofia e regressão. Uma redução na densidade vascular e no número de macrófagos também foi observada, e associou-se a uma redução da expressão do VEGF, Flk-1 e MMP-9. Por fim, como esperado, o grupo tratado mostrou uma concentração baixa de PGE<sub>2</sub>.

A partir desses resultados demonstramos que o presente modelo de endometriose foi muito semelhante à doença humana, sendo útil para a investigação dos mecanismos do processo de angiogênese envolvidos na adesão peritoneal das células endometriais. Esses resultados sugerem que o uso de inibidores seletivos da COX-2 é eficaz na diminuição do estabelecimento e do crescimento da endometriose, principalmente pela sua atividade anti-angiogênica. Estudos deste agente em humanos são indicados como uma terapia eficaz no tratamento da endometriose.

## ABSTRACT

Endometriosis is a common disease characterized by the presence of a functional endometrium outside the uterine cavity, causing pelvic pain, dysmenorrhea, and infertility. The survival of ectopic endometrium is related to the acquisition of new blood vessels, and the use of angiostatic agents promises a new therapeutic option. Cyclooxygenase-2 (COX-2), a rate-limiting enzyme in the biosynthesis of prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), is highly expressed in the endometriotic tissue and results in an increase of the PGE<sub>2</sub> concentration. Although the inhibition of COX-2 prevents the establishment and growth of endometriosis lesions in different animal models, the mechanisms underlying this regression remain to be further determined.

In this study, we have established an experimental model of rat peritoneal endometriosis to evaluate the process of angiogenesis and to compare with eutopic endometrium. In addition, we investigated the antiangiogenic effects of the selective COX-2 inhibitor Parecoxib on the growth of endometrial implants in a peritoneal endometriosis rat model. Using immunohistochemistry and RT-PCR, we analyzed the morphological characteristics of these lesions and the vascular density, the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor Flk-1, the distribution of macrophages, the expression of MMP-9 and COX-2 and the prostaglandin concentration in the endometriotic lesions control and treated with Parecoxib for 30 days.

The results showed that the auto-transplantation of endometrium pieces into the peritoneal cavity is a well-established method for endometriosis induction in rats. The lesions were cystic and vascularized, and demonstrated histological hallmarks of human pathology, such as endometrial glands and stroma. The vascular density and the presence of VEGF, Flk-1 and MMP-9 were significantly higher in endometriotic lesions than in eutopic endometrium, and

confirmed the angiogenic potential of these lesions. We also observed an increase in the number of activated macrophages (ED-1 positive cells) in the endometriotic lesions, showing a positive correlation with VEGF. In lesions treated with Parecoxib, we demonstrated a significant decrease of the implant size, and the histologic examination indicated mostly atrophy and regression. It was also observed a reduction in the microvessel density and in the number of macrophages, associated to a decrease of VEGF, Flk-1 and MMP-9 expression. Finally, as expected, the treatment group showed low concentration of PGE<sub>2</sub>.

From these results we demonstrate that the present endometriosis model was very similar to human disease, and would be useful for investigation of the mechanisms of angiogenesis process involved in the peritoneal attachment of endometrial cells. These results suggest that the use of COX-2 selective inhibitors could be effective to suppress the establishment and growth of endometriosis, partially by their antiangiogenic activity. Studies of this agent in humans as a potential therapy are indicated in the treatment of endometriosis.

**LISTA DE ABREVIACOES**

AChE	Acetilcolinesterase
AINEs	Antiinflamatorios No-Esteroidais
Ang	Angiopoetina
ASRM	<i>American Society for Reproductive Medicine</i>
BSA	Albumina de Soro Bovino
CAUAP	Comissão de Avaliao do Uso de Animais em Pesquisa
CCS	Centro de Ciências da Saúde
COX-2	Ciclooxigenase-2
CS	Condroitin Sulfato
DAB	Diaminobenzidina
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblasto
FGFR	Receptor do Fator de Crescimento de Fibroblasto
Flk-1	<i>tyrosine kinase receptor</i>
Flt-1	<i>tyrosine kinase receptor</i>
GAG	Glicosaminoglicano
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato dehidrogenase
GFP	Proteína Fluorescente Verde
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofina
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HE	Hematoxilina-Eosina

HPMA	Hidroxipropil Metacrilamida
IBCCF	Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
IL	Interleucina
IM	Intramuscular
kg	Quilograma
LSAB	<i>Labelled Streptavidin Biotin</i>
M	Molar
MEC	Matriz Extracelular
mg	Miligrama
MIF	Fator Inibitório de Macrófagos
mm	Milímetro
MMPs	Metaloproteinases
NK	<i>Natural Killer</i>
PBS	Tampão Fosfato de Sódio
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipase A <sub>2</sub>
PIGF	Fator de Crescimento da Placenta
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
RT-PCR	Reação em Cadeia de Polimerase-Transcriptase Reversa
TIMPs	Inibidores Tissulares de Metaloproteinases
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TxA <sub>2</sub>	Tomboxano A <sub>2</sub>
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

VEGFR	Receptor do Fator de Crescimento Endotelial Vascular
vWF	Fator de Von Willebrand

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>página</b>
Figura 1: Esquema do endométrio	2
Figura 2: Histologia do endométrio	4
Figura 3: Corte histológico de endometriose de sigmóide	5
Figura 4: Esquema mostrando o processo de angiogênese	16
Figura 5: Esquema representativo da angiogênese no crescimento tumoral	17
Figura 6: Relação dos inibidores angiogênicos descritos no período entre 1980-2005	22
Figura 7: Visão macroscópica de focos endometrióticos no peritônio	24
Figura 8: Via das Ciclooxygenases	29
Figura 9: Procedimento cirúrgico para estabelecimento das lesões endometrióticas em ratas.	42
Figura 10: Visão macroscópica dos implantes endometriais na cavidade peritoneal de ratas.	43
Figura 11: Visão macroscópica dos implantes na cavidade peritoneal de ratas com 10 dias após os implantes iniciais.	44
Figura 12: Análise histológica do endométrio tópico e da endometriose peritoneal de ratas 10 dias após os implantes iniciais	45
Figura 13: Visão macroscópica dos implantes na cavidade peritoneal de ratas com 15 dias após os implantes iniciais.	46
Figura 14: Análise histológica do endométrio tópico e da endometriose peritoneal de ratas 15 dias após os implantes iniciais.	47
Figura 15: Visão macroscópica dos implantes na cavidade peritoneal de ratas com 30 dias após os implantes iniciais.	48
Figura 16: Análise histológica do endométrio tópico e da endometriose peritoneal de ratas 30 dias após os implantes iniciais.	49

Figura 17: Avaliação do crescimento dos implantes.	50
Figura 18: Imunomarcção para vWF em endométrio tópico e endometriose peritoneal de ratas 15 e 30 dias após os implantes iniciais.	52
Figura 19: Análise estatística das imunomarcações com vWF no endométrio tópico e nas endometrioses de ratas 15 e 30 dias após os implantes iniciais.	53
Figura 20: Imunomarcção para $\alpha$ -actina de músculo liso em endométrio tópico e endometriose peritoneal de ratas 15 e 30 dias após os implantes iniciais.	55
Figura 21: Análise estatística das imunomarcações com $\alpha$ -actina de músculo liso no endométrio tópico e nas endometrioses de ratas 15 e 30 dias após os implantes iniciais.	56
Figura 22: Expressão do RNAm transcrito do VEGF no endométrio tópico e nas lesões endometrióticas por RT-PCR.	57
Figura 23: Imunomarcção para VEGF em endométrio tópico e endometriose peritoneal de ratas 15 e 30 dias após os implantes iniciais.	58
Figura 24: Análise estatística das imunomarcações com VEGF no endométrio tópico e nas endometrioses de ratas 15 e 30 dias após os implantes iniciais.	59
Figura 25: Expressão do RNAm transcrito do Flk-1 no endométrio tópico e nas lesões endometrióticas por RT-PCR.	60
Figura 26: Imunomarcção para Flk-1 em endométrio tópico e endometriose peritoneal de ratas 15 e 30 dias após os implantes iniciais.	61
Figura 27: Análise estatística das imunomarcações com Flk-1 no endométrio tópico e nas endometrioses de ratas 15 e 30 dias após os implantes iniciais.	62
Figura 28: Imunomarcção ED-1 em endométrio tópico e endometriose peritoneal de ratas 15 e 30 dias após os implantes iniciais.	64

Figura 29: Análise estatística das imunomarcações com ED-1 no endométrio tópico e nas endometrioses de ratas 15 e 30 dias após os implantes iniciais.	65
Figura 30: Expressão do RNAm transcrito da MMP-9 no endométrio tópico e nas lesões endometrióticas por RT-PCR.	66
Figura 31: Análise semiquantitativa das bandas referentes à expressão do RNAm transcrito do VEGF, Flk-1 e MMP-9 no endométrio tópico e nas lesões endometrióticas por RT-PCR	66
Figura 32: Expressão do RNAm transcrito da COX-2 no endométrio tópico e nas lesões endometrióticas por RT-PCR.	67
Figura 33: Imunomarcação para COX-2 em endométrio tópico e endometriose peritoneal de ratas 15 e 30 dias após os implantes iniciais.	68
Figura 34: Análise estatística das imunomarcações com COX-2 no endométrio tópico e nas endometrioses de ratas 15 e 30 dias após os implantes iniciais.	69
Figura 35: Esquema mostrando os tratamentos com Parecoxib.	70
Figura 36: Análise macroscópica das lesões controles e tratadas com Parecoxib.	71
Figura 37: Análise da quantificação dos vasos sanguíneos marcados para vWF.	73
Figura 38: Análise estatística das imunomarcações com vWF no endométrio tópico e nas endometrioses de ratas dos grupos controle e tratado.	74
Figura 39: Expressão do RNAm transcrito dos genes VEGF e Flk-1 em amostras de endométrio tópico e de lesões endometrióticas com e sem tratamento por RT-PCR.	76
Figura 40: Análise da distribuição do VEGF.	77
Figura 41: Análise estatística das imunomarcações com VEGF no endométrio tópico e nas endometrioses de ratas dos grupos controle e tratado.	78
Figura 42: Análise da distribuição do Flk-1.	80

Figura 43: Análise estatística das imunomarcações com Flk-1 no endométrio tópico e nas endometrioses de ratas dos grupos controle e tratado.	81
Figura 44: Análise de macrófagos ativos marcados com ED-1.	82
Figura 45: Análise estatística das imunomarcações com ED-1 no endométrio tópico e nas endometrioses de ratas dos grupos controle e tratado.	83
Figura 46: Expressão do RNAm transcrito do gene da MMP-9 em amostras de endométrio tópico e de lesões endometrióticas com e sem tratamento por RT-PCR.	84
Figura 47: Análise imunohistoquímica e RT-PCR para COX-2 em amostras de endométrio tópico e de lesões endometrióticas com e sem tratamento.	87
Figura 48: Análise estatística das imunomarcações com COX-2 no endométrio tópico e nas endometrioses de ratas dos grupos controle e tratado.	88
Figura 49: Concentrações de PGE <sub>2</sub> no endométrio tópico e nas lesões endometrióticas de ratas dos grupos controle e tratado determinadas por ensaio imunoenzimático.	89

**ÍNDICE DE TABELAS**

página

Tabela 1: Distribuição das queixas apresentadas em 244 pacientes com endometriose atendidas na Clínica Ginecológica do HC-FMUSP no período de 1993 a 1999	10
Tabela 2: Lista dos oligos utilizados nas reações de PCR	38

**ÍNDICE GERAL**

página

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
1.1. ENDOMÉTRIO E O CICLO MENSTRUAL	1
1.2. ENDOMETRIOSE	5
1.2.1. Histórico	6
1.2.2. Teorias Etiopatogênicas	7
1.2.3. Sintomas	9
1.2.4. Epidemiologia	10
1.2.5. Classificações	11
1.2.6. Diagnóstico Histológico	12
1.2.7. Tratamento Clínico e Cirúrgico	13
1.3. VASCULOGÊNESE E ANGIOGÊNESE	14
1.4. FATORES ANGIOGÊNICOS	17
1.4.1. Fatores estimuladores da angiogênese	18
1.4.2. Fatores inibidores da angiogênese	21
1.5. ENDOMETRIOSE E ANGIOGÊNESE	23
1.6. TERAPIAS ANTI-ANGIOGÊNICAS NA ENDOMETRIOSE	27
1.7. CICLOOXIGENASE-2	28
1.8. INIBIDORES DA COX-2 E ENDOMETRIOSE	30
<b>2. OBJETIVO GERAL</b>	32
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32

<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>34</b>
3.1. Estabelecimento de modelo experimental de endometriose peritoneal em Ratas Wistar a partir de transplante autólogo do endométrio.	34
3.2. Caracterização morfológica das lesões e do endométrio tópico.	34
3.3. Estudo Imunohistoquímico.	35
3.4. Estudo histomorfométrico e análise estatística.	36
3.5. Análise por RT-PCR.	37
3.6. Extração e Quantificação de Prostaglandina (PGE <sub>2</sub> ).	38
3.7. Tratamentos com inibidor seletivo da COX-2 no modelo experimental de endometriose.	39
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>41</b>
4.1. ESTABELECIMENTO DE MODELO EXPERIMENTAL DE ENDOMETRIOSE PERITONEAL	41
4.1.1. Caracterização morfológica das lesões e do endométrio tópico	43
4.1.2. Distribuição de vasos sanguíneos	51
4.1.3. Perfil angiogênico do modelo experimental	56
4.2. ESTUDO DA EXPRESSÃO E DISTRIBUIÇÃO DE COX-2 NO MODELO EXPERIMENTAL E NO ENDOMÉTRIO TÓPICO	66
4.3. ANÁLISE DA RESPOSTA TERAPÊUTICA DOS TRATAMENTOS COM INIBIDOR SELETIVO DA COX-2 NO MODELO EXPERIMENTAL DE ENDOMETRIOSE	70
4.3.1. Observação macroscópica das lesões endometrióticas controles e tratadas com Parecoxib.	70
4.3.2. Estudo da densidade vascular do endométrio tópico e das lesões endometrióticas controles e tratadas.	72

4.3.3. Análise da angiogênese no endométrio tópico e nas lesões endometrióticas controles e tratadas.	75
4.3.4. Análise da expressão e da distribuição de COX-2 no endométrio tópico e nas lesões endometrióticas controles e tratadas.	85
4.3.5. Concentrações de PGE <sub>2</sub> no endométrio tópico e nas lesões endometrióticas controles e tratadas.	89
<b>5. DISCUSSÃO</b>	90
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	101
<b>7. ANEXOS</b>	
7.1. ANEXO I	124
<i>Vascular density and distribution of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 (Flk-1) are significantly higher in patients with deeply infiltrating endometriosis affecting the rectum.</i>	
7.2. ANEXO II	133
<i>Angiogenesis pattern in a rat model of peritoneal endometriosis is similar to human disease.</i>	
7.3. ANEXO III	136
<i>Composition of sulfated glycosaminoglycans and immunodistribution of chondroitin sulfate in deeply infiltrating endometriosis affecting the rectosigmoid.</i>	
7.4. ANEXO IV	144
<i>A selective cyclooxygenase-2 inhibitor suppresses the growth of endometriosis with an anti-angiogenic effect in a rat model.</i>	

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. ENDOMÉTRIO E O CICLO MENSTRUAL**

O endométrio é um tecido especializado que recobre internamente o útero e sofre mudanças morfológicas, celulares e moleculares de forma seqüencial a cada mês sob ação dos hormônios sexuais, estrogênio e progesterona, na preparação para a implantação ovular (Tabibzadeh, 2002). É um tecido dinâmico composto de glândulas epiteliais tubuliformes contíguas a um epitélio superficial e um estroma conjuntivo que contém células estromais especializadas, fibroblastos, elementos vasculares e células inflamatórias (Rodgers e cols., 1994). O endométrio segundo Bulletti e cols., (1998) é um tecido complexo que se desenvolve sob a coordenação dos hormônios sexuais através de uma rede de moléculas bioativas, produzidas e ativadas durante o ciclo. Esse tecido é submetido mensalmente a modificações morfológicas características que ocorrem numa forma seqüencial e previsível como intensa proliferação e diferenciação celular, destruição e remodelamento tecidual (Tabibzadeh, 1990).

O endométrio é formado por duas camadas: a camada basal ou germinativa e a camada funcional ou superficial. A camada basal é mais profunda e se localiza próximo ao miométrio, se modifica pouco durante o ciclo, e não descama na menstruação. Nela se encontram os brotos glandulares e vasculares responsáveis pela regeneração da mucosa no ciclo seguinte após a menstruação. A camada funcional apresenta modificações mais marcantes do que a basal durante o ciclo sob o estímulo dos hormônios esteróides sexuais (Tabibzadeh, 1990).

A irrigação do endométrio se faz por um sistema vascular característico e exclusivo deste órgão e é fundamental no mecanismo da menstruação. A vascularização se origina das artérias uterinas, que se dividem em artérias arqueadas no miométrio gerando as artérias radiadas que

penetram perpendicularmente no endométrio dando origem às artérias basais, que se dividem em ramos horizontais nutrindo a camada basal e ramos verticais que nutrem a camada funcional (Hickey e Fraser, 2000). Esses vasos dão origem as artérias espiraladas ou helicoidais, que se modificam de forma extraordinária durante o ciclo (Gordon e cols., 1995) (Figura 1).

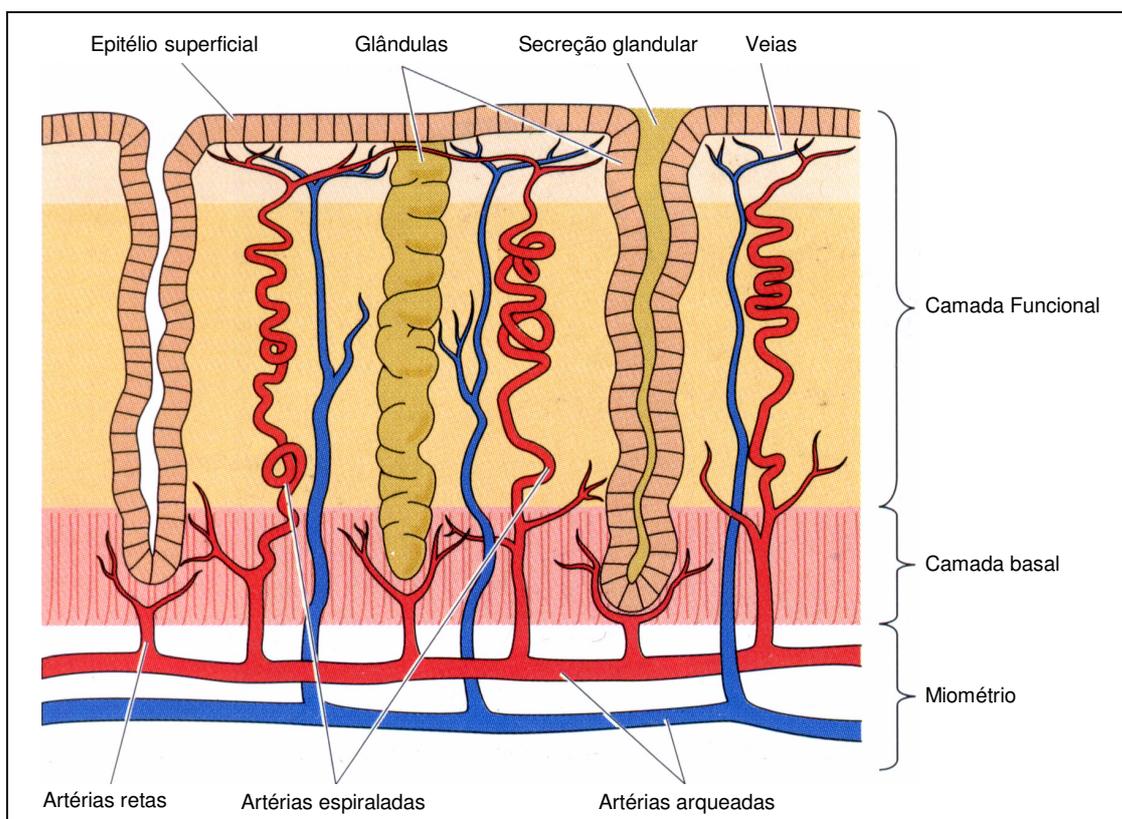


Figura 1. Esquema do endométrio humano mostrando as camadas basal e funcional, glândulas e a vascularização (Gartner e Hiatt, 1997).

A caracterização histológica da fase do ciclo endometrial é bem estabelecida e segue os critérios descritos por Noyes em 1950 (em Kohorn e Tchao, 1969). A primeira fase que se inicia com um novo ciclo é denominada fase proliferativa ou folicular, pois o fato mais marcante desta fase é a proliferação que ocorre sob ação dos estrogênios produzidos no folículo ovariano. Após a

ovulação, sob a ação da progesterona, o endométrio se diferencia se tornando secretor (fase secretora ou lútea).

Logo após a menstruação, o endométrio encontra-se baixo, regenerado por volta do 5º dia, a partir de células da camada basal (estroma, brotos glandulares e vasos) e de células remanescentes da porção baixa do corpo uterino que não são descamadas e permanecem durante a menstruação (Strauss e Gorpide, 1991). Nessa fase, as glândulas são finas, retas e tubulares, apresentam epitélio colunar baixo, com grande número de mitoses, associada à grande produção de componentes da matriz extracelular (MEC) (Figura 2). Próximo a ovulação (ao redor do 14º dia), o endométrio começa a se espessar, sendo observada pseudo-estratificação epitelial além de aumento no volume do estroma (Fata e cols., 2000).

Após a ovulação, a progesterona atua sobre o endométrio estimulado e preparado pelo estrogênio, induzindo a síntese e secreção glandular de um material rico em glicoproteínas (Ferency e cols., 1979). A progesterona tem ação inibidora sobre a proliferação das células epiteliais glandulares atuando através da enzima  $17\beta$  hidroxidehidrogenase que bloqueia a ação dos estrogênios, além de inibir a expressão de receptores de estrogênio (Clarke e Sutherland, 1990). Nessa fase as modificações morfológicas são mais marcantes e se correlacionam de uma forma muito precisa com a data do ciclo. Há um acúmulo progressivo de glicogênio nas células estromais e inicia-se o desenvolvimento de um sistema secretor nas células epiteliais glandulares, as glândulas se tornam mais tortuosas e há um maior desenvolvimento de artérias espiraladas (Strauss e Gorpide., 1991; Junqueira e Carneiro, 2004). As células estromais localizadas ao redor dos vasos aumentam de volume e adquirem um citoplasma eosinófilo tornando-se decidualizadas. As glândulas tortuosas apresentam epitélio glandular cilíndrico simples contendo vacúolos de secreção citoplasmática e um estroma conjuntivo com edema (Ferency e Bergeron., 1991) (Figura 2).

Não ocorrendo gravidez essas alterações endometriais necessitam de um sistema próprio de remodelamento, do qual participa a menstruação, processo que inclui a destruição do tecido superficial, remodelamento e angiogênese seguido de uma nova fase de crescimento tecidual estimulado pelos estrogênios no ciclo seguinte (Hicker e Fraser., 2000).

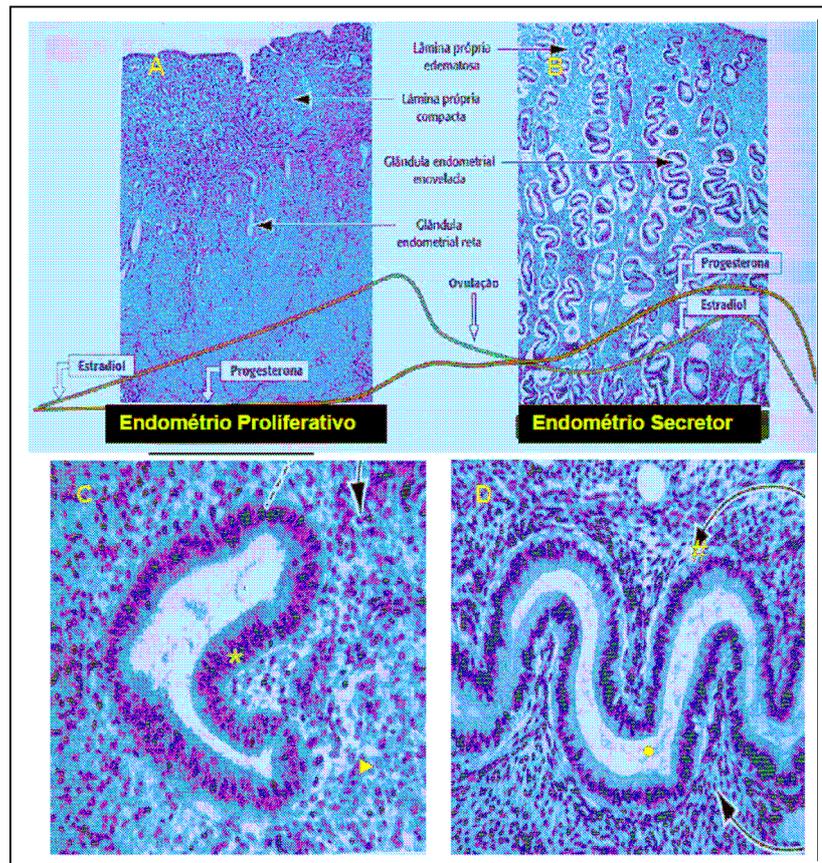


Figura 2: Histologia do endométrio. Figuras de corte histológico de endométrio nas diferentes fases do ciclo menstrual. Coloração de HE. A: endométrio proliferativo mostrando glândulas tubulares retilíneas; B: endométrio secretor mostrando glândulas tortuosas; C: endométrio proliferativo mostrando pseudo-estratificação epitelial (\*) e estroma denso (▶); D: endométrio secretor mostrando realinhamento dos núcleos (#) e secreção glandular (●). Na parte superior (A e B) são mostrados os níveis hormonais durante o ciclo menstrual, em verde o estrogênio e em vermelho a progesterona. (Kierszbaum, 2004). Aumentos: 10X (A e B) e 40X (C e D).

## 1.2. ENDOMETRIOSE

A endometriose é caracterizada pela presença de tecido endometrial ectópico em localização extra-uterina (Figura 3), acometendo principalmente ovários, peritônio pélvico, fundo-de-saco, ligamentos uterossacos, face posterior do útero, cólon sigmóide e bexiga, podendo comprometer ainda apêndice, íleo, diafragma, vulva, vagina, colo do útero, septo retovaginal, parede abdominal, rins e regiões inguinais. É uma doença comum que afeta aproximadamente 10% de todas as mulheres na idade reprodutiva (Abrao., 2000).

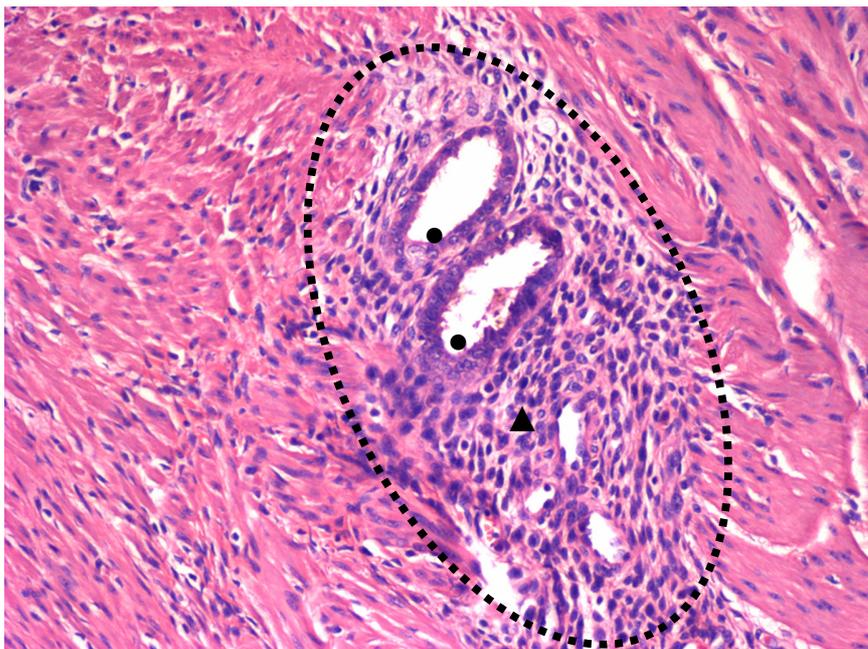


Figura 3: Corte histológico de endometriose de sigmóide. Coloração de HE. Observa-se na área assinalada do foco da lesão endométríótica, a presença de elementos glandulares (●) e estromais (▲). Aumento: 10X.

### 1.2.1. Histórico

A maioria dos estudos credits a Carl Von Rokitansky, em 1860, na Alemanha, a primeira descrição de um caso de endometriose, quando deparou com presença de tecido endometrial ectópico em útero obtido de necropsia, denominando-o, na época, de adenomioma. Outros autores referem uma descrição feita por Disterweg, em 1883, como a primeira citação dessa patologia, com o relato de um caso de uma paciente com polipose na parede posterior do útero, cuja descrição anatomopatológica muito se assemelha à da endometriose (Benagiano e cols., 1991).

No entanto, Knapp, em 1999, publicou um estudo sobre o histórico desta afecção, referindo que a endometriose já havia sido descrita bem antes da publicação de Rokitansky, há pelo menos 300 anos na Europa. Knapp atribui a um médico alemão, Daniel Shroen, em 1690, no livro *Disputatio Inauguralis de Ulceribus Ulceri*, a primeira descrição detalhada da endometriose. Shroen descreveu minuciosamente úlceras que primariamente distribuíam-se pelo peritônio e bexiga, intestino e ligamento largo. Essas úlceras, no seu entender, seriam inflamações que tenderiam a formar aderências entre os órgãos abdominais, referindo ainda que tais úlceras evoluíam em tamanho e vascularização, podendo formar tumorações tendentes a infectar-se ou evoluir com hemorragias. Shroen referiu categoricamente que esta é uma patologia de mulheres que tinham atingido a maturidade sexual.

Finalmente, em 1927, Sampson descreveu a endometriose como a presença de tecido endometrial em localização extra-uterina, tal qual é conhecida atualmente e sugeriu a menstruação retrógrada como provável etiologia. Sua teoria foi baseada na observação de sangue saindo pelas tubas uterinas em mulheres operadas durante a menstruação, constatando também fragmentos de tecido endometrial no lúmen das trompas. Sampson igualmente sugeriu que,

apesar de benigna, a doença tinha o potencial de invadir órgãos adjacentes, distorcendo a anatomia pélvica.

### **1.2.2. Teorias Etiopatogênicas**

Apesar do conhecimento a respeito dos aspectos clínicos da endometriose e suas repercussões na vida da paciente, a etiopatogenia, os fatores de risco para progressão da doença, a evolução natural e a relação com a infertilidade vêm sendo exaustivamente estudados. Devido a diferentes locais de acometimento, possíveis origens, aspecto e resposta hormonal, Nissole e Donnez em 1997, sugeriram que a endometriose peritoneal, ovariana e nódulos adenomióticos no septo-retrovaginal são três diferentes doenças, com diferentes etiopatogenias. Atualmente, segundo Nap e cols., (2004), existem três hipóteses mais viáveis para a etiopatogenia da endometriose: teoria da indução, teoria do desenvolvimento *in situ* e teoria da menstruação retrógrada.

#### **1.2.2.1. Teoria da indução**

Essa teoria assume que a degeneração do endométrio menstrual libera fatores endógenos, com subsequente indução de um processo metaplásico no epitélio seroso dos ovários e nas células serosas do mesotélio, resultando no tecido endometrial (Ohtake e cols., 1999). Como critério de definição de endometriose, glândulas e estroma endometrial devem estar presentes nas lesões ectópicas. Os trabalhos suportando essa teoria possuem evidências que o epitélio endometrial e as glândulas são resultado de indução, mas não há evidências de formação de estroma endometrial no final do processo metaplásico.

### **1.2.2.2. Teoria do desenvolvimento *in situ***

De acordo com essa teoria, o endométrio ectópico se desenvolve *in situ* a partir de tecidos locais, incluindo epitélio germinal dos ovários e restos do Ducto de Müller e Wolffian. Num contexto amplo, essa teoria também implica que a endometriose peritoneal resulta de metaplasia *in situ* de células serosas mesoteliais (Fuji, 1991; Suginami, 1991). O fato de que a endometriose ocorre quando o endométrio está presente e que homens são excluídos dessa moléstia, enfraquece o poder de metaplasia no conceito de endometriose.

### **1.2.2.3. Teoria da Menstruação Retrógrada**

A teoria mais aceita sobre a gênese da endometriose propõe o desenvolvimento de implantes ectópicos a partir de fragmentos de endométrio que, por fluxo menstrual retrógrado, extravasam para cavidade peritoneal e ali se aderem (Sampson, 1927). Menstruação retrógrada é um evento comum em mulheres com trompas de Falópio desobstruídas. Halme e cols., (1984) obtiveram líquido peritoneal de mulheres no período menstrual. Foi encontrado sangue em 90% de pacientes com trompas desobstruídas, e quando as trompas estavam obstruídas, somente 15% possuíam evidências de sangue. Essa teoria também é suportada pela presença de fragmentos de endométrio com células viáveis que quando transplantadas para meios de cultura ou animais, levam à formação de focos de endometriose (Koks e cols., 1997). Um ponto importante é o fato de que o aumento da descamação retrógrada do endométrio humano aumenta a probabilidade do desenvolvimento da endometriose, sendo suportado pela ocorrência de menstruações longas e em excesso em mulheres com endometriose (Darrow e cols., 1993). Para o tecido endometrial se implantar no peritônio, deve ser capaz de aderir na superfície peritoneal, invadir a membrana

basal e matriz extracelular, e adquirir vasos sanguíneos para sobrevivência. Entretanto essa seqüência de eventos não é bem estudada em humanos, sendo que há estudos em sistemas de modelos experimentais variados *in vivo* e *in vitro*. Esses estudos apontam que o próprio tecido endometrial é o elemento chave para o desenvolvimento da endometriose (Spuijbroek e cols., 1992).

### **1.2.3. Sintomas**

A endometriose está associada a uma grande variedade de sintomas dolorosos que estão intimamente relacionados à aparência, ao grau de invasão, à localização e à profundidade de acometimento das lesões. No entanto Fedele e cols., (1990), não demonstraram nenhuma relação entre a prevalência e gravidade dos sintomas com o estágio ou sítio das lesões de endometriose. Desde que a maioria dos implantes está confinada à cavidade pélvica, as manifestações clínicas da doença mais relatadas são a dor pélvica, distúrbios menstruais e infertilidade. Abrao e cols., (2000), estudando 244 casos de endometriose, observaram a dismenorréia, algia pélvica crônica e esterilidade como queixas principais (Tabela 1).

<b>Queixas</b>	<b>Número</b>	<b>%</b>
Dismenorréia	134	54,9
Dor pélvica crônica	56	22,6
Esterilidade	34	13,8
Alterações intestinais cíclicas	8	3,1
Dispareunia	5	2,2
Alterações emocionais	3	1,3
Alterações urinárias cíclicas	2	0,9
Hemoptise	1	0,4
Irregularidade menstrual	1	0,4
Total	244	100

Tabela 1: Distribuição das queixas apresentadas em 244 pacientes com endometriose atendidas na Clínica Ginecológica do HC-FMUSP no período de 1993 a 1999.

#### **1.2.4. Epidemiologia**

O perfil real da paciente portadora de endometriose é impreciso, embora exista consenso em que a endometriose esteja presente em pelo menos 10% da população geral na idade reprodutiva (Eskenazi e Warner, 1997). Dois estudos importantes devem ser referidos quando se estuda a epidemiologia da endometriose. Mathias e cols., (1996), enviaram questionário validado para 5.263 mulheres entre 18 e 50 anos com resultado de 14,7% de portadoras de dor pélvica crônica, sendo 61% sem causa definida, e 45% de diminuição da capacidade de trabalho devido à dor. Velebil e cols., (1995) relataram que entre 15 e 44 anos, a endometriose é a terceira principal

causa de internação hospitalar relacionada a distúrbio do trato reprodutivo nos Estados Unidos, perdendo apenas para doença inflamatória pélvica e cistos ovarianos benignos.

Reese e cols., (1996), acompanharam 67 pacientes entre 11 e 19 anos com dor pélvica crônica, sem melhora com tratamento clínico, submetidas à laparoscopia, revelando 73% (49 pacientes) de achados compatíveis com endometriose. Esta observação corrobora com o trabalho de Hadfield e cols., (1996), que indicam tempo médio de 11,7 anos nos Estados Unidos e 7,9 anos no Reino Unido entre o início dos sintomas e a época do diagnóstico da doença.

Entretanto, segundo Viganò e cols., (2004), é difícil estimar a prevalência devido aos estudos incluírem mulheres em diferentes condições, e são conduzidas em centros que aplicam diferentes critérios de diagnóstico e exibem diferentes níveis de interesse clínico na endometriose.

### **1.2.5. Classificações**

A partir da primeira tentativa de se estabelecer critérios para classificação da endometriose realizada por Sampson (1921), inúmeras classificações têm sido propostas. Em 1951, Huffman propôs um estadiamento da doença semelhante ao utilizado na vigência do câncer do colo do útero. Foi o primeiro autor a relacionar o estágio da doença com a anatomia. Baseava-se na extensão e descrição dos locais acometidos observados durante a laparotomia. Diferenciava também as lesões consideradas superficiais das profundas, sem incluir os estadiamentos das aderências. Os achados eram divididos em quatro graus diferentes.

Acosta e cols., (1973), propuseram a classificação dividida em acometimento leve, moderado e grave. Avaliaram o comprometimento do ovário, a presença de aderências conforme o local de acometimento, envolvimento de tecidos adjacentes, cicatrizes e retrações, extensão e

dimensão das lesões. Todos esses eram critérios importantes na indicação da cirurgia conservadora e terapêutica hormonal.

Observando essa divergência acerca de classificação aliada ao aumento da incidência da endometriose, em 1979 a *American Fertility Society* reuniu especialistas propondo uma classificação em sistemas de escores, reunidos em estágios. Esta classificação foi atualizada em 1996 pela *American Society for Reproductive Medicine* (ASRM) antes denominada *American Fertility Society*, propondo para descrever a doença, além do sistema de escores unificados em 4 estágios; I (mínimo), II (leve), III (moderado) e IV (severo), a avaliação percentual das lesões peritoneais. Nessa classificação foi introduzido o estágio mínimo da doença e as aderências passaram a ser mais detalhadas conforme sua consistência e localização. é a classificação mais utilizada atualmente, estabelecida como diálogo universal.

A dificuldade dos métodos de estagiamento e a praticidade dos mesmos, propostas desde 1921 até 1996 ainda persistem. A necessidade de um método prático e eficaz de estadiamento resultaria em um melhor prognóstico desta patologia em relação à infertilidade, alívio da dor pélvica, prevenção de recidiva e, conseqüentemente, a melhor opção na escolha da terapêutica (ASRM, 1997).

### **1.2.6. Diagnóstico Histológico**

As lesões endometrióticas caracterizam-se por hemorragia e fibrose de padrão cicatricial associadas a elementos epiteliais e/ou estromais müllerianos. A presença de hemorragia e fibrose sem elementos müllerianos pode sugerir foco endometriótico, sobretudo diante de quadro clínico característico. Entretanto, o diagnóstico histológico depende da demonstração destes elementos. A classificação histológica é feita analisando-se os seus constituintes. Abrao e cols., (2003),

avaliaram 412 biópsias de pacientes com endometriose e concluíram que o padrão histológico pode auxiliar no prognóstico de resposta ao tratamento da endometriose. Segundo os autores, o padrão estromal se dá quando a presença de estroma é morfológicamente similar ao do endométrio tópico em qualquer fase do ciclo. Já no glandular há presença de epitélio superficial, ou constituindo espaços glandulares ou císticos, associado a tecido com sinais de hemorragia prévia, caracterizada pela presença de fibrose. Este padrão é subclassificado segundo a similaridade com o epitélio endometrial ativo nas seguintes formas de apresentação:

- bem diferenciado: células epiteliais têm morfologia indistinguível dos endométrios tópicos nas diferentes fases do ciclo.
- indiferenciado: presença de epitélio superficial ou constituindo espaços glandulares ou císticos. O epitélio é aplainado ou cuboidal baixo, sem correspondente endometrial tópico, assemelhando-se ao mesotélio do revestimento peritoneal.
- diferenciação mista: presença, na mesma biópsia, de epitélios de padrão bem diferenciado e indiferenciado.

### **1.2.7. Tratamento Clínico e Cirúrgico**

O alívio dos sintomas como dismenorréia severa ou incapacitante, dispareunia ou infertilidade constitui o principal objetivo do tratamento da endometriose. O arsenal medicamentoso existente para o tratamento clínico da endometriose não dispõe, atualmente, de nenhuma droga capaz de erradicar por completo os focos ectópicos de tecido endometrial que caracterizam a doença (Abrao., 2000).

O tratamento cirúrgico assume, então, papel relevante no controle da endometriose, pois permite ao ginecologista identificar e remover todos os focos da doença durante o ato cirúrgico.

Entretanto, a identificação adequada das lesões endometrióticas requer treinamento acurado, além de extrema atenção durante a cirurgia. Em linhas gerais, qualquer anormalidade do peritônio deve ser biopsiada para estudo histológico posterior, mesmo que fragmentos de tecido normal sejam incluídos no material enviado para análise. A taxa de recorrência após a remoção completa de todas as lesões visíveis é estimada em torno de 21% no intervalo de 2 anos pós-cirurgia (Redwine, 1991).

Com a falta de um modelo de tratamento clínico, algumas terapias têm sido testadas com o objetivo de erradicar os focos endometriais ectópicos sem agressividade para a paciente. Como descrito em alguns trabalhos, a vascularização de implantes endometrióticos é provavelmente o fator mais importante no processo de invasão das células endometriais em outros tecidos. A partir daí, estudos com componentes anti-angiogênicos vem sendo realizados para obtenção de um novo modelo de tratamento eficaz e menos agressivo (Nap e cols., 2004).

### **1.3. VASCULOGÊNESE E ANGIOGÊNESE**

O sistema cardiovascular é um dos primeiros sistemas do corpo humano a se formar durante o período embrionário, por ser necessário ao transporte de nutrientes aos tecidos e órgãos em desenvolvimento. A formação dos vasos sanguíneos ocorre em resposta a fatores de crescimento e sinais específicos, que delimitam a diferenciação de células endoteliais (que delimitam o interior dos vasos) e de células de musculatura lisa (que os revestem externamente) e a organização do conjunto dessas células em forma de tubo. Ao longo desse processo, há um aumento de demanda de oxigênio e ao mesmo tempo os tecidos do embrião liberam moléculas que estimulam o crescimento dos vasos sanguíneos (vascularização). A expansão dos vasos é rápida, graças aos mecanismos integrados de proliferação, migração e diferenciação de células

endoteliais. A vascularização é dividida em dois processos: a vasculogênese e a angiogênese (Yancopoulos e cols., 2000).

Na vasculogênese, precursores de células endoteliais (angioblastos) surgem na camada de células mesodérmicas da chamada vesícula vitelina. Os angioblastos organizam-se em agregados celulares denominados ilhotas sanguíneas e sua diferenciação forma uma rede vascular primária composta de canais endoteliais similares e de tamanho relativamente uniforme. Posteriormente, essa vascularização primária é submetida a uma remodelagem, regulada por substâncias que atuam como sinais angiogênicos, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). (Yancopoulos e cols., 2000).

Angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes. Esse processo é fortemente regulado em adultos, sendo que na maioria das vezes ocorre em órgãos lesados por um trauma ou infecção. A angiogênese envolve vários passos, os quais incluem ativação de células endoteliais, quebra de membrana basal, migração dessas células em direção a um estímulo, proliferação, fusão com o vaso original formando uma linha contínua de células endoteliais, tubulização e início do fluxo sanguíneo por esse novo vaso (Klagsbrun e cols., 1991). (Figura 4)

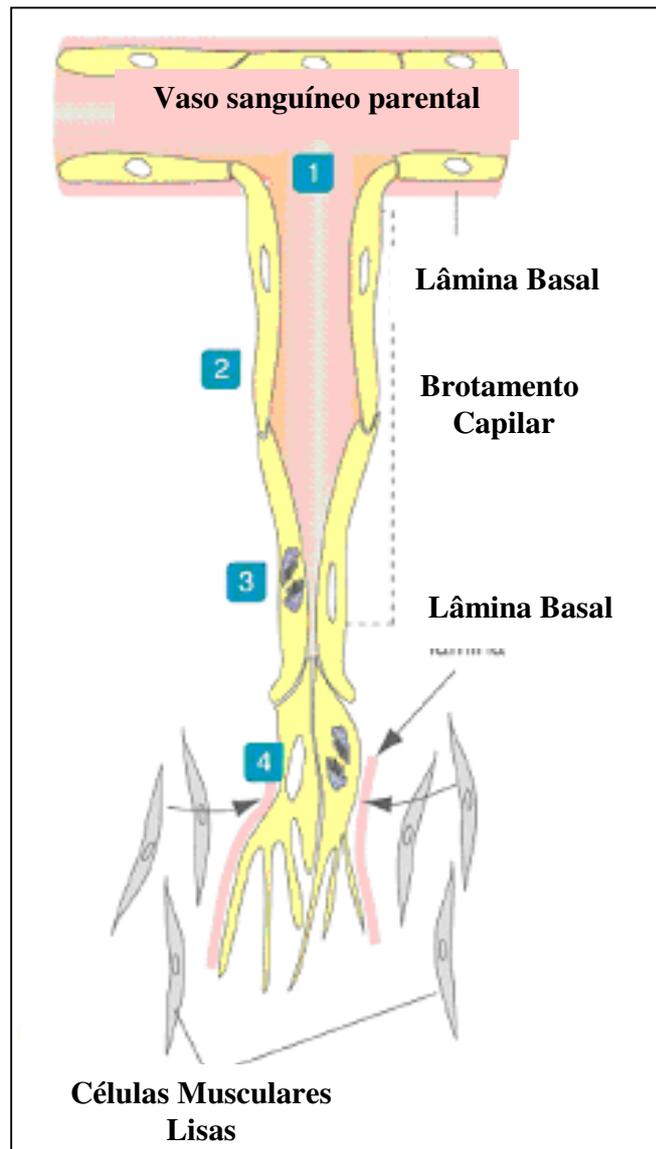


Figura 4: Esquema mostrando o processo de angiogênese. A formação de um novo vaso sanguíneo é iniciada pela degradação da membrana basal e elementos da MEC (1); a partir de estímulos angiogênicos as células endoteliais migram e proliferam (2); ocorre à maturação das células endoteliais (3); tubos capilares são organizados com recrutamento de pericitos e células da musculatura lisa formando um novo vaso sanguíneo (4) (Kierszbaum, 2004).

A formação de novos vasos sanguíneos ocorre raramente em adultos, exceto em casos específicos como cicatrização de feridas e no ciclo menstrual da mulher. A angiogênese pode ocorrer nos processos de reparação e em algumas patologias, o exemplo mais clássico é com relação a processos tumorais (Hanahan e Folkman, 1996) (Figura 5).

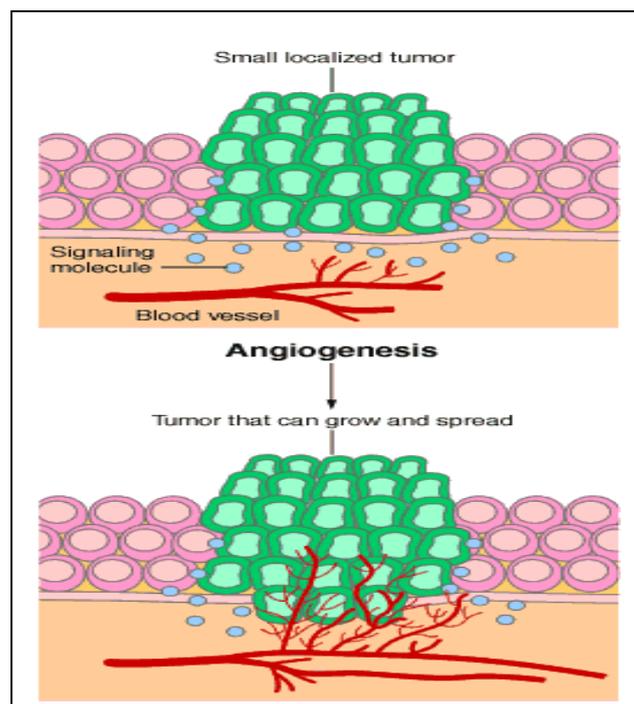


Figura 5: Esquema representativo da angiogênese no crescimento tumoral. As células cancerosas liberam moléculas sinalizadoras aos vasos sanguíneos ao seu redor. Essas moléculas ativam genes do tecido endotelial que estimulam a formação de novos vasos, ocorrendo o crescimento desse tumor. Disponível em: <http://sciencepark.mdanderson.org/surp/seminars/Angiogenesis.pdf>

#### 1.4. FATORES ANGIOGÊNICOS

A angiogênese é controlada pelo intercâmbio entre proteínas que estimulam ou inibem o crescimento de novos vasos sanguíneos. Em situações normais, o balanço entre esses estímulos

tende a inibição e como consequência o crescimento de novos vasos sanguíneos é impedido. Em certas situações patológicas, o controle inibitório local é incapaz de impedir o aumento da ativação de indutores angiogênicos, ocorrendo um crescimento anormal de vasos sanguíneos (Iruela-Arispe e Dvorak., 1997).

Várias moléculas são identificadas como indutoras da angiogênese, pois esse processo é dependente de fatores liberados pelas células. O processo de migração é possibilitado por moléculas presentes na membrana plasmática das células, que promovem contatos pontuais e transitórios com as moléculas de adesão e reconhecimento existentes no meio extracelular. Orientadas por essa sinalização, as células endoteliais organizam-se em arranjos tubulares para formarem os vasos sanguíneos (Yancopoulos e cols., 2000).

#### **1.4.1. Fatores estimuladores da angiogênese**

Para que inicie o mecanismo de angiogênese, é necessário que elementos da matriz extracelular sejam degradados possibilitando a migração e a formação de tubos pelas células endoteliais (Klagsbrun e D'Amore, 1991). A partir daí, as metaloproteinases (MMPs) desempenham um importante papel na angiogênese, pois são enzimas zinco-dependentes capazes de degradar todos os elementos da matriz extracelular. Tem expressão multigênica, sendo possíveis agentes mediadores da remodelagem da matriz extracelular, quando associados a seus inibidores, chamados inibidores tissulares de metaloproteinases (TIMPs). Salamonsen e cols., (1997), descreveram que as MMPs não são importantes apenas no crescimento de novos vasos sanguíneos, mas são responsáveis pela descamação da camada superficial do endométrio durante a menstruação, tendo sua síntese mediada pela progesterona. Segundo Freitas e cols., (1999), a MMP-2 está presente em vasos sanguíneos do endométrio humano durante todo o ciclo

menstrual. As MMPs-3 e -9 também são encontradas em vasos sanguíneos, mas somente na fase secretora do ciclo menstrual. Muitos autores descreveram que concentrações elevadas de MMP-9 circulante estão associadas com invasão e metástase em diferentes processos tumorais (Zucker e cols., 1993; Bernhard e cols., 1994; Hua e cols., 1996). Turner e cols., (2000) mostraram que a expressão de MMP-9 favoreceu um comportamento agressivo em tumores pituitários, e que existe uma correlação direta entre a MMP-9 e o processo de angiogênese nestes tumores.

Suri e cols., (1996) descreveram que a família das angiopoetinas (Ang) desempenha um importante papel no crescimento de vasos sanguíneos. A Ang-1 é expressa em células da musculatura lisa e se liga a um receptor, tie-2, no endotélio dos vasos sanguíneos. Ang-1 induz a fosforilação do receptor tie-2 e previne a apoptose no endotélio. Entretanto, Maisonpierre e cols., (1997), descreveram que a Ang-2 quando se liga ao receptor tie-2, não transmite sinal, fazendo com que a célula endotelial sofra apoptose ocorrendo uma atrofia dos vasos sanguíneos. Esses autores concluem que a Ang-2 é um antagonista natural do receptor tie-2 inibindo a angiogênese. Em contrapartida, Oliner e cols., (2004) demonstraram que a partir do uso de inibidores específicos da Ang-2 o tamanho de tumores é reduzido, ocorrendo também uma diminuição da proliferação de células endoteliais. Esses resultados podem representar uma estratégia antiangiogênica para o tratamento de pacientes com tumores sólidos. Resultados bastante controversos também são vistos com relação ao papel biológico da Ang-3 e Ang-4. Lee e cols., (2004) relataram que a Ang-3 e a Ang-4 induziram a migração de células endoteliais apresentando atividade angiogênica *in vivo*. Entretanto, níveis elevados de Ang-3 têm a capacidade de inibir a angiogênese em modelos de carcinomas (Xu e cols., 2004). Em estudo recente, Olsen e cols., (2006) corroboram com esta teoria. Os autores descreveram que a Ang-4 pode contribuir na regulação e no remodelamento da maturação vascular através da sua atividade antiangiogênica sobre linhagem tumoral humana.

Outro importante estimulador da angiogênese é o fator de crescimento de fibroblasto (FGF). Essa família é composta por nove membros, sendo que o FGF-1, ou FGF ácido (aFGF), e o FGF-2, ou FGF básico (bFGF) são os de maior destaque. Eles interagem com receptores tirosina quinases na membrana plasmática (FGFRs) resultando transduções de sinais em várias células. Esse mecanismo é muito complexo, sendo que para ativá-lo é necessária uma interação com proteoglicanos de heparan sulfato (Hyder e Stancel., 1999). Segundo Klein e cols., (1997), o bFGF induz o aumento da proliferação, migração e diferenciação de células endoteliais, células da musculatura lisa e fibroblastos que expressam FGFRs. Foi demonstrado também, que há um sinergismo entre FGF e VEGF, sendo que o FGF estimula a síntese de VEGF em linhagens de células tumorais (Goto e cols., 1993).

Dentre os fatores que estão envolvidos no crescimento de vasos sanguíneos, o VEGF é o mais importante. É uma glicoproteína homodimérica de 30 – 46 kDa e consiste em 6 membros: VEGF-A, -B, -C, -D, -E e PlGF (Ferrara e Davis-Smyth., 1997). Seus receptores mais conhecidos, o *c-fms-like tyrosine kinase*, Flt-1 (VEGFR-1), e o *kinase domain receptor*, Flk-1 (VEGFR-2) são expressos predominantemente nas células endoteliais (Jakeman e cols., 1992), mas também já foram encontrados em células tumorais de carcinoma ovariano (Boocock e cols., 1995) e em macrófagos peritoneais (McLaren e cols., 1996). Sabe-se que o Flt-1 e o Flk-1 quando ligados ao VEGF, possuem diferentes propriedades de transdução de sinais e possibilitam mediar diferentes funções (Waltenberger e cols., 1994). Apresentam também alguns co-receptores como neuropilinas, heparan-sulfato, caderinas e integrinas, que se ligam a alguns elementos da família VEGF (Neufeld e cols., 1999).

Ferrara e cols., (1996) relataram que a perda de um simples alelo do VEGF é letal em embrião de camundongo entre os dias 11 e 12, sendo que a angiogênese inicial apresenta defeitos resultando em anomalias severas. O VEGF apresenta várias funções biológicas como

proliferação, migração, sobrevivência e permeabilidade das células endoteliais pela ligação com VEGFR-2 (Ferrara, 2001). Segundo Benjamin e cols., (1999), o VEGF é o fator chave para a sobrevivência de células endoteliais, tanto *in vivo* como *in vitro*. Também confere à célula endotelial resistência a estímulos apoptóticos (Gerber e cols., 1998) e induz a produção de MMPs (Unemori e cols., 1992).

#### **1.4.2. Fatores inibidores da angiogênese**

Os inibidores angiogênicos podem ser necessários para manter o crescimento normal dos vasos sanguíneos, prevenindo uma vascularização anormal (Iruela-Arispe e Dvorak, 1997). Em 1980, em estudo com interferon  $\alpha$ , foi demonstrado pela primeira vez a inibição da migração de células endoteliais (Brouty-Boye e Zeter, 1980) (Figura 6).

Em 1990, Ingberg e cols., demonstraram a ação do TNP-470, um análogo sintético da fumagilina que bloqueava efetivamente a migração e a proliferação de células endoteliais, mas seu uso era limitado devido a sua alta toxicidade. Em trabalho mais recente, foi estudado o efeito de um conjugado formado de TNP-470 e caplostatina, um polímero de hidroxipropil metacrilamida (HPMA) em 84 tipos de tumores em camundongos e coelhos. Como resultado, houve uma inibição entre 40 e 100% dos tumores e uma diminuição da toxicidade, demonstrando que esse conjugado é menos tóxico e mais efetivo e que poderia ser usado no tratamento de câncer e inflamações (Satchi-Fainaro e cols., 2005).

Posteriormente, foram descritos dois novos componentes: um fragmento do plasminogênio denominado angiostatina (O'Reilly e cols., 1994), e um fragmento do colágeno XVIII denominado endostatina (O'Reilly e cols., 1997). Estes atuam como inibidores específicos da proliferação de células endoteliais diminuindo o crescimento dos vasos sanguíneos e

impedindo o desenvolvimento dos tumores. Nos modelos experimentais estudados, após a administração desses componentes, o crescimento tumoral era inibido, pois havia um equilíbrio entre apoptose e proliferação de células tumorais (O'Reilly e cols., 1997). Angiostatina e endostatina foram os primeiros componentes descritos, com ação anti-angiogênica originados das próprias células cancerosas. A angiostatina foi identificada na urina e no sangue de camundongos com células tumorais. A endostatina foi isolada de cultura de células de hemangiomas e de tumores originados de células endoteliais. Essas células tumorais aparentemente secretavam fatores que proporcionavam um “feedback” negativo, ocasionando uma inibição do crescimento de vasos sanguíneos (Iruela-Arispe e Dvorak., 1997).

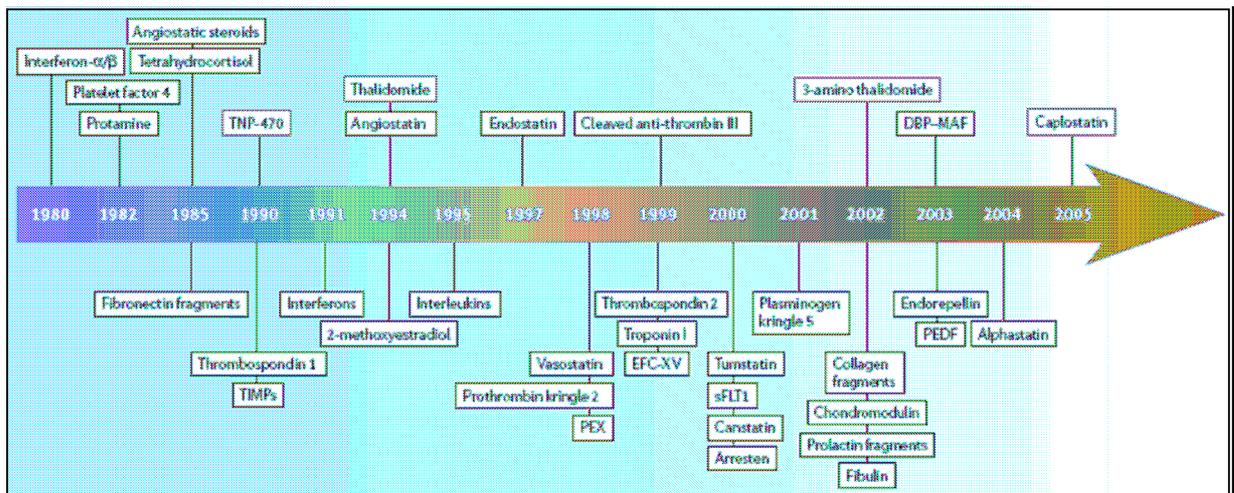


Figura 6: Relação dos inibidores angiogênicos descritos no período entre 1980-2005 (Folkman J, 2007).

A partir do ano de 2003, os compostos com ação anti-angiogênica começaram a ser aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos (Folkman J, 2007). O Bevacizumab, por exemplo, recebeu aprovação do FDA para o tratamento de câncer coloretal em

2004, sendo o primeiro composto inibidor da angiogênese (Hurwitz e cols., 2004). Atualmente, 43 componentes com efeitos anti-angiogênico são estudados em ensaios clínicos nos Estados Unidos para o tratamento de diferentes tipos de câncer, destes, 10 estão em fase III (Folkman J, 2007).

### **1.5. ENDOMETRIOSE E ANGIOGÊNESE**

Acredita-se que a endometriose se origina a partir de fragmentos de endométrio que, por fluxo menstrual retrógrado, se implantam em localização extra-uterina (Sampson., 1927). Para a sobrevivência do endométrio ectópico, a formação de vasos sanguíneos é essencial; isso sugere que a angiogênese é um pré-requisito para o desenvolvimento da endometriose (Nap e cols., 2004).

Através da visão macroscópica, algumas lesões endometrióticas apresentam alta vascularização ao seu redor (Oosterlynck e cols., 1993) (Figura 7). No entanto, estudos sobre a vascularização das lesões endometrióticas são raros. Matsuzaki e cols., (2001), usando CD34 como marcador endotelial, não relataram diferenças na densidade vascular entre lesões endometrióticas peritoneais e endométrio tópico, e sim no diâmetro dos vasos; lesões maiores apresentaram vasos sanguíneos de maior diâmetro. Por outro lado, através de imunomarcações para Fator de Von Willebrand, outro importante marcador endotelial, Hull e cols., (2003) demonstraram um aumento na densidade vascular de lesões endometrióticas.

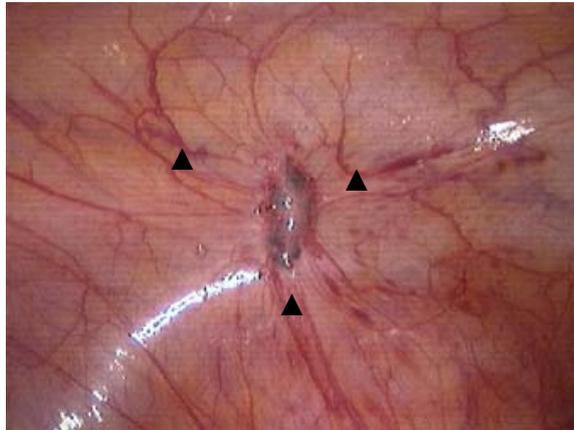


Figura 7: Visão macroscópica de lesão endometriótica no peritônio. Nota-se a alta vascularização ao redor do foco de lesão endometriótica (▲) (Groothuis e cols., 2005).

Apesar de ser uma doença benigna, a endometriose exibe proliferação celular, invasão celular e neoangiogênese, muitas vezes se comportando com agressividade de doença maligna (Abrao e cols., 2006). Sendo assim, a degradação da matriz extracelular torna-se um passo primordial para a implantação do tecido endometrial em locais ectópicos. Kokorine e cols., (1997) demonstraram que a MMP-1 é importante no remodelamento tecidual e no processo de implante peritoneal do tecido endometrial. Estudando a MMP-2 no endométrio uterino e em implantes endometriais, Wenzl e Heinzl, (1998), observaram uma maior distribuição em localização ectópica, sendo descrito que esta enzima possui funções na implantação endometrial. Em análise molecular da MMP-3, Cox e cols., (2001) relataram uma maior expressão em lesões endometrióticas comparada com o endométrio normal. Com relação a MMP-9, existem vários trabalhos relatando níveis elevados desta enzima em lesões de endometriose (Chung e cols., 2001; Lui e cols., 2002; Chen e cols., 2004). No entanto, em estudos mais recentes, os autores têm procurado analisar o papel da MMP-9 tanto em implantes endometriais ectópicos, quanto no endométrio tópico de mulheres com endometriose. Collette e cols., (2004) em estudo *in vitro*,

demonstraram um aumento da liberação de MMP-9 pelo endométrio tópico de mulheres com endometriose comparados com o endométrio normal, sugerindo uma possível mudança na expressão desta MMP no endométrio tópico. Os autores relatam que esta hipótese é suportada pelo fato de que o endométrio de mulheres com endometriose aparentemente é mais invasivo ao implante peritoneal. Em outro estudo, Collette e cols., (2006) relataram novamente os níveis elevados de MMP-9 em endométrio tópico de mulheres com endometriose, mas também observaram uma baixa expressão de seu inibidor natural TIMP-1, tanto da proteína quanto dos níveis de RNAm. Isto pode refletir *in vivo*, no aumento da capacidade do tecido de invadir e quebrar a membrana basal. Desta forma, favorece o crescimento de novos vasos sanguíneos e posteriormente a implantação e o desenvolvimento da endometriose.

Shifren e cols., (1996), relatam que o VEGF pela ação angiogênica provavelmente age no tecido endometrial ectópico, favorecendo sua perpetuação e infiltração, uma vez que o implante endometrial ectópico apresenta grande rede vascular ao seu redor. Na mesma época, McLaren e cols., (1996) descreveram que mulheres com endometriose possuem quantidades elevadas de VEGF no líquido peritoneal. Esses autores observaram variações cíclicas nas concentrações de VEGF em mulheres com endometriose, sendo que a concentração foi maior na fase proliferativa em relação à fase secretora. Esses dados sugerem que níveis elevados de VEGF em mulheres com endometriose podem ser importantes na patogênese da doença. Os mesmos autores descreveram ainda que o VEGF é produzido e secretado no líquido peritoneal, principalmente por macrófagos ali presentes, tendo sua produção aumentada quando estes estão ativados. Ressaltam também que os esteróides ovarianos estimulam a produção de VEGF, e que sua concentração aumentada em mulheres com endometriose tem possível correlação com a maior gravidade da doença.

Oosterlynck e cols., (1993), observaram uma maior quantidade de fatores angiogênicos no líquido peritoneal em mulheres com endometriose, não havendo correlação entre a severidade da doença e a presença de fatores angiogênicos. Em contra posição, Gagné e cols., (2003), não encontraram diferenças significativas nas concentrações de VEGF em soro de mulheres com e sem endometriose, concluindo que a doença não está associada com níveis elevados de VEGF na circulação.

Estudando outros fatores angiogênicos que possam estar interferindo também no desenvolvimento da endometriose, Hayrabyan e cols., (2005) descreveram que o fator de crescimento do fibroblasto (FGF) está envolvido no remodelamento vascular na angiogênese endometriótica, desempenhando importante papel na formação da parede vascular e na migração de células endoteliais. Nesta mesma linha, Laschke e cols., (2005) analisaram o efeito do inibidor do VEGF (SU5416) e de uma combinação de inibidores do VEGF, FGF e PDGF (SU6668) sobre a angiogênese de lesões endometrióticas em camundongos. Como resultado, houve uma redução mais significativa da angiogênese quando utilizado o inibidor dos três fatores, mostrando que a vascularização destas lesões ectópicas depende não somente do VEGF, mas também de outros fatores como FGF e PDGF.

Recentemente em nosso laboratório, analisamos através de imunohistoquímica a densidade vascular e a distribuição do VEGF e seu receptor Flk-1 em endométrio tóxico e em três diferentes locais de endometriose humana: ovário, bexiga e reto-sigmóide. Como resultado foi encontrado uma maior quantidade de vasos sanguíneos e uma maior imunomarcagem do VEGF e Flk-1 nos casos de endometriose de reto-sigmóide. Esses dados demonstram que a angiogênese é encontrada predominantemente em casos de doença infiltrativa profunda e reforça a hipótese do uso de terapias anti-angiogênicas no tratamento da endometriose, especialmente nos casos de doença infiltrativa profunda (Machado e cols., 2008).

## 1.6. TERAPIAS ANTI-ANGIOGÊNICAS NA ENDOMETRIOSE

Considerando que a angiogênese é importante na patogênese da endometriose, componentes angiostáticos podem interferir no desenvolvimento das lesões. Hull e cols., (2003), demonstraram pela primeira vez que agentes anti-angiogênicos podem inibir o crescimento de implantes em modelos de endometriose *in vivo*. Os autores testaram 2 antagonistas do VEGF e sugeriram que esses agentes poderiam ser utilizados como novo modelo de tratamento da endometriose. Nap e cols., (2005), avaliaram a ação de agentes angiostáticos utilizando modelo de endometriose em membrana de galinha. Os autores relataram uma diminuição na resposta angiogênica a partir da administração destes agentes na presença do endométrio humano, sugerindo que o endométrio induz a resposta angiogênica durante a implantação no ambiente ectópico. Utilizando modelo de endometriose em macacos Rhesus, Park e cols., (2004) reportaram a inibição do desenvolvimento das lesões através do bloqueio do receptor do VEGF. A presença da endometriose foi visualizada e confirmada histologicamente em 5 dos 6 (83%) macacos no grupo controle, comparado com 1 de 6 (17%) macacos no grupo de estudo.

A partir dos primeiros resultados obtidos através de estudos da angiogênese e de agentes angiostáticos em modelos de endometriose, a busca de outras substâncias que possam estar influenciando diretamente no desenvolvimento das lesões endometrióticas torna-se bastante relevante, assim como a investigação de possíveis fármacos de ação anti-angiogênica mais efetivos na busca de um tratamento clínico ideal para esta patologia.

## 1.7. CICLOOXIGENASE-2

Há duas principais isoformas da enzima ciclooxigenase: COX-1 e COX-2. A diferença mais importante entre as duas isoformas é o padrão de expressão e regulação tecidual. A COX-1 é expressa virtualmente em todos os tecidos, principalmente células sangüíneas e endoteliais, trato gastrointestinal, micro-vascularização renal, glomérulos e ductos coletores. A isoforma COX-2 não é detectada na maioria dos tecidos normais, entretanto, é induzida em sítios inflamatórios por citocinas, fatores de crescimento ou promotores tumorais (Vane e cols., 1996). Há ainda a COX-3, que foi identificada como sendo um variante de “*splicing*” do gene da COX-1, encontrada principalmente no sistema nervoso central (Chandrasekharan e cols., 2002). A principal função das ciclooxigenases 1 e 2 é catalisar a conversão do ácido araquidônico, obtido a partir da membrana nuclear pelas fosfolipases  $A_2$ , em prostaglandinas (PGs), tromboxanos e prostaciclina (Figura 8). A via metabólica do ácido araquidônico é importante na produção de mediadores lipídicos com papel fisiológico na hemostasia e na manutenção da mucosa gástrica, bem como em processos como dor, febre e inflamação. A COX-1 sintetiza prostaglandinas que são requeridas pela fisiologia normal da função de citoproteção gastrointestinal, de ativação plaquetária e do parto. Como a COX-2 é indutível, em sítios inflamatórios esta enzima sintetiza prostaglandinas que estão relacionadas com os processos patológicos como dor, febre e inflamação. Algumas dessas substâncias produzidas, como a prostaglandina- $E_2$  ( $PGE_2$ ), podem afetar também a proliferação celular, apoptose e angiogênese, sugerindo que o aumento na produção de PGs possa contribuir ativamente para a progressão de células malignas (Cao e Prescott, 2002).

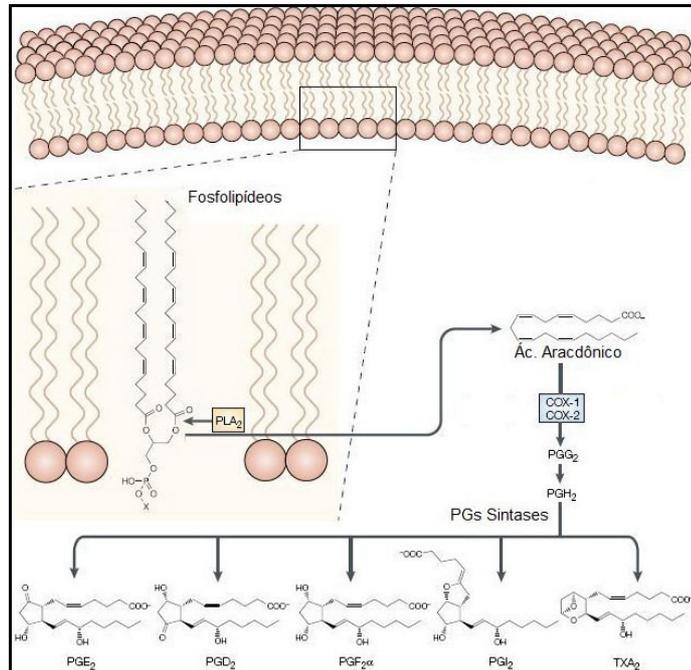


Figura 8: Via das Ciclooxigenases (Adaptado de: Gupta, RA & DuBois, RN, 2001): O Ácido Aracdônico, obtido de membranas celulares pelas fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), é convertido em prostaglandinas (PGs) pela ação das enzimas COX (1 e 2). Prostaglandinas sintases convertem a PGH<sub>2</sub> no produto final. (Tomboxano A<sub>2</sub>: TxA<sub>2</sub>)

A ação antiinflamatória dos agentes não-esteroidais (AINEs) está claramente relacionada com a inibição da COX, e é provável que, quando utilizados como agentes antiinflamatórios, seus efeitos indesejáveis decorram, em grande parte, da inibição da COX-1. (Goodman & Gilman, 2003 e Chan e cols., 2004). Por outro lado, os inibidores seletivos de COX-2 são fármacos que, em sua dosagem terapêutica, inibem apenas a isoforma COX-2, sem interferência na atividade COX-1. Tais compostos foram intitulados coxibs, sendo o celecoxib o primeiro a ser aprovado pelo FDA para uso nos Estados Unidos (Fort, 1999). Mais recente, foi introduzido no mercado o parecoxib, o primeiro inibidor específico da COX-2 para uso parenteral e com propriedades farmacológicas semelhantes aos demais coxibs (Cheer e Goa, 2001).

Segundo Gately (2000), a ativação da COX-2 resulta no aumento da expressão de VEGF, induzindo a diferenciação, proliferação e migração de células endoteliais sobre uma variedade de condições patológicas. A partir destes dados, estudos têm demonstrado que inibidores seletivos da COX-2, além de inibir a síntese de prostaglandinas em processos inflamatórios, possuem atividade anti-angiogênica em diferentes tipos de implantes tumorais (Masferrer e cols., 2000) e ainda podem inibir diretamente a proliferação de células endoteliais (Yazawa e cols., 2005). Nesta mesma linha, estudos pré-clínicos e epidemiológicos mais recentes sugerem que inibidores seletivos da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) também podem reduzir o risco de desenvolvimento de câncer, inibindo o crescimento tumoral, proliferação e angiogênese, e aumentando a apoptose de células tumorais (Subbaramaiah e Dannenberg, 2003; Kakizoe, 2003).

### **1.8. INIBIDORES DA COX-2 E ENDOMETRIOSE**

Em situações normais, a COX-2 é distribuída no epitélio glandular endometrial e no endotélio vascular de mulheres, sendo sua expressão mais baixa na fase proliferativa inicial e aumentando gradativamente atingindo seu pico na fase secretora. Ota e cols., (2001) em estudo com 35 pacientes com endometriose, encontraram uma maior expressão de COX-2 no epitélio glandular de mulheres com endometriose comparado com endométrio normal. Resultados similares foram descritos por Chishima e cols., (2002), que demonstraram uma maior marcação de COX-2 em implantes endometrióticos quando comparado com endométrio tópico. Os autores também relataram, que os níveis de mRNA COX-2 encontrados na endometriose foi 5 vezes maior comparado com o controle. O mecanismo da superexpressão da COX-2 na endometriose não está claro, mas indica que deve ocorrer devido ao aumento da resposta autoimune do tecido endometriótico, sendo a COX-2 liberada por citocinas ainda não conhecidas. Entretanto, a

diminuição da atividade da COX-2 em tecido endometriótico através do uso de seus inibidores, pode significar uma nova estratégia de tratamento para a endometriose.

Efstahiou e cols., (2005) avaliaram o efeito de diferentes fármacos inibidores da COX em modelo murino de endometriose. Como resultados os autores obtiveram uma diminuição das lesões endometrióticas quando utilizado o fármaco celecoxib, e concluem que esses agentes podem atuar efetivamente na inibição do estabelecimento e no crescimento das lesões endometrióticas no modelo utilizado. Nesta mesma linha, Ozawa e cols., (2006) analisaram o efeito do inibidor seletivo da COX-2 NS398 sobre implantes endometrióticos em camundongos. Neste estudo foi observado uma diminuição no tamanho das lesões, na densidade vascular e nos níveis de VEGF em animais que utilizaram este inibidor, o que sugere uma possível relação destas alterações com o efeito anti-angiogênico do inibidor usado.

Estudos relatam que a partir da inibição da COX-2, é vista uma diminuição da atividade angiogênica em vários tipos de câncer, em modelos de angiogênese em ratos e também em modelos de tumores *in vivo* (Majima e cols., 1997; Sawaoka e cols., 1999; Masferrer e cols., 2000). Ma e cols., (2002) descreveram que os antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs) têm mostrado efeitos divergentes no balanço entre fatores anti-angiogênicos e pro-angiogênicos no soro. Especificamente, os autores relataram que a celecoxib inibe a angiogênese através do aumento dos níveis séricos de endostatina em modelo de úlcera gástrica.

Conforme descrito anteriormente, a angiogênese é um pré-requisito para o desenvolvimento da endometriose, e, além disso, sabe-se que a COX-2 possui atividade angiogênica. Coletivamente, esses estudos indicam que o mecanismo de ação dos AINEs inibindo o desenvolvimento de lesões endometrióticas incluem os efeitos sobre a angiogênese, inflamação, permeabilidade vascular, apoptose. Diferenças em um destes parâmetros, como também as diferenças na farmacocinética, podem contribuir para a eficácia nesses modelos.

## **2. OBJETIVO GERAL**

Considerando a importância da formação de novos vasos sanguíneos no desenvolvimento de lesões endometrióticas, o objetivo principal deste trabalho é estudar o processo da angiogênese na endometriose experimental, com ênfase no papel do VEGF e suas possíveis interações com MMP-9 e COX-2. Por outro lado, pretendemos avaliar a resposta terapêutica destas lesões a partir do uso de inibidores da COX-2, na hipótese de um tratamento clínico mais efetivo desta patologia.

### **2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

**Estabelecimento de modelo animal de endometriose peritoneal em Ratas Wistar a partir de transplante autólogo do endométrio.**

**Análise das possíveis lesões encontradas a partir dos implantes e também do endométrio tópico:**

- Caracterização morfológica das lesões utilizando técnicas histológicas;
- Estudo da distribuição de vasos sanguíneos utilizando imunomarcção para Fator de Von Willebrand e  $\alpha$ -actina de músculo liso;
- Avaliação da expressão e distribuição de VEGF e seu receptor Flk-1 utilizando RT-PCR e imunohistoquímica;
- Estudo da presença de macrófagos ativos utilizando imunomarcção para ED-1;

- Caracterização da expressão de MMP-9 utilizando RT-PCR.

**Avaliar a distribuição e expressão de COX-2 no modelo experimental e no endométrio tópico:**

- Caracterização da presença de COX-2 utilizando RT-PCR e imunohistoquímica.

**Analisar a resposta terapêutica a partir de tratamentos com inibidor seletivo da COX-2 no modelo experimental de endometriose:**

- Análise da manutenção e o desenvolvimento das lesões implantadas;

- Identificação de vasos sanguíneos utilizando imunomarcção para Fator de Von Willebrand;

- Estudo da expressão e distribuição de VEGF e seu receptor Flk-1 utilizando RT-PCR e imunohistoquímica;

- Estudo da presença de macrófagos ativos utilizando imunomarcção para ED-1;

- Caracterização da expressão de MMP-9 utilizando RT-PCR;

- Caracterização da presença de COX-2 utilizando RT-PCR e imunohistoquímica;

- Avaliação das concentrações de PGE<sub>2</sub> utilizando ensaios enzimáticos.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

Esse projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pela Comissão de Avaliação do Uso de Animais em Pesquisa (CAUAP) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) - Processo IBCCF 009 (anexo I).

#### **3.1. Estabelecimento de modelo experimental de endometriose peritoneal em Ratas Wistar a partir de transplante autólogo do endométrio.**

Foram utilizadas 30 ratas Wistar com 8 semanas de vida pesando em torno de 200 gramas. O modelo foi o mesmo empregado por Vernon e Wilson (1985), sendo realizada uma incisão na linha alba, sob anestesia intra-peritoneal com 0,6 Rompum® (Ketamina) + 0,2 Xilazina 2% em condições limpas porém não assépticas, ligadura e secção do corno uterino direito. Em placa de Petri com solução salina, o útero foi aberto longitudinalmente e o endométrio foi seccionado em fragmentos de 3-4mm<sup>2</sup> para posteriormente ser implantado na cavidade peritoneal utilizando fio de Nylon 6-0 (3 implantes/animal). O fechamento da parede abdominal foi feito com fio de Nylon 3-0.

#### **3.2. Caracterização morfológica das lesões e do endométrio tópico**

Em tempos determinados de 10 (n = 10), 15 (n = 10) e 30 (n = 10) dias após os implantes, foram realizadas eutanásias nos animais para avaliação macroscópica, sendo observado parâmetros de crescimento das lesões (comprimento e largura). As amostras das lesões

endometrióticas e do endométrio tópico foram coletadas, sendo fixadas em formol tamponado e emblocadas em parafina para análise histológica com coloração de hematoxilina-eosina, e para o estudo imunohistoquímico. As lesões foram confirmadas com a observação de componentes estromais e/ou glandulares endometriais nos tecidos analisados. Os cortes estudados que não apresentaram componentes endometriais foram descartados.

### **3.3. Estudo imunohistoquímico**

Para o estudo da distribuição de vasos sanguíneos foram realizadas imunomarcações para Fator de Von Willebrand (vWF), pois essa glicoproteína é encontrada em células endoteliais sendo utilizada como marcador de endotélio vascular, e para  $\alpha$ -actina de músculo liso, pois está presente em células musculares que estabilizam novos vasos sanguíneos. Concomitantemente, também foi realizada imunomarcação para identificação do VEGF e seu receptor Flk-1 e COX-2; e para observação de macrófagos ativos foi utilizada imunomarcação para ED-1. O protocolo utilizado para os estudos imunohistoquímicos foi o seguinte:

As lâminas foram colocadas em estufa por 30 min e em seguida foram desparafinizadas com 3 banhos de xilol por 20 min cada e hidratadas com 3 banhos com álcool por 5 min cada. Logo após foi realizada a recuperação antigênica com tampão citrato 0,01M, pH 6,0 em panela de pressão. As lavagens entre as várias etapas foram feitas com tampão fosfato (PBS 0,1M, pH 7,4) em banhos sucessivos de 5 min. Foi feito bloqueio da peroxidase endógena com peróxido 3% por 15 min em temperatura ambiente. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi feito com PBS/BSA 5% por 30 min em câmara úmida. Os cortes foram incubados com anticorpos primários policlonal anti-vWF(A 0082 - DAKO – EUA) 1:100; monoclonal anti- $\alpha$ -actina de músculo liso monoclonal (M 0851 – DAKO – USA) 1:100; anti-VEGF (SC 7269 – Santa Cruz Biotechnology) 1:100;

policlonal anti-Flk-1 (SC 6251 – Santa Cruz Biotechnology) 1:200; policlonal anti-COX-2 (SC 1745 - Santa Cruz Biotechnology) 1:100; monoclonal anti-ED-1 (AB 31630 – Abcam – EUA) 1:200; todos diluídos em PBS/BSA 1% em câmara úmida overnight. Para controle negativo foi utilizado PBS/BSA 1% no lugar do anticorpo monoclonal e soro normal de coelho no lugar dos anticorpos policlonais. Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotilado LSAB 1 (K 0690 - DAKO - EUA) por 30 min, e posteriormente incubados com anticorpo secundário LSAB 2 (K 0690 - DAKO - EUA) por 30 min. Os cortes foram revelados com diaminobenzidina (DAB) (K 3468 - DAKO - EUA) e contrastados com hematoxilina de Meyer. Os cortes foram então hidratados em 3 banhos sucessivos de álcool 70%, 80% e 100%, clarificados em xilol (I, II e III) (5 min/cada), e montados com Entellan para serem observados por microscopia ótica.

### **3.4. Estudo histomorfométrico e análise estatística**

A obtenção dos resultados utilizados para análise estatística foi feita através da observação microscópica (microscopia ótica) dos cortes de endométrio e endometriose de ratas marcados com vWF,  $\alpha$ -actina de músculo liso, VEGF, Flk-1, COX-2 e ED-1, fotografados em câmera digital e posteriormente analisados em programa de análise de imagem Image Pro Plus 4.0. Para cada lâmina foram analisados 10 campos aleatórios de maior aumento (40X), utilizando a média dos resultados obtidos. A contagem dos vasos sanguíneos marcados para vWF e  $\alpha$ -actina de músculo liso foi feita manualmente (tag points), lembrando que em tecidos endometrióticos, serão contados apenas os vasos sanguíneos presentes nas lesões. As contagens das áreas marcadas com VEGF, Flk-1, COX-2 e ED-1 foram correlacionadas com as áreas demarcadas (per área), expressas em porcentagem.

Para análise estatística utilizamos o programa Primer. Os gráficos foram feitos no programa *Oringin Graph*. Os dados foram representados em tabelas e gráficos, sendo informado a Média, Desvio Padrão ( $x \pm DP$ ) e Erro Padrão, conforme teste estatístico utilizado. Para comparação entre os endométrios nos diferentes tratamentos, foi utilizado One Way RM ANOVA com pós-teste Student-Newmans-Keul. Para essas análises, um  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

### **3.5. Análise semiquantitativa por RT-PCR**

Uma outra parte do material foi destinada ao estudo da expressão do VEGF, Flk-1, MMP-9 e COX-2 utilizando a técnica de *reverse transcriptase chain reaction* (RT-PCR). Logo após a coleta, a amostra foi colocada em trizol para a extração do RNA total. O material foi quantificado por espectrofotometria (260 nm) e uma quantidade de 2  $\mu$ g de RNA total foi utilizada para síntese da primeira fita de cDNA, de acordo com o protocolo recomendado pelo fornecedor do Oligo (dT) Primer, Gibco-BRL; foram utilizados aproximadamente 200 ng de cDNA para cada amplificação a partir de oligos específicos (Tabela 2). Todas as amostras foram amplificadas no termociclador nas mesmas condições: desnaturação em 4-min a 95°C seguido de ciclos de 30 s a 94°C (desnaturação), 45 s a 61°C (anelamento) e 45 s a 72°C (extensão). Os produtos finais foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% e marcados com brometo de etídio. A análise semiquantitativa das bandas foi determinada usando o Scion Image Alpha 4.0.3.2

Ensaio	Tipo	Sequência
<b>VEGF</b>	Senso	5'-ACC ATG AAC TTT CTG CTC-3'
	Reverso	5'-GGA CGG CTT GAA GAT ATA-3'
<b>Flk-1</b>	Senso	5'-GCA CTG AAT TAT GGG AGA-3'
	Reverso	5'-ATG TGA TTT TCT TCT TGA TG-3'
<b>MMP-9</b>	Senso	5'-GTT TCT GCC CCA GTG AGA ATC TC-3'
	Reverso	5'-TGC TGG ATG TCT TTT ATG TCG-3'
<b>COX-2</b>	Senso	5'-CAT GAT CTA CCC TCC CCA CG-3'
	Reverso	5'-CAG ACC AAA GAC TTC CTG CCC-3'
GAPDH	Senso	5'-CAC CAC CAT GGA GAA GGC-3'
	Reverso	5'-CCA TCC ACA GTC TTC TGA-3'

Tabela 2: Lista dos oligos utilizados nas reações de PCR

### 3.6. Extração e Quantificação de Prostaglandina (PGE<sub>2</sub>)

As concentrações de PGE<sub>2</sub> foram determinadas por Imunoensaio Enzimático (Kit Cayman Chemical, Ann Arbor, MI), conforme as recomendações do fabricante. O método baseia-se no princípio de competição por anticorpo monoclonal específico. A PGE<sub>2</sub> dos plasma tecidos compete no mesmo sítio com a PGE<sub>2</sub> conjugado a uma acetilcolinesterase (PGE<sub>2</sub>AChE). Conforme Pradeles e cols., (1985), o anticorpo monoclonal específico liga-se ao anticorpo policlonal anti-coelho IgG e, em seguida, ocorre a competição entre a PGE<sub>2</sub> livre e a PGE<sub>2</sub>AChE, sendo que a quantidade de PGE<sub>2</sub>AChE adicionada é constante, e a sua capacidade de se ligar ao anticorpo é inversamente proporcional à quantidade de PGE<sub>2</sub> livre de cada

amostra. A placa então foi lavada a fim de remover o excesso de reagentes e, em seguida, é adicionado um reagente, que contém o substrato AChE (Ellman's Reagente). O resultado dessa reação enzimática foi a produção de uma cor amarela, que é determinada por um espectrofotômetro Spectra Max®, (Molecular Device Corporation, Sunnyvale, Califórnia – EUA) na absorvância de 412nm, sendo proporcional à quantidade de PGE<sub>2</sub>AChE. As concentrações de PGE<sub>2</sub> foram automaticamente quantificadas em uma curva de calibração, utilizando-se do programa SoftMax (Molecular Device Corporation, Sunnyvale, Califórnia – EUA).

### **3.7. Tratamentos com inibidor seletivo da COX-2 no modelo experimental de endometriose**

Para a realização dos tratamentos foram utilizadas 20 ratas Wistar com 8 semanas de vida pesando em torno de 200 gramas. Foi utilizado o inibidor seletivo de COX-2 Parecoxib (Laboratórios Pfizer), sendo estabelecida doses diárias de 3mg/kg no período de 30 dias, administradas via intramuscular. Os animais foram divididos em 2 grupos: Grupo 1 (controle) recebeu salina (n = 10), e Grupo 2 foi tratado com parecoxib (n = 10). 15 dias após a realização dos implantes endometriais nos animais em estudo, foi realizada uma incisão na linha alba para confirmar a viabilidade das lesões endometrióticas. Nos animais que apresentaram lesões bem estabelecidas, os tratamentos foram iniciados nos tempos e doses estabelecidas. A seguir, foram realizadas eutanásias nos animais para observação macroscópica das lesões. Parâmetros como comprimento e largura foram analisados para que possamos avaliar a resposta terapêutica do medicamento utilizado, sendo comparados com animais que receberam apenas injeções de salina. Por fim, as amostras de endométrio e de endometriose foram coletadas para as análises

imunohistoquímicas da distribuição de vasos sanguíneos e da presença de VEGF, Flk-1, MMP-9 e COX-2, empregando o mesmo protocolo descrito anteriormente.

## **4. RESULTADOS**

Os resultados obtidos neste trabalho foram divididos em 3 partes: na primeira parte estão contidos todos os dados relacionados ao estabelecimento de modelo experimental de endometriose e o perfil angiogênico das lesões estabelecidas. Na segunda parte foi realizado o estudo da distribuição e da expressão de COX-2 no modelo experimental de endometriose. Na última parte estão contidos os resultados obtidos a partir dos tratamentos com inibidor seletivo de COX-2.

### **4.1. PARTE 1: ESTABELECIMENTO DE MODELO EXPERIMENTAL DE ENDOMETRIOSE PERITONEAL**

O estabelecimento das lesões foi realizado conforme Vernon e Wilson (1985). A região peritoneal foi aberta sendo localizado e retirado apenas um corno uterino (Figura 9 A e B); a seguir, o corno uterino retirado foi colocado em meio de cultura DMEM F-12 (Figura 9 C) e aberto de forma longitudinal para a coleta de fragmentos do endométrio medindo 3-4mm<sup>2</sup> (Figura 9 D).

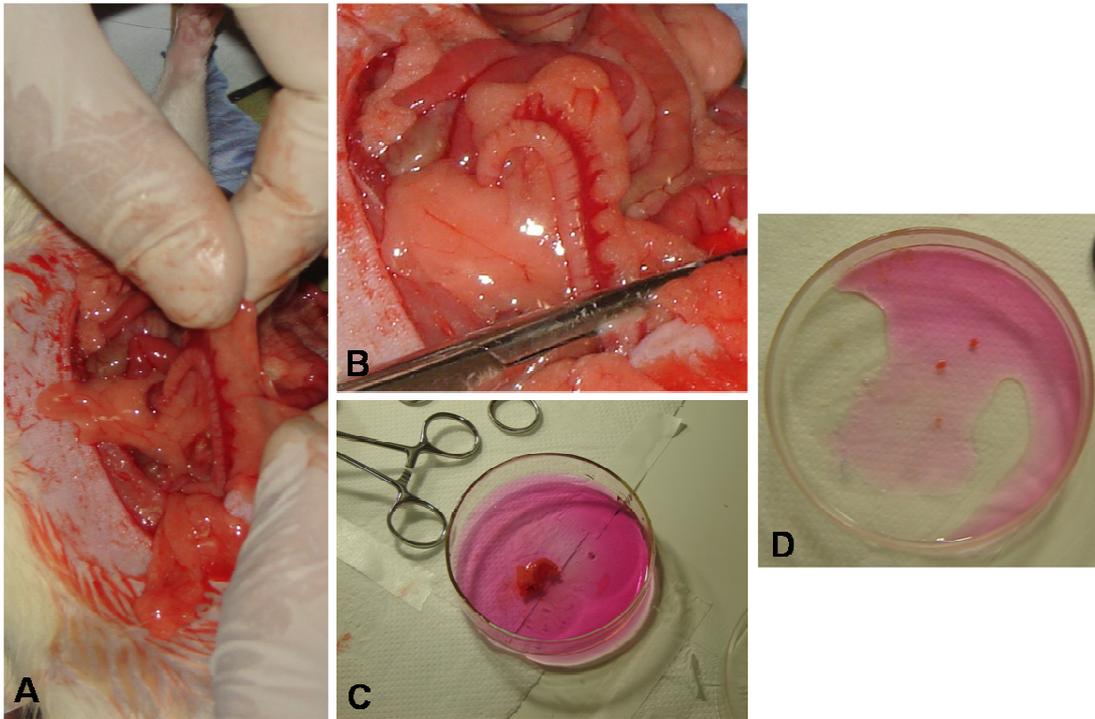


Figura 9: Procedimento cirúrgico para o estabelecimento das lesões endometrióticas em ratas. (A) Região peritoneal aberta e útero localizado; (B e C) Corno uterino retirado e colocado em meio de cultura; (D) Fragmentos de endométrio medindo  $3-4\text{mm}^2$  coletados após a abertura longitudinal do corno uterino.

Os fragmentos do endométrio foram a seguir implantados na cavidade peritoneal dos animais por meio de fio de sutura, sendo o abdômen posteriormente fechado. A visão macroscópica dos implantes iniciais medindo entre  $3-4\text{mm}^2$  é observada na Figura 10.

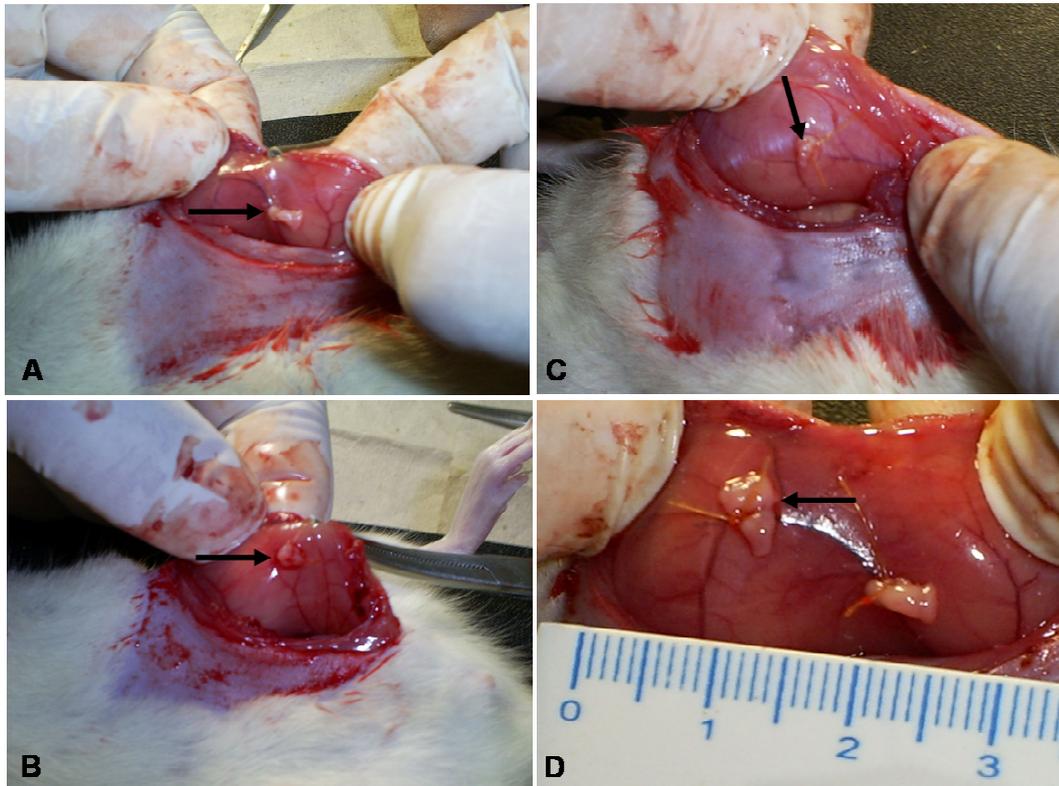


Figura 10: Visão macroscópica dos implantes endometriais na cavidade peritoneal de ratas em tempo zero. Implantes iniciais de fragmentos de endométrio medindo  $3-4\text{mm}^2$  suturados na cavidade peritoneal de ratas ( $\rightarrow$ ).

#### 4.1.1. Caracterização morfológica das lesões e do endométrio tópico

Após 10, 15 e 30 dias, os animais foram sacrificados para avaliação macroscópica das lesões, utilizando parâmetros de comprimento x largura. Após estas observações, as amostras do endométrio tópico e das lesões endometrióticas foram coletadas para análise histológica através da coloração de HE.

Com 10 dias, os implantes não estavam completamente aderidos sendo facilmente removidos. Na análise macroscópica, observa-se um crescimento dos implantes em relação ao

inicial, conforme ilustrado na figura 11. Esse resultado indicou a necessidade de um tempo maior para o estabelecimento da lesão.

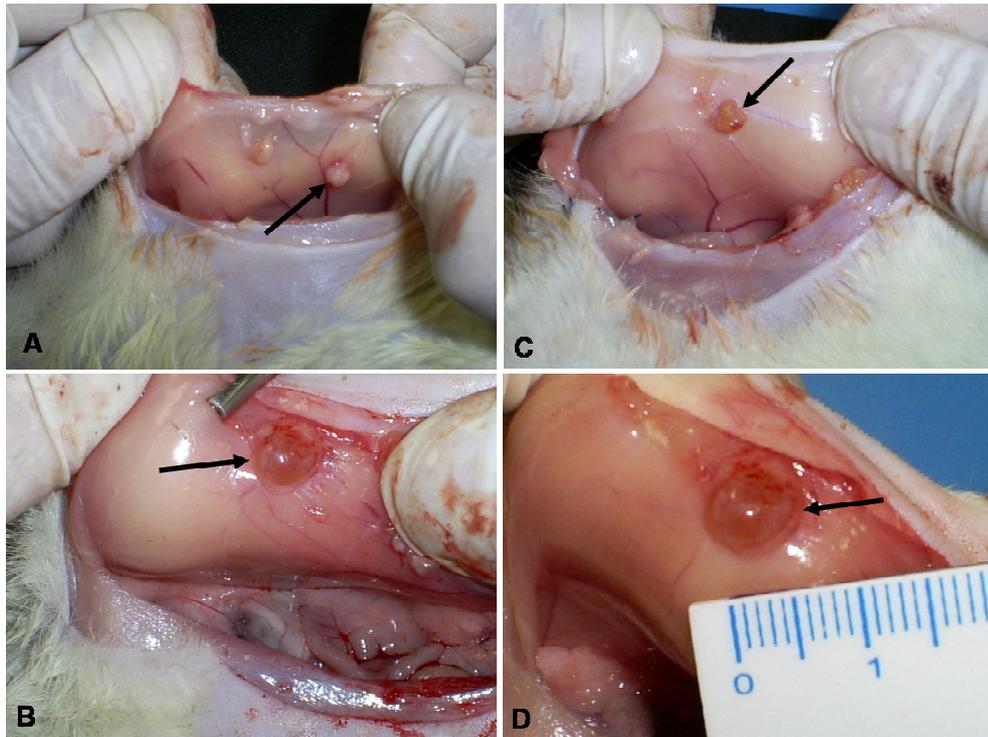


Figura 11: Visão macroscópica dos implantes na cavidade peritoneal de ratas com 10 dias após os implantes iniciais. Observa-se um crescimento dos implantes iniciando seu estabelecimento na cavidade peritoneal (→).

Na análise histológica de ratas 10 dias após os implantes iniciais, o endométrio tópico apresentou um estroma muito celular, abundantemente vascularizado e com pouco edema; o epitélio glandular era do tipo colunar simples e com citoplasma muito vacuolizado (Figura 12 A e B). Com relação aos implantes endometrióticos, estes apresentaram características morfológicas semelhantes ao endométrio tópico, com presença de um epitélio vacuolizado e um estroma muito vascularizado. (Figura 12 C e D).

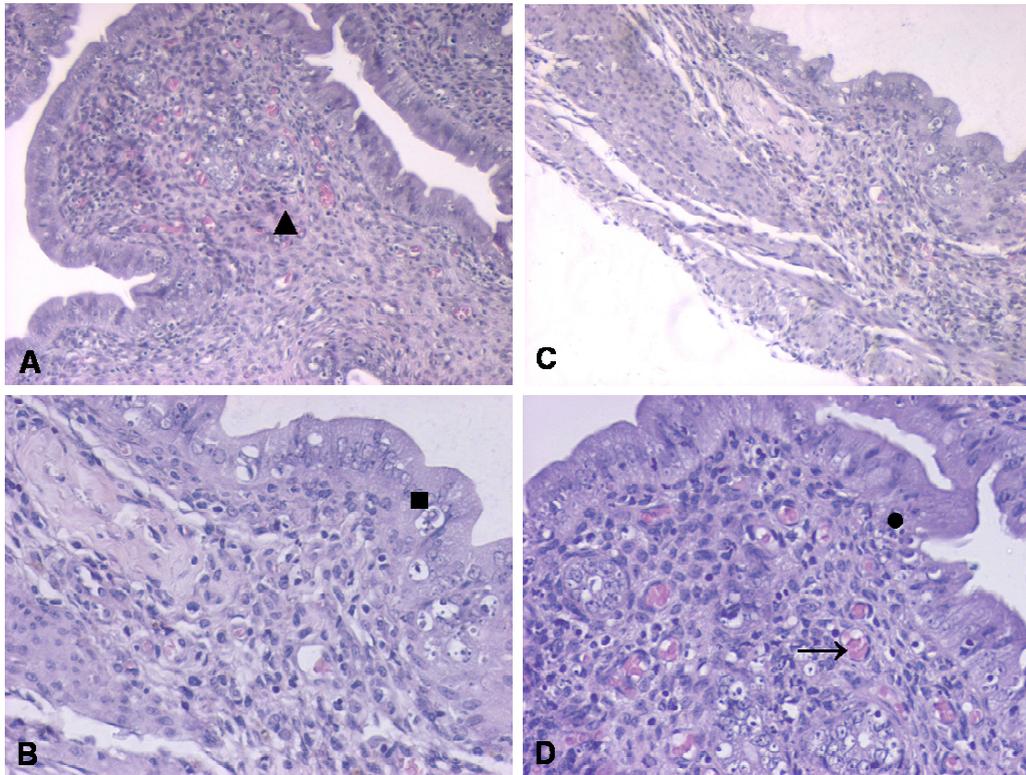


Figura 12: Análise histológica do endométrio tópico e da endometriose peritoneal de ratas 10 dias após os implantes iniciais. Fotomicrografias de cortes de endométrio tópico (A e B) e de endometriose peritoneal (C e D) corados com HE. No endométrio tópico observa-se um estroma muito celular com pouco edema (▲) e um epitélio glandular do tipo colunar simples com citoplasma muito vacuolizado (■). Os implantes endometrióticos apresentaram epitélio vacuolizado (●) semelhante ao do endométrio tópico, sendo vistos abundantes vasos sanguíneos ao longo do estroma (→). Aumento original 100X (A e C) e 400X (B e D).

A análise macroscópica dos implantes na cavidade peritoneal de ratas com 15 dias após os implantes iniciais mostrou um crescimento e uma adesão importantes dos implantes. Observa-se

também, um aumento no calibre dos vasos sanguíneos, orientados em direção aos implantes (Figura 13).

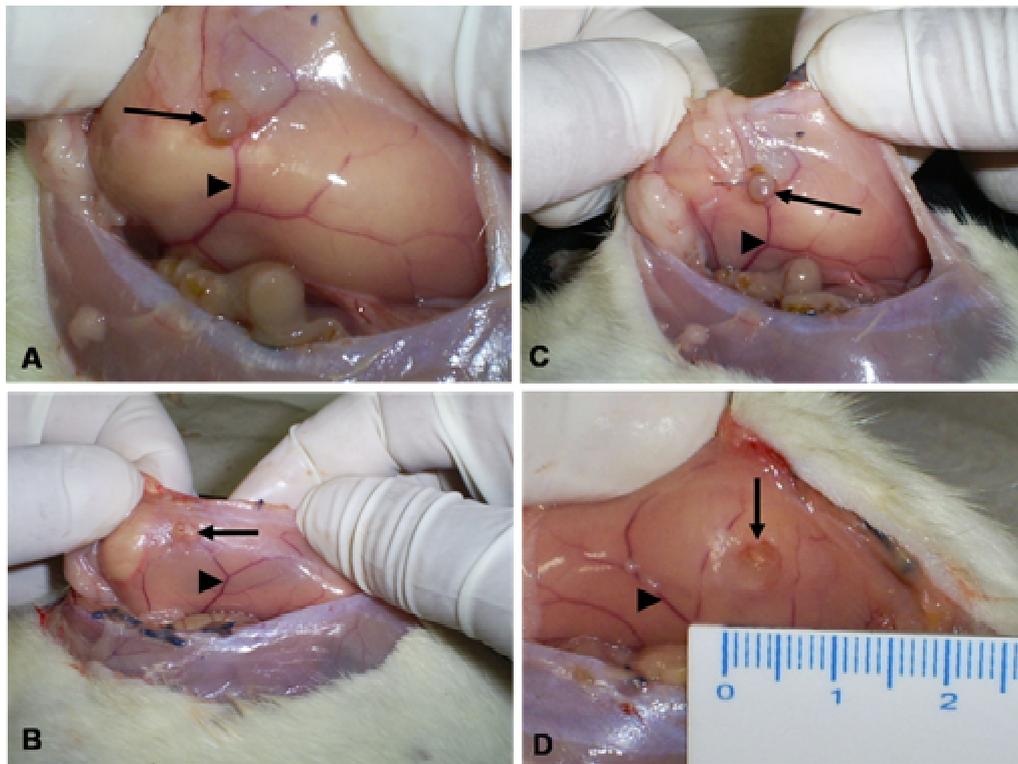


Figura 13: Visão macroscópica dos implantes na cavidade peritoneal de ratas com 15 dias após os implantes iniciais. Observa-se um crescimento dos implantes (→) seguido de um aumento no calibre dos vasos sanguíneos (▶).

Na análise histológica de ratas 15 dias após os implantes iniciais, foi observado um estroma muito celular contendo estruturas glandulares retilíneas nas amostras do endométrio tópico (Figura 14 A e B). Os implantes endometrióticos mostraram características morfológicas definidas, com presença de glândulas endometriais, semelhantes ao endométrio tópico (Figura 14 C e D).

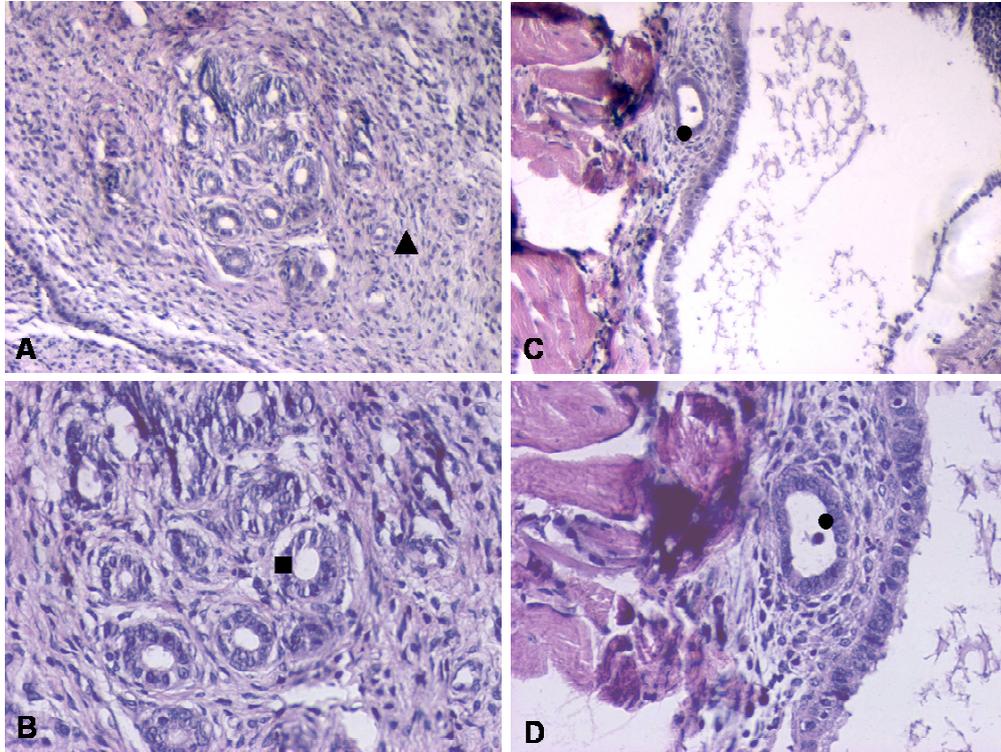


Figura 14: Análise histológica do endométrio tópico e da endometriose peritoneal de ratas 15 dias após os implantes iniciais. Fotomicrografias de cortes de endométrio tópico (A e B) e de endometriose peritoneal (C e D) corados com HE. No endométrio tópico observa-se um estroma muito celular (▲) com estruturas glandulares retilíneas (■). Os implantes endometrióticos mostraram a presença de glândulas endometriais (●) semelhantes ao endométrio tópico. Aumento original 100X (A e C) e 400X (B e D).

Com 30 dias após os implantes iniciais, o estudo macroscópico mostrou um crescimento e uma adesão completa das lesões endometrióticas na cavidade peritoneal. A exemplo das lesões com 15 dias, foi observado um aumento no calibre dos vasos sanguíneos, sendo observada uma convergência destes vasos em direção a lesão (Figura 15).

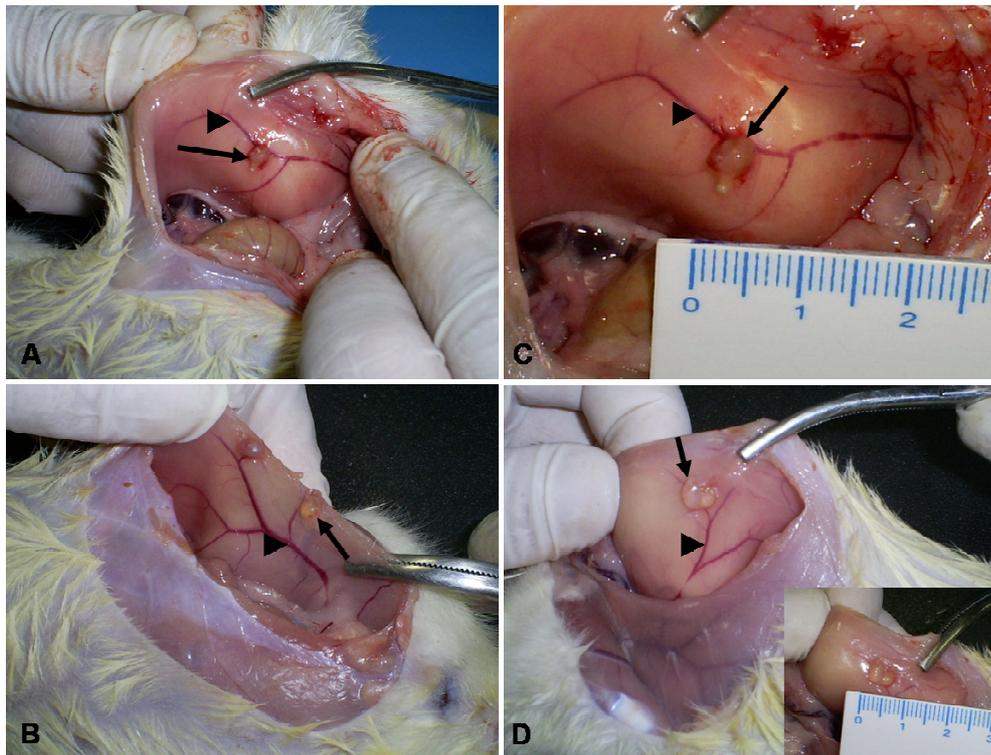


Figura 15: Visão macroscópica dos implantes na cavidade peritoneal de ratas com 30 dias após os implantes iniciais. As lesões endometrióticas cresceram mostrando uma adesão completa na cavidade peritoneal (→). Nota-se um crescimento no calibre dos vasos sanguíneos e uma convergência em direção a lesão (▶).

A análise histológica do endométrio tópico e das lesões endometrióticas de ratas 30 dias após os implantes iniciais mostrou características morfológicas semelhantes às descritas com 15

dias. No endométrio tópico, foi observado um estroma muito celular com estruturas glandulares retilíneas (Figura 16 A e B). Os implantes endometrióticos mostraram a presença de várias glândulas endometriais, muito semelhantes às encontradas no endométrio tópico (Figura 16 C e D).

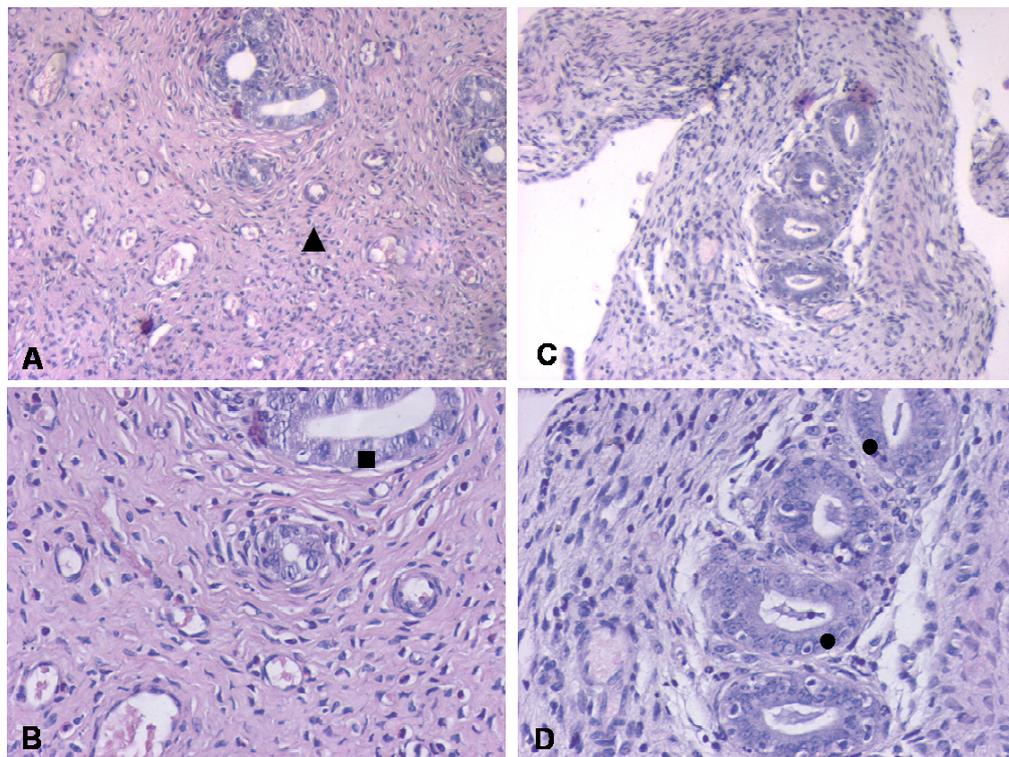


Figura 16: Análise histológica do endométrio tópico e da endometriose peritoneal de ratas 30 dias após os implantes iniciais. Fotomicrografias de cortes de endométrio tópico (A e B) e de endometriose peritoneal (C e D) corados com HE. No endométrio tópico observa-se um estroma muito celular (▲) com estruturas glandulares retilíneas (■), como visto nas análises de 15 dias. Os implantes endometrióticos mostraram a presença de várias glândulas endometriais (●) semelhantes às observadas no endométrio tópico. Aumento original 100X (A e C) e 400X (B e D).

A partir das análises macroscópicas dos implantes (comprimento x largura), foi realizada a avaliação do crescimento das lesões. Estes resultados confirmaram um aumento significativo da área dos implantes comparados com o inicial (Figura 17 A), conforme observado também no histograma representativo (Figura 17 B).

**A**

<b>Modelo Experimental</b>	<b>Área das lesões (mm<sup>2</sup>)</b>
<b>Endometriose peritoneal</b>	
Implantes Iniciais	3,5 ± 0,5
Endometriose – 10 dias (n = 5)	5,6 ± 0,4
Endometriose – 15 dias (n = 5)	5,7 ± 0,2
Endometriose – 30 dias (n = 5)	5,8 ± 0,3

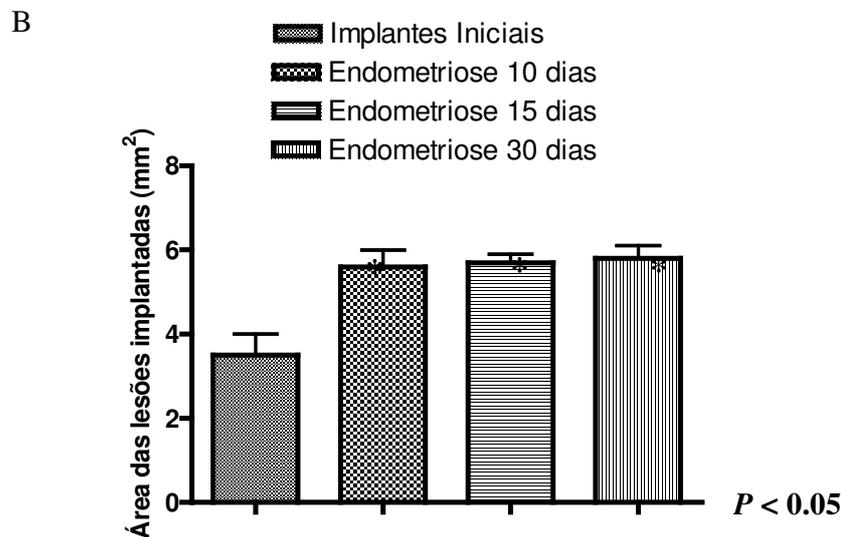


Figura 17: Resultado das observações macroscópicas (comprimento x largura) dos implantes iniciais e após 10, 15 e 30 dias. A: Área das lesões expressa em mm<sup>2</sup>. B: Histograma representando a área das lesões implantadas.

#### 4.1.2. Distribuição de vasos sanguíneos

Este estudo foi realizado a partir de imunomarcações para vWF e  $\alpha$ -actina de músculo liso em endométrio tópico e em lesões endometrióticas de 15 e 30 dias, uma vez que o implante de 10 dias, como descrito anteriormente, não teve seu estabelecimento de forma adequada. A seguir foi realizada a histomorfometria comparada dos tecidos imunomarcados.

Com 15 e 30 dias, observamos uma maior quantidade de vasos sanguíneos marcados para vWF nas lesões endometrióticas em relação ao endométrio tópico. No endométrio tópico, observa-se a presença de vasos sanguíneos ao longo do estroma endometrial (Figura 18 A e D). Nas amostras das lesões endometrióticas de 15 dias (Figura 18 B e E) e 30 dias (Figura 18 C e F) foram vistos vasos sanguíneos de pequeno calibre em grande quantidade, localizados no estroma endometrial ao redor das glândulas. A análise estatística da contagem do número de vasos sanguíneos marcados no endométrio tópico e nas endometrioses identificou uma predominância significativa do número de vasos nas endometrioses de ratas 15 e 30 dias após os implantes iniciais (Figura 19 A). Estes resultados estão representados no histograma com as médias da densidade vascular das amostras (Figura 19 B).

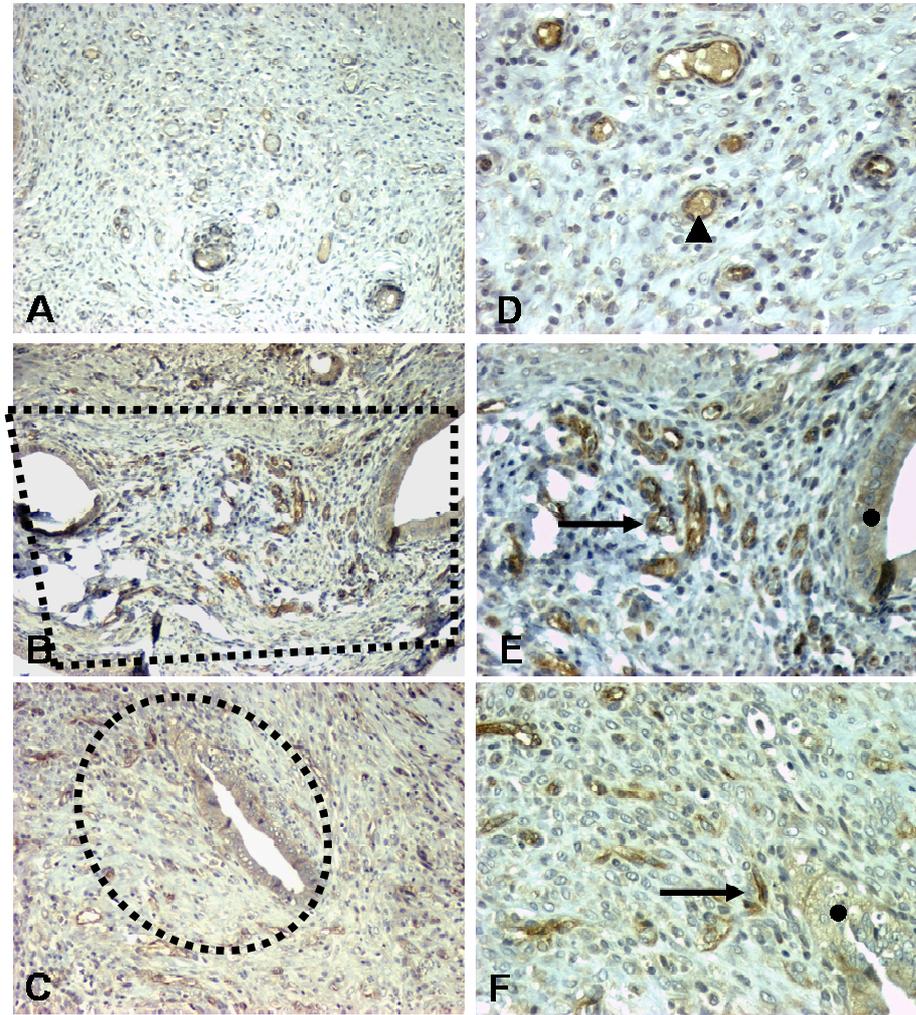


Figura 18: Imunomarcção para vWF em endométrio típico e endometriose peritoneal de ratas 15 e 30 dias após os implantes iniciais. Fotomicrografias de cortes de endométrio típico (A e D) e de endometriose peritoneal com 15 (B e E) e 30 (C e F) dias imunomarcados com vWF. No endométrio típico observa-se a presença de vasos sanguíneos no estroma endometrial (▲). Nos implantes endometrióticos de 15 e 30 dias foram vistos vários vasos sanguíneos de pequeno calibre (→) ao redor das glândulas (●). As áreas pontilhadas representam os focos endometrióticos onde foram realizadas as análises (B e C). Aumento original 100X (A, B e C) e 400X (D, E e F).

A

	Média (nº de vasos sanguíneos)	Desvio Padrão
Endométrio Tópico	8,1	± 0,73
Endometriose 15 dias	21,5	± 1,35
Endometriose 30 dias	20,6	± 0,84

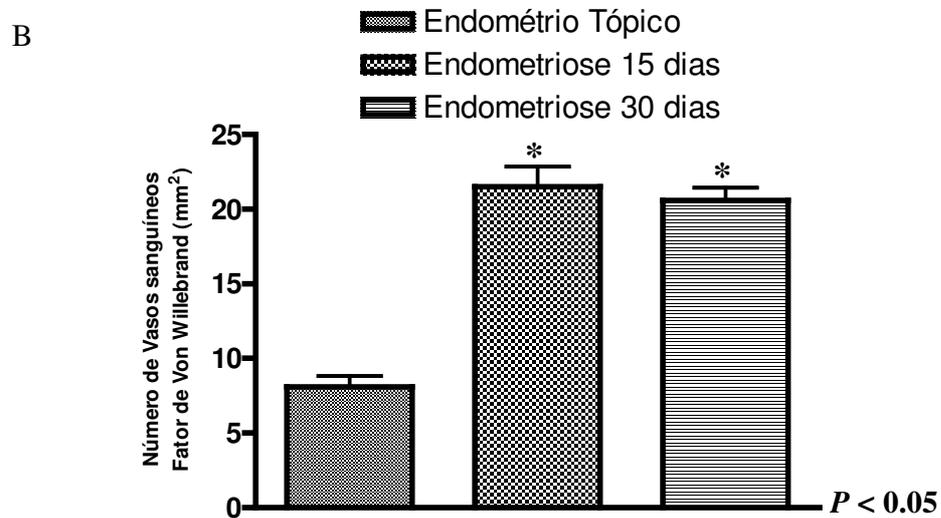


Figura 19: Análise estatística das imunomarcações com vWF no endométrio tópico e nas endometrioses de ratas 15 e 30 dias após os implantes iniciais. O resultado mostrou um aumento significativo do número de vasos sanguíneos marcados nas endometrioses. A: Distribuição da média e desvio padrão. B: Histograma representando a densidade vascular.

Nas análises de densidade vascular utilizando marcação com  $\alpha$ -actina de músculo liso, foi identificada a presença de vasos sanguíneos de grande calibre no estroma endometrial nas amostras do endométrio tópico (Figura 20 A e D). Nas lesões endometrióticas de 15 (Figura 20 B e E) e 30 dias (Figura 20 C e F), foi observada uma maior quantidade de vasos sanguíneos

marcados em relação ao endométrio tópico, sendo estes vasos sanguíneos localizados no estroma endometrial ao redor das glândulas. Entretanto, nas lesões endometrióticas com 30 dias foram encontrados vasos sanguíneos em maior quantidade em comparação com 15 dias. A análise estatística confirmou uma predominância significativa do número de vasos marcados para  $\alpha$ -actina de músculo liso nas endometrioses em comparação ao endométrio tópico (Figura 21 A), conforme ilustrado também no histograma representando a densidade vascular (Figura 21 B).

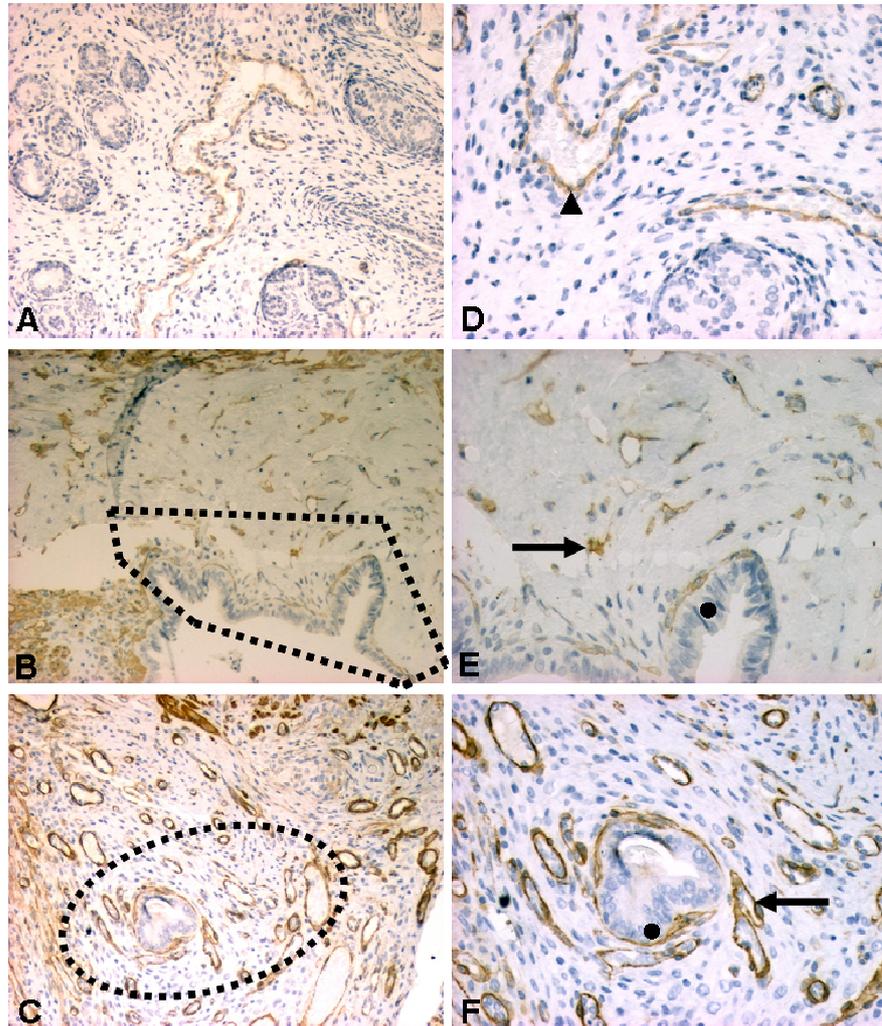


Figura 20: Imunomarcção para  $\alpha$ -actina de músculo liso em endométrio tópico e endometriose peritoneal de ratas 15 e 30 dias após os implantes iniciais. Fotomicrografias de cortes de endométrio tópico (A e D) e de endometriose peritoneal com 15 (B e E) e 30 (C e F) dias imunomarcados com  $\alpha$ -actina de músculo liso. No endométrio tópico observa-se a presença de vasos sanguíneos de grande calibre no estroma endometrial ( $\blacktriangle$ ). Nos implantes endometrióticos de 15 e 30 dias foram vistos vasos sanguíneos em maior quantidade ( $\rightarrow$ ) no estroma ao redor das glândulas ( $\bullet$ ). As áreas pontilhadas representam os focos endometrióticos onde foram realizadas as análises (B e C). Aumento original 100X (A, B e C) e 400X (D, E e F).

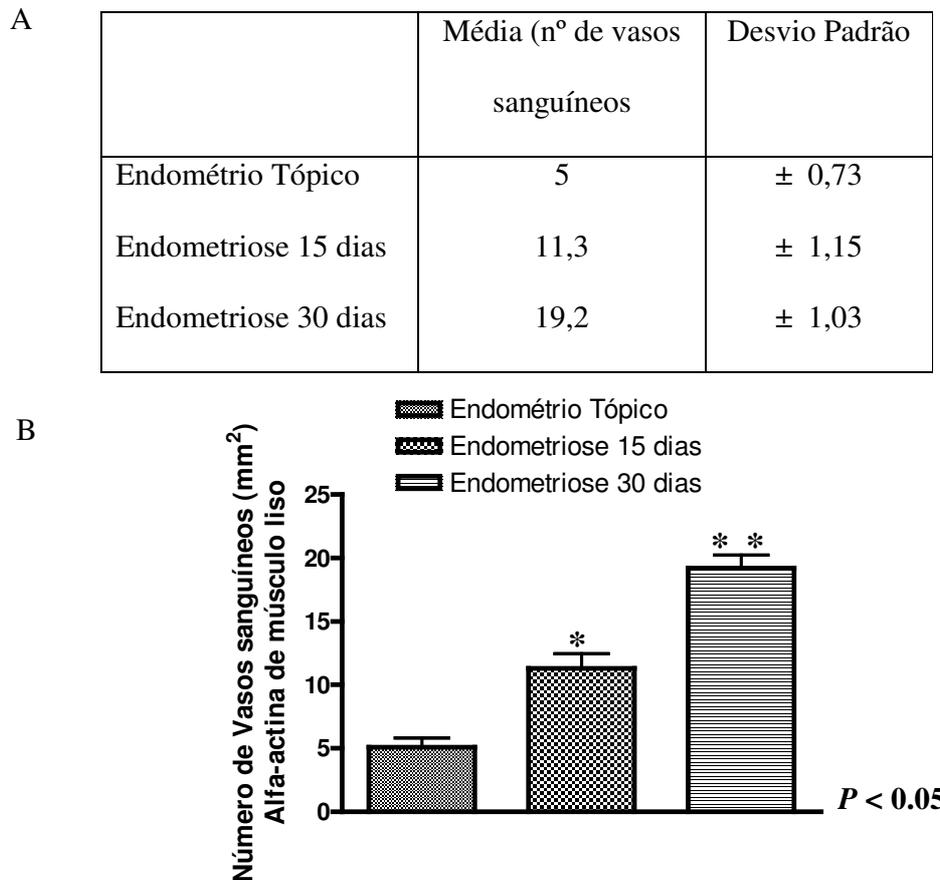


Figura 21: Análise estatística das imunomarcações com  $\alpha$ -actina de músculo liso no endométrio tópico e nas endometrioses de ratas 15 e 30 dias após os implantes iniciais. O resultado mostrou um aumento significativo do número de vasos sanguíneos marcados nas endometrioses. A: Distribuição da média e desvio padrão. B: Histograma representando a densidade vascular.

#### 4.1.3. Perfil angiogênico do modelo experimental

O perfil angiogênico do modelo experimental de endometriose foi determinado a partir das análises da expressão e distribuição do VEGF e de seu receptor Flk-1, e das imunomarcações com anticorpo ED-1 para a identificação de macrófagos ativos.

O RNA mensageiro (RNAm) transcrito do VEGF foi analisado por RT-PCR. A expressão do gene do VEGF nas lesões endometrióticas com 15 e 30 dias foi maior em comparação ao endométrio tópico (Figura 22).

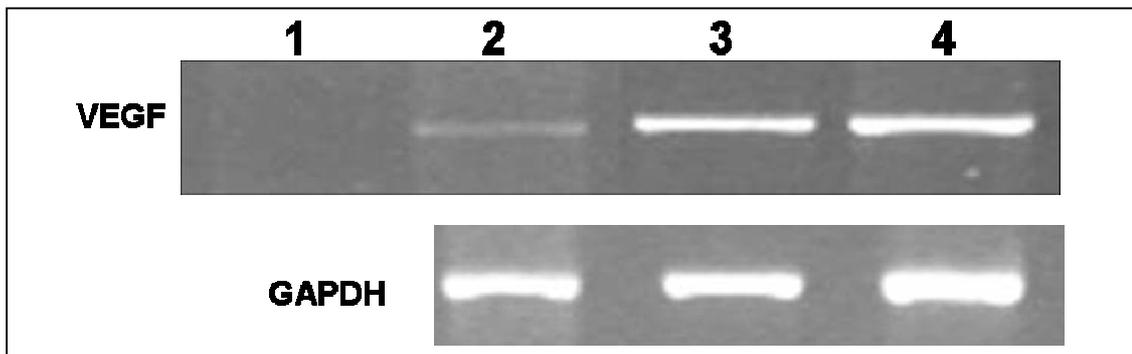


Figura 22: Expressão do RNAm transcrito do VEGF no endométrio tópico e nas lesões endometrióticas por RT-PCR. Linha 1, controle negativo (sem cDNA). Linha 2, endométrio tópico. Linha 3, lesões com 15 dias. Linha 4, lesões com 30 dias. Os níveis de RNAm transcrito do VEGF nas lesões endometrióticas foi maior em comparação com amostras de endométrio tópico. Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) RNAm foi utilizado como controle.

Com relação à distribuição do VEGF nos tecidos, a imunoreatividade foi detectada principalmente no citoplasma das células epiteliais glandulares no endométrio tópico (Figura 23 A e D) e nos tecidos endometrióticos com 15 (Figura 23 B e E) e 30 (Figura 23 C e F) dias. Também foram observadas marcações nas células estromais em ambos os tecidos, mas com menos intensidade. Nas endometrioses, foram identificados alguns vasos sanguíneos marcados para VEGF (Figura 23 E e F).

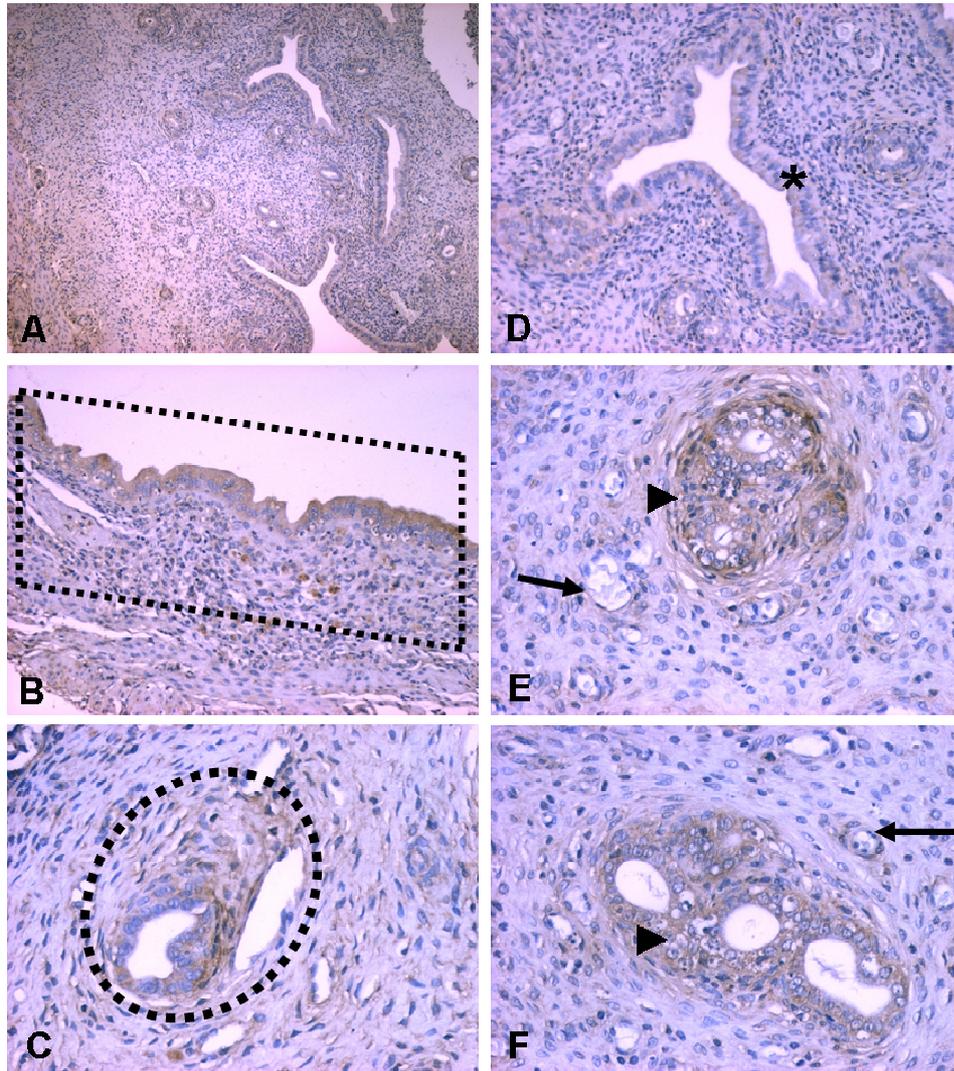


Figura 23: Imunomarcção para VEGF em endométrio tópico e endometriose peritoneal de ratas 15 e 30 dias após os implantes iniciais. Fotomicrografias de cortes de endométrio tópico (A e D) e de endometriose peritoneal com 15 (B e E) e 30 (C e F) dias imunomarcados com VEGF. A reação imunohistoquímica foi observada principalmente nas células epiteliais nas endometrioses (▶) em comparação ao endométrio tópico (\*). Também são observados vasos sanguíneos marcados para VEGF nos tecidos endometrióticos (→). As áreas pontilhadas representam os focos endometrióticos onde foram realizadas as análises (B e C). Aumento original 100X (A, B e C) e 400X (D, E e F).

Como esperado, a análise histomorfométrica mostrou uma maior distribuição do VEGF nas endometrioses de 15 e 30 dias em comparação ao endométrio tóxico. Também foi observado que entre as endometrioses, não houve diferença estatística significativa (Figura 24 A). Estes resultados são confirmados no histograma representando a porcentagem de células marcadas para VEGF (Figura 24 B).

A

	Média (% células marcadas)	Desvio Padrão
Endométrio Tópico	5,68	± 0,1
Endometriose 15 dias	8,52	± 0,19
Endometriose 30 dias	8,43	± 0,12

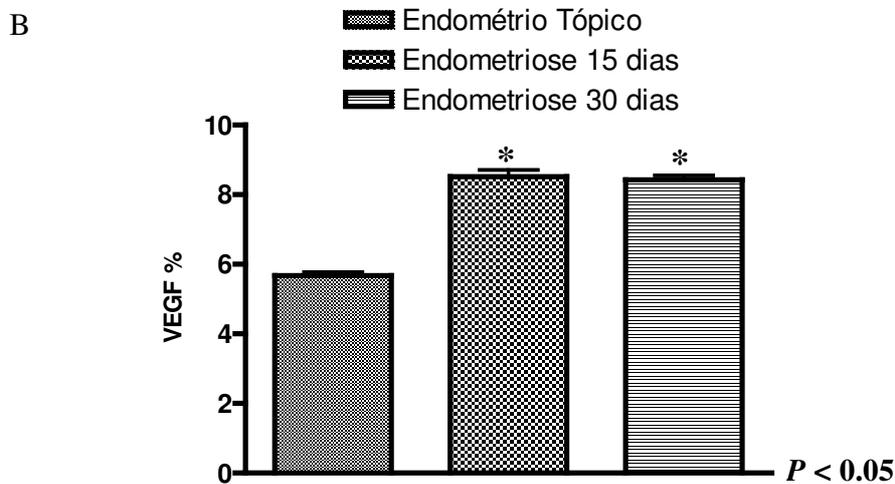


Figura 24: Análise estatística das imunomarcações com VEGF no endométrio tóxico e nas endometrioses de ratas 15 e 30 dias após os implantes iniciais. O resultado mostrou um aumento significativo da distribuição de VEGF nas endometrioses. A: Distribuição da média e desvio padrão. B: Histograma representando as marcações para VEGF.

Nos estudos com o Flk-1, foi avaliada primeiramente a expressão do gene do Flk-1 por RT-PCR. A exemplo do VEGF, foi observada uma maior expressão do RNAm transcrito do Flk-1 nas lesões endometrióticas em comparação ao endométrio tópico (Figura 25).

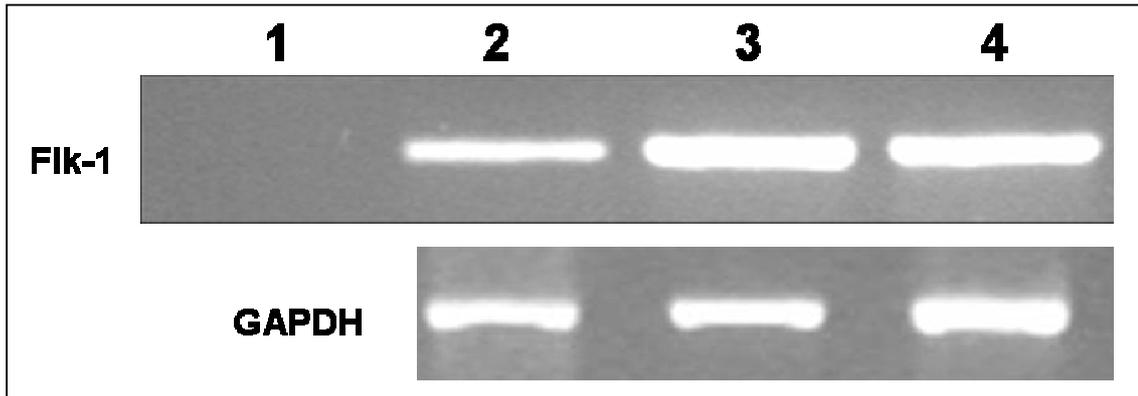


Figura 25: Expressão do RNAm transcrito do Flk-1 no endométrio tópico e nas lesões endometrióticas por RT-PCR. Linha 1, controle negativo (sem cDNA). Linha 2, endométrio tópico. Linha 3, lesões com 15 dias. Linha 4, lesões com 30 dias. A expressão do RNAm do Flk-1 nas lesões endometrióticas foi maior em comparação ao endométrio tópico. Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) RNAm foi utilizado como controle.

As imunomarcações para Flk-1 mostraram precipitados de peroxidase no endométrio tópico (Figura 26 A e D) e nas endometrioses de 15 (Figura 26 B e E) e 30 (Figura 26C e F) dias. Como esperado, houve uma maior distribuição nas endometrioses em comparação com o endométrio tópico, pois todos os focos da lesão tiveram uma alta imunomarcação para Flk-1, novamente com predomínio no epitélio glandular e com pouca expressão no estroma endometrial circunjacente, onde foram observadas marcações em alguns vasos sanguíneos de pequeno calibre (Figura 26 E e F).

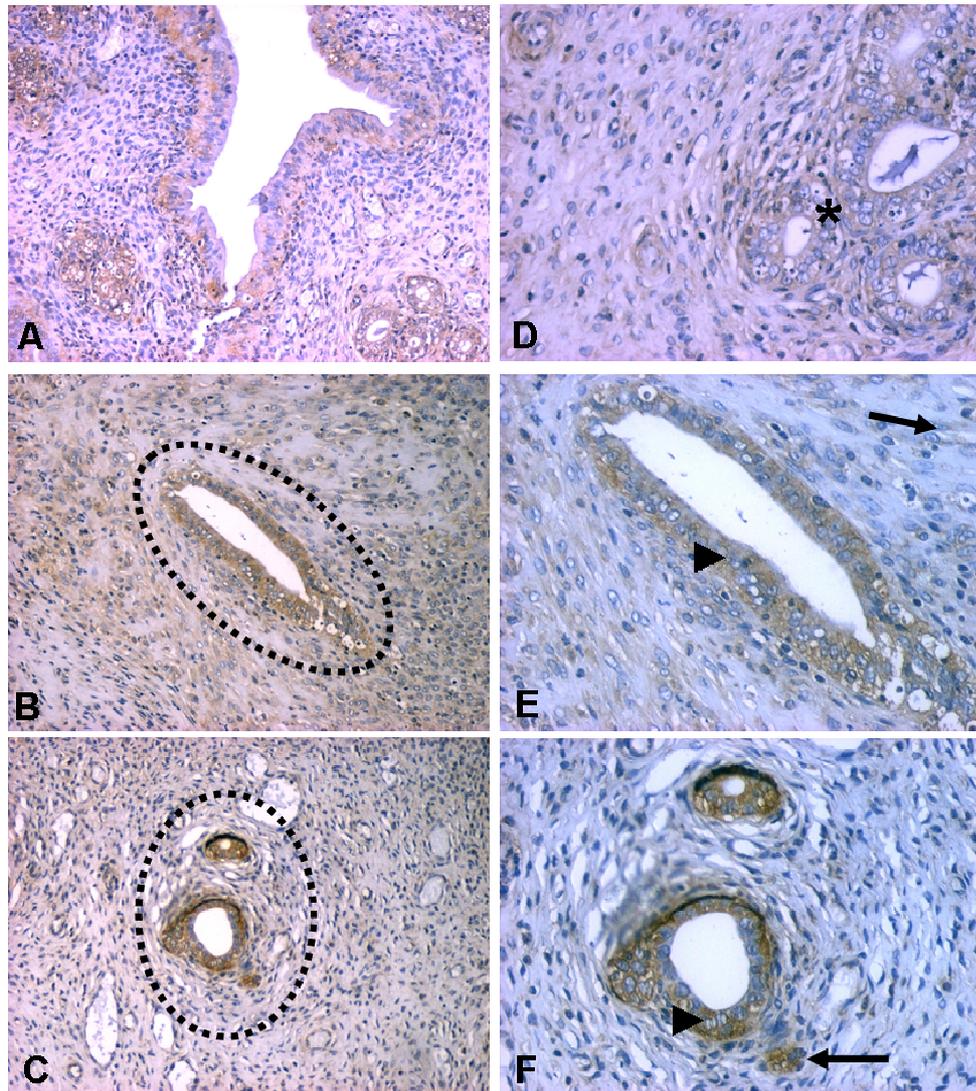


Figura 26: Imunomarcção para Flk-1 em endométrio típico e endometriose peritoneal de ratas 15 e 30 dias após os implantes iniciais. Fotomicrografias de cortes de endométrio típico (A e D) e de endometriose peritoneal com 15 (B e E) e 30 (C e F) dias imunomarcados com Flk-1. Observa-se imunomarcações no epitélio glandular nas endometrioses (►) e com menor intensidade no endométrio típico (\*). Em alguns casos observa-se imunomarcações em vasos sanguíneos (→). As áreas pontilhadas representam os focos endometrióticos onde foram realizadas as análises (B e C). Aumento original 100X (A, B e C) e 400X (D, E e F).

A análise estatística das imunomarcações para Flk-1 identificou um predomínio nas endometrioses de ratas 15 e 30 dias em comparação com o endométrio tópico. Na comparação feita entre as endometrioses de 15 e 30 dias, não houve diferença estatística significativa (Figura 27 A). Estes resultados estão demonstrados também no histograma representando a porcentagem de células marcadas para Flk-1 (Figura 27 B).

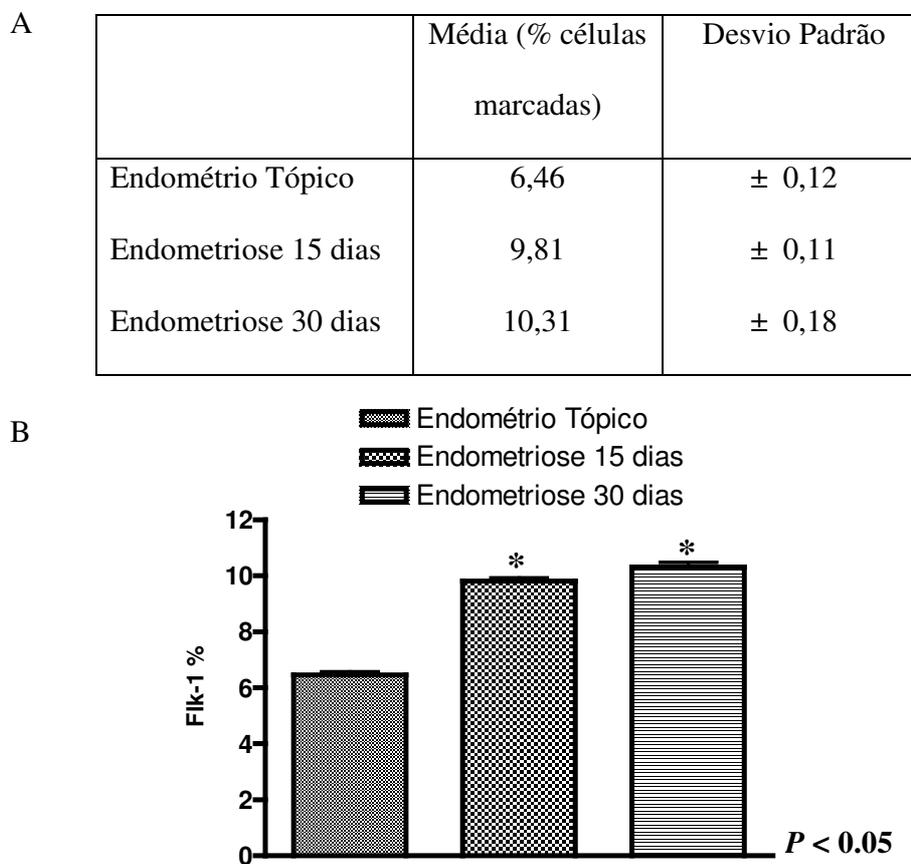


Figura 27: Análise estatística das imunomarcações com Flk-1 no endométrio tópico e nas endometrioses de ratas 15 e 30 dias após os implantes iniciais. O resultado mostrou um aumento significativo da distribuição de Flk-1 nas endometrioses em comparação ao endométrio tópico. A: Distribuição da média e desvio padrão. B: Histograma representando as marcações para Flk-1.

A análise da distribuição de macrófagos ativos foi realizada a partir da imunomarcção para ED-1. Nas amostras de endométrio típico, foram observados macrófagos em pouca quantidade ao longo do estroma (Figura 28 A e D). Nas endometrioses de 15 (Figura 28 B e E) e 30 (Figura 28 C e F) dias, as imunomarcções revelaram uma maior quantidade de macrófagos ativos em comparação com o endométrio típico, localizados principalmente ao redor das glândulas. Entretanto, quando comparado entre as lesões endometrióticas em ambos os tempos, a quantidade de macrófagos ativos encontrados nas lesões de 30 dias foi maior em relação às lesões de 15 dias. A histomorfometria das imunomarcções com ED-1 confirmou um aumento significativo do número de macrófagos ativos nas endometrioses (Figura 29 A), sendo estes resultados também representados no histograma (Figura 29 B).

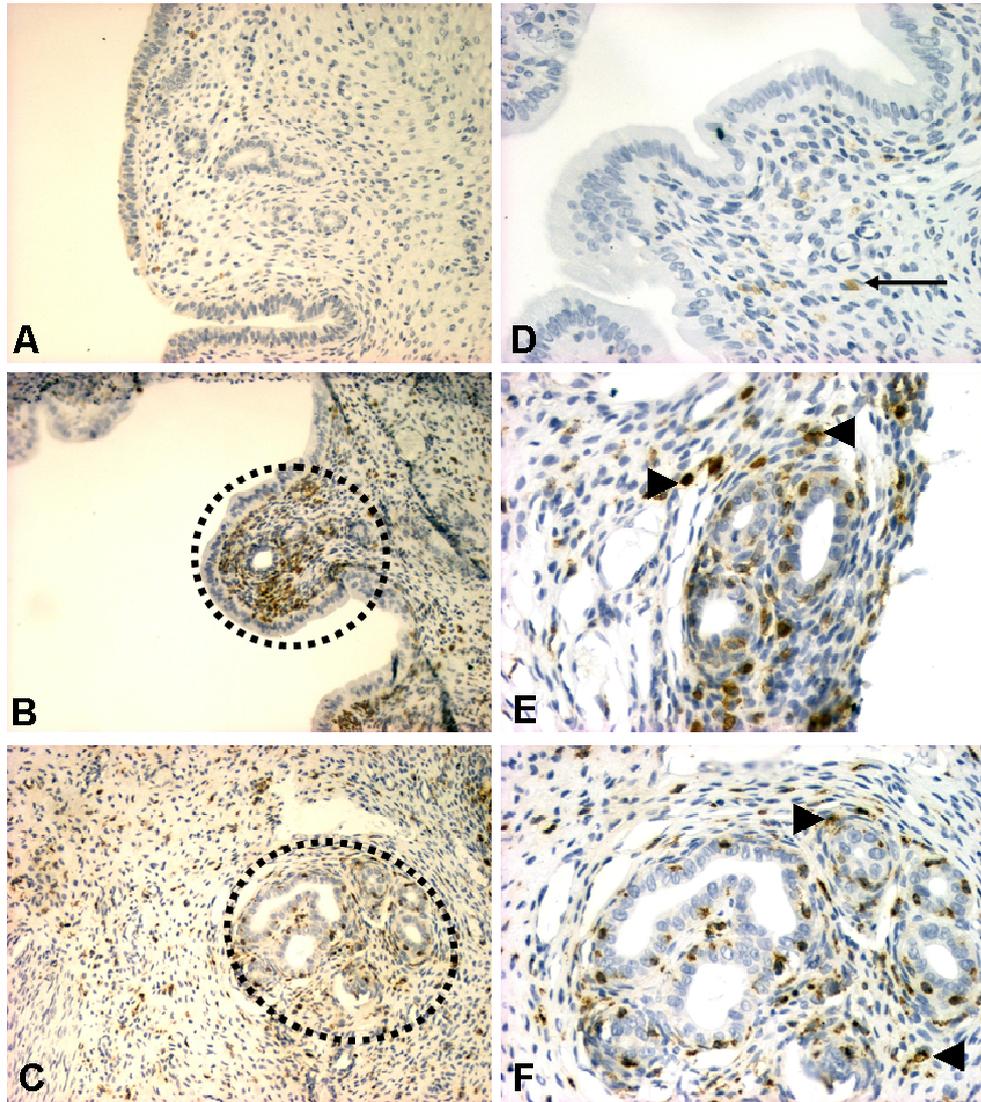


Figura 28: Imunomarcção ED-1 em endométrio típico e endometriose peritoneal de ratas 15 e 30 dias após os implantes iniciais. Fotomicrografias de cortes de endométrio típico (A e D) e de endometriose peritoneal com 15 (B e E) e 30 (C e F) dias imunomarcados com ED-1. A distribuição de macrófagos ativos marcados com ED-1 foi observada em maior quantidade no estroma, principalmente ao redor das glândulas, nas amostras de endometriose (►) em comparação ao endométrio típico (→). As áreas pontilhadas representam os focos endometrióticos onde foram realizadas as análises (B e C). Aumento original 100X (A, B e C) e 400X (D, E e F).

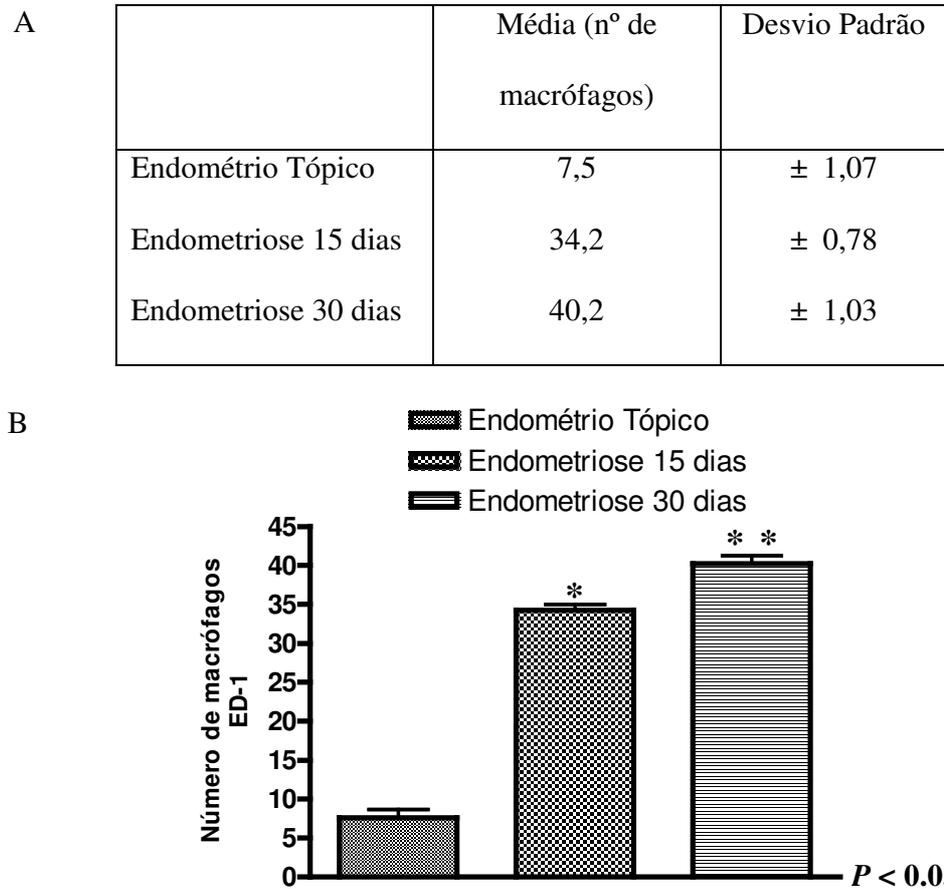


Figura 29: Análise estatística das imunomarcações com ED-1 no endométrio típico e nas endometrioses de ratas 15 e 30 dias após os implantes iniciais. O resultado mostrou um aumento significativo do número de macrófagos ativos marcados com ED-1 nas endometrioses. A: Distribuição da média e desvio padrão. B: Histograma representando o número de macrófagos positivos para ED-1.

A primeira parte dos resultados deste trabalho encerra-se com a análise da expressão do RNAm transcrito da MMP-9 por RT-PCR. A exemplo do VEGF e do FLK-1, foi observada uma maior expressão de MMP-9 nas lesões endometrióticas em comparação ao endométrio típico, confirmando o potencial angiogênico das lesões (Figura 30).

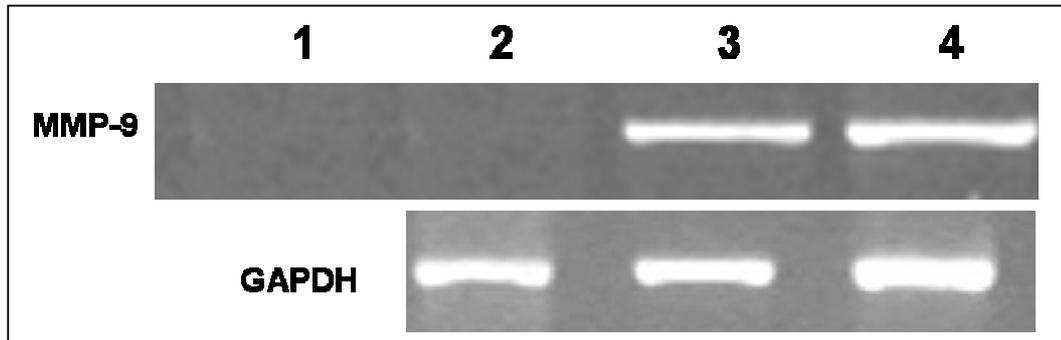


Figura 30: Expressão do RNAm transcrito da MMP-9 no endométrio tópico e nas lesões endometrióticas por RT-PCR. Linha 1, controle negativo (sem cDNA). Linha 2, endométrio tópico. Linha 3, lesões com 15 dias. Linha 4, lesões com 30 dias. Os níveis de RNAm transcrito da MMP-9 nas lesões endometrióticas foi maior em comparação com amostras de endométrio tópico. Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) RNAm foi utilizado como controle.

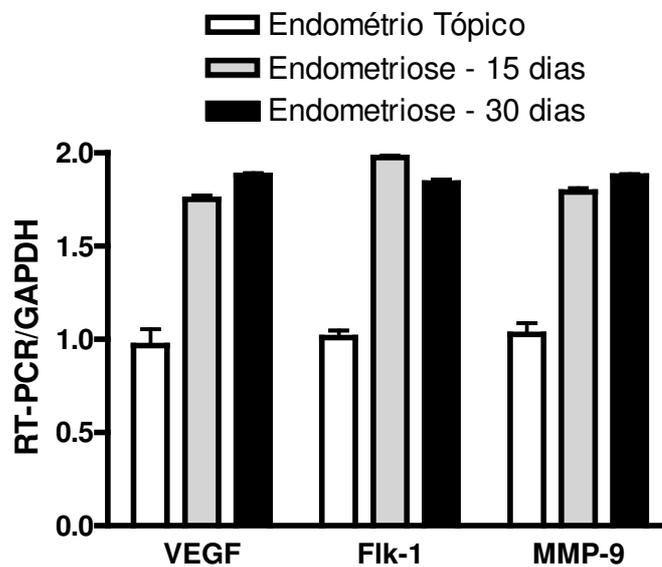


Figura 31: Análise semiquantitativa das bandas referentes à expressão do RNAm transcrito do VEGF, Flk-1 e MMP-9 no endométrio tópico e nas lesões endometrióticas por RT-PCR.

#### 4.2. PARTE 2: ESTUDO DA EXPRESSÃO E DISTRIBUIÇÃO DE COX-2 NO MODELO EXPERIMENTAL E NO ENDOMÉTRIO TÓPICO:

Antes do início dos tratamentos, foi avaliada a presença de COX-2 no modelo experimental e no endométrio tópico. Para o estudo da expressão do RNAm da COX-2, as amostras obtidas das lesões endometrióticas de 15 e 30 dias foram insuficientes para as análises por RT-PCR. Com isso, foi realizada a análise do RNA total dos animais com endometriose, tendo um “*pool*” das amostras obtidas com 15 e 30 dias. Os resultados deste estudo mostraram uma maior expressão do COX-2 nas lesões endometrióticas em comparação ao endométrio tópico (Figura 32).

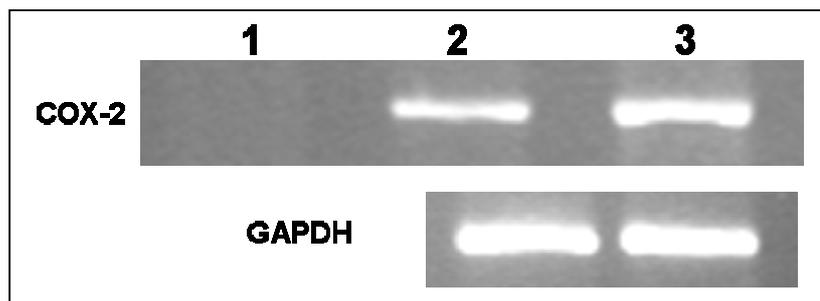


Figura 32: Expressão do RNAm transcrito da COX-2 no endométrio tópico e nas lesões endometrióticas por RT-PCR. Linha 1, controle negativo (sem cDNA). Linha 2, endométrio tópico. Linha 3, “*pool*” das lesões com 15 e 30 dias. A expressão do RNAm da COX-2 nas lesões endometrióticas foi maior em comparação ao endométrio tópico. Gliceraldeído-3-fosfato dehidrogenase (GAPDH) RNAm foi utilizado como controle.

Utilizando imunomarcção para COX-2, foram observadas poucas células marcadas ao longo do estroma nas amostras do endométrio tópico (Figura 33 A e D). Como esperado, uma maior quantidade desta enzima foi encontrada nas endometrioses em comparação com o

endométrio tópico. A distribuição da COX-2 foi localizada principalmente nas células epiteliais e em algumas células estromais, conforme demonstrado nas lesões de 15 (Figura 33 B e D) e 30 (Figura 33 C e F) dias.

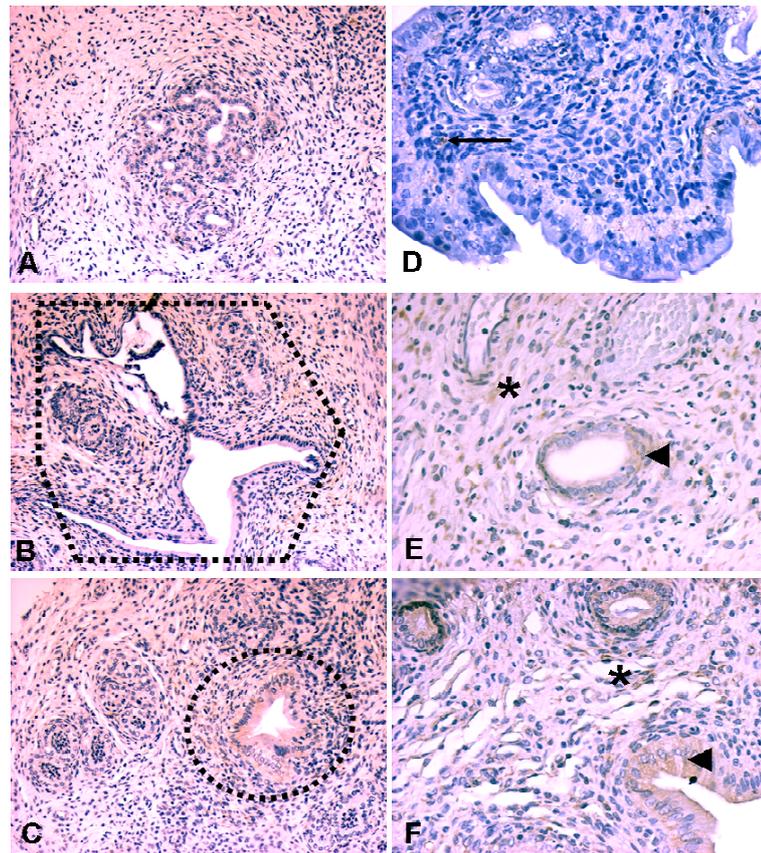


Figura 33: Imunomarcção para COX-2 em endométrio tópico e endometriose peritoneal de ratas 15 e 30 dias após os implantes iniciais. Fotomicrografias de cortes de endométrio tópico (A e D) e de endometriose peritoneal com 15 (B e E) e 30 (C e F) dias imunomarcados com COX-2. Observa-se uma maior distribuição de COX-2 nas células epiteliais (◄) e em algumas células estromais (\*) nas endometrioses em comparação ao endométrio tópico, onde poucas células estão marcadas ao longo do estroma (→). As áreas pontilhadas representam os focos endometrióticos onde foram realizadas as análises (B e C). Aumento original 100X (A, B e C) e 400X (D, E e F).

A análise estatística revelou uma predominância significativa das imunomarcações para COX-2 nas endometrioses em comparação com o endométrio. Entretanto, nas lesões endometrióticas com 30 dias foi observada uma maior distribuição de COX-2 em comparação com 15 dias (Figura 34 A). O histograma representando a porcentagem de células marcadas para COX-2 confirma estes achados (Figura 34 B).

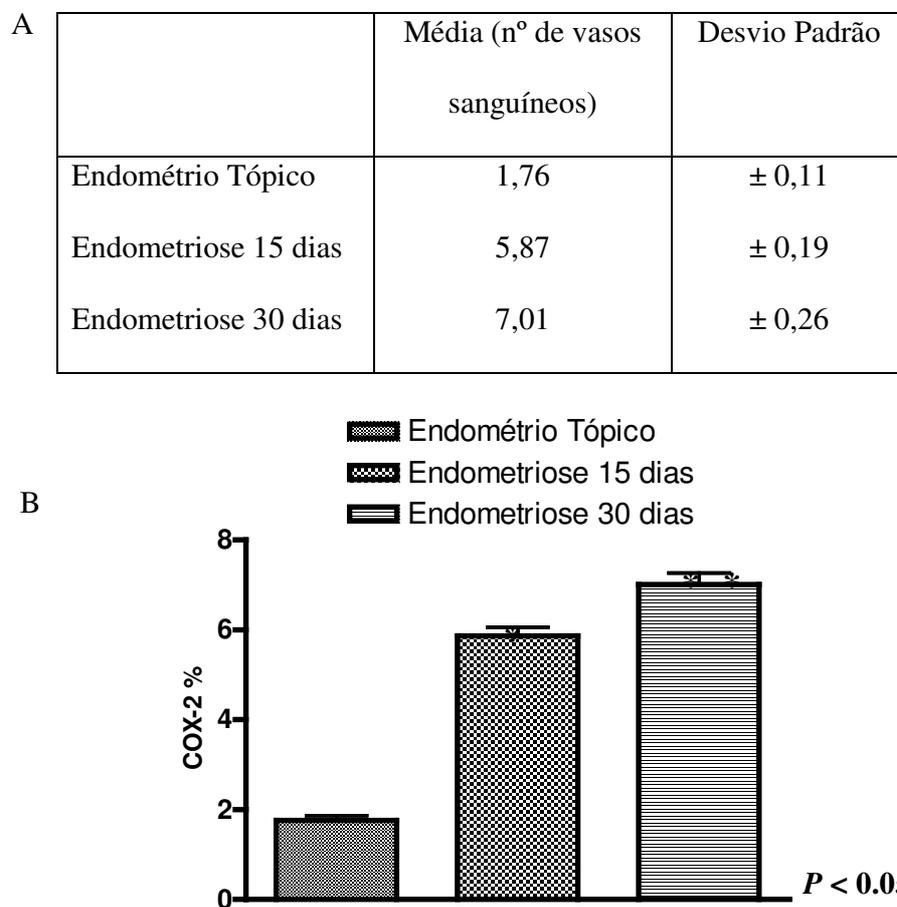


Figura 34: Análise estatística das imunomarcações com COX-2 no endométrio tópico e nas endometrioses de ratas 15 e 30 dias após os implantes iniciais. O resultado revelou um aumento significativo das marcações para COX-2 nas endometrioses. A: Distribuição da media e desvio padrão. B: Histograma representando a porcentagem de células marcadas para COX-2.

#### 4.3. PARTE 3: ANÁLISE DA RESPOSTA TERAPÊUTICA A PARTIR DE TRATAMENTOS COM INIBIDOR SELETIVO DA COX-2 NO MODELO EXPERIMENTAL DE ENDOMETRIOSE:

Para a realização dos tratamentos foi utilizado o inibidor seletivo de COX-2 Parecoxib, sendo administradas doses diárias de 3mg/kg no período de 30 dias via intramuscular (Figura 35).

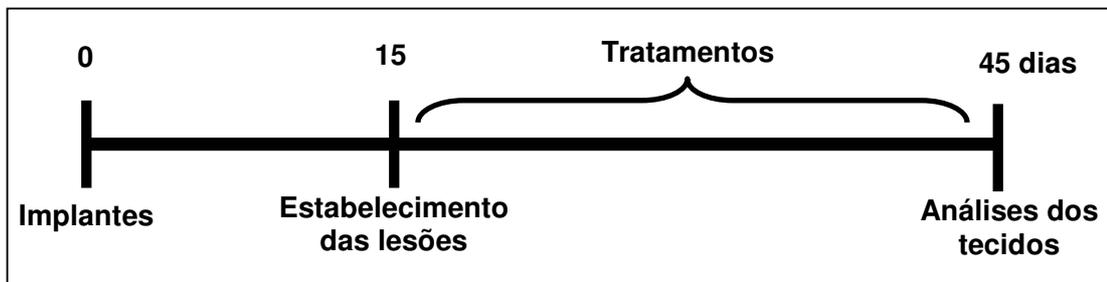


Figura 35: Esquema mostrando os tratamentos com Parecoxib (3 mg/kg/dia IM).

##### 4.3.1. Observação macroscópica das lesões endometrióticas controles e tratadas com Parecoxib.

Em todos os procedimentos não houve complicações. Os implantes do tecido endometrial aderiram de forma satisfatória na parede peritoneal e formaram lesões viáveis em todos os 20 animais. As lesões encontradas apresentavam-se bem vascularizadas e císticas, lembrando as lesões peritoneais humanas (Figura 36 A e C). Após o estabelecimento das lesões, os tratamentos foram iniciados. Nos animais do grupo controle, não foram observadas alterações no tamanho dos implantes (Figura 36 B). Entretanto, 4 semanas após o tratamento com Parecoxib, foi observada uma diminuição significativa no tamanho dos implantes em relação ao grupo controle, resultando no não estabelecimento das lesões (Figura 36 D). O resultado das análises estatísticas da medida

do crescimento das lesões confirmou uma diminuição significativa das lesões no grupo tratado ( $1,18 \pm 0,51$ ) em relação ao grupo controle ( $6,12 \pm 0,15$ ) (Figura 36 E).

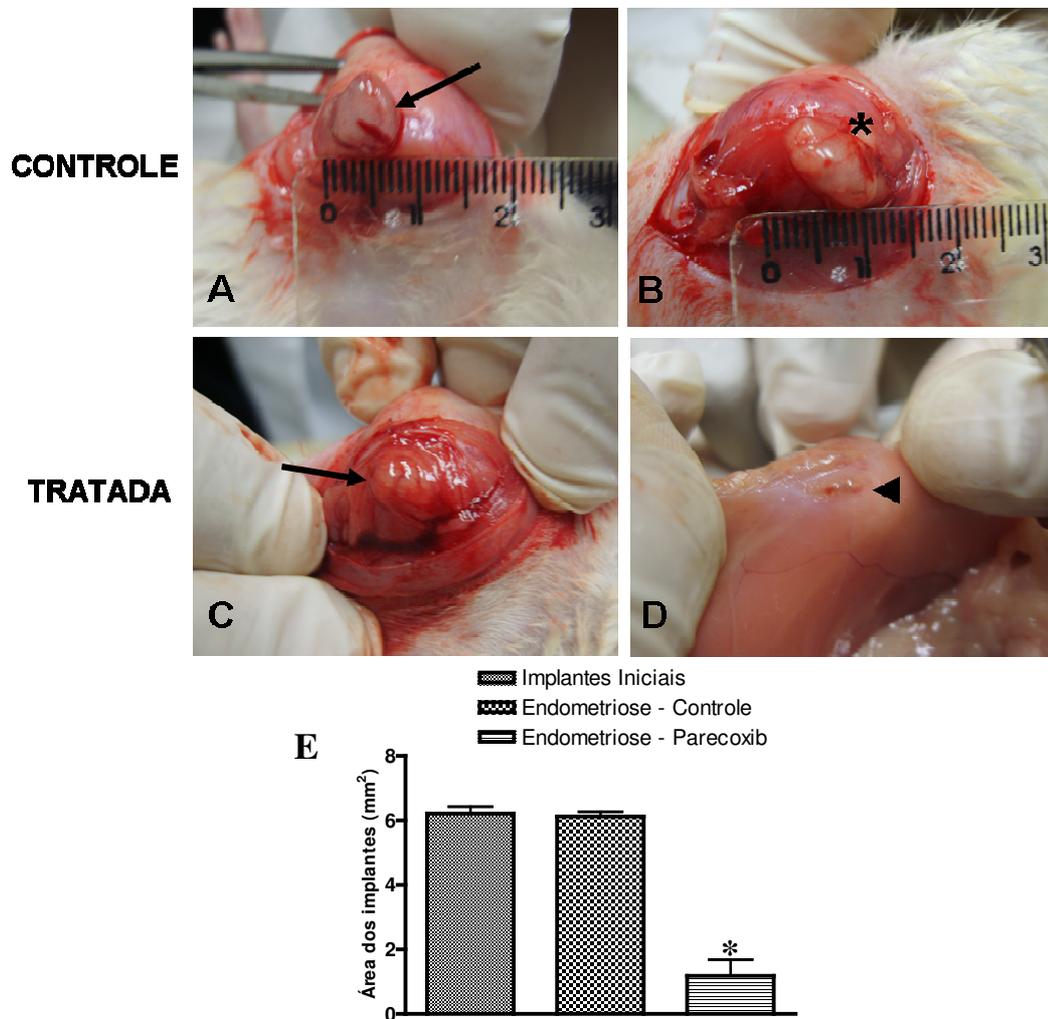


Figura 36: Análise macroscópica das lesões controles e tratadas com Parecoxib. Lesões estabelecidas com 15 dias (A e C) e lesões tratadas por 30 dias após o estabelecimento (B e D). Nas lesões endometrióticas estabelecidas são vistos cistos muito vascularizados, lembrando lesões humanas ( $\rightarrow$ ). Após os tratamentos, no grupo controle não foi identificada diferença no tamanho (\*); entretanto observa-se uma diminuição das lesões tratadas com Parecoxib, resultando no não estabelecimento destas lesões ( $\blacktriangleleft$ ). Gráfico das análises estatísticas do crescimento das lesões identificando uma diferença significativa entre os grupos (E).

#### **4.3.2. Estudo da densidade vascular do endométrio tópico e das lesões endometrióticas controles e tratadas**

A densidade vascular foi determinada a partir dos estudos da quantificação dos vasos sanguíneos marcados para vWF. Nas amostras de endométrio tópico, a distribuição deste marcador foi similar nos animais controle e tratado, sendo encontrados vasos sanguíneos ao longo do estroma (Figura 37 A e C). Como esperado, nas lesões endometrióticas controles foi observada uma maior quantidade de vasos sanguíneos marcados com vWF, localizados no estroma e concentrado ao redor das glândulas, em comparação com as análises do endométrio tópico (Figura 37 B). Entretanto, nas lesões endometrióticas tratadas a densidade vascular foi significativamente reduzida em comparação com as lesões do grupo controle (Figura 37 D). Esses resultados foram confirmados nas análises histomorfométricas dos vasos sanguíneos marcados para vFW (Figura 38 A) e no histograma representando a densidade vascular (Figura 38 B).

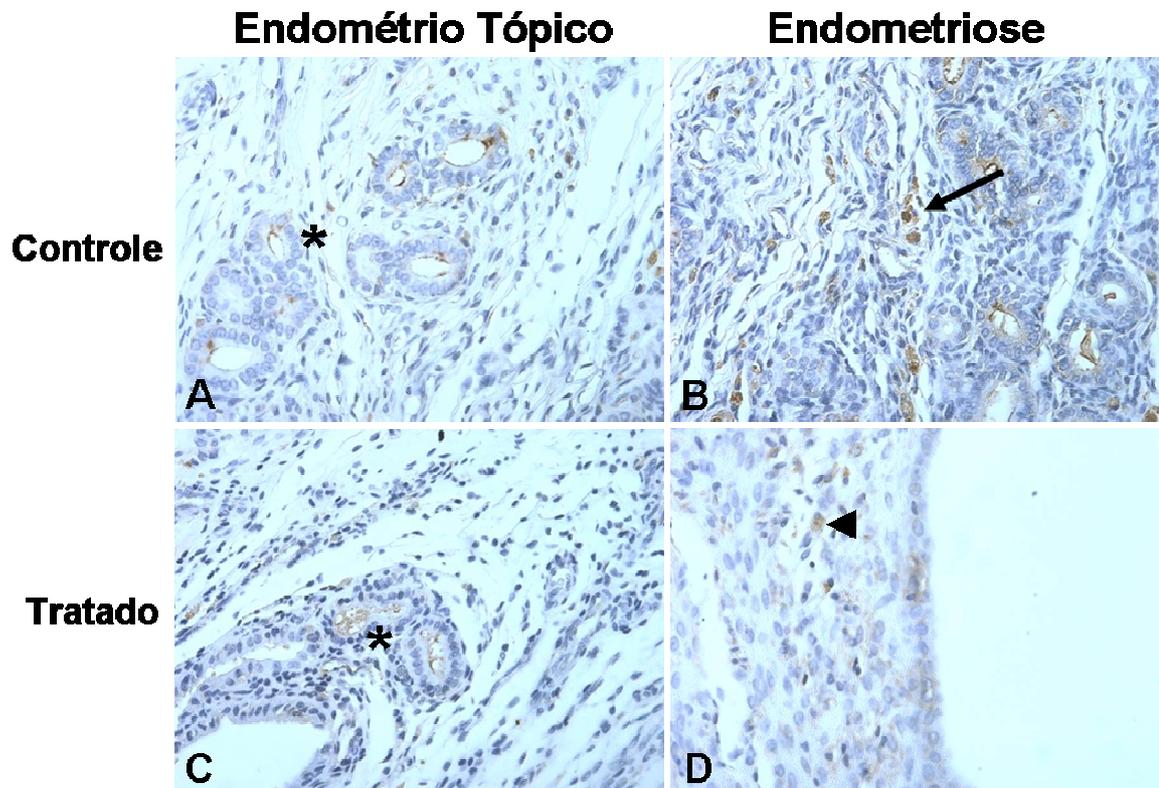


Figura 37: Análise da quantificação dos vasos sanguíneos marcados para vWF. Nos tecidos endometriais, a distribuição do vWF foi similar nos animais dos grupos controle e tratado (\*). Entretanto, nas lesões endometrióticas observou-se uma maior quantidade de vasos sanguíneos positivos para vWF no estroma e concentrados ao redor das glândulas nas amostras do grupo controle (→) em relação ao tratado (◄). Aumento original 400X.

A

	Média (nº de vasos sanguíneos)	Desvio Padrão
Endométrio Tópico Controle	8,7	± 1,15
Endometriose Controle	19,3	± 1,25
Endométrio + Parecoxib	8,1	± 0,73
Endometriose + Parecoxib	10,1	± 1,66

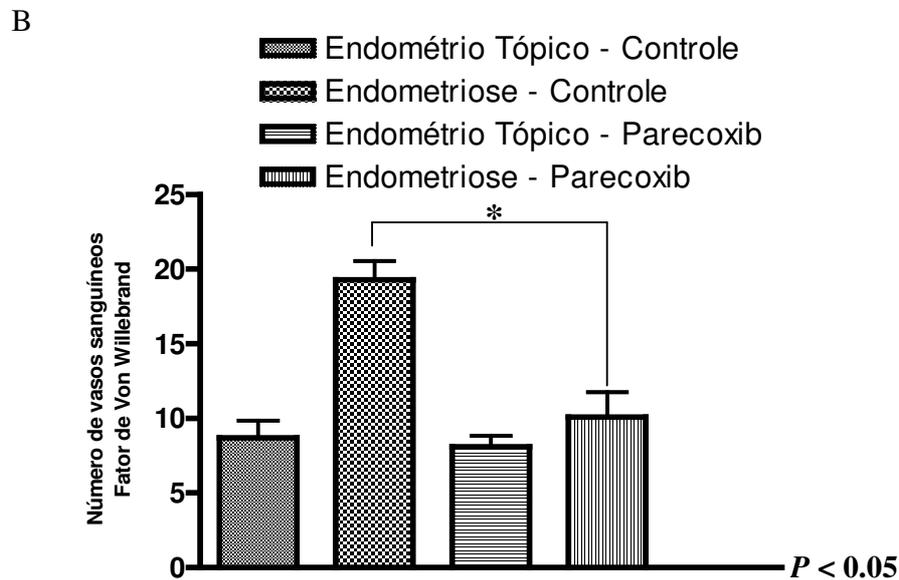


Figura 38: Análise estatística das imunomarcações com vWF no endométrio tópico e nas endometrioses de ratas dos grupos controle e tratado. O resultado mostrou uma diminuição significativa do número de vasos sanguíneos marcados nas amostras de endometrioses do grupo tratado em relação ao controle. A: Distribuição da média e desvio padrão. B: Histograma representando a densidade vascular.

### **4.3.3. Análise da angiogênese no endométrio tópico e nas lesões endometrióticas controles e tratadas**

A avaliação da angiogênese no endométrio tópico e nas lesões endometrióticas controles e tratadas foi realizada com as análises da expressão e distribuição do VEGF e de seu receptor Flk-1, bem como com o estudo da quantificação do número de macrófagos ativos através da imunomarcação com ED-1. Foi realizada também a análise da expressão de MMP-9.

O RNAm transcrito do VEGF e do Flk-1 foi analisado por RT-PCR para avaliar a expressão destes genes. Foi observado que os níveis do RNAm de ambos os genes foram maiores nas lesões endometrióticas em comparação com o endométrio tópico, confirmando o potencial angiogênico das lesões. Por outro lado, os níveis dos transcritos destes fatores angiogênicos nas endometrioses tratadas com Parecoxib foram menores em relação as amostras do grupo controle (Figura 39).

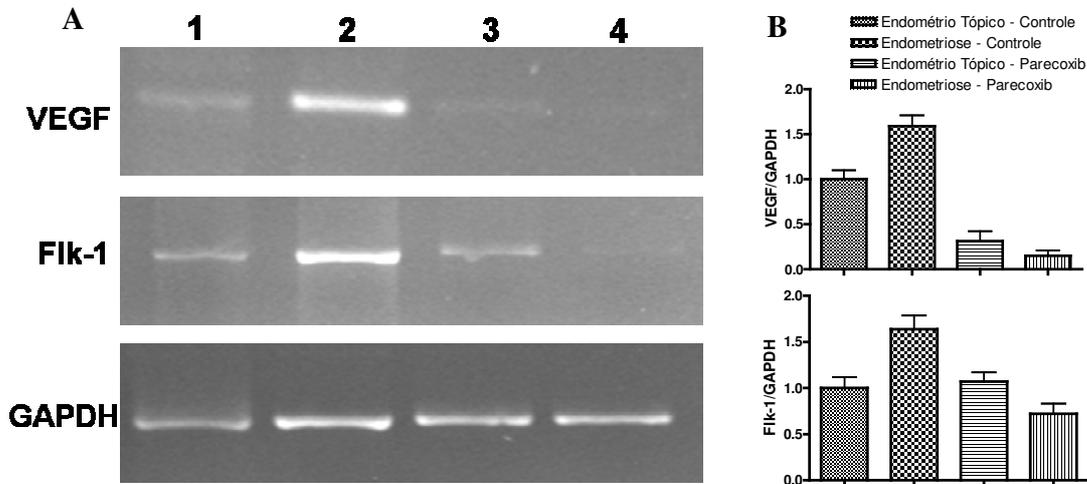


Figura 39: Expressão do RNAm transcrito dos genes VEGF e Flk-1 em amostras de endométrio tópico e de lesões endometrióticas com e sem tratamento por RT-PCR (A) e densitometria das bandas (B). Linha 1, endométrio tópico - controle. Linha 2, endometriose - controle. Linha 3, endométrio tópico - tratado. Linha 4, endometriose – tratado. Os níveis do RNAm transcrito do VEGF e Flk-1 nas lesões endometrióticas tratadas foram menores em relação as amostras controle. Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) RNAm foi utilizado como controle.

A distribuição do VEGF foi encontrada principalmente no citoplasma das células epiteliais glandulares e de forma mais difusa nas células estromais nos tecidos endometriais controles e tratados (Figura 40 A e B) e com maior intensidade nos tecidos endometrióticos controles (Figura 40 C), onde foram vistos alguns vasos sanguíneos marcados. No entanto, conforme observado nas análises da expressão do gene por RT-PCR, a distribuição do VEGF nos tecidos endometrióticos tratados foi menor em relação ao grupo controle. Ainda, essas lesões mostraram uma acentuada atrofia e regressão do tecido epitelial (Figura 40 D), mostrando que o Parecoxib age diretamente no estabelecimento destas lesões.

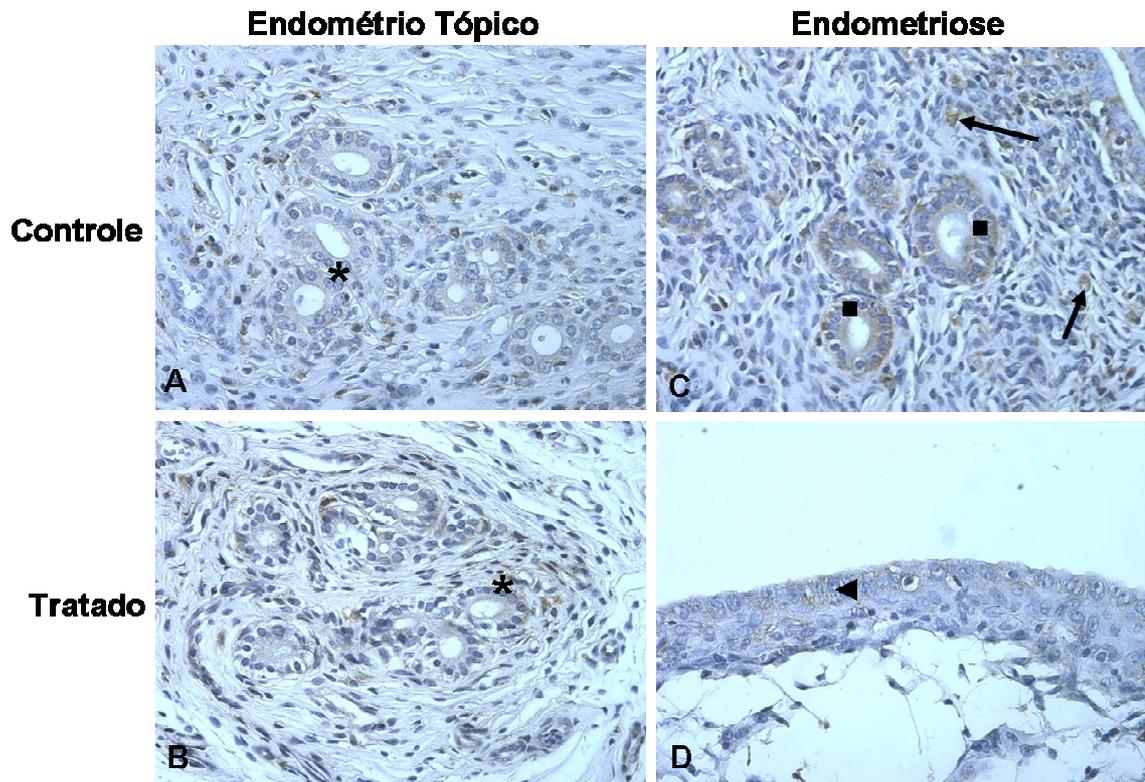


Figura 40: Análise da distribuição do VEGF. Nos tecidos endometriais, as imunomarcações do VEGF foram similares nos animais dos grupos controle e tratado (\*). Nos tecidos endometrióticos do grupo controle observa-se uma distribuição mais concentrada do VEGF nas células epiteliais (■), sendo vistos também vasos sanguíneos marcações para VEGF (→); entretanto, nas lesões tratadas com Parecoxib, as marcações estão menos intensas e o tecido mostra acentuada atrofia e regressão das células epiteliais (◄). Aumento original 400X.

Como esperado, a análise histomorfométrica das imunomarcações com VEGF mostrou uma diminuição significativa deste fator nas amostras de endometrioses do grupo tratado em relação ao controle (Figura 41 A). Estes resultados são confirmados no histograma representando a porcentagem de células marcadas para VEGF (Figura 41 B).

A

	Média (% de células marcadas)	Desvio Padrão
Endométrio Tópico Controle	4,84	± 0,48
Endometriose Controle	7,93	± 0,87
Endométrio + Parecoxib	3,97	± 0,86
Endometriose + Parecoxib	3,25	± 0,87

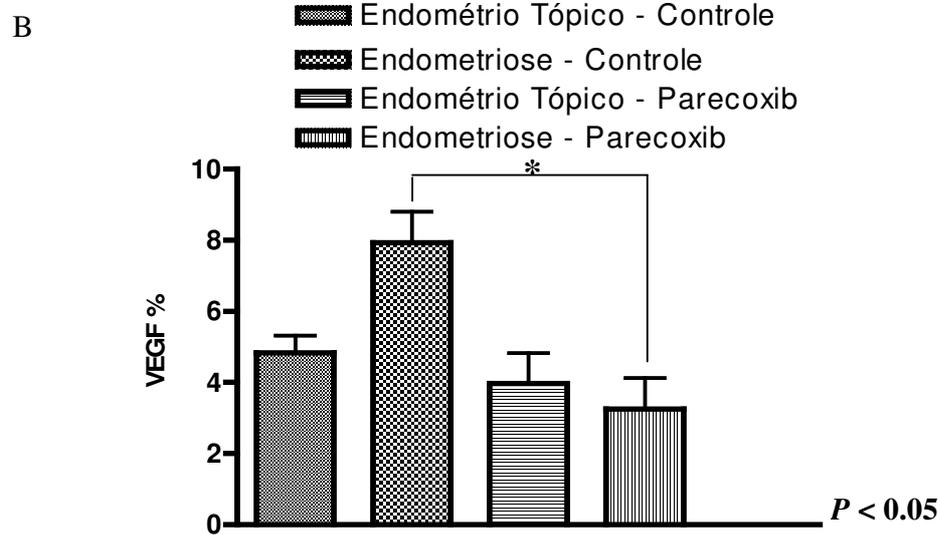


Figura 41: Análise estatística das imunomarcações com VEGF no endométrio tópico e nas endometrioses de ratas dos grupos controle e tratado. O resultado mostrou uma diminuição significativa na distribuição do VEGF nas amostras de endometrioses do grupo tratado em relação ao controle. A: Distribuição da média e desvio padrão. B: Histograma representando a porcentagem de células marcadas para VEGF.

As imunomarcações para Flk-1 mostraram reações no endométrio típico e nas endometrioses. Nos tecidos endometriais, observa-se imunomarcações do Flk-1 nas células epiteliais e ao longo do estroma nas amostras controles (Figura 42 A) e tratadas (Figura 42 B). Conforme resultados anteriores, houve uma maior distribuição de Flk-1 na endometriose controle em relação ao endométrio, novamente com predomínio das marcações no epitélio glandular e sendo observadas em alguns vasos sanguíneos (Figura 42 C). Os precipitados de peroxidase foram encontrados em pouca quantidade nas amostras de endometriose tratadas com Parecoxib, e como nas análises com VEGF, as células epiteliais mostraram uma acentuada atrofia e regressão (Figura 42 D).

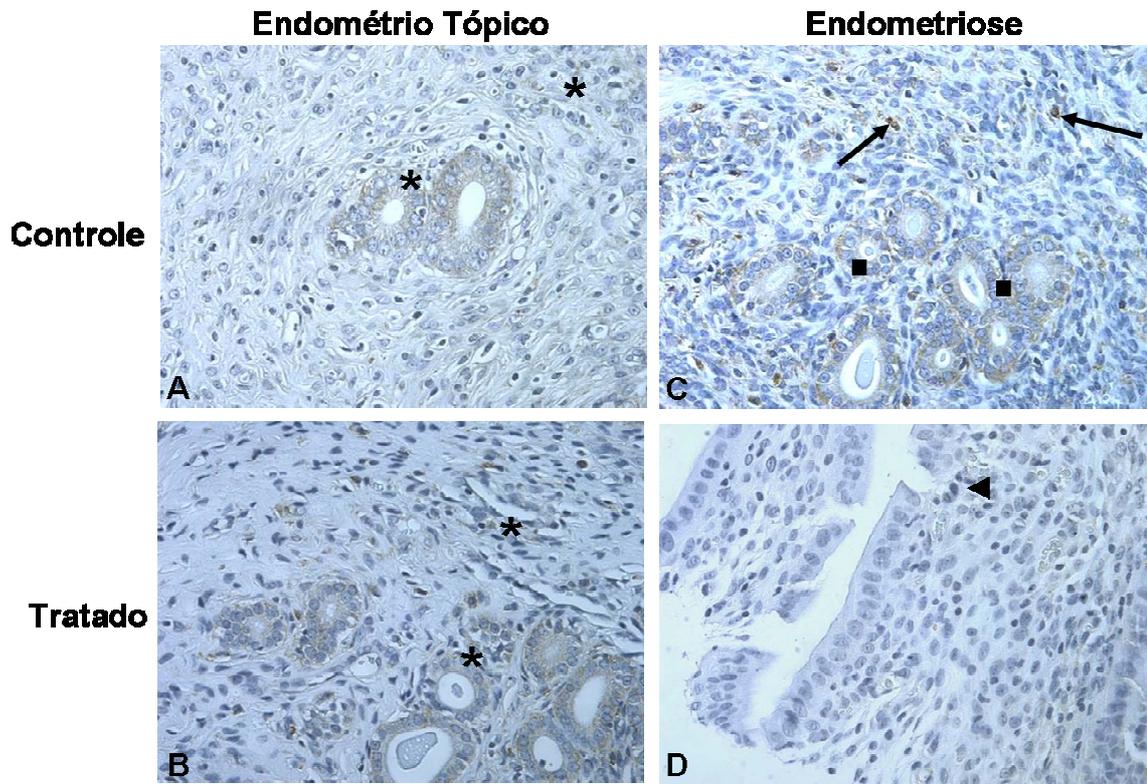


Figura 42: Análise da distribuição do Flk-1. Nos tecidos endometriais, observa-se imunomarcações do Flk-1 nas células epiteliais e ao logo do estroma (\*). Como as análises do VEGF, nos tecidos endometrióticos observa-se uma distribuição do Flk-1 mais concentrada nas células epiteliais (■) e também em alguns vasos sanguíneos (→) nas amostras controles (; já nas lesões tratadas com Parecoxib, o tecido mostra acentuada atrofia e regressão sendo encontradas poucas células marcadas com Flk-1 (◄). Aumento original 400X.

A análise estatística das imunomarcações para Flk-1 no endométrio tópico e nas endometrioses de ratas confirmou uma diminuição significativa nas endometrioses tratadas em comparação com as controles (Figura 43 A). Estes resultados são mostrados também no histograma que representa a porcentagem de células marcadas para Flk-1 (Figura 43 B).

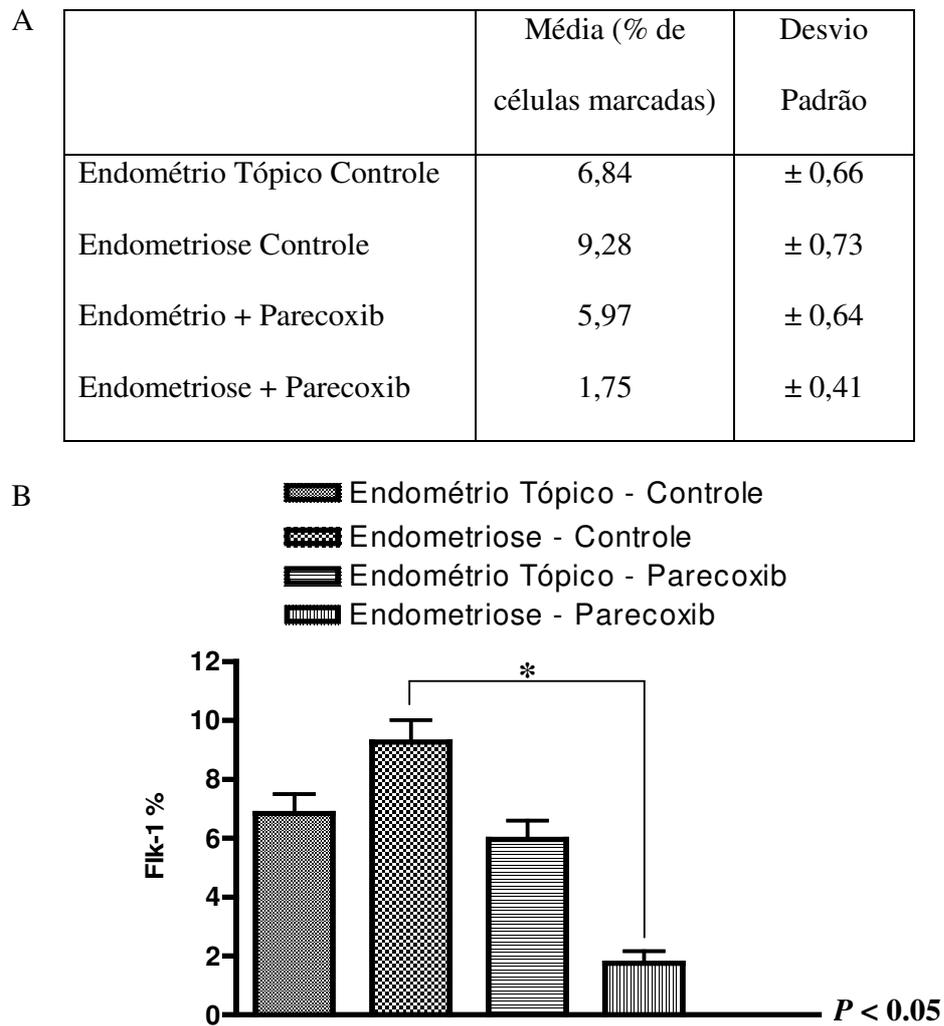


Figura 43: Análise estatística das imunomarcações com Flk-1 no endométrio tópico e nas endometrioses de ratas dos grupos controle e tratado. A histomorfometria demonstrou uma diminuição significativa na distribuição do Flk-1 nas amostras de endometrioses do grupo tratado em relação ao controle. A: Distribuição da media e desvio padrão. B: Histograma representando a porcentagem de células marcadas para Flk-1.

As imunoreatividades da distribuição de macrófagos ativos com ED-1 foram observadas em pouca quantidade ao longo do estroma nos tecidos endometriais controles (Figura 44 A) e tratados (Figura 44B). Nas amostras controles de endometriose (Figura 44 C), esta distribuição

foi vista em maior número ao longo do estroma em comparação ao endométrio tópico em ambos os grupos, onde não foram observadas diferenças. Entretanto, nas lesões tratadas, o número de macrófagos observados foi menor e novamente os tecidos mostraram uma intensa atrofia e regressão nas células epiteliais (Figura 44 D).

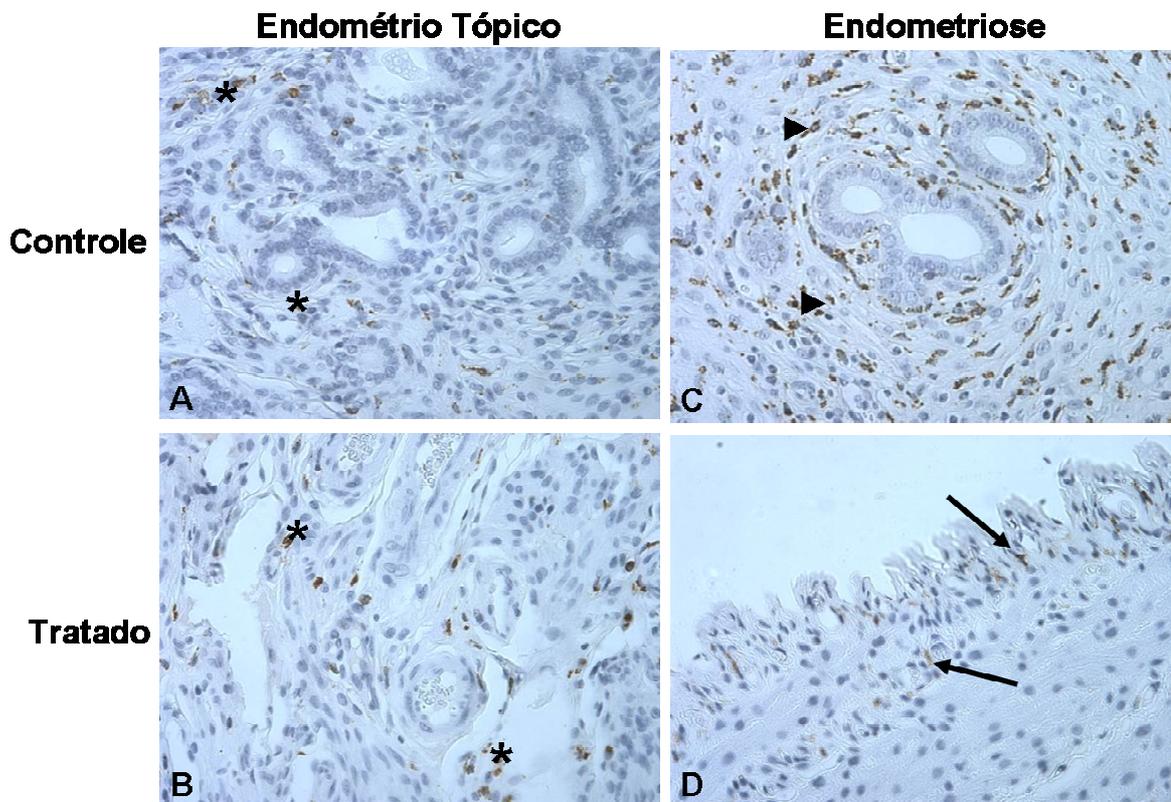


Figura 44: Análise de macrófagos ativos marcados com ED-1. A distribuição de macrófagos ativos foi observada em maior quantidade no estroma, principalmente ao redor das glândulas, nas amostras controles de endometriose (▶) em comparação ao endométrio tópico em ambos os grupos (\*). Nas lesões tratadas, o número de macrófagos marcados com ED-1 foi menor, e novamente os tecidos mostraram uma intensa regressão (→) Aumento original 100X.

As análises estatísticas das imunomarcações com ED-1 mostraram uma diminuição significativa no número de macrófagos ativos marcados com ED-1 nas endometrioses tratadas em comparação às amostras controles (Figura 45 A), sendo estes resultados confirmados no histograma representando o número de macrófagos positivos para ED-1 (Figura 45 B).

A

	Média (nº de macrófagos)	Desvio Padrão
Endométrio Tópico Controle	9,7	± 1,33
Endometriose Controle	75,9	± 1,79
Endométrio + Parecoxib	7,7	± 1,41
Endometriose + Parecoxib	12,4	± 1,71

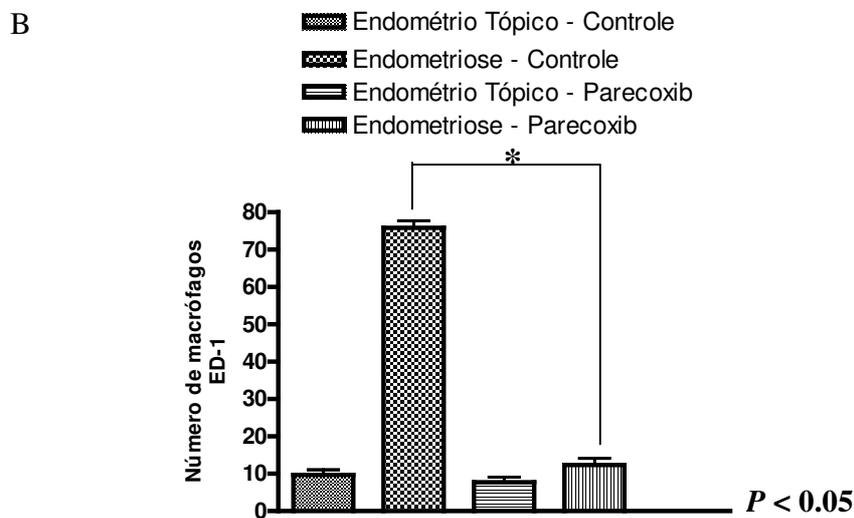


Figura 45: Análise estatística das imunomarcações com ED-1 no endométrio tópico e nas endometrioses de ratas dos grupos controle e tratado. A contagem mostrou uma diminuição significativa no número de macrófagos ativos marcados com ED-1 nas endometrioses tratadas em comparação às amostras controles. A: Distribuição da média e desvio padrão. B: Histograma representando o número de macrófagos positivos para ED-1.

O último estudo para a avaliação da angiogênese no endométrio tópico e nas lesões endometrióticas controles e tratadas foi realizado com as análises da expressão de MMP-9. Pela técnica de RT-PCR, os níveis de expressão do gene da MMP-9 foram avaliados de acordo com o RNAm transcrito. Conforme os resultados com o VEGF e seu receptor, a expressão de MMP-9 também foi menor nas lesões endometrióticas tratadas com Parecoxib, mostrando uma redução significativa na angiogênese nesses animais tratados (Figura 46).

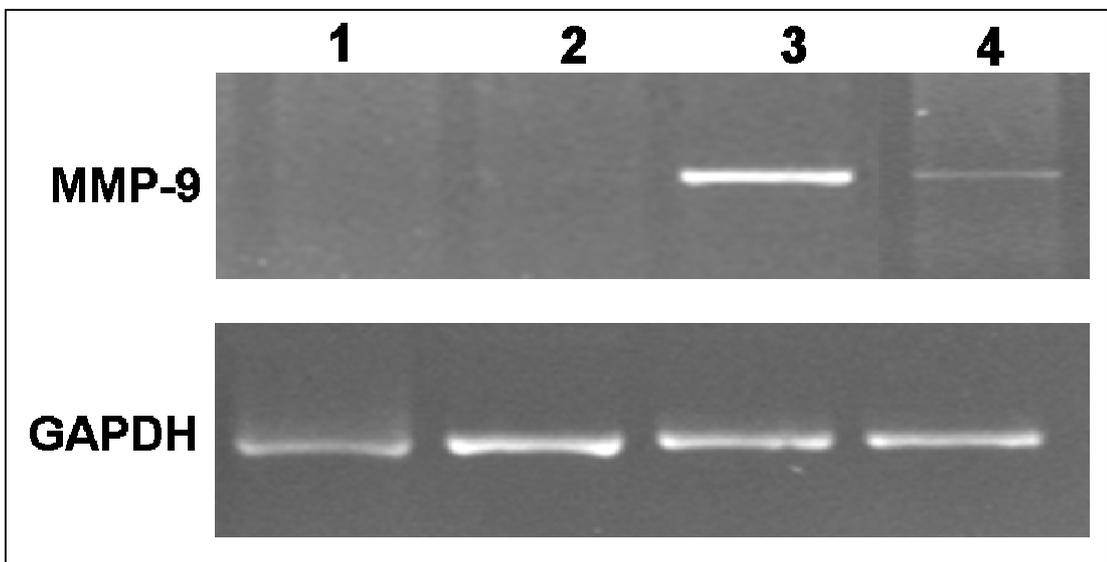


Figura 46: Expressão do RNAm transcrito do gene da MMP-9 em amostras de endométrio tópico e de lesões endometrióticas com e sem tratamento por RT-PCR. Linha 1, endométrio tópico - controle. Linha 2, endométrio tópico - tratado. Linha 3, endometriose - controle. Linha 4, endometriose - tratado. Os níveis de RNAm transcrito da MMP-9 nas lesões endometrióticas tratadas foram menores em comparação as amostras controle. Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) RNAm foi utilizado como controle.

#### **4.3.4. Análise da expressão e da distribuição de COX-2 no endométrio tópico e nas lesões endometrióticas controles e tratadas**

Novamente, as marcações para COX-2 foram detectadas predominantemente nas células epiteliais com pouca distribuição ao longo do estroma. No endométrio tópico, a imunodistribuição foi similar nos animais controles (Figura 47 A) e tratados (Figura 47 C). Nas lesões endometrióticas controles (Figura 47 B), as marcações foram encontradas com maior intensidade em comparação as amostras de endométrio. Nos animais tratados com Parecoxib, a distribuição de COX-2 foi menor nas lesões endometrióticas, mostrando também uma constante atrofia e regressão do epitélio glandular (Figura 47 D). Estes resultados são confirmados com a análise dos níveis de RNAm transcrito da COX-2, sendo observada uma menor expressão nas lesões tratadas em relação as amostras controles (Figura 47 E).

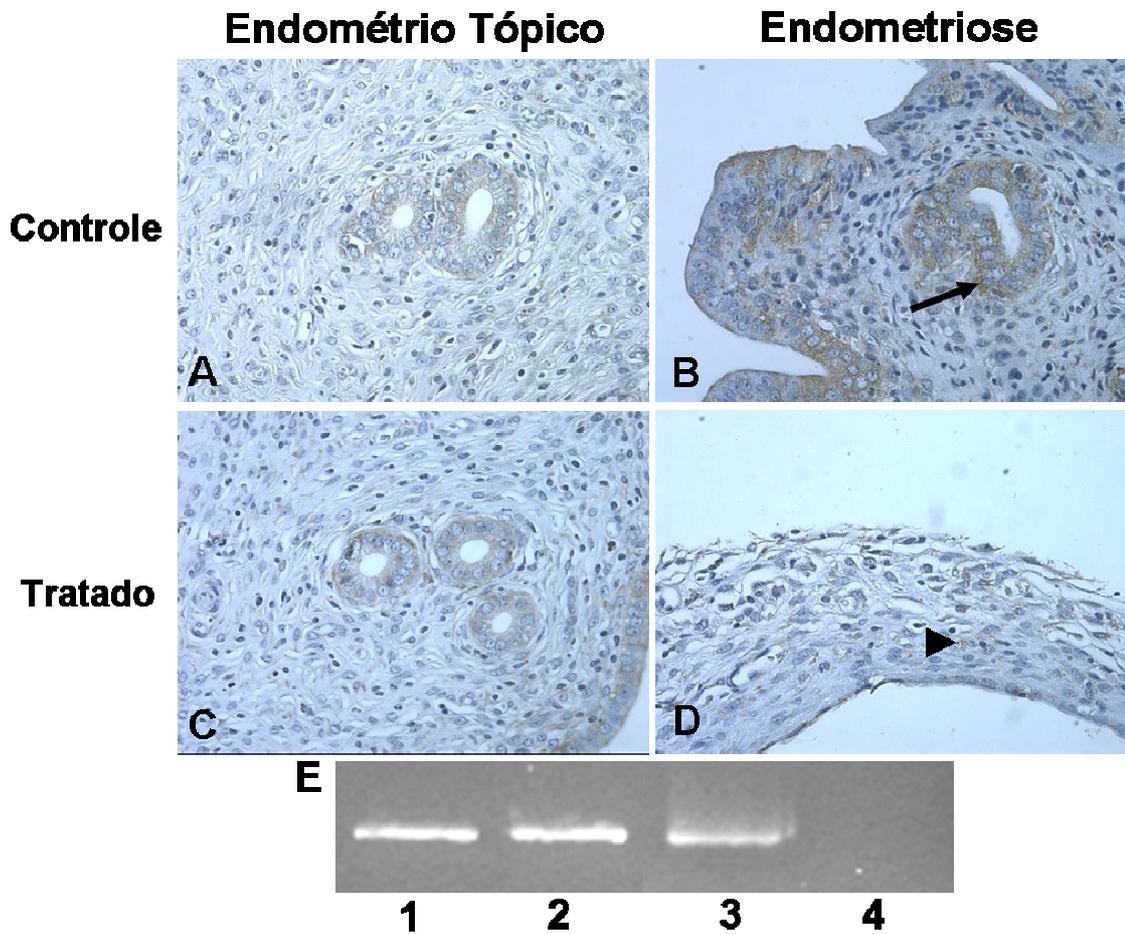


Figura 47: Análise imunohistoquímica (A, B, C e D) e RT-PCR (E) para COX-2 em amostras de endométrio tópico e de lesões endometrióticas com e sem tratamento. A imunoreação para COX-2 foi detectada predominantemente nas células epiteliais glandulares no endométrio tópico (\*) e de forma mais intensa nas endometrioses no grupo controle (→). Nos casos tratados com Parecoxib, a distribuição de COX-2 foi menor nas lesões endometrióticas e o tecido mostra constantes atrofias nas células epiteliais (▶). Aumento original 100X. Como esperado, os níveis de RNAm da COX-2 foram menores nas lesões endometrióticas tratadas em relação as amostras controles (E). Linha 1: endométrio tópico - controle. Linha 2: endometriose - controle. Linha 3: endométrio tópico - tratado. Linha 4: endometriose - tratado.

As análises histomorfométricas das imunomarcações com COX-2 no endométrio tópico e nas endometrioses de ratas dos grupos controle e tratado confirmaram uma diferença estatística significativa entre os grupos, demonstrando uma diminuição na distribuição da COX-2 nas amostras de endometrioses do grupo tratado em relação ao controle (Figura 48 A). Estes resultados também são mostrados no histograma representando a porcentagem de células marcadas para COX-2 (Figura 48 B).

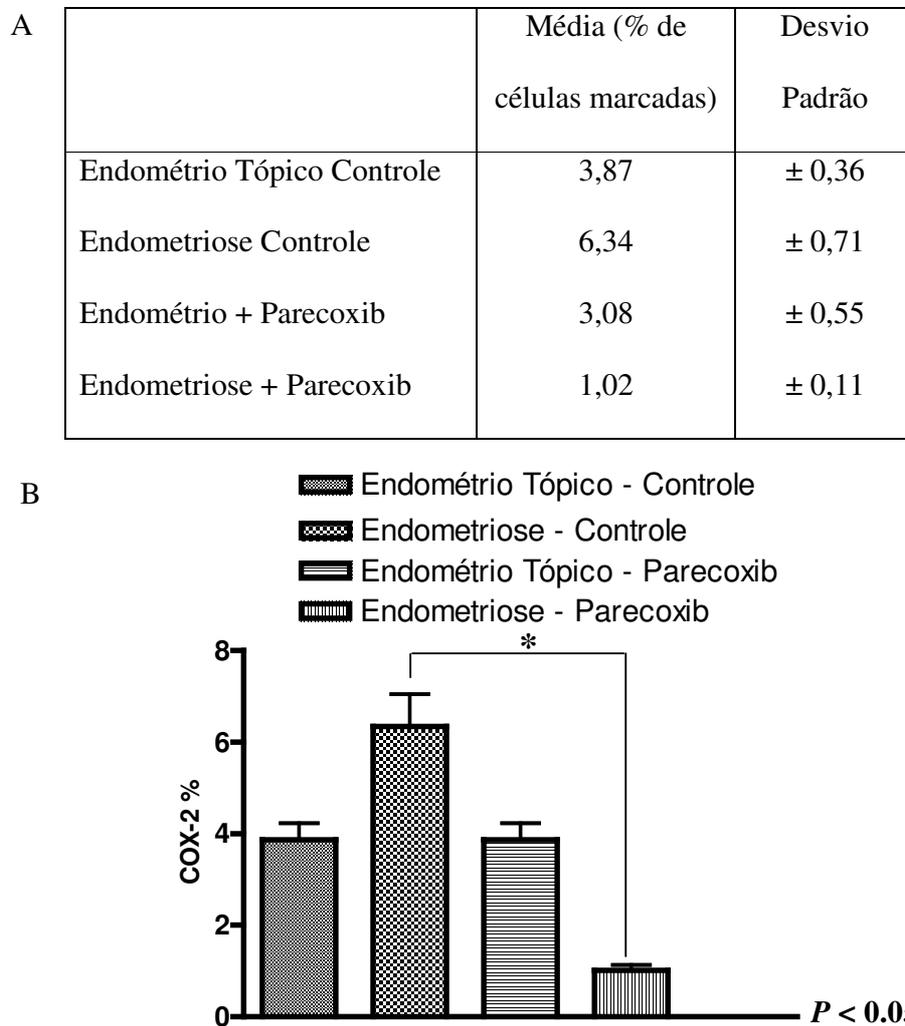


Figura 48: Análise estatística das imunomarcações com COX-2 no endométrio tópico e nas endometrioses de ratas dos grupos controle e tratado. A histomorfometria demonstrou uma diminuição significativa na distribuição do COX-2 nas amostras de endometrioses do grupo tratado em relação ao controle. A: Distribuição da média e desvio padrão. B: Histograma representando a porcentagem de células marcadas para COX-2.

#### 4.3.5. Concentrações de PGE<sub>2</sub> no endométrio tópico e nas lesões endometrióticas controles e tratadas

A atividade da COX-2 foi avaliada com a medida dos níveis de PGE<sub>2</sub> sintetizadas no modelo experimental de endometriose por ensaio imunoenzimático. Os níveis de PGE<sub>2</sub> no endométrio tópico controle (925 pg/ml ± 43) e tratado (946 pg/ml ± 66) foram similares. Os resultados mostraram que nas lesões endometrióticas tratadas com Parecoxib os níveis de PGE<sub>2</sub> diminuíram de forma significativa em comparação as amostras do grupo controle (5.254 pg/ml ± 948 e 212 ± 95 respectivamente) (Figura 49).

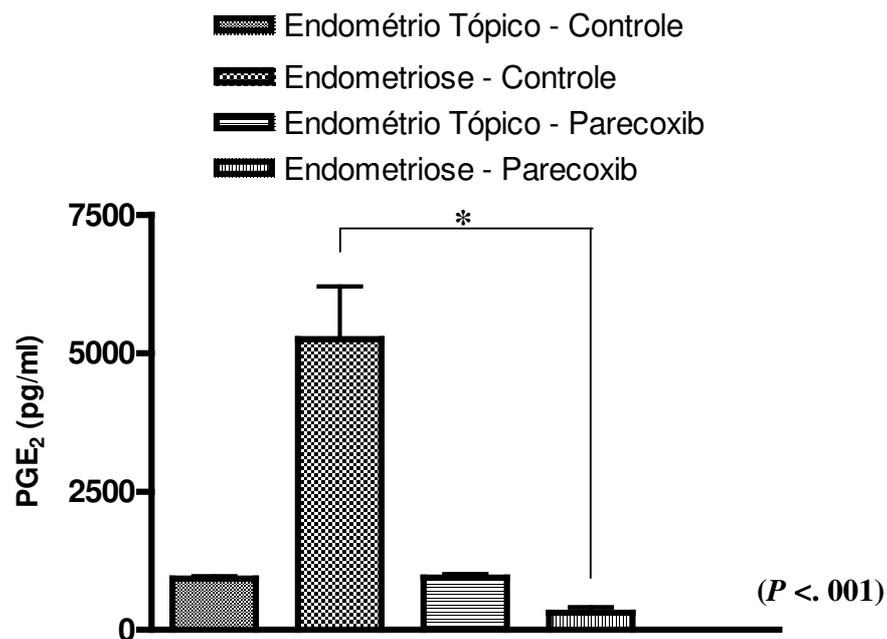


Figura 49: Concentrações de PGE<sub>2</sub> no endométrio tópico e nas lesões endometrióticas de ratas dos grupos controle e tratado determinadas por ensaio imunoenzimático. Os níveis de PGE<sub>2</sub> no endométrio tópico controle e tratado foram similares. Nos casos de endometriose, as lesões tratadas com Parecoxib tiveram os níveis de PGE<sub>2</sub> diminuídos (\*) em comparação as amostras controle.

## 5. DISCUSSÃO

O processo de angiogênese é de extrema importância na fisiopatologia da endometriose, pois o tecido endometrial ectópico necessita de uma nova rede vascular para seu desenvolvimento. Em nosso primeiro trabalho (anexo I), confirmamos a importância da angiogênese em lesões endometrióticas profundas humanas, pois vimos um aumento da vascularização, da distribuição de VEGF e seu receptor Flk-1 em endometriose (grau III e IV) em relação ao endométrio típico humano (Machado e cols., 2008). Partindo dessa premissa, componentes com ação anti-angiogênica podem interferir no desenvolvimento das lesões. Atualmente, estudos têm procurado estabelecer modelos experimentais de endometriose para investigar o uso destes agentes como um tratamento clínico efetivo desta patologia. Os resultados obtidos nesse trabalho sugerem o uso clínico destes compostos em mulheres com endometriose.

Na primeira parte dos resultados, estabelecemos um modelo experimental para o estudo da endometriose e demonstramos que as lesões são muito vascularizadas e possuem um alto potencial angiogênico (anexo II). Conforme descrito por Vernon e Wilson (1985), realizamos um transplante autólogo de endométrio e implantamos os fragmentos na cavidade peritoneal dos animais. Com 15 e 30 dias desde o implante inicial, as lesões cresceram e aderiram completamente na cavidade peritoneal. As análises histológicas mostraram a viabilidade das lesões, sendo observadas características morfológicas definidas, como presença de um estroma muito celular e glândulas endometriais retilíneas. Nossos resultados estão de acordo com Dogan e cols., (2004), que demonstraram, através de observações macroscópicas, implantes endometriais viáveis em 26 de 30 (86,6%) animais estudados, sendo que a maioria dos implantes eram císticos e bem vascularizados. Mostraram ainda, que as características histológicas eram semelhantes à doença em humanos, incluindo lesões vascularizadas contendo glândulas endometriais e estroma.

Modelos experimentais são indispensáveis para uma melhor compreensão da fisiopatologia da endometriose, como também para testar novos modelos de tratamento desta patologia. Embora existam desvantagens em extrapolar dados, estudos utilizando modelos experimentais são extremamente importantes, pois eventos relacionados com a patogênese da endometriose não são acessíveis em seres humanos (Grümmer, 2006). Ainda, o tecido endometriótico em ratas é similar se comparado ao humano, como revelado neste estudo. Becker e cols., (2006) desenvolveram um modelo *in vivo* menos invasivo para o estudo da endometriose. Os autores utilizaram camundongos transgênicos fluorescentes, e a seguir, os tecidos endometriais foram retirados destes animais e implantados em animais selvagens. Os focos endometrióticos foram claramente observados com luminescência transabdominal e o tamanho das lesões foi correlacionado com a intensidade da luminescência. Em outro estudo, Hirata e cols., (2005) mostraram um modelo usando camundongos que expressam a *green fluorescence protein* (GFP). O tecido endometrial foi retirado destes animais e injetados em camundongos selvagens, sendo observadas lesões com fluorescência de forma mais clara e rápida, permitindo a identificação de focos microscópicos e uma análise quantitativa mais precisa.

Estudando a densidade vascular dos implantes a partir de imunomarcações para vWF e  $\alpha$ -actina de músculo liso, demonstramos uma maior quantidade de vasos sanguíneos nas lesões endometrióticas em relação ao endométrio tópico. As marcações para vWF nas endometrioses de 15 e 30 dias não apresentaram diferenças, no entanto, nas lesões de 30 dias, foram observados um número maior de vasos sanguíneos marcados para  $\alpha$ -actina de músculo liso. Esta diferença está relacionada ao fato de que a maior parte dos vasos sanguíneos são maduros, conforme demonstrado por Groothuis e cols., (2005). Esta observação indica que o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos é necessário para o estabelecimento das lesões endometrióticas, e também que os vasos recém formados são mais maduros nas endometrioses depois de 30 dias.

Utilizando os mesmos marcadores em modelo com camundongos *nude* de endometriose, Nap e cols., (2004) relataram que o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos é essencial na manutenção e crescimento da endometriose.

Uma das principais características da endometriose é a sua natureza inflamatória. Estudos demonstraram que citocinas produzidas por células imunes desempenham um papel importante na patogênese da endometriose, e muitas dessas citocinas possuem atividade angiogênica (Vinatier e cols., 1996; Becker e D'Amato, 2007). O VEGF é o fator angiogênico mais importante na endometriose, e acredita-se que, quando ligado a seus receptores, é o principal responsável pelo aumento da permeabilidade vascular nesta doença (Taylor e cols., 2002). Em nosso modelo, demonstramos que a expressão e a distribuição do VEGF e de seu receptor Flk-1 foi maior em lesões endometrióticas comparado com o controle. Também observamos um aumento no número de macrófagos ativos nas lesões endometrióticas. Nossos resultados estão de acordo com outros estudos que mostraram uma alta relação entre o VEGF e macrófagos ativos nas lesões endometrióticas. Os autores relataram que o VEGF é expresso em níveis elevados nas lesões endometrióticas, e que esta expressão se deve a presença de macrófagos ativos (McLaren e cols., 1996). Nessa mesma linha, Wang e cols., (2005) descreveram uma alta expressão de Flk-1 em lesões endometrióticas peritoneais, e concluem que esse resultado está fortemente associado com a neovascularização das lesões.

Macrófagos peritoneais e linfócitos ativos parecem desempenhar um papel importante na secreção de citocinas pró-inflamatórias e pró-angiogênicas. Mueller e cols., (2000) demonstraram que os macrófagos ativos produzem interleucina-1  $\beta$  (IL-1  $\beta$ ) em pacientes com endometriose, e que isso resulta na expressão aumentada de VEGF. Em modelo de endometriose em camundongo, foi reportado que a interleucina-6 (IL-6) em associação com o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) foi secretada por macrófagos, e que também resultou em um aumento do

VEGF (Lin e cols., 2006). Esses resultados reforçam a idéia de que fatores angiogênicos e citocinas inflamatórias possuem funções importantes no estabelecimento e no crescimento de lesões no microambiente da endometriose, e sugerem que o balanço desses fatores pró e anti-angiogênicos determina o crescimento e o desenvolvimento das lesões endometrióticas. Neste contexto, o comportamento do tecido endometriótico é muito semelhante ao observado em processo tumorais (Folkman, 1971).

Como a endometriose apresenta proliferação celular, invasão celular e neoangiogênese, as MMPs são de extrema importância, pois participam da angiogênese inicial degradando componentes da matriz extracelular. Chen e cols., (2004) mostraram níveis elevados de MMP-9 e baixos de TIMP-1 no endométrio ectópico em comparação com o tópico. Os autores concluem que essa diferença na expressão de MMP-9 e TIMP-1 nas lesões pode estar relacionada com a patogênese da endometriose. Em trabalho recente, Di Carlo e cols., (2009) avaliaram a expressão de VEGF e MMP-9 em endometriomas de ovário por imunohistoquímica e RT-PCR em tempo real. Como resultado, foram observados aumentos na expressão e na distribuição do VEGF e da MMP-9 nos cistos endometrióticos em comparação ao controle. Entretanto, esses marcadores foram encontrados em grande quantidade no endométrio das mulheres com endometriose, o que favorece o crescimento de novos vasos sanguíneos e posteriormente a implantação e o desenvolvimento da endometriose. Em nosso modelo, a expressão do RNAm da MMP-9 foi maior nas endometrioses em relação ao endométrio, o que indica um papel direto desta MMP no estabelecimento das lesões na cavidade peritoneal. Esses resultados confirmam a importância das MMPs na progressão da endometriose.

Além das MMPs, estudos demonstram que proteoglicanos desempenham um papel importante na manutenção da integridade vascular. Kim-Safran e cols., (2008) relataram que proteoglicanos estão envolvidos na angiogênese modulando alguns fatores de crescimento como

o bFGF e o VEGF. Recentemente em nosso laboratório (anexo III), realizamos a caracterização histoquímica e bioquímica dos GAGs sulfatados e a imunolocalização do condroitin sulfato (CS) em lesões endometrióticas profundas humanas. Como resultado, observamos uma alta concentração de CS no estroma nos focos endometrióticos, sugerindo que o CS esteja relacionado com a angiogênese nas lesões profundas (Berardo e cols., 2009).

A partir da primeira parte dos resultados, demonstramos que o perfil angiogênico das lesões endometrióticas no modelo experimental é semelhante à doença humana. Entretanto, apesar dos avanços recentes nessa área, o conhecimento sobre os mecanismos que regulam o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos nas lesões endometrióticas ainda é limitado. A introdução dos modelos *in vivo* de endometriose proporciona uma observação mais detalhada da angiogênese, e certamente auxilia uma melhor compreensão desse mecanismo. Dessa forma, pode ser possível desenvolver novas estratégias de tratamento com compostos de ação anti-angiogênica, na tentativa de uma terapia eficaz para mulheres com endometriose. Nap e cols., (2004), avaliaram o efeito dos componentes angiostáticos, anti-VEGF-A, TNP-470, endostatina e anginex, na tentativa de inibir o estabelecimento de lesões endometrióticas. Nesse estudo, foi realizado um transplante de endométrio humano em camundongos, e após 3 semanas as lesões de endometriose estavam estabelecidas. A vascularização das lesões foi analisada através de imunomarcagem com  $\alpha$ -actina de músculo liso e Fator VIII. Os autores obtiveram como resultado uma diminuição do número de vasos novos nas lesões endometrióticas tratadas, sugerindo que a angiogênese é um pré-requisito para a manutenção e crescimento das lesões endometrióticas.

Com os resultados obtidos de estudos com agentes angiostáticos em modelos de endometriose, a busca de possíveis fármacos de ação anti-angiogênica torna-se bastante relevante. Como descrito anteriormente, a inflamação e a angiogênese são dois processos que

estão fortemente associados com doenças (Pupo-Nogueira e cols., 2007), e a liberação de PGE<sub>2</sub> pode possuir um papel importante em ambos os cenários (Sales e Jabbour, 2003). Kirkpatrick e cols., (2002) observaram que o aumento na expressão de COX-2 está diretamente relacionado com o aumento na expressão de VEGF em células de câncer de mama. Estudos também relatam as interações entre COX-2 e VEGF no desenvolvimento de lesões endometrióticas humanas. A inibição da COX-2 previne o estabelecimento da endometriose e reduz o tamanho e o número de lesões em diferentes modelos animais (Matsuzaki e cols., 2004a). Banu e cols., (2008) encontraram grande quantidade de COX-2 nos tecidos endometrióticos. Os autores relataram que este aumento induz a produção de PGE<sub>2</sub>, e esta regula a sobrevivência, a migração e a invasão das células endometrióticas estromais e epiteliais. Demonstraram ainda, que a inibição da COX-2 diminuiu o crescimento e a invasão das lesões em humanos.

Por conseguinte, a COX-2 é responsável pela produção dos mediadores da inflamação sugerindo uma relação com a angiogênese, uma vez que estes processos estão fortemente associados a doenças (Gazvani e Templeton, 2002). A partir daí, na segunda parte dos nossos resultados, observamos uma maior expressão e distribuição da COX-2 nas lesões endometrióticas em comparação com o endométrio tóxico. Nossos resultados estão de acordo com Matsuzaki e cols., (2004b), que observaram uma expressão elevada de COX-2 estudando lesões endometrióticas profundas em humanos. A partir da segunda parte dos nossos resultados, concluímos que a COX-2 está presente em grande quantidade nas lesões endometrióticas. Esse resultado sugere uma interação da COX-2 com o VEGF, sendo de extrema importância para o desenvolvimento das lesões endometrióticas no modelo experimental, principalmente pelo estímulo da angiogênese.

Na terceira parte dos nossos resultados, demonstramos que o uso do inibidor seletivo de COX-2 Parecoxib, administrado via intramuscular, resulta na regressão dos implantes

endometrióticos. Também mostramos uma redução da densidade vascular, VEGF, Flk-1, macrófagos ativos, COX-2 e PGE<sub>2</sub> nas lesões tratadas com Parecoxib. Resultados semelhantes foram descritos por Dogan e cols., (2004) investigando os efeitos do inibidor da COX-2 rofecoxib em modelo de endometriose em rato. Após as administrações, os autores relataram uma diminuição no tamanho dos explantes (62,4%) comparados com o controle (16,6%). Neste mesmo estudo, avaliaram os níveis de VEGF após as administrações do rofecoxib e obtiveram uma diminuição deste fator, sendo proposto que o fármaco em estudo atue na diminuição de fatores angiogênicos como o VEGF, que é vital para a angiogênese da endometriose. A partir desses resultados, os autores concluem que a inibição da enzima COX-2 poderia estar influenciando no desenvolvimento das lesões endometrióticas a partir de sua ação anti-angiogênica, e se confirmado em humanos poderia ser utilizado como tratamento efetivo desta patologia. No entanto, as terapias clínicas atuais de endometriose agem reduzindo os níveis de esteróides endógenos. O Danazol, os contraceptivos orais e os análogos de GnRH são eficazes para tratar os sintomas associados a endometriose, e também reduzem as lesões (Rice, 2002), contudo, apresentam altos efeitos colaterais que constituem um problema e limitam o uso a longo prazo (Mihalyi e cols., 2006; Vercellini e cols., 2008). Considerando a falta de eficiência dos tratamentos disponíveis, o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes, com menos efeitos colaterais e nenhum efeito negativo, é necessário.

Em nosso estudo, claramente mostramos que o inibidor seletivo da COX-2 Parecoxib reduziu efetivamente o tamanho dos implantes no modelo experimental de endometriose peritoneal (anexo IV). Os achados histopatológicos mostraram uma constante atrofia e regressão das lesões, especialmente no tecido epitelial. Efstathiou e cols., (2005) observaram que diferentes AINEs reduzem as lesões em modelo de endometriose em camundongo: o Celecoxib e a Indometacina foram os mais eficazes, sendo que a aspirina não teve nenhum efeito nas lesões.

Interessante ressaltar que o tratamento com Celecoxib foi eficaz na regressão da endometriose somente no estabelecimento e no crescimento das lesões, não tendo nenhum efeito nas lesões já estabelecidas. Ao contrário, o nosso tratamento afetou a progressão e a manutenção das lesões, pois foi iniciado somente após o estabelecimento das lesões.

O desenvolvimento e a manutenção da endometriose são dependentes do crescimento de novos vasos sanguíneos (Groothuis e cols., 2005). Para analisar a resposta vascular ao Parecoxib, examinamos a vascularização das lesões e observamos uma redução no número de vasos no grupo tratado. Os nossos resultados estão de acordo com Ozawa e cols., (2006), que também descreveram uma redução no número de vasos sanguíneos nas lesões endometrióticas em ratas tratadas com inibidor seletivo de COX-2. Em contrapartida, Efstathiou e cols., (2005), usando CD31 como marcador endotelial, não encontraram diferença na densidade vascular nas lesões endometrióticas controle e tratadas com Celecoxib e aspirina.

Demonstramos neste estudo que a expressão e a distribuição do VEGF nos implantes endometrióticos foi significativamente mais baixa no grupo tratado em comparação com o grupo de controle. Esses resultados sugerem que o mecanismo de ação do Parecoxib na regressão das lesões seja devido a sua atuação na redução do VEGF, que é vital para a sobrevivência das lesões endometrióticas. A importância do VEGF foi descrita pelo nosso grupo em trabalho anterior (anexo II), onde a imunolocalização deste fator foi mais intensa em lesões de endometriose profunda, sugerindo uma correlação positiva entre níveis de VEGF e a severidade da doença (Machado e cols., 2008). Laschke e cols., (2007) também observaram que o inibidor seletivo de COX-2 NS398 induz a regressão dos implantes autólogos endometriais pela sua ação na supressão da angiogênese e na estimulação da apoptose. Esses autores demonstraram que nos implantes endometrióticos tratados ocorreu uma redução na proliferação celular e na expressão do VEGF, bem como uma indução da apoptose associada a expressão de caspase-3. Esses

resultados reforçam a idéia de que o uso de inibidores seletivos de COX-2 reduzem as lesões endometrióticas pela inibição da expressão do VEGF.

Os receptores Flt e Flk-1 são expressos predominantemente em células endoteliais, e quando ligados ao VEGF, estimulam a migração e a proliferação celular e o aumento na liberação de enzimas proteolíticas (Ferrara e cols., 1992). Também observamos em nosso modelo uma redução significativa na expressão e na distribuição do Flk-1 nas lesões endometrióticas do grupo tratado com Parecoxib, reforçando a idéia de que o Parecoxib possui uma atividade anti-angiogênica. Em modelo experimental de endometriose, este é o primeiro estudo a demonstrar uma redução do VEGF e de seu receptor após tratamento com inibidor seletivo de COX-2.

A endometriose é considerada uma doença multifatorial, mas existem evidências de que disfunções no sistema imunológico influenciam na fisiopatologia e nas manifestações clínicas da doença (Giudice e Kao, 2004). Siristatidis e cols., (2006) demonstraram que pacientes com endometriose apresentaram uma redução de células *natural killer* (NK) e de linfócitos T citotóxicos, bem como um aumento no número de macrófagos ativos no líquido peritoneal. Esses resultados indicam que o processo de inflamação é maior na endometriose em comparação com o endométrio tópico. Nossos resultados mostraram que o número de macrófagos marcados para ED-1 foi maior em lesões endometrióticas, no entanto, no grupo tratado com Parecoxib, este número foi diminuído indicando uma redução na inflamação e no processo de angiogênese, pois vários autores relataram que macrófagos são a fonte principal de VEGF produzido nas áreas de inflamação (McLaren e cols., 1996; Dionyssopoulou e cols., 2005; Lin e cols., 2006). Recentemente, foi investigado se o fator inibitório de macrófagos (MIF) pode influenciar na expressão de COX-2 e na produção de PGE<sub>2</sub> por células endometriais ectópicas. Como resultado os autores mostraram que o MIF apresentou vários efeitos diretos e indiretos no remodelamento,

na proliferação e na angiogênese tecidual, e concluíram que o MIF estimula a expressão de COX-2 e a secreção de PGE<sub>2</sub> (Carli e cols., 2009).

O mecanismo da superexpressão da COX-2 na endometriose ainda gera conflitos, mas foi sugerido que o aumento da resposta auto-imune no tecido endometriótico pode iniciar com a expressão de COX-2, estimulada por algumas citocinas (Ota e cols., 2001). Nós demonstramos que a expressão da COX-2 é mais alta na endometriose em relação ao endométrio tópico, sugerindo uma correlação com o VEGF no processo de angiogênese. Ceyhan e cols., (2008) relataram um aumento na expressão da COX-2 e VEGF no epitélio glandular de amostras de cistos endometrióticos, e discutem uma correlação direta destes dados com o processo de angiogênese. Além disso, os inibidores seletivos da COX-2 reduzem a expressão de MMP-2 e MMP-9, que contribuem para o desenvolvimento, a sobrevivência, e a invasão das lesões endometrióticas (Ueda e cols., 2002).

A PGE<sub>2</sub> é um importante mediador que regula proliferação, apoptose e migração celular, além de promover crescimento tumoral e estimular a angiogênese (Wang e Dubois, 2006). Em tecido endometriótico, Banu e cols., (2008) mostraram que a COX-2 é altamente expressa, e sugerem que este aumento e a produção de PGE<sub>2</sub> regule a sobrevivência, a migração, e a invasão de células endometrióticas epiteliais e estromais em humanos. Esses autores mostraram ainda, que a inibição farmacológica e genômica da COX-2 reduz o crescimento, a migração e a invasão dessas células endometrióticas. Recentemente, em outro estudo, esses autores estabeleceram linhagens imortalizadas de células endometrióticas epiteliais e estromais humanas para avaliar a atividade da COX-2 e a síntese da PGE<sub>2</sub>. Como resultado, a COX-2 foi expressa de forma abundante produzindo grande quantidade de PGE<sub>2</sub> (Banu e cols., 2009). Em nosso modelo, os achados são compatíveis com os resultados prévios de outros autores que demonstraram uma redução no crescimento endometrial a partir do uso de inibidores seletivos da COX-2 (Olivares e

cols., 2008). Ainda, o tratamento com Parecoxib reduziu a secreção de PGE<sub>2</sub> em nosso modelo. Dessa forma, os nossos resultados, juntamente com os achados de outros laboratórios (Efstathiou e cols., 2005, Wu e cols., 2007; Banu e cols., 2008), indicam que a PGE<sub>2</sub> tem um papel importante na patogênese da endometriose.

A partir da terceira parte dos nossos resultados, demonstramos que o inibidor seletivo da COX-2 Parecoxib foi efetivo na redução do crescimento dos implantes endometrióticos no modelo experimental. Esses resultados sugerem que esta redução deve-se, principalmente, pela atividade anti-angiogênica do Parecoxib, e indicam estudos deste agente em humanos como uma possível terapia clínica efetiva da endometriose.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrao MS. Endometriose: uma visão contemporânea. 2000. Editora Revinter.

Abrao MS, Neme RM, Carvalho FM, Aldrighi JM, Pinotti JA. Histological classification of endometriosis as a predictor of response to treatment. *Int J Gynecol Obstet.* 2003;82:31-40.

Abrao MS, Podgaec S, Dias JA, Averbach M, Garry R, Ferraz Silva LF, Carvalho FM. Deeply infiltrating endometriosis affecting in the rectum and lymph nodes. *Fertil Steril* 2006;86(3):543-547.

Acosta AA, Buttran VC, Besch PK. A proposed classification of pelvic endometriosis. *Obstet Gynecol.* 1973;42:19-24.

Banu SK, Lee J, Speights VO, Starzinski-Powitz A, Arosh JA. Cyclooxygenase-2 regulates survival, migration, and invasion of human endometriotic cells through multiple mechanisms. *Endocrinol.* 2008;149(3):1180-1189.

Banu SK, Starzinski-Powitz A, Speights VO, Burghardt RC, Arosh JA. Induction of peritoneal endometriosis in nude mice with use of human immortalized endometriosis epithelial and stromal cells: a potential experimental tool to study molecular pathogenesis of endometriosis in humans. *Fertil Steril.* 2009;91(5):2199-2209.

Becker CM, Wright RD, Satchi-Fainaro R, Funakoshi T, Folkman J, Kung AL, D'Amato RJ. A Novel Noninvasive Model of Endometriosis for Monitoring the Efficacy of Antiangiogenic Therapy. *Am J Pathol.* 2006;168(6):2074-2084.

Becker CM, D'Amato RJ. Angiogenesis and antiangiogenesis therapy in endometriosis. *Microvas Res.* 2007;74:121-130.

Benagiano G, Brosens I. The history of endometriosis: identifying the disease. *Hum Reprod.* 1991;6:963-968.

Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Pode D, and Keshet E. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J Clin Invest.* 1999;103:159-165.

Berardo PT, Abrao MS, Souza MLS, Machado DE, Silva LCF, Nasciutti LE. Composition of sulfated glycosaminoglycans and immunodistribution of chondroitin sulfate in deeply infiltrating endometriosis affecting the rectosigmoid. *Micron.* 2009;40:639-645.

Bernhard ED, Gruber SB, Muschel RJ. Direct evidence linking expression of matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/collagenase) to the metastatic phenotype in transformed rat embryo cells. *Proc Natl Acad Sci.* 1994;91:4293– 4297.

Boocock CA, Chermock-Jones DS, Sharkey AM. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors flt and KDR in ovarian carcinoma. *J Natl Cancer Invest.* 1995;87:506-516.

Brouty-Boye D and Zetter BR. Inhibition of cell motility by interferon. *Science.* 1980;208:516-518.

Bulletti C, Ziegler DE, Albonetti A, Flamigni C. Paracrine regulation of menstruation. *J Reprod Immunol.* 1998;39:89-104.

Cao Y, Prescott SM. Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. *J Cell Physiol.* 2002;190(3):279-286.

Carli C, Metz CN, Al-Abed Y, Naccache PH, Akoum A. Up-regulation of cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in human endometriotic cells by macrophage migration inhibitory factor: involvement of novel kinase signaling pathways. *Endocrinology.* 2009;150(7):3128-3137.

Ceyhan ST, Onguru O, Baser I, Gunhan O. Expression of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in ovarian endometriotic cysts and their relationship with angiogenesis. *Fertil Steril.* 2008;90(4):988-993.

Chan FKL e Graham DY. Review article: prevention of non-steroidal anti-inflammatory drug gastrointestinal complications – review and recommendations based on risk assessment. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004; 19:1051-1061.

Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci.* 2002;99(21):13926-13931.

Chen QH, Qu JY, Xu YY, Qiu NX, Zhuang YZ, Zhong S, Fang QQ. Expressions of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in ectopic and eutopic endometrium. *Zhong Fu Chan.* 2004;39:809-812.

Cheer SM, Goa KL. Parecoxib (parecoxib sodium). *Drugs.* 2001;61:1133-1141.

Chishima F, Hayakawa S, Sugita K, Kinukawa N, Aleemuzzaman S, Nemoto N. Increased expression of cyclooxygenase-2 in local lesions of endometriosis patients. *Am J Reprod Immunol.* 2002;48:50-56.

Chung HW, Wen Y, Chun SH, Nezhat C, Woo BH, Polan L. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 mRNA expression in ectopic and eutopic endometrium in women with endometriosis: a rationale for endometriotic invasiveness. *Fertil Steril.* 2001;75:152-159.

Clarke CL and Sutherland RL. Progesterone Regulation of Cellular Proliferation. *Endocr Rev.* 1990;11(2):266-301.

Collette T, Bellehumeur C, Kats R, Maheux R, Mailloux J, Velleneuve M, Akoum A. Evidence for an increase in release of proteolytic activity by the eutopic endometrial tissue in women with endometriosis and for involvement of matrix metalloproteinase-9. *Hum Reprod.* 2004;19:1257-1264.

Collette T, Maheux R, Mailloux J, Akoum A. Increased expression of matrix metalloproteinase-9 in the eutopic endometrial tissue of women with endometriosis. *Human Reprod.* 2006;21(21):3059-3067.

Cox KE, Piva M, Sharpe-Timms KL. Differential regulation of matrix metalloproteinase-3 gene expression in endometriotic lesions compared with endometrium. *Biol Reprod.* 2001;65:1297-1303.

Darrow SL, Vena JE, Batt RE. Menstrual cycle characteristics and the risk of endometriosis. *Epidemiol.* 1993;4:135-142.

Di Carlo C, Bonifácio M, Tommaselli GA, Bifulco G, Guerra G, Nappi C. Metalloproteinases, vascular endothelial growth factor, and angiopoietin 1 and 2 in eutopic and ectopic endometrium. *Fertil Steril.* 2009;91(6):2315-2323.

Dionyssopoulou E, Vassiliadis S, Evangeliou A, Koumantakis EE, Athanassakis I. Constitutive or induced elevated levels of L-carnitine correlate with the cytokine and cellular profile of endometriosis. *J Reprod Immunol.* 2005;65(2):159-170.

Dogan E, Saygili U, Posaci C, Tuna B, Caliskan S, Altunyurt S, Saatli B. Regression of endometrial explants in rats treated with the cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib. *Fertil Steril.* 2004;82(3):1115-1120.

Efstathiou JA, Sampson DA, Levine Z, Rohan RM, Zurakowski D, Folkman J, D'Amato RJ, Rupnick MA. Nonsteroidal antiinflammatory drugs differentially suppress endometriosis in a murine model. *Fertil Steril.* 2005;83(1):171-181.

Eskenazi B and Warner ML. Epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 1997;24(2):235-258.

Fata JE, Ho ATV, Leco KJ, Moorehead RA, Khoka R. Cellular turnover and extracellular matrix remodeling in female reproductive tissues: functions of metalloproteinases and their inhibitors. *Cell Mol Life Sci.* 2000;57:77-95.

Ferenczy A, Bertrand G, Gelfand MM. Proliferation kinetics in human endometrium during normal menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol.* 1979;15:859-867.

Ferenczy A, and Bergeron C. Histology of the human endometrium. *An N Y Acad Scienc.* 1991; Part 1:7-27.

Fedele L, Parazzini F, Bianchi S, Arcaini L, Candiani GB. Stage and localization of pelvic endometriosis and pain. *Fertil Steril*. 1990;53:155-158.

Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev* 1992;13:18-32.

Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O`Shea KS, Poweel-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*. 1996;380:439-442.

Ferrara N and Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrinol Rev*. 1997;18:4-25.

Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell*. 2001;280:1358-1366.

Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *New Engl J Med*. 1971;285(21):1182-1186.

Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nature Reviews*. 2007;6:276-286.

Fort J. Celecoxib, a COX-2-specific inhibitor: the clinical data. *Am J Orthop*. 1999;28(3):13-18.

Freitas S, Meduri G, Nestour EL, Bausero P, Perrot-Applanat M. Expression of metalloproteinases and their inhibitors in blood vessels in human endometrium. *Biol Reprod.* 1999;61(4):1070-1082.

Fuji S. Secondary mullerian system and endometriosis. *Am J Obstet Gynecol.* 1991; 165:219-225.

Gagne D, Pagé M, Robitaille G, Hugo P, and Gosselin D. Levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) in serum of patients with endometriosis. *Hum Reprod.* 2003;18(8):1674-1680.

Gartner L P, Hiatt JL. *Tratado de Histologia em Cores.* 1<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1997.

Gately S. The contributions of cyclooxygenase-2 to tumor angiogenesis. *Cancer Metastase.* 2000;19:19-27.

Gazvani R, Templeton A. Peritoneal environment, cytokines and angiogenesis in the pathophysiology of endometriosis. *Reprod.* 2002;123:217-226.

Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 1998;273(21):13313-13316.

Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet* 2004;364:1789-1799.

Goodman & Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica. McGraw-Hill, 10<sup>o</sup> edição, 2003.

Gordon JD, Shifren JL, Foulk RA, Taylor RN, Jaffe RB. Angiogenesis in the Human Female Reproductive Tract. *Obstet Gynecol Surv.* 1995;50(9):688-697.

Goto F, Goto K, Weindel K, Folkman J. Synergistic effects of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and cord formation of bovine capillary endothelial cells within collagen gels. *Lab Invest.* 1993;69:508-517.

Groothuis PG, Nap AW, Winterhager E, Grümmer R. Vascular development in endometriosis. *Angiogenesis.* 2005;8(2):147-156.

Grümmer R. Animal models in endometriosis research. *Hum Reprod Update.* 2006;12(5):641–649.

Gupta RA, Dubois RN. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nat Rev Cancer.* 2001;1(1):11-21.

Hadfield R, Mardon H, Barlow D, Kennedy S. Delay in the diagnosis of endometriosis: a survey of women from USA and the UK. *Hum Reprod.* 1996;11(4):878-880.

Halme J, Hammond MG, Hulka JF. Retrograde menstruation in healthy women and patients with endometriosis. *Obstet Gynecol.* 1984;64:151-154.

Hanahan D and Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 1996;86:353-364.

Hayrabedyan S, Kyurkchiev S, Kehayov I. FGF-1 and S100A13 possibly contribute to angiogenesis in endometriosis. *J Reprod Immunol*. 2005;67(1-2):87-101.

Hickey M and Fraser IS. The structure of endometrial microvessels. *Hum Reprod*. 2000;15(Suppl 3):57-66.

Hirata T, Osuga Y, Yoshino O, Hirota Y, Harada M, Takemura Y, Morimoto C, Koga K, Yano T, Tsutsumi O, Taketani Y. Development of an experimental model of endometriosis using mice that ubiquitously express green fluorescent protein. *Hum Reprod* 2005;20(8):2092-2096.

Hua J, Muschel R. Inhibition of matrix metalloproteinase 9 expression by a ribozyme blocks metastasis in a rat sarcoma model system. *Cancer Res*. 1996;56:5279 –5284.

Huffman JW. External endometriosis. *Am J Obstet Gynecol*. 1951;62:1243.

Hull ML, Charnock-Jones DS, Han CLK, Bruner-Tran KL, Osteen KG, Tom BDM, Fan TD, Smith SK. Antiangiogenic agents are effective inhibitors of endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:2889-2899.

Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2004;350(23):2335-2342.

Hyder SM and Stancel GM. Regulation of angiogenic growth factors in the female reproductive tract by estrogens and progestins. *Mol Endocrinol.* 1999;13(5):806-811.

Ingber D, Fujita T, Kishimoto S, Sudo K, Kanamaru T, Brem H, Folkman J. Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumor growth. *Nature.* 1990;348:555-558.

Iruela-Arispe ML and Dvorak HF. Angiogenesis: a dynamic balance of stimulators and inhibitors. *Thromb Haemos.* 1997;78(1):672-677.

Jakeman L, Winer J, Bennett GL. Binding sites for vascular endothelial growth factor are localized on endothelial in adult rat tissue. *J Clin Invest.* 1992;89:244-253.

Junqueira LC e Carneiro J. *Aparelho Reprodutor Feminino. Histologia Básica.* 10<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004 p. 432-452.

Kakizoe T. Chemoprevention of cancer-focusing on clinical trials. *Jpn J Clin Oncol.* 2003;33:421-442.

Kierszenbaum AL. *Histologia e Biologia Celular: uma Introdução à Patologia*. 2<sup>a</sup> ed. Elsevier Editora. 2004 p. 368-372.

Kirkpatrick K, Ogunkolade W, Elkak A, Bustin S, Jenkins P, Ghilchik M, Mokbel K. The mRNA expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in human breast cancer. *Curr Med Res Opin* 2002;18:237-241.

Kirn-Safran, CB, D'Souza, SS, Carson, DD. Heparan sulfate proteoglycans and their binding proteins in embryo implantation and placentation. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2008; 19:187–193.

Klagsbrun M and D'Amore PA. Regulators of angiogenesis. *Annu Rev Physiol.* 1991;53:217-239.

Klein S, Roghani M, Rifkin DB. Fibroblast growth factors as angiogenesis factors: new insights into their mechanisms of action. *EXS.* 1997;79:159-192.

Knapp VJ. How old is endometriosis? Late 17<sup>th</sup>- and 18<sup>th</sup>-century European descriptions of the disease. *Fertil Steril.* 1999;72(1)10-14.

Kohorn EI and Tchao R. Conversion of proliferative endometrium to secretory endometrium by progesterone in organ culture. *J Endocrinol.* 1969;45:401-405.

Kokorine I, Nissole M, Donnez J, Eeckhout Y, Courtoy PJ, Marbaix E. expression of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) is related to the activity of human endometriotic lesions. *Fertil Steril*. 1997;68:246-251.

Koks CAM, Dunselman GAJ, De Goeij AFPM. Evaluation of a menstrual cup to collect shed endometrium for in vitro studies. *Fertil Steril*. 1997;68:560-564.

Laschke MW, Elitzsch A, Vollmar B, Vajkoczy P, Menger MD. Combined inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor, but not inhibition of VEGF alone, effectively suppresses angiogenesis and vessel maturation in endometriotic lesions. *Hum Repro*. 2005;19:1-7.

Laschke MW, Elitzsch A, Scheuer C, Vollmar B, Menger MD. Selective cyclo-oxygenase-2 inhibition induces regression of autologous endometrial grafts by down-regulation of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis and stimulation of caspase-3-dependent apoptosis. *Fertil Steril* 2007;87(1):163-171.

Lee HJ, Cho CH, Hwang SJ, Choi HH, Kim KT, Ahn SY, Kim JH, Oh JL, Lee GM, Koh GY. Biological characterization of angiopoietin-3 and angiopoietin-4. *FASEB J*. 2004;18:1200-1208.

Lin YJ, Lai MD, Lei HY, Wing LY. Neutrophils and macrophages promote angiogenesis in the early stage of endometriosis in a mouse model. 2006. *Endocrinology*;147(3):1278-1286.

Liu XJ, He YL, Peng DX. Expression of metalloproteinase-9 in ectopic endometrium in women with endometriosis. *Di Yi Jun*. 2002;22:467-469.

Ma L, Del Soldato P, Wallace JL. Divergent effects of new cyclooxygenase inhibitor on gastric ulcer healing: shifting the angiogenic balance. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:13243-13247.

Machado DE, Abrão MS, Berardo PT, Takiya CM, Nasciutti LE. Vascular density and distribution of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGF-2 (Flk-1) are significantly greater in patients with deeply infiltrating endometriosis affecting the rectum. *Fertil Steril*. 2008;90(1):148-155.

Maisonpierre PC, Suri C, Jonrd PF, Batunkova S, Wiegang SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*. 1997;277:55-60.

Majima M, Isono M, Ikedaanaka K, Harada Y. Significant roles of inducible cyclooxygenase (COX)-2 in angiogenesis. *Jpn J Pharmacol*. 1997;75:105-114.

Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, Zweifel BS, Settle SL, Woerner BM. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Res*. 2000;60:1306-1311.

Mathias SD, Keppermann M, Liberman RF, Lipschutz RC, Steege JF. Chronic pelvic pain: prevalence, health-related quality of life, and economic correlates. *Obstet Gynecol.* 1996;87(3):321-327.

Matsuzaki S, Canis M, Murakami T. Immunohistochemical analyses of the role of angiogenic status in the vasculature of peritoneal endometriosis. *Fertil Steril.* 2001;76:712-716.

Matsuzaki S, Canis M, Darcha C, Dallel R, Okamura K, Mage G. Cyclooxygenase-2 selective inhibitor prevents implantation of eutopic endometrium to ectopic sites in rats. *Fertil Steril* 2004a;82:1609-1615.

Matsuzaki S, Canis M, Pouly JL, Wattiez A, Okamura K, Mage G. Cyclooxygenase-2 expression in deep endometriosis and matched eutopic endometrium. *Fertil Steril* 2004b;82:1309-1315.

McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, Millican SA, Müller KH, Sharkey AM, Smith SK. Vascular endothelial growth factor is produced by peritoneal fluid macrophages in endometriosis and is regulated by ovarian steroids. *J Clin Invest.* 1996;98(2):482-489.

Mihalyi A, Simsa P, Mutinda KC, Meuleman C, Mwenda JM, D'Hooghe TM. Emerging drugs in endometriosis. *Expert Opin Emerg Drugs* 2006;11:503-524.

Mueller MD, Lebovic DI, Garrett E, Taylor RN. Neutrophils infiltrating the endometrium express vascular endothelial growth factor: potential role in endometrial angiogenesis. *Fertil Steril.* 2000;74(1):107-112.

Nap AW, Groothuis PG, Demir AY, Evers JLH, Dunselman GAJ. Pathogenesis of endometriosis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2004;18(2):233-244.

Nap AW, Griffioen AW, Dunselman GAJ, Bouma-Ter, Steege JCA, Thijssen VLJL, Evers JLH, Groothuis PG. Antiangiogenesis therapy for endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(3):1089-1095.

Nap AW, Dunselman GAJ, Griffioen AW, Mayo KH, Evers JLH, Groothuis PG. Angiostatic agents prevent the development of endometriosis-like lesions in the chicken chorioallantoic membrane. *Fertil Steril.* 2005;83(3):793-795.

Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelium growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.* 1999;(13):9-22.

Nisolle M and Donnez J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertil Steril.* 1997;68(4):585-596.

Ohtake H, Katabuchi H, Matsuura K, Okamura H. A novel in vitro experimental model for ovarian endometriosis: the three-dimensional culture of human ovarian surface epithelial cells in collagen gels. *Fertil Steril.* 1999;71:50-55.

Oliner J, Min H, Leal J, Yu D, Rao S, You E, Tang X, Kim H, Meyer S, Han SJ, et al. Suppression of angiogenesis and tumor growth by selective inhibition of angiopoietin-2. *Cancer Cell.* 2004;6:507–516.

Olivares C, Bilotas M, Buquet R, Borghi M, Sueldo C, Tesone M, Meresman G. Effects of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor on endometrial epithelial cells from patients with endometriosis. *Hum Reprod.* 2008;23(12):2701-2708.

Olsen MWB, Ley CD, Junker N, Hansen AJ, Lund EL, Kristjansen PEG. Angiopoietin-4 Inhibits Angiogenesis and Reduces Interstitial Fluid Pressure. *Neoplasia.* 2006;8(5):364–372.

Oosterlynck DJ, Meuleman C, Sobis H. Angiogenic activity of peritoneal fluid from women with endometriosis. *Fertil Steril.* 1993;59:778-782.

O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastasis by a Lewis lung carcinoma. *Cell.* 1994;79:315-328.

O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Ison BR, Folkman J. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell.* 1997;88:277-285.

Ota H, Igarashi S, Sasaki M, Tanaka T. Distribution of cyclooxygenase-2 in eutopic and ectopic endometrium in endometriosis and adenomyosis. *Hum Reprod* 2001;16:561-566.

Ozawa Y, Murakami T, Tamura M, Terada Y, Yaegashi N, Okamura K. A selective cyclooxygenase-2 inhibitor suppresses the growth of endometriosis xenografts via antiangiogenic activity in severe combined immunodeficiency mice. *Fertil Steril*. 2006;86(3):1146-1151.

Park A, Chang P, Ferin M, Xiao E, Zeitoun K. Inhibition of endometriosis development in Rhesus monkeys by blocking VEGF receptor. *Fertil Steril*. 2004; O-176:S71.

Pradelles P, Grassi J, Maclouf J. Enzyme immunoassays of eicosanoids using acetylcholine esterase as label: an alternative to radioimmunoassay. *Anal Chem* 1985;57: 1170-1173.

Pupo-Nogueira A, Oliveira RM, Petta CA, Podgaec S, Dias Junior JA, Abrao MS. Vascular endothelial growth factor concentrations in the serum and peritoneal fluid of women with endometriosis. *Int J Gynaecol Obstet* 2007;99(1):33-37.

Redwine DB. Conservative laparoscopic excision of endometriosis by sharp dissection: lifetable analysis of reoperation and persistent or recurrent disease. *Fertil Steril*. 1991;56:628-634.

Reese KA, Reddy S, Rock JA. Endometriosis in adolescent population: the Emory experience. *J Pediatr Adolesc Gynecol*. 1996;9(3):125-128.

Revised American Fertility Society Classification Of Endometriosis:1996. *Fertil Steril*. 1997;67:817-821.

Rice VM. Conventional medical therapies for endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2002;955:343-352.

Rodgers WH, Matrisian LM, Giudice LC, Dsupin B, Cannon P, Svitek C, Gorstein F, Osteen K. Patterns of metalloproteinase expression in cycling endometrium imply differential functions and regulation by steroid hormones. *J Clin Invest*. 1994;94:946-953.

Salamonsen LA, Butt AR, Hammond FR, Garcia S, Zhang J. Production of endometrial matrix metalloproteinases, but not their tissue inhibitors, is modulated by progesterone withdrawal in a *in vitro* model for menstruation. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82:1409-1415.

Sales KJ, Jabbour HN. Cyclooxygenase enzymes and prostaglandins in pathology of the endometrium. *Reproduction*. 2003;126:559-567.

Sampson JA. Perforating hemorrhagic (chocolate) cysts of the ovary; their importance and specially their relation to pelvic adenomas endometrial type. *Arch Surg*. 1921;3:245-323.

Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol*. 1927;14:422-469.

Satchi-Fainaro R, Mamluk R, Wang L, Short SM, Nagy JA, Feng D, Dvorak AM, Dvorak HF, Uder M, Mukhopadhyay D, Folkman J. Inhibition of vessel permeability by TNP-470 and its polymer conjugate, caplostatin. *Cancer Cell*. 2005;7:251-255.

Sawaoka H, Tsuji S, Tsujii M, Gunawan ES, Sasaki Y, Kawano S, Hori M. Cyclooxygenase inhibitors suppress angiogenesis and reduce tumor growth in vivo. *Lab Invest.* 1999;79:1469-1477.

Shifren JL, Tseng JF, Zaloudek CJ, Ryan IP, Meng G, Ferrara N, Jaffe RB, Taylor RN. Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: implications for angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81(8):3112-3118.

Siristatidis C, Nissotakis C, Chrelias C, Iacovidou H, Salamalekis E. Immunological factors and their role in the genesis and development of endometriosis. *J Obstet Gynaecol Res* 2006;32:162-170.

Spuijbroek MDEH, Dunselman GAJ, Menheere PPCA, Evers JLH. Early endometriosis invades the extracellular matrix. *Fertil Steril.* 1992;58:929-933.

Strauss JF, Gurdip E. The endometrium: Regulation and Dysfunction. In: Yen SSC, and Jaffe RB. *Reprod Endocrinol.* 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia:W.B.Saunders. 1991. p.309-356.

Subbaramaiah K, Dannenberg AL. Cyclooxygenase-2: a molecular target for cancer prevention and treatment. *Trends Pharmacol Sci.* 2003;24:95-102.

Suginami HA. A reappraisal of the celomic metaplasia theory by reviewing endometriosis occurring in unusual sites and instance. *Am J Obstet Gynecol.* 1991; 165:214-218.

Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Requisite role of angiopoietin- 1, a ligant for the Tie2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell*. 1996;87:1171-1180.

Tabibzadeh S. Immunoreactivity of human endometrium: correlation with endometrial dating. *Fertil Steril*. 1990;54(4):624-631.

Taylor RN, Lebovic DI, Mueller MD. Angiogenic factors in endometriosis. *Ann NY Acad Sci*. 2002;955:89-100.

Turner HE, Nagy Z, Esiri MM, Harris AL, Wass JAH. Role of Matrix Metalloproteinase 9 in Pituitary Tumor Behavior. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(8):2931-2935.

Ueda M, Yamashita Y, Takehara M, Terai Y, Kumagai K, Ueki K, Kanda K, Yamaguchi H, Akise D, Hung YC, Ueki M. Survivin gene expression in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(7):3452-3459.

Unemori EN, Ferrara N, Bauer EA, Amento EP. Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. *J Cell Physiol*. 1992;153:557-562.

Vane JR, Botting RM. Mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *Scand J Rheumatol Suppl*. 1996;102:9-21.

Velebil P, Wingo PA, Xia Z, Wilcox LS, Peterson HB. Rate of hospitalization of gynecologic disorders among reproductive-age women in the United States. *Obstet Gynecol.* 1995;86(5):764-769.

Vercellini P, Somigliana E, Vigano P, abbiati A. Endometriosis: current and future medical therapies. *Best Practice & Res Clin Obstet and Gynaecol.* 2008;22(2):275–306.

Vernon MW and Wilson EA. Studies on the surgical induction of endometriosis in the rat. *Fertil Steril.* 1985;44:684-694.

Viganò P, Parazzini F, Somigliana E, Vercellini P. Endometriosis: epidemiology and aetiological factors. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2004;18(2): 177-200.

Vinatier D, Dufour P, Oosterlynck D. Immunological aspects of endometriosis. *Hum Reprod Update.* 1996;2(5):371-384.

Xu Y, Liu YJ, Yu Q. Angiopoietin-3 inhibits pulmonary metastasis by inhibiting tumor angiogenesis. *Cancer Res.* 2004;64:6119–6126.

Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. Different signal transduction properties of KDR and flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem.* 1994;269:26988-26995.

Wang HB, Lang JH, Leng JH, Zhu L, Liu ZF, Sun DW. Expression of vascular endothelial growth factor receptors in the ectopic and eutopic endometrium of women with endometriosis. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2005;85(22):1555-1559.

Wang D, Dubois RN. Prostaglandins and cancer. *Gut* 2006;55:115-122.

Wenzl RJ, Heinzl H. localization of matrix metalloproteinase-2 in uterine endometrium and ectopic implants. *Gynecol Obstet Invest*. 1998;45:253-257.

Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular specific growth factors and blood vessels formation. *Nature*. 2000;407:242.

Yazawa K, tsuno NH, Kitayama J, Kawai K, Okaji Y, Asakage M. Selective inhibitor of cyclooxygenase (COX0-2 inhibits endothelial proliferation by induction of cell cycle arrest. *Int J Cancer*. 2005;113:541-548.

Zucker S, Lysik RM, Zarrabi MH, Moll U. Type IV collagenase is increased in plasma of patients with colon cancer and breast cancer. *Cancer Res*. 1993;53:140 –146.

## **7. ANEXOS**

### **7.1. ANEXO I**

*Vascular density and distribution of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 (Flk-1) are significantly higher in patients with deeply infiltrating endometriosis affecting the rectum. Fertil Steril. 2008;90(1):148-155.*

**7.2. ANEXO II**

*Angiogenesis pattern in a rat model of peritoneal endometriosis is similar to human disease.*

*Submetido Angiogenesis.*

### **7.3. ANEXO III**

*Composition of sulfated glycosaminoglycans and immunodistribution of chondroitin sulfate in deeply infiltrating endometriosis affecting the rectosigmoid. Micron. 2009;40:639-645.*

**7.4. ANEXO IV**

*A selective cyclooxygenase-2 inhibitor suppresses the growth of endometriosis with an anti-angiogenic effect in a rat model. Submetido Fertility and Sterility.*

# 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](#)