

JOSÉ AUGUSTO SOARES PANTALEÃO<sup>1</sup>

HELENE NARA HENRIQUES<sup>2</sup>

ANA CAROLINA BERGMANN DE CARVALHO<sup>3</sup>

CARLOS EDUARDO POLLASTRI<sup>4</sup>

PORPHIRO JOSÉ SOARES FILHO<sup>5</sup>

MARIA ANGÉLICA GUZMÁN-SILVA<sup>6</sup>

# Efeito da tibolona sobre o endométrio de ratas castradas

*Effect of tibolone on endometrium of castrated rats*

## Artigo original

### Palavras-chave

Menopausa/efeitos de drogas  
Endométrio/metabolismo  
Endométrio/anatomia & histologia  
Ratos Wistar  
Norpregnenos/administração & dosagem

### Keywords

Menopause/drug effects  
Endometrium/metabolism  
Endometrium/anatomy & histology  
Rats, Wistar  
Norpregnens/administration & dosage

### Resumo

**OBJETIVO:** avaliar o efeito do uso prolongado de alta dose de tibolona na morfologia do endométrio em ratas castradas. **MÉTODOS:** foram utilizadas 15 ratas Wistar, fêmeas, com idade de oito semanas e peso médio de 250 g. Todas as ratas foram submetidas à ooforectomia bilateral e 30 dias depois foi coletada citologia vaginal, verificando-se o *status* de menopausa. As ratas foram divididas aleatoriamente em dois grupos: o tratado (n=9) recebeu via oral 1 mg tibolona/dia; o controle (n=6) recebeu apenas solução do veículo carboximetilcelulose. Após 20 semanas de tratamento, todos os animais foram sedados e sacrificados por deslocamento cervical. Os úteros foram retirados e fixados em formol 10% tamponado. Ambos os cornos uterinos foram clivados em três regiões (proximal, medial, distal) e processados para inclusão em parafina. Cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina foram submetidos à análise morfológica e morfométrica. Foram avaliados os seguintes parâmetros: espessura do epitélio superficial endometrial, espessura do estroma endometrial, área endometrial, número absoluto de glândulas endometriais e número de glândulas/área endometrial. Os dados obtidos foram comparados mediante o teste *t* de Student. **RESULTADOS:** no Grupo Tibolona os úteros se apresentaram bem desenvolvidos e houve aumento significativo ( $p \leq 0,01$ ) de todos os parâmetros histomorfométricos. Por vezes, o epitélio cilíndrico tornava-se estratificado pavimentoso e recobria porções internas das glândulas bem como a cavidade endometrial. As ratas do Grupo Controle apresentaram útero atrofiado. Havia poucas glândulas de padrão tubular e escassa substância intercelular. As glândulas eram revestidas de epitélio cúbico que se estendia à cavidade endometrial. **CONCLUSÕES:** a tibolona em alta dose administrada por um longo período de tempo à ratas castradas tem efeito estrogênico, que pode ser dose-dependente, e causa proliferação no endométrio e alteração da diferenciação celular (metaplasia escamosa), porém não leva à hiperplasia.

### Abstract

**PURPOSE:** to evaluate the effect of long-term use of a high dose of tibolone on the morphology of the endometrium of castrated female rats. **METHODS:** fifteen female Wistar rats, aged eight weeks and weighting about 250 g were used. All the female rats were submitted to bilateral oophorectomy and 30 days afterwards, vaginal cytology was collected, to verify the menopause status. The female rats were randomly divided in two groups. The Treatment Group (n=9) received 1 mg of tibolone/day orally; the Control Group (n=6) received a solution of carboxymethylcellulose vehicle. After 20 weeks of treatment, all the animals were sedated and sacrificed by cervical dislocation. The uterus was removed and fixated in 10% buffer formaldehyde. Both uterine horns were divided in three regions (proximal, medial and distal) and processed to be included in paraffin. Histological sections, stained with hematoxylin-eosin were submitted to morphological and morphometrical analysis. The following parameters have been analyzed: thickness of the endometrial superficial epithelium, thickness of the endometrium stroma, endometrial area, absolute number of endometrial glands and number of glands/endometrial area. The data obtained were compared by the t-Student test. **RESULTS:** in the Tibolone Group, the uteri were well developed and there was a significant increase ( $p < 0.01$ ) of all the histomorphometric parameters. In some cases, the cylindrical epithelium became stratified, pavementous and covered the internal portions of the glands, as well as of the endometrium cavity. Rats from the Control Group presented uterine atrophy. There were few tubular-like glands and scarce intercellular substance. Glands were covered by cubic epithelium which extended itself to the endometrial cavity. **CONCLUSIONS:** high doses of tibolone, given for long periods of time to castrated female rats, have an estrogenic effect which can be dose-dependent, causing proliferation in the endometrium and causing changes in the cell differentiation (squamous metaplasia), but do not lead to hyperplasia.

### Correspondência:

Maria Angélica Guzmán-Silva  
Rua Pereira da Silva, 137/1.806 – Icaraí  
CEP: 24220-030 – Niterói (RJ), Brasil  
Fone (21) 2629-9044 / Fax (21) 2629-9128  
E-mail: mptmags@yahoo.com.br

### Recebido

28/5/08

### Aceito com modificações

26/2/09

Departamento de Patologia da Universidade Federal Fluminense – UFF – Niterói (RJ), Brasil.

<sup>1</sup> Professor Adjunto da Universidade Federal Fluminense – UFF – Niterói (RJ), Brasil.

<sup>2</sup> Acadêmica de Biomedicina da Universidade Federal Fluminense – UFF – Niterói (RJ), Brasil.

<sup>3</sup> Pós-graduanda (Mestrado) do Programa de Patologia Investigativa da Universidade Federal Fluminense – UFF – Niterói (RJ), Brasil.

<sup>4</sup> Pós-graduando (Doutorado), Professor Assistente da Universidade Federal Fluminense – UFF – Niterói (RJ), Brasil.

<sup>5</sup> Professor adjunto do Departamento de Patologia da Universidade Federal Fluminense – UFF – Niterói (RJ), Brasil.

<sup>6</sup> Professora-associada do Departamento de Patologia da Universidade Federal Fluminense – UFF – Niterói (RJ), Brasil.

## Introdução

A menopausa resulta da diminuição da secreção dos hormônios ovarianos, estrogênio e progesterona<sup>1</sup>. Estudos populacionais sugerem que o fumo e a condição socioeconômica baixa estão associados com o final precoce dos períodos menstruais<sup>2</sup>. Outros fatores podem afetar a idade nas quais as mulheres têm seu período menstrual finalizado, como menarca, paridade, uso prévio de contraceptivos orais, índice de massa corpórea, etnia e história familiar<sup>3</sup>.

O climatério representa o período de transição entre a vida reprodutiva e a senilidade, caracterizado por uma diminuição gradual da função ovariana. A deficiência estrogênica observada depois da menopausa é responsável por vários efeitos adversos na mulher, tais como alterações urogenitais, esqueléticas, vasomotoras, emocionais, sexuais, etc. Existem também fortes evidências de que a terapia de reposição hormonal melhora os sintomas vasomotores e urogenitais, reduz a incidência de fraturas ósseas e protege contra o câncer colorretal<sup>4</sup>.

Nesta fase, as mudanças fisiológicas e clínicas estão representadas principalmente por sintomas vasomotores (fogachos), sudorese, nervosismo, irritabilidade, insônia, cefaleia e vertigem, além da atrofia da pele, distúrbios urogenitais e alterações osteoarticulares. O panorama do climatério mudou de maneira importante com a identificação dos estrogênios, da progesterona e de outros esteroides sintéticos. O início do uso destes hormônios como reposição hormonal na pós-menopausa veio melhorar uma série de sintomas e sustar algumas alterações degenerativas na esfera genital e extragenital<sup>5</sup>. O tratamento mais usado para os sintomas da menopausa é com estrogênio, usado isolado ou em combinação com progesterona para prevenir estímulo endometrial<sup>6</sup>. O uso de estrogênio para reposição hormonal pode efetivamente prevenir a osteoporose e outros sintomas relacionados à diminuição do estradiol plasmático na menopausa. Entretanto, o estrogênio pode levar a um aumento de proliferação celular no útero e nas mamas, podendo aumentar o risco de desenvolvimento de neoplasias uterinas. A terapêutica ideal seria, portanto, uma substância que tenha ação estrogênica em ossos e sistema urogenital, mas não em útero e mamas<sup>7</sup>.

A tibolona é um esteroide sintético utilizado para o tratamento de sintomas do climatério. Possui ação específica para os tecidos com atividades estrogênica, androgênica e progestogênica. Sua ação estrogênica acontece em ossos, vagina, cérebro e sistema cardiovascular e a progestogênica no endométrio e mama. O efeito progestogênico protetor do endométrio evita a estimulação estrogênica, diminuindo o risco de hiperplasia e carcinoma do endométrio<sup>5,8</sup>.

Depois da administração oral, a tibolona é rapidamente metabolizada em 3-alfa e 3-beta-hidroxitibolona, pela

ação das 3-alfa e 3-beta-hidroxiesteroide desidrogenases hepática e intestinal. Ambos os hidroximetabólitos têm meia-vida de aproximadamente sete horas, mas a concentração do metabólito 3-alfa-hidroxi é quatro vezes mais elevada na circulação, comparada com a do metabólito 3-beta. Esses dois metabólitos são responsáveis pela ação estrogênica da tibolona. Os dois metabólitos 3-hidroxi parecem ser completamente agonistas do receptor estrogênico humano e têm potência menor que o estradiol<sup>8</sup>. Por exemplo, 2,5 mg de tibolona têm efeitos similares no osso de mulheres na pós-menopausa aos de 1 mg de estradiol<sup>9</sup>. Os metabólitos 3-hidroxi mostram uma maior seletividade pelo clássico receptor estrogênico alfa, comparado com a isoforma beta<sup>8</sup>.

Um terceiro metabólito, o isômero delta-4, é formado diretamente da tibolona pela atividade da 3-beta-hidroxiesteroide desidrogenase, sendo o metabólito 3-beta-hidroxi um substrato potencial. Este isômero é rapidamente removido da circulação e sua meia-vida é de seis horas<sup>9</sup>. O isômero delta-4 ativa os receptores progestogênicos e androgênicos, mas não o receptor estrogênico<sup>10</sup>. Além disso, possui uma afinidade maior pelo receptor progestogênico tipo B que o tipo A<sup>3</sup>. O grupo 7-alfa-metil impede este metabólito de ser 5-alfa-reduzido e perder sua atividade progestogênica<sup>8,9</sup>. Em pesquisas animais foi identificado outro metabólito da tibolona, o 7-alfa-metil-17-alfa-etinilestradiol, cuja potência se assemelha à do etinilestradiol. Sua concentração sérica após 2,5 mg de tibolona oral encontra-se próxima à obtida com 30 µg de etinilestradiol<sup>11,12</sup>.

O endométrio da mulher e o da rata exhibe alterações proliferativas comparáveis quando submetidas à terapia hormonal, suportando a validade do estudo dessas alterações no modelo murino na pós-menopausa. O uso do modelo animal permite a avaliação do efeito direto dos hormônios sobre o endométrio, eliminando-se os efeitos de potenciais variáveis que podem estar presentes em ensaios clínicos, como idade, tempo de menopausa e tempo de uso de terapia hormonal<sup>13,14</sup>.

A expectativa de vida, da maioria das linhagens de ratos, é em torno de dois e meio a três anos<sup>15</sup>. Comparado ao organismo humano, o metabolismo das ratas é muito acelerado. Alguns estudos mostram que esses animais com 24 meses de vida correspondem aproximadamente a um indivíduo de 60 anos. Isso significa que cada dia de vida do animal corresponderia a aproximadamente 30 dias de vida na espécie humana<sup>16-18</sup>. O atual experimento teve uma duração de 140 dias que, se extrapolarmos para o tempo de vida correspondente na mulher, significaria aproximadamente 11,5 anos. Por outro lado, ao comparar a atual pesquisa com a maioria dos experimentos em ratos pode-se afirmar que o período de tratamento é prolongado, já que os trabalhos geralmente são efetuados por um período que varia de três dias<sup>10</sup> a seis semanas<sup>19</sup>.

A dose de tibolona utilizada neste experimento foi considerada como alta, em comparação com a dose habitual de 2,5 mg usada em humanos, que corresponde, em uma mulher de 60 kg, à 0,041 mg/kg. Utilizando o sistema alométrico<sup>20</sup>, foi calculada a dose equivalente para a rata, que foi de 0,161 mg/kg. Portanto, a dose de 1 mg/dia por animal de 0,250 kg, que usamos neste trabalho, corresponde a 4 mg/kg, uma dose 24 vezes mais alta que a habitual, equivalente em humanos.

O objetivo deste trabalho foi o de avaliar os efeitos da tibolona, administrada em alta dose e por período prolongado, sobre a morfologia do endométrio de ratas adultas castradas.

## Métodos

Foram utilizadas 15 ratas albinas da linhagem Wistar, com idade de oito semanas e peso médio de 250 g. As ratas foram fornecidas pelo Laboratório de Nutrição Experimental (LABNE) da Universidade Federal Fluminense (UFF), onde foi efetuado o experimento. Este projeto obedeceu às normas Internacionais de Proteção aos Animais e do Código Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina/Hospital Universitário Antônio Pedro da UFF (Registro nº 086/06). Os animais foram alojados em gaiolas individuais de propileno e fundo plástico com leito de maravalha esterilizada. As gaiolas foram mantidas no biotério em ambiente de temperatura constante ( $24 \pm 2$  °C) com ciclos claros e escuros de 12 em 12 horas. Os animais receberam água filtrada e ração própria para ratos (Fri-Lab Ratos II, Fri-Ribe) *ad libitum*. Todos os animais foram submetidos à ooforectomia bilateral sob anestesia via *ip* com 100 mg/kg de quetamina (CRISTALIA) e 20 mg/kg de xilazina (Anasedan Vetbrands)<sup>21</sup>. Trinta dias após a ooforectomia foi coletada citologia vaginal de todas as ratas, que foram divididas de forma aleatória em dois grupos. O Grupo Tibolona (n=9) recebeu a droga na dose de 1 mg/dia dissolvida em solução de carboximetilcelulose (CMC) a 0,5%. O Grupo Controle (n=6) recebeu apenas a solução de CMC a 0,5%. A administração foi efetuada diariamente por intubação esofágica, num volume de 0,5 mL/rata. As ratas foram acompanhadas mensalmente por meio de citologia vaginal e não houve perdas durante o experimento.

Com 20 semanas de uso da droga todos os animais foram anestesiados com quetamina e xilazina e sacrificados por deslocamento cervical. Os animais foram dissecados e tiveram seus cornos uterinos retirados, os quais foram imersos em formol 10% tamponado. Após a fixação, os fragmentos foram desidratados e processados para inclusão em parafina segundo as técnicas habituais. A inclusão foi realizada de tal maneira que permitisse observar cortes

transversais dos cornos uterinos. Os blocos foram cortados em micrótomo ajustado para 4 µm e as lâminas submetidas à técnica de coloração pela hematoxilina-eosina (HE).

A análise histológica utilizou critérios convencionais para descrição morfológica do epitélio e do estroma endometrial em três regiões – proximal, medial, distal – de ambos os cornos uterinos.

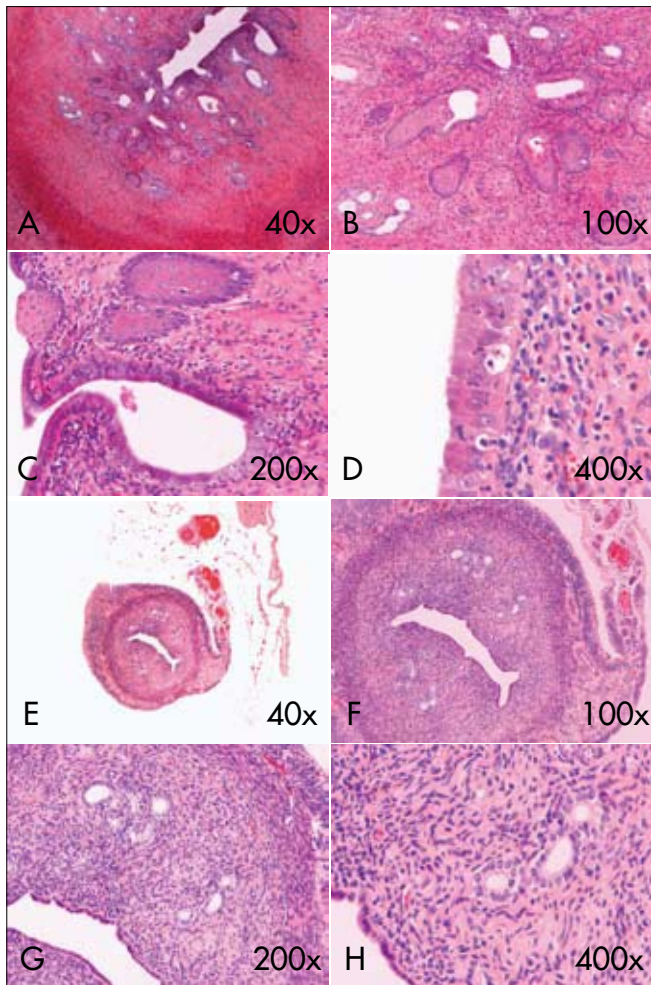
A avaliação morfométrica foi realizada em imagens digitalizadas em formato TIFF e analisadas pelo programa Image-Pro Plus 4.5. O sistema de captura digital consiste de um microscópio de luz Nikon Eclipse E400 acoplado a uma câmera digital CCD Evolution MP 5.0 de alta resolução da Media Cybernetics, que transmite a imagem a um computador tipo PC. Em cada animal foi analisado o terço médio dos cornos direito e esquerdo. Os seguintes parâmetros foram analisados: espessura do epitélio superficial endometrial, espessura do estroma endometrial, área endometrial e número de glândulas endometriais. De cada corno uterino foram efetuadas quatro medidas da espessura do estroma endometrial e do epitélio superficial em pontos equidistantes. A medida do epitélio foi obtida pela distância de uma linha paralela à superfície apical das células luminiais até outra linha paralela à lâmina basal (Figura 1A, E). O estroma foi medido desde a lâmina basal até o limite do miométrio (Figura 1B, F). Em cada corte histológico, a área endometrial foi delimitada manualmente e medida automaticamente e o número de glândulas endometriais foi contado manualmente (Figura 1C, D, G, H).

As médias e desvios padrão das médias foram calculados em cada grupo. Para análise dos resultados utilizou-se o teste *t* de Student. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi fixado em 5% ( $p < 0,05$ ).

## Resultados

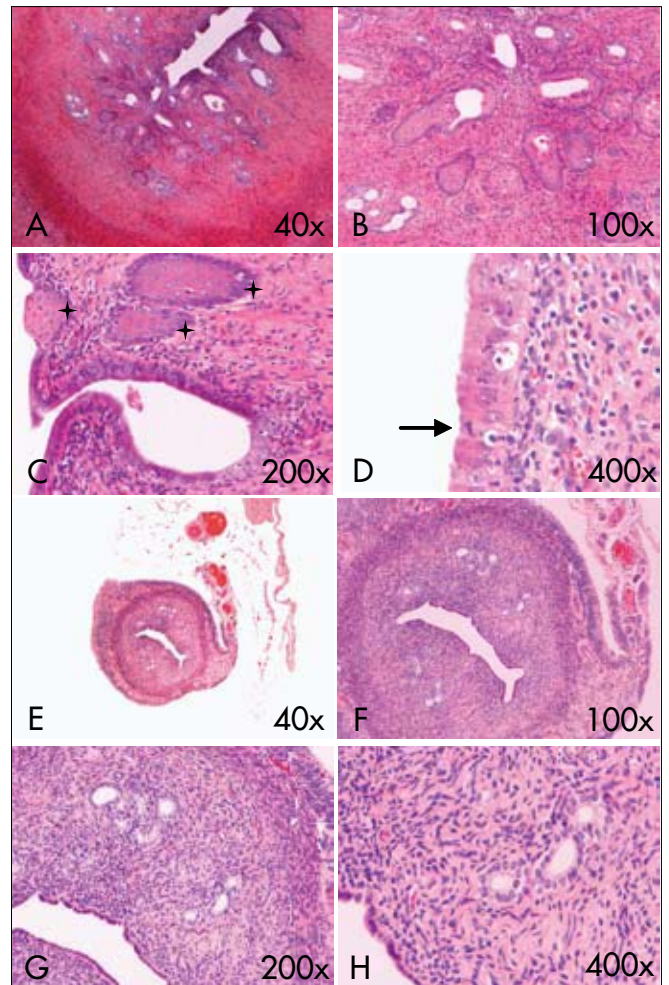
Ao início do experimento todas as ratas se encontravam em *status* de menopausa confirmado pelo padrão da citologia vaginal em anestro, com presença de leucócitos, muco e células profundas. Ao longo do experimento esse padrão se manteve no Grupo Controle, já o Grupo Tibolona apresentou padrão citológico compatível com estro persistente, comprovado, através da citologia vaginal mensal, pela presença exclusiva de escamas.

Os úteros das ratas do Grupo Tibolona se apresentaram bem desenvolvidos (Figura 2 A, B, C, D). Os cortes histológicos apresentaram endométrio com estroma rico em substância hialina homogênea intercelular e numerosas glândulas ora tubulares, ora tortuosas, por vezes dilatadas, contendo células descamadas e degeneradas no seu interior. Em algumas áreas, o epitélio superficial se mostrava cuboidal, mas predominava o padrão colunar alto (cilíndrico) com núcleos reativos, volumosos, com



**Figura 1** - Características morfológicas do endométrio de ratas castradas (HE). A, B, C, D – grupo tibolona; A – corno uterino desenvolvido com proliferação de glândulas endometriais; B – numerosas glândulas exibindo metaplasia escamosa; C – detalhe de glândula dilatada revestida por epitélio colunar alto e metaplasia escamosa do epitélio endometrial superficial e glandular (estrelas); D – detalhe do epitélio endometrial superficial do tipo colunar alto exibindo numerosos leucócitos (exocitose), figura de mitose (seta) e numerosos eosinófilos no estroma endometrial. E, F, G, H – grupo controle; E – corno uterino atrofiado; F – poucas glândulas endometriais inativas; G – detalhe das glândulas endometriais tubulares; H – detalhe do epitélio endometrial superficial e glandular do tipo cúbico.

nucléolos evidentes, e foram observadas figuras de mitose na maioria dos casos. Displasia e necrose não foram observadas. Por vezes, o epitélio tornava-se estratificado pavimentoso. Tal epitélio recobria porções internas das estruturas glandulares bem como a cavidade endometrial. A análise dos resultados de forma mais individualizada mostrou que, a metaplasia escamosa estava presente no epitélio superficial do Grupo Tibolona, em oito dos nove casos estudados, sendo que na maioria era apenas focal. Em três casos observou-se epitélio pseudoestratificado. Nas áreas sem metaplasia, as células epiteliais apresentavam vacúolos citoplasmáticos. O estroma endometrial era homogêneo com hialinização e glândulas do tipo



**Figura 2** - Características morfológicas do endométrio de ratas castradas (Hematoxilina-Eosina). A, B, C, D – grupo tibolona; A – corno uterino desenvolvido com proliferação de glândulas endometriais; B – numerosas glândulas exibindo metaplasia escamosa; C – detalhe de glândula dilatada revestida por epitélio colunar alto e metaplasia escamosa do epitélio endometrial superficial e glandular (estrelas); D – detalhe do epitélio endometrial superficial do tipo colunar alto exibindo numerosos leucócitos (exocitose), figura de mitose (seta) e numerosos eosinófilos no estroma endometrial. E, F, G, H – grupo controle; E – corno uterino atrofiado; F – poucas glândulas endometriais inativas; G – detalhe das glândulas endometriais tubulares; H – detalhe do epitélio endometrial superficial e glandular do tipo cúbico.

tubular-tortuosa, apresentando revestimento epitelial com metaplasia escamosa na totalidade dos casos estudados; em dois casos esta era queratinizada. Havia também difuso infiltrado neutrofílico, com presença de frequentes eosinófilos, tocando e invadindo o componente epitelial (exocitose), formando alguns microabscessos. Os vasos sanguíneos se encontravam em maior número.

As ratas do Grupo Controle apresentaram útero atrofiado (Figura 2E, F, G, H), com acentuada diminuição de todos seus componentes. O endométrio mostrava estroma frouxo, tendo de permeio alguns vasos sanguíneos isolados e células do tecido conjuntivo com núcleos pequenos, por vezes alongados e heterocromáticos. O

**Tabela 1 - Características morfológicas do endométrio em um corno uterino de ratas castradas tratadas ou não com tibolona. Avaliação por morfometria.**

Grupo	Espessura		Área endometrial (mm <sup>2</sup> )	Glândulas	
	Epitélio superficial (µm)	Estroma endometrial (µm)		(n)	(n/mm <sup>2</sup> )
Tibolona	33,2±7,4 <sup>a</sup>	823,8±69,4 <sup>a</sup>	3,4±0,4 <sup>a</sup>	37±8 <sup>a</sup>	10,9±2,6 <sup>b</sup>
Controle	8,9±3,7 <sup>b</sup>	198,0±81,6 <sup>b</sup>	0,3±0,2 <sup>b</sup>	8±3 <sup>b</sup>	28,7±8,1 <sup>a</sup>

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa, teste t (p<0,01).

córicion interglandular continha poucas glândulas de padrão tubular, bem como escassa substância intercelular. As glândulas mostravam-se revestidas de epitélio cúbico que se estendia à cavidade interna endometrial, exibindo pequenos núcleos arredondados heterocromáticos.

Os resultados da morfometria estão expressos na Tabela 1. Foi notado que o Grupo Tibolona apresentou o epitélio superficial endometrial com espessura significativamente (p<0,001) aumentada, assim como, também a espessura do estroma endometrial (lâmina própria). O aumento dessas estruturas correspondia aproximadamente a quatro vezes o valor do Grupo Controle. A área endometrial aumentou de forma significativa (p<0,001) no Grupo Tibolona, representando mais de 10 vezes a área do Grupo Controle (3,4±0,4 *versus* 0,3±0,2 mm<sup>2</sup>). No Grupo Tibolona, o número de glândulas em contagem absoluta foi significativamente maior (p<0,001) que o Grupo Controle, chegando a quase quintuplicar este valor (37±12 *versus* 8±3). Isso caracterizou uma densidade glandular significativamente menor (p<0,01) no endométrio do Grupo Tibolona (10,9±2,6 *versus* 28,7±8,1) em comparação ao Grupo Controle.

## Discussão

O tratamento da mulher climatérica com estrogênios tem efeitos benéficos para prevenção da atrofia vaginal, sintomas urogenitais, perda de massa óssea e outros. A estrogenerioterapia isolada aumenta o risco de hiperplasia e câncer de endométrio. Estes efeitos podem, no entanto, ser prevenidos com o uso concomitante de um agente progestacional ou mesmo da própria progesterona. A tibolona usada no tratamento da mulher climatérica melhora todos os sintomas sem, contudo, ter ação proliferativa no endométrio e nas mamas<sup>19</sup>.

Estudos em animais e em humanos mostram que a tibolona possui efeitos tecido-seletivos, agindo como composto estrogênico no osso e sistema nervoso central, enquanto nenhuma estimulação estrogênica é encontrada na mama ou no endométrio<sup>22</sup>. Este último dado pode ser explicado pelo efeito progestogênico da tibolona que induz as sulfotransferases e inibe as sulfatases, reduzindo os níveis endometriais dos metabólitos estrogênicos<sup>8</sup>. Os resultados deste experimento mostram claramente que a

tibolona em alta dose administrada, por um longo período de tempo à ratas castradas, causa proliferação no endométrio. Em um estudo de curta duração, 35 dias, usando alta dose de tibolona em ratas Wistar castradas, foi verificada ação proliferativa no endométrio<sup>23</sup>. Esses achados podem, entretanto, ser explicados pelos seguintes argumentos. A tibolona é metabolizada no endométrio pela enzima 3-beta-hidroxiesteroide desidrogenase/isomerase, gerando o isômero delta-4, sem atividade estrogênica. Entretanto, pouco se sabe sobre a deficiência desta enzima quando se usa tibolona em alta dose<sup>24</sup>. Tais deficiências poderiam explicar os achados da nossa investigação.

Outros estudos mostram que a tibolona *in vivo* pode ser metabolizada em outro composto com forte ação estrogênica, o 7-alfa-metil-17-alfa-etinilestradiol (7α-MEE)<sup>11,12</sup>. Entretanto, há uma grande controvérsia quanto à existência desse metabólito, que é convertido por aromatasas hepáticas a partir de tibolona<sup>8,10-12,25-27</sup>.

Portanto, alta dose de tibolona associada à deficiência da 3-beta-hidroxiesteroide desidrogenase/isomerase propiciaria aumento do metabólito 7-alfa-metil-17-alfa-etinilestradiol, que por sua forte ação estrogênica é capaz de estimular a proliferação do endométrio.

Além disso, o tratamento com tibolona em ratas castradas induziu um *status* de estro persistente, determinando metaplasia escamosa do epitélio endometrial. Tal resposta estaria relacionada à atuação do metabólito 7-alfa-metil-17-alfa-etinilestradiol por seu efeito estrogênico, associado à possível deficiência do isômero delta-4. Ratas mantidas em estro persistente, sob condições experimentais, apresentam alterações morfofuncionais do trato reprodutivo que resultam em alterações endometriais do tipo estratificação do epitélio (metaplasia escamosa). A administração de estrona em ratas adultas castradas<sup>28</sup>, bem como a exposição contínua à luz<sup>29</sup> ou administração de testosterona<sup>30</sup>, levam à supressão do ciclo, induzindo estro persistente<sup>29,30</sup> e estratificação do epitélio endometrial superficial e glandular<sup>28-30</sup>. Essas alterações seriam dependentes do alto nível de hormônios esteroides circulantes, especialmente estrogênio<sup>29,30</sup>.

Em ratas, na fase do estro ocorre aumento do número de eosinófilos no estroma endometrial, sendo o estrogênio o hormônio responsável por esse aumento<sup>31</sup>. Tal resposta é dose-dependente<sup>30,31</sup> e acontece também em situações de estro persistente experimental<sup>29,30</sup>, assim como o induzido nesta investigação com tibolona.

A ação da tibolona, no endométrio de ratas castradas, é diferente da ação contínua do estrogênio que pode levar a hiperplasia, hiperplasia com atipias e adenocarcinoma<sup>32</sup>. Os presentes resultados mostraram claramente ação estrogênica no endométrio, representada nas avaliações morfológicas e morfométricas. O

caráter proliferativo foi determinado pela identificação de frequentes mitoses, estratificação e metaplasia escamosa dos epitélios superficial e glandular, bem como pelo aumento significativo do número absoluto de glândulas no estroma endometrial. Contudo, ao expressar o número de glândulas por área em mm<sup>2</sup>, foi verificado, na realidade, que a densidade de glândulas/mm<sup>2</sup> era significativamente maior no Grupo Controle do que no Grupo Tibolona, o que nos permite afirmar que a tibolona tem ação proliferativa epitelial, porém não leva à hiperplasia endometrial.

Como conclusão, a tibolona em alta dose administrada por um longo período de tempo em ratas castradas tem efeito estrogênico, que pode ser dose-dependente, e causa proliferação no endométrio e alteração da diferenciação celular (metaplasia escamosa), porém não leva à hiperplasia.

Entendemos que a tibolona tem uma ação estrogênica efetiva e benéfica em tecidos como vagina, osso e cérebro, e mesmo aplicada em alta dose e por um longo período não mostrou em nenhum momento atividade oncogênica. Entretanto, é preciso ter precaução ao extrapolar esses resultados para a espécie humana, principalmente para mulheres pós-menopáusicas que apresentem contraindicações absolutas ou relativas ao uso de estrogênio.

## Agradecimentos

À farmácia de manipulação Officilab, que gentilmente forneceu a tibolona usada neste experimento. Ao LABNE da UFF pelo apoio institucional e a Wagner Gonçalves Bernardo pelo auxílio no uso do programa Image-Pro Plus.

## Referências

- Nelson HD. Menopause. *Lancet*. 2008;371(9614):760-70.
- Gold EB, Block G, Crawford S, Lachance L, FitzGerald G, Miracle H, et al. Lifestyle and demographic factors in relation to vasomotor symptoms: baseline results from the Study of Women's Health Across the Nation. *Am J Epidemiol*. 2004;159(12):1189-99.
- Melby MK, Lock M, Kaufert P. Culture and symptom reporting at menopause. *Hum Reprod Update*. 2005;11(5):495-512.
- Botsis D, Christodoulakos G, Papagianni V, Lambrinouadaki I, Aravantinos L, Makrakis E, et al. The effect of raloxifene and tibolone on the uterine blood flow and endometrial thickness: a transvaginal Doppler study. *Maturitas*. 2006;53(3):362-8.
- Kloosterboer HJ. Tibolone: a steroid with a tissue-specific mode of action. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2001;76(1-5):231-8.
- Landgren MB, Helmond FA, Engelen S. Tibolone relieves climacteric symptoms in highly symptomatic women with at least seven hot flushes and sweats per day. *Maturitas*. 2005;50(3):222-30.
- Blom MJ, Wassink MJ, De Gooyer ME, Ederveen AG, Kloosterboer HJ, Lange J, et al. Metabolism of tibolone and its metabolites in uterine and vaginal tissue of rat and human origin. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2006;101(1):42-9.
- Kloosterboer HJ. Tissue-selectivity: the mechanism of action of tibolone. *Maturitas*. 2004;48 Suppl 1:S30-40.
- Kloosterboer HJ. Tissue-selective effects of tibolone on the breast. *Maturitas*. 2004;49(1):S5-15.
- de Gooyer ME, Oppers-Tiemissen HM, Leysen D, Verheul HA, Kloosterboer HJ. Tibolone is not converted by human aromatase to 7alpha-methyl-17alpha-ethynylestradiol (7alpha-MEE): analyses with sensitive bioassays for estrogens and androgens and with LC-MS/MS. *Steroids*. 2003;68(3):235-43.
- Bodine PV, Harris HA, Lyttle CR, Komm BS. Estrogenic effects of 7alpha-methyl-17alpha-ethynylestradiol: a newly discovered tibolone metabolite. *Steroids*. 2002;67(8):681-6.
- Wiegratz I, Sanger N, Kuhl H. Formation of 7 alpha-methyl-ethinyl estradiol during treatment with tibolone. *Menopause*. 2002;9(4):293-5.
- Andrade PM, Baracat EC, Simões MJ, Rodrigues de Lima G. Histomorphometric aspects of adult castrated rat endometrium after the use of estrogen, progesterone and tamoxifen. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2000;27(2):138-41.
- Moraes AVS, Simões RS, Fonzar LF, Simões MJ, Soares Junior JM, Haidar MA, et al. Efeitos da terapia estro-raloxifeno sobre o endométrio de ratas. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2006;28(2):101-6.
- Canadian Council on Animal Care. Guide to the care and use of experimental animals. Ottawa: CCAC; 1984. p. 175-89.
- Sakai Y, Zhong R, Garcia B, Zhu L, Wall WJ. Assessment of the longevity of the liver using a rat transplant model. *Hepatology*. 1997;25(2):421-5.
- Kang KB, Van Der Zyp A, Iannazzo L, Majewski H. Age-related changes in monocyte and platelet cyclooxygenase expression in healthy male humans and rats. *Transl Res*. 2006;148(6):289-94.
- Campbell SJ, Carare-Nnadi RO, Losey PH, Anthony DC. Loss of the atypical inflammatory response in juvenile and aged rats. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2007;33(1):108-20.
- Czerny B, Teister M, Juzyszyn Z, Mysliwiec Z, Pawlik A. Effect of tibolone on turnover of cholesterol to bile acids in ovariectomized rats. *Menopause*. 2005;12(5):609-12.
- Felippe PAN. Sistema alométrico ou cálculo de dosagem por taxa metabólica do animal [documento da Internet]. Campinas: Unicamp; 2005 [citado 15 ago 2008]. Disponível em: <http://www.ib.unicamp.br/ceea/files/ceea/calculo.doc>
- Piovesan AC, Soares Júnior JM, Mosquette R, Simões MJ, Simões RS, Baracat EC. Estudo morfológico e molecular da mama de ratas castradas tratadas com isoflavona ou estrogênios. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2005;27(4):204-9.
- Hanifi-Moghaddam P, Gielen SC, Kloosterboer HJ, De Gooyer ME, Sijbers AM, van Gool AJ, et al. Molecular portrait of the progestagenic and estrogenic actions of tibolone: behavior of cellular networks in response to tibolone. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(2):973-83.

23. Kuscuk NK, Koyuncu FM, Inan S, Tuglu I, Uyar Y, Ozbilgin K. The effect of tibolone on endometrial IGF-1 and IGFBP-1 levels in ovariectomized rats. *Maturitas*. 2002;42(3): 247-52.
24. de Vries CS, Bromley SE, Thomas H, Farmer RD. Tibolone and endometrial cancer: a cohort and nested case-control study in the UK. *Drug Saf*. 2005;28(3):241-9.
25. Zacharia LC, Jackson EK, Kloosterboer HJ, Imthurn B, Dubey RK. Conversion of tibolone to 7 $\alpha$ -methyl-ethinyl estradiol using gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-mass spectrometry: interpretation and clinical implications. *Menopause*. 2006;13(6):926-34.
26. Dröge MJ, Oostebing F, Oosting E, Verheul HA, Kloosterboer HJ. 7 $\alpha$ -methyl-ethinyl estradiol is not a metabolite of tibolone but a chemical stress artifact. *Menopause*. 2007;14(3 Pt 1): 474-80.
27. Kuhl H, Wiegatz I. Can 19-nortestosterone derivatives be aromatized in liver of adult humans? Are there clinical implications? *Climacteric*. 2007;10(4):344-53.
28. Li QN, Hu B, Huang LF, Chen Y, Weng LL, Zheng H, et al. Effects of low doses of hydrochloride tetracycline on bone metabolism and uterus in ovariectomized rats. *Acta Pharmacol Sin*. 2003;24(6):599-604.
29. Santos JM, Carreiro de Teves D, Baracat EC, Soares Júnior JM, Simões MJ. Morphological aspects of the endometrium of persistent estrous rats induced by continuous light submitted to ooforectomy and treated with oestrogen and progesterone. *Rev Chil Anat*. 1999;17(2):169-74
30. Patriarca MT, Simões RD, Smaniotto S, De Teves DC, Simões Mde D, Evêncio-Neto J, et al. Morphological action of tamoxifen in the endometrium of persistent estrous rats. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1996;75(8):707-10.
31. Simões MJ, Mora OA. Aspectos morfológicos do endométrio de ratas nas subfases inicial, intermediária e final do estro e do diestro. *Rev Bras Biol*. 1980;40(3):561-7.
32. Doll A, Abal M, Rigau M, Monge M, Gonzalez M, Demajo S, et al. Novel molecular profiles of endometrial cancer-new light through old windows. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2008;108(3-5):221-9.