

# AVALIAÇÃO DO EFEITO DO VALERATO DE ESTRADIOL NO CICLO ESTRAL E NA HISTOLOGIA DA VEIA POPLÍTEA DE RATAS

Miriane de Oliveira<sup>1,2</sup>

Juliane dos Santos<sup>1</sup>

Márcia Clélia Leite Marcelino<sup>1</sup>

Patricia Pinto Saraiva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Ciências da Saúde - Universidade do Sagrado Coração, USC – Bauru - SP.

<sup>2</sup>Departamento de Clínica Médica - Faculdade de Medicina de Botucatu, FMB/Unesp – Botucatu – SP

OLIVEIRA, Miriane de e et al. Avaliação do efeito do valerato de estradiol no ciclo estral e na histologia da veia poplítea de ratas. *Salusvita*, Bauru, v. 29, n. 1, p. 47-56, 2010.

## RESUMO

**Objetivos:** O objetivo deste estudo foi avaliar o ciclo estral e o número de células musculares lisas (NCML) da túnica média (TM) de ratas submetidas ao tratamento com estrogênio.

**Métodos:** Foram utilizadas vinte ratas Wistar, sem experiência sexual, divididas em dois grupos: Controle (GC, n = 10 - 0,2 ml de veículo) e Estradiol (GE, n = 10 - 0.125mcg de valerato de estradiol). A administração das soluções foram feitas por gavagem durante vinte e oito dias e durante esse período foram realizados esfregaços vaginais, para avaliação do ciclo estral. Após o tratamento, as ratas foram eutanasiadas e o segmento da veia poplítea direita foi removido para procedimentos histológicos. As células musculares lisas vasculares (CMLV) da TM foram observadas em microscópio óptico em au-

Recebido em: 19/03/2009

Aceito em: 07/12/2009

mento de 100 vezes e contadas com auxílio de contador manual de células da marca Digitimer.

**Resultados:** De acordo com a avaliação diária dos esfregaços vaginais, não foram observadas alterações nas fases do ciclo estral. A comparação da contagem do NCML entre os grupos GC (n=8, 30,50 ± 6,28) e GE (n= 8, 29,22± 3,41) não apresentou diferença estatística significativa.

**Conclusões:** Concluiu-se que o hormônio de valerato de estradiol, na dose diária oral de 0.125mcg, não promoveu alterações do ciclo estral e não alterou o NCML na veia poplítea, durante vinte oito dias de tratamento.

**Palavras-chave:** Ciclo Estral. Valerato de estradiol. Células Musculares lisa. Túnica Média. Veia Poplítea.

## ABSTRACT

**Objectives:** *The objective of this study was to evaluate the estrous cycle and the number of smooth muscle cells (NSMC) of the middle coat (MC) of female rats treated with estrogen.*

**Methods:** *We used twenty female Wistar rats, without sexual experience, were divided into two groups: Control group (n = 10 - 0.2 ml of vehicle) and Estradiol group [(n = 10 - 0.125mcg estradiol valerate (EV)]. The administration of the solutions were made by gavage for twenty-eight days, during this period were performed vaginal smears for evaluation of the estrous cycle. After treatment, the rats were euthanized and the segment of the right popliteal vein was removed for histological procedures. The vascular smooth muscle cells (VSMC) of MC were observed under an optical microscope at 100x magnification and counted with the aid of manual cell counter brand Digitimer.*

**Results:** *According to the daily evaluation of vaginal smears, there were no changes in the phases of the estrous cycle. The counting of NSMC between groups GC (n = 8, 30.50 ± 6.28) and GE (n = 8, 29.22 ± 3.41) showed no significant change.*

**Conclusions:** *We concluded that the hormone EV, in oral daily dose, at concentration of 0.125mcg, do not predispose to estrous cycle and do not alter NSML in the popliteal vein, for twenty eight days of treatment.*

**Keywords:** *Estrous Cycle. Estradiol Valerate. Smooth Muscle Cells. Middle Coat. Popliteal Vein.*

OLIVEIRA,  
Miriane de e et  
al. Avaliação do  
efeito do valerato  
de estradiol no  
ciclo estral e na  
histologia da veia  
poplítea de ratas.  
*Salusvita*, Bauru,  
v. 29, n. 1, p. 47-  
56, 2010.

OLIVEIRA,  
Miriane de e et  
al. Avaliação do  
efeito do valerato  
de estradiol no  
ciclo estral e na  
histologia da veia  
poplítea de ratas.  
*Salusvita*, Bauru,  
v. 29, n. 1, p. 47-  
56, 2010.

## INTRODUÇÃO

Os estrogênios e progestínicos administrados por via oral estão entre os fármacos mais prescritos. Os efeitos da progesterona são necessariamente dependentes da ação do estrógeno no tecido alvo, havendo assim, um efeito sinérgico (WILLIAMS; STANCEL et al., 1996). Os estrogênios e a progesterona são os principais esteróides femininos, estando envolvidos em inúmeras funções celulares, como proliferação e diferenciação de células normais e cancerosas (CUNHA, 2004; YAMASHITA, 1998).

O ciclo menstrual feminino que tem duração média de 28 dias, podendo variar de 20 a 45 dias, sofre ação direta desses hormônios (GUYTON; HALL, 2002; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Os roedores são mamíferos que apresentam ciclo estral regular, caracterizado por mudanças morfológicas nos ovários, útero e vagina, características facilmente observadas durante quatro a seis dias (SIMÕES, 1984; MARCONDES et al., 2002) e tem quatro fases, denominadas de estro, metaestro, diestro e proestro. Em razão da curta duração de seu ciclo estral, ratas constituem bom modelo para o estudo das alterações que ocorrem durante o ciclo reprodutivo (MARCONDES, 2001).

Segundo White et al. (1995) os estrógenos podem influenciar vários processos fisiológicos, são agentes vasoprotetores naturais, protegem contra a aterosclerose, reduzem o tônus vascular da musculatura lisa e abrem canais de cálcio específicos.

Quando os humanos assumem uma postura vertical, o sangue progressivamente diminui nas veias dos membros inferiores. Com essa ação, ocorre a diminuição do volume de sangue e retorno venoso central e, posteriormente, provoca estresse ortostático, desafiando a pressão arterial (ROWELL, 1993).

Estudos de Hernandez et al. (2005) sugerem que o comprimento venoso dos membros inferiores podem ter um impacto direto nas respostas cardiovasculares ao estresse ortostático e, possivelmente, a tolerância ortostática. Shoemaker et al. (2001) demonstraram claramente que as mulheres apresentam menos tolerância ortostática que os homens.

Segundo Meendering et al. (2005) em seu estudo não encontraram mudanças na complacência venosa, ou seja, na capacidade de veias ou artérias aumentarem de volume quando submetidas a uma determinada pressão interna em mulheres tratadas com formas exógenas ou endógenas de estrogênio. No entanto, é desconhecido o efeito que a flutuação dos níveis desse hormônio tem sobre a complacência venosa em mulheres durante ciclo menstrual e uso de anticoncepcional oral.

Numerosos estudos têm mostrado que os hormônios estrogênios apresentam múltiplos efeitos sobre os vasos sanguíneos, e, portanto,

podem alterar a complacência venosa em mulheres (MONAHAN et al., 2004). Segundo Farhat et al. (1996) os estrogênios promovem diminuição da proliferação celular nas células musculares lisas vasculares (CMLV) da túnica média (TM), causando rápida vasodilatação e podem reduzir a secreção de colágeno e a deposição de matriz extracelular. As CMLV possuem morfologia alongada e por sua característica contrátil, participam de muitos processos fisiológicos que incluem a contração e relaxamento dos músculos dos vasos sanguíneos.

Trabalhos que mostram a relação entre hormônios esteróides, veias varicosas e alteração do ciclo estral de roedores são escassos na literatura, com isso o objetivo desse trabalho foi analisar efeitos da administração do valerato de estradiol na histologia da veia poplítea de ratas, através da contagem das CMLV, além de avaliar o ciclo estral simultaneamente.

## MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética Universidade do Sagrado Coração – USC - Bauru , estando de acordo com o “Guia para Cuidados e Usos de Animais Experimentais”.

Para este trabalho foram utilizadas 20 ratas da raça Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), adultas, virgens e púberes, pesando aproximadamente 250 gramas, provenientes do Biotério da USC. Os animais foram confinados em gaiolas individuais e mantidos em ambiente com ração comercial e água ad libitum, com temperatura de 21 °C e iluminação artificial, com lâmpadas fluorescentes (marca Phillips, modelo luz do dia, 40 W), estabelecendo um fotoperíodo de doze horas claro e doze horas escuro, considerando o período de luz das seis às dezoito horas.

Após um período de adaptação de aproximadamente doze dias, realizaram-se esfregaços vaginais para a determinação da regularidade do ciclo estral. Os animais que apresentaram três ciclos estrais regulares consecutivos foram divididos em dois grupos, constituídos por dez animais cada, denominados Grupo GC (Controle) e Grupos GE (Experimental). Em cada grupo seguiram-se os seguintes parâmetros: Grupo GC (animais tratados com veículo e avaliados durante vinte oito dias de experimento) e Grupo GE (animais tratados com 0,125 mcg de valerato de estradiol).

Os animais do grupo GE receberam o valerato de estradiol que foi diluído em álcool etílico, posteriormente adicionado ao veículo e administrado via oral, via gavagem (Figura 1b), em doses diárias por vinte oito dias. Os animais do grupo GC receberam apenas o veículo. A solução oral sem açúcar utilizada como veículo foi com-

OLIVEIRA,  
Miriane de e et  
al. Avaliação do  
efeito do valerato  
de estradiol no  
ciclo estral e na  
histologia da veia  
poplítea de ratas.  
*Salusvita*, Bauru,  
v. 29, n. 1, p. 47-  
56, 2010.

OLIVEIRA,  
Miriane de e et  
al. Avaliação do  
efeito do valerato  
de estradiol no  
ciclo estral e na  
histologia da veia  
poplítea de ratas.  
*Salusvita*, Bauru,  
v. 29, n. 1, p. 47-  
56, 2010.

posta por água purificada, Suspender® (agente suspensor), Sacarina (edulcorante), Nipagim® (Metilparabeno) e Nipasol® 25 (Propilparabeno), sendo estes últimos conservantes.

Durante a administração dos fármacos, realizaram-se, diariamente, exames colpocitológicos em todos os animais, para o acompanhamento do ciclo estral das ratas. Para a coleta do material as ratas foram contidas e a ponteira (capacidade para 200 µL) foi introduzida no canal vaginal (Figura 1a). Cerca de 200 µL de solução de cloreto de sódio 0,9% foi aplicado no canal vaginal e recolhido com a ponteira. O lavado foi distendido em uma lâmina para microscopia de luz e observado à fresco em aumento de 40 vezes. Os lavados vaginais foram realizados entre quinze e dezesseis horas, sendo observadas as fases metaestro, diestro, proestro e estro.

Após os vinte e oito dias de tratamento os animais foram anestesiados com solução 1:1 de Ketamina e Cloridrato de Xylazina na dose de 0,14ml/100gr, por via intramuscular. Os segmentos venosos foram retirados da veia poplítea do membro inferior direito, através de cirurgia, posterior a anestesia, com incisões na pele em torno de três centímetros, sendo colocados em formol a 10%. Após quarenta e oito horas de fixação, cada segmento foi incluído em parafina. Em seguida realizaram-se cortes histológicos transversais; para cada seguimento de veia foram feitas quatro amostras, dispostas em uma lâmina, as quais receberam coloração pelo método Hematoxilina-Eosina (HE). Foram realizadas contagens de CMLV da TM dos Grupos GC e GE, visualizadas em aumento de 100 vezes com auxílio de contador manual de células da marca Digitimer. Após a contagem foram obtidas a média de quantidade de células de cada lâmina.



Figura 1a



Figura 1b

Figura 1 - Durante 28 dias, entre 15h00 - 16h00, a secreção vaginal das ratas foi coletada usando uma pipeta com 200µl de solução salina (NaCl 0,9%) (a), inserindo a ponta dentro da vagina das ratas, mas não profundamente. Pelo mesmo período houve a administração do valerato de estradiol e veículo via gavagem (b). (a)

Fonte: MARCONDES et al. (2002)



## ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A análise estatística foi realizada, através da técnica da análise de variância não paramétrica, para o modelo com dois fatores, sendo utilizado o Teste de Mann-Whitney, considerando como significativo o  $p < 0,05$ , com auxílio do Programa GraphPad In Stat3.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em ambos os grupos GC e GE observou-se que o exame colpocitológico, no proestro, consistiu predominantemente de células epiteliais nucleadas e anucleadas. A fase de estro foi caracterizada pela presença de células cornificadas ou queratinizadas. No metaestro, além das células observadas nas duas fases anteriores, observou-se a presença de leucócitos. O diestro foi caracterizado pela escassez de elementos celulares, e grande concentração de leucócitos e mucos. Os animais de ambos os grupos apresentaram, durante todo o experimento, em média seis ciclos que duraram cerca de quatro dias cada um. Foram observadas as quatro fases do ciclo estral (Figura 2), citadas por Aires (1999) e Marcondes (2002) em ambos os grupos.

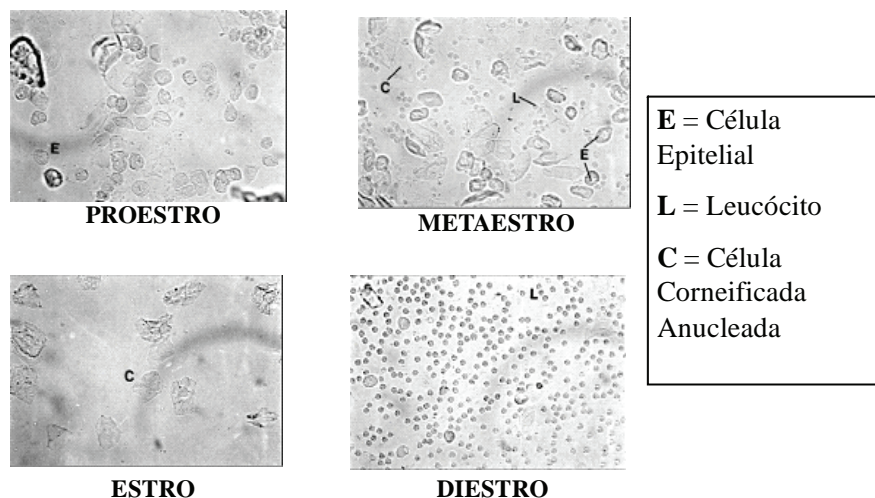


Figura 2 - Esfregaços vaginais se pode observar as fases do ciclo estral das ratas.  
Fonte: MARCONDES et al. (2002)

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que o valerato de estradiol na concentração de 0,125mcg não alterou as fases do ciclo estral do animais, pois durante todo o experimento o ciclo se mostrou regular.

Porto et al. (1997) concluíram que qualquer alteração histológica na camada de células musculares lisas da túnica média (Figura 3) de

OLIVEIRA,  
Miriane de e et  
al. Avaliação do  
efeito do valerato  
de estradiol no  
ciclo estral e na  
histologia da veia  
poplítea de ratas.  
*Salusvita*, Bauru,  
v. 29, n. 1, p. 47-  
56, 2010.

OLIVEIRA,  
Miriane de e et  
al. Avaliação do  
efeito do valerato  
de estradiol no  
ciclo estral e na  
histologia da veia  
poplítea de ratas.  
*Salusvita*, Bauru,  
v. 29, n. 1, p. 47-  
56, 2010.

veias pode ser causa primária ou secundária do desenvolvimento de varizes dos membros inferiores. Estas células tem papel contrátil e são responsáveis pela síntese e manutenção da matriz extracelular da túnica média e, juntamente com as células endoteliais, pelo conjuntivo subendotelial.

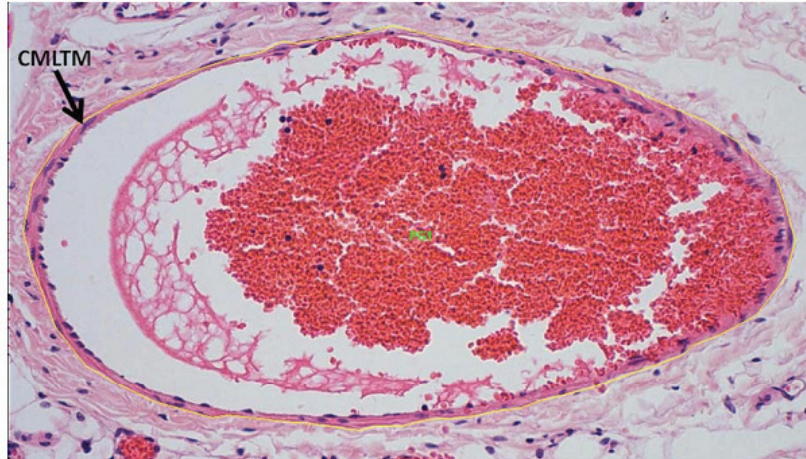


Figura 3 - Corte Histológico da Veia Poplítea evidenciando uma CMLTM.  
CMLTM = Célula Muscular Lisa da Túnica Média.

No presente estudo não foram encontradas alterações quanto ao número de células musculares lisas (NCML) na parede da veia poplítea de ambos os grupos (Figura 4). O NCML da TM do grupo GE não sofreu ação significativa do hormônio administrado quando comparado ao grupo GP (Tabela 1).

Tabela 1 - refere-se ao nível de significância da comparação do NMCL entre os grupos GC e GE.

Grupos	Total	Significância de NCML na TM		
		Médias e DP	p	NS
GC x GE	244,00 x 233,75	30,50±6,28 x 29,22±3,41	0,7984	Insignificante

Nota: Foi utilizada a técnica de análise de variância (ANOVA), para o esquema de dois fatores, sendo utilizado o Teste de Mann-Whitney. Dados expressos em média ± desvio-padrão. Considerado  $p < 0,05$  como significativo. NCML = Número de Células Musculares Lisas; GC = Grupo Controle; GE = Grupo Estrógeno; TM = Túnica Média; DP = Desvio Padrão; NS = Nível de Significância.

## NCML Controle x Estrógeno

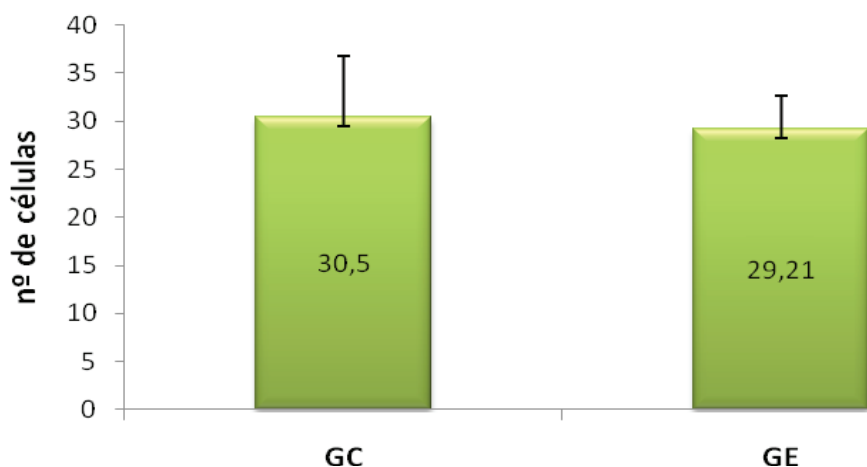


Figura 4 - Gráfico do NCML sob o tratamento com veículo comparado ao com Valerato de Estradiol. O GC recebeu veículo por vinte oito dias. O grupo GE recebeu pelo mesmo período valerato de estradiol. Considerado  $p < 0,05$  como significativo.

Para Kockx et al (1998), a hipertrofia das células musculares lisas e a presença de microherniações na membrana plasmática dessas células na camada circular das veias varicosas esta diretamente associada à fraqueza da parede venosa e seria a base para ruptura das fibras elásticas desta parede, porém em nosso experimento não foi possível avaliar se houve ou não hipertrofia destas células, tampouco a densidade de fibras elásticas.

Estudos *in vivo*, em humanos e animais experimentais, mostram que estrógenos promovem vasodilatação. Já *in vitro*, o 17- $\beta$  estradiol inibe a proliferação celular de CMLV e melhora as lesões que ocorrem na aterosclerose (TOSTES et al., 2003). Os resultados obtidos com a metodologia utilizada em no presente estudo não apresentaram diferença significativa do número de CMLV entre os grupos GC e GE. Portanto o estrógeno não promoveu diminuição do NCML, conforme Farhat et al. (1996) citou em seu estudo, e nem aumento do número dessas células.

## CONCLUSÃO

Concluimos que os hormônio VE, em doses orais, nas concentrações de 0,125mcg não predispõe alteração no ciclo estral e no NCML.

OLIVEIRA, Miriane de e et al. Avaliação do efeito do valerato de estradiol no ciclo estral e na histologia da veia poplítea de ratas. *Salusvita*, Bauru, v. 29, n. 1, p. 47-56, 2010.



OLIVEIRA,  
Miriane de e et  
al. Avaliação do  
efeito do valerato  
de estradiol no  
ciclo estral e na  
histologia da veia  
poplítea de ratas.  
*Salusvita*, Bauru,  
v. 29, n. 1, p. 47-  
56, 2010.

## REFERÊNCIAS

- AIRES, M. M. **Fisiologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.
- CUNHA, G.R.; COOKE, P.S.; KURITA, T. Role of stromal-epithelial interactions in hormonal responses. **Arch. Histol. Cytol.**, Niigata, v. 67, p. 417-434, 2004.
- FARHAT, M.Y.; LAVIGNE, M.C.; RAMWELL, P.W. The vascular protective effects of estrogen. **Faseb J.**, Bethesda, v. 10, p. 615-624, 1996.
- GUYTON, A.C; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
- HERNANDEZ, J.P.; KARANDIKAR, A.; FRANKE W.D. Effects of age and fitness on tolerance to lower body negative pressure. **J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.**, Washington DC, v. 60, n. 6, p. 782-786, 2005.
- KOCKX, M.M. et al. Vascular remodeling in varicose veins. **Angiology**, Thousand Oaks, v. 49, n. 1, p. 871- 877, 1998.
- MARCONDES, F.K; et al. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze. **Physiol. Behav.**, New York, v. 74, n. 4-5, p 435-440, 2001.
- MARCONDES, F. K. et al. Determination Of The Estrous Cycle Phases Of Rats: Some Helpful Considerations. **Braz. J. Biol.**, São Carlos, v. 62, n. 4, p. 55-68, 2002.
- MEENDERING, J.R.; et al. Effects of menstrual cycle and oral contraceptive use on calf venous compliance. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, Bethesda, v. 288, n. 1, p. H103-H110, 2005.
- MONAHAN, K.D.; RAY, C.A. Gender affects calf venous compliance at rest and during baroreceptor unloading in humans. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, Bethesda, v. 286, p. H895–H901, 2004.
- PORTO, L. C. et al. Connective tissue accumulation in the muscle layer in normal and varicose saphenous veins. **Angiology**, Thousand Oaks, v. 3, p. 243-349, 1997.
- ROWELL, L.B. **Human Cardiovascular Control: Passive Effects of Gravity**. New York: Oxford University Press, 1993.
- SHOEMAKER, J.K.; et al. Gender affects sympathetic and hemodynamic response to postural stress. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, Bethesda, v. 281, p. H2028–H2035, 2001.

TOSTES, R.C.; et al. Effects of estrogen on the vascular system. **Braz. J. Med. Biol. Res.** Ribeirão Preto, v. 36, 1143-1158, 2003.

WILLIAMS, C.L.; STANCEL, G.M. Estrogênio e progestogênios In: GOODMAN, L.S. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 1996, p. 1046-1065.

WHITE, R.E.; DARKOW, D.J.; LANG, J.L. Estrogen relaxes coronary arteries by opening BKCa channels through a cGMP-dependent mechanism. **Circulat. Res.** Baltimore, v. 77, p. 936-342, 1995.

YAMASHITA, S. Localization and functions of steroid hormone receptors. **Histol. Histopathol.**, Murcia, v. 13, p. 255-270, 1998.

OLIVEIRA,  
Miriane de e et  
al. Avaliação do  
efeito do valerato  
de estradiol no  
ciclo estral e na  
histologia da veia  
poplítea de ratas.  
*Salusvita*, Bauru,  
v. 29, n. 1, p. 47-  
56, 2010.