

# Dosagem de Óxido Nítrico (NO) no Fluido Peritoneal e no Soro de Pacientes com Endometriose

## Research of Nitric Oxide in Peritoneal Fluid and Serum of Women With Endometriosis

**Coelho, Rogéria Teixeira<sup>1</sup>; Souza, Maria do Carmo Borges<sup>1</sup>; Dias, Patricia Fernandes<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Instituto de Ginecologia da UFRJ

<sup>2</sup>Departamento de Farmacologia Clínica da UFRJ

Endereço da autora: eydona@uol.com.br

Recebido: 27/11/2003

Avaliado e aceito: 16/12/2003

### Abstract

*The purpose of this study was to investigate the presence of Nitric Oxide (NO) in the pathogenesis of inflammation in endometriosis. The peritoneal fluid and the serum from 65 patients undergoing laparoscopy because pathologies including endometriosis were examined from March 1999 to August 2000. The peritoneal fluid was aspirated from the Douglas pouch and the serum was frozen. The NO production detected through spectrophotometry pointed to increased rates in early stages endometriosis (stage I ASRM- revised).*

**Key words:** Nitric Oxide/Inflammation/Endometriosis/Infertility.

### Introdução

Por mais de 70 anos, várias teorias têm sido aventadas para explicar a patogênese da endometriose. A partir da década de 60, com o advento da laparoscopia e o desenvolvimento das técnicas de diagnóstico endoscópico, tornou-se cada vez mais freqüente seu diagnóstico e, conseqüentemente, surgiram várias possibilidades para sua classificação e tratamento. Considerando o caráter imunológico e inflamatório da endometriose, a função reguladora do fluido peritoneal, o fenômeno de vasodilatação peritoneal intensa

mantida e um ambiente peritoneal favorável à implantação das células endometriais que refluem através das tubas ciclicamente, pode-se entender a presença de muitos mediadores químicos envolvidos neste complexo mecanismo de fisiopatogênese da doença.

O NO é um gás liberado a partir da reação de oxigenação do aminoácido L-arginina pelas óxido nítrico-sintases (NOS), em pequenas quantidades em condições fisiológicas e, em maiores quantidades em condições patológicas, como no processo inflamatório e choque séptico. Reconhecido a partir de 1980 como fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF), de imediato podemos questionar se não seria um dos mediadores envolvido no processo inflamatório e de vasodilatação que a endometriose apresenta.

O NO é sintetizado a partir do nitrogênio guanidínico do aminoácido L-arginina por enzimas chamadas de NO-sintases. Atualmente, baseando-se em dados de purificação das proteínas, seu seqüenciamento e clonagem de genes, foram caracterizados três tipos de óxido nítrico-sintases (NOS). Uma delas é característica do endotélio (chamada de eNOS) e a outra do tecido cerebral (bNOS); as duas liberam pequenas quantidades de NO por curtos períodos, em resposta a estímulos de receptores ou estímulos físicos. A terceira enzima é chamada de induzida (iNOS), porque sua síntese necessita ser induzida nas células por uma varie-

dade de fatores, mais comumente lipopolissacarídeos bacterianos (LPS) e/ou citocinas (interferon- $\gamma$ , interleucina-1, fator de necrose tumoral- $\alpha$ ).

O objetivo deste trabalho é avaliar a dosagem do NO no fluido peritoneal e no soro de pacientes submetidas à laparoscopia por diferentes indicações, procurando verificar a presença desta substância em portadoras de endometriose.

## Material e Método

Trabalho prospectivo, realizado com 65 pacientes submetidas à laparoscopia no período de março de 1999 a agosto de 2000; parte delas (em número de 41) pertence ao Serviço de Videoendoscopia da Clínica São Paulo, em Nova Iguaçu (CEVESP), no Estado do Rio de Janeiro, sob a direção do Dr. Cláudio Crispi; as demais pacientes (em número de 24) são provenientes de clínica privada.

O protocolo da pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ginecologia da UFRJ. Após a assinatura do consentimento informado, as pacientes responderam a questionário sobre utilização de medicações, estresse, cirurgias prévias.

Durante o exame foi realizada a colheita do fluido peritoneal (fundo-de-saco de Douglas) e do soro das pacientes, para dosagem de óxido nítrico (NO), no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Óxido Nítrico da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

## Crítérios de Inclusão

Indicações para a laparoscopia como investigação de dor pélvica crônica, miomatose uterina, cisto ovariano, suspeita de endometriose, hidrossalpinge, prenhez tubária íntegra ou pesquisa de esterilidade, excluindo-se infecção sistêmica ou localizada na cavidade abdominal (peritonite), aderências pélvicas e/ou abdominais intensas que dificultassem a introdução do trocarte ou da agulha para a colheita do material, contaminação da cavidade abdominal e/ou pélvica com sangue (hemorragia interna ou acidente de punção) durante a laparoscopia.

## Coleta do Material

O sangue venoso da paciente foi colhido no pré-operatório imediato. Utilizou-se hemovácuo sem anticoagulante no volume de 10 ml. O tubo repousava em estante durante 30 minutos aguardando-se a retração do coágulo, seguida de centrifugação por 10 minutos a velocidade de 1.200 rpm. O soro foi armazenado em *eppendorf*® em *freezer* até o momento da dosagem do NO. Na laparoscopia, imediatamente após a segunda punção cirúrgica e o inventário da

cavidade abdominal, introduziu-se agulha de punção, sendo colhido fluido peritoneal de fundo-de-saco posterior; na ausência de conteúdo líquido na cavidade, realizou-se lavado com 20 ml de soro fisiológico, posteriormente colhido com agulha e armazenado em tubos de *eppendorf*® sem anticoagulante, na dosagem de 10 ml. Este material foi congelado até o momento da dosagem. no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Óxido Nítrico do Departamento de Farmacologia Básica e Clínica.

## Preparo do Material e Dosagem do Óxido Nítrico

A metodologia utilizada para a dosagem do NO foi adaptada a partir de Cole (1968) e Bartholomew (1984). A técnica consiste em converter todo o nitrato existente na amostra analisada a nitrito, que posteriormente é quantificado por espectrofotometria. Inicialmente se cresce a *E. coli* em meio próprio de anaerobiose, a fim de que a bactéria expresse a enzima nitrato redutase.

1. Soluções utilizadas: Trypcase Soy Broth 30; molibdato de amônio 1,24 mg; nitrato de potássio 10,1 g; mistura mineral 5 ml; água do Nanopure qsp 1.000 ml.
2. Autoclavar 15 minutos a 121°C, adicionar glucose (25% w/v, em água, esterilizada por filtração) na quantidade de 16 ml. Crescer a bactéria no meio de cultura citado anteriormente a 37°C, por 18 a 20 horas, em anaerobiose.
3. Coletar o meio e centrifugar (6.000 g, 15 minutos). Lavar a bactéria com PBS até obter reação negativa para Griess (realizar sete a oito lavagens da bactéria). Diluir a bactéria a fim de obter concentração de 150 mg/ml, e armazenar em alíquotas a -70°C ou em N<sub>2</sub> líquido.
4. Desproteínização: em um *eppendorf*® com 150 ml de soro ou líquido peritoneal, colocar ZnSO<sub>4</sub> 15 ml, vortexar e deixar em repouso por 10 minutos a 4°C, adicionar 3 ml de NaOH 2.5N, vortexar e deixar em repouso por mais 10 minutos a 4°C, vortexar, centrifugar por 10 minutos, 10.000 g a 4°C.
5. Após a desproteínização, as amostras foram submetidas às incubações necessárias para a conversão do nitrato em nitrito, seguindo-se o seguinte protocolo:
  - (a) Como reagentes utilizar fosfato de sódio 0,5 M com pH 7.2, e formato de amônio 2,4 M com pH 7.2;
  - (b) Diluir uma alíquota da bactéria (100  $\mu$ l) para 1 ml de PBS;
  - (c) Em *eppendorffs*® adicionar: 15  $\mu$ l de fosfato de sódio, 15  $\mu$ l de formato de amônio, 150  $\mu$ l de amostra ou de padrão e 10  $\mu$ l de bactéria diluída, incubar a 37°C por duas horas, centrifugar 10.000 g por cinco mi-

nutos a 20° C. Retirar 100 µl, transferir para placa de 96 poços. Acrescentar 100 µl de reagente de Griess, e após 10 minutos ler a 540 nM. Na hora do uso, misturar 1:1 e usar imediatamente.

6. Os padrões de diluição de nitrato de sódio e de nitrito de sódio para a curva padrão são: 0/2,5/5/10/25/50/75/100 e 150 µM.

O reagente de Griess compreende sulfanilamida 1% (w/v) em H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 5% (v/v) e alfa-naftiletilenodiamina 0,1% em água.

Curva Padrão da Amostra		
Concentração	Valor	Valor Médio
2.500	0,041	0,041
5000	0,200	0,200
10.000	0,293	0,293
25.000	0,443	0,443
50.000	0,634	0,634
75.000	0,714	0,714
100.000	0,785	0,785
150.000	0,954	0,954
200.000	1,287	1,287

Menor valor médio: 0,041.

Maior valor médio: 1,287.

A análise estatística foi realizada através dos testes de comparação: de *Mann-Whitney*, para comparação dos níveis do NO entre dois grupos independentes; *Qui-quadrado* ou o teste exato de *Fisher*, quando o teste de qui-quadrado não pôde ser avaliado. O critério de determinação de significância foi o nível de 5%, ou seja, se o valor de *p* do teste for menor ou igual a 0,05, então existe significância estatística.

## Resultados

A Tabela 1a fornece a média, o desvio padrão (DP), a mediana, o mínimo e o máximo das variáveis numéricas para o total da amostra (n = 65).

Os Gráficos 1 e 2 mostram a média da dosagem de NO no soro e no fluido em 100% da amostra.

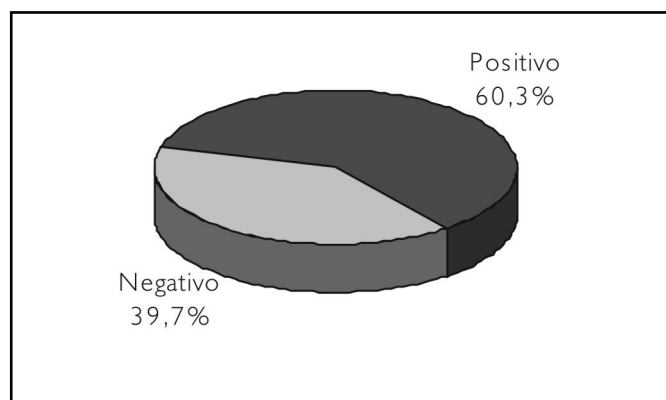


Gráfico 1 – NO no soro.

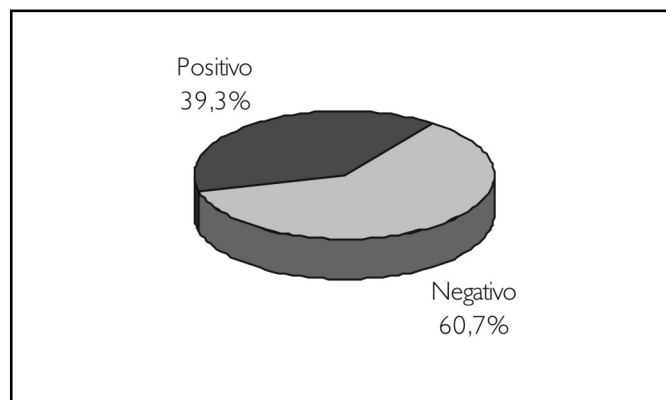


Gráfico 2 – NO.

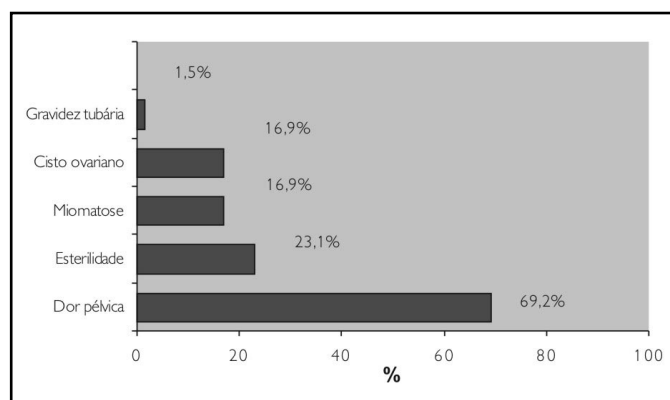
Tabela 1a Análise Descritiva das Variáveis Numéricas para o Total da Amostra						
Variável	N	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo
Idade (anos)	65	33,02	8,40	33	12	58
Menarca (anos)	64	12,17	1,43	12	9	16
No soro	38	38,48	33,19	28,05	1,6	130,2
No fluido	22	38,30	39,73	19,5	4,7	148,3

DP = Desvio Padrão.

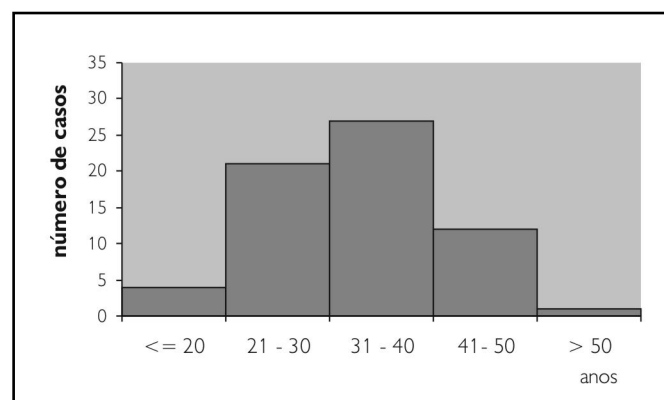
**Tabela Ib**  
**Frequência e Percentual das Variáveis Categóricas para o Total da Amostra**

<i>Variável</i>	<i>Categoria</i>	<i>n</i>	<i>%</i>
Cirurgia prévia	Sim	37	56,9
ACO	Sim	24	36,9
Estresse	Sim	40	61,5
Endometriose	Ausente	19	29,2
Endometriose	Presente	46	70,8
Estágios	Estágio I	23	35,4
	Estágio II	11	16,9
	Estágio III	8	12,3
	Estágio IV	4	6,2
NO no soro	Positivo	38	60,3
NO no fluido	Positivo	22	39,3
Dor pélvica	Sim	45	69,2
Esterilidade	Sim	15	23,1
Miomatose	Sim	11	16,9
Cisto ovariano	Sim	11	16,9
Gravidez tubária	Sim	1	1,5
Medicação	Presente	25	38,5
Anticonvulsivante	Sim	3	
Anticoncepcional	Sim	3	
Para endometriose	Sim	6	
Antiinflamatório	Sim	12	
Anti-hipertensivo	Sim	3	
Antibióticos	Sim	2	
Antianêmico	Sim	3	
Antitireoideano	Sim	1	

DP = Desvio Padrão



**Gráfico 3** – Motivo da cirurgia.



**Gráfico 4** – Distribuição da amostra pela faixa etária.

### *Correlação entre NO Versus Medicação*

A Tabela II fornece a média, o desvio padrão (DP), a mediana, o mínimo e o máximo para NO (soro e fluido) segundo a medicação.

Obs.: As categorias somam mais de 100% porque algumas pacientes apresentaram mais de um motivo de cirurgia.

**Tabela II**  
**Análise Descritiva das Variáveis Numéricas Segundo a Medicação**

Variável	Medicação	n	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	p valor
No soro	Ausente	27	40,07	33,31	28,1	3,9	130,2	0,39
	Presente	11	34,56	34,16	24,1	1,6	90	
No fluido	Ausente	14	35,68	46,03	15,55	4,7	148,3	0,20
	Presente	8	42,88	27,60	39,9	8,4	90	

DP = Desvio Padrão.

Observou-se que não existe diferença significativa no NO do soro ( $p = 0,39$ ) e do fluido ( $p = 0,20$ ) entre as pacientes com e sem medicação.

#### *Correlação entre NO Versus Endometriose*

A Tabela III fornece a média, o desvio padrão (DP), a mediana, o mínimo e o máximo para NO (soro e fluido) segundo a endometriose.

Observou-se que existe diferença significativa no NO do soro ( $p = 0,0005$ ) e no do fluido ( $p = 0,0009$ ) entre as pacientes com e sem endometriose. Isto significa que as pacientes com endometriose apresentaram NO do soro e do fluido significativamente maior que as sem endometriose.

#### *Correlação entre NO Versus Cirurgia Prévia*

A Tabela IV fornece a média, o desvio padrão (DP), a mediana, o mínimo e o máximo para NO (soro e fluido) segundo a cirurgia prévia.

Observou-se que existe diferença significativa no NO do soro ( $p = 0,01$ ) entre as pacientes com e sem cirurgia prévia. Isto significa que as pacientes com cirurgia prévia apresentaram NO do soro significativamente menor que as sem cirurgia prévia. Não existe diferença significativa no NO do fluido ( $p = 0,37$ ) entre as pacientes com e sem cirurgia prévia.

**Tabela III**  
**Análise Descritiva das Variáveis Numéricas Segundo a Endometriose**

Variável	Endometriose	n	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	p valor
No soro	Ausente	13	15,75	10,38	13,3	3,9	37	0,0005
	Presente	25	50,30	34,91	39,7	1,6	130,2	
No fluido	Ausente	7	9,41	3,82	8,4	4,7	14,6	0,0009
	Presente	15	51,77	41,82	33,1	12	148,3	

DP = Desvio Padrão.

**Tabela IV**  
**Análise Descritiva das Variáveis Numéricas Segundo a Cirurgia Prévia**

Variável	Cirurgia Prévia	n	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	p valor
No soro	Não	20	47,87	32,22	38,25	7,1	121	0,01
	Sim	18	28,04	31,90	16,05	1,6	130,2	
No fluido	Não	10	30,11	29,47	15,55	5,6	89,9	0,37
	Sim	12	45,12	46,80	26,15	4,7	148,3	

DP = Desvio Padrão.

### Correlação entre ACO Versus Endometriose e Dor Pélvica Crônica

Os Gráficos 5 e 6 fornecem a frequência e o percentual de endometriose segundo o uso de ACO e a presença de estresse, respectivamente.

Observou-se que não existe associação significativa entre a presença de endometriose e o uso de ACO ( $p = 0,26$ ). Das 24 pacientes que tomavam ACO, 62,5% apresentavam endometriose, contra 75,6% que não tomavam ACO (Gráfico 5).

Existe associação significativa entre a presença de endometriose e a presença do estresse detectado à resposta simples “sim” ou “não” durante a anamnese, no entendimento de cada paciente ( $p = 0,038$ ). Isto significa que as pacientes com estresse apresentaram proporção de endometriose (80%) significativamente maior que as sem estresse (56%).

### Níveis de NO (Soro e Fluido) nos Quatro Estágios da Endometriose

A Tabela V fornece a média, o desvio padrão (DP), a mediana, o mínimo e o máximo para NO (soro e fluido dos

dos em  $\mu\text{M}$ ) segundo o estágio da endometriose. Esta análise está comprometida devido ao pequeno número da amostra nos estágios graves (III e IV).

O Gráfico 7 fornece a frequência e o percentual de dor pélvica segundo o uso de ACO.

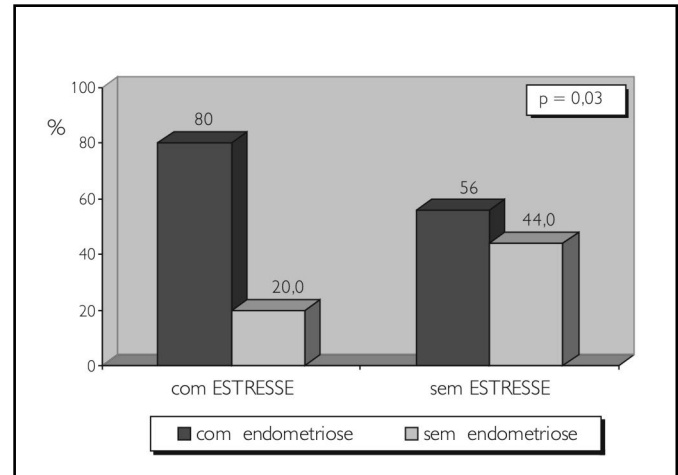


Gráfico 6 – Endometriose versus estresse.

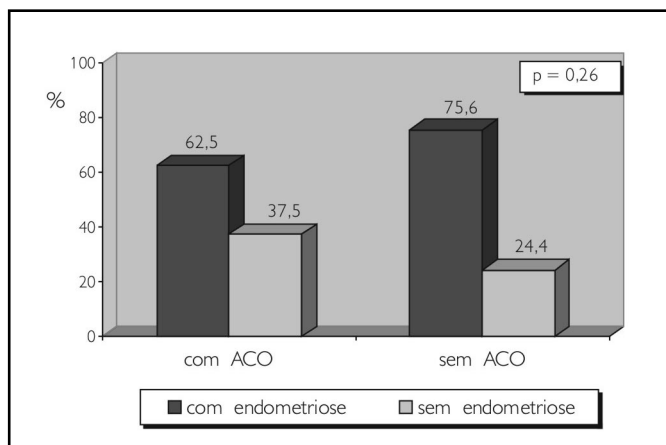


Gráfico 5 – Endometriose versus ACO.

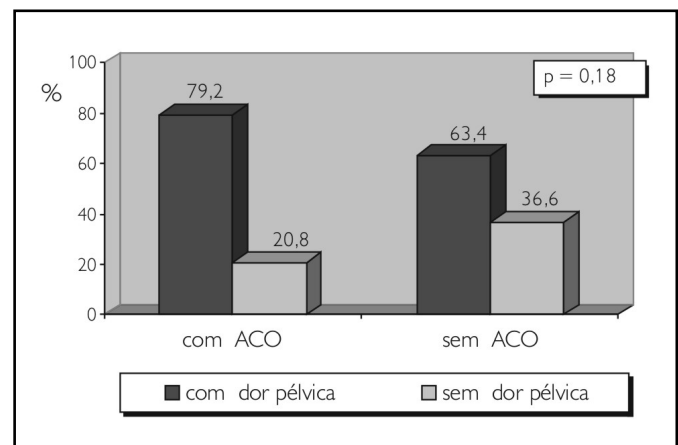


Gráfico 7 – Dor pélvica crônica versus ACO.

**Tabela V**  
**Análise Descritiva do NO Segundo o Estágio da Endometriose**

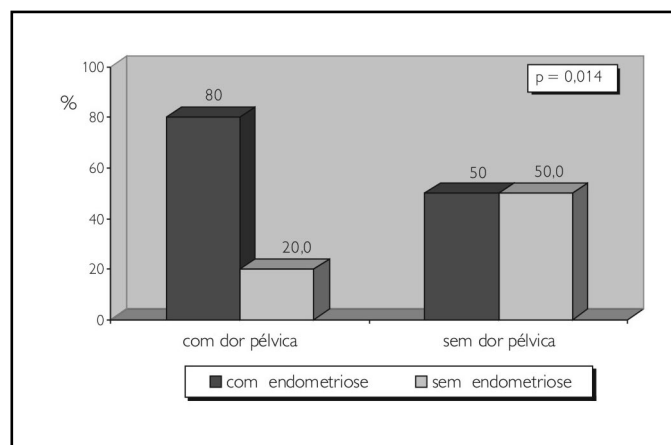
Variável	Estágio	n	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo
No soro	I	12	68,18	38,38	64,2	10,6	130,2
	II	6	31,02	18,71	35,85	1,6	55,3
	III	4	36,10	27,31	33,9	5,5	71,1
	IV	3	36,27	28,26	20	19,9	68,9
No fluido	I	8	64,85	50,20	61,4	12	148,3
	II	1	29,90	—	29,9	29,9	29,9
	III	5	41,10	29,88	33,1	16,5	90
	IV	1	22,40	—	22,4	22,4	22,4

Correlação entre ACO versus dor pélvica.

Não existe associação significativa entre a presença de dor pélvica e o uso de ACO ( $p = 0,18$ ). Das 24 pacientes que tomavam ACO, 79,2% apresentavam dor pélvica, contra 63,4% que não tomavam ACO.

### Correlação entre Endometriose e Dor Pélvica Crônica

O Gráfico 8 fornece a frequência e o percentual de endometriose segundo a presença de dor pélvica.



**Gráfico 8 – Endometriose versus dor pélvica.**

Há associação significativa entre a presença de endometriose e a presença de dor pélvica ( $p = 0,014$ ). Das 45 pacientes com dor pélvica, 80% apresentavam endometriose, contra 50% que não apresentaram dor.

### Discussão

Do ponto de vista fisiológico, o NO é produzido pelas NO-sintases constitutivas, endotelial e neuronal, em pequenas quantidades, que têm ações inclusive nas contrações do miométrio subendometrial, variando de acordo com a fase do ciclo (Mohamed, 1995), aumentando na fase proliferativa e periovulatória, com diminuição na fase secretora, provavelmente por ação sinérgica entre a progesterona e o NO. Yallanpali (1994) acredita, inclusive, que o NO poderia regular a contração uterina durante a gravidez. É bem conhecido que existem fenômenos imunes envolvidos na endometriose e na adenomiose, como aumento da atividade de macrófagos ou diminuição da atividade “*T cell*”. Estes fatos sugerem que várias citocinas secretadas pelas células endometriais, células imunes ou macrófagos estimulariam as iNO-sintases a liberar NO (Otta, 1998). Acredita-se que células imunes, especialmente leucócitos polimorfonucleares e macrófagos, produzam radicais livres para combater patógenos.

Concentrações elevadas de citocinas de células imunes (mais provavelmente de macrófagos ativados) têm sido encontradas no fluido peritoneal de mulheres com endometriose (Oosterlynck *et al.*, 1994; Ho *et al.*, 1996). Especialmente nos estágios iniciais, essas concentrações estariam associadas com o aumento do número de lesões vermelhas (ativas), e estas poderiam ser as produtoras das citocinas (Harada *et al.*, 1999).

Acredita-se que as manifestações iniciais da endometriose sejam formadas por lesões subclínicas ou não-coloridas (brancas), de baixa atividade mitótica e pobre vascularização estromal, correspondendo à forma quiescente da doença (Donnez, 1992; Brosens, 1994). Lesões vermelhas (vesículas vermelhas, lesões polipóides, lesão em chama-de-vela) são as formas mais ativas (Russel, 1986; Nisolle, 1993), mais agressivas, que poderiam progredir para as chamadas lesões pretas ou típicas, consideradas como implantes profundos, cercadas por fibrose (Donnez, 1995). A história de operações prévias (Tabela IV), que mostrou ser significativa a dosagem de NO apenas no soro, com ausência de alterações no fluido sugere uma diferença entre a resposta do NO ao processo de agressão agudo ou crônico.

Recentes estudos (Yoshida *et al.*, 1998) demonstraram que a angiogênese induzida pelo TGF- $\alpha$  é mediada indiretamente através de interleucina-8 e fator de crescimento endotelial vascular. A IL-8 é também um potente agente angiogênico e quimiotático para neutrófilos. Porque a angiogênese é um degrau fundamental para o estabelecimento das lesões endometrióticas, a IL-8 pode ter um papel importante na progressão da endometriose. Dada a importância dos macrófagos tanto em iniciar a imunidade celular ao apresentar antígenos para as células T CD4+ como em eliminar células-alvo pela produção de NO, muitos autores presumiram que as concentrações peritoneais de NO deveriam estar aumentadas nas mulheres com endometriose.

Observamos que a média do NO no soro e no fluido daquelas pacientes em estágio inicial foi, respectivamente: no soro, 68,18  $\mu\text{M}$  (estágio I) e 31,02  $\mu\text{M}$  (estágio II); no fluido, 64,85  $\mu\text{M}$  (estágio I) e 29,90  $\mu\text{M}$  (estágio II). Os dados sugerem uma predominância nos estágios iniciais estatisticamente significativa, onde a reação inflamatória é mais expressiva. Nos estágios avançados (Tabela V) não foi possível aplicar estudo estatístico devido ao número pequeno da amostra.

Radicais livres do oxigênio têm sido implicados na patogênese de muitas doenças humanas. Em algumas condições,

estes radicais têm função significativa no processo de formação da doença. O ferro tem função vital, facilitando a formação do ânion  $O^2$  e do radical  $OH$  altamente tóxico. Estes radicais livres danificam as proteínas, os carboidratos, os nucleotídeos e os lipídios, resultando em dano tecidual e formação de aderências (Ho *et al.*, 1997). Gutteridge (1986) concorda com a importância da liberação do ferro da hemoglobina durante o processo da menstruação retrógrada dentro do fluido peritoneal (as mulheres com endometriose podem ter mais menstruação retrógrada e favorecer esta reação formadora de radicais livres). Zeller (1987) mostrou aumento da quimioluminescência de células mononucleares no fluido peritoneal de mulheres com endometriose, ao que foi atribuído o aumento da geração de produtos reativos do oxigênio (ânions superóxido, peróxido de hidrogênio,  $H^2O^2$ ) e oxigênio livre.

Embora em princípio tenha concordado que a presença de endometriose significaria níveis aumentados de NO e radicais livres, Ho (1997) não encontrou diferença significativa entre os produtos do metabolismo do NO (nitrato e nitrito) entre mulheres com endometriose em estágio inicial ou avançado do grupo de controle sem endometriose. Entretanto, demonstrou aumento de volume do fluido peritoneal em mulheres em estágio avançado da doença, significativamente maior que o grupo controle. Seu número de casos foi de 12 pacientes no estágio avançado, 12 no estágio inicial e 10 controles sem endometriose; obteve ainda correlação positiva de CA-125 no soro com a gravidade da endometriose, mas não no fluido.

Apesar de que dados referentes à avaliação do volume do fluido não tenham feito parte desta investigação, demonstramos um aumento significativo de NO no estágio inicial tanto no soro quanto no fluido das pacientes. Em nosso trabalho, foi investigado um número maior de pacientes, discordando do trabalho de Ho. Da mesma forma, apenas pudemos detectar associação significativa entre endometriose e estresse (Gráfico 6). Pacientes com estresse apresentaram endometriose em 80%.

A análise dos dados (Tabela 2) mostrou que os medicamentos que as pacientes utilizavam em geral não interferiram na dosagem do NO tanto no fluido quanto no soro. Não houve também correlação entre o uso de anticoncepcional e dor pélvica (Gráfico 5), enquanto a correlação entre dor pélvica e endometriose (Gráfico 8) foi significativa, pois 80% das pacientes com dor pélvica apresentaram endometriose, contra 50% das pacientes com dor pélvica sem endometriose, provavelmente relacionada à profundidade dos focos.

Konninckx e Martin (1992) propuseram uma classificação da endometriose de localização profunda, em separado, em três subtipos. Quando da terapia hormonal da endometriose com análogos de GnRH, a ausência de resposta destes implantes profundo seria porque a droga não ganha acesso ao foco pela fibrose perithecidual, as células endometrióticas teriam programação genética própria (enquanto a influência endócrina parece secundariamente dependente do grau individual de diferenciação celular), os receptores estrogênicos estão em menor quantidade nos focos peritoneais e nos nódulos retovaginais do que no endométrio eutópico, ou diferentes mecanismos regulatórios de receptores esteróides endometrióticos poderiam resultar em dependência endócrina deficiente (embora presentes, os receptores são inativos).

Qualquer dessas hipóteses poderia justificar a diferença que encontramos na dosagem de NO entre estágios iniciais e avançados da endometriose. Fibrose maior também explicaria os achados estatísticos entre dosagem de NO no soro em pacientes com cirurgias prévias observados na Tabela IV.

Da mesma forma, monócitos e células monócito-derivadas de indivíduos saudáveis contêm pequena ou nenhuma iNOS, enquanto níveis altos são facilmente detectáveis em casos de infecção ou doenças inflamatórias crônicas (Facchetti *et al.*, 1999). Endometriose e estresse foram presenças outras que determinaram alterações significativas do NO (Tabela 3, Gráfico 6).

A positividade de iNOS foi, entretanto, seletivamente demonstrada em macrófagos que formavam granulomas, onde poucas células positivas para iNOS foram reconhecidas no tecido subjacente. Isso pode indicar que a expressão de iNOS depende dos mecanismos envolvidos no microambiente do granuloma. Se, por um lado, produtos microbianos podem ser diretamente responsáveis pela indução de iNOS em humanos, outras condições inflamatórias não-granulomatosas caracterizadas por mediação celular tipo-1 também o fazem.

## Conclusão

A dosagem de NO no soro e no fluido peritoneal de pacientes com ou sem endometriose foi significativamente diferente, maior naquelas com endometriose. Tais achados apontam para a importância da necessidade de maiores estudos da relação NO/endometriose. Uma vez mais bem estabelecida sua implicação na gênese das lesões endometrióticas, a experimentação clínica de agentes antioxidantes poderia ser parte do arsenal terapêutico para a patologia.



## Resumo

A proposta deste estudo foi investigar a presença de Óxido Nítrico (NO) na patogênese da inflamação na endometriose. O fluido peritoneal e o soro de 65 pacientes submetidas a laparoscopia por endometriose, entre março 1999 e agosto 2000, foram examinados. O fluido peritoneal foi aspirado do fundo de saco de Douglas e o soro foi congelado. A produção de NO detectada por espectrofotometria mostrou níveis aumentados nos estágios iniciais da endometriose.

---

**Unitermos:** Óxido Nítrico; Endometriose; Infertilidade.

---

## Referências

1. Arici A., Oral E., Attar E. – Monocyte chemotactic protein-1 concentration in peritoneal fluid of women with endometriosis and its modulation of expression in mesothelial cells. *Fertil Steril*; 67, 6:1065-1072, 1997.
2. Awwad J. T., Sayegh R. A., Hassan T., Awwad S. T., Isaacson K. – The SCID: an experimental model for endometriosis. *Hum Reprod*; 14,12:3107-3111, 1999.
3. Bogdan C., Röllinghoff M., Diefenbach A. – The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunological Reviews*, 173:17-26, 2000.
4. Brau D. P., Muriana A., Gebel H. et al. – Monocyte mediated enhancement of endometrial cell proliferation in women with endometriosis. *Fertil Steril*; 63:46, 1994.
5. Bredt D. S. e Snyder S. H. – Nitric Oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem*; 63:175-95, 1994.
6. Chao C. H., Bei C. Y., Meng H. W., Ko E. H. – Enhanced interleukin-4 expression in patients with endometriosis. *Fertil Steril*; 67,6:1059-1064, 1997.
7. Cole – *Biochem Biophys Acta*, 162:39-49, 1968.
8. De Caterina R., Libby P., Peng H. B., Thannickal V. J., Rajavashisth T. B., Gimbrone Jr. M. A., Shin W. S., Liao J. K. – Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation: nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest*, 96:60, 1995.
9. Donnez J., Langerock S., Thomas K. – Peritoneal fluid volume 17-beta estradiol and progesterone concentrations in women with endometriosis on/or luteinized unruptured follicle syndrome. *Gynecol Obstet Invest* ,16:210-220, 1988.
10. Fachetti F., Vermi W., Fiorentini S., Chilosi M., Caruso A., Duse M., Notarangelo L. D. e Badolato R. – Expression of inducible Nitric Oxide Synthase in human granulomas and histiocytic reactions. *Am J Pathol*, Vol..54, 1:145-152, 1999.
11. Fakih H., Bagget B., Holtz G. et al. – Interleucine-1: a possible role in the infertility associated with endometriosis. *Fertil Steril* ;47:213, 1987.
12. Fanton J. W., Golden J. G. – Radiation-induced endometriosis in Macaca mulatta. *Radiat Res*, 126:141-146, 1991.
13. Fukaya T., Suguwara J., Yoshida H., Murakami T., Yajima A. – Intercellular adhesion molecule-1 and hepatocyte growth and a review of literature. *Gynecol Obstet Invest* (47) suppl 1:11-17, 1999.