

Adriana Beatriz Barretto

**Tratamento da Endometriose Peritoneal com
Injeção Local de Ácido Acetilsalicílico
Estudo Experimental em Coelhas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Área de Concentração em Bases Gerais da Cirurgia e Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Cirurgia.

Orientador: Prof. Dr. Rogério Saad-Hossne

**Botucatu
2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Barretto, Adriana Beatriz.

Tratamento da endometriose peritoneal com injeção local de ácido acetilsalicílico : estudo experimental em coelhas / Adriana Beatriz Barretto. – Botucatu : [s.n], 2012

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Rogério Saad-Hossne

Capes: 40102149

1. Endometriose. 2. Aspirina. 3. Coelho como animal de laboratório.

Palavras-chave: Aspirina; Coelhos fêmeas; Endometriose; Estudo experimental.

Dedicatória



Dedico aos meus pais, **Cecília** e **Gilmar**,

Por todos os seus exemplos, pelos esforços que sempre fizeram para que eu tivesse um bom estudo, tudo o que fizeram não foi em vão e tudo foi observado com muito carinho e atenção, pois sei que por muitas vezes foi mais do que difícil superar os desafios. Por todo tempo dedicado a minha formação, pela estruturação familiar que temos, por tudo o que são para mim, com certeza o maior e melhor exemplo de pessoas dignas e respeitadas.

Sem vocês, estar onde estou, conquistando o meu caminho, não teria o mesmo valor.

Dedico ao meu irmão e sua esposa, **André** e **Sabrina**,

O sucesso de vocês é um dos motivos que me faz levantar todos os dias e desejar cada vez mais, tenho muito orgulho de ter vocês em minha vida.

E por fim à pessoa mais maravilhosa que já entrou na minha vida, meu namorado e futuro marido, **Paulo**,

Você apareceu na minha vida para me mostrar que nenhum problema no mundo é o suficiente para desequilibrar alguém, tenho muito orgulho de te ter ao meu lado, meu namorado, meu melhor amigo, meu confidente, meu conselheiro, meu futuro marido. Me faltam palavras para dizer o quanto você é importante para mim.

*Agradecimentos
Especiais*



Ao meu orientador *Prof. Dr. Rogério Saad Hossne*,
ao qual eu serei sempre grata por me proporcionar a
possibilidade de chegar onde cheguei e me incentivando
a querer sempre mais.

Ao *Dr. Rafael Denadai*, por toda disponibilidade e ajuda em grande parte da finalização do trabalho, sua parceria foi essencial para o enriquecimento da dissertação e do meu conhecimento.

Ao *Prof. Dr. Juan Llanos*, sempre disposto a ajudar de todas as formas para o meu crescimento profissional.

Ao técnico do laboratório *Ednelson Henrique Bianchi*, uma das pessoas com mais conhecimento que já encontrei, obrigada por todas as horas disponíveis ao meu dispor, por todas as aulas sobre todos os assuntos imagináveis, por todo o conhecimento a mim passado e principalmente por ter aberto as portas para a sua amizade.

À *Solange Peron Bueno Angela* por seu conhecimento específico que engrandeceu a dissertação em toda a parte histológica.

Agradecimientos



Agradeço a todas as pessoas que me auxiliaram na concretização deste trabalho, com muita dedicação e qualificação profissionais:

Ao *Abílio* e a *Adnice*, grande parte do meu crescimento foi consequência da atenção e carinho de vocês, obrigada nunca será o suficiente para retribuir tudo o que já fizeram por mim, horas e horas sem dormir que jamais trocaria por nada, muitas risadas, choros, perdas e conquistas em todo este tempo próximo a vocês. Continuem sempre com este coração enorme que cativa a qualquer um. Muito obrigada.

Aos amigos que fiz durante estes anos na pós-graduação, os quais sempre estiveram à disposição para me ajudar em qualquer momento: *Bruna, Karen, Carlos, Maila, Mariana, Renata, Gabrielli*, vocês são mais do que especiais.

À *Luana Amaral*, secretária do Departamento de Cirurgia, a qual se tornou uma grande amiga.

À minha prima-irmã *Mariana Leme Bernabé*, para você minha pequena grande mulher eu só posso dizer que sua ajuda sempre foi fundamental, só por sentar do meu lado por horas e dar apoio moral enquanto estudava. Mesmo com seus 16 anos, disponibilizou de seu tempo para me ajudar a procurar artigos, traduzir textos, melhorar frases, observar lâminas e escolher fotos. Você é meu orgulho, muito obrigada por existir na minha vida.

À *todos* aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram na realização desta dissertação de mestrado,

Muito Obrigada!

Επίγραφε



O amor entre pais e filhos
é como uma doce canção de ninar
Nossa vida com eles é como viver
uma eterna poesia... eterna magia...
Com eles renascemos... revivemos...
Encontramos nossa parte perdida,
escondida ou mesmo ocultada
pelo peso do tempo que passou.
Um filho, conforta, abriga, desvenda,
revela e ilumina o nosso caminho.
É uma porta aberta para qualquer situação...
Um filho é o sol do meio dia, a lua e as estrelas
nas noites de escuridão...
É a nossa bússola, nosso norte... nosso sul...
É a beleza de um céu azul...
É como a rota de um navio,
a bússola que nos direciona
a um porto seguro...
Enfim um filho é o milagre realizado
em nós para que **Deus** nos abasteça
de esperança e realização...

E você querida filha, é o **CRISTAL**
que me fortalece a alma e o coração...

Maria Cecilia Leme Barretto

Sumário



Lista de Figuras.....	16
Lista de Tabelas.....	19
1. Introdução.....	21
1.1 Aspectos Demográficos, Clínicos e Diagnósticos da Endometriose.....	22
1.2 Tratamento da Endometriose.....	23
1.3 Apresentação da Linha de Pesquisa Envolvendo o Ácido Acetilsalicílico.....	24
1.4 Histórico do Ácido Acetilsalicílico.....	27
1.5 Tratamento da Endometriose com Ácido Acetilsalicílico.....	30
2. Objetivos.....	31
3. Material e Método.....	33
3.1 Ética.....	34
3.2 Animais.....	34
3.3 Protocolo e Grupos Experimentais.....	35
3.4 Técnicas Cirúrgicas e Anestésica.....	36
3.4.1 Indução de Lesões Endometriais.....	36
3.4.2 Aferição Dimensional e Tratamento das Lesões.....	38
3.4.3 Tratamento e Sacrifício.....	38
3.5 Solução Teste.....	38
3.6 Formas de Análise dos Resultados – Avaliação do Efeito dos Tratamentos.....	39
3.6.1 Avaliações Histopatológicas dos Focos Endometriais.....	39
3.7 Análise Estatística.....	40
4. Resultados.....	41
4.1 Análise Qualitativa.....	42
4.1.1 Figuras.....	43
4.2 Análise Quantitativa.....	47
4.2.1. Tabelas.....	48
5. Discussão.....	50
6. Conclusões.....	58
7. Referências.....	60

ANEXO.....	71
Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal.....	72
Artigo - Efeitos da Injeção Local de Ácido Acetilsalicílico a 20% na Endometriose Peritoneal – Estudo Experimental em Coelhos.....	73
Resumo.....	75
Introdução.....	76
Material e Métodos.....	78
Animais.....	78
Cirurgias.....	79
Solução Teste.....	80
Resultados.....	81
Grupo 1 – Animais tratados com solução fisiologia (controle) e sacrificados 20 dias após o tratamento.....	81
Grupo 2 – Animais tratados com solução de ácido acetilsalicílico (20%) e sacrificados após 10 dias do tratamento.....	82
Grupo 3 – Animais tratados com solução de ácido acetilsalicílico (20%) e sacrificados após 20 dias do tratamento.....	83
Análise Estatística.....	84
Discussão.....	86
Conclusão.....	88
Referências.....	89
Artigo - Effects of Local Injection of 20% Acetylsalicylic Acid on Peritoneal Endometriosis – An Experimental Study in Rabbits...	93
Abstract.....	95
Introduction.....	96
Materials and Methods.....	98
Animals.....	98
Surgeries.....	99
Test Solution.....	100
Results.....	101
Group 1 – Animals treated with physiological solution (control) and sacrificed 20 days after treatment.....	101
Group 2 – Animals treated with solution of acetylsalicylic acid (20%) and sacrificed 10 days after treatment.....	102

Group 3 – Animals treated with solution of acetylsalicylic acid (20%) and sacrificed 20 days after treatment.....	103
Statistical Analysis.....	104
Discussion.....	105
Conclusion.....	107
References.....	108

Lista de Figuras



Figura 1 -	Fórmula estrutural do ácido acetilsalicílico (adaptado de Schrör, 2009).....	30
Figura 2 -	Implante de foco endometrial no peritônio.....	37
Figura 3 -	Lâmina Grupo 1 (controle) / aumento 100x – endometriose desenvolvida com 10 dias de tratamento com solução fisiológica 0,9%.....	43
Figura 4 -	Lâmina Grupo 1 (controle) / aumento 100x – endometriose desenvolvida com 10 dias de tratamento com solução fisiológica 0,9%.....	44
Figura 5 -	Lâmina Grupo 1 (controle) / aumento 400x – endometriose desenvolvida com 10 dias de tratamento com solução fisiológica 0,9%.....	44
Figura 6 -	Lâmina Grupo 2 (tratamento) / aumento 100x – endometriose desenvolvida com 20 dias de tratamento com solução bicarbonatada de ácido acetilsalicílico 20%.....	45
Figura 7 -	Lâmina Grupo 2 (tratamento) / aumento 400x – endometriose desenvolvida com 20 dias de tratamento com solução bicarbonatada de ácido acetilsalicílico 20%.....	45
Figura 8 -	Lâmina Grupo 3 (tratamento) / aumento 400x – necrose após 20 dias de tratamento com solução bicarbonatada de ácido acetilsalicílico 20%.....	46
Figura 9 -	Lâmina Grupo 3 (tratamento) / aumento 100x – necrose após 20 dias de tratamento com solução bicarbonatada de ácido acetilsalicílico 20%.....	46

Artigo - Efeitos da Injeção Local de Ácido Acetilsalicílico a 20% na Endometriose Peritoneal – Estudo Experimental em Coelhos

Figura 1 -	Lâmina Grupo 1 (controle) / aumento 100x – endometriose desenvolvida com 10 dias de tratamento com solução fisiológica 0,9%.....	81
Figura 2 -	Lâmina Grupo 2 (tratamento) / aumento 100x – endometriose desenvolvida com 20 dias de tratamento com solução bicarbonatada de ácido acetilsalicílico 20%.....	82
Figura 3 -	Lâmina Grupo 3 (tratamento) / aumento 400x – necrose após 20 dias de tratamento com solução bicarbonatada de ácido acetilsalicílico 20%.....	84

Artigo – Effects of Local Injection of 20% Acetylsalicylic Acid on Peritoneal Endometriosis – An Experimental Study in Rabbits

Figure 1 -	Group 1 (control) – endometriosis developed 10 days after treatment with 0.9% physiological solution. Note peritoneal endometriosis implants with preserved glands and stroma permeated by mild lymphoplasmacytic inflammatory infiltrate and rare eosinophils. (hematoxylin-eosin; original magnification 100x).....	101
Figure 2 -	Group 2 (treatment) – endometriosis developed 20 days after treatment with bicarbonate solution of 20% acetylsalicylic acid. Note areas of epithelium and stroma partially preserved permeated by intense lymphocytic and eosinophilic infiltrate. (hematoxylin-eosin; original magnification 100x).....	102
Figure 3 -	Group 3 Slides (treatment) – necrosis 20 days after treatment with bicarbonate solution of 20% acetylsalicylic acid. Note intense inflammatory infiltrate lymphoplasmacytic, glandular and stromal collapse, abundant apoptotic bodies and extensive necrosis. (hematoxylin-eosin; original magnification 400x).....	103

Lista de Tabelas



Tabela 1 -	Histórico do ácido acetilsalicílico (adaptado de SCHRÖR, 2009 e Bayer, 2012).....	28
Tabela 2 -	Tamanho dos implantes de endometriose macroscopicamente e porcentagem de tecido endometrial microscopicamente.....	48
Tabela 3 -	Tamanho dos implantes após 20 dias de tratamento com injeção local de solução bicarbonatada de ácido acetilsalicílico 20% (Grupo 3 – Tratamento 20 dias).....	49

Artigo - Efeitos da Injeção Local de Ácido Acetilsalicílico a 20% na Endometriose Peritoneal – Estudo Experimental em Coelhos

Tabela 1 -	Tamanho dos implantes de endometriose macroscopicamente, microscopicamente e porcentagem de tecido endometrial.....	85
------------	---	----

Artigo – Effects of Local Injection of 20% Acetylsalicylic Acid on Peritoneal Endometriosis – An Experimental Study in Rabbits

Table 1 -	Size of endometriotic implants: macroscopically, microscopically and as a percentage of endometrial tissue.....	104
-----------	---	-----

1. Introdução



1.1 Aspectos Demográficos, Clínicos e Diagnósticos da Endometriose

A endometriose é uma doença ginecológica caracterizada pela presença de tecido endometrial além dos limites uterinos (FILIGHEDDU et al., 2010), que acomete mulheres jovens em idade reprodutiva com taxas variáveis de 2 a 7%, podendo chegar a 25% das mulheres entre os 30 e 40 anos de idade (MONTEFORTE et al., 1995).

Um número significativo de mulheres é assintomático. Quando sintomáticas, dor pélvica como dismenorréia (dor associada à menstruação) é a manifestação mais frequentemente reportada. Geralmente, as dores tendem a ser mais intensas no período pré-menstrual, melhorando após o término da menstruação. Outros sintomas que podem estar presentes são: dor lombar, disquezia (movimentos intestinais dolorosos e/ou difíceis), dor durante a micção e dispareunia (dor na relação sexual). Além disso, a endometriose geralmente está associada à infertilidade, como resultado das aderências que distorcem a anatomia pélvica e prejudicam a liberação do óvulo e captura do mesmo (AMARAL et al., 2009). De acordo com GIUDICE e KAO (2004) a prevalência de endometriose pode chegar a 60% em mulheres com dores pélvicas ou infertilidade, mais especificadamente a prevalência de endometriose em mulheres na idade reprodutiva é estimada em 10%, em mulheres com dor pélvica crônica pode chegar a até 82%, e naquelas submetidas à investigação de infertilidade, entre 20% e 50% (AMARAL et al., 2009).

O exame diagnóstico tido como padrão-ouro para confirmação da doença é a análise anatomopatológica de peças obtidas através de métodos invasivos como videolaparoscopia e laparotomia (SCHOR et al., 1999; AMARAL et al., 2009).

O fato de a endometriose requerer um método invasivo para o diagnóstico dificulta ou até impede a realização de pesquisas controladas objetivando o estudo de novas drogas e terapêuticas (SCHOR et al., 1999).

1.2 Tratamento da Endometriose

Quanto à terapêutica, a primeira e melhor opção é a cirúrgica, primeiro pela retirada dos focos de endometriose, segundo por ser aquela que demonstra os mais altos índices de resolução (EVERS, 1995; HOLOCH & LESSEY, 2010; AL-JEFOUT, 2011). Apesar disto, a taxa de recorrência pode chegar a 47% (HART et al., 2008, CATENACCI et al., 2009 & CONTRAN et al., 2007).

Ensaio clínico buscam novas opções terapêuticas no âmbito farmacológico com o intuito de: diminuir o número de procedimentos invasivos, impedir a invasão endometriótica ectopicamente, melhorar a evolução prognostica e reduzir os índices de recidivas. Estudos com drogas sistêmicas como agonistas de GnRH (*Gonadotropin-Releasing Hormone*) (SAKATA, 1990), danazol (SAKATA, 1990), inibidores da aromatase (YANO, 1996), imunomoduladores (Fator de Necrose Tumoral-alfa recombinante humano) (D'ANTONIO, 2000), antiinflamatórios não esteroidais (celecoxib, indometacina, sulinac e ibuprofeno) (EFSTATHIOU, 2005), inibidores de

aromatase (BILOTAS et al., 2010), rosiglitazone (OLIVARES et al., 2011), resveratrol (BRUNER-TRAN et al., 2011) e bazedoxifene (KULAK et al., 2011) demonstraram sucesso na regressão dos implantes ectópicos. O mesmo foi observado por IGELMO (1999) e SOMIGLIANA (1999), utilizando interferon α -2b e interleucina-12 respectivamente por via tópica intra-peritoneal.

Entretanto, o teste terapêutico com novos medicamentos requer uso de modelos experimentais primariamente aos testes clínicos com humanos (Conselho Nacional de Saúde, 1996; BRICK et al., 2008). A escolha do modelo deve ser baseada na maior fidedignidade fisiopatogênica entre o modelo animal e o ser humano.

1.3 Apresentação da Linha de Pesquisa Envolvendo o Ácido Acetilsalicílico

Ao considerar a relevância epidemiológica e as dificuldades terapêuticas da endometriose, novas opções de tratamento necessitam ser desenvolvidas e testadas. Para que tais alternativas terapêuticas tenham aplicabilidade espera-se que sejam eficazes, de fácil execução e baixo custo financeiro e apresentem pouco ou nenhum efeito colateral.

Neste contexto, pesquisas experimentais desenvolvidas desde a década de 70 e ainda em desenvolvimento no Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina de Botucatu, nas quais foram estudados os efeitos do ácido acetilsalicílico e de seus derivados em diferentes modelos animais, embasaram a aplicação do ácido acetilsalicílico no presente estudo.

A seguir estão apresentados brevemente os principais estudos relacionados com a linha de pesquisa supracitada, que permitirá justificar e entender a ideia do uso do ácido acetilsalicílico.

Hossne^{1*}, em 1972 apresentou a possibilidade do uso de “soluções esclerosantes” em cães para o tratamento da hiperplasia prostática benigna. Nesta época preconizava-se o emprego da criocirurgia que tinha como objetivos a necrose inicial com posterior fibrose do órgão, sendo que este efeito poderia ser então reproduzido com o uso destas soluções. Algumas soluções foram testadas inicialmente, porém com resultados insatisfatórios: glicose hipertônica e oleato de monoetanolamina.

Em seguida foi testada uma solução intitulada “esclerosante”, cuja composição era o fenol, o ácido acético glacial, glicerina e água bidestilada.

A ação desta droga foi então estudada, no Laboratório de Cirurgia Experimental, em tecido prostático de cães e verificou que a mesma acarretava necrose tecidual e posterior fibrose. Destes trabalhos resultaram as primeiras teses desta linha de pesquisa. Frente aos bons resultados obtidos, a solução foi usada no tratamento local do carcinossarcoma de *Walker 256* implantado no fígado de ratos, cujos resultados evidenciaram a destruição do tecido neoplásico hepático.

Em 1992 (Saad-Hossne) estudaram-se os efeitos da solução sobre o fígado e serosa peritoneal de cobaias normais, onde se observou que no tecido hepático a solução acarretou necrose de coagulação e no peritônio não foram observadas alterações macro e microscópicas.

¹ *comunicação pessoal

Em 1997 (Saad-Hossne) foram estudados os efeitos da “solução esclerosante” no tumor ascítico de Ehrlich, *in vitro* e *in vivo*, com objetivo principal de investigar se a solução acarretava necrose e destruição das células tumorais, tendo como proposta final o embasamento da sua aplicação terapêutica na ascite neoplásica. Os resultados mostraram que *in vitro* a solução acarretava morte das células tumorais e que *in vivo* houve a redução das células tumorais e aumento de células inflamatórias em suspensão no líquido ascítico, sendo esta resposta dose dependente.

Com o intuito de identificar o efeito de cada um dos componentes, bem como concentrações menos tóxicas desta solução, foi iniciado estudo de cada um dos compostos de forma isolada. O ácido acético apresentou bons resultados *in vitro*.

Com vistas à redução de riscos de toxicidade e objetivando o estudo de cada um dos componentes e seus derivados, iniciaram-se pesquisas *in vivo* com o ácido acético isoladamente. Alguns autores já haviam estudado a dose letal e grau de toxicidade em trabalhos experimentais e outros, mostraram os efeitos necrotizantes no fígado em humanos.

A partir destes trabalhos, o uso de outra droga menos tóxica foi cogitado, amplamente utilizada em medicina, semelhante ao ácido acético – o ácido acetilsalicílico - um éster do ácido acético que contém o componente salicílico de efeito sabidamente queratolítico.

Assim, em 2001 (Saad-Hossne), foram estudados, de forma qualitativa, os efeitos da solução de ácido acetilsalicílico (AAS) e da solução de ácido

acético em fígado de animais sadios e portadores de tumor, usado como modelo *in vitro* as células em suspensão de carcinoma VX-2 e *in vivo* células tumorais VX-2 implantadas em fígado de coelhos.

Concluiu-se que *in vitro*, a solução de ácido acetilsalicílico e a solução de ácido acético causam morte (inviabilidade) das células neoplásicas. No estudo *in vivo*, utilizando fígado de animais sadios, ambas as soluções acarretam após 24 horas do tratamento necrose de coagulação com destruição localizada do tecido hepático; após 14 dias do tratamento as lesões desapareceram ou foram substituídas por processo cicatricial (fibrose). Nos animais com carcinoma VX-2 hepático, ambas as soluções acarretaram após 24 horas necrose do tecido tumoral; decorridos sete dias as áreas destruídas se mostraram livres de tecido tumoral com regeneração do tecido hepático.

Em conformidade com esta linha de pesquisa e mediante resultados anteriormente obtidos, foram realizados os trabalhos contidos neste texto, onde se buscou estudar os efeitos da aspirina[®] em diversos modelos experimentais em animais e em tecido humano (côlon).

1.4. Histórico do Ácido Acetilsalicílico

O ácido acetilsalicílico é um fármaco do grupo dos anti-inflamatórios não-esteroides (AINE), utilizado como anti-inflamatório, antipirético, analgésico e também como antiagregante plaquetário. Em estado puro, é um pó cristalino branco ou cristais incolores, pouco solúvel em água, facilmente solúvel no álcool e solúvel no éter.

Uma recente revisão (SCHRÖR, 2009) discutiu detalhadamente toda a história da aspirina® desde a sua criação. Os principais marcos históricos relacionados a descoberta e o uso do ácido acetilsalicílico foram resumidos na tabela 1.

Tabela 1- Histórico do ácido acetilsalicílico (adaptado de SCHRÖR, 2009 e Bayer, 2012).

Data	Evento
Séc. V a.C.	Hipócrates descreveu que o pó da casca do Salgueiro (<i>Spiraea ulmaria</i>) conhecida também por “chorão” (que contém salicilatos, mas é potencialmente tóxico), aliviava dores e diminuía febre.
1763	Edmund Stone descreveu de forma científica as propriedades antipiréticas da casca do Salgueiro.
1828	O princípio ativo da casca do salgueiro (salicina ou ácido salicílico) foi isolado na sua forma cristalina pelo farmacêutico francês Henri Leroux e pelo químico italiano Raffaele Piria.
1859-1874	Kolbe sintetizou o ácido salicílico na sua forma pura pela primeira vez. Heyden, seu aluno, passou a desenvolver em larga escala e inaugurou a primeira fábrica de produção de ácido salicílico em 1874 e, em alguns anos, eram produzidas toneladas da droga.
1876	Stricker divulga o ácido salicílico como analgésico e anti-inflamatório no Charité, em Berlim.
1897	Pesquisando um medicamento para dores reumáticas que fosse melhor tolerado por seu pai, o Dr. Felix Hoffmann, um jovem químico da Bayer, sintetizou o ácido acetilsalicílico, princípio ativo da aspirina®.
1899	Heinrich Dreser, diretor do Departamento de Farmacologia da Bayer, publicou o primeiro estudo sobre o tratamento farmacológico do ácido acetilsalicílico. E nomeou a substância como Aspirina (A – de acetil, Spir – de <i>Spiraea ulmaria</i> e in – sufixo utilizado na época).
1899	Em 1º de fevereiro, o nome Aspirin® é submetido a registro de marca no Escritório Imperial de Patentes de Berlim, sendo concedido no dia 6 de março do mesmo ano.

Tabela 2- Histórico do ácido acetilsalicílico (adaptado de SCHRÖR, 2009 e Bayer, 2012). (Continuação)

1929	A aspirina [®] é mencionada por José Ortega y Gasset na publicação “A Revolução das Massas”: “A vida do homem médio é hoje mais fácil, cômoda e segura que a do mais poderoso em outro tempo. Que lhe importa não ser mais rico que os outros, se o mundo o é e lhe proporciona magníficas estradas de rodagem, de ferro, telégrafo, hotéis, segurança física e aspirina [®] ?”.
1950	Aspirina [®] entra para o <i>Guinness Book of Records</i> como o analgésico mais vendido do mundo.
1950	Craven, um clínico geral de Glendale (Califórnia), estudou 400 pacientes e encontrou que a aspirina [®] preveniu eventos isquêmicos cardíacos.
1967-1968	O'Brien, Zucker e Weiss publicaram os primeiros estudos mecanicista sobre o efeito antiplaquetário da aspirina [®] .
1971	John Vane, do Royal College of Surgeons, publicou estudos sobre o mecanismo de ação do ácido acetilsalicílico.
1971	Brian Smith e Willis descobrem a inibição da síntese de prostaglandinas em plaquetas pelo ácido acetilsalicílico, justificando o efeito anti-plaquetário da substância.
1982	John Vane recebe Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia pela descoberta do mecanismo de ação do ácido acetilsalicílico.
1983	Publicação do primeiro estudo duplo-cego placebo-controlado sobre o uso de ácido acetilsalicílico em homens com síndrome coronariana aguda. A incidência de infarto agudo do miocárdio e mortes dentro de 3 meses foi reduzida em 50%.
1997	100 anos que o Dr. Felix Hoffmann produziu de forma bem sucedida o princípio ativo da aspirina [®] .
2009	A Bayer completou 110 anos de registro da Aspirina [®] .

Sua fórmula molecular (figura 1) consiste em tratar o ácido salicílico com anidrido acético, em presença de ácido sulfúrico, que atua como catalisador. Técnicas como filtração a vácuo e recristalização podem ser empregadas.

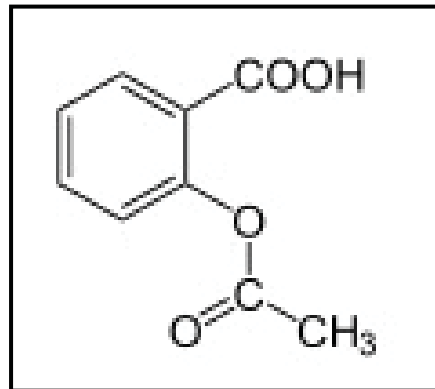


Figura 1- Fórmula estrutural do ácido acetilsalicílico (adaptado de Schrör, 2009).

1.5 Tratamento da Endometriose com Ácido Acetilsalicílico

Em conformidade com os mais de 100 anos de uso do ácido acetilsalicílico e com os resultados obtidos na linha de pesquisa descrita previamente, surgiu à ideia de testar os efeitos do ácido acetilsalicílico em focos endometriais induzidos em animais de experimentação. Dessa maneira, recentemente, SIQUEIRA et al. (2011) estudaram os efeitos do ácido acetilsalicílico a 5% em focos de endometriose induzidos em peritônio de coelhas e encontraram que 10 dias após o tratamento a solução de ácido acetilsalicílico foi eficaz na destruição dos focos de endometriose comparando-se com o grupo controle, existindo, no entanto, focos endometriais remanescentes.

Julga-se então justificado o emprego do ácido acetilsalicílico embasando adequadamente a presente proposta.

2. Objetivo



Avaliar os efeitos da solução bicarbonatada de ácido acetilsalicílico (aspirina[®]) a 20% nos implantes peritoneais de endométrio autólogo de coelhas adultas para embasar método terapêutico para o tratamento da endometriose.

O intuito principal do presente estudo experimental é o de responder os seguintes questionamentos:

- Quais as taxas de destruição (ou eliminação) serão encontradas nos focos de endometriose 10 e 20 dias após injeção da solução bicarbonatada de ácido acetilsalicílico na concentração de 20%?
 - A solução de ácido acetilsalicílico a 20% é capaz de destruir ou eliminar os focos de endometriose após 10 e 20 dias do tratamento?
-

3. Material e Método



3.1. Ética

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Botucatu Universidade Estadual Paulista (FMB-UNESP), de acordo com o protocolo número 107/05 (CEEA-UNESP Botucatu). Os coelhos foram mantidos de acordo com as diretrizes do *Care and Use of Laboratory Animals (Institute for Laboratory Animal Research, 1996)* e de acordo com os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.2. Animais

Foram utilizados 30 coelhos *Nova Zelândia Botucatu*, adultos, fêmeas e virgens, com peso aproximado de 3000 g. Estes animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (UNESP) Campus de Botucatu.

O número de coelhas foi baseado no cálculo do tamanho amostral para validação estatística e de acordo com a orientação do estatístico.

As coelhas foram mantidas em gaiolas apropriadas com controle de luz, umidade, temperatura, água e alimentação. Foram submetidas a 12 horas de exposição à luz; temperatura mantida de 20°C a 25°C; umidade relativa variável entre 40% a 60%. Alimentação com ração industrializada e água *ad libitum*.

O peso das coelhas foi aferido anteriormente à realização de cada laparotomia, com a finalidade de termos base de comparação entre cada coelha e certificação de que a manutenção diária destas foi a mais semelhante possível. Logo, com a equivalência no ganho de peso, poderemos inferir influências ambientais mínimas nos resultados a serem encontrados.

3.3 Protocolo e Grupos Experimentais

Com o objetivo de avaliar os efeitos da solução nos focos de endometriose peritoneal em coelhas, os animais foram sacrificados 10 e 20 dias após o término do tratamento. O tempo foi escolhido com base no estudo de SIQUEIRA et al., 2011, em que a análise histopatológica revelou destruição parcial dos focos de endometriose 10 dias após a aplicação intralesional de ácido acetilsalicílico a 5%. E o novo período, 20 dias, para observar a evolução do tratamento.

Estes animais foram divididos em 3 grupos experimentais:

Grupo 1 – 10 animais

Neste grupo os animais foram tratados com solução fisiológica 0,9% (controle) e sacrificados 20 dias após o tratamento da endometriose.

Grupo 2 – 10 animais

Neste grupo os animais foram tratados com a solução bicarbonatada de ácido acetilsalicílico (20%) e sacrificados 10 dias após o tratamento da endometriose.

Grupo 3 – 10 animais

Neste grupo os animais foram tratados com a solução bicarbonatada de ácido acetilsalicílico (20%) e sacrificados 20 dias após o tratamento da endometriose.

3.4 Técnica Cirúrgica e Anestésica

Foram realizadas 3 laparotomias em cada coelha. A primeira correspondente à cirurgia de indução da endometriose. A subsequente realizada 20 dias após a primeira cirurgia, com a finalidade de visualizar os focos de endometriose e aplicar a droga em estudo. A última laparotomia foi aquela seguida de sacrifício animal, avaliação macroscópica e preparo de material para avaliação histopatológica.

3.4.1 Indução de Lesões Endometrióticas

Os animais foram anestesiados por via endovenosa com solução de quetamina 10% (1ml/kg) e xilasina 2% (0,5ml/kg).

Realizou-se a tricotomia da parede abdominal com uso de lâminas e, a seguir, aplicou-se as técnicas de anti-sepsia. Todos os procedimentos foram realizados com luvas de látex estéreis, lavadas previamente com soro fisiológico a 0,9% (SIQUEIRA et al., 2011).

Após a anestesia, os animais foram submetidos à laparotomia conforme a técnica descrita por SILVA et al. (2004). Iniciando-se com uma incisão longitudinal mediana da parede abdominal, de aproximadamente 2cm. Através

desta obteve-se acesso à cavidade pélvica, onde foi ressecado cerca de 4cm do corno uterino.

O fragmento uterino foi imerso em solução fisiológica 0,9% a 4°C durante 4 minutos. Após este tempo, procedeu-se à incisão longitudinal do corno uterino ressecado, delimitando um fragmento de 5,0 X 5,0 mm seguida da separação do endométrio das outras camadas uterinas, foram feitos dois fragmentos por coelha.

Os endométrios foram então suturados no peritônio, um do lado direito e outro do lado esquerdo (para obter número maior de amostras), com fio Vicryl® 6.0 (figura 2), próximos à linha Alba, na localidade onde a maioria dos vasos foi visualizada.

Após o implante os animais foram mantidos em cativeiro durante 20 dias, período em que a viabilidade e tamanho do enxerto são máximos: 100% e 2,5cm, segundo estudo realizado por SILVA et al. (2004) e pelo piloto feito antes do início do trabalho.

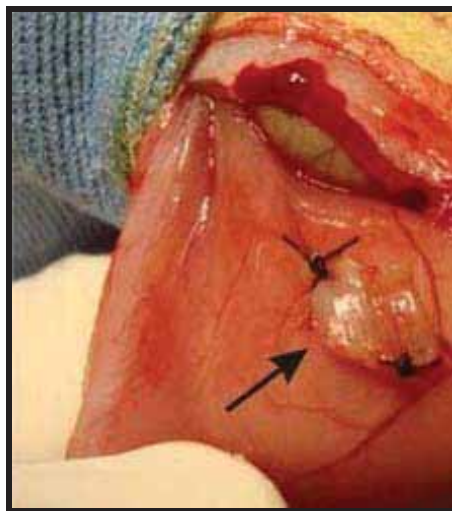


Figura 2 – Implante de foco endometrial no peritônio.

3.4.2 Aferição Dimensional e Tratamento das Lesões

Ao 30º dia pós-operatório, as coelhas foram submetidas a uma segunda laparotomia para visualização das lesões e estabelecimento da área de endometriose encontrada (largura e comprimento) através do uso de um paquímetro.

3.4.3 Tratamento e Sacrifício

O momento da realização do sacrifício foi 10 e 20 dias da aplicação do medicamento, conforme o grupo experimental.

O sacrifício foi realizado na dose de 200mg/kg de pentobarbital, por via intravenosa.

3.5 Solução Teste

O ácido acetilsalicílico foi fornecido por um laboratório de manipulação (Opção Fênix LTDA., São Paulo, Brasil). Para a obtenção da solução a 20% foi feita diluição de 1000mg de ácido acetilsalicílico em 5ml de bicarbonato de sódio a 10%, formando a solução bicarbonatada de ácido acetilsalicílico a 20%. A solução foi preparada 10 minutos antes do seu uso.

3.6 Forma de Análise dos Resultados - Avaliação do Efeito dos Tratamentos

3.6.1 Avaliações Histopatológicas dos Focos Endometriais

Após a ressecção cirúrgica cuidadosa de todos os 60 implantes de endometriose, todas as peças cirúrgicas foram mantidas em formol a 10% tamponado durante 2 dias. A seguir, as peças foram processadas no processador automático de tecidos (Leica TP 1020), emblocadas em parafina (Leica EG 1160), cortadas no micrótomo (Leica RM 2145), em cortes 4 μ , aquecidas em estufa (Modelo Fanem – 02EB) a 60°C durante 12 horas e coradas no colorador automático (Leica Auto-Stainer XL) para hematoxilina-eosina (HE) por meio de montagem Permacet (Fisher) das lâminas em processador (Leica CU500). Para cada animal foi montada uma lâmina com dois focos endometriais cada, perfazendo um total de 30 lâminas.

As lâminas obtidas foram examinadas ao microscópio óptico para identificação e caracterização das lesões e posteriormente submetidas à análise morfométrica por intermédio de sistema analisador de imagens Kontron Elektronik GMBH (Kontron AG, Eching/München, Germany) e programa Kontron KS-300 v2.0 (Kontron AG, Eching/München, Germany). Foram analisados qualitativamente e quantitativamente o processo inflamatório, a hemorragia e a apoptose e também mensurada a presença de endometriose. A análise de todas as lâminas foi efetuada aleatoriamente por um médico patologista experiente sem o conhecimento prévio quanto ao protocolo correspondente ao foco endometrial em estudo.

O tecido endometrial remanescente foi avaliado qualitativamente em campo claro e quantitativamente utilizando o software de imagem Kontron KS300 V2.0 (Kontron AG, Eching/München, Germany). Este programa de computador pode medir várias tonalidades dentro do espectro de cores azul, vermelho e verde. A cor de interesse em lâminas histológicas coradas com HE foi o vermelho (tecido endometrial). Este software permite ao operador delinear uma região de interesse fazendo um esboço à mão livre dessa área usando o mouse do computador. O programa, então, apresenta a cor 1 como uma área percentual que contém vermelho. A área mais representativa de cada foco endometrial foi escolhida para todas as 30 lâminas avaliadas. Esta região de interesse foi analisada para a contagem do tecido endometrial remanescente (em porcentagem).

3.7 Análise Estatística

Na análise descritiva, os dados foram resumidos em médias e desvios padrão. Nas comparações entre grupos foi utilizado o teste T Student. Os programas estatísticos utilizados foram o SPSS versão 11.0 e o SAS, versão 8.01. O nível de significância adotado foi 0,05.

4. Resultados



4.1 Análise Qualitativa

Observou-se ganho de peso em todas as 30 coelhas avaliadas, certificando que a manutenção diária destas foi a mais semelhante possível.

Grupo 1 – Animais tratados com solução fisiológica 0,9% (controle) e sacrificados 20 dias após o tratamento.

À macroscopia todos os implantes formavam estruturas císticas, sendo metade delas hemorrágica; este aspecto foi confirmado à microscopia que evidenciou formações císticas em todas as lâminas, com revestimento epitelial colunar em agrupamento glandular associado a um estroma de células fusiformes: cisto de tecido endometrial. Em 8 das 10 lâminas, o endométrio estava em fase proliferativa – foram vistas regiões com inúmeras mitoses e uma quantidade pequena de apoptoses celulares o que demonstrou que o tecido endometrial teve seu crescimento livre neste período.

Grupo 2 – Animais tratados com solução de ácido acetilsalicílico a 20% (tratamento 1) e sacrificados após 10 dias do tratamento.

Todos os implantes observados no momento da re-operação tinham aspecto hemorrágico e se encontravam aderidos ao conteúdo da cavidade endometrial.

À microscopia mostrou pequenos focos de cisto de tecido endometrial em todas as lâminas, sendo um aspecto inferior quando comparado ao grupo controle. Acompanhado de hemorragia, fibrose, processo inflamatório e apoptose, sem exceções.

Grupo 3 – Animais tratados com solução de ácido acetilsalicílico a 20% (grupo 2) e sacrificados após 20 dias do tratamento.

Macroscopicamente os implantes deste grupo foram de difícil visualização, apresentando aderência ao conteúdo da cavidade endometrial.

Na microscopia não foi possível encontrar formação cística de endometriose assim como evidências de processo inflamatório em todas as lâminas, sendo observadas apenas grandes áreas de necrose e apoptose.

4.1.1 Figuras

Grupo 1 – Animais tratados com solução fisiológica 0,9% (controle) e sacrificados 20 dias após o tratamento.

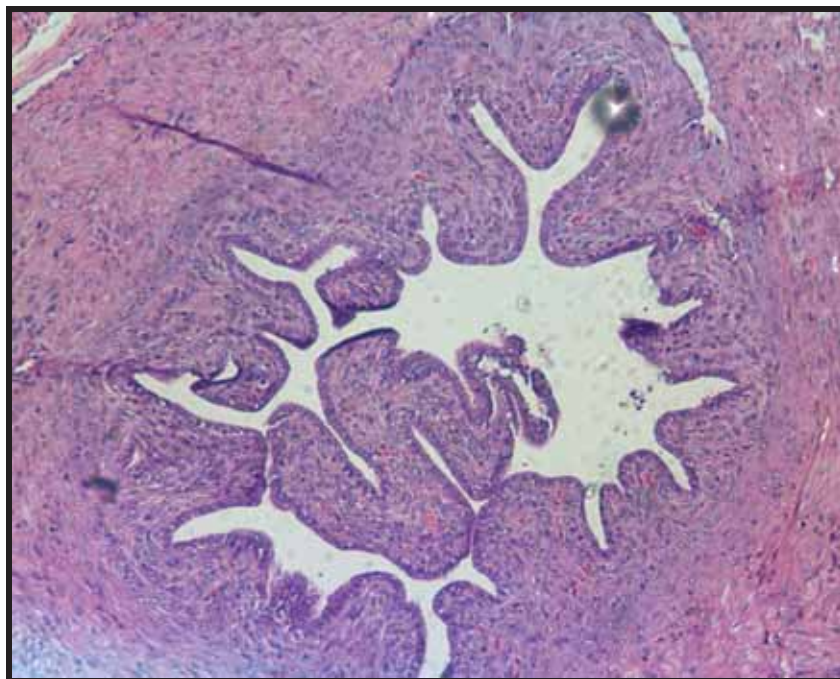


Figura 3 - Lâmina Grupo 1 (controle) / aumento 100x – endometriose desenvolvida com 10 dias de tratamento com solução fisiológica 0,9%. O corte revela implantes endometrióticos peritoniais com glândulas e estroma preservados permeados por discreto infiltrado inflamatório linfo-plasmocitário e raros eosinófilos.

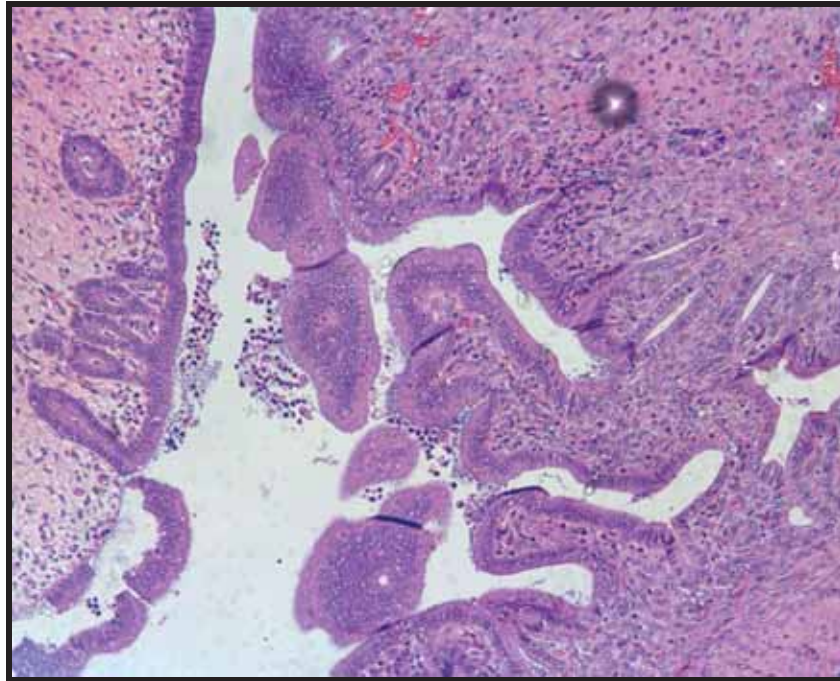


Figura 4 - Lâmina Grupo 1 (controle) / aumento 100x – endometriose desenvolvida com 10 dias de tratamento com solução fisiológica 0,9%. O corte revela implantes endometrióticos peritoniais com glândulas e estroma preservados permeados por discreto infiltrado inflamatório linfo-plasmocitário e raros eosinófilos. Notam-se macrófagos com hemossiderina na luz.

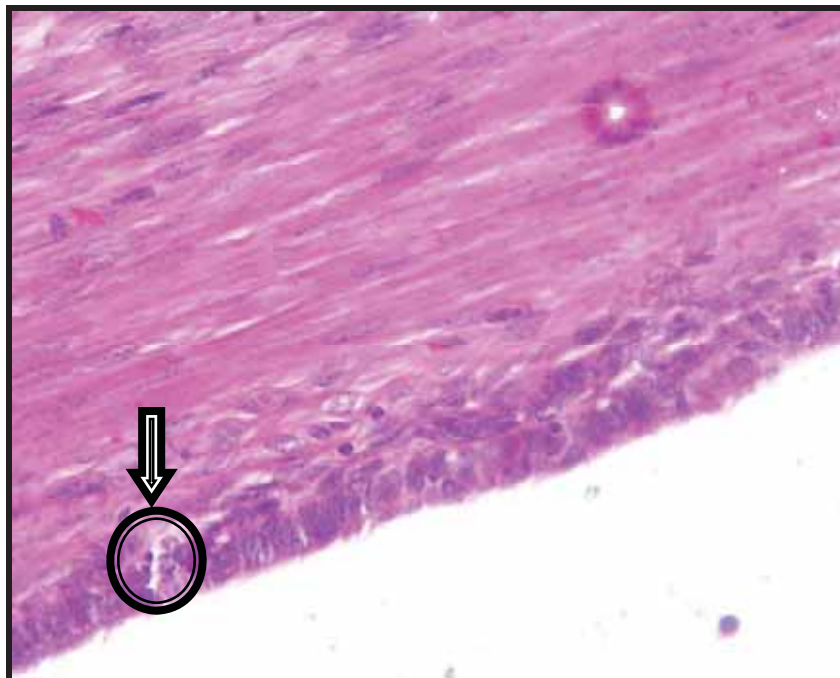


Figura 5 - Lâmina Grupo 1 (controle) / aumento 400x – endometriose desenvolvida com 10 dias de tratamento com solução fisiológica 0,9%. Detalhe revelando raros corpos apoptóticos.

Grupo 2 – Animais tratados com solução de ácido acetilsalicílico a 20% (tratamento 1) e sacrificados após 10 dias do tratamento.

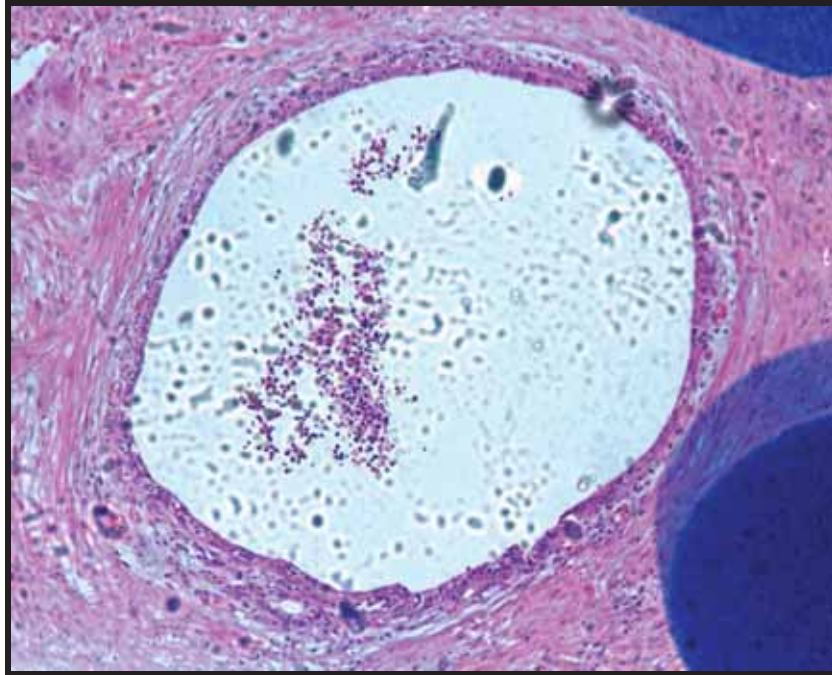


Figura 6 - Lâmina Grupo 2 (tratamento) / aumento 100x – endometriose desenvolvida com 20 dias de tratamento com solução bicarbonatada de ácido acetilsalicílico 20%.

Revela áreas de epitélio e estroma parcialmente preservados permeados por intenso infiltrado inflamatório linfoplasmocitário e eosinofílico.

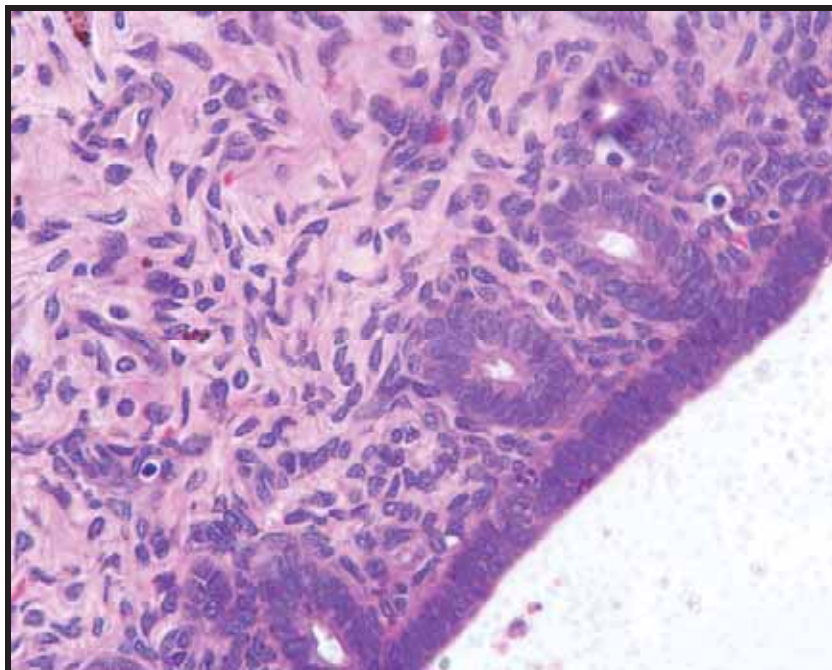


Figura 7 - Lâmina Grupo 2 (tratamento) / aumento 400x – endometriose desenvolvida com 20 dias de tratamento com solução bicarbonatada de ácido acetilsalicílico 20%.

Nota-se aumento do número de corpos apoptóticos, revelando sinais de necrose celular.

Grupo 3 – Animais tratados com solução de ácido acetilsalicílico a 20% (grupo 2) e sacrificados após 20 dias do tratamento.

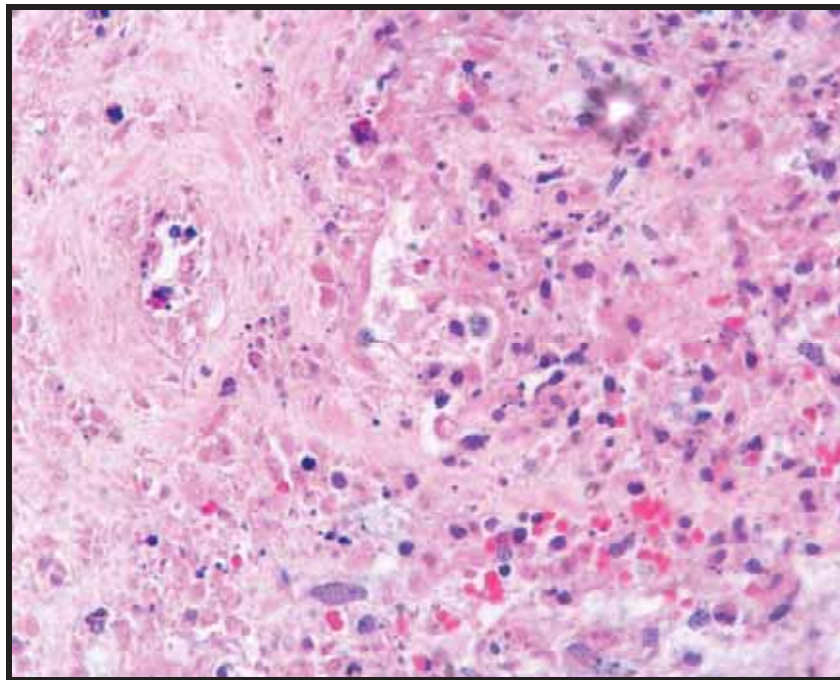


Figura 8- Lâmina Grupo 3 (tratamento) / aumento 400x – necrose após 20 dias de tratamento com solução bicarbonatada de ácido acetilsalicílico 20%. Revela intenso infiltrado inflamatório linfo-plasmocitário, colapso glandular e estromal, corpos apoptóticos abundantes e extensa necrose.

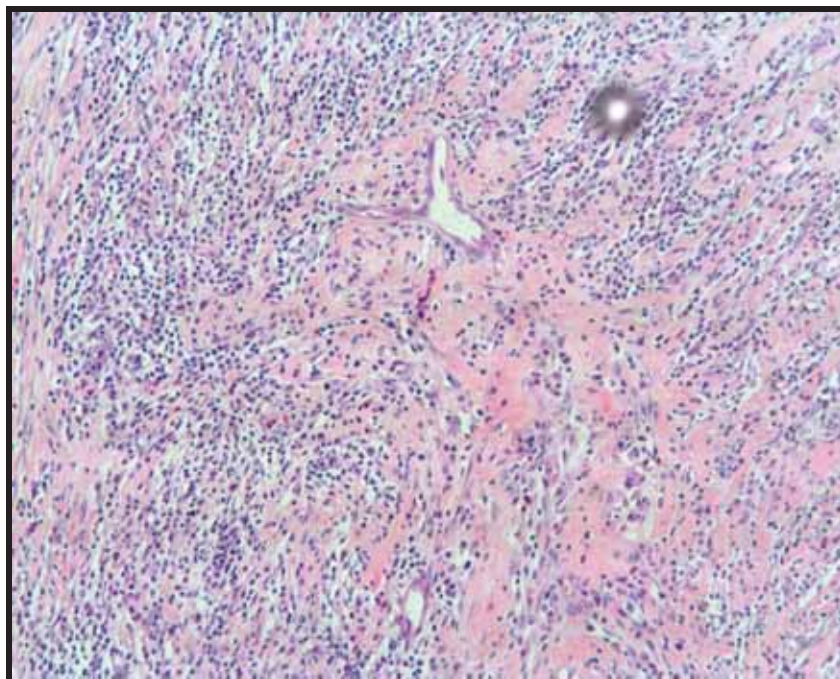


Figura 9 - Lâmina Grupo 3 (tratamento) / aumento 100x – necrose após 20 dias de tratamento com solução bicarbonatada de ácido acetilsalicílico 20%. Áreas de fibrose cicatricial, revelando proliferação de fibroblastos, fibras de colágeno e infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear.

4.2. Análise Quantitativa

A análise quantitativa revelou que o grupo 2 (tratamento 10 dias) tinha menor área macroscópica e menos tecido endometrial remanescente ($p < 0,0001$ para todas as comparações), quando comparado ao grupo 1 (controle).

Como não foram evidenciadas lesões endometriais nos animais do grupo 3 (tratamento 20 dias), não foram realizadas mensurações macroscópicas e a análise quantitativa histopatológica demonstrou ausência completa de tecido endometrial em todas as amostras analisadas, revelando apenas necrose tecidual. Por não existir endometriose remanescente foi aconselhado pelo estatístico a exclusão do grupo 3 no teste estatístico.

4.2.1 Tabelas

As dimensões encontradas no grupo 1 (controle), grupo 2 (tratamento 10 dias) encontram-se na tabela 2 e o grupo 3 (tratamento 20 dias) está representado na tabela 3.

Tabela 2 - Tamanho dos implantes de endometriose macroscopicamente e porcentagem de tecido endometrial microscopicamente.

Grupo Controle			Grupo Tratamento (10 dias)		
Macroscopia		Microscopia	Macroscopia		Microscopia
Dimensões (mm)	Área (mm ²)	Tecido endometrial (%)	Dimensões (mm)	Área (mm ²)	Tecido endometrial (%)
130x59	7670	91	58x45	2610	7
97x73	7081	81	82x50	4100	10
125x72	9000	95	68x45	3060	3
100x76	7600	86	82x60	4920	5
102x78	7956	94	91x56	5096	9
84x65	5460	71	59x47	2773	6
75x62	4650	73	60x57	3420	7
88x77	6776	77	71x43	3053	3
96x69	6624	79	72x49	3528	4
98x80	7840	86	70x47	3290	7
M±DP	7065±1268	83±8	M±DP	3585±857	6±2

M = Média; DP = Desvio padrão; p<0,0001 Teste T Student

Tabela 3 - Tamanho dos implantes após 20 dias de tratamento com injeção local de solução bicarbonatada de ácido acetilsalicílico 20% (Grupo 3 – Tratamento 20 dias).

Grupo Tratamento (20 dias)		
Macroscopia		Microscopia
Dimensões (mm)	Área (mm²)	Tecido endometrial (%)
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0
Média	0	0

5. *Discussão*



A endometriose é um assunto que vem sendo discutido e estudado há muitos anos. Teorias como a da indução, que propõe que um fator bioquímico endógeno induz a transformação de células peritoneais indiferenciadas em tecido endometrial (LEVANDER et al., 1955 e MERRILL, 1966) e como a da metaplasia celômica, onde ocorre a substituição de uma célula adulta por outro tipo celular (RUSSO et al., 2000 e DINULESCU et al., 2005) são teorias pouco aceitas. Entretanto, Sampson em 1927, justifica o surgimento da endometriose pela presença de menstruação retrógrada, esta teoria baseia-se na suposição de que a endometriose é causada pela sementeira ou implantação de células endometriais por regurgitação transtubária durante a menstruação, existindo dados clínicos e experimentais sólidos apoiando essa hipótese (SAMPSON, 1927, HANEY et al., 1987 e RAMEY & ARCHER, 1993).

Os únicos modelos animais que podem desenvolver espontaneamente a endometriose são os primatas. No entanto, o modelo com animais desta ordem torna-se limitado pelo alto custo de manutenção e pelas inúmeras reservas no âmbito ético (HIRATA et al., 2005).

Modelos experimentais com ratos, apesar de não apresentarem evolução espontânea da lesão, são modelos amplamente utilizados desde sua implementação pioneira por GOLAN et al. e por JONES, ambos em 1984, seguidos por VERNON & WILSON (1985), RAJKUMAR et al. (1990) e SHARPE et al. (1991) em camundongos (CUMMINGS & METCALF, 1995, SOMIGLIANA et al., 1999 e ROSSI et al., 2000), em hamsters (STEINLEITNER et al., 1991) e coelhos (SCHENKEN & ASCH, 1980; DUNSELMAN et al., 1989; HOMM et al., 1989). Desses modelos não-primatas, principalmente ratos e

camundongos, têm sido desenvolvidos nos últimos anos (MIELI et al., 2002, NETO et al., 2007 e 2011, BATISTA et al., 2009). O modelo consiste em ressecar cirurgicamente uma porção do útero, fragmentar em pedaços pequenos, e reintroduzir, principalmente por sutura, na cavidade peritoneal (GRUMMER, 2006). De acordo com estudo (SILVA et al., 2004) que avaliou a evolução de lesões de endometriose em coelhas, todos os focos endometriais foram visualizados à laparoscopia 4 (quatro) semanas após o implante peritoneal.

A aplicação destes modelos é apropriada para investigação dos mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento das lesões peritoneais. Também é adequada para a avaliação dos efeitos de diversas medicações tais como imunomoduladores e antiinflamatórios (GRÜMMER, 2006), foco deste estudo.

Experimentos com ratos como os de REZENDE (1997), SCHOR (1999), NETO (2007), AMARAL (2009) e KONDO (2011), são bem acessíveis, entretanto requerem um manejo cirúrgico mais delicado, devido à implementação e execução do estudo ser dependente da fase hormonal do animal (GRÜMMER, 2006) e possuírem maior susceptibilidade ao erro na aferição do tamanho das lesões. Estes motivos levaram à escolha do modelo experimental de autotransplante endometrial ectópico em coelhas.

A seleção da via intraperitoneal para estudo torna-se interessante, pois, além da constatada ausência de malefícios à integridade do peritônio, torna-se possível minimizar a ocorrência de efeitos sistêmicos associados ao uso do medicamento (KETTEL & HUMMEL, 1997).

Com base em estudos anteriores (SAAD-HOSSNE et al., 2004(b), SAAD-HOSSNE et al., 2007 e SIQUEIRA et al., 2011) que utilizaram diferentes períodos de avaliação do tratamento após a aplicação do ácido acetilsalicílico (24, 48 e 72 horas e 7, 10 e 14 dias) em diferentes modelos experimentais, decidimos estimar os efeitos do ácido acetilsalicílico em dois momentos, 10 e 20 dias após a aplicação da droga em questão. Em estudo prévio SIQUEIRA et al. (2011) demonstraram que 10 dias após a injeção de ácido acetilsalicílico a 5% houve apenas destruição parcial dos focos de endometriose. Dessa maneira, com o objetivo de aumentar a eficácia terapêutica, no presente estudo, avaliamos os efeitos do ácido acetilsalicílico em uma concentração maior (20%) em um mesmo período (10 dias) e em um período maior (20 dias). A quantidade de solução de ácido acetilsalicílico utilizada em cada animal neste estudo também foi baseada em estudos anteriores (SAAD-HOSSNE et al., 2004(b) e 2007).

Observamos que após 10 dias de tratamento os implantes obtiveram os resultados semelhantes ao trabalho de SIQUEIRA et al. (2011), com 10 dias de tratamento e solução de 5% de ácido acetilsalicílico, quando comparado ao grupo controle. Entretanto, no grupo 3, com 20 dias de tratamento com solução de ácido acetilsalicílico a 20%, as áreas endometrióticas foram extintas, restando apenas necrose em seu lugar.

Estudos prévios com diferentes tratamentos (LOBO et al., 2008, OLIVARES et al., 2011, DELGADO-ROSAS et al., 2011 e KULAK et al., 2011) também evidenciaram destruição dos focos de endometriose. MIELI et al. (2002) utilizaram laser de vapor de cobre para o tratamento da endometriose

induzida em coelhas e encontraram em 31% dos casos, 100% de destruição dos focos de endometriose, e nas coelhas tratadas ainda com endometriose remanescente, houve diminuição em 69,85% na quantidade de glândulas. NETO et al. (2007), utilizaram a sinvastatina para avaliar alterações macroscópicas e histológicas de endometriose experimental em ratas e demonstraram que a sinvastatina impediu o crescimento dos focos de endometriose.

Da mesma forma BATISTA et al. (2009) induziram a endometriose em ratas e as tratou com 0,8mg/kg/dia de dexametasona. O tratamento reduziu a inflamação nos implantes endometriais, o teor de colágeno no estroma e significativamente a área ocupada pelas glândulas, concluindo que a dexametasona, na dosagem utilizada, reduz os efeitos estrogênicos em implantes endometriais em ratas.

NETO et al. (2011) avaliaram as alterações macroscópicas e histológicas em endometriose experimental em ratas, após tratamento com *Uncaria tomentosa* (cat's claw) e mostraram que o tratamento com *Uncaria tomentosa* provocou uma redução acentuada no crescimento ao longo do tempo ($p=0,009$), quando comparado com o controle.

Embora nestes estudos (SIQUEIRA et al., 2011, MIELI et al., 2002, BATISTA et al., 2009 e NETO et al., 2011) tenha ocorrido destruição parcial dos focos de endometriose, nenhum deles foi totalmente eficaz, ao melhor do conhecimento da autora este é o primeiro estudo que utilizando ácido acetilsalicílico atingiu a destruição de 100% dos focos de endometriose implantados em coelhas.

Uma vez que uma série de estudos tem relatado que o aumento da proliferação celular e diminuição da apoptose de células endometriais facilitam sua sobrevivência e implantação ectópica destas células em mulheres com endometriose (KHAN et al., 2009), drogas que induzam a apoptose são relevantes tanto para a prevenção e quanto para o tratamento da endometriose.

Neste contexto, neste estudo analisou-se também a indução de apoptose em todas as amostras, para averiguar se a droga utilizada induz a morte celular programada nos focos de endometriose. No grupo 1 (controle) foram encontradas poucas células apoptóticas nas 10 lâminas, enquanto no grupo 2 (10 dias tratamento) foi possível observar em todas as lâminas um grande número de células neste estágio e no grupo 3 (20 dias tratamento) foram encontradas também uma grande quantidade de células apoptóticas sem rastro de endometriose em todas as lâminas, restando apenas necrose tecidual, demonstrando que o ácido acetilsalicílico induz a apoptose de forma progressiva com o passar do tempo. SIQUEIRA et al. (2011) em seu estudo com ácido acetilsalicílico a 5% e OLIVARES et al. (2011) com celecoxib e rosiglitazone (combinado ou separado) observaram histologicamente a presença de apoptose nos focos de endometriose.

Pode-se observar então no Grupo 3 uma melhor resposta para o tratamento, onde encontramos necrose e apoptose em grande número. De acordo com ROTHWELL et al., 2011, a ingestão regular de anti-inflamatórios não-esteróides, inibidores da ciclooxigenase (COX), como a aspirina, pode induzir a apoptose em diversas linhagens de células cancerígenas (DIKSHIT et

al., 2006) e em focos de endometriose (OLIVARES et al., 2011). No entanto, os mecanismos moleculares através dos quais a apoptose é induzida, não são bem compreendidos (DIKSHIT et al., 2006), existindo vários mecanismos propostos, incluindo inibição da função do proteassoma, a ativação da via de ceramida, ativação de caspases, a super-estimulação de várias proteínas pro-apoptóticas e estresse oxidativo (DIKSHIT et al., 2006 e JANA, 2008).

Em estudos na área da oncologia, a super-expressão da COX-2 é comumente encontrada em muitos cânceres (IWATA et al., 2007 e GROOT et al., 2007) existindo uma relação causal com a supressão do sistema imune do hospedeiro, com uma maior resistência à apoptose e a estimulação do crescimento de células cancerígenas e invasão (IWATA et al., 2007 e GROOT et al., 2007). Portanto, a inibição da COX-2 torna-se um relevante alvo terapêutico (IWATA et al., 2007 e GROOT et al., 2007).

De acordo com o relatado pode-se assumir que o uso da aspirina nos focos de endometriose pode ter estimulado a apoptose através da inibição da COX-1 e 2.

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se observar grande indução de apoptose, levando a 100% de destruição de todos os focos de endometriose, mostrando que o ácido acetilsalicílico quando comparado aos outros trabalhos supracitados obteve resultados promissores.

Visando a aplicabilidade clínica dos resultados apresentados aqui, novos estudos são necessários para investigar os efeitos do ácido acetilsalicílico aplicado através do acesso laparoscópico, que vem sendo descrita como o

padrão para o diagnóstico e tratamento da endometriose (SCHOR et al., 1999; AMARAL et al., 2009) e também para avaliar os efeitos do ácido acetilsalicílico em células endometriais humanas *in vitro* e posteriormente *in vivo*. Além disto o estudo quantitativo da endometriose pela coloração com caspase, pode confirmar os dados qualitativos ora observados.

6. Conclusões



Com base no método empregado e no modelo experimental utilizado, com vista ao objetivo estabelecido, chegamos às seguintes conclusões:

- No grupo avaliado 10 dias após o tratamento a solução bicarbonatada de ácido acetilsalicílico a 20% causou hemorragia, fibrose, processo inflamatório e apoptose dos focos endometriais.
- Após 20 dias, houve eliminação completa do tecido endometrial, existindo infiltrados de processo inflamatórios, apoptose e grandes áreas de necrose.

Conclui-se então que a solução bicarbonatada de ácido acetilsalicílico a 20% em 10 dias causa destruição parcial dos focos de endometriose. E no tempo de 20 dias de tratamento a destruição foi total, ou seja, a solução bicarbonatada de ácido acetilsalicílico é eficaz no tratamento da endometriose peritoneal experimental em coelhas autólogas, no tempo de 20 dias.

7. Referências



1. Amaral VF, Dal Lago EA, Kondo W, Souza LC, Francisco JC. Development of an experimental model of endometriosis in rats. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*. 2009; 36: 250-5.
 2. Anazetti MC, Melo PS. Morte celular por apoptose: uma visão bioquímica e molecular. *Metrocamp pesquisa*. 2007; 1: 37-58.
 3. Batista APC, Medeiros PL, Teixeira AAC, Teixeira VW. Histochemical and morphometric analysis of endometriotic lesions induced in female rats and treated with dexamethasone. *J Bras Patol Med Lab*. 2009; 45: 147-53.
 4. Bayer. Ácido Acetilsalicílico – Linha do tempo aspirina® [web site]. 2002. Available at: <http://www.aspirina.com.br/espaco-aspirina/linha-do-tempo/linha-do-tempo.php>. Accessed January 28, 2012.
 5. Berger JS, Lala A, Krantz MJ, Baker GS, Hiatt WR. Aspirin for the prevention of cardiovascular events in patients without clinical cardiovascular disease: a meta-analysis of randomized trials. *Am Heart J*. 2011; 162: 115-24.
 6. Brasil. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução 196/96. [web site]. Available at: <http://conselho.saude.gov.br> - Accessed January 24, 2012.
 7. Brick VS, Saad-Hossne W, Saad-Hossne R. Clinical research on new drugs (Phase I). Profile of scientific publications: data from the pre-clinical phase and bioethical aspects. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2008; 23: 531-5.
-

8. Catenacci M, Sastry S, Falcone T. Laparoscopic surgery for endometriosis. *Clin Obstet Gynecol.* 2009; 52: 351–61.
 9. Contran RS, Kumar V, Collins T. The female genital system and breast. In: Robbins SL, editor. *Basic Pathology.* 8th ed. Philadelphia: Saunders. 2007; 710–1.
 10. Cummings AM, Metcalf JL. Induction of endometriosis in mice: a new model sensitive to estrogen. *Reprod Toxicol.* 1995; 9: 233–8.
 11. D'Antonio M, Martelli F, Peano S, Papoian R, Borrelli F. Ability of recombinant human TNF binding protein-1 (r-hTBP-1) to inhibit the development of experimentally-induced endometriosis in rats. *J Reprod Immunol.* 2000; 48: 81–98.
 12. de Groot DJ, de Vries EG, Groen HJ, de Jong S. Non-steroidal anti-inflammatory drugs to potentiate chemotherapy effects: from lab to clinic. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2007;61(1):52-69.
 13. Delgado-Rosas F, Gómez R, Ferrero H, Gaytan F, Garcia-Velasco J, Simón C, Pellicer A. The effects of ergot and non-ergot-derived dopamine agonists in an experimental mouse model of endometriosis. *Society for Reproduction and Fertility.* 2011; 142: 745-55.
 14. Dikshit P, Chatterjee M, Goswami A, Mishra A, Jana NR. Aspirin induces apoptosis through the inhibition of proteasome function. *J Biol Chem.* 2006 Sep 29;281(39):29228-35.
-

15. Dinulescu DM, Ince TA, Quade BJ, et al. Role of K-ras and Pten in the development of mouse models of endometriosis and endometrioid ovarian cancer. *Nat Med.* 2005; 11: 63-70.
 16. Dunselman GA, Willebrand D, Land JA, Bouckaert PX, Evers JL. A rabbit model of endometriosis. *Gynecol Obstet Invest.* 1989; 27: 29–33.
 17. Efstathiou JA, Sampson DA, Levine Z, Rohan RM, Zurakowski D, Folkman J, D'Amato RJ, Rupnick MA. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs differentially suppress endometriosis in a murine model. *Fertil Steril.* 2005; 83: 171-81.
 18. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 2007; 35: 495-516.
 19. Evers JLH, Dunselman GAJ, Land JA. Management of recurrent endometriosis. In: Coutinho EM, Spinola P, deMoura LH, editors. *Progress in the management of endometriosis.* London, England: Parthenon Publishing. 1995; 291–7.
 20. Ferrero S, Abbamonte LH, Anserini P, Remorgida V, Ragni Nicola. Future perspectives in the medical treatment of endometriosis. *Obstetrical and Gynecological Survey.* 2005; 60: 817-26.
 21. Filigheddu N, Gregnanin I, Porporato PE, Surico D, Perego B, Galli L, Et al. Differential expression of microRNAs between eutopic and ectopic endometrium in ovarian endometriosis. *Journal of Biomedicine & Biotechnology.* 2010.
-

22. Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet*. 2004; 364: 1789–99.
 23. Golan A, Winston RM, Dargenio R. Experimental endometriosis: a microsurgical animal model in rats. *Isr J Med Sci*. 1984; 20: 1094-6.
 24. Grivicich I, Regner A, Rocha AB. Morte celular por apoptose. *Rev. Bras. Canc.* 2007; 53: 335-43.
 25. Grümmer R. Animal models in endometriosis research. *Human Reproduction Update*. 2006; 12: 641–9.
 26. Haney AF. Endometriosis: pathogenesis and pathophysiology. In: Wilson EA, ed. *Endometriosis*. New York, NY. AR Liss. 1987; 23-51.
 27. Hart RJ, Hickey M, Maouris P, Buckett W. Excisional surgery versus ablative surgery for ovarian endometriomata. *Cochrane Database Revisão Sistemática*. 2008.
 28. 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: 2092-6.
 29. Himm RJ, Garza DE, Mathur S, Austin M, Baggett B, Williamson HO. Immunological aspects of surgically induced experimental endometriosis: variation in response to therapy. *Fertil Steril*. 1989; 52: 132–9.
 30. Igelmo JMR, Quereda F, Acién P. Intraperitoneal and subcutaneous treatment of experimental endometriosis with recombinant human interferon- α -2b in murine model. *Fertil Steril*. 1999; 71: 907-11.
-

31. Iwata C, Kano MR, Komuro A, Oka M, Kiyono K, Johansson E, Morishita Y, Yashiro M, Hirakawa K, Kaminishi M, Miyazono K. Inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses lymphonode metastasis via reduction of lymphangiogenesis. *Cancer Res.* 2007;67:10181–10189.
 32. Jana NR. NSAIDs and apoptosis. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65(9):1295-301.
 33. Jones RC. The effect of a luteinizing hormone releasing hormone (LRH) agonist (Wy-40,972), levonorgestrel, danazol and ovariectomy on experimental endometriosis in the rat. *Acta Endocrinol.* 1984; 106: 282-8.
 34. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis. A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* 1992; 26: 239-57
 35. Kettel LM, Hummel WP. Modern medical management of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol.* 1997; 24: 361-73.
 36. Kondo W, Dal Lago EA, Noronha L, Olandoski M, Kotze PG, Amaral VF. Effect of anti-TNF- α on peritoneal endometrial implants of rats. *Rev. Col. Bras. Cir.* 2011; 38: 266-73.
 37. Kulak J, Fischer C, Komm B, Taylor HS. Treatment with bazedoxifene, a selective estrogen receptor modulator, causes regression of endometriosis in a mouse model. *Endocrinology.* 2011; 152: 3226-32.
 38. Levander G, Normann P. The pathogenesis of endometriosis: an experimental study. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1955; 34: 366-98.
-

39. Lobo VLR, Soares Júnior JM, Jesus Simões M, Simões RS, Lima GR, Baracat EC. Does gestrinone antagonize the effects of estrogen on endometrial implants upon the peritoneum of rats? *Clinics*. 2008; 63: 525-30.
40. Merrill JA. Endometrial induction of endometriosis across millipore filters. *Am J Obstet Gynecol*. 1966; 94: 780-9.
41. Mieli MPA, Oliveira W, Osaka JT, Sandoval MP, Pereira PRB, Tolosa EMC. Tratamento da endometriose induzida cirurgicamente em coelhas pelo laser de vapor de cobre (LVC). *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2002; 17: 312-6.
42. Monteforte CA, Nava C, Carnevale GP. Preliminary results of therapeutical association of GnRH and α -interferon in the treatment of pelvic endometriosis. In: Coutinho EM, Spinola P, deMoura LH, editors. *Progress in the Management of Endometriosis*. London, England: Parthenon Publishing. 1995; 305–8.
43. Neto J, Coelho TM, Aguiar GC, Carvalho LR, Araújo AG, Girão MJ, Schor E. Experimental endometriosis reduction in rats treated with *Uncaria tomentosa* (cat's claw) extract. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2011.
44. Neto JN, Torres OJM, Borges MOR, Coelho TM, Nascimento AGPAC, Nunes Júnior JNN, Esteves GL. Changes in the volume and histology of focus of endometriosis in rats treated with simvastatin. *Rev Brasileira Ginecologia e Obstetrícia*. 2007; 29: 396-402.
-

45. Olivares C, Ricci A, Bilotas M, Baraňao RI, Meresman G. The inhibitory effect of celecoxib and rosiglitazone on experimental endometriosis. *Fertility and Sterility* 2011; 96: 428-33.
 46. Parolin MB, Reason IJM. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. *Arq. Gastroenterol.* 2001; 38: 138-44.
 47. Rajkumar K, Schott PW, Simpson CW. The rat as an animal model for endometriosis to examine recurrence of ectopic endometrial tissue after regression. *Fertil Steril.* 1990; 53: 921-5.
 48. Ramey JW, Archer DF. Peritoneal fluid: its relevance to the development of endometriosis. *Fertil Steril.* 1993; 60: 1-14.
 49. Rezende CAL, Silva AL, Júnior JLS, Gobbi H, Martins MMF. Experimental model for endometriosis - comparative histological study between the ectopic and eutopic endometrium - *Acta. Cirúrgica Brasileira.* 1997; 12:226-30.
 50. Rossi G, Somigliana E, Moschetta M, Santorsola R, Cozzolino S, Filardo P, Salmaso A, Zingrillo B. Dynamic aspects of endometriosis in a mouse model through analysis of implantation and progression. *Arch Gynecol Obstet.* Vol. 2000; 263: 102-7.
 51. Rothwell PM, Fowkes FG, Belch JF, Ogawa H, Warlow CP, Meade TW. Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: analysis of individual patient data from randomised trials. *Lancet.* 2011; 377: 31-41.
-

52. Russo L, Woolmough E, Heatley MK. Structural and cell surface antigen expression in the rete ovarii and epoophoron differs from that in the fallopian tube and in endometriosis. *Histopathology*. 2000; 37: 64-69.
53. Saad-Hossne R, Hossne WS, Prado RG. Ascite neoplásica. Efeito da solução aquosa de fenol, ácido acético e glicerina sobre o tumor ascítico de Erlich. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2003; 18: 518-26.
54. Saad-Hossne R, Hossne WS, Prado RG. Efeito da solução aquosa de fenol, ácido acético e glicerina sobre o tumor ascítico de Erlich. Estudo experimental in vitro. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2004(a); 19: 54-8.
55. Saad-Hossne R, Prado RG, Hossne WS. Efeito da solução de ácido acetilsalicílico e de ácido acético em fígado de coelhos. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2004(b); 19: 677-86.
56. Saad-Hossne R, Prado RG, Hossne WS. Efeito da solução de ácido acetilsalicílico e de ácido acético sobre carcinoma vx-2. Análise in vitro. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2006; 21: 1514.
57. Saad-Hossne R, Prado RG, Hossne WS. Effects of acetylsalicylic acid and acetic acid solutions on VX2 liver carcinoma in rabbits: in vivo analysis. *Acta Cir Bras*. 2007; 22: 299–308.
58. Sakata M, Terakawa N, Mizutani T, Tanizawa O, Matsumoto K, Terada N, Sudo K. Effects of danazol, gonadotropin-releasing hormone agonist, and a combination of danazol and gonadotropin-releasing hormone agonist on experimental endometriosis. *J Obstet Gynecol*. 1990; 163: 1679–84.
-

59. Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am Obstet Gynecol.* 1927; 14: 422–69.
 60. Schenken RS, Asch RH. Surgical induction of endometriosis in the rabbit: effects on fertility and concentrations of peritoneal fluid prostaglandins. *Fertil Steril.* 1980; 34: 581–7.
 61. Schor E, Freitas V, Soares Junior JM, Simões MJ, Baracat EC. Endometriose: Modelo experimental em ratas. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia.* 1999; 21: 281-4.
 62. Schrör K. *Geschichte von Acetylsalicylsäure.* Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. 2009; 38: 306-13
 63. Sharpe KL, Bertero MC, Muse KN, Vernon MW. Spontaneous and steroid-induced recurrence of endometriosis after suppression by a gonadotropin-releasing hormone antagonist in the rat. *Am J Obstet Gynecol.* 1991; 164: 187–94.
 64. Silva JCR, Silva ANJSR, Coltro OS, Garcia SB, Reis FC, Nogueira AA. Experimental endometriosis model in rabbits with follow-up of the lesions. *Revista Brasileira Ginecologia e Obstetrícia.* 2004; 26: 715-9.
 65. Siqueira JM, Barretto AB, Saad-Hossne R. Treatment of endometriosis with local acetylsalicylic acid injection: Experimental study in rabbits. *The Journal of Minimally Invasive Gynecology.* 2011; 18: 800-6.
-

66. Somigliana E, Vigano P, Rosi G, Carinelli S, Vignali M, Panina-Bordignon P. Endometrial ability to implant in ectopic sites can be prevented by interleukin-12 in a murine model of endometriosis. *Hum Reprod.* 1999; 14: 2944–50.
67. Steinleitner A, Lambert H, Suarez M, Serpa N, Robin B, Cantor B. Periovulatory calcium channel blockade enhances reproductive performance in an animal model for endometriosis-associated subfertility. *Am J Obstet Gynecol.* 1991; 164: 949–52.
68. Vernon MW, Wilson EA. Studies on the surgical induction of endometriosis in the rat. *Fertil Steril.* 1985; 44: 684–94.
69. Yano S, Ikegami Y, Nakao K. Studies on the effect of the new nonsteroidal aromatase inhibitor fadrozole hydrochloride in an endometriosis model in rats. *Arzneimittelforschung.* 1996; 46: 192-5.
-

Анехо



Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal

Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br

Instituída na Faculdade de Medicina através da Portaria do Diretor nº 30 de 26/04/99



Comissão de Ética em Experimentação Animal

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS que o Protocolo n.º 758 sobre o projeto de pesquisa "Tratamento da endometriose peritoneal com injeção local de ácido acetil salicílico. Estudo experimental em coelhas", que será conduzido por Adriana Beatriz Barretto, orientada pelo Prof. Dr. Rogério Saad Hossne, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva de que os "coelhas", são provenientes de Biotério convencional, sem condições de atestar a sanidade dos mesmo.

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEEA em 29/10/2009.

Regina H. Garcia Martins
Profª Drª Regina H. Garcia Martins
Presidente da CEEA

Alberto Santos Capelluppi
Alberto Santos Capelluppi
Secretário da CEEA

*Efeitos da Injeção Local de Ácido Acetilsalicílico
a 20% na Endometriose Peritoneal –
Estudo Experimental em Coelhos*

Artigo



Efeitos da Injeção Local de Ácido Acetilsalicílico a 20% na Endometriose Peritoneal – Estudo Experimental em Coelhos

Adriana Beatriz Barretto¹, Rafael Denadai¹, Ednelson Henrique Bianchi², Solange Peron Bueno Angela³ e Rogério Saad-Hossne¹

1 – Departamento de Cirurgia e Ortopedia, Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), Universidade do Estado de São Paulo (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil.

2 – Departamento de Cirurgia Experimental, Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), Universidade do Estado de São Paulo (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil.

3 – Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), Universidade do Estado de São Paulo (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil.

Conflitos de interesse: Nenhum

Auxílio financeiro: CAPES e FAPESP-Brasil

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi estimar os efeitos da injeção local da solução de ácido acetilsalicílico a 20% em implantes de endométrio autólogo intraperitoneal. Foram utilizadas 30 coelhas adultas divididas em 3 grupos de 10 coelhas, com indução da endometriose peritoneal. Após 20 dias da indução da endometriose as coelhas foram randomizadas e de acordo com os grupos receberam os determinados tratamentos: solução fisiológica 0,9% por 20 dias (grupo 1, controle), solução bicarbonatada de ácido acetilsalicílico 20% durante 10 dias (grupo 2, tratamento) e solução bicarbonatada de ácido acetilsalicílico 20% durante 20 dias (grupo 3, tratamento). Os focos de endometriose foram removidos e preparados em lâminas para análise histológica. Foi utilizado um programa de computador para análise das lâminas e aferição da área total de endometriose remanescente. A área do grupo 2 (tratamento 10 dias) foi significativamente menor que a área de endometriose no grupo 1 (controle) e no grupo 3 (tratamento 20 dias), a área não foi aferida por não ter restado endometriose remanescente em nenhuma das 10 lâminas. O tratamento com ácido acetilsalicílico em um período de 20 dias destrói toda a área de endometriose.

INTRODUÇÃO

A endometriose é uma doença ginecológica caracterizada pela presença de tecido endometrial além dos limites uterinos [1], que acomete mulheres jovens em idade reprodutiva com taxas variáveis de 2 a 7%, podendo chegar a 25% das mulheres entre os 30 e 40 anos de idade [2]. Um número significativo de mulheres é assintomática, e quando sintomáticas envolvem dor pélvica como dismenorréia, dor lombar, disquezia, dor durante a micção e dispareunia. Em alguns casos pode causar a infertilidade [3].

O exame diagnóstico tido como padrão-ouro para confirmação da doença é a análise anatomopatológica de peças obtidas através de métodos invasivos, como videolaparoscopia e laparotomia [3-4].

A primeira e melhor opção atualmente é a cirúrgica, entretanto, a taxa de recorrência pode chegar a 47% [5-7], seguida pelo uso de drogas que podem minimizar as dores, mas que não eliminam a doença.

Baseando-se no mecanismo de desenvolvimento mais difundido da doença, o de Sampson, que justifica o surgimento da endometriose pela presença de menstruação retrógrada [8], os únicos modelos animais que podem desenvolvê-la espontaneamente são os primatas. No entanto, o modelo com animais desta ordem torna-se limitado pelo alto custo de manutenção e pelas inúmeras reservas no âmbito ético [9].

Modelos experimentais com ratos, apesar de não apresentarem evolução espontânea da lesão, são modelos amplamente utilizados desde sua implementação pioneira por Golan e Jones, ambos em 1984 [10-11]. O modelo consiste em ressecar cirurgicamente uma porção do útero, cortar em pedaços pequenos, e reintroduzir, principalmente por sutura, na cavidade peritoneal

[12]. De acordo com estudo [13] que avaliou a evolução de lesões de endometriose em coelhas, todos os focos endometriais foram visualizados à laparoscopia 4 (quatro) semanas após o implante peritoneal.

No presente estudo utilizou-se o ácido acetilsalicílico (aspirina) devido ao seu uso generalizado e aos estudos experimentais anteriores que temos reunidos sobre o assunto. Nestes estudos, os autores demonstram os efeitos do ácido acetilsalicílico sobre tecidos normais (fígado e mucosa do cólon de coelhos); realizaram a injeção de ácido acetilsalicílico (2,5% e 5,0%) no lobo esquerdo do fígado de coelhos e não encontraram alterações na evolução clínica, peso e nas dosagens bioquímicas, quando comparados ao controle (solução salina), aplicaram ácido acetilsalicílico a 5% na forma de enema em mucosa colorretal de coelhos e também não encontraram nenhuma alteração na mucosa do cólon, quando comparado com o controle (solução salina). Em outros dois estudos, os autores observaram efeitos citolíticos e anti-tumorais (*in vitro* e *in vivo*) do ácido acetilsalicílico. No primeiro, estudaram células tumorais VX-2 incubadas com ácido acetilsalicílico (2,5% e 5%) e encontraram que a viabilidade das células tumorais diminui progressivamente e que ao final de 30 minutos todas as células tumorais eram inviáveis [14]. No outro estudo, avaliaram os efeitos do ácido acetilsalicílico a 5% em tumor VX-2 implantado em fígado de coelhos e encontraram uma destruição do tumor hepático experimental, sem alterações na evolução clínica, peso e dosagens bioquímicas [15].

Seguindo esta linha de pesquisa, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos da injeção local de ácido acetilsalicílico em implantes peritoneais de endometriose, num modelo experimental em coelhas.

Materiais e Métodos

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Botucatu Universidade Estadual Paulista (FMB-UNESP), de acordo com o protocolo número 107/05. Os coelhos foram mantidos de acordo com as diretrizes do *Care and Use of Laboratory Animals* (Institute for Laboratory Animal Research, 1996) e de acordo com os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Animais

Quarenta coelhos adultos, fêmeas, virgens, pesando aproximadamente 2500g foram mantidos em gaiolas apropriadas em condições controladas condições de luz, umidade, temperatura, água e alimentos. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados com os animais sob anestesia geral através de administração intravenosa de 30 mg de sódio / kg de 3% pentobarbital.

Os animais foram anestesiados por via endovenosa com solução de quetamina 10% (1ml/kg) e xilasina 2% (0,5ml/kg).

Realizou-se a tricotomia da parede abdominal com uso de lâminas e, a seguir, aplicou-se as técnicas de anti-sepsia. Todos os procedimentos foram realizados com luvas de látex estéreis, lavadas previamente com soro fisiológico a 0,9% [16].

Cirurgias

Após a anestesia, os animais foram submetidos à laparotomia conforme a técnica descrita por Silva [13]. Iniciando-se com uma incisão longitudinal mediana da parede abdominal, de aproximadamente 2cm. Através desta obteve-se acesso à cavidade pélvica, onde foi ressecado cerca de 4cm do corno uterino.

O fragmento uterino foi imerso em solução fisiológica 0,9% a 4°C durante 4 minutos. Após este tempo, procedeu-se à incisão longitudinal do corno uterino ressecado, delimitando um fragmento de 5,0 X 5,0mm seguida da separação do endométrio das outras camadas uterinas, foram feitos dois fragmentos por coelhas.

Os endométrios foram então suturados, um do lado direito do peritônio e o outro do lado esquerdo, com fio Vicryl® 6.0, próximo à linha Alba, na localidade onde a maioria dos vasos foi visualizada, com a face endometrial livre voltada para a luz da cavidade abdominal.

Após o implante os animais foram mantidos em cativeiro durante 20 dias, período em que a viabilidade e tamanho do enxerto são máximas: 100% e 2,5 cm, segundo estudo realizado por Silva [13] e pelo piloto feito antes do início do trabalho.

Ao 30º dia pós-operatório, as coelhas foram submetidas a uma segunda laparotomia para visualização das lesões e estabelecimento da área de

endometriose encontrada (largura e comprimento) através do uso de um paquímetro e submetida a análise estatística (Teste T Student).

O momento da realização do sacrifício foi 10 e 20 dias da aplicação do medicamento, conforme o grupo experimental.

O sacrifício foi realizado na dose de 200mg/kg de pentobarbital, por via intravenosa.

Solução Teste

A solução teste para a obtenção da solução bicarbonatada de ácido acetilsalicílico a 20% foi feita através da diluição de 1000mg de ácido acetilsalicílico em 5ml de bicarbonato de sódio a 10%, formando a solução bicarbonatada de ácido acetilsalicílico a 20%. A solução foi preparada 10 minutos antes do seu uso.

Resultados

Grupo 1 – Animais tratados com solução fisiologia (controle) e sacrificados 20 dias após o tratamento

À macroscopia todos os implantes formavam estruturas císticas, sendo metade delas hemorrágica; este aspecto foi confirmado à microscopia que evidenciou formações císticas em todas as lâminas, com revestimento epitelial colunar em agrupamento glandular associado a um estroma de células fusiformes: cisto de tecido endometrial. Em 8 das 10 lâminas, o endométrio estava em fase proliferativa – foram vistas regiões com inúmeras mitoses e uma quantidade pequena de apoptoses celulares o que demonstrou que o tecido endometrial teve seu crescimento livre neste período.

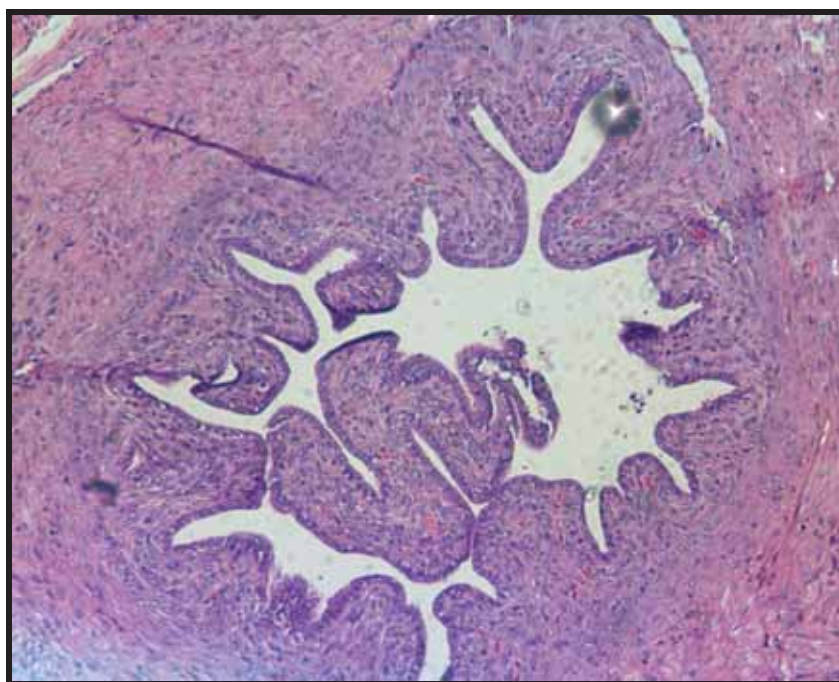


Figura 2: Lâmina Grupo 1 (controle) / aumento 100x – endometriose desenvolvida com 10 dias de tratamento com solução fisiológica 0,9%.

O corte revela implantes endometrióticos peritoneais com glândulas e estroma preservados permeados por discreto infiltrado inflamatório linfoplasmocitário e raros eosinófilos.

Grupo 2 – Animais tratados com solução de ácido acetilsalicílico (20%) e sacrificados após 10 dias do tratamento

Todos os implantes observados no momento da re-operação tinham aspecto hemorrágico e se encontravam aderidos ao conteúdo da cavidade endometrial, sendo de difícil identificação visual qual aspecto macroscópico possuía o implante.

À microscopia mostrou pequenos focos de cisto de tecido endometrial em todas as lâminas, sendo um aspecto inferior quando comparado ao grupo controle. Acompanhado de hemorragia, fibrose, processo inflamatório e apoptose, sem exceções.

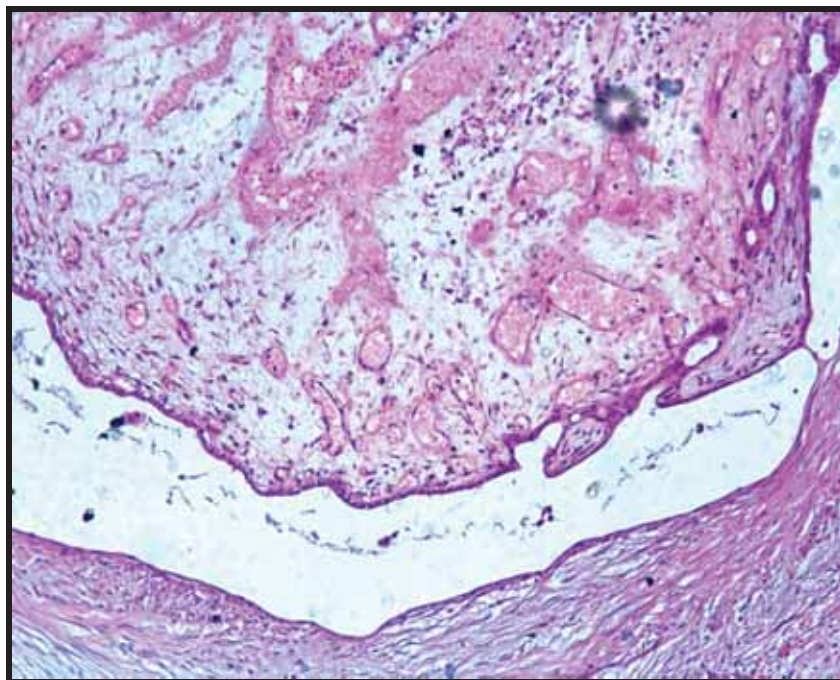


Figura 3: Lâmina Grupo 2 (tratamento) / aumento 100x – endometriose desenvolvida com 20 dias de tratamento com solução bicarbonatada de ácido acetilsalicílico 20%.

Revela áreas de epitélio e estroma parcialmente preservados permeados por intenso infiltrado inflamatório linfoplasmocitário e eosinofílico.

Grupo 3 – Animais tratados com solução de ácido acetilsalicílico (20%) e sacrificados após 20 dias do tratamento

Macroscopicamente os implantes deste grupo também foram de difícil visualização, apresentando aderência ao conteúdo da cavidade endometrial.

Na microscopia não foi possível encontrar formação cística de endometriose assim como evidências de processo inflamatório em todas as lâminas, sendo observado apenas grandes áreas de necrose e apoptose.

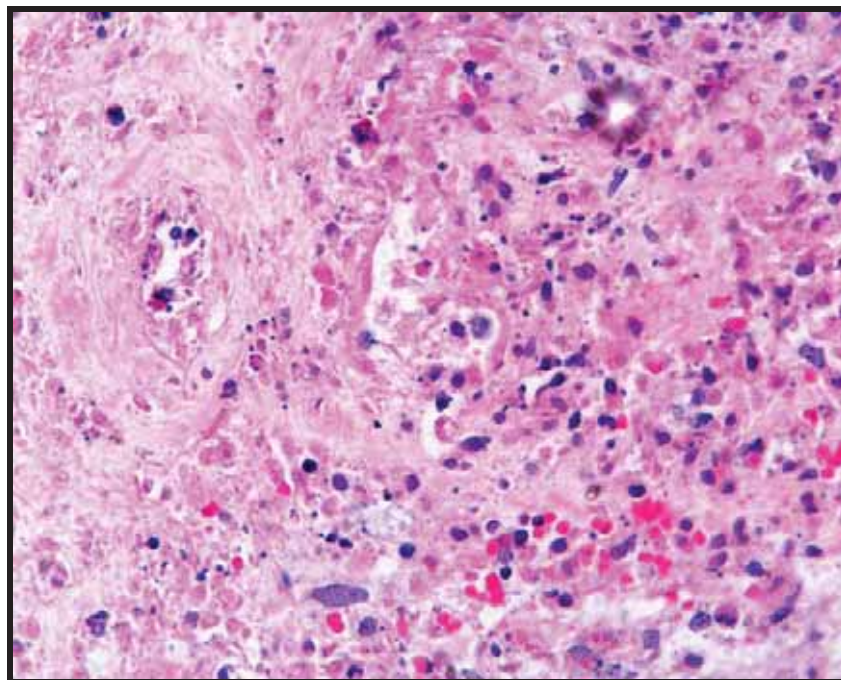


Figura 4: Lâmina Grupo 3 (tratamento) / aumento 400x – necrose após 20 dias de tratamento com solução bicarbonatada de ácido acetilsalicílico 20%.

Revela intenso infiltrado inflamatório linfo-plasmocitário, colapso glandular e estromal, corpos apoptóticos abundantes e extensa necrose.

Análise Estatística

As áreas dos grupos 1 (controle) e 2 (tratamento 10 dias) foram aferidas em mm e a área com tecido endometrial em porcentagem. Foi feita análise estatística através do Teste T Student e encontrada, tanto para a área quanto para o tecido endometrial, uma diferença entre os grupos estatisticamente significativa, mostrando uma grande diminuição do foco de endometriose (tabela 1).

Tabela 1 - Tamanho dos implantes de endometriose macroscopicamente, microscopicamente e porcentagem de tecido endometrial.

Grupo Controle			Grupo Tratamento (10 dias)		
Macroscopia		Microscopia	Macroscopia		Microscopia
Dimensões (mm)	Área (mm ²)	Tecido endometrial (%)	Dimensões (mm)	Área (mm ²)	Tecido endometrial (%)
130x59	7670	91	58x45	2610	7
97x73	7081	81	82x50	4100	10
125x72	9000	95	68x45	3060	3
100x76	7600	86	82x60	4920	5
102x78	7956	94	91x56	5096	9
84x65	5460	71	59x47	2773	6
75x62	4650	73	60x57	3420	7
88x77	6776	77	71x43	3053	3
96x69	6624	79	72x49	3528	4
98x80	7840	86	70x47	3290	7
M±DP	7065± 1268	83±8	Média±DP	3585± 857	6±2

M = Média; DP = Desvio padrão p<0,0001 Teste T Student

No grupo 3 (tratamento 20 dias), não houve aferição do tamanho das lesões por não ter sido encontrada endometriose remanescente em nenhuma das 10 lâminas analisadas, sendo excluída do teste estatístico.

Discussão

Com base em estudos anteriores [15,17] que utilizaram diferentes períodos de avaliação (24, 48 e 72 horas e 7, 10 e 14 dias, respectivamente) após a intervenção terapêutica com ácido acetilsalicílico, sendo um trabalho precursor a este com 24 horas e 10 dias respectivamente e com concentração da droga de 5% [16], decidimos estimar os efeitos do ácido acetilsalicílico em dois momentos diferentes, ou seja, 10 e 20 dias após a aplicação da droga em questão, em que sua concentração também foi alterada e aumentada para 20%. A quantidade injetada em cada animal neste estudo também foi baseada em estudos anteriores [15,17].

Em estudos prévios com diferentes tratamentos, tais como laser de vapor de cobre [18], sinvastatina [19], dexametasona [20], *Uncaria tomentosa* (cat's claw) [21] também foram testados em animais experimentais, apresentando resultados com destruição de parte dos focos de endometriose, impedimento do crescimento após o uso da droga e diminuição da área endometriótica, respectivamente. De forma similar, no estudo de Siqueira [16], foi apresentado o uso da solução de ácido acetilsalicílico 5% com resposta positiva ao objetivo do trabalho porém não totalmente satisfatória. Os focos de endometriose foram apenas parcialmente destruídos [16]. No presente estudo foi averiguado o que aconteceria com o aumento da concentração da solução (20%) em um período semelhante (10 dias) e em um tempo superior (20 dias) de tratamento.

As respostas encontradas foram que em 10 dias de tratamento os implantes obtiveram os resultados semelhantes ao trabalho de Siqueira [16], com 10 dias de tratamento com solução de 5% de ácido acetilsalicílico, o que nos leva a entender que a dosagem não é significativa no aumento de 15%. Entretanto no grupo 3, com 20 dias de tratamento com solução de ácido acetilsalicílico 20% a resposta foi de que as áreas endometrióticas foram extintas, restando apenas necrose em seu lugar.

Foi avaliada também a indução de apoptose em todas as amostras. No grupo 1 (controle) foram encontrados alguns sinais de células apoptóticas nas 10 lâminas, no grupo 2 (10 dias tratamento) foi possível observar um grande número de células neste estágio em todas as lâminas e no grupo 3 (20 dias tratamento) em todas as lâminas foram encontradas células apoptóticas sem rastro de endometriose, restando apenas necrose tecidual, outros autores [16,22,23] também evidenciaram que o AAS a 5% e outras drogas respectivamente induzem a apoptose em focos endometriais.

Este trabalho nos leva a gerar uma nova pauta, um novo modelo experimental para o estudo sem a necessidade do método invasivo para a injeção local da droga.

Conclusão

Com base no método empregado e no modelo experimental utilizado, com vista ao objetivo estabelecido, chegamos às seguintes conclusões:

- No grupo avaliado 10 dias após o tratamento a solução bicarbonatada de ácido acetilsalicílico a 20% causou hemorragia, fibrose, processo inflamatório e apoptose dos focos endometriais.
- Após 20 dias, houve eliminação completa do tecido endometrial, existindo infiltrados de processo inflamatórios, apoptose e grandes áreas de necrose.

Conclui-se então que a solução bicarbonatada de ácido acetilsalicílico a 20% em 10 dias causa destruição parcial dos focos de endometriose. E no tempo de 20 dias de tratamento a destruição foi total, ou seja, a solução bicarbonatada de ácido acetilsalicílico é eficaz no tratamento da endometriose peritoneal experimental em coelhas autólogas, no tempo de 20 dias.

Referências

1. Filigheddu N, Gregnanin I, Porporato PE, Surico D, Perego B, Galli L, Et al. Differential expression of microRNAs between eutopic and ectopic endometrium in ovarian endometriosis. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*. 2010.
 2. Monteforte CA, Nava C, Carnevale GP. Preliminary results of therapeutical association of GnRH and α -interferon in the treatment of pelvic endometriosis. In: Coutinho EM, Spinola P, deMoura LH, editors. *Progress in the Management of Endometriosis*. London, England: Parthenon Publishing. 1995; 305–8.
 3. Amaral VF, Dal Lago EA, Kondo W, Souza LC, Francisco JC. Development of an experimental model of endometriosis in rats. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*. 2009; 36: 250-5.
 4. Schor E, Freitas V, Soares Junior JM, Simões MJ, Baracat EC. Endometriose: Modelo experimental em ratas. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*. 1999; 21: 281-4.
 5. Hart RJ, Hickey M, Maouris P, Buckett W. Excisional surgery versus ablative surgery for ovarian endometriomata. *Cochrane Database Revisão Sistemática*. 2008.
 6. Catenacci M, Sastry S, Falcone T. Laparoscopic surgery for endometriosis. *Clin Obstet Gynecol*. 2009; 52: 351–61.
-

7. Contran RS, Kumar V, Collins T. The female genital system and breast. In: Robbins SL, editor. Basic Pathology. 8th ed. Philadelphia: Saunders. 2007; 710–1.
 8. Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. Am Obstet Gynecol. 1927; 14: 422–69.
 9. 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: 2092-6.
 10. Golan A, Winston RM, Dargenio R. Experimental endometriosis: a microsurgical animal model in rats. Isr J Med Sci. 1984; 20: 1094-6.
 11. Jones RC. The effect of a luteinizing hormone releasing hormone (LRH) agonist (Wy-40,972), levonorgestrel, danazol and ovariectomy on experimental endometriosis in the rat. Acta Endocrinol. 1984; 106: 282-8.
 12. Grümmer R. Animal models in endometriosis research. Human Reproduction Update. 2006; 12: 641–9.
 13. Silva JCR, Silva ANJSR, Coltro OS, Garcia SB, Reis FC, Nogueira AA. Experimental endometriosis model in rabbits with follow-up of the lesions. Revista Brasileira Ginecologia e Obstetrícia. 2004; 26: 715-9.
 14. Saad-Hossne R, Prado RG, Hossne WS. Efeito da solução de ácido acetilsalicílico e de ácido acético sobre carcinoma vx-2. Análise *in vitro*. Acta Cirúrgica Brasileira. 2006; 21: 1514.
-

15. Saad-Hossne R, Prado RG, Hossne WS. Effects of acetylsalicylic acid and acetic acid solutions on VX2 liver carcinoma in rabbits: in vivo analysis. *Acta Cir Bras.* 2007; 22: 299–308.
 16. Siqueira JM, Barretto AB, Saad-Hossne R. Treatment of endometriosis with local acetylsalicylic acid injection: Experimental study in rabbits. *The Journal of Minimally Invasive Gynecology.* 2011; 18: 800-6.
 17. Saad-Hossne R, Prado RG, Hossne WS. Efeito da solução de ácido acetilsalicílico e de ácido acético em fígado de coelhos. *Acta Cirúrgica Brasileira.* 2004(b); 19: 677-86.
 18. Mieli MPA, Oliveira W, Osaka JT, Sandoval MP, Pereira PRB, Tolosa EMC. Tratamento da endometriose induzida cirurgicamente em coelhas pelo laser de vapor de cobre (LVC). *Acta Cirúrgica Brasileira.* 2002; 17: 312-6.
 19. Neto JN, Torres OJM, Borges MOR, Coelho TM, Nascimento AGPAC, Nunes Júnior JNN, Esteves GL. Changes in the volume and histology of focus of endometriosis in rats treated with sinvastatin. *Rev Brasileira Ginecologia e Obstetrícia.* 2007; 29: 396-402.
 20. Batista APC, Medeiros PL, Teixeira AAC, Teixeira VW. Histochemical and morphometric analysis of endometriotic lesions induced in female rats and treated with dexamethasone. *J Bras Patol Med Lab.* 2009; 45: 147-53.
 21. Neto J, Coelho TM, Aguiar GC, Carvalho LR, Araújo AG, Girão MJ, Schor E. Experimental endometriosis reduction in rats treated with *Uncaria tomentosa* (cat's claw) extract. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology.* 2011.
-

22. Ferrero S, Abbamonte LH, Anserini P, Remorgida V, Ragni Nicola. Future perspectives in the medical treatment of endometriosis. *Obstetrical and Gynecological Survey*. 2005; 60: 817-26.
 23. Olivares C, Ricci A, Bilotas M, Barañao RI, Meresman G. The inhibitory effect of celecoxib and rosiglitazone on experimental endometriosis. *Fertility and Sterility* 2011; 96: 428-33.
-

*Effects of Local Injection of 20% Acetylsalicylic
Acid on Peritoneal Endometriosis –
An Experimental Study in Rabbits*

Artigo



Effects of Local Injection of 20% Acetylsalicylic Acid on Peritoneal Endometriosis – An Experimental Study in Rabbits

Adriana Beatriz Barretto¹, Rafael Denadai¹, Ednelson Henrique Bianchi², Solange Peron Bueno Angela³ e Rogério Saad-Hossne¹

1 – Department of Surgery, Botucatu Medical School, Sao Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil

2 – Department of Experimental Surgery, Botucatu Medical School, Sao Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil

3 – Department of Pathology, Botucatu Medical School, Sao Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil

Conflitos de interesse: Nenhum

Auxílio financeiro: CAPES e FAPESP-Brasil

ABSTRACT

The objective of the present study was to estimate the effects of local injection of acetylsalicylic acid solution into intraperitoneal implants of autologous endometrium. The 30 adult female rabbits utilized were divided into 3 groups of 10 each, in which peritoneal endometriosis was induced. Twenty days after endometriosis induction the rabbits were randomized and according to group received the following treatments: physiological solution 0.9% for 20 days (Group 1, control), bicarbonate solution of acetylsalicylic acid 20% for 10 days (Group 2, treatment) and bicarbonate solution of acetylsalicylic acid 20% for 20 days (Group 3, treatment). The endometriosis foci were removed and prepared on slides for histological analysis. A computer program was utilized to analyze the slides and measure the total area of remaining endometriosis. Group 2 (10-day treatment) presented a significantly smaller endometriosis area than Group 1 (control) and Group 3 (20-day treatment); the area was not measured on account of lack of endometriosis residue in any of the 10 slides. The 20-day treatment with acetylsalicylic acid destroys the entire endometriosis area.

Keywords: AAS, Aspirin, Endometriosis, Experimental Study

INTRODUCTION

Endometriosis is a gynecological disease characterized by the presence of endometrial tissue beyond the uterine limits [1], afflicts young women of reproductive age at rates varying from 2 to 7%, and approaches 25% among women between 30 and 40 years of age [2]. A significant number of women are asymptomatic, and when symptomatic they involve pelvic pain with dysmenorrhea, back pain, dyschezia, painful urination and dyspareunia. In some cases it can cause infertility [3].

The diagnostic exam considered the gold standard for confirmation of the disease is the anatomopathological analysis of pieces obtained through invasive methods such as videolaparoscopy and laparotomy [3-4].

Currently, the first and best option is surgery, but the recurrence rate can approach 47% [5-7], followed by the use of drugs that can minimize the pains, but without eliminating the disease.

Based on the mechanism of more widespread development of the disease, identified by Sampson, which explains the appearance of endometriosis by presence of retrograde menstruation [8], primates provide the only animal models that can develop it spontaneously. However, models utilizing animals of this order have become limited by high maintenance cost and by innumerable ethical reservations [9].

Rat experimental models, despite not presenting spontaneous evolution of the lesion, have been widely used since being pioneered by Golan and Jones, both in 1984 [10-11]. The model consists of surgical resection of a portion of the uterus, cutting it into small pieces that are reintroduced, principally

by suture, into the peritoneal cavity [12]. According to a study [13] that evaluated the evolution of endometriosis lesions in female rabbits, all the endometriotic foci were visualized via laparoscopy 4 (four) weeks after the peritoneal implantation.

Acetylsalicylic acid (aspirin) was employed in the present study due to its generalized use and based on prior experimental studies we have gathered on the subject in which the authors demonstrate the effects of acetylsalicylic acid on normal tissues (liver and colonic mucosa of rabbits); they performed the injection of acetylsalicylic acid (2.5% and 5.0%) into the left lobe of the liver of rabbits and found no alterations in the clinical evolution, weight or biochemical levels, when compared to the control (saline solution); they applied 5% acetylsalicylic acid in the form of enema in colorectal mucosa of rabbits and also observed no alteration in the colonic mucosa, in relation to the control (saline solution). In two other studies, the authors found cytolytic and anti-tumoral effects (*in vitro* and *in vivo*) of acetylsalicylic acid. In the first, the studied VX-2 tumor cells incubated with acetylsalicylic acid (2.5% and 5%) progressively lost their viability so that at the end of a 30-minute period all the tumor cells were unviable [14]. The other study, evaluating the effects of 5% acetylsalicylic acid on VX-2 tumors implanted in rabbit livers, found a destruction of the experimental liver tumor, without alterations in the clinical evolution, weight or biochemical levels [15].

As a result of the research line of Saad-Hossne, the objective of the present work was to evaluate the effects of local injection of acetylsalicylic acid into peritoneal implants of autologous endometrium in an experimental rabbit model of endometriosis.

MATERIALS AND METHODS

The experimental protocol was approved by the Ethics Committee of the Botucatu School of Medicine of the State University of Sao Paulo (FMB-UNESP), under the number protocol 107/05. The rabbits were maintained according to the guidelines published in the *Care and Use of Laboratory Animals (Institute for Laboratory Animal Research, 1996)* and following the ethical principles of the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA).

Animals

Forty adult female virgin rabbits, weighing approximately 2500g were maintained in suitable cages under controlled conditions of light, humidity and temperature with *ad libitum* access to water and food. All surgical procedures were performed with the animals under general anesthesia through intravenous administration of 30 mg of sodium / kg of 3% pentobarbital.

The animals were anesthetized intravenously with a solution of ketamine 10% (1ml/kg) and xylazine 2% (0.5ml/kg).

Trichotomy of the abdominal wall was accomplished with the aid of slides followed by the application of antiseptic techniques. All the procedures were accomplished while wearing sterile latex gloves previously washed in 0.9% physiological serum [16].

Surgeries

After the anesthesia, the animals were submitted to laparotomy according to the technique described by Silva [13], beginning with a median longitudinal incision of the abdominal wall of approximately 2 cm, thus obtaining access to the pelvic cavity, where about 4 cm of the uterine horn was resected.

The uterine fragment was immersed in 0.9% physiological solution at 4°C for 4 minutes, after which a longitudinal incision was made in the resected uterine horn, delimiting a fragment measuring 5.0 X 5.0mm followed by separation of the endometrium from the other uterine layers, obtaining two fragments from each female rabbit.

The two endometriotic fragments were then sutured, one from the right side of the peritoneum and the other from the left side, with Vicryl® 6.0 thread, near the Alba line, at the point where the most vessels were observed, with the free endometrial face oriented toward the lumen of the abdominal cavity.

After the implantation the animals were maintained in captivity for 20 days, the period in which the viability and size of the graft are maximized: 100% and 2.5 cm, according to a study realized by Silva [13] and by the pilot performed before the initiation of the work.

On the 30th postoperative day, the female rabbits were submitted to a second laparotomy to visualize the lesions and establish the area of endometriosis lesions (width and length) by means of a pachymeter. The resulting data were submitted to statistical analysis (Student's *t* test).

The respective moments of sacrifice were at 10 and 20 days after medicament application, depending on the experimental group.

The animals were euthanized by administering a pentobarbital dose of 200mg/kg, by the intravenous route.

Test Solution

A test solution to obtain bicarbonate solution of 20% acetylsalicylic acid was prepared by diluting 1000mg of acetylsalicylic acid in 5ml of 10% sodium bicarbonate. The solution was prepared 10 minutes prior to its use.

RESULTS

Group 1 – Animals treated with physiological solution (control) and sacrificed 20 days after treatment

Macroscopically, all the implants formed cystic structures, half of which were hemorrhagic; this aspect was confirmed by microscopy which evidenced cystic formation on all the slides, with columnar epithelial lining in the glandular grouping associated with a stroma of fusiform cells: endometrial tissue cyst. In 8 of the 10 slides, the endometrium was in a proliferative phase – regions with innumerable mitoses and a small quantity of cellular apoptoses were noted, which demonstrated that the endometrial tissue was growing freely in this period (figure 1).

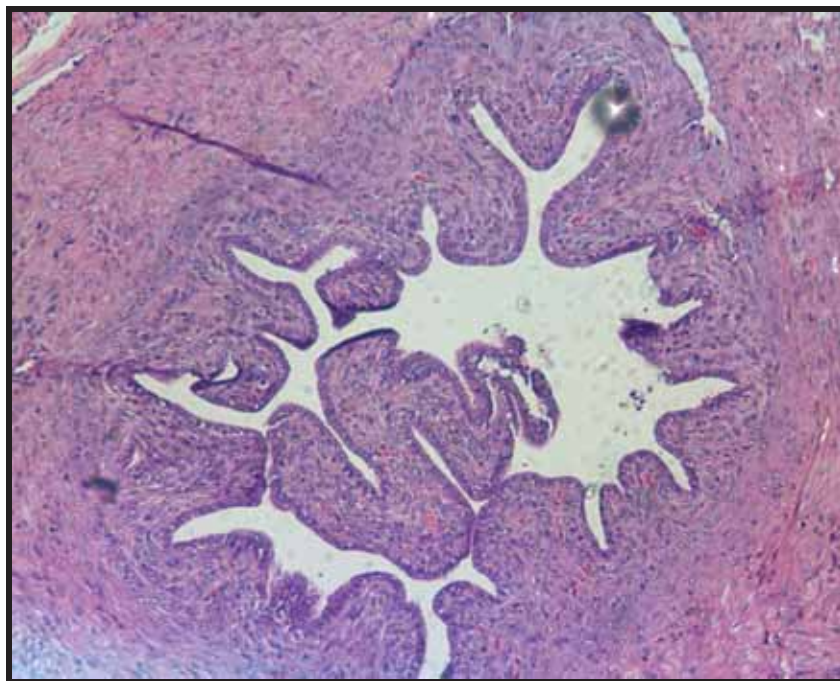


Figure 1 - Group 1 (control) – endometriosis developed 10 days after treatment with 0.9% physiological solution. Note peritoneal endometriosis implants with preserved glands and stroma permeated by mild lymphoplasmacytic inflammatory infiltrate and rare eosinophils. (hematoxylin-eosin; original magnification 100x).

Group 2 – Animals treated with solution of acetylsalicylic acid (20%) and sacrificed 10 days after treatment.

All the implants observed at the moment of re-operation had a hemorrhagic aspect and were adhering to the content of the endometrial cavity, hampering the visual identification as to which macroscopic aspect possessed the implant.

Microscopy showed small cystic foci of endometrial tissue on all the slides, constituting a smaller aspect than that of the control group, accompanied by hemorrhage, fibrosis, inflammatory process and apoptosis, without exceptions (figure 2).

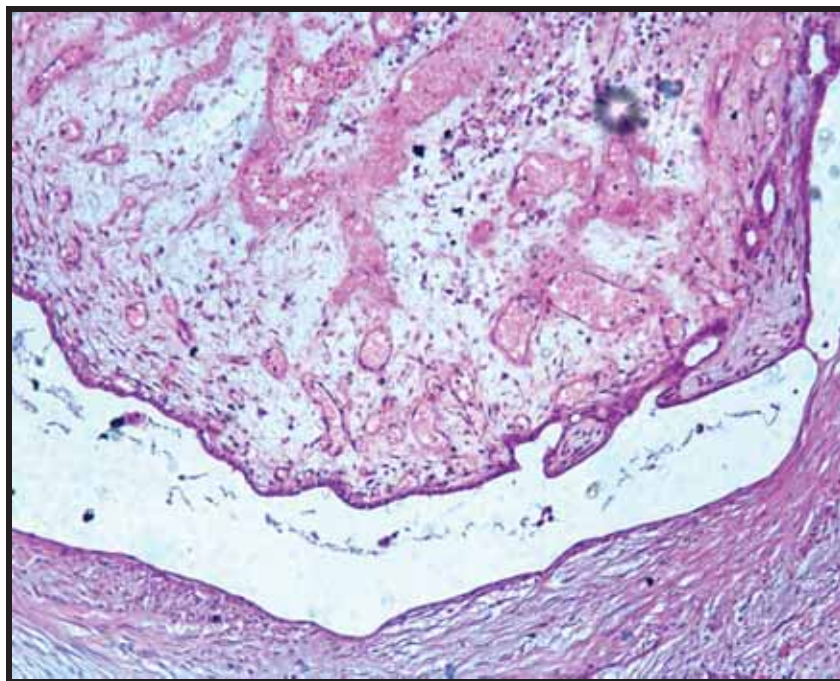


Figure 2 - Group 2 (treatment) – endometriosis developed 20 days after treatment with bicarbonate solution of 20% acetylsalicylic acid. Note areas of epithelium and stroma partially preserved permeated by intense lymphocytic and eosinophilic infiltrate. (hematoxylin-eosin; original magnification 100x).

Group 3 – Animals treated with solution of acetylsalicylic acid (20%) and sacrificed 20 days after treatment

Macroscopically the implants of this group were also difficult to visualize, presenting adherence to the endometrial cavity content.

Microscopy was unable to locate cystic formation of endometriosis or evidence of inflammatory process on any of the slides, which presented only large areas of necrosis and apoptosis.

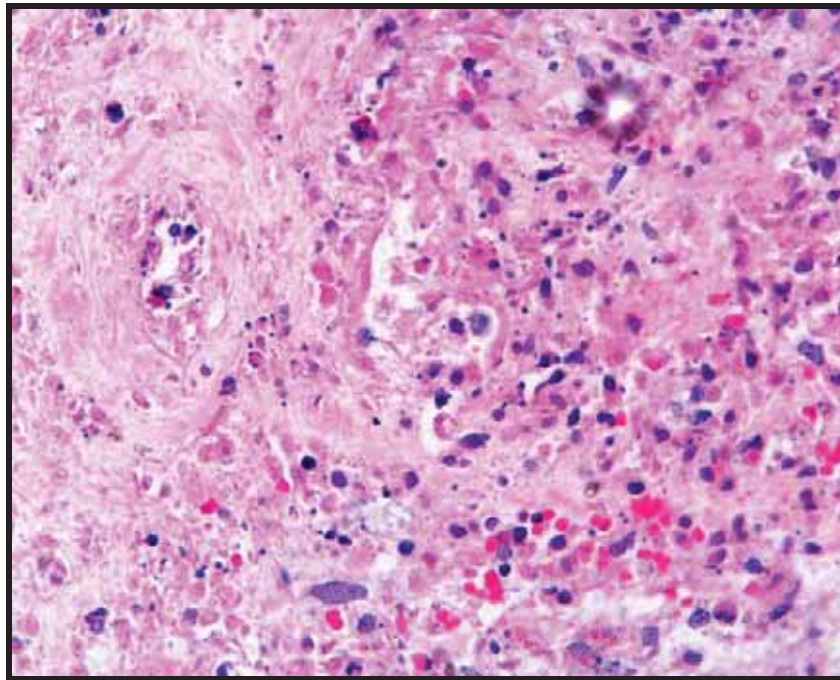


Figure 3 - Group 3 Slides (treatment) – necrosis 20 days after treatment with bicarbonate solution of 20% acetylsalicylic acid. Note intense inflammatory infiltrate lymphoplasmacytic, glandular and stromal collapse, abundant apoptotic bodies and extensive necrosis. (hematoxylin-eosin; original magnification 400x).

Statistical Analysis

The areas of groups 1 (control) and 2 (10-day treatment) were measured in mm and the area with endometrial tissue as a percentage. Statistical analysis was accomplished through the Student's t test, which found a statistically significant inter-group difference in both area and endometrial tissue, showing a large diminution of endometriotic foci (Table 1).

In Group 3 (20-day treatment), the absence of remaining endometriosis on any of the 10 slides analyzed precluded the measurement of lesion sizes, thus excluding this parameter from the statistical test.

Table 1 - Size of endometriotic implants: macroscopically, microscopically and as a percentage of endometrial tissue.

Control Group			Treatment Group (10 days)		
Macroscopy		Microscopy	Macroscopy		Microscopy
Dimensions (mm)	Area (mm ²)	Endometrial Tissue (%)	Dimensions (mm)	Area (mm ²)	Endometrial Tissue (%)
130x59	7670	91	58x45	2610	7
97x73	7081	81	82x50	4100	10
125x72	9000	95	68x45	3060	3
100x76	7600	86	82x60	4920	5
102x78	7956	94	91x56	5096	9
84x65	5460	71	59x47	2773	6
75x62	4650	73	60x57	3420	7
88x77	6776	77	71x43	3053	3
96x69	6624	79	72x49	3528	4
98x80	7840	86	70x47	3290	7
M±SD	7065±1268	83±8	M±SD	3585±857	6±2

M = Mean; SD = Standard deviation; p<0,0001 Teste T Student

DISCUSSION

Based on prior studies [15,17] that utilized different periods of evaluation (24, 48 and 72 hours and 7, 10 and 14 days, respectively) after the therapeutic intervention with acetylsalicylic acid, with an even earlier study utilizing 24 hours and 10 days respectively and a drug concentration of 5% [16], we decided to estimate the effects of acetylsalicylic acid at two distinct moments, namely 10 and 20 days after application of the drug in question, whose concentration was also altered and raised to 20%. The quantity injected into each animal in this study was also based on previous studies [15,17].

In prior studies with different treatments, such as copper vapor laser [18], simvastatin [19], dexamethasone [20] and *Uncaria tomentosa* (cat's claw) [21] were also tested on experimental animals, presenting results in the form of destruction of a portion of the endometrial foci, impeding their growth after the use of the drug and diminution of the endometriotic area, respectively. Similarly, a study by SIQUEIRA et al. 2011 [16], which utilized a solution of 5% acetylsalicylic acid, presented a positive but not completely satisfactory response in relation to the objective of the work. The foci of endometriosis were only partially destroyed [16]. In the present study it was verified what would occur when the solution concentration was increased (to 20%) in a similar period (10 days) and in a longer treatment interval (20 days).

The responses indicated that 10 days after treatment the implants obtained results similar to those reported by SIQUEIRA et al., 2011[16], in a study that assessed the effect 10 days after treatment with a 5% solution of acetylsalicylic acid, which leads us to infer that a 15% increase of the dose is

not significant. However, in Group 3, treated for 20 days with 20% acetylsalicylic acid solution, the response was an elimination of the endometrial areas, leaving only necrosis in their place.

Also evaluated was the induction of apoptosis in all samples. Group 1 (control) presented some signs of apoptotic cells on the 10 slides; Group 2 (10-day treatment) showed a large number of cells in this stage on all the slides while Group 3 (20-day treatment) all the slides revealed apoptotic cells without a trace of endometriosis, leaving only tissue necrosis. Other authors [16,22,23] also evidenced that AAS at 5% and other drugs induce apoptosis in endometrial foci.

This study leads us to generate a new approach, a new experimental model to study this disease without requiring an invasive method to accomplish local injection of the drug.

CONCLUSION

Based on the method and the experimental model employed, in light of the established aim, we reach the following conclusions:

- In the group evaluated after 10 days of treatment, the bicarbonate solution of 20% acetylsalicylic acid caused hemorrhage, fibrosis, inflammatory process and apoptosis of the endometrial foci.
- After 20 days, there was complete elimination of endometrial tissue, the existence of inflammatory process infiltrations, apoptosis and large areas of necrosis.

Therefore, it is concluded that the bicarbonate solution of 20% acetylsalicylic acid within 10 days causes partial destruction of endometrial foci and in 20 days their total destruction. In other words, bicarbonate solution of acetylsalicylic acid is efficacious in treating experimental peritoneal endometriosis in autologous female rabbits, in a period of 20 days.

REFERENCES

1. Filigheddu N, Gregnanin I, Porporato PE, Surico D, Perego B, Galli L, Et al. Differential expression of microRNAs between eutopic and ectopic endometrium in ovarian endometriosis. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*. 2010.
 2. Monteforte CA, Nava C, Carnevale GP. Preliminary results of therapeutical association of GnRH and α -interferon in the treatment of pelvic endometriosis. In: Coutinho EM, Spinola P, deMoura LH, editors. *Progress in the Management of Endometriosis*. London, England: Parthenon Publishing. 1995; 305–8.
 3. Amaral VF, Dal Lago EA, Kondo W, Souza LC, Francisco JC. Development of an experimental model of endometriosis in rats. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*. 2009; 36: 250-5.
 4. Schor E, Freitas V, Soares Junior JM, Simões MJ, Baracat EC. Endometriose: Modelo experimental em ratas. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*. 1999; 21: 281-4.
 5. Hart RJ, Hickey M, Maouris P, Buckett W. Excisional surgery versus ablative surgery for ovarian endometriomata. *Cochrane Database Revisão Sistemática*. 2008.
-

6. Catenacci M, Sastry S, Falcone T. Laparoscopic surgery for endometriosis. *Clin Obstet Gynecol.* 2009; 52: 351–61.
 7. Contran RS, Kumar V, Collins T. The female genital system and breast. In: Robbins SL, editor. *Basic Pathology.* 8th ed. Philadelphia: Saunders. 2007; 710–1.
 8. Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am Obstet Gynecol.* 1927; 14: 422–69.
 9. 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: 2092-6.
 10. Golan A, Winston RM, Dargenio R. Experimental endometriosis: a microsurgical animal model in rats. *Isr J Med Sci.* 1984; 20: 1094-6.
 11. Jones RC. The effect of a luteinizing hormone releasing hormone (LRH) agonist (Wy-40,972), levonorgestrel, danazol and ovariectomy on experimental endometriosis in the rat. *Acta Endocrinol.* 1984; 106: 282-8.
 12. Grümmer R. Animal models in endometriosis research. *Human Reproduction Update.* 2006; 12: 641–9.
-

13. Silva JCR, Silva ANJSR, Coltro OS, Garcia SB, Reis FC, Nogueira AA. Experimental endometriosis model in rabbits with follow-up of the lesions. *Revista Brasileira Ginecologia e Obstetrícia*. 2004; 26: 715-9.
 14. Saad-Hossne R, Prado RG, Hossne WS. Efeito da solução de ácido acetilsalicílico e de ácido acético sobre carcinoma vx-2. *Análise in vitro*. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2006; 21: 1514.
 15. Saad-Hossne R, Prado RG, Hossne WS. Effects of acetylsalicylic acid and acetic acid solutions on VX2 liver carcinoma in rabbits: in vivo analysis. *Acta Cir Bras*. 2007; 22: 299–308.
 16. Siqueira JM, Barretto AB, Saad-Hossne R. Treatment of endometriosis with local acetylsalicylic acid injection: Experimental study in rabbits. *The Journal of Minimally Invasive Gynecology*. 2011; 18: 800-6.
 17. Saad-Hossne R, Prado RG, Hossne WS. Efeito da solução de ácido acetilsalicílico e de ácido acético em fígado de coelhos. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2004; 19: 677-86.
 18. Mieli MPA, Oliveira W, Osaka JT, Sandoval MP, Pereira PRB, Tolosa EMC. Tratamento da endometriose induzida cirurgicamente em coelhas pelo laser de vapor de cobre (LVC). *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2002; 17: 312-6.
 19. Neto JN, Torres OJM, Borges MOR, Coelho TM, Nascimento AGPAC, Nunes Júnior JNN, Esteves GL. Changes in the volume and histology of focus of endometriosis in rats treated with sinvastatin. *Rev Brasileira Ginecologia e Obstetrícia*. 2007; 29: 396-402.
-

20. Batista APC, Medeiros PL, Teixeira AAC, Teixeira VW. Histochemical and morphometric analysis of endometriotic lesions induced in female rats and treated with dexamethasone. *J Bras Patol Med Lab.* 2009; 45: 147-53.
 21. Neto J, Coelho TM, Aguiar GC, Carvalho LR, Araújo AG, Girão MJ, Schor E. Experimental endometriosis reduction in rats treated with *Uncaria tomentosa* (cat's claw) extract. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology.* 2011.
 22. Ferrero S, Abbamonte LH, Anserini P, Remorgida V, Ragni Nicola. Future perspectives in the medical treatment of endometriosis. *Obstetrical and Gynecological Survey.* 2005; 60: 817-26.
 23. Olivares C, Ricci A, Bilotas M, Barañao RI, Meresman G. The inhibitory effect of celecoxib and rosiglitazone on experimental endometriosis. *Fertility and Sterility* 2011; 96: 428-33.
-