

MARÍLIA OLIVEIRA RIBEIRO

**HISTOLOGIA ENDOMETRIAL, DENSIDADE, CALIBRE
MICROVASCULAR E MATRIZ-METALOPROTEINASE-3 EM
USUÁRIAS DO SISTEMA INTRA-UTERINO LIBERADOR DE
LEVONORGESTREL OU DO IMPLANTE SUBDÉRMICO LIBERADOR
DE NESTORONE COM E SEM SANGRAMENTO ENDOMETRIAL**

Tese de Doutorado

**ORIENTADOR: Prof. Dr. CARLOS ALBERTO PETTA
CO-ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. LILIANA A. L. DE ANGELO ANDRADE**

**UNICAMP
2006**

MARÍLIA OLIVEIRA RIBEIRO

**HISTOLOGIA ENDOMETRIAL, DENSIDADE, CALIBRE
MICROVASCULAR E MATRIZ-METALOPROTEINASE-3 EM
USUÁRIAS DO SISTEMA INTRA-UTERINO LIBERADOR DE
LEVONORGESTREL OU DO IMPLANTE SUBDÉRMICO LIBERADOR
DE NESTORONE COM E SEM SANGRAMENTO ENDOMETRIAL**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor em Tocoginecologia, área de Tocoginecologia

**ORIENTADOR: Prof. Dr. CARLOS ALBERTO PETTA
CO-ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. LILIANA A. L. DE ANGELO ANDRADE**

**UNICAMP
2006**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

R355h	Ribeiro, Marília Oliveira Histologia endometrial, densidade, calibre microvascular e matriz-metaloproteinase-3 em usuárias do sistema intra-uterino liberador de levonorgestrel ou do implante subdérmico liberador de nestorone com e sem sangramento endometrial / Marília Oliveira Ribeiro. Campinas, SP: [s.n.], 2006. Orientadores: Carlos Alberto Petta, Liliana Aparecida Luci de Ângelo Andrade Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. 1. Histologia. 2. Leucócitos. 3. Dispositivo intra-uterino. 4. Levonogestrel. 5. Endométrio. 6. Dispositivos Anticoncepcionais. I. Petta, Carlos Alberto. II. Andrade, Liliana Aparecida Luci de. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.
-------	--

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluna: MARÍLIA OLIVEIRA RIBEIRO

Orientador: Prof. Dr. CARLOS ALBERTO PETTA

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. LILIANA A. L. DE ANGELO ANDRADE

Membros:

1.

2.

3.

4.

5.

**Curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas**

Data: 26/06/2006

Dedico este trabalho...

*...ao meu pai, **Conrado** (in memorian),
pelo exemplo de disciplina, caráter, dignidade e amor.*

*...à minha mãe, **Leida**,
a quem tudo devo, pelo carinho dedicado a vida toda.*

*...ao meu marido, **Hélio**,
alma gêmea e grande incentivador.*

*...ao meu filho, **Daniel**,
criança que ilumina minha vida.*

*...à minha irmã, **Eliane**,
companheira de todas as horas.*

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Petta, pelo exemplo como pesquisador, médico e professor, pelo incentivo em todos os momentos difíceis durante a execução deste trabalho.

À Profa. Dra. Liliana Aparecida L. de A. Andrade, por suas orientações, incentivo e paciência, pelo exemplo como pesquisadora, médica e professora.

Ao Prof. Dr. Luis Bahamondes por sua grande ajuda, em todos os momentos, desde o início deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Ismael Dale Cotrim da Silva, pela orientação na montagem da estrutura física que permitiu a análise dos dados.

À Dra. Lois Salamonsen, por ter me ajudado nos vários momentos que solicitei e por todos os artigos que me enviou.

À Enf. Maria Margarete Hidalgo pela ajuda, fundamental, na fase inicial deste estudo.

Às secretárias Verônica Barros e Margarete Donadon, pela paciência e dedicação em todas as fases deste trabalho.

Às enfermeiras do Ambulatório de Reprodução Humana, Cecília, Creusa, Ximena, Tila (in memorian), Sara e Nádia, pelo companheirismo e apoio na fase de coleta do material.

Às estatísticas Maria Helena de Souza e Adriane Elisabeth Olivatto, pelo empenho na análise dos resultados.

Aos demais funcionários do Cemicamp, Caism e Astec, pelo apoio e incentivo.

À técnica de laboratório **Léa de Magalhães Simões**, pela responsabilidade e competência na confecção das lâminas.

À bióloga **Marisa Almeida Matsuda** e aos demais **funcionários do Laboratório de Patologia Experimental**, pelo comprometimento com a atividade a eles destinada na realização deste trabalho.

A todos os **funcionários do Laboratório de Anatomia Patológica**, os quais me acolheram com respeito e deram apoio durante a fase de análise deste trabalho.

Às **mulheres usuárias do SIU-LNG** e do implante subdérmico liberador de NES que participaram, voluntariamente, deste estudo, sem as quais nada disso seria possível.

Apoio

FAPESP- Processo nº 2001/14645-6

Sumário

Símbolos, Siglas e Abreviaturas	xv
Resumo	xvii
Summary	xxi
1. Introdução	23
1.1. Anticoncepcionais contendo apenas progestógenos de ação prolongada.....	25
1.2. O Sistema intra-uterino liberador de levonorgestrel.....	27
1.3. Nestorone: um novo progestógeno	31
1.4. Aspectos morfológicos endometriais em usuárias do SIU-LNG e de outros progestógenos.....	35
1.5. Vasos endometriais em usuárias de anticoncepcionais contendo somente progestógenos.....	38
1.6. Leucócitos endometriais.....	42
1.6.1. Neutrófilos	43
1.6.2. Eosinófilos	44
1.6.3. Monócitos/Macrófagos	44
1.6.4. Mastócitos	45
1.6.5. Linfócitos	46
1.7. As enzimas matriz-metaloproteinases e o endométrio	49
2. Objetivos	59
2.1. Objetivo geral	59
2.2. Objetivos específicos	59
3. Publicações	61
3.1. Artigo 1	63
3.2. Artigo 2	71
4. Discussão.....	79
4.1. Avaliação histológica.....	84
4.1.1. Usuárias do SIU-LNG	84
4.1.2. Usuárias do implante subdérmico liberador de NES	85
4.2. Avaliação dos vasos sanguíneos.....	87
4.2.1. Usuárias do SIU-LNG	87
4.2.2. Usuárias do implante subdérmico liberador de NES	88
4.3. Avaliação da imunoexpressão da MMP-3.....	89
4.3.1. Usuárias do SIU-LNG	89
4.3.2. Usuárias do implante subdérmico liberador de NES	90

4.4. Limitações dos estudos.....	90
4.5. Considerações finais	91
5. Conclusões.....	93
6. Referências Bibliográficas.....	97
7. Bibliografia de Normatizações.....	113
8. Anexos	115
8.1. Anexo 1 – Termo de consentimento livre e esclarecido	115
8.2. Anexo 2 – Ficha para coleta de dados.....	117
8.3. Anexo 3 – Calendário menstrual	123

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

AMP-D	Acetato de medroxiprogesterona de depósito
CAISM	Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
DIU	Dispositivo intra-uterino
EN-NET	Enantato de noretisterona
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
HE	Hematoxilina-eosina
IMC	Índice de massa corpórea
ITMP	Inibidores teciduais das enzimas matriz metaloproteinases
MAC	Método anticoncepcional
MMP	Matriz Metaloproteinase
NES	Nestorone
NET	Noretisterona
SIU-LNG	Sistema Intra-uterino Liberador de Levonorgestrel
Unicamp	Universidade Estadual de Campinas

Resumo

Atualmente, os métodos anticoncepcionais somente com progestógenos estão sendo usados por um número cada vez maior de mulheres. Estes são de alta eficácia e de longa duração. Dentre eles encontram-se o sistema intra-uterino liberador de levonorgestrel (SIU-LNG) e o implante subdérmico liberador de nestorone (NES). Nas usuárias destes métodos, as mudanças no padrão do fluxo menstrual são quase universais e a imprevisibilidade do sangramento uterino constitui a principal causa de descontinuação dos mesmos. O **objetivo** deste estudo de corte transversal foi verificar diferenças quanto aos aspectos histológicos em hematoxilina-eosina (HE) e através de reações imunoistoquímicas em biópsias endometriais nas usuárias do SIU-LNG ou do implante subdérmico liberador de NES, em grupos com e sem sangramento uterino, após seis meses de uso dos métodos. **Sujeitos e Métodos:** Foram avaliadas e submetidas à biópsia endometrial 58 usuárias do SIU-LNG, subdivididas em 29 casos em cada grupo com e sem sangramento e 20 usuárias do implante subdérmico liberador de NES, sendo 14 no grupo com sangramento e 6 sem sangramento. Após a avaliação morfológica em HE o material foi submetido a reações imunoistoquímicas para os marcadores CD34 (avaliação dos vasos da mucosa)

e MMP-3 (matriz-metaloproteinase-3), enzima relacionada aos processos de colapso do endométrio. **Resultados:** Dentre as usuárias do SIU-LNG, o aspecto histológico mais freqüente foi o endométrio progestacional. Não houve correlação significativa entre a presença do sangramento e a idade, paridade, cor, índice de massa corpórea, tempo de uso do SIU-LNG e o padrão menstrual prévio ao uso do SIU-LNG. Também não houve diferença estatisticamente significante com relação aos dados morfológicos analisados de endometrite, necrose estromal, erosão de superfície com reepitelização focal, colapso estromal, pseudoestratificação glandular, edema estromal, densidade e calibre vasculares. O perímetro e o maior diâmetro glandular foram significativamente maiores no grupo sem sangramento. Um número maior de leucócitos foi a única característica histológica significativa, que se relacionou à ocorrência de sangramento endometrial nas usuárias de SIU-LNG. A imunoexpressão da MMP-3 foi significativamente maior no grupo com sangramento. Com relação às usuárias do implante subdérmico liberador de NES, o padrão histológico endometrial mais freqüente foi o progestacional. Não houve correlação entre a classificação histológica e a presença ou não de sangramento endometrial. Não houve diferenças entre os grupos com e sem sangramento com relação à ocorrência de endometrite, necrose estromal, erosão de superfície com reepitelização focal, colapso estromal, pseudoestratificação glandular, edema estromal, perímetro e diâmetros glandulares, número de leucócitos, densidade e maior diâmetro vascular e a imunoexpressão da MMP-3. O maior número de glândulas endometriais foi a única característica morfológica significativa no grupo sem sangramento. **Conclusões:** Nas usuárias do SIU-LNG houve evidente correlação da importância dos leucócitos e da MMP-3 na

perda da integridade endometrial no grupo com sangramento, porém o mesmo não foi observado em usuárias do implante subdérmico liberador de NES. Os resultados obtidos sugerem a necessidade de se seguir avaliando os leucócitos endometriais, bem como suas interações enzimáticas, incluindo as MMP na busca dos mecanismos patogênicos do sangramento endometrial em usuárias de anticoncepcionais somente com progestógenos.

Summary

Progestogen-only contraception is being used by an increasing number of women. It has a long term and high efficacy. Among these methods, there is the levonorgestrel intrauterine system (LNG-IUS) and the Nestorone® (NES)-releasing contraceptive implant. However, the changes of menstrual patterns are almost universal and unpredictable and remains the main reason for discontinuation of the method. **Objective:** This was a cross sectional study. It aimed to investigate the endometrial histology and immunohistochemical reactions in users of LNG-IUS or NES-releasing contraceptive implant, for more than six months, in women with and without endometrial bleeding. **Methods:** In users of LNG-IUS endometrial biopsy was obtained in a total of 58 healthy volunteers, twenty-nine women in each group: with or without endometrial bleeding. In users of (NES)-releasing contraceptive implant in 20 women, 14 with and 6 without endometrial bleeding. **Results:** In users of LNG-SIU, histological analysis revealed that the majority of samples displayed a progestin-modified appearance. There was no significant difference between the two groups comparing age, body mass index, duration of contraceptive use, parity, ethnicity and menstrual pattern previous to use of LNG-IUS. There was no significant difference in the evaluation of

endometritis, stroma collapse, superficial erosion, glandular pseudo stratification, oedema, density and caliber microvascular. The perimeter and the major glandular diameter were the only characteristics significantly higher in the group without bleeding. A number significantly higher of leukocytes was found in the group with bleeding. This was the only histological characteristic correlated with the endometrial bleeding in these groups. MMP-3 showed a significantly higher number of reactive cells in the bleeding group. In users of NES-releasing contraceptive there was no significant difference between the two groups comparing clinical characteristics. The histological analysis of the endometrial tissue showed a predominance of progestogenic pattern endometrium in both groups. There was no significant difference in the evaluation of endometritis, stroma collapse, superficial erosion, glandular pseudo stratification, oedema, perimeter, glandular diameter, leukocytes, endometrial vascular density and caliber and the rate of cells expressing MMP-3.

Conclusions: These finding provide no evidence microvascular pattern but, point to the importance of the leukocytes and MMP-3 expression for loss of endometrial integrity and abnormal bleeding in women using LNG-IUS. This pattern was not observed in users of NES-releasing contraceptive. The results suggest the necessity of others evaluations about endometrial leukocytes, theirs enzymatics interactions, including the MMP in progestogen-only contraception.

1. Introdução

Os anticoncepcionais que contêm somente progestógenos são usados por um número estimado de 20 milhões de mulheres em todo o mundo. Recentes avanços nos sistemas de liberação têm aumentado a duração e a aceitabilidade destes métodos (Hickey et al., 1999), que têm em comum a alta eficácia e a propriedade de agir por longo tempo, o que facilita seu uso (D'arcangues, 2000).

A maior limitação no uso destas preparações consiste no distúrbio nos padrões do sangramento menstrual particularmente nos primeiros meses de uso (D'arcangues et al., 1992; Fraser e Hickey, 2000).

As alterações no padrão de sangramento variam desde a amenorréia, *spotting*, o qual se caracteriza por sangramento uterino insuficiente para requerer uso de absorvente; sangramento irregular e leve até o fluxo sanguíneo prolongado e freqüente (Belsey et al., 1986; Fraser, 1999). O sangramento volumoso é raro, embora episódios prolongados de sangramento leve possam provocar uma grande perda sanguínea, maior do que a mulher apresentaria nos seus ciclos menstruais normais (Fraser et al., 2000).

O sangramento uterino que não ocorre de forma regular é pouco tolerado pela maioria das mulheres e consiste na causa mais comum para o abandono do uso dos anticoncepcionais contendo somente progestógenos, correspondendo a aproximadamente metade dos casos de descontinuação do método (Belsey et al., 1986; Fraser, 1986; Findlay, 1996; Hickey et al., 1996a;1998; Fraser e Hickey, 2000).

O sangramento endometrial anormal não apenas reduz o uso destes medicamentos, mas pode restringir as opções anticonceptivas aceitáveis para estas mulheres e comprometer a qualidade de vida das mesmas (Smith, 2000). Além disto, pode tornar insatisfeita a mulher que considera seu padrão menstrual como parâmetro de sua saúde reprodutiva e geral, além da dimensão sociocultural que tem o sangramento uterino (D'arcangues, 2000).

A taxa de descontinuação pode ser diminuída por boa orientação e apoio no seguimento, auxiliando a mulher a entender a natureza destas mudanças no padrão de sangramento e a reconhecer que, usualmente, ocorre melhora com o tempo (Fraser et al., 2000).

Nos últimos anos, um número significativo de avanços ocorreu na tentativa de identificar os mecanismos determinantes destes distúrbios de sangramento, mas muitas dúvidas permanecem e exigem novos estudos. Um melhor conhecimento auxiliará no tratamento e na prevenção do sangramento uterino imprevisível (Smith, 2000).

Devido ao desconhecimento do completo mecanismo do sangramento endometrial anormal em usuárias de anticoncepcionais que contêm apenas

progestógenos, a terapêutica tem sido empírica com o uso de estrogênios, anticoncepcionais orais combinados, progestógenos, antiinflamatórios não esteróides, vitaminas, ferro e ansiolíticos; estas, algumas vezes, podem ser eficazes a curto prazo, mas não alteram a frequência de episódios de sangramento/*spotting* e podem estar associados à ocorrência de outros efeitos colaterais (D'arcanges, 2000).

Os dados atuais sugerem que o estabelecimento de um padrão de sangramento regular, para todas as usuárias de progestógenos de longa ação, talvez não seja possível e a indução da amenorréia associada ao aconselhamento será mais realista (D'arcanges, 2000). Estudo realizado com usuárias do sistema intra-uterino liberador de levonorgestrel (SIU-LNG) demonstrou que 91,6% das mulheres em amenorréia estavam satisfeitas. Dentre as mulheres que ainda apresentavam sangramento uterino apenas 3,8% delas não gostariam de estar em amenorréia (Nascimento et al., 2002).

1.1. Anticoncepcionais contendo apenas progestógenos de ação prolongada

Os contraceptivos contendo somente progestógenos de ação prolongada pertencem a dois grandes grupos, os derivados pregnanos e os estranos. Os derivados pregnanos dividem-se nos derivados da 17-hidroxiprogesterona (acetato de medroxiprogesterona) e os da 19-norprogesterona (acetato de nomegestrol e nesterone). No grupo dos derivados da estrona estão as gonanas derivadas da testosterona (levonorgestrel e etonorgestrel) (Sitruk-Ware, 2006).

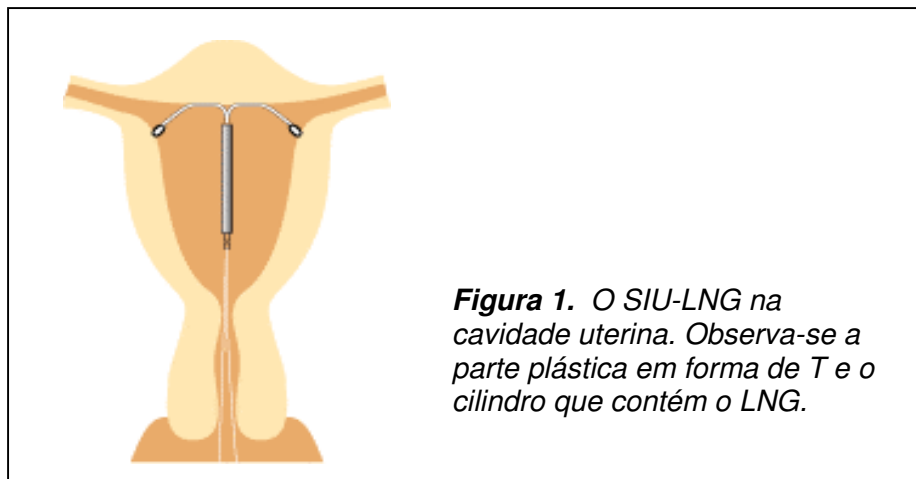
Dentre os anticoncepcionais contendo somente progestógenos de longa duração encontram-se:

- o acetato de medroxiprogesterona na forma de depósito (AMP-D), aprovado para uso em 1992, pela *Food and Drugs Administration* – EUA. Estima-se que 13 milhões de mulheres sejam usuárias deste método, no mundo, para anticoncepção (D'arcangues, 2000);
- o Implanon® (Organon, Holanda), um implante subcutâneo com haste única, contendo um sistema liberador de etonogestrel de 68mg e menos androgênico que o levonorgestrel (LNG) (Croxatto e Mäkäräinen, 1998), o qual passou a ser comercializado no Brasil a partir de 2001;
- outros métodos contendo apenas progestógenos incluem três sistemas de liberação prolongada de levonorgestrel. O implante subdérmico com seis hastes, Norplant® (Leiras Oy, Turku, Finlândia), foi aprovado desde 1983 na Europa, mas não é comercializado no Brasil, sendo usado por cerca de seis milhões de mulheres no mundo. O Jadelle®, outro implante subdérmico mais recente, contém duas hastes liberadoras da mesma quantidade de LNG que as seis cápsulas do Norplant® (Robertson et al., 1983). O sistema intra-uterino liberador de 20µg diárias de levonorgestrel é utilizado por cerca de um milhão de mulheres no mundo (D'arcangues, 2000) e
- o Nestorone (NES), previamente conhecido como ST1435, consiste em um potente derivado da 19-norprogesterona, o qual vem sendo estudado para anticoncepção na forma de implante subdérmico (Coutinho, 1978; Lahteenmaki et al., 1981; Odland et al., 1984; Kurunmaki et al., 1985; Sivin et al., 2004), de gel transdérmico (Haukkamaa et al., 1991; Suhonen et al., 1992) e de anel vaginal (Laurikka-Routtiet et al., 1990; Brache et al., 2000; Massai et al., 2000; Croxatto et al., 2006); sendo que os últimos estudos avaliam sua associação com o etinilestradiol (Sivin et al., 2005; Weisberg et al., 2005).

1.2. O Sistema intra-uterino liberador de levonorgestrel

Estudos para a administração intra-uterina do LNG tiveram início no começo dos anos 70 (Scommegna et al., 1970; El Mahgoub, 1975; Nilsson et al., 1975). O SIU-LNG para contracepção foi desenvolvido por Luukkainen e Nilsson (1978) com o apoio do *Population Council* e *International Committee for Contraception Research*. O produto final foi elaborado por Leiras Oy Pharmaceutical, Turku, Finlândia, e lançado em 1990. Atualmente, é comercializado na maior parte da Europa, nos EUA, em alguns países asiáticos e no Brasil, onde está disponível com o nome Mirena® (Schering, AG, Berlin).

O SIU-LNG é composto por uma parte plástica em forma de T (32x32mm), com um cilindro contendo o LNG, na dose de 52mg, dentro de uma cápsula de dimetilpolisiloxano que controla uma liberação diária de 20µg do hormônio na cavidade uterina (Figura 1). Este sistema libera o LNG por um período de cinco anos, com uma margem de segurança de dois anos para anticoncepção.



O SIU-LNG, atualmente, também é utilizado como parte da terapia de reposição hormonal (Andersson et al., 1992b; Suhonen et al., 1995), como adjuvante na terapia com tamoxifeno (Hubacher e Grimes, 2002), bem como no tratamento da menorragia e anemia, sendo uma alternativa à histerectomia ou à ablação endometrial (Andersson e Rybo, 1990; Hurskainen et al., 2001; Hubacher e Grimes, 2002; Monteiro et al., 2002; Hurskainen et al., 2004).

Outras aplicações incluem casos de dismenorréia severa (Puolakka et al., 1996), alívio da dor associada à endometriose (Vercellini et al., 1999; Lockhat, et al., 2005; Petta et al., 2005) e tratamento da endometriose do septo retovaginal (Fedele et al., 2000).

A diminuição do fluxo menstrual ocorre na maioria das usuárias de SIU-LNG, sendo esta a característica que o torna uma opção para o tratamento da menorragia e dismenorréia (Lähteenmäki et al., 1998). Este fenômeno, que é independente da função ovariana e da concentração dos esteróides sexuais circulantes, decorre da ação local e não há hipoestrogenismo (Nilsson et al., 1984).

O LNG liberado na cavidade endometrial é rapidamente absorvido pelos capilares, para a circulação sistêmica. No entanto, a concentração sérica é menor que a observada em usuárias de implantes subcutâneos de LNG (Norplant®), contraceptivos orais combinados e minipílulas. A produção de estradiol não é prejudicada, permanecendo semelhante à do ciclo menstrual normal (Nilsson et al., 1984). A ovulação geralmente não é inibida, embora pequenas alterações na função ovulatória tenham sido observadas (Nilsson et al., 1984; Barbosa et

al., 1995), correlacionando com a elevação inicial da concentração sérica do LNG (Xiao et al., 1995).

Os efeitos contraceptivos do SIU-LNG decorrem, sobretudo, de alterações em receptores de estrógenos e progestógenos no endométrio (Nilsson et al., 1978), também da supressão da proliferação endometrial, inibição da migração espermática, espessamento do muco cervical e por reação de corpo estranho (Barbosa et al., 1995). Tanto os receptores endometriais de estrogênios (RE) como os de progestógenos (RP), em usuárias de SIU-LNG, correspondem à cerca de 50% dos encontrados em controles. Portanto, há redução nos locais de ligação de estrogênios e progestagênios no endométrio de usuárias de SIU-LNG, o que pode implicar a eficácia anticonceptiva, o sangramento endometrial irregular ou a ocorrência de amenorréia nestas mulheres (Critchley et al., 1998; Pengdi et al., 1999).

O método é muito eficaz como contraceptivo, com índice de Pearl, em cinco anos, de 0,11, podendo ser comparado com as melhores técnicas de esterilização cirúrgica (Luukkainen et al., 1986).

Nas mulheres que optam pelo uso do SIU-LNG, quando orientadas sobre a possibilidade de sangramento uterino imprevisível, o método é mais aceito e as taxas de continuação anuais giram em torno de 75% (Nilsson et al., 1981; Faúndes, et al., 1993; Diaz et al., 2000). Um estudo demonstrou que a maioria das usuárias de SIU-LNG (74%) estava muito satisfeita, sendo que 70% tinham escolhido este método devido à insatisfação com a forma de anticoncepção anterior. A satisfação da usuária foi maior quando a mesma recebia informações, no dia da

inserção, sobre possíveis alterações menstruais, sobretudo a ocorrência de amenorréia; aumento de oleosidade da pele e cabelos, risco de gravidez e doença inflamatória pélvica (Backman et al., 2002).

As usuárias de maior idade - entre 35 e 45 anos - apresentam excelente aceitabilidade em relação às mulheres mais jovens, podendo o SIU-LNG ser considerado um dos principais métodos anticoncepcionais para mulheres desta faixa etária (Dubuisson e Mugnier, 2002).

As principais razões que levam a usuária a abandonar o uso do SIU-LNG, em taxas cumulativas em cinco anos por 100 mulheres, são a gravidez, 1,0; expulsão, 5,0; mudanças no padrão menstrual, 16,7; dor, 4,3 e doença inflamatória pélvica 1,2 (Cox et al., 2002).

A maior razão para o descontentamento com o uso do SIU-LNG e que constitui a causa mais comum de descontinuação do uso é o sangramento endometrial imprevisível (Luukkainen et al., 1986; Ji et al., 1990; Sivin et al., 1990). A frequência dos episódios de sangramento é geralmente alta durante os primeiros meses (três a seis meses) após a inserção, com uma melhora gradual com a exposição contínua (Fraser et al., 1996). A porcentagem de mulheres com oligo ou amenorréia foi de cerca de 30% no primeiro ano, em estudo realizado por Ji et al. (1990).

Outro estudo mostrou que, nos seis primeiros meses de uso, 44% das mulheres relatam amenorréia e esta taxa estabiliza em 50% em 12 a 24 meses de uso. O *spotting* ocorre em 25% das usuárias em seis meses e diminui para

8% e 11% aos 18 e 24 meses de uso, respectivamente. A oligomenorréia ocorre em 1/4 das mulheres e esta taxa permanece igual em dois anos de observação. A menorragia e os ciclos regulares ocorrem em poucas mulheres após seis meses de uso (Hidalgo et al., 2002).

Assim como ocorre com os outros métodos anticoncepcionais contendo somente progestógenos, os mecanismos do sangramento endometrial anormal não são bem conhecidos.

1.3. Nestorone: um novo progestógeno

O NES foi desenvolvido no início da década de 80, porém como permanece em fase de desenvolvimento para aplicação clínica ainda é considerado na classificação dos novos progestógenos (Sitruk-Ware, 2006).

Este progestógeno tem a fórmula química 16-metileno-17 α -acetoxi-19-nor-progesterona, sendo inativo por via oral. Portanto, pode ser administrado para anticoncepção no pós-parto, não expondo o lactente à influência do hormônio excretado no leite (Lähteenmäki et al., 1990).

O NES não apresenta ação androgênica, estrogênica e glicocorticóide (Kumar et al., 2000). Consta de uma molécula progestacional “pura”, pois se liga seletivamente aos receptores de progesterona. Caracteriza-se pela ausência de ligação à proteína carreadora de hormônios sexuais. Consiste no mais potente progestógeno com relação à atividade progestacional e anti-ovulatória (Kumar et. al., 2000; Sitruk-Ware, 2006).

A estrutura do implante subdérmico liberador de NES foi desenvolvida pelo *Population Council*, sendo composto, externamente, por um tubo de silicone; na parte central, por uma membrana que limita a liberação da droga e, internamente, pela matriz contendo a medicação (Díaz et al., 1995).

Considera-se que o implante subdérmico liberador de NES determine a anticoncepção por supressão da ovulação através da inibição do pico de gonadotrofinas no meio do ciclo e do desenvolvimento folicular (Faúndes et al., 1999; Brache et al., 2000).

Implantes subdérmicos liberadores de NES, com diferentes doses, também vêm sendo estudados para o alívio da dor provocada pela endometriose (Coutinho e Montgomery, 1999; Ylänen et. al., 2003).

Os implantes liberadores de NES de 150µg/dia promovem eficácia contraceptiva por dois anos, com uma margem de segurança de seis meses (Fraser et al., 2000). Um estudo avaliou 4000 mulheres-meses de exposição e apenas uma gravidez ocorreu próximo ao final do segundo ano de uso, em usuária de doses mais baixas (45 a 50µg/dia) (Díaz et al., 1995).

O Elcometrine consiste em um implante subdérmico liberador de NES de haste única, o qual foi registrado no Brasil como anticonceptivo em 1998 (Coutinho e Montgomery, 1999). Sua vida efetiva é de apenas seis meses e vem sendo estudado para o uso no pós-parto (Croxatto, 2002).

Um implante subdérmico liberador de NES de 4,5cm, contendo 92,7mg $\pm$ 2,4mg (média $\pm$ DP), fornecendo *in vitro* níveis de 125µg/dia, foi avaliado em 300

mulheres em um estudo envolvendo três centros latino-americanos, que são o Instituto Chileno de Medicina Reprodutiva, a Universidade Estadual de Campinas e o Profamilia da República Dominicana. Ocorreram três gestações antes de 18 meses de uso do implante subdérmico e como este fato não era esperado, o estudo foi interrompido. Apesar disso, o implante subdérmico liberador de NES foi considerado seguro e bem tolerado, sendo sugeridas novas investigações (Sivin et al., 2004).

Como outros anticoncepcionais que contêm progestógenos de longa ação, o NES causa alterações menstruais nas usuárias do método, sendo o distúrbio mais freqüente o aumento do número de dias de sangramento e *spotting* em intervalos de 30 dias em aproximadamente 25% das usuárias, as quais apresentam mais de dez dias de sangramento e *spotting* em cada mês (Díaz et al., 1995).

Outro estudo observou que a maioria das mulheres que receberam implantes de NES, de 4cm ou dois de 3cm, experimentaram uma redução do fluxo menstrual no primeiro ano de uso. No entanto, a perda sanguínea apresentou muitas variações individuais e não houve caso de menorragia. Verificou-se um aumento das incidências de amenorréia e oligomenorréia em sucessivos trimestres no primeiro ano de uso e um discreto aumento na ocorrência de sangramento freqüente ou *spotting* (Fraser et al., 2000).

No estudo multicêntrico envolvendo o implante subdérmico liberador de 125µg/dia de NES, do qual a Universidade de Campinas participou, os principais distúrbios menstruais registrados nos calendários menstruais foram o sangramento

irregular e o *spotting*. O *spotting* esteve presente em mais de um terço das mulheres durante os primeiros 18 meses do estudo (Sivin et al., 2004).

Um trabalho sugeriu que a secreção ovariana de estradiol e progesterona, durante o uso do implante subdérmico liberador NES, atua sobre o endométrio e os mecanismos que controlam o padrão menstrual. Esta relação não esteve presente em todos os casos e nestas situações o sangramento endometrial começou ou parou sem mudanças claras na concentração de estradiol. A secreção endógena de progesterona esteve associada com a menor duração do sangramento. Neste estudo, as evidências sugerem que os esteróides femininos exerçam o papel principal no controle do sangramento endometrial em usuárias de progestógenos anticoncepcionais com baixas doses (Faúndes et al., 1999).

Apesar do sangramento uterino imprevisível, a taxa de continuação para o implante subdérmico liberador de NES foi de 90% em um ano (Laurikka-Routti e Haukkamaa, 1992). No estudo multicêntrico, as taxas de continuação no primeiro e segundo anos foram de 80,5 e 66,7 por 100, respectivamente; sendo que as alterações menstruais foram as principais causas de abandono do método (Sivin et al., 2004).

Em relação às alterações morfológicas endometriais e imunoistoquímicas determinadas exclusivamente pelo uso do NES, nenhum estudo foi encontrado até o momento.

1.4. Aspectos morfológicos endometriais em usuárias do SIU-LNG e de outros progestógenos

Sabe-se que o SIU-LNG, na cavidade uterina, induz a uma rápida e dramática diferenciação do endométrio (Nilsson et al., 1978; Silverberg et al., 1986). Estas mudanças são consistentes com a transformação mediada pela progesterona, como observado durante a fase secretória e na gestação. As alterações morfológicas incluem decidualização extensa do estroma, infiltração leucocitária, atrofia glandular e da superfície epitelial; além de alterações vasculares. A atividade secretória das glândulas epiteliais cessa e a função proliferativa do endométrio é inibida. Isto resulta em um afinamento generalizado das camadas funcionais do endométrio. Estas características de supressão endometrial estão presentes desde o primeiro até o sétimo ano de uso do SIU-LNG (Silverberg et al., 1986).

A decidualização é sempre acompanhada por infiltração leucocitária (Martinez–Manautou et al., 1975). A quebra tecidual é uma propriedade inerente do tecido decidualizado. A necrose focal, após um certo período de tratamento com altas doses de progesterona, é freqüentemente observada acompanhando a infiltração leucocitária (Silverberg et al., 1986). Como os leucócitos estão sempre presentes no endométrio normal e na decídua, deve haver alguma influência destes na necrose decidual focal, a qual deve ser ativada pelos leucócitos já presentes ou por aqueles novos que infiltram (Song e Fraser, 1995).

Após três meses de uso do SIU-LNG ocorre aumento da apoptose nas glândulas endometriais e no estroma, o que se associa ao aumento da expressão do antígeno Faz (também chamado CD95 ou Apo1), o qual é considerado um

mediador de apoptose nas células hematopoéticas. Também se observa diminuição da proliferação endometrial associada à diminuição da proteína Bcl-2, a qual atua prevenindo a apoptose celular. Talvez estes sejam alguns dos mecanismos moleculares, pelos quais a inserção do SIU-LNG cause a mudança atrófica do endométrio (Maruo et al., 2001).

Os derivados da 19-nortestoterona, como a norestisterona (NET) e o LNG, apresentam maiores efeitos no estroma, produzem maior decidualização e, conseqüentemente, maior atrofia do que os derivados da progesterona (Dallenbach-Hellweg, 1980). Em alguns casos a atrofia é extrema, observando-se presença de fibrose e calcificação (Silverberg et al., 1986). Estas mudanças morfológicas ocorrem rapidamente, com perda da atividade cíclica após um mês da inserção do SIU-LNG, embora, no início, algumas regiões do endométrio apresentem aparência secretória (Pekonen et al., 1992).

No endométrio exposto ao SIU-LNG, as mudanças morfológicas são muito mais uniformes em comparação com o uso de dispositivo intra-uterino (DIU) não hormonal, onde as alterações estão localizadas na região em contato com o dispositivo. A aparência do endométrio retorna ao normal três meses, após a retirada do SIU-LNG, sendo associada com o completo retorno da fertilidade (Andersson et al., 1992a).

Um estudo demonstrou que, em usuárias do SIU-LNG, a característica endometrial mais encontrada foi a decidualização estromal, acompanhada por atrofia das glândulas endometriais, por um infiltrado de células inflamatórias e por um aspecto papilar da superfície (Phillips et al., 2003).

Micropólipos endometriais vêm sendo identificados como resultado da exposição prolongada intra-uterina ao LNG, havendo um número significativamente maior quando o SIU-LNG permanece pelo menos quatro anos (Silverberg et al., 1986), o que explicaria o sangramento uterino anormal nestas mulheres, as quais não apresentam pólipos no momento da inserção do dispositivo. Qualquer novo padrão de sangramento, após a ocorrência de amenorréia ou a persistência de sangramento volumoso, deve fazer pensar em causa orgânica, como os pólipos endometriais (Brecht et al., 2000).

Um estudo com mulheres usuárias de baixas doses de progestógeno para anticoncepção (noretisterona 300µg/dia), observou mudanças histológicas endometriais não correlatas com a atividade ovariana. Em mulheres sem atividade folicular o endométrio apresentou, ocasionalmente, atividade proliferativa, apesar de níveis baixos de estradiol circulante. Naquelas com atividade folicular, com altos níveis de estradiol, o endométrio variou da hipotrofia até a atrofia. Com ovulação normal houve variação entre atrofia, hipotrofia, atividade secretória irregular ou normal (Kim-Bjorklund et al., 1991).

No início, o uso dos progestógenos de baixa dose não afeta as mitoses estromais, não induz à pseudoestratificação epitelial ou edema e não há infiltração leucocitária (Landgren et al., 1990). Após dois a três meses de uso há aumento focal do edema do estroma e aparecem reações pré-decíduais ou decíduais. Ocorre no endométrio a infiltração local de leucócitos, predominantemente linfócitos e monócitos. A infiltração é vista mais freqüentemente no endométrio de mulheres que sangraram recentemente e menos freqüentemente no endométrio atrófico (Ludwig, 1982).

1.5. Vasos endometriais em usuárias de anticoncepcionais contendo somente progestógenos

Há alguns anos, sabe-se que vasos anormais desenvolvem-se no endométrio de mulheres expostas à ação progestogênica. Porém, apenas recentemente os pesquisadores começaram a compreender as mudanças estruturais e funcionais dos microvasos endometriais (Hickey e Fraser, 2000b).

Tipicamente ocorre redução no número e tamanho das arteríolas espiraladas, bem como diminuição da tortuosidade destes vasos. Além disso, ocorre um aumento no número dos microvasos endometriais em usuárias de progestógenos de baixas doses (Hourihan et al., 1986). Outro estudo demonstrou que baixas doses de progesterona afetam os vasos endometriais, havendo diminuição no número de artérias na junção miométrio-endométrio e aumento no número e na dilatação de veias (Ludwig, 1982; Johannisson et al., 1991).

Nos vasos endometriais superficiais observam-se paredes finas e dilatadas (Hourihan et al., 1986; Song e Fraser, 1995). O papel destes vasos é incerto, pois na avaliação histológica, eles, geralmente, não contêm hemácias e existe dificuldade para confirmar dilatação vascular *in vitro* devido ao colapso rápido dos vasos (Rogers et al., 1993).

Um dos primeiros estudos que relaciona o antigo DIU liberador de 65µg/dia de progesterona (Progestasert) com os microvasos da superfície endometrial, avaliados por microscopia eletrônica, relata que estes se encontravam com número significativamente diminuído. Além disso, verificou que havia um número maior de

vasos com alterações degenerativas, quase três vezes mais que os controles, porém estes não apresentavam inibição na resposta hemostática. Concluiu que a ausência de inibição da hemostasia e a diminuição do número de vasos atuariam reduzindo a perda sanguínea através dos vasos lesados (Shaw et al., 1981).

O uso do implante subcutâneo Norplant® foi relacionado com um marcado impacto na arquitetura vascular, com diminuição na expressão de componentes da membrana basal das células endoteliais. Estas mudanças não se relacionaram, diretamente, com a ocorrência do sangramento irregular, mas a redução da matriz extracelular reflete o aumento da fragilidade vascular (Hickey et al., 1999).

No entanto, foi após o uso do anticorpo anti-CD34 - marcador de células endoteliais - em técnica de imunoistoquímica, que foi possível observar um número maior de pequenas estruturas endoteliais do que aquelas detectadas por técnicas histológicas convencionais (Rogers et al, 1993; Hickey et al., 1999). Com a imunoistoquímica observou-se um surpreendente aumento na densidade vascular, mais de 50%, após o uso de Norplant® quando comparado aos controles (Rogers et al., 1993; Hickey et al., 1999). Este aumento começou logo após a inserção do implante, atingiu o máximo entre três e seis meses de exposição, retornando gradualmente à densidade normal com o tempo (Hickey et. al., 1999). Este retorno pode estar associado ao declínio sérico gradual dos níveis liberados de LNG e ao aumento da secreção endógena de estradiol (Jones e Critchley, 2000).

O primeiro trabalho publicado sobre os efeitos na angiogênese endometrial de diferentes doses e progestógenos *in vivo* demonstrou que o NET e o AMP-D

estimulavam a angiogênese em todas as doses. O LNG estimulou a angiogênese em doses entre 100pmol/l e 10nmol/l, mas não em altas doses. Em contraste, o acetato de nomegestrol estimulou a angiogênese em altas, mas não em baixas doses. Além disto, demonstrou que em usuárias de SIU-LNG, por cerca de três anos, a densidade microvascular estava aumentada (Hague et al., 2002).

A exposição ao Norplant®, embora tenha uma dose muito menos efetiva que o SIU-LNG sobre o endométrio, resulta em mudanças vasculares que podem ser observadas por histeroscopia; que incluem presença de petéquias e equimoses na superfície endometrial (Hickey et al., 1996a, 1998; Hickey e Fraser, 2000b).

Quando se comparou a histeroscopia de usuárias de Norplant® com a de portadoras de menorrágia disfuncional, observou-se, no primeiro grupo, que a superfície endometrial estava coberta por um número maior de vasos sanguíneos, sendo que esta superfície era maior naquelas com sangramento freqüente ou prolongado e com *spotting*. A superfície vascular desigual, com aparência neovascular e em mosaico foi comumente vista nas usuárias de Norplant®, mas não no outro grupo. Glândulas proeminentes e abertas, com muco espesso, foram comumente observadas no endométrio das usuárias de Norplant® e pequenos pólipos sésseis foram vistos em seis de 34 casos (Hickey e Fraser, 2002).

Os anticorpos anti-CD31, anti- α -actina e miosina de músculo liso, foram utilizados em reações de imunoistoquímica, em peças de histerectomia, em grupos de portadoras de menorrágia, usuárias do SIU-LNG, por dois a quatro meses, em comparação com não usuárias. Observaram-se vasos alargados e com paredes

finas no grupo tratado, mas quase completamente ausentes no grupo-controle. O número de secções transversais de vasos por unidade de área e o diâmetro do mais largo lúmen foram significativamente maiores após tratamento com SIU-LNG (Mcgavigan et al., 2003).

Um outro estudo, no qual foi utilizado o marcador de células endoteliais CD-31, demonstrou que em usuárias do SIU-LNG a densidade vascular encontra-se diminuída e a área média dos vasos significativamente aumentada quando comparado com o endométrio de ciclos menstruais normais (Jondet et al., 2005).

Todas estas características anormais dos microvasos superficiais agora são evidentes no endométrio de mulheres expostas à ação progestogênica prolongada. Considera-se seguro afirmar que estes vasos, anormais e frágeis, de alguma forma estão relacionados ao sangramento irregular de muitas mulheres usuárias destes agentes. No entanto, os distúrbios moleculares que determinam a angiogênese e a fragilidade vascular anormal ainda não são claros (Fraser e Hickey, 2000).

Experiências em animais sugerem que a inibição da angiogênese pode prevenir o completo desenvolvimento endometrial (Klauber et al., 1997) e o uso futuro destes agentes talvez previna o aparecimento destes vasos anormais e frágeis, evitando o sangramento endometrial imprevisível em usuárias de progestógenos de ação prolongada (Fraser e Hickey, 2000; Hague et al., 2002).

1.6. Leucócitos endometriais

Postula-se que a menstruação resulte de um processo inflamatório no qual os leucócitos desempenham um papel-chave através da produção de moléculas, incluindo citocinas e proteases (Salamonsen e Lathbury, 2000). Alterações no padrão dos leucócitos endometriais têm sido observadas em resposta ao tratamento com anticoncepcionais contendo progestógenos. No entanto, o papel dos leucócitos na patogênese do sangramento uterino anormal, em usuárias de esteróides, não foi esclarecido (Vincent e Salamonsen, 2000).

O conceito de que a menstruação resulta de um processo inflamatório foi inicialmente postulado por Finn (1986). A hipótese foi originalmente baseada em características do endométrio durante a fase secretora, como o fluxo de leucócitos, a presença de edema e de células decidualizadas (Salamonsen e Lathbury, 2000).

Os leucócitos têm o potencial de contribuir direta e indiretamente para a ocorrência da menstruação. Alguns de seus produtos promovem a destruição tecidual, enquanto outros ativam enzimas latentes produzidas por células adjacentes ou estimulam estas células a produzir moléculas biologicamente ativas.

Existe um aumento no número total de leucócitos no endométrio previamente à menstruação, onde constituem mais de 40% do número total de células dentro do compartimento estromal (Salamonsen e Woolley, 1999).

Em particular, as células da linhagem mielóide - neutrófilos, eosinófilos, macrófagos ou monócitos - são abundantes. Os mastócitos encontram-se altamente

ativados, liberando componentes granulares ao microambiente local. As células de origem linfóide, particularmente as *natural killer* uterinas, estão também presentes em número substancial, mas também aparecem precocemente durante a fase secretória, indicando um papel primário na implantação e estabelecimento da gravidez (King et al., 1989; Trundley e Moffett, 2004).

1.6.1. Neutrófilos

De forma genérica, são chamados de granulócitos os leucócitos que, na avaliação histológica, apresentam núcleo de forma irregular e citoplasma com grânulos específicos. De acordo com a afinidade tintorial de seus grânulos citoplasmáticos, distinguem-se três tipos: neutrófilos, eosinófilos e basófilos. Os neutrófilos têm núcleo formado por dois a cinco lóbulos ligados entre si por finas pontes de cromatina (Junqueira e Carneiro, 1999).

Os neutrófilos correspondem à população de leucócitos mais abundante no sistema imune humano, sendo que estão associadas à destruição dos tecidos nos distúrbios inflamatórios. Essas células são identificadas no tecido endometrial através de sua morfologia e da imunolocalização da sua protease específica, a elastase (Salamonsen e Woolley, 1999).

Os neutrófilos são encontrados em pequeno número no endométrio normal, mas a quantidade aumenta, dramaticamente, no período perimenstrual. Além disso, são encontrados em áreas de colapso estromal no endométrio de mulheres tratadas com altas doses de progestógenos orais (Song et al., 1998) ou com implantes de

LNG (Norplant®) (Vicent et al., 1999), onde eles alcançavam densidades semelhantes às vistas no endométrio menstrual (Salamonsen e Lathbury, 2000).

1.6.2. Eosinófilos

Os eosinófilos funcionam como células efetoras que desempenham um importante papel na patogênese da reação inflamatória do tipo tardia e, embora não sejam observados na mucosa endometrial normal, têm seu número aumentado apenas no pré-mênstruo (Salamonsen e Lathbury, 2000).

Os eosinófilos apresentam, na avaliação histológica, núcleo bilobulado. A sua principal característica para identificação é a presença de granulações que coram pela eosina (granulações acidófilas) (Junqueira e Carneiro, 1999).

1.6.3. Monócitos/Macrófagos

Os macrófagos são monócitos diferenciados que migram da corrente sangüínea. Estas células são parte integrante da resposta imune em lesões inflamatórias crônicas e são encontradas em sítios de remodelação tecidual (Bonatz et al., 1992).

O aumento do número de macrófagos no endométrio ocorre no pré-mênstruo e em usuárias de Norplant®, sobretudo em mulheres com sangramento uterino anormal (Salamonsen e Lathbury, 2000). Os macrófagos encontram-se espalhados através do tecido, com algumas células agregadas e outras se concentrando ao redor das glândulas endometriais (Song e Fraser, 1995).

Junto dos plasmócitos e dos linfócitos, os monócitos (macrófagos) também são conhecidos como leucócitos mononucleares, pois, na avaliação histológica, têm núcleo de forma mais regular e o citoplasma não possui granulações específicas.

Os macrófagos são células com grande capacidade de fagocitose, apresentam núcleo ovóide ou reniforme e sua morfologia varia conforme seu estado funcional (Junqueira e Carneiro, 1999).

1.6.4. Mastócitos

Os mastócitos são células do tecido conjuntivo originadas a partir de células mesenquimatosas, e sua principal função consiste em armazenar potentes mediadores inflamatórios como a histamina, heparina, fator quimiotático de eosinófilos, serotonina e fatores quimiotáticos de neutrófilos (Junqueira e Carneiro, 1999).

Secretam muitas moléculas vasoativas, pró-inflamatórias, que determinam infiltração de leucócitos, os quais levam à lesão tecidual devido à liberação de proteases. O número destas células também aumenta no pré-mênstruo (Salamonsen e Lathbury, 2000).

Na avaliação histológica, os mastócitos são ricos em grânulos azulados pela coloração de hematoxilina-eosina (HE) e detectados por imunoistoquímica através das proteinases específicas triptase e quinase, sendo que a localização extracelular da enzima triptase é indicativa de ativação (Jeziorska et al., 1995). Além disso, parecem regular a produção e ativação das enzimas metaloproteinases pelas

células estromais endometriais *in vitro*, postulando assim o seu envolvimento na regulação da ação das metaloproteinases na menstruação (Zhang et al., 1998), como será descrito a seguir.

1.6.5. Linfócitos

Os linfócitos são leucócitos mononucleares que são identificados à microscopia óptica por apresentarem núcleo esférico, com citoplasma muito escasso e basofilia discreta. Por vezes, o citoplasma não é visível (Junqueira e Carneiro, 1999).

Os linfócitos são divididos em T, B e células *Natural Killer* (NK), também denominadas como células granulares endometriais. Os linfócitos T são responsáveis pela resposta imune celular, os linfócitos B pela imune humoral e as NK pela resposta imune inespecífica, sem a necessidade de um estímulo prévio (Junqueira e Carneiro, 1999).

Os **linfócitos T** apresentam-se, no endométrio, em número muito menor que os demais leucócitos (1% a 2 % do total de células linfomielóides) e são encontradas em três sítios: no endométrio basal, estroma e epitélio.

São conhecidas subpopulações de linfócitos T com diferentes funções. Dentre eles, os linfócitos T *helper* atuam facilitando as reações imuno-reguladoras, os T supressores apressam o término da resposta imunitária e os T citotóxicos - também denominados de “células matadoras” - reconhecem antígenos de histocompatibilidade e matam células estranhas, neoplásicas ou infectadas por

vírus (Cotran et al., 1991a). As células T *helper* encontram-se no endométrio em maior número que as T citotóticas. A progesterona determina uma diminuição da atividade dos linfócitos T citotóxicos (Salamonsen e Lathbury, 2000).

Os linfócitos B são detectados em pequeno número durante o ciclo menstrual e na fase perimenstrual são encontrados em grupos entre as células estromais. Não se sabe se estas células produzem imunoglobulinas no endométrio.

Os **linfócitos granulares endometriais (células *natural Killer*)** são as células hematopoéticas mais numerosas no endométrio perimenstrual, sugerindo um possível papel contra infecção e preparação para a gravidez (Salamonsen e Lathbury, 2000).

Os vários linfócitos não podem ser diferenciados morfologicamente e sua caracterização é feita através de reações imunocitoquímicas.

O número relativo dos diferentes tipos leucocitários no tecido endometrial, nos dias 26 a 28 do ciclo, pode ser sumariado como a seguir: macrófagos (6%-15% do total de células endometriais), neutrófilos (6%-15%), linfócitos granulares endometriais (6%-15%), eosinófilos (3%-5%), células T (1%-2%), células B (1%-2%) e mastócitos (3%-5%) (Salamonsen e Lathbury, 2000) (Quadro 1).

Quadro 1 - Distribuição relativa de células inflamatórias específicas no endométrio funcional nos três estágios do ciclo menstrual normal

	Fase proliferativa	Fase secretora	Menstruação
Dia do ciclo	10 – 12	22 – 23	26 – 28
Macrófagos (CD68+)	+	++	+++
Eosinófilos	-	-	++
Neutrófilos	-	-	+++
Mastócitos	++	++	++
Linfócitos T (CD3+)	+	+	+
Linfócitos B (CD45RD+)	-/+	-/+	+
Linfócitos granulares	-	+ / ++	+++

Os sinais -, +, ++, +++ representam valores de 0, 1 - 2, 3 - 5 e 6 – 15% do total de células, respectivamente (Modificado de Salamonsen e Woolley, 1999).

Somente macrófagos e mastócitos apresentam uma distribuição uniforme nos dias 26 a 28 do ciclo; os demais, usualmente, apresentam distribuição focal antes da menstruação (Salamonsen e Woolley, 1999).

Um estudo recente comparou grupos com e sem sangramento uterino em usuárias do SIU-LNG. Verificou no endométrio aumento significativo de célula *natural Killer* no grupo com sangramento uterino e ausência de diferença, entre os grupos, com relação à presença de neutrófilos e mastócitos (Peloggia et al., 2006).

Não se sabe como os neutrófilos e outros leucócitos penetram e são ativados no endométrio, pois se considera que as quimiocinas executem este papel (Salamonsen et al., 2000). As quimiocinas são substâncias liberadas pelas células epiteliais ou estromais que determinam a migração unidirecional de células para um ponto atrativo, ou seja, determinam uma locomoção orientada ao longo de um gradiente químico (Cotran et al., 1991b).

Um trabalho recente verificou a presença abundante de nove quimiocinas endometriais, as quais promovem um recrutamento seletivo de subpopulações leucocitárias necessárias na gestação e na menstruação. Essas subpopulações permitem que haja um grande número de macrófagos e células *natural Killer* no sítio de implantação gestacional, evitando a invasão trofoblástica. Na ausência de gestação, permitem um intenso recrutamento de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos, o que levaria ao fluxo menstrual (Jones et al., 2004).

Outro estudo demonstrou que a expressão de quimiocinas encontra-se desregulada no endométrio de usuárias do SIU-LNG ou de implante subdérmico de LNG, o que contribuiria para um aumento do recrutamento leucocitário, levando à fragilidade endometrial e ao sangramento uterino anormal nestas mulheres (Jones et al., 2005).

1.7. As enzimas matriz-metaloproteinases e o endométrio

Atualmente, considera-se que a quebra do tecido endometrial, levando à menstruação, decorra da produção e ativação de um grande número de enzimas denominadas matriz-metaloproteinases (MMP). Esses processos ocorrem imediatamente antes e durante a menstruação e decorrem do distúrbio no balanço entre estas enzimas e seus inibidores naturais, denominados inibidores teciduais das metaloproteinases (ITMP) (Salamonsen et al., 2000).

Desde o início da década de 80, as MMP foram relacionadas à carcinogênese. O desenvolvimento de técnicas bioquímicas e biomoleculares

mais sofisticadas permitiu a identificação de proteases específicas (Chambers e Matrisian, 1997). Segundo revisão realizada por estes autores, desde os trabalhos de Liotta et al. (1980), o interesse maior voltou-se para as collagenases tipo IV, atualmente conhecidas como gelatinases A (72kDa-colagenase tipo IV ou MMP-2) e B (92 kDa-colagenase tipo IV ou MMP-9).

Diversos autores referiram associações entre MMP e a progressão tumoral. Sabe-se, atualmente, que o número de MMP detectadas e seus valores individuais aumentam com a progressão tumoral (Chambers e Matrisian, 1997; Graesslin et al., 2006).

A partir da década de 90, a relação das MMP com as fases do ciclo menstrual passou a ser estudada (Soini et al., 1997). As MMP são uma família de proteases zinco-dependentes que atuam em substratos específicos para colágenos, proteoglicanos e outros, sendo responsáveis pela degradação de componentes do interstício e da membrana basal extracelular. Sua síntese é mínima no tecido conectivo normal, sendo maior em condições patológicas, nas quais a quebra tecidual está presente. No endométrio, onde a remodelação ocorre ciclicamente durante os anos reprodutivos, o papel das MMP é considerado decisivo (Salamonsen et al., 2000).

As MMP são secretadas, em sua maioria, na forma latente, sendo ativadas no meio extracelular por uma variedade de proteases. Uma vez ativada, a enzima pode ter sua ação bloqueada por um dos quatro ITMP. Se o balanço entre MMP e ITMP é insuficiente, ocorre degradação da matriz extracelular; se isto

ocorre sem controle, determina uma completa destruição do tecido. Portanto, é necessário que ocorra uma maciça produção das MMP para a rápida e extrema destruição tecidual vista na menstruação (Salamonsen et al., 2000).

Muitos estudos descrevem a expressão do RNAm e da proteína que origina a MMP, bem como sua localização celular no endométrio humano durante o ciclo menstrual normal mediante o uso da hibridização *in situ* e estudos imunoistoquímicos (Quadro 2).

Quadro 2 – Localização celular das enzimas matriz-metaloproteinases (MMP) e dos inibidores teciduais das MMP (ITMP) no endométrio humano perimenstrual e menstrual

MMP	Sinônimo	Localização celular do RNAm	Localização celular da proteína
MMP-1	Colagenase intersticial	Estroma, arteríolas e pequenos vasos	Estroma, pontos focais
MMP-2	Gelatinase 17	Estroma, epitélio	Estroma, endotélio, epitélio
MMP-3	Stromelysin 1	Estroma adjacente ao epitélio, associado com membrana basal e na estrutura dos vasos sanguíneos	Estroma, pontos focais
MMP-7	Matrilysin	Epitélio glandular	Epitélio glandular
MMP-9	Gelatinase 9	N, M	N, M, EO (nos vasos sanguíneos), glândulas epiteliais e estroma.
MMP-10	Stromelysin 2	Estroma	Estroma
MMP-11	Stromelysin 3	Estroma	Estroma (baixa concentração)
MTI-MMP		Não examinado	Epitélio, algumas áreas de estroma decidualizado
MMP-14			Glândulas epiteliais
ITMP-1		Epitélio e estroma periglandular	Epitélio, estroma, musculatura vascular
ITMP -2		Não examinado	Epitélio, estroma, musculatura vascular
ITMP -3		Não examinado	Epitélio, estroma, musculatura vascular

Dados obtidos por hibridização e estudos imunoistoquímicos. N= neutrófilos; M = macrófagos/monócitos; EO = eosinófilos; MT = tipo membrana (modificado de Salamonsen e Woolley, 1999 e atualizado segundo Goldman e Shalev, 2003).

Como demonstrado anteriormente, no pré-mênstruo e durante a menstruação, a maioria das MMP é produzida por células estromais, embora a MMP-7 seja um produto das células epiteliais e a MMP-9 seja produzida por eosinófilos, neutrófilos e macrófagos.

Observa-se também que as MMP podem ser divididas em quatro subfamílias maiores, que são as collagenases (MMP-1), gelatinases (MMP-2, MMP-9), estromelisinases (incluindo a MMP-3) e MT-MMP (Salamonsen e Lathbury, 2000).

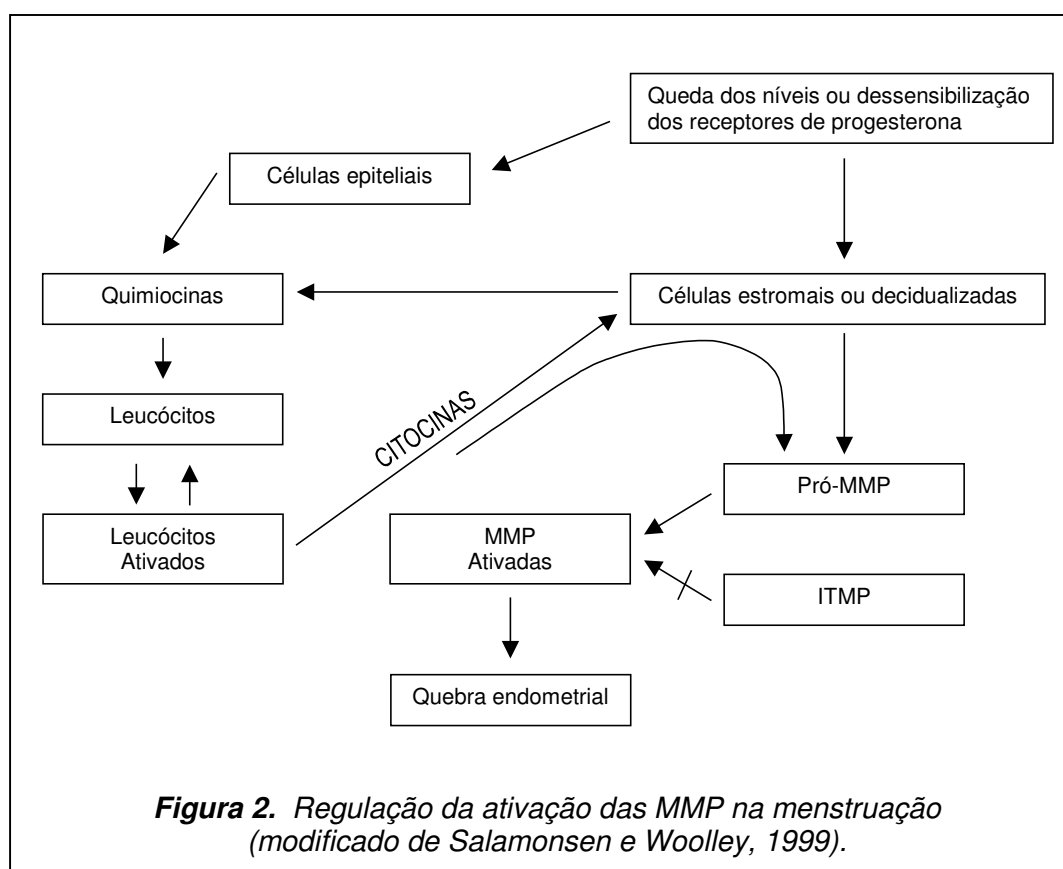
Em estudos *in vitro* observou-se que as MMP podem ser reguladas no endométrio, por fatores endócrinos e parácrinos. Em relação aos mecanismos endócrinos, a progesterona é o fator mais importante quando ocorre queda nos níveis de sua produção, no endométrio decidualizado ocorre aumento na produção de MMP-1, 2 e 3.

Dentre os fatores parácrinos considera-se o papel dos leucócitos, através da produção de citocinas: interleucina 1, fator de crescimento β , fator de necrose tumoral α e proteases, incluindo a neutrófilo elastase. As citocinas têm papel crítico na produção e ativação das MMP que determinam a menstruação (Salamonsen et al., 2000).

Recentemente foi observado um aumento acentuado da triptase mastocitária endometrial, dentre as usuárias do SIU-LNG com sangramento uterino, a qual consiste em enzima fundamental na ativação da MMP-3 (Peloggia et al., 2006).

Considera-se que a queda dos níveis ou a dessensibilização dos receptores de progesterona, através da produção de quimiocinas pelas células estromais e epiteliais, parece induzir a entrada e a ativação dos leucócitos no endométrio. Estas células parecem determinar uma maciça produção de citocinas que levam à ativação das Pró-MMP ou talvez promovam, diretamente, a produção das MMP (Figura 2).

As proteases liberadas por células migratórias ou mastócitos ativados talvez ativem as MMP latentes. Algumas MMP ativadas podem ativar outras MMP. A degradação da matriz extracelular endometrial e das membranas basais resulta na fragilidade dos vasos sanguíneos e na perda de tecido endometrial (Salamonsen e Woolley, 1999).



Verifica-se, pelo esquema anterior, que a queda dos níveis ou a dessensibilização dos receptores de progesterona, através da produção de quimiocinas pelas células estromais e epiteliais, parece induzir a entrada e a ativação dos leucócitos no endométrio. Estas células parecem determinar uma produção maciça de citocinas que levam à ativação das Pró-MMP ou talvez promovam, diretamente, a produção das MMP.

As proteases liberadas por células migratórias ou mastócitos ativados talvez ativem as MMP latentes. Algumas MMP ativadas podem acelerar outras MMP. A degradação da matriz extracelular endometrial e das membranas basais resulta na fragilidade dos vasos sanguíneos e na perda de tecido endometrial (Salamonsen e Woolley, 1999).

A imunolocalização da MMP-9 foi descrita em biópsias endometriais de mulheres usuárias de Norplant®, em neutrófilos, eosinófilos, sobretudo naquelas com morfologia endometrial descamativa. Não foi observada correlação entre o número de células positivas para MMP-9 e o número de dias de sangramento (Vicent et al., 1999).

A imunorreação para ITMP foi demonstrada no endométrio de usuárias de AMP-D, estando presente em todos os compartimentos, porém com uma significativa diminuição no epitélio (ITMP -1 e ITMP -2), no estroma (ITMP -1, ITMP -2, ITMP -3), no endotélio (ITMP-1 e ITMP -2) e na musculatura vascular lisa (ITMP-1) em comparação com controles (biópsias endometriais de mulheres no período pré-menstrual ou menstrual). Este estudo demonstrou aumento do influxo de

células positivas para MMP-9 (neutrófilos e células TCD3+), macrófagos e células *natural Killer* no endométrio de usuárias de AMP-D de forma semelhante ao de mulheres no período perimenstrual (Vincent et al., 2002).

Estudo envolvendo usuárias de Norplant® demonstrou que, durante os episódios de sangramento, os níveis de LNG e de hormônio sexuais não apresentaram variações, quando comparados aos do período sem sangramento, exceto por um discreto decréscimo na concentração de estradiol. No entanto, a expressão e ativação da MMP-3, em material de biópsia endometrial, encontrava-se consistentemente aumentada no início dos episódios de sangramento.

Além disto, a MMP-3 foi imunolocalizada nas células estromais com áreas de quebra tecidual com sangramento endometrial severo, mas não em área sem sangramento. Estas observações sugerem que a expressão e ativação da MMP-3 participam na iniciação dos episódios de sangramento em usuárias de Norplant® (Marbaix et al., 2000).

Em outro trabalho observou-se a presença de MMP-1 e 3 em células estromais e na matriz extracelular adjacente, bem como de MMP-9 em vários subtipos de leucócitos em usuárias de Norplant® ou de acetato de medroxiprogesterona na forma de depósito, em comparação com controles normais (Vincent e Salamonsen, 2000).

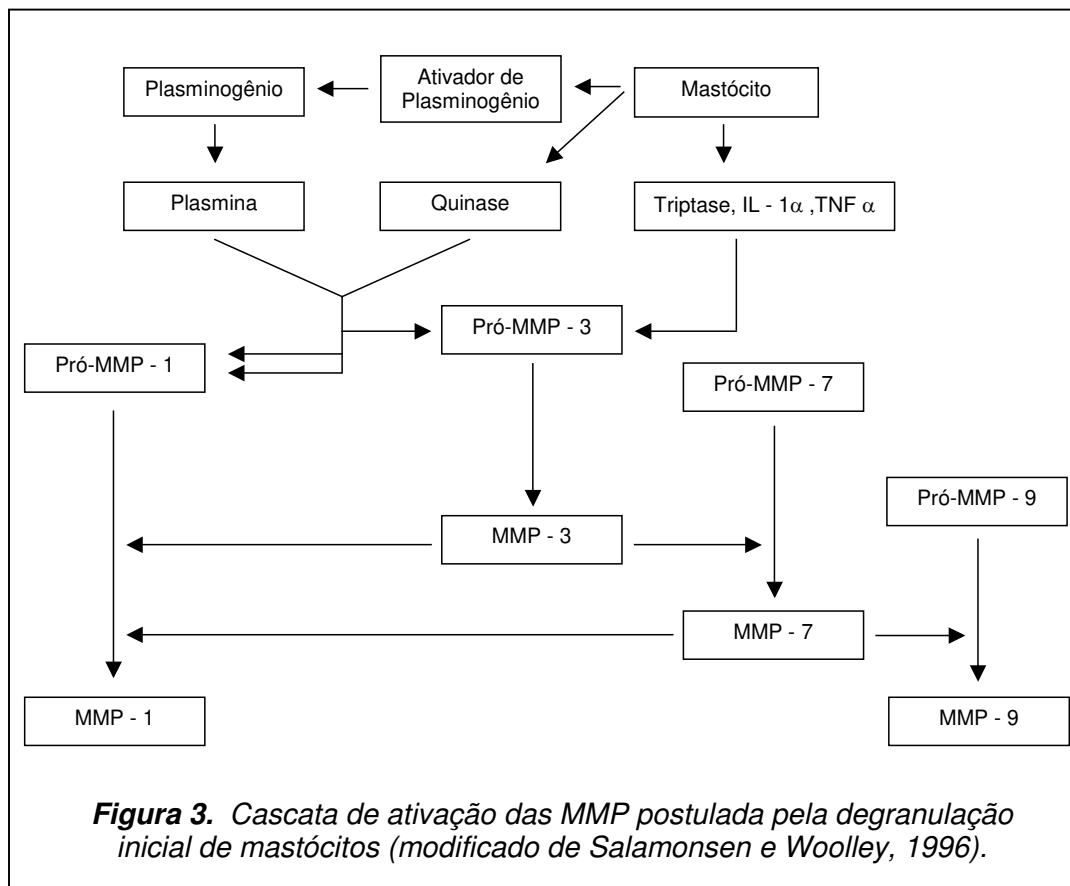
Também verificaram que nas usuárias de anticoncepcionais contendo somente progestógenos, a extensão das MMP endometriais, a imunolocalização de neutrófilos, eosinófilos e de mastócitos ativados foi similar ou maior que aquela

observada no grupo-controle com mulheres no período perimenstrual. Níveis maiores de MMP-1 foram observados em usuárias de Norplant® quando comparados às usuárias de AMP-D. Nenhuma correlação foi observada com o número de dias de sangramento (Vincent e Salamonsen, 2000).

Diante disso, torna-se bastante sugestivo que a expressão e ativação das MMP participem na iniciação dos episódios de sangramento em usuárias de anticoncepção contendo apenas progestógenos. As MMP mais estudadas no endométrio são as 1, 3 e 9 (Salamonsen et al., 2000).

A MMP-3 apresenta um extenso alcance de ação, degradando múltiplos componentes da matriz extracelular, incluindo proteoglicanos e a região não helicoidal do colágeno (Clavel et al., 1992).

A ativação das MMP somente se inicia após um passo crítico, que constitui a ativação da MMP-3 (Salamonsen e Lathbury, 2000), como demonstrado na Figura 3, a qual mostra a cascata de ativação das MMP postulada pela degranulação inicial de mastócitos.



A MMP-3 também ativa a Pró-MMP-1 e a Pró-MMP-9 (Marbaix et al., 2000). Diante destas significativas ações, o envolvimento da MMP-3 no processo de quebra do estroma endometrial é investigado neste trabalho.

Observa-se, com essa revisão da literatura, que não há um consenso sobre a patogênese do sangramento uterino anormal associado ao uso dos anticoncepcionais contendo apenas progestógenos.

Este trabalho tem como objetivo verificar se existem diferenças quanto aos aspectos histológicos endometriais, a densidade e o calibre microvascular e a

quantificação da matriz-metaloproteinase-3 em usuárias do SIU-LNG ou do implante subdérmico liberador de NES, em grupos com e sem sangramento uterino.

O presente estudo consiste no primeiro - do qual teve origem uma série que está sendo realizada na Unidade de Reprodução Humana do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) - que visa avaliar as características do endométrio de usuárias de progestógenos de longa duração.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Comparar os aspectos histológicos endometriais, a densidade e o calibre dos vasos da mucosa endometrial, bem como a quantificação da MMP-3 em usuárias do SIU-LNG ou do implante subdérmico liberador de NES, nos grupos com e sem sangramento uterino.

2.2. Objetivos específicos

Comparar, nos grupos de usuárias do SIU-LNG ou do implante subdérmico liberador de NES , com e sem sangramento uterino:

- a classificação do padrão histológico do endométrio;
- a presença ou não de endometrite, necrose estromal, erosão de superfície da mucosa endometrial com reepitelização focal e colapso estromal;

- o grau de pseudoestratificação das glândulas e do edema estromal;
- a quantificação de mitoses, leucócitos, eosinófilos, plasmócitos, glândulas, mitoses no epitélio glandular, área, perímetro, maior e menor diâmetro e altura glandular;
- a densidade e o maior diâmetro dos vasos da mucosa endometrial;
- a quantificação da expressão imunoistoquímica da MMP-3.

3. Publicações

Artigo 1

Correlation between endometrial histology, microvascular density and calibre, matrix metalloproteinase-3 and bleeding pattern in women using levonorgestrel-releasing intrauterine system (Mirena®)

Artigo 2

Endometrial histology, microvascular density and caliber, and matrix metalloproteinase-3, in users of the Nestorone®-releasing contraceptive implant with and without endometrial breakthrough bleeding

Correlation between endometrial histology, microvascular density and calibre, matrix metalloproteinase-3 and bleeding pattern in women using a levonorgestrel-releasing intrauterine system

Marilia Oliveira-Ribeiro¹, Carlos A. Petta^{1,3}, Líliliana A.L. De Angelo Andrade², Luis Bahamondes¹ and Margarete M. Hidalgo¹

¹Human Reproduction Unit, Department of Obstetrics and Gynaecology and ²Department of Pathology, School of Medicine, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil

³To whom correspondence should be addressed at: Caixa Postal 6181, 13084-971, Campinas, SP, Brazil. E-mail: cpetta@attglobal.net

BACKGROUND: The main reason for discontinuation of the levonorgestrel-releasing intrauterine system (LNG-IUS) is unpredictable bleeding pattern. **METHODS:** The objective of the study was to evaluate the endometrial histology, microvascular density and calibre, and the quantification of matrix metalloproteinase (MMP-3) in long-term users of LNG-IUS, with and without bleeding. Endometrial biopsies were obtained from 58 healthy women, 29 who maintained some degree of endometrial bleeding and 29 who were amenorrhoeic. **RESULTS:** In the histological analysis, the majority of samples displayed a progestin-modified appearance. The major glandular diameter and the perimeter were significantly greater in the group of women with amenorrhoea. A significantly higher number of leukocytes was found in the group with bleeding ($P = 0.014$). No significant correlation was observed between the microvascular density or calibre and the bleeding pattern. MMP-3 showed a significantly higher number of reactive cells ($P = 0.005$) in the group who maintained some degree of bleeding. **CONCLUSIONS:** Women using LNG-IUS who maintained endometrial bleeding during its use presented a higher number of leukocytes and MMP-3 in the endometrium when compared to women using LNG-IUS who became amenorrhoeic. However, the results did not provide evidence for microvascular pattern changes.

Key words: endometrial bleeding/intrauterine levonorgestrel/leukocytes/MMP-3/microvessels

Introduction

The progestogen-only contraception methods are used by an considerable number of women. They provide long-term action and high efficacy. The 20 µg/day levonorgestrel-releasing intrauterine system (LNG-IUS) is associated with a 97% reduction in menstrual blood loss (Andersson and Rybo, 1990; Milson *et al.*, 1991), and the predominant bleeding pattern among Brazilian women was amenorrhoea, present in ~50% after 1 year of use (Hidalgo *et al.*, 2002). Despite the reduction in menstrual bleeding, unpredictable breakthrough bleeding is the most common reason for discontinuation of use of the method in LNG-IUS users and other progestogen-only contraceptives.

The mechanism leading to episodes of bleeding remains to be elucidated (D'Arcangues *et al.*, 1992; Findlay, 1996; Hickey *et al.*, 1999; Fraser and Hickey, 2000). Changes in the endometrial steroid receptor profile, with down-regulation of the receptor for estrogen and both isoforms of the progesterone receptor (Critchley *et al.*, 1998b), alterations in

endometrial histology, endometrial vascular morphology, function and haemostasis, and endometrial repair mechanisms are all possible mechanisms to explain bleeding (Fraser *et al.*, 1996).

The role of matrix metalloproteinases (MMP) in endometrial breakdown that triggers menstruation has been described previously (Salamonsen and Woolley, 1996, 1999). This study aimed to assess the histological appearance, including the number of leukocytes, the microvascular density and calibre, and the quantification of MMP-3 in the endometrium of long-term users of LNG-IUS who maintain some degree of endometrial bleeding or among those who were amenorrhoeic.

Materials and methods

This study was conducted at the Human Reproduction Unit, Department of Obstetrics and Gynaecology, School of Medicine, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil. Institutional Review Board approval was obtained and all women signed an informed consent form before joining the study.

The sample size was established in 28 women in each group. This figure was estimated based on a 40% difference between users of LNG-IUS with and without bleeding and with alpha of 0.05 and beta of 0.20. A total of 58 users of LNG-IUS (Mirena[®]; Leiras/Schering Oy, Finland) for contraception for >3 years were enrolled.

Endometrial specimens were carefully obtained by biopsy (Pipelle de Cornier, Prodimed, Neuilly-en-Thelle, France) at the outpatient clinic without anaesthesia to try to obtain material from the whole wall of the uterine cavity. In the cases in which the material was scanty it was useful for the histological quantitative analysis but not for other analyses. The other findings were obtained from 22 out of 29 samples from the group with bleeding and 18 out of 29 samples from the group with amenorrhoea, because the tissue was atrophic and the material was scant (Mazur and Kurman, 1995) that did not allow for an adequate analysis of those parameters. Usually, these specimens are often reported as insufficient or inadequate for analysis (Wang *et al.*, 1995; Marbaix *et al.*, 2000; Vincent *et al.*, 2000). However, scant tissue may be representative of the lining of the uterine cavity as a whole (Mazur and Kurman, 1995).

The women included in this study answered a questionnaire about their menstrual pattern after the insertion of the LNG-IUS. Women were considered belonging to the group of no bleeding if they had not presented any uterine bleeding in the 3 months prior to the biopsy. The women assigned to the group with bleeding were those who had presented some uterine bleeding in the 3 months prior to joining the study but were not bleeding at the time the endometrial biopsy was taken.

The biopsies were fixed in 10% buffered neutral formalin, dehydrated, embedded in paraffin and cut at 4 mm, deparaffinized, rehydrated, stained with haematoxylin and eosin (HE) according to standard protocols and submitted to immunohistochemical analysis. The qualitative histological analysis was performed with the use of a Nikon E-200 microscope. The histological and immunohistochemical quantitative analyses were performed on the captured image, with the use of a Nikon E-200 microscope, a Nikon Coolpix-95 videocamera coupled to a computer with a special plate and software for image analysis (Imagelab[®], Brazil).

Endometrial histology

The morphometric assessment was similar to that used by Wang *et al.* (1995): five randomly selected high power fields ($\times 400$ objective) were assessed for the qualitative and quantitative analyses. Each sample was classified into the histological pattern, and they were considered suitable for the qualitative and quantitative analyses if the section contained both glands and stroma, and if at least five random fields could be counted at a $\times 400$ magnification.

The qualitative analysis included the following histological patterns: (i) proliferative: features consistent with the proliferative phase of the normal cycle; (ii) secretory: consistent with the secretory phase of the normal cycle; (iii) progestogenic: evidence of exogenous progestogenic effects, small glands with cuboidal or low columnar epithelia and decidualized stroma; (iv) atrophic: endometria with very little dense stroma, reduced glands with small cuboidal epithelial cells (Hickey *et al.*, 1999) or scant or absent material (Mazur and Kuman, 1995). Endometritis (defined by the presence of plasma cells or eosinophils), stromal necrosis, mucosal collapse, superficial erosion with epithelial re-epithelization, glandular pseudostratification and edema, were the other qualitative characteristics analysed in this study.

The number of stromal mitoses, leukocytes, eosinophils, glands, glandular mitoses and measurements of the glandular area and perimeter, major and minor glandular diameter, and height of the glandular epithelium were the parameters morphometrically assessed

in five high power fields ($\times 400$). The leukocytes were morphologically identified by the size of the cell and the characteristic nuclear pattern. When presenting cytoplasmic granules, they were classified as eosinophil leukocytes and when presenting eccentric nuclei and chromatin with typical distribution they were identified as plasma cells.

Endometrial vessels

The endometrial microvasculature was visualized using immunohistochemical reactions by the avidin-biotin-peroxidase method, using antigen recovery with antigen exposure in a pressure steam cooker (15 min, citrate buffer 0.01 mmol/l, pH 6.0). The primary antibody utilized was the mouse monoclonal antibody against human CD34 antigen (Neomarkers, Labvision, USA), at a dilution of 1:50, which is expressed on the endothelial cell membrane (Fina *et al.*, 1990; Hickey *et al.*, 1999). The secondary antibody was the Envision (Dako) reaction amplifier. Positive and negative reactions were performed by using human placenta as control.

Vessel counting

The greater endometrial vascular density field in each case was chosen in order to standardize the vessel counting. At a magnification $\times 100$, all brown-coloured structures were considered positive, even if a lumen could not be identified (Hickey *et al.*, 1999). The measurements were calculated by the average number of vessels/mm². The vascular calibre, based on the CD34 immunoreaction, was evaluated using a magnification $\times 100$ objective by selecting the major vessels in each case, and the diameter and area measurements were calculated with the image software.

MMP-3 expression quantification

MMP-3 immunohistochemistry was performed with the use of a monoclonal mouse anti-human MMP-3 antibody (Neomarkers; Labvision, USA), Ab-2 (Clone SL-1 IID 4), at a dilution of 1:50. Stromal cells with fine granular brown-coloured cytoplasm were considered MMP-3 positive. Negative and positive reactions were carried out with human placentas used as reaction control. Perl's histochemical reaction was carried out after the immunostain reaction in order to distinguish the positive immunostaining brown colour from the haemosiderin of the endometrial mucosa. In each case, the most intensely stained regions were selected and 10 fields at magnification $\times 400$ were counted. The numbers of positive and negative cells were counted. All the stroma cells were counted until reaching 1000 cells in each case.

Statistical analysis

The quantitative variables and the qualitative evaluation of histological findings were analysed using the χ^2 -test. The variables for age, duration of contraceptive use, and body mass index (BMI) (kg/m²) were analysed using the Mann-Whitney *U*-test. As for the quantitative histological evaluation, the Mann-Whitney *U*-test was used for the abnormal distribution and Fisher's *t*-test for the normal distribution. The Mann-Whitney *U*-test was also utilized for the evaluation of density, microvascular calibre and quantification of MMP-3. The significance was established at $P < 0.05$.

Results

Subjects characteristics

The subjects' characteristics are shown in Table I. No significant difference was found between the two groups (with and without endometrial bleeding) with respect to age

Table 1. Clinical characteristics and endometrial histological classification, after 3 years of LNG-IUS use in women with and without bleeding

	With bleeding	Without bleeding
No. of women	29	29
Age (years) ^a	28.3 (± 4.5)	27.2 (± 5.6)
Parity (%)		
≤ 2	75.9	82.8
> 2	24.1	17.2
Ethnicity (%)		
White	72.4	51.7
Non-white	27.6	48.3
Body mass index (kg/m ²) ^a	26.7 (± 5.3)	27.2 (± 5.6)
Duration of contraceptive use ^a	38.4 (± 12.4)	42.4 (± 7.0)
Histology (%)		
Progestogenic	69.9	62.1
Atrophic	24.1	37.9
Secretory	3.4	0
Proliferative	3.4	0

^a Results are given as mean (± SD).

($P = 0.078$), parity ($P = 0.745$), BMI ($P = 0.768$), duration of contraceptive use ($P = 0.139$), and ethnicity ($P = 0.176$). The menstrual pattern previous to the contraceptive use was also not significantly different in the two groups ($P = 0.391$). The most frequent pattern in the group with bleeding was spotting (65.5%), with oligomenorrhoea and normal cycles occurring in 17.2% respectively.

Histological assessment

No differences were found in the histological patterns of both groups. The histological analysis of the tissues showed that the majority of the samples had progestogenic appearance, followed by an atrophic pattern. In the group with bleeding, one case of secretory and one case of proliferative endometrial pattern was observed (Table 1). No cases of hyperplasia or cancer were observed. There were no significant differences between the groups with or without bleeding in relation to the other qualitative histological characteristics.

Stromal edema was present in the majority of the cases in both groups ($P = 0.238$). Endometritis (morphological identification of plasma cells or eosinophils) was observed in 54.5 and 61.1% in the groups with and without bleeding respectively ($P = 0.923$). Stromal necrosis ($P = 1$), superficial erosion with focal re-epithelialization ($P = 0.197$), mucosal breakdown ($P = 0.464$), and glandular pseudostratification ($P = 0.187$) were absent in the majority of cases in both groups.

Other alterations were observed at low frequency. In the group with bleeding, there was one case of polyp, with intense fibrinous exudate, presence of giant cell and focal proliferative endometrium; two cases with intense neutrophilic exudate; and four cases (18.2%) with many macrophages with haemosiderin. In the group with amenorrhoea, we observed one case with giant cell inflammatory reaction, hyalin material in an enlarged interstitial space, fusiform cells and hyalin decidua; two cases with microcalcifications, and six cases (33.3%) with macrophages with haemosiderin. Stromal mitosis ($P = 0.191$), number of eosinophils ($P = 0.489$) and plasma cells ($P = 0.911$) were similar in both studied

groups. Figure 1a shows that the total number of leukocytes was significantly higher in the group with bleeding ($P = 0.014$).

No significant differences were found in the number of glands ($P = 0.722$), measure of glandular area ($P = 0.068$), minor glandular diameter ($P = 0.406$), and glandular epithelium height ($P = 0.805$). The perimeter ($P = 0.015$) and the major glandular diameter ($P = 0.033$) were significantly higher in the group with amenorrhoea (Figure 1b and c). No glandular mitosis was found.

Vascular aspects of endometrial biopsies

Vessel counting was performed by two observers, and the variation between them was minimal. The final counting of vascular density was taken as the mean of these values. Endometrial vascular density was (mean ± SD) 25 ± 18.1 and 33 ± 16.3 vessels/mm² in the groups with and without bleeding respectively ($P = 0.817$) (Figure 1d). Major vascular diameter was (mean ± SD) $2614 \pm 1826 \mu\text{m}$ in the group with bleeding, and $1781 \pm 1354 \mu\text{m}$ in the group in amenorrhoea ($P = 0.211$) (Figure 1e).

MMP-3 immunohistochemical data

Figure 1f shows that in the group with bleeding, the rate of cells expressing MMP-3 by 1000 stromal counted cells (mean ± SD) was 162 ± 119.4 , thus being significantly higher than in the group in amenorrhoea (52 ± 52.6) (Figure 2a and b) ($P < 0.005$).

Discussion

Our results showed that the perimeter and the major glandular diameter were significantly higher in the group of women in amenorrhoea. On the other hand, women in the group with some bleeding pattern presented a significantly higher number of leukocytes and the MMP-3 showed a significantly higher number of reactive cells.

It is necessary to take into account that the group of women presenting uterine bleeding had several patterns, and the samples of the endometrium in this group were not collected during the bleeding episode. Therefore, the findings cannot be interpreted as an explanation for the irregular bleeding experienced by some LNG-IUS users. Unpredictable breakthrough bleeding is the most frequent cause of discontinuation of the method of contraception, but our findings could provide an insight into the mechanism of action for bleeding during the use of LNG-IUS. Additionally, *in vivo*, MMP-3 is secreted and diluted in the extracellular space, where weak immunostaining was reported (Jeziorska *et al.*, 1996).

The finding of no correlation between the bleeding patterns and the histological appearance of the endometrium was described previously (Nilsson *et al.*, 1978; Silverberg *et al.*, 1986; Hickey *et al.*, 1999; Pengdi *et al.*, 1999; Skinner *et al.*, 1999). In both groups, the majority of samples showed a progestin-modified appearance (Critchley *et al.*, 1998a; Phillips *et al.*, 2003) and atrophic endometrium was the second most common finding. These specimens are often reported as insufficient or inadequate for analysis (Wang *et al.*,

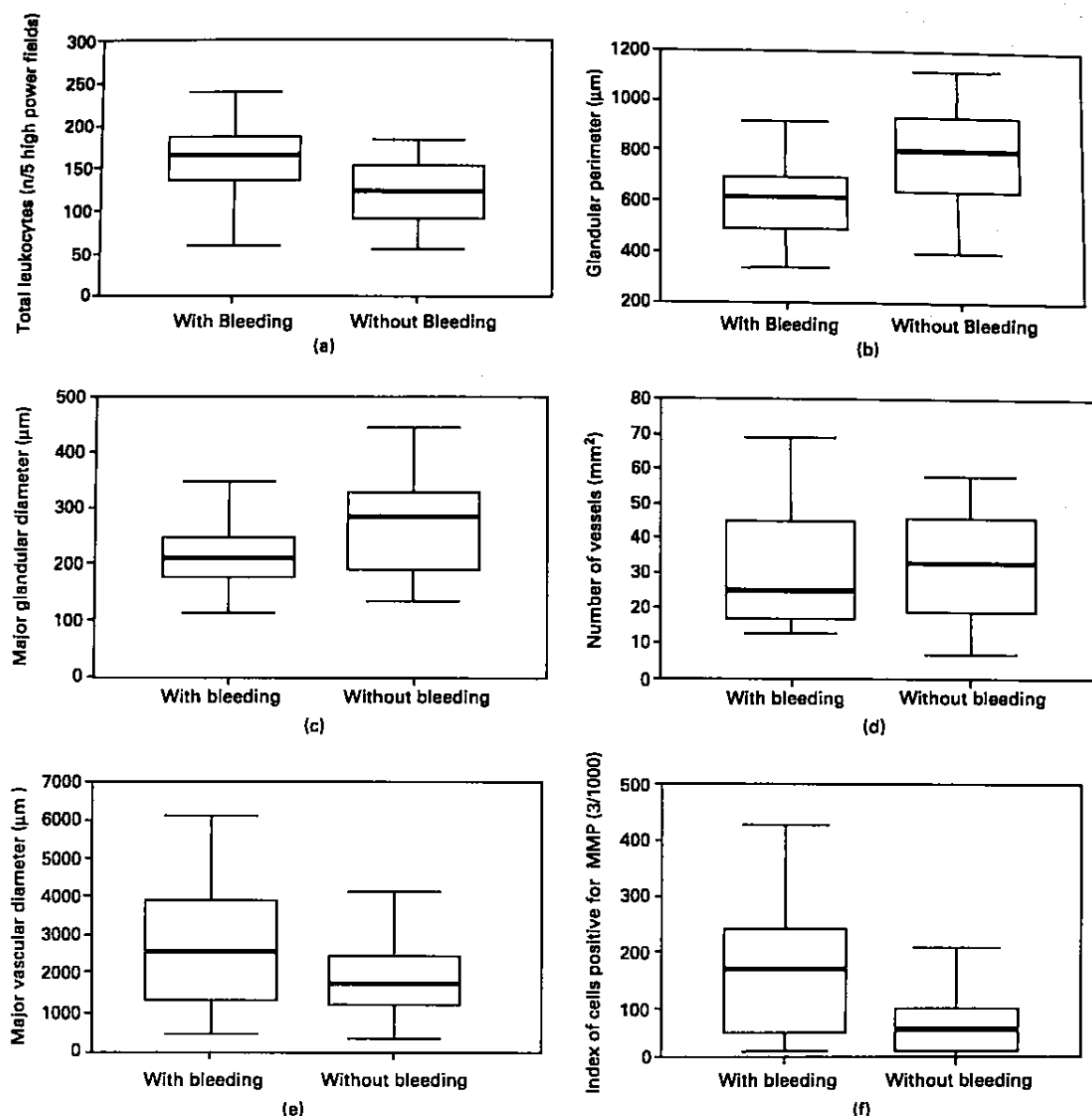


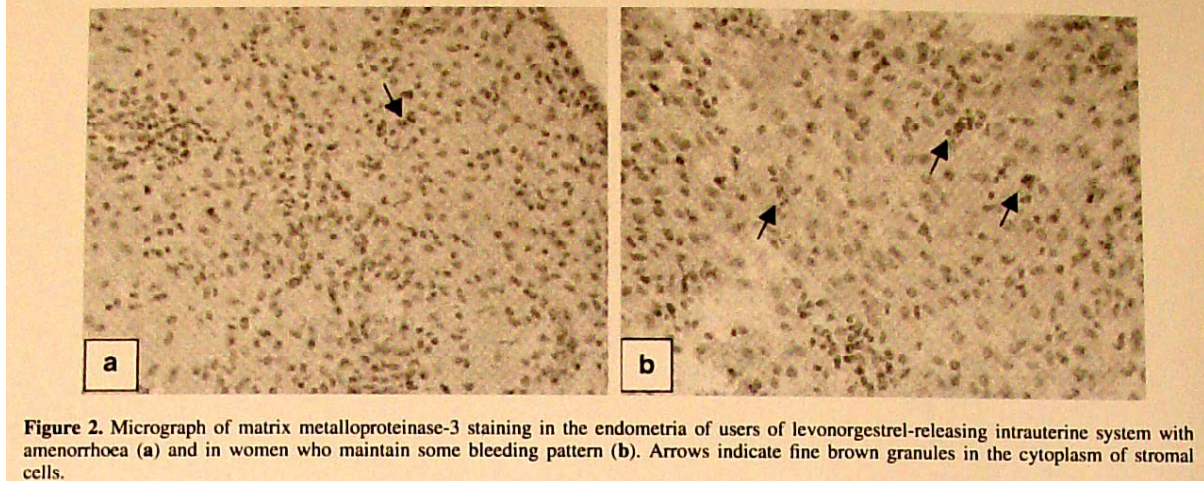
Figure 1. Several parameters in the endometria of women with levonorgestrel-releasing intrauterine system after 3 years of its use in the group with ($n = 22$) and without bleeding ($n = 18$). (a) Number of leukocytes ($P = 0.014$). (b and c) Perimeter ($P = 0.015$) and major glandular diameter ($P = 0.033$). (d) Number of vessels. (e) Major vascular diameter. (f) Positive index for matrix metalloproteinase-3 in stromal cells. Each box is limited by the 25th and 75th percentiles, the solid line in the middle is the median value, and the whiskers represent the minimum/maximum value measured.

1995; Marbaix *et al.*, 2000; Vincent *et al.*, 2000), however, it may be representative of the uterine cavity (Mazur and Kurman, 1995). These results were similar to previous publications showing that approximately half of the samples obtained from users of Norplant[®] implants and depot medroxyprogesterone acetate (D-MPA) were not adequate for analysis (Hadisaputra *et al.*, 1996; Vincent *et al.*, 1999).

No difference was found between the two groups regarding vascular density. A marked decrease in the number of vessels was observed among women with amenorrhoea (32

vessels/mm²), similar to that observed in users of high doses of oral progesterone (Song and Fraser, 1995) or in the endometrium exposed to progesterone-releasing IUD (Progestasert[®]) (Shaw *et al.*, 1981).

Others described an increase in vascular density in users of Norplant implants and LNG-IUS (Hickey *et al.*, 1999; McGavigan *et al.*, 2003). Our results with the use of CD34 are discordant with other studies that found a great increase in vascular density in the users of Norplant immediately after the insertion (Hickey *et al.*, 1999) or in users for periods of



2 and 4 months (McGavigan *et al.*, 2003). The different findings were probably related to the short length of LNG-IUS use in these other series. In agreement with our results, one other study found that LNG was not able to stimulate angiogenesis in mice (Hague *et al.*, 2002).

Leukocytes were significantly higher in the group with bleeding. This is in agreement with previous opinions that menstruation arises as a result of an inflammatory process (Finn, 1986; Salamonsen and Lathbury, 2000). Withdrawal or down-regulation of the receptors for progesterone (as occurred with the use of LNG-IUS) may induce the entry or activation of leukocytes into the endometrium, via production of chemokines by endometrial stromal or epithelial cells, which may up-regulate the production of cytokines by means of any of these cell types (Salamonsen and Woolley, 1996, 1999).

An increase in infiltrated leukocytes was also observed after 1 month of the insertion of LNG-IUS (Jones and Critchley, 2000) and more frequently in the endometria of women who had bled recently and less frequently in the atrophic endometria of users of lower doses of progestogen orally for contraception (Ludwig, 1982).

The number of leukocytes has been described as varying according to the time of LNG-IUS use (Critchley *et al.*, 1998b) and having no association with the menstrual pattern of the user. It is necessary to recall that our women used the LNG-IUS for >3 years and, on the other hand, in the group of women with bleeding only seven samples out of 29 presented scant or atrophic endometria, which may be one of the explanations for the differences between both groups (Vincent and Salamonsen, 2000).

Leukocyte number has been demonstrated as important in the normal function of the endometrium, including its role in the regulation of MMP and in endometrial bleeding (Salamonsen and Lathbury, 2000; Salamonsen *et al.*, 2000). However, few studies have correlated its number with the presence of endometrial breakdown bleeding, a fact observed in our study that showed that the women who maintained some level of bleeding presented a higher number of leukocytes,

even with the biopsies not being taken during an episode of bleeding. Our number of cases is bigger than the one observed and can explain our findings. However, one limitation of our study was that leukocytes were evaluated only by morphology, without immunohistochemical staining as performed in one previous study (Vincent *et al.*, 2000). Our results and those of previous studies (Vincent and Salamonsen, 2000; Salamonsen *et al.*, 2000; Salamonsen and Lathbury, 2000) show the complexity of the relationship between leukocytes and the response to the exogenous steroids even in the case of intrauterine administration.

MMP-3 was significantly higher in women with bleeding. MMP-3 is a protease involved in endometrial breakdown at menstruation, playing a central role in establishing a cascade of MMP activation (Salamonsen and Lathbury, 2000). Once activated, MMP-3 is able to digest various extracellular matrix proteins, including type IV collagen, laminin and fibronectin of the basement membranes (Nagase, 1998). Proteases released from migratory cells or activated mast cells may activate the latent MMP. Some active MMP can also activate other MMP, thus setting up a cascade of MMP activation. After secretion, MMP are also controlled through the inhibition of enzyme activity by endogenous tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP). The TIMP-1, -2, -3 are located in the endometrium and their role would appear to be maintenance of tissue integrity (Zhang and Salamonsen, 1997; Skinner *et al.*, 1999). The MMP degradation of endometrial extracellular matrix and basement membranes results in the fragility of blood vessels and the loss of endometrial tissue (Salamonsen and Woolley, 1996, 1999).

The zymography and western blotting studies in users of Norplant implants showed the release of pro-MMP-3, and its levels of activation increased when bleeding endometria were compared with non-bleeding samples. Immunolocalization of MMP-3 occurs in 36% of the bleeding endometria, but virtually no detection was made in endometrial samples during non-bleeding intervals (Marbaix *et al.*, 2000). In our study, the MMP-3 was found in most women who maintained some

degree of endometrial bleeding pattern (except in two cases) although the samples were taken during the interval between bleedings. It could be speculated that our results were misinterpreted due to the presence of haemosiderin. However, Perl's reaction was used to avoid biases in the analysis. Our results are in agreement with the observation of intense MMP-9 immunoreactivity in the stromal cells of all endometrial samples in users of LNG-IUS (Skinner *et al.*, 1999).

The MMP-3 expression was different from that observed with other progestin-only contraceptives. The LNG-IUS delivers higher local concentrations of LNG to the uterine cavity than Norplant implants and D-MPA. Another difference in the present study was that the MMP-3 was found in focal points in all endometrial stromal cells, and not restricted to areas showing stromal breakdown and tissue shedding. The difference could be explained by the previous finding which showed that the high local concentration of progestin could down-regulate the progesterone receptor (Critchley *et al.*, 1998b) and also because progesterone withdrawal was described as the optimal stimulus for inducing all the MMP in the endometrium, including MMP-3 (Salamonsen *et al.*, 1997).

In conclusion, this study showed that the endometria of long-term users of LNG-IUS who presented some degree of bleeding through its use presented a higher number of leukocytes and MMP-3, compared to women with amenorrhoea, thus suggesting a pivotal role of both in the triggering of endometrial bleeding. The molecular mechanisms leading to the deregulation of leukocytes and MMP, as well as to their activation, need to be further investigated.

Acknowledgements

Partial financial support for this study was provided by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Award # 01/14645-6.

References

- Andersson JK and Rybo G (1990) Levonorgestrel releasing intrauterine device in the treatment of menorrhagia. *Br J Obstet Gynaecol* 97, 690–694.
- Critchley HO, Wang H, Jones RL, Kelly RW, Drury TA, Gebbie AE, Buckley CH, McNeilly AS and Glasier AF (1998a) Morphological and functional features of endometrial decidualization following long-term intrauterine levonorgestrel delivery. *Hum Reprod* 13,1218–1224.
- Critchley HO, Wang H, Kelly RW, Gebbie AE and Glasier AF (1998b) Progesterone receptor isoforms and prostaglandin dehydrogenase in the endometrium of women using a levonorgestrel-releasing intrauterine system. *Hum Reprod* 13,1210–1217.
- D'Arcangues C, Odland V and Fraser IS (1992) Dysfunctional uterine bleeding induced by exogenous hormones. In Alexander NJ and D'Arcangues C (eds) *Steroid Hormones and Uterine Bleeding*. AAAS Press, Washington, pp. 81–105.
- Finu L, Molgaard HV, Robertson D, Bradley NJ, Monaghan P, Delia D, Sutherland DR, Baker MA and Graves MF (1990) Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* 75,2417–2426.
- Findlay JK (1996) Future directions for research on endometrial bleeding. *Hum Reprod* 11 (Suppl 2),179–183.
- Finn CA (1986) Implantation, menstruation and inflammation. *Biol Rev* 61,313–328.
- Fraser IS and Hickey M (2000) Endometrial vascular changes and bleeding disturbances with long-acting progestins. *Steroids* 65,665–670.
- Fraser IS, Hickey M and Song J-Y (1996) A comparison of mechanisms underlying disturbances of bleeding caused by spontaneous dysfunctional uterine bleeding on hormonal contraception. *Hum Reprod* 11 (Suppl 2),165–179.
- Hadisaputra W, Affandi B, Witaksono J and Rogers PA (1996) Endometrial biopsy collection from women receiving Norplant. *Hum Reprod* 11 (Suppl 2),31–34.
- Hague S, Mackenzie IZ, Bicknell R and Rees MC (2002) In-vivo angiogenesis and progestogens. *Hum Reprod* 17,786–793.
- Hickey M, Simbar M, Young L, Markham R, Russel P and Fraser IS (1999) A longitudinal study of changes in endometrial microvascular density in Norplant® implants users. *Contraception* 59,123–129.
- Hidalgo MM, Bahamondes L, Perrotti M, Diaz J, Dantas-Monteiro C and Petta C (2002) Bleeding patterns and clinical performance of the levonorgestrel-releasing intrauterine system (Mirena) up to two years. *Contraception* 65,325–328.
- Jeziorska M, Nagase H, Salamonsen LA and Woolley DE (1996) Immunolocalization of the matrix metalloproteinases gelatinase B and stromelysin 1 in human endometrium throughout the menstrual cycle. *J Reprod Fertil* 107,43–51.
- Jones RL and Critchley HO (2000) Morphological and functional changes in human endometrium following intrauterine levonorgestrel delivery. *Hum Reprod* 15 (Suppl 3) 162–172.
- Ludwig H (1982) The morphologic response of the human endometrium to long-term treatment with progestational agents. *Am J Obstet Gynecol* 142,796–808.
- Marbaix E, Vekemans M, Galant C, Rigot V, Lemoine P, Dubois D, Picquet C, Henriot P, Twagirayezu P, Sufi S *et al.* (2000) Circulating sex hormones and endometrial stromelysin-1 (matrix metalloproteinase-3) at the start of bleeding episodes in levonorgestrel-implant users. *Hum Reprod* 15 (Suppl 3),120–134.
- Mazur MT and Kurman RJ (1995) Effects of hormones. In Mazur MT and Kurman RJ (eds) *Diagnosis of Endometrial Biopsies and Curettings. A Practical Approach*. Springer Verlag, New York, pp. 109–130.
- McGavigan CJ, Dockery P, Metaxa-Mariatou V, Campbell D, Stewart CJ, Cameron IT and Campbell S (2003) Hormonally mediated disturbance of angiogenesis in the human endometrium after exposure to intrauterine levonorgestrel. *Hum Reprod* 18,77–84.
- Milson I, Andersson K and Andersch B (1991) A comparison of fluriprofen, tranexamic acid and a levonorgestrel-releasing intra-uterine contraceptive device in the treatment of idiopathic menorrhagia. *Am J Obstet Gynecol* 169,879–883.
- Nagase H (1998) Stromelysins 1 and 2. In Parks WC and Mecham RP (eds) *Matrix Metalloproteinases*. Academic Press, San Diego, pp. 43–84.
- Nilsson CG, Luukkainen T and Arko H (1978) Endometrial morphology of women using a D-norgestrel releasing intrauterine device. *Fertil Steril* 29,397–401.
- Pengdi Z, Xiaoqun L, Hongzhi L, Zhao G, Jie C, Ruhua X, Shizhu L, Shangchun W and Jiedong W (1999) The effect of a levonorgestrel-releasing intrauterine device on human endometrial oestrogen and progesterone receptors after one year of use. *Hum Reprod* 14,970–975.
- Phillips V, Graham CT, Manek S and McCluggage WG (2003) The effects of the levonorgestrel intrauterine system (Mirena coil) on endometrial morphology. *J Clin Pathol* 56,305–307.
- Salamonsen LA and Lathbury L (2000) Endometrial leukocytes and menstruation. *Hum Reprod Update* 6,16–27.
- Salamonsen LA and Woolley DE (1996) Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in endometrial remodeling and menstruation. *Reprod Med Rev* 5,185–203.
- Salamonsen LA and Woolley DE (1999) Menstruation: induction by matrix metalloproteinases and inflammatory cells. *J Reprod Immun* 44,1–27.
- Salamonsen LA, Butt AR, Hammond FR, Garcia S and Zhang J (1997) Production of endometrial matrix metalloproteinases, but not their tissue inhibitors, is modulated by progesterone withdrawal in an in vitro model for menstruation. *J Clin Endocrinol Metab* 82,1409–1415.
- Salamonsen LA, Zhang J, Hampton A and Lathbury L (2000) Regulation of matrix metalloproteinases in human endometrium. *Hum Reprod* 15 (Suppl 3),1112–1119.
- Shaw ST, Jr, Macaulay LK, Aznar R, Gonzalez-Angulo A and Roy S (1981) Effects of a progesterone-releasing intrauterine contraceptive device on endometrial blood vessels: a morphometric study. *Am J Obstet Gynecol* 114,821–827.
- Silverberg SG, Haukkanen M, Arko H, Nilsson CG and Luukkainen T (1986) Endometrial morphology during long-term use of levonorgestrel-releasing intrauterine devices. *Int J Gynecol Pathol* 5,235–241.
- Skinner JL, Ruley SC, Gebbie AE, Glasier AF and Critchley HO (1999) Regulation of matrix metalloproteinase-9 in endometrium during

- the menstrual cycle and following administration of intrauterine levonorgestrel. *Hum Reprod* 14,793–799.
- Song JY and Fraser IS (1995) Effects of progestogens on human endometrium. *Obstet Gynecol Surv* 50,385–394.
- Vincent AJ, Malakooti N, Zhang J, Rogers PA, Affandi B and Salamonsen LA (1999) Endometrial breakdown in women using Norplant is associated with migratory cell expressing of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B). *Hum Reprod* 14,807–815.
- Vincent AJ, Zhang J, Ostor A, Rogers PA, Affandi B, Kovacs G and Salamonsen LA (2000) Matrix metalloproteinase-1 and -3 and mast cells are present in the endometrium of women using progestin-only contraceptives. *Hum Reprod* 15,123–130.
- Wang IYS, Russel P and Fraser IS (1995) Endometrial morphometry in users of intrauterine contraceptive devices and women with ovulatory dysfunctional uterine bleeding: a comparison with normal endometrium. *Contraception* 51,234–243.
- Zhang J and Salamonsen LA (1997) Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1, -2 and -3 in human endometrium during the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* 3,735–741.

Submitted on September 17, 2003; accepted on May 7, 2004



Endometrial histology, microvascular density and caliber, and matrix metalloproteinase-3 in users of the Nestorone®-releasing contraceptive implant with and without endometrial breakthrough bleeding

Marília Oliveira-Ribeiro^a, Carlos A. Petta^{a,*}, Liliana A.L. De Angelo Andrade^b,
Margarete M. Hidalgo^a, Alessandra Pellogia^a, Luis Bahamondes^a

^aDepartment of Obstetrics and Gynecology, Human Reproduction Unit, School of Medicine, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas 13084-971, SP, Brazil

^bDepartment of Pathology, School of Medicine, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas 13084-971, SP, Brazil

Received 10 July 2005; revised 7 September 2005; accepted 25 October 2005

Abstract

Objective: This descriptive study evaluated endometrial histology, microvascular density and caliber, and quantification of matrix metalloproteinase (MMP-3) expression in long-term users of the Nestorone® (NES)-releasing implant who presented or not endometrial breakthrough bleeding (BTB).

Methods: Endometrial biopsies were obtained from 32 healthy women with unpredictable BTB. The quantitative analysis was performed only in 20 samples.

Results: The mean duration of use of the implant among the 14 women with BTB was 19.6 ± 1.0 months, and the other six women had used the implant for 17.7 ± 2.3 months (mean $\pm$ S.E.M.). Histological analysis of the endometrial tissue showed a predominance of progestogenic pattern followed by atrophic and proliferative endometrium in both groups. Mucosal breakdown and glandular pseudostratification were observed in half of the cases. Endometrial vascular density was 73.1 ± 10.0 and 57.5 ± 24.1 vessels/mm², and maximum vessel diameter was 923.3 ± 86.0 and 1038.0 ± 404 μ m (mean $\pm$ S.E.M.) in the group with and without BTB, respectively, without significance, and the rate of cells expressing MMP-3 $\times 1000$ counted stromal cells was 155.8 ± 24.8 and 127.0 ± 19.0 (mean $\pm$ S.E.M.) in both groups, respectively, without significance.

Conclusions: This study provides information about some endometrial aspects of women using NES in contraceptive implants. In addition, the endometrium was similar during long-term use of NES-releasing contraceptive implants in women with and without endometrial bleeding.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Endometrial bleeding; Subdermal progestin implant; Nestorone; Leukocytes; MMP-3/microvessels

1. Introduction

Progestin-only (p-only) methods of contraception are used worldwide by millions of women mainly because of their long-term action and high efficacy. Nestorone® (NES) is a 19-nor-progesterone derivative that has been studied as a contraceptive in implant form [1–4], as a vaginal ring [5–8] and as a gel [9,10]. A 45-mm-long subdermal implant containing 92.7 ± 2.4 mg (mean $\pm$ SD) of NES, intended to

provide in vitro rates of 125 μ g/day, was evaluated in 300 women at three Latin American centers as part of the Contraceptive Development Program of the Population Council [11]. The principal disturbance recorded in the menstrual diaries of these women was irregular bleeding or spotting, and this is in agreement with reports published on the use of other progestin-releasing subdermal implants or other p-only contraceptives [12]. Prolonged bleeding and/or spotting was less frequent but was still reported by more than one third of subjects during the first 18 months of the study [11].

The mechanism that leads to unpredictable breakthrough bleeding (BTB) remains unclear [13–17]. Changes have

* Corresponding author. Tel.: +55 19 3289 2856; fax: +55 19 3289 2440.

E-mail address: cpetta@attglobal.net (C.A. Petta).

been reported in the endometrial steroid receptor profile with down-regulation of estrogen receptors and both isoforms of the progesterone receptor [18]. Alterations have also been found in endometrial histology, endometrial vascular morphology, function and hemostasis, as well as in endometrial repair mechanisms. Any of these mechanisms could explain BTB [19].

The role of matrix metalloproteinase (MMP) in the endometrial breakdown that triggers menstruation has been previously described [20,21], and the role of MMP-3 in BTB in users of p-only contraceptives has been previously published [17,20,21]. The objective of this descriptive study was to assess the histological appearance of the endometrium, including the number of leukocytes, the microvascular density and caliber and the quantification of MMP-3 in the endometrium in long-term users of the NES-releasing contraceptive implant with and without endometrial BTB. Based on the observation that the endometrial response to progestins varied according to dose, type, route of administration and duration of exposure [22], our hypothesis was that the endometrium of women exposed to the NES-releasing implant may be different from that observed in users of Norplant implants and different between women with and without BTB.

2. Materials and methods

The study was conducted at the Human Reproduction Unit, Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil. The protocol was approved by the IRB and all women signed an informed consent form before enrollment to the study. Of the 100 Brazilian women who participated in the clinical trial of the NES-releasing implant [11], a subsample of 32 users was enrolled in this study. All participating women presented some unscheduled bleeding pattern during implant use.

Endometrial specimens were obtained by biopsy (Pipelle de Cornier®, Prodimed, Neuilly-en-Thelle, France), carried out without anesthesia at the outpatient clinic, to obtain material from the entire wall of the uterine cavity. In cases in which the material was scanty, only qualitative but not quantitative histological analyses were performed. Quantitative analyses were therefore carried out in only 20 of the 32 samples because the remaining 12 tissue samples were atrophic and the material was insufficient [23]. The women recorded bleeding patterns prospectively in a menstrual diary throughout the entire duration of implant use.

According to the World Health Organization [24,25], bleeding was defined as “any bloody vaginal discharge that requires the use of protection such as pads and tampons” and spotting as “any bloody vaginal discharge that is not intense enough to require sanitary protection.” All women presented unscheduled bleeding in the 3 months prior to joining the study. During the 90-day period previous to the biopsy among

the 20 women in whom we performed the quantitative analysis, the 14 women categorized with BTB presented bleeding days ranging from 16 to 38 days (24.5 ± 4.5 , mean $\pm$ SD) and bleeding episodes ranging from 3 to 8. The remaining six women (categorized as group without BTB), in the 90-days period, showed bleeding days ranging from 8 to 12 days (11.0 ± 0.5 , mean $\pm$ SD) and bleeding episodes between 2 and 3 [25]. The biopsies were taken during bleeding or within a few days of cessation of bleeding.

The specimens were fixed in 10% buffered neutral formalin, dehydrated, embedded in paraffin and cut into 4- μ m blocks, deparaffinized, rehydrated, stained with hematoxylin and eosin according to standard protocols and submitted to immunohistochemical analysis. Qualitative histological analysis was performed using a Nikon E-200 microscope. Histological and immunohistochemical quantitative analyses were performed on the captured image using a Nikon E-200 microscope and a Nikon Coolpix-95 video camera connected to a computer with a special plate and software for image analysis (Imagelab®, Brazil).

2.1. Endometrial histology

Morphometric assessment was carried out using a technique similar to that used by Wang et al. [26]. Qualitative and quantitative analyses were carried out by assessing five randomly selected high power fields (objective $\times 400$). Each sample was classified according to histological pattern, and they were considered suitable for qualitative and quantitative analyses if the section contained both glands and stroma, and if at least five random fields could be counted at $\times 400$ magnification.

The qualitative analysis included the following histological patterns: (a) proliferative — features consistent with the proliferative phase of the normal cycle; (b) secretory — consistent with the secretory phase of the normal cycle; (c) progestogenic — evidence of exogenous progestogenic effects, small glands with cuboidal or low columnar epithelia and decidualized stroma; (d) atrophic — endometria with very little dense stroma, reduced glands with small cuboidal epithelial cells [15] or scant or absent material [23]. Endometritis (defined by the presence of plasma cells or eosinophils), stromal necrosis, endometrial glandular and stromal breakdown, surface epithelium erosion with reepithelization, glandular pseudostratification and edema were the other qualitative characteristics analyzed in this study.

The parameters morphometrically assessed in five high power fields ($\times 400$) were the number of stromal mitoses, leukocytes, eosinophils, glands, glandular mitoses and measurements of the glandular area and perimeter, major and minor glandular diameter, and height of the glandular epithelium. The leukocytes were morphologically identified according to the size of the cell and their characteristic nuclear pattern. When leukocytes presented cytoplasmic granules, they were classified as eosinophilic and when they presented eccentric nuclei and chromatin with typical distribution, they were identified as plasma cells.

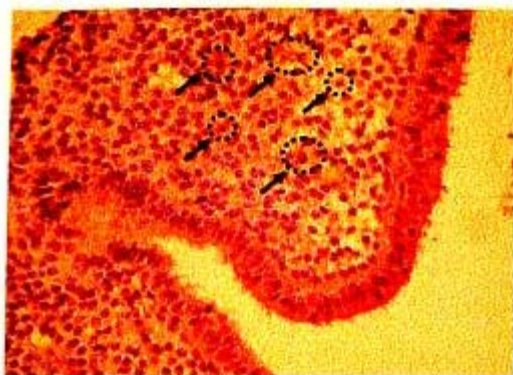


Fig. 1. Micrograph of cell staining for MMP-3 in the endometria of users of NES implant who presented BTB. Arrows indicate fine brown granules in the cytoplasm of stromal cells.

2.2. Endometrial vessels

Microvasculature was assessed by immunohistochemistry. Formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections were subjected to immunohistochemical testing using the streptavidin-biotin method. New formalin-fixed sections were placed on silanized slides. Antigen retrieval was performed following hydration and endogenous peroxidase blocking with 3% H₂O₂, using steam heat incubation with citrate buffer 0.01 mmol/L, pH 6.0, for 15 min. The primary antibody used was the mouse antihuman CD34 monoclonal antibody (Neomarkers, Labvision, Fremont, CA, USA) at a dilution of 1:50, which is expressed in the endothelial cell membrane [15,27]. Detection of specific antibody binding was carried out using the Envision-peroxidase system (Dakopatts, code K1491, Dako, Carpinteria, CA, USA). Slides were then stained with 3,3-diaminobenzidine (Sigma, St. Louis, MO, USA, code D-5637), counterstained with Mayer's hematoxylin, dehydrated and mounted with Entellan (Merck, Darmstadt, Germany, code 107961). Human placenta was used as a control to assess positive and negative reactions. Negative control tissue was analyzed in a similar way to that of study cases, except that incubation with primary antibody was not performed. Staining was evaluated using an optical microscope, and all brown structures were considered positive even if the presence of lumen could not be established [15].

2.3. Vessel counting

In order to standardize vessel counting, the endometrial field with highest vascularization was chosen in every case. Under magnification ($\times 100$), all brown structures were considered positive, even if the presence of a lumen could not be established [15]. The measurements were calculated from the average number of vessels per millimeter squared. Vascular caliber, based on CD34 immunoreaction, was evaluated using magnification ($\times 100$) and by selecting the major vessels in each case. The diameter and area measurements were calculated using image software.

2.4. Matrix metalloproteinase-3 expression quantification

Matrix metalloproteinase-3 immunohistochemistry was performed using a mouse antihuman MMP-3 monoclonal antibody (Neomarkers), Ab-2 (Clone SL-1 IID 4), at a dilution of 1:50. Stromal cells with fine, granular, brown cytoplasm were considered MMP-3 positive (Fig. 1). Negative and positive reactions were assessed using human placentas as control. Perl's histochemical reaction was performed following the immunostaining reaction in order to differentiate the positive immunostaining brown color from hemosiderin of the endometrial mucosa. In each case, the most intensely stained regions were selected, and the numbers of positive and negative cells in 10 fields at magnification $\times 400$ were counted. All the stroma cells up to a maximum of 1000 cells were counted in each case.

2.5. Statistical analysis

Comparison of the demographic variables between the two groups was performed using Pearson and Yates' χ^2 test when appropriate. The Student's *t* test was used to compare both groups regarding some variables, and when the distribution was abnormal, we used the Mann-Whitney *U* test. The Mann-Whitney *U* test was also utilized for the evaluation of density, microvascular caliber and quantification of MMP-3. The significance was established at $p < .05$.

3. Results

3.1. Characteristics of subjects

The characteristics of women enrolled to this study are shown in Table 1. Before initiating use of the implant, most women (90.6%) had regular menstrual cycles. At the time of the biopsy, the 14 women with BTB had been using the implant for 19.6 ± 1.0 months and the other six women had used the implant for 17.7 ± 2.3 months (mean $\pm$ SEM).

Table 1
Clinical characteristics and classification of endometrial histology in long-term users of NES implant at bleeding episodes ($n = 20$)

Variables	Women with BTB	Women without BTB
Age (years)*	28.8 $\pm$ 2.5	32.2 $\pm$ 5.5
Parity (%)		
≤ 2	85.0	67.0
> 2	15.0	33.0
Ethnicity (%)		
White	44.0	84.0
Nonwhite	56.0	16.0
BMI (kg/m ²)*	22.6 ($\pm$ 2.7)	23.9 ($\pm$ 2.9)
Use of NES implant (months)*	19.0 ($\pm$ 3.8)	17.7 ($\pm$ 2.3)
Histology (%)		
Atrophic	14.3	16.6
Progestogenic	55.0	50.0
Proliferative	21.4	16.6
Secretory	7.1	16.6

* Results are mean $\pm$ SD.

Table 2
Endometrial histometric characteristics in women presenting BTB ($n = 14$) or without BTB ($n = 6$) during NES implant use (values are mean)

Variable	Women with BTB	Women without BTB	p value
Stromal mitosis ^a	0.8	0.8	NS
Total leukocytes ^a	124.2	134.2	NS
Eosinophils ^a	0.5	0.6	NS
Glands ^a	6.6	12.5	0.02
Glandular area (μm)	17,551.5	15,902.5	NS
Perimeter (μm)	568.23	543.25	NS
Maximum glandular diameter (μm)	166.61	179.00	NS
Minimum glandular diameter (μm)	118.23	111.75	NS
Glandular epithelium height (μm)	25.0	24.3	NS
Glandular mitosis ^a	0.643	1.25	NS

NS, not significant.

^a Number per five high power fields.

3.2. Histological assessment

In the histological classification of the 20 samples analyzed, the predominant pattern was progestogenic pattern followed by the atrophic and proliferative endometrium, in both groups of women (Table 1). Stromal edema was present in 95% of the cases. Mucosal breakdown and glandular pseudostratification were observed in half of the cases; however, most of the samples presented no stromal necrosis. There were two cases of endometritis (morphological identification of plasma cells or eosinophils). The few other alterations found consisted of three cases of tubal metaplasia and eight cases of macrophages with hemosiderin. In addition, a total leukocyte count of 124.2 and 134.2, an eosinophil count of 0.5 and 0.6 and glands of 6.6 and 12.5 ($p < .02$) were observed per five high power fields in the group of women with and without BTB, respectively. Other characteristics such as glandular area and epithelium height, perimeter, maximum and minimum glandular diameter and mitosis are described in Table 2. There were no differences in the findings between the samples obtained in the group with or without BTB and the samples obtained during bleeding episodes or few days away from the bleeding episodes. The only significant difference was observed in the number of endometrial glands that was doubled in the group without BTB ($p < .02$) (Table 2).

3.3. Vascular appearance and MMP-3 immunohistochemistry of endometrial biopsies

Endometrial vascular density was 73.1 ± 10.0 and 57.5 ± 24.1 vessels/ mm^2 and maximum vessel diameter was 923.3 ± 86.0 and $1038.0 \pm 404 \mu\text{m}$ (mean $\pm$ SEM) in the group with and without BTB, respectively, without significance. The rate of cells expressing MMP-3 $\times 1000$ counted stromal cells was 155.8 ± 24.8 and 127.0 ± 19.0 (mean $\pm$ SEM) in women with and without BTB, respectively, without significance (Fig. 1).

4. Discussion

As far as we know, this is the first study in which several issues of the endometrium, including MMP-3, has been evaluated in users of the NES-releasing contraceptive implant. With the exception of the number of glands that was doubled in women without BTB, there were no differences in the other findings between the samples from women with and without BTB. However, a major limitation of the study was the fact that we were able to obtain material from women presenting BTB, but only a few samples from women without BTB or with regular bleeding as a control group. It is important to establish the causes of unpredictable BTB because this is one of the principal reasons for discontinuation among users of p-only contraceptive implants, including users of the NES-releasing implants enrolled in a 2-year study conducted in three countries [11].

Our study showed endometrial samples with a predominance of progestogenic pattern followed by atrophic and proliferative pattern almost equal in both groups of women. Four samples were compatible with the follicular phase, and two were compatible with the luteal phase of the menstrual cycle. Patterns compatible with luteal activity were detected in 23% of cycles at 18 months of use in the entire group [11]. The endometrium displayed different histological aspects that were not correlated to bleeding patterns or to the duration of use of the implant. Similar results have been previously described in users of Norplant implants and LNG-IUS [16,17,28–33]. In addition, the observation of two cases of endometritis was unexpected; however, Rhoton-Vlasak et al. [33] reported similar results in users of Norplant. These women require special attention because the abnormal bleeding could be a consequence of the endometritis and may benefit from treatment with antibiotics.

Progestin released from contraceptive implants and distributed along the hypothalamic–pituitary–gonadal axis interferes with ovulation by partially or completely inhibiting gonadotrophin [34]. This may explain the higher frequency of progestogenic histological patterns found in users of the LNG-IUS compared to users of implants because serum levels of estradiol (E_2) and progesterone in the former group are, in many cases, compatible with levels of the luteal phase [35,36]. In one study [15], the endometrial histology most frequently found in users of Norplant consisted of atrophic and proliferative patterns; however, 14 months after the first biopsy, secretory patterns were observed. The difference between those results and our results may be explained by the difference in the bleeding patterns reported in each study.

The number of glands was significantly lower in samples from women with BTB. This finding could indicate that the atrophy of the mucosa is greater and the proliferative capacity is lower than in women without BTB. This could be correlated with the number of glandular mitosis that was also half that observed in the samples from women without BTB, although without statistical significance.

Previous reports showed the importance of MMP in menstrual breakdown and showed that in the untreated endometrium, stromelysin-1 (MMP-3) is expressed during normal menstrual bleeding [37–41] and could be reproduced in endometrial culture without E_2 and progesterone [42].

Our study found that in users of NES-releasing implants, cellular MMP-3 expression presented a trend that was higher in women with BTB than in women without BTB, although the results were not significant. However, this result could be biased due to the small number of samples in the group without BTB. This is in accordance with a previous report from our group showing that, in users of the LNG-IUS who continued to have some form of uterine bleeding, MMP-3 expression was significantly higher than in those women who were in amenorrhea [17]. Moreover, Marbaix et al. [32] studied MMP-3 in users of Norplant at the onset of bleeding and during nonbleeding intervals and showed that the occurrence of bleeding was strongly linked to MMP-3 expression and activation of tissue breakdown in foci. In addition, when the nonbleeding endometrium was compared to the bleeding endometrium, MMP-3 was almost fourfold greater in women of the latter group [32]. These results showed that regulation of MMP-3 expression and activation is altered in women who experience BTB during the use of p-only contraceptive implants, although we failed to observed difference between the two studied groups.

However, the immunohistochemical technique used to detect MMP-3 in this study may have underestimated the number of cells producing MMP-3 because it is only capable of detecting cells with a high capacity for MMP-3 expression. These results contradict the findings from a previous study that observed that MMP-3 is secreted and diluted in the extracellular space; however, these differences may be a result of the different technique used since weak immunostaining was reported [43].

Matrix metalloproteinase-3 and other proteinases have been reported to be involved in endometrial bleeding and to have a central role in the activation of pro-MMP-3 [44,45], which in turn establishes a cascade of MMP activation [46]. After activation, MMP-3 is able to digest some extracellular matrix proteins, including type IV collagen, laminin and fibronectin from the basement membranes [32]. The proteinases released from migratory or activated mast cells could activate MMP that can in turn activate other MMPs, thereby also establishing a cascade of MMP activation. The MMP degradation of endometrial extracellular matrix and basement membranes results in the fragility of blood vessels and the loss of endometrial tissue described both at menstruation and in Norplant implant users with abnormal bleeding but rarely detected in the endometrium during nonbleeding intervals [20,21,32,47].

Regarding vascular density and maximum vessel diameter, our results were higher and lower, respectively, compared to previous reports in users of the LNG-IUS who continued to have some form of endometrial bleeding

[17]. However, vascular density in our study was lower than that observed by Hickey et al. [15] at 2–13 weeks and at 14–42 weeks after insertion and those of Rodgers et al. [37] at 3–12 months of use of the Norplant implant. Changes in vascular density following insertion of Norplant implants have also been described by Fraser and Hickey [16] and have been reported in users of the LNG-IUS who presented BTB [48]. It has been suggested [15] that vascular density is higher in women presenting regressed endometrium; however, other authors [48–50] observed no increase in vascular density in atrophic endometrium.

One explanation for the discrepancy between our findings and those from other studies [15,37] could be the fact that in 11 out of the 20 women, in whom the evaluation was performed, the histological appearance was progestational, and in only three cases was it atrophic. In addition, there have been reports that women from developed and developing countries respond differently with respect to bleeding patterns during use of the same progestins [51]. Weight, body mass index (BMI) and the degree of suppression of ovarian activity may also influence bleeding patterns in users of p-only methods. The fact that different techniques were used in different studies cannot be ignored because different results were found.

Total leukocyte count (in the 20 women in whom this evaluation was possible) was similar to that reported previously for users of the LNG-IUS who maintained some uterine bleeding patterns [17], and this may be explained by the concept that endometrial bleeding is the result of an inflammatory process [46,52]. Exogenous progestins influence leukocytic infiltration [53], and the interstudy differences may be attributable to the different abnormal bleeding patterns and to the different progestins used in the studies [54].

Moreover, MMP degrades mature collagen and collagen IV, contributing to vascular fragility and loss of epithelial integrity, thereby stimulating BTB. Leukocytes play a role in this mechanism via their role in the regulation of MMP, their elaboration of some cytotoxic mediators and production of vasoactive molecules [22]. However, we cannot draw definitive conclusions based on our findings because leukocytes were evaluated using morphology and not immunohistochemical staining [22].

The lack of differences between the endometrial findings of samples from women with and without BTB could be accounted for by the small sample size in both groups, because in almost one third of the samples, we could not perform the evaluation due to insufficient material, as occurred in other studies [22]. In conclusion, this study showed that the endometrium presented a similar pattern during long-term use of NES-releasing contraceptive implants in women with and without BTB. Our results could be biased due to the small number of women without BTB. In addition, this study provides information about some endometrial aspects in women using the novel potent progestin NES for contraceptive implants.

Acknowledgments

This clinical trial on the performance of NES implants was undertaken as part of the Contraceptive Development Program of the Population Council's International Committee for Contraception Research (ICCR). The study received funding from the United Nations Fund for Population and also received support provided by the Office of Population, Health, and Nutrition, Bureau for Global Health, U.S. Agency for International Development, under the terms of Award No. HRN-A-00-99-00010. The present study was partially financed by the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brazil, grants # 01/14645-6 and # 03/08391-7.

References

- [1] Coutinho E. Clinical experience with implant contraception. *Contraception* 1978;18:411–27.
- [2] Lahteenmaki P, Weiner E, Lahteenmaki P, Johansson E, Luukkainen T. Contraception with subcutaneous capsules containing ST-1435. Pituitary and ovarian function and plasma levels of ST-1435. *Contraception* 1981;23:63–75.
- [3] Odland V, Lithell H, Selinus I, Vessby B. Unaltered lipoprotein and carbohydrate metabolism during treatment with contraceptive subdermal implants containing ST-1435. *Ups J Med Sci* 1984;89:151–8.
- [4] Kurumaki H, Toivonen J, Lahteenmaki P, Luukkainen T. Contraception with subdermal ST-1435 capsules: side-effects, endocrine profiles and liver function related to different lengths of capsules. *Contraception* 1985;31:305–18.
- [5] Laurikka-Routti M, Haukkamaa M, Heikinheimo O. A contraceptive vaginal ring releasing ethinyl estradiol and the progestin ST-1435: bleeding control, serum steroid concentrations, serum lipids and serum chemistry. *Contraception* 1990;42:111–20.
- [6] Alvarez-Sanchez F, Brache V, Jackaniz T, Faundes A. Evaluation of four different contraceptive vaginal rings: steroid serum levels, luteal activity, bleeding control and lipid profiles. *Contraception* 1992;46:387–98.
- [7] Brache V, Alvarez-Sanchez F, Faundes A, Jackaniz T, Mishell DR, Lahteenmaki P. Progestin-only contraceptive rings. *Steroids* 2000;65:687–91.
- [8] Brache V, Mishell DR, Lahteenmaki P, et al. Ovarian function during use of vaginal rings delivering three different doses of Nestorone. *Contraception* 2001;63:257–61.
- [9] Haukkamaa M, Laurikka-Routti M, Heikinheimo O. Transdermal absorption of the progestin ST-1435: therapeutic serum steroid concentrations and high excretion of the steroid in saliva. *Contraception* 1991;44:269–76.
- [10] Suhonen S, Haukkamaa M, Lahteenmaki P, Holmstrom T. Endometrial effect of transdermal estradiol and progestin ST-1435 in postmenopausal women. *Fertil Steril* 1992;57:1211–5.
- [11] Sivin I, Croxatto H, Bahamondes L, et al. Two-year performance of a Nestorone-releasing contraceptive implant: a three-center study of 300 women. *Contraception* 2004;69:137–44.
- [12] D'Arcangues C. Management of vaginal bleeding irregularities induced by progestin-only contraceptives. *Hum Reprod* 2000;15(Suppl 3):24–9.
- [13] D'Arcangues C, Odland V, Fraser IS. Dysfunctional uterine bleeding induced by exogenous hormones. In: Alexander NJ, D'Arcangues C, editors. *Steroid hormones and uterine bleeding*. Washington (DC): AAAS Press; 1992. p. 81–105.
- [14] Findlay JK. Future directions for research on endometrial bleeding. *Hum Reprod* 1996;11(Suppl 2):179–83.
- [15] Hickey M, Simbar M, Young L, Markham R, Russel P, Fraser IS. A longitudinal study of changes in endometrial microvascular density in Norplant® implants users. *Contraception* 1999;59:123–9.
- [16] Fraser IS, Hickey M. Endometrial vascular changes and bleeding disturbances with long-acting progestins. *Steroids* 2000;65:665–70.
- [17] Oliveira-Ribeiro M, Petta CA, De Angelo Andrade LAL, Bahamondes L, Hidalgo MM. Correlation between endometrial histology, microvascular density and calibre, matrix metalloproteinase-3 and bleeding pattern in women using a levonorgestrel-releasing intrauterine system. *Hum Reprod* 2004;19:1778–84.
- [18] Critchley HO, Wang H, Jones RL, et al. Morphological and functional features of endometrial decidualization following long-term intrauterine levonorgestrel delivery. *Hum Reprod* 1998;13:1218–24.
- [19] Fraser IS, Hickey M, Song J-Y. A comparison of mechanisms underlying disturbances of bleeding caused by spontaneous dysfunctional uterine bleeding on hormonal contraception. *Hum Reprod* 1996;11(Suppl 2):165–79.
- [20] Salamonsen LA, Woolley DE. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in endometrial remodeling and menstruation. *Reprod Med Rev* 1996;5:185–203.
- [21] Salamonsen LA, Woolley DE. Menstruation: induction by matrix metalloproteinases and inflammatory cells. *J Reprod Immunol* 1999;44:1–27.
- [22] Vincent AJ, Salamonsen LA. The role of matrix metalloproteinases and leukocytes in abnormal uterine bleeding associated with progestin-only contraceptives. *Hum Reprod* 2000;15(Suppl 3):135–43.
- [23] Mazur MT, Kurman RJ. Effects of hormones. In: Mazur MT, Kurman RJ, editors. *Diagnosis of endometrial biopsies and curettings. A practical approach*. New York: Springer Verlag; 1995. p. 109–30.
- [24] Rodriguez G, Faundes A, Atkinson L. An approach to the analysis of menstrual patterns in the clinical evaluation of contraceptives. *Stud Fam Plann* 1976;7:42–51.
- [25] Belsey EM, Machin D, D'Arcangues C. The analysis of vaginal bleeding patterns induced by fertility regulating methods. *Contraception* 1986;34:253–60.
- [26] Wang IYS, Russel P, Fraser IS. Endometrial morphometry in users of intrauterine contraceptive devices and women with ovulatory dysfunctional uterine bleeding: a comparison with normal endometrium. *Contraception* 1995;51:234–43.
- [27] Fina L, Molgaard HV, Robertson D, et al. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* 1990;75:2417–26.
- [28] Johannisson E. Endometrial morphology during the normal cycle and under the influence of contraceptive steroids. In: d'Arcangues C, Fraser IS, Newton JR, Odland V, editors. *Contraception and mechanisms of endometrial bleeding*. Cambridge: Cambridge University Press; 1990. p. 53–80.
- [29] Silverberg SG, Haukkamaa M, Arko H, Nilsson CG, Luukkainen T. Endometrial morphology during long-term use of levonorgestrel-releasing intrauterine devices. *Int J Gynecol Pathol* 1986;5:235–41.
- [30] Skinner JL, Riley SC, Gebbie AE, Glasier AF, Critchley HO. Regulation of matrix metalloproteinase-9 in endometrium during the menstrual cycle and following administration of intrauterine levonorgestrel. *Hum Reprod* 1999;14:793–9.
- [31] Jones RL, Critchley HOD. Morphological and functional changes in human endometrium following intrauterine levonorgestrel delivery. *Hum Reprod* 2000;15(Suppl 3):162–72.
- [32] Marbaix E, Vekemans M, Galant C, et al. Circulating sex hormones and endometrial stromelysin-1 (matrix metalloproteinase-3) at the start of bleeding episodes in levonorgestrel-implant users. *Hum Reprod* 2000;15(Suppl 3):120–34.
- [33] Rhyton-Vlasak A, Chegini N, Hardt N, Williams RS. Histological characteristics and altered expression of interleukins (IL) IL-13 and IL-15 in endometria of levonorgestrel users with different uterine bleeding patterns. *Fertil Steril* 2005;83:659–65.
- [34] Croxatto HB. Mechanisms that explain the contraceptive action of progestin implants for women. *Contraception* 2002;65:21–7.

- [35] Nilsson CG, Lanteenmaki PLA, Luukkainen T. Ovarian function in amenorrheic and menstruating users of levonorgestrel-releasing intrauterine device. *Fertil Steril* 1984;41:52–5.
- [36] Barbosa I, Olsson SE, Odland V, Gonçalves T, Coutinho E. Ovarian function after seven years use of levonorgestrel IUD. *Adv Contracept* 1995;11:85–95.
- [37] Rodgers WH, Matrisian LM, Giudice LC, et al. Patterns of matrix metalloproteinase expression in cycling endometrium imply differential functions and regulation by steroid hormones. *J Clin Invest* 1994;94:946–53.
- [38] Hampton AL, Salmons LA. Expression of messenger ribonucleic acid encoding matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors is related to menstruation. *J Endocrinol* 1994;141:R1–R3.
- [39] Marbaix E, Kokorine I, Henriot P, Donnez J, Courtoy PJ, Eeckhout Y. The expression of interstitial collagenase in human endometrium is controlled by progesterone and by oestradiol and is related to menstruation. *Biochem J* 1995;305:1027–30.
- [40] Kokorine I, Marbaix E, Henriot P, et al. Focal cellular origin and regulation of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) are related to menstrual breakdown in the human endometrium. *J Cell Sci* 1996;109:2151–60.
- [41] Irwin JC, Kirk D, Gwatkin RB, Navre M, Cannon P, Giudice LC. Human endometrial matrix metalloproteinase-2, a putative menstrual proteinase. Hormonal regulation in cultured stromal cells and messenger RNA expression during the menstrual cycle. *J Clin Invest* 1996;97:438–47.
- [42] Marbaix E, Kokorine I, Moulin P, Donnez J, Eeckhout Y, Courtoy PJ. Menstrual breakdown of human endometrium can be mimicked in vitro and is selectively and reversibly blocked by inhibitors of matrix metalloproteinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:9120–5.
- [43] Jeziorska M, Nagase H, Salmons LA, Woolley DE. Immunolocalization of the matrix metalloproteinases gelatinase B and stromelysin 1 in human endometrium throughout the menstrual cycle. *J Reprod Fertil* 1996;107:43–51.
- [44] Lees M, Taylor DJ, Woolley DE. Mast cell proteinases activate precursor forms of collagenase and stromelysin, but not of gelatinases A and B. *Eur J Biochem* 1994;223:171–7.
- [45] Nagase H. Stromelysins 1 and 2. In: Parks WC, Mecham RP, editors. *Matrix metalloproteinases*. San Diego: Academic Press; 1998. p. 43–84.
- [46] Salmons LA, Lathbury L. Endometrial leukocytes and menstruation. *Hum Reprod Update* 2000;6:16–27.
- [47] Galant C, Vekemans M, Lemoine P, et al. Temporal and spatial association of matrix metalloproteinases with focal endometrial breakdown and bleeding upon progestin-only contraception. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:4827–34.
- [48] McGavigan CJ, Dockery P, Metaxa-Mariatou V, et al. Hormonally mediated disturbance of angiogenesis in the human endometrium after exposure to intrauterine levonorgestrel. *Hum Reprod* 2003;18:77–84.
- [49] Hickey M, Lau T, Fraser IS, Rogers PAW. Endometrial vascular density in conditions of endometrial atrophy. *Hum Reprod* 1996;9:2009–13.
- [50] Hickey M, Fraser I, Dwyer D, Graham S. Endometrial vasculature in Norplant users: preliminary results from a hysteroscopic study. *Hum Reprod* 1996;11(Suppl 2):35–44.
- [51] Belsey EM. Task Force on Long-Acting Systems for Fertility Regulation. Menstrual bleeding patterns in untreated women and with long-acting methods of contraception. *Adv Contracept* 1991;7:257–90.
- [52] Finn CA. Implantation, menstruation and inflammation. *Biol Rev* 1986;61:313–28.
- [53] Song JY, Russell P, Markham R, Manconi F, Fraser IS. Effects of high dose progestogens on white cells and necrosis in human endometrium. *Hum Reprod* 1996;11:1713–8.
- [54] Odland V, Fraser IS. Contraception and menstrual bleeding disturbances. In: d'Arcangues C, Fraser IS, Newton JR, editors. *Contraception and mechanisms of endometrial bleeding*. Cambridge: Cambridge University Press; 1990. p. 5–32.

4. Discussão

O presente trabalho, na qualidade de estudo pioneiro sobre o tema nesta instituição, exigiu superar obstáculos para sua concretização. Inicialmente, não dispúnhamos da estrutura tecnológica necessária, a qual foi montada após visita ao laboratório de ginecologia molecular da Escola Paulista de Medicina e orientação do Prof. Dr. Ismael Dale Cotrim da Silva, coordenador daquele serviço. Para a adequada utilização do maquinário adquirido, bem como do *software* Imagelab 2000, a pesquisadora principal e sua co-orientadora participaram de treinamentos específicos.

A próxima barreira a ser vencida foi a não especialização da pesquisadora principal em anatomia patológica, mas em tocoginecologia. Esta fase exigiu a paciência e o profissionalismo da co-orientadora deste estudo, a qual habilitou a pesquisadora principal para leitura das lâminas em coloração de HE e em reações de imunoistoquímica.

Durante o período de análise do material, a pesquisadora principal permaneceu, junto à sua co-orientadora, trabalhando durante seis meses no

laboratório de anatomia-patológica. Muitos dos questionamentos foram respondidos, via e-mail, pela Dra. Lois Salamonsen, pesquisadora consagrada na área de avaliação endometrial em usuárias de anticoncepcionais hormonais, do laboratório Prince's Henry Institute (Melbourne, Austrália). Aquele foi um tempo de grande aprendizado para todos os envolvidos neste estudo. Esta tese de doutorado concretiza um esforço conjunto, que foi necessário em todas as fases deste trabalho, e inicia uma importante linha de pesquisa.

Avaliando conjuntamente as duas publicações apresentadas dos estudos realizados, consideramos que o SIU-LNG e o implante subdérmico liberador de NES são constituídos por compostos diferentes, com vias de administração e mecanismos de ação distintos, o que impede de estabelecer uma comparação direta entre os dois métodos anticoncepcionais. Diante disso, poderia ser questionado o fato de os dois trabalhos serem apresentados dentro da mesma tese. No entanto, os estudos convergem ao considerarmos que ambos envolvem progestógenos de ação prolongada, os quais determinam sangramento endometrial irregular em grande número de usuárias, sendo esta a principal causa de abandono do uso destes métodos (Belsey et al., 1986; Fraser, 1986; Findlay, 1996; Hickey et al., 1996a; 1998; Fraser e Hickey, 2000).

Além disso, atualmente, a tônica da pesquisa em usuárias de anticoncepcionais contendo somente progestógenos consiste na análise endometrial para a determinação da patogênese do sangramento uterino anormal e foi o que avaliamos nos dois estudos, considerando as mesmas variáveis.

Com relação à metodologia, três diferenças ocorreram entre os dois trabalhos:

- 1- No estudo envolvendo as usuárias do SIU-LNG foi possível formar um grupo de mulheres sem sangramento uterino há três meses ou mais. No entanto, em usuárias do implante subdérmico liberador de NES não foi possível constituir, apesar de intensa tentativa, um grupo de mulheres em amenorréia devido aos episódios freqüentes de sangramento endometrial. Assim, a biópsia de endométrio nas usuárias do implante subdérmico liberador de NES, foi categorizada em grupos com e sem sangramento, dependendo se a paciente estava ou não com sangramento no dia da execução da biópsia.
- 2- Utilizou-se um formulário pré-testado (Apêndice 2) nos dois estudos, onde constavam perguntas sobre o padrão menstrual prévio e após o início do uso do método, bem como se havia ou não sangramento endometrial no dia da biópsia de endométrio.

Para as usuárias do SIU-LNG caracterizou-se o padrão menstrual prévio e durante o uso do método clinicamente de acordo com Speroff et al. (1995).

Para as usuárias do implante subdérmico liberador de Nestorone, as quais apresentavam padrões de sangramento muito irregulares, não sendo possível caracterizá-los clinicamente, considerou-se o calendário menstrual (Apêndice 3) estabelecido por Belsey et al. (1986), preenchido pela mulher em sua casa e entregue durante a consulta, o qual permitiu determinar, nos últimos três meses de

uso do método, o número de episódios e a duração do sangramento endometrial em cada um deles.

O calendário menstrual constituiu parte do estudo multicêntrico, do qual todas as usuárias do implante subdérmico liberador de Nestorone participavam previamente ao estudo apresentado nesta tese.

3- Dentre as usuárias do SIU-LNG, todos os casos com estroma escasso ou ausente foram considerados como endométrio atrófico. Para tanto, baseamo-nos na definição de autores conceituados em patologia do endométrio (Mazur e Kurman, 1995), de que o tecido escasso talvez seja tudo o que esteja presente e, então, representa, completamente, o que ocorre na cavidade uterina. Uma mínima quantidade de tecido deve servir para diagnóstico, de acordo com Mazur e Kurman (1995), e isto não representa um material insuficiente.

Associando esta definição ao fato de que as biópsias endometriais foram realizadas sempre pelas mesmas pessoas, obedecendo aos mesmos critérios, incluímos aqueles casos que não continham mais de cinco campos de 400X para análise como atróficos, embora o restante das análises histológica e imunoistoquímica não tenha sido possível nestes casos.

No entanto, na publicação do estudo envolvendo as usuárias do implante subdérmico liberador de NES, os editores consideraram mais adequado tratar a presença de material escasso (menos de cinco campos para análise histológica)

ou ausente como material insuficiente, embasado nas definições de outros autores (Wang et al., 1995; Marbaix et al., 2000; Vincent et al., 2000).

Assim, no estudo envolvendo as usuárias do implante subdérmico liberador de NES, 12 casos foram considerados como material insuficiente e não como atrofia endometrial, e portanto estes não foram considerados nos resultados. Os demais 20 casos permitiram a análise de todas as variáveis estudadas. Salientamos que não há erro nas duas considerações, mas formas diferentes de interpretação.

Com relação aos resultados obtidos e com diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, dentre as usuárias do SIU-LNG o perímetro e o maior diâmetro glandular foram significativamente maiores no grupo sem sangramento. No grupo com sangramento verificou-se um número significativamente maior de leucócitos totais e células com imunoexpressão positiva para MMP-3.

Nas usuárias do implante subdérmico liberador de NES apenas o número de glândulas foi significativamente maior no grupo sem sangramento, e não houve diferença estatisticamente significativa com relação a nenhuma das demais variáveis estudadas.

No intuito de discutir os resultados obtidos de uma forma mais didática, as variáveis estudadas foram separadas em avaliação histológica, dos vasos sanguíneos e da imunoexpressão da MMP-3. Estes itens foram então subdivididos em usuárias do SIU-LNG e do implante subdérmico liberador de NES, e apresentados em seguida.

4.1. Avaliação histológica

4.1.1. Usuárias do SIU-LNG

Nas usuárias do SIU-LNG observou-se que não houve correlação entre a classificação histológica do endométrio e a presença ou não de sangramento. Nos dois grupos, o aspecto progestacional do endométrio foi o mais freqüente. A atrofia endometrial foi o segundo achado mais encontrado.

Alguns autores verificaram, em mulheres usuárias de Norplant®, 90% dos casos com endométrio progestacional, 5% de endométrios com característica descamativa e atrofia endometrial em 5% (Vincent et al. ,2000). Este anticoncepcivo também contém levonorgestrel, mas, ao contrário do SIU-LNG que age diretamente sobre o endométrio, o seu progestógeno age a distância (Hickey e Fraser, 2000a). Esperaríamos, então, que o SIU-LNG determinasse mais casos de atrofia endometrial que o Norplant®, o que foi verificado em 24,1% dos casos com sangramento e em 37,9% dos sem sangramento no presente estudo.

Dentro do grupo de usuárias do SIU-LNG com sangramento uterino, também foi encontrado um caso de endométrio secretor e outro de proliferativo. O endométrio secretor foi observado em 10% das usuárias de Norplant®, sugerindo ação endógena da progesterona (Marbaix et al., 2000), morfologia também descrita por Silverberg et al. (1986), como um caso contendo foco de glândulas em fase secretora. O padrão proliferativo não é facilmente explicado e também não encontramos casos na literatura com este aspecto. Poderíamos interpretar que nas mulheres que sangram ocasionalmente, na amostra curetada poderia ser observada a camada basal de regeneração da mucosa que tem aspecto proliferativo.

Dentre as características glandulares analisadas, o perímetro e o maior diâmetro glandular foram, significativamente, maiores no grupo sem sangramento. Não encontramos na literatura uma explicação para isso e poderíamos justificar este achado interpretando que a mucosa endometrial que sangra e descama com maior frequência não teria tempo suficiente para apresentar glândulas que se desenvolvessem mais e fossem maiores.

Os leucócitos totais apresentaram número significativamente maior no grupo com sangramento, o que coincide com a literatura atual, que considera o colapso da mucosa endometrial resultante de um processo inflamatório, no qual os leucócitos apresentam um papel-chave, através da produção de moléculas, incluindo citocinas e proteases (Finn, 1986; Salamonsen e Lathbury, 2000).

4.1.2. Usuárias do implante subdérmico liberador de NES

No estudo envolvendo usuárias do implante subdérmico liberador de NES o padrão histológico endometrial predominante foi o progestacional nos dois grupos avaliados. O aspecto histológico endometrial não apresentou correlação com a presença ou não de sangramento endometrial no dia da realização da biópsia de endométrio. Resultados semelhantes foram previamente descritos em usuárias do implante subdérmico Norplant® e do SIU-LNG (Silverberg et al., 1986; Johannisson, 1990; Skinner et al., 1999; Fraser e Hickey, 2000; Jones e Critchey et al., 2000; Marbaix et al., 2000; Rhoton-Vlasak et al., 2005).

A observação de dois casos de endometrite foi inesperada; no entanto, Rhoton-Vlasak et al. (2005), descreveram resultados similares em usuárias de Norplant®. Estas mulheres necessitam de especial atenção, uma vez que o sangramento uterino anormal pode ser consequência da endometrite e talvez possam se beneficiar do tratamento com antibióticos.

O número de glândulas foi significativamente menor em amostras endometriais de mulheres com sangramento endometrial. Este achado pode significar que a atrofia da mucosa é maior e a capacidade proliferativa é menor do que em mulheres sem sangramento endometrial. Isso pode correlacionar-se com o número de mitoses glandulares, as quais foram menos freqüentes (a metade do número) que as observadas em amostras endometriais das mulheres sem sangramento, embora sem significância estatística.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos com relação ao número de leucócitos. No entanto, nas 20 mulheres onde a avaliação foi possível, este número foi semelhante ao observado nas usuárias do SIU-LNG do grupo com sangramento endometrial.

A ausência de diferenças entre os aspectos histológicos endometriais de amostras de mulheres com ou sem sangramento endometrial, usuárias do implante subdérmico liberador de NES, pode decorrer do pequeno tamanho amostral nos grupos, uma vez que em um terço das amostras não foi possível realizar a avaliação histológica devido ao escasso material, como ocorreu em outros estudos (Vincent e Salamonsen, 2000).

4.2. Avaliação dos vasos sanguíneos

4.2.1. Usuárias do SIU-LNG

Não foram encontradas diferenças significantes nas usuárias do SIU-LNG entre os grupos estudados, com relação à densidade média do número de vasos ou ao maior diâmetro vascular.

Verificou-se um pequeno número de vasos no grupo em amenorréia (32 vasos/mm²), sendo este resultado semelhante ao observado em usuárias de progestógenos em altas doses por via oral (Song e Fraser, 1995) ou no endométrio exposto ao DIU liberador de progesterona (Progestasert®). Além disso, um outro estudo, envolvendo ratas, mostrou que a angiogênese não foi estimulada pelo LNG em doses altas (acima de 100 nmol/l) (Hague et al., 2002).

Quanto ao maior diâmetro vascular, no grupo com sangramento endometrial de usuárias do SIU-LNG verificou-se aumento da variação das medidas do maior diâmetro vascular que no grupo sem sangramento, sendo os valores da média dos casos com sangramento cerca de 30% maiores que os sem sangramento. Entretanto, pela análise estatística, estas diferenças não foram significantes, o que poderia estar relacionado ao tamanho amostral.

Outro estudo, no qual foi utilizado o marcador de células endoteliais CD-31, demonstrou que, em usuárias do SIU-LNG, a densidade vascular encontra-se diminuída e a área média dos vasos significativamente aumentada quando comparado ao endométrio em ciclos menstruais normais (Jondet et al., 2005).

4.2.2. Usuárias do implante subdérmico liberador de NES

Nas usuárias do implante subdérmico liberador de NES não foram observadas diferenças estatisticamente significantes, entre os grupos com e sem sangramento endometrial, considerando-se a densidade e o maior diâmetro vascular.

Dentre as usuárias com sangramento endometrial, os resultados deste estudo foram maiores em relação à densidade e menores quanto ao diâmetro vascular máximo, quando comparados ao estudo das usuárias do SIU-LNG com sangramento endometrial. No entanto, a densidade vascular encontrada no presente trabalho foi menor do que a observada por Hickey et al. (1999), 2 a 13 semanas e 14 a 42 semanas após a inserção, ou descrita por Rodgers et al. (1994), com 3 a 12 meses de uso do implante Norplant®.

Mudanças na densidade vascular, após a inserção do implante Norplant®, também foram descritas por Fraser e Hickey (2000), bem como verificadas em usuárias do SIU-LNG que apresentavam sangramento endometrial (MacGavigan et al., 2003).

Foi sugerido que a densidade vascular é maior em mulheres que apresentam endométrio atrófico (Hickey et al., 1999); porém outros autores não confirmaram este achado (Hickey et al., 1996a, 1996b; MacGavigan et al., 2003). Uma possível explicação para as diferenças encontradas entre os resultados deste estudo e aqueles de outros estudos (Hickey et al., 1999; Rodgers et al., 1994) pode ser o fato de que em 11 das 20 mulheres, nas quais a avaliação foi realizada, o aspecto histológico endometrial foi o progestacional e somente em três casos observou-se atrofia.

4.3. Avaliação da imunoexpressão da MMP-3

4.3.1. Usuárias do SIU-LNG

A quantificação da MMP-3 no grupo com sangramento uterino em usuárias do SIU-LNG mostrou aumento estatisticamente significativo quando comparada ao grupo sem sangramento. Este achado coincide com a literatura, que mostra que a MMP-3 estava localizada nas células estromais de usuárias de Norplant® e de AMP-D, sendo considerada na iniciação dos episódios de sangramento (Marbaix et al., 2000; Vincent e Salamonsen, 2000).

O uso da reação de Western blotting e da zimografia - em usuárias de Norplant® - detectou liberação de pro-MMP-3 significativamente aumentada no endométrio no período de sangramento em comparação com amostras sem sangramento. Neste mesmo estudo, a MMP-3 foi expressa na forma de granulações citoplasmáticas em algumas células estromais e em focos limitados a áreas com quebra estromal nos períodos de sangramento (36% dos casos: 5 de 14) e não naqueles sem sangramento (Marbaix et al., 2000).

Na avaliação deste estudo, a MMP-3 também foi encontrada na maior parte dos casos sem sangramento (excetuando-se dois), embora em número significativamente menor de células. A realização da reação de Perls's foi um cuidado no planejamento técnico do material que evitou a possibilidade de confusão da imunoexpressão da MMP-3 com a hemossiderina no momento da avaliação histológica.

4.3.2. Usuárias do implante subdérmico liberador de NES

Nas usuárias do implante subdérmico liberador de NES, a expressão celular da MMP-3 apresentou tendência a ser maior naquelas do grupo com sangramento endometrial, porém este resultado não foi estatisticamente significativo. A ausência de diferença pode decorrer de *bias* devido ao pequeno número amostral no grupo sem sangramento endometrial.

4.4. Limitações dos estudos

Estes estudos foram limitados por serem de corte transversal. Sugere-se que as próximas análises sejam feitas de forma prospectiva, com realização de biópsia de endométrio antes da inserção dos métodos e a seguir, a cada trimestre.

Quanto ao material que não foi suficiente para permitir análises histológica e imunoistoquímica completas nos dois estudos, estes dados coincidem com a literatura, pois um estudo com a cureta de Novak, em usuárias de Norplant®, considerou insuficientes 33% das biópsias (Marbaix et al., 2000). Outros descrevem uma perda de até metade dos casos coletados em usuárias de Norplant® e AMP-D com cureta de Pipelle® (Vincent et al., 2000).

Outra limitação no trabalho envolvendo as usuárias do implante subdérmico liberador de NES, a qual é comum a este tipo de estudo e não é exclusiva deste trabalho, foi o pequeno número de amostras endometriais que são possíveis de se obter a partir de mulheres sem sangramento ou com sangramento regular, para constituir o grupo-controle.

4.5. Considerações finais

Após revisão da literatura, verificamos que este é o primeiro estudo - envolvendo o implante subdérmico liberador de NES - no qual vários aspectos histológicos e imunoistoquímicos endometriais, incluindo as MMP-3, foram estudados.

Diante do exposto, verifica-se que nas usuárias do SIU-LNG houve evidente correlação da importância dos leucócitos e da MMP-3 na perda da integridade endometrial no grupo com sangramento endometrial, porém o mesmo não foi observado em usuárias do implante subdérmico liberador de NES. Os resultados obtidos sugerem a necessidade de se seguir avaliando os leucócitos endometriais, bem como suas interações enzimáticas, incluindo as MMP na busca dos mecanismos patogênicos do sangramento endometrial em usuárias de anticoncepcionais somente com progestógenos.

5. Conclusões

- O padrão endometrial mais frequentemente encontrado em **usuárias de SIU-LNG** foi o progestacional, seguido pelo aspecto atrófico, nos grupos com e sem sangramento uterino. Não houve correlação entre a classificação histológica e o padrão de sangramento em usuárias de SIU-LNG.
- Não houve diferença estatisticamente significativa, entre os grupos com e sem sangramento, com relação à ocorrência de endometrite, necrose estromal, erosão de superfície com reepitelização focal, colapso estromal, pseudoestratificação glandular e edema estromal.
- Não houve diferença estatisticamente significativa, entre os grupos com e sem sangramento, com relação à quantificação de mitoses, eosinófilos, plasmócitos, glândulas, mitoses no epitélio glandular, menor diâmetro e altura glandular.
- O perímetro e o maior diâmetro glandular foram as características morfológicas, que se apresentaram significativamente maiores no grupo sem sangramento, em comparação ao grupo com sangramento.

- O número significativamente maior de leucócitos, no grupo com sangramento, foi a característica morfológica, dentre as avaliadas, que se relacionou à ocorrência de sangramento endometrial, indicando o desencadeamento de um processo inflamatório.
- Não houve diferença estatisticamente significativa na densidade vascular e na medida do maior diâmetro dos vasos de cada caso entre os grupos estudados.
- A imunoexpressão da MMP-3 foi significativamente aumentada nos casos com sangramento uterino.

Em relação às usuárias do implante subdérmico liberador de NES:

- O padrão endometrial mais freqüentemente encontrado foi o progestacional. Não houve correlação entre a classificação histológica e o padrão de sangramento.
- Não houve diferença estatisticamente significativa, entre os grupos com e sem sangramento, com relação à ocorrência de endometrite, necrose estromal, erosão de superfície com reepitelização focal, colapso estromal, pseudoestratificação glandular e edema estromal.
- Não houve diferença estatisticamente significativa, entre os grupos com e sem sangramento, com relação à quantificação de mitoses, leucócitos, eosinófilos, plasmócitos, mitoses no epitélio glandular, área, perímetro, maior e menor diâmetros e altura glandular.

- O número de glândulas endometriais foi a única característica morfológica, no grupo sem sangramento, significativamente maior que no grupo com sangramento.
- Não houve diferença estatisticamente significativa, entre os grupos estudados, com relação à densidade vascular, à medida do maior diâmetro dos vasos de cada caso e à imunoexpressão da MMP-3.

6. Referências Bibliográficas

Andersson K, Rybo G. Levonorgestrel-releasing intrauterine device in the treatment of menorrhagia. **Br J Obstet Gynaecol** 1990; 97:690-4.

Andersson K, Batar I, Rybo G. Return to fertility after removal of a levonorgestrel-releasing intrauterine device and Nova-T. **Contraception** 1992a; 46:575-84.

Andersson K, Mattsson LA, Rybo G, Stadberg E. Intrauterine release of levonorgestrel – a new way of adding progestogen in hormone replacement therapy. **Obstet Gynecol** 1992b; 79:963-7.

Backman T, Huhtala S, Luoto R, Tuominen J, Rauramo I, Koskenuu M. Advance information improves user satisfaction with the levonorgestrel intrauterine system. **Obst Gynec** 2002; 99:608-13.

Barbosa I, Olsson SE, Odland, V, Gonçalves T, Coutinho E. Ovarian function after seven years use of levonorgestrel IUD. **Adv Contracept** 1995, 11:85-95.

Belsey EM, Machin D, D'arcangues C. The analysis of vaginal bleeding patterns induced by fertility regulating methods. **Contraception** 1986; 34:253-60.

Bonatz G, Hansmann MI, Bucholz F, Mettler L, Radzun HJ, Semm K. Macrophage and lymphocyte subsets in the endometrium during different phases of the ovarian cycle. **Int J Gynaecol Obstet** 1992; 37:29-36.

Brache V, Massai R, Mishell DR, Moo-Young AJ, Alvarez F, Salvatierra AM, et al. Ovarian function during use of Nestorone (R) subdermal implants. **Contraception** 2000; 61:199-204.

Brechin S, Cameron ST, Paterson AM, Willians AR, Critchley HO. Intrauterine polyps – a cause of unscheduled bleeding in women using the levonorgestrel intrauterine system: Case Report. **Hum Reprod** 2000; 15:650-2.

Chambers AF, Matrisian LM. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. **J Natl Cancer Inst** 1997; 89:1260-70.

Clavel C, Polette M, Doco M, Binnering I, Birembaut P. Immunolocalization of matrix metallo-proteinases and their tissue inhibitor in human mammary pathology. **Bull Cancer** 1992; 79:261-70.

Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Doenças da imunidade. In: Cotran RS; Kumar V; Robbins SL. **Patologia estrutural e funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1991a. p.137-8.

Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Inflamação e reparo. In: Cotran RS; Kumar V; Robbins SL. **Patologia estrutural e funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1991b.p.40-1.

Coutinho E. Clinical experience with implant contraception. **Contraception** 1978; 18:411-27.

Coutinho EM, Montgomery M. Elcometrine for long-term contraception and clinical management of endometriosis. In: Coutinho EM, Spinola P, eds. **Reproductive medicine: a millennium review**. New York: The Parthenon Publishing Group; 1999.p.87-91.

Cox M, Tripp J, Blacksell S. Clinical performance of the levonorgestrel intrauterine system in routine use by the UK Family Planning and Reproductive Health Research Network: 5-year report. **J Fam Plann Reprod Health Care** 2002; 28:73-77.

Critchley HOD, Wang H, Jones RL, Kelly RW, Drudy TA, Gebbie AE, et al. Morphological and functional features of endometrial decidualization following long-term intrauterine levonorgestrel delivery. **Hum Reprod** 1998; 13:1218-24.

Croxatto HB, Mäkäräinen L. The pharmacodynamics and efficacy of Implanon. An overview of the data. **Contraception** 1998; 58:915-75.

Croxatto HB. Progestin implants for female contraception. **Contraception** 2002; 65:15-9.

Croxatto HB, Brache V, Massai R, Alvarez F, Forcelledo ML, Pavez M, et al. Feasibility study of Nestorone-ethinylestradiol vaginal contraceptive ring for emergency contraception. **Contraception** 2006; 73:46-52.

Dallenbach-Hellweg GC. Morphological changes induced by exogenous gestagens in normal human endometrium. In: Dallenbach-Hellweg GC. **Functional morphologic changes in female sex organs induced by exogenous hormones**. Berlin: Springer; 1980. p.95-100.

D'arcangues C; Odland V; Fraser IS. Dysfunctional uterine bleeding induced by exogenous hormones. In: Alexander NJ, D'arcangues C, eds. **Steroids hormones and uterine bleeding**. Washington: AAAS Press; 1992. p.81-105.

D'arcangues C. Management of vaginal bleeding irregularities induced by progestin-only contraceptives. **Hum Reprod** 2000; 15(suppl.3):24-9.

Díaz S, Schiappacasse V, Pavez M, Zepeda A, Moo-Young AJ, Brandeis A, et al. Clinical trial with Nestorone subdermal contraceptive implants. **Contraception** 1995; 51:33-8.

Díaz J, Bahamondes L, Monteiro I, Petta C, Hidalgo MM, Arce XE. Acceptability and performance of the levonorgestrel-releasing intrauterine system (MIRENA®) in Campinas, Brazil. **Contraception** 2000; 62:59-61.

Dubuisson JB, Mugnier E. Acceptability of levonorgestrel releasing intrauterine system after discontinuation of previous contraception: results of a French clinical study in women aged 35 to 45 years. **Contraception** 2002; 66:121-8.

El-Mahgoub, S. D-norgestrel slow-releasing T device as an intrauterine contraceptive. **Am J Obstet Gynecol** 1975; 123:133-8.

Faúndes A, Alvarez F, Díaz JA. Latin American experience with levonorgestrel IUD. **Ann Med** 1993; 25:149-53.

Faúndes A, Alvarez F, Brache V, Cochon L, Tejada AS, Moo-Young. Correlation of endocrine profiles with bleeding patterns during use of Nestorone contraceptive implants. **Hum Reprod** 1999; 14:3013-7.

Fedele L, Bianchi S, Zanconato G, Portuese A, Raffaelli R. Use of a levonorgestrel releasing intrauterine device in the treatment of rectovaginal endometriosis. **Fertil Steril** 2000; 75:485-8.

Findlay JK. Future directions for research on endometrial bleeding. **Hum Reprod** 1996; 11(suppl.2):179-83.

Finn CA. Implantation, menstruation and inflammation. **Biol Rev** 1986; 61:313-28.

Fraser IS. A review of the role of progestogens in hormonal replacement therapy: influence on bleeding patterns. **Maturitas** 1986; 8(2):113-21.

Fraser IS, Hickey M, Song, J-Y. A comparison of mechanisms underlying disturbances of bleeding caused by spontaneous dysfunctional uterine bleeding on hormonal contraception. **Hum Reprod** 1996 11(suppl.2):165-79.

Fraser IS. Bleeding arising from the use of exogenous steroid. **Baillieres's Clin Obstet Gynaecol** 1999; 13:203-22.

Fraser IS, Hickey M. Endometrial vascular changes and bleeding disturbances with long-acting progestins. **Steroids** 2000; 65:665-70.

Fraser IS, Weisberg E, Minehan E, Johansson EDB. A detailed analysis of menstrual blood loss in women using Norplant and Nestorone progestogen – only contraceptive Implants or vaginal rings. **Contraception** 2000; 61:241-51.

Goldman S, Shalev E. The role of the matrix metalloproteinases in human endometrial and ovarian cycles. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol** 2003; 111:109-21.

Graesslin O, Cortez A, Fauvet R, Lorenzato M, Birembaut P, Darai E. Metalloproteinase-2, -7 and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 expression in normal, hyperplastic and neoplastic endometrium: a clinical-pathological correlation study. **Ann Oncol** 2006; 17:637-45.

Hague S, Mackenzie IZ, Bicknell R, Rees MC. In-vivo angiogenesis and progestogens. **Hum Reprod** 2002; 17:786-93.

Haukkamaa M, Laurikka-Routti M, Heikinheimo O. Transdermal absorption of the progestin ST-1435: therapeutic serum concentration and high secretion of the steroid in saliva. **Contraception** 1991; 44:269-76.

Hickey M, Fraser IS, Dwarte D, Graham S. Endometrial vasculature in Norplant® users: preliminary results from a hysteroscopic study. **Hum Reprod** 1996a; 11(suppl.2):35-44.

Hickey M, Lau TM, Russell P, Fraser IS. Microvascular density in conditions of endometrial atrophy. **Hum Rep** 1996b; 11:2009-13.

Hickey M, Dwarte D, Fraser IS. Precise measurements of intrauterine vascular structures at hysteroscopy in menorrhagia and during Norplant use. ***Hum Reprod*** 1998; 13:3190-6.

Hickey M, Simbar M, Young L, Markham R, Russel P, Fraser IS. A longitudinal study of changes in endometrial microvascular density in Norplant® implants users. ***Contraception*** 1999; 59:123-9.

Hickey M, Fraser IS. A functional model for progestogen-induced breakthrough bleeding. ***Hum Reprod*** 2000a; 15(suppl.3):1-6.

Hickey M, Fraser IS. The structure of endometrial microvessels. ***Hum Reprod*** 2000b; 15:57-66.

Hickey M, Fraser IS. Surface vascularization and endometrial appearance in women with menorrhagia or using levonorgestrel contraceptive implants. Implications for the mechanisms of breakthrough bleeding. ***Hum Reprod*** 2002; 17:2428-34.

Hidalgo MM, Bahamondes L, Perrotti M, Diaz J, Dantas-Monteiro C, Petta C. Bleeding patterns and clinical performance of the levonorgestrel-releasing intrauterine system (Mirena) up to two years. ***Contraception*** 2002; 65:325-8.

Houriham HM, Sheppard BL, Bonnar J. A morphometric study of the effects of oral norethisterone or levonorgestrel on endometrial blood vessels. ***Contraception*** 1986; 38:603-12.

Hubacher D, Grimes DA. Noncontraceptive health benefits of intrauterine devices: a systematic review. ***Obstet Gynecol Surv*** 2002; 57:120-8.

Hurskainen R, Teperi J, Rissanen P, Aalto AM, Grenman S, Kivela A, et al. Quality of life and cost-effectiveness of levonorgestrel-releasing intrauterine system versus hysterectomy for treatment of menorrhagia: a randomised trial. ***Lancet*** 2001; 357:273-7.

Hurskainen R, Teperi J, Rissanen P, Aalto AM, Grenman S, Kivela A, et al. Clinical outcomes and costs with the levonorgestrel-releasing intrauterine system or hysterectomy for treatment of menorrhagia: randomized trial 5-year follow-up. **JAMA** 2004; 291:1456-63.

Jeziorska M, Salamonsen LA, Wooley DE. Mast cell and eosinophil distribution and activation in human endometrium throughout the menstrual cycle. **Biol Reprod** 1995; 53:312-30.

Ji G, Shu-Li W, Shang-Chun W, Bo-Ling S, Allonen H, Luukkainen T. Comparison of the clinical performance, contraceptive efficacy and acceptability of levonorgestrel releasing IUD and Norplant – 2 implants in China. **Contraception** 1990; 41:485-94.

Johannisson E. Endometrial morphology during the normal cycle and under the influence of contraceptive steroids. In: D'arcangues C, Fraser IS, Newton JR, Odland V, eds. **Contraception and mechanisms of endometrial bleeding**. Cambridge: Cambridge University Press; 1990. p.53-80.

Johannisson E, Brosens I, Cornillie F, Elder M, White J, Sheppard B, et al. Morphometric study of the human endometrium following continuous exposure to levonorgestrel released from vaginal rings during 90 days. **Contraception** 1991; 43:361-74.

Jondet M, Letellier B, Verdys MT. Endometrial vascularization in levonorgestrel intrauterine device users; computerized microvessel measurement study. **Contraception** 2005; 71:60-4.

Jones RL, Critchley HOD. Morphological and functional changes in human endometrium following intrauterine levonorgestrel delivery. **Hum Reprod** 2000; 15(suppl.3):162-72.

Jones RL, Hannan NJ, Kaituú TJ, Zhang J, Salamonsen LA. Identification of chemokines important for leukocyte recruitment to the human endometrium at the times of embryo implantation and menstruation. **J Clin Endocrinol Metab** 2004; 89:6155-67.

Jones RL, Morison NB, Hannan NJ, Critchley HO, Salamonsen LA. Chemokine expression is dysregulated in the endometrium of women using progestin-only contraceptives and correlates to elevated recruitment of distinct leukocyte populations. **Hum Reprod** 2005; 20:2724-35.

Junqueira LC, Carneiro J. Células do sangue. In: Junqueira LC, Carneiro J. **Patologia estrutural e funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p.192-203.

Kim-Bjorklund T, Landgren BM, Johannisson E. Morphometric studies of the the endometrium, the fallopian tube, and the corpus luteum during contraception with the 300 mg norethisterone (NET) minipill. **Contraception** 1991; 43:459-74.

King A, Wellings V, Gardner L, Loke YW. Immunocytochemical characterization of the unusual large granular lymphocytes in human endometrium throughout the menstrual cycle. **Hum Immunol** 1989; 24:195-205.

Klauber N, Rohan RM, Flynn E, D'amato RJ. Critical components of the female reproductive pathway are suppressed by angiogenesis inhibitor AGM-1470. **Nature Med** 1997; 3:443-6.

Kumar N, Koide SS, Tsong Y-Y, Sundaram K. Nestorone®: a progestin with a unique pharmacological profile. **Steroids** 2000; 65:629-36.

Kurunmaki H, Toivonen J, Lahteenmaki P, Luukkainen T. Contraception with subdermal ST-1435 capsules: side-effects, endocrine profiles and liver function related to different lengths of capsules. **Contraception** 1985; 31:305-18.

Lahteenmaki P, Weiner E, Lahteenmaki P, Johansson E, Luukkainen T. Contraception with subcutaneous capsules containing ST-1435. Pituitary and ovarian function and plasma levels of ST-1435. **Contraception** 1981; 23:63-75.

Lähteenmäki PL, Díaz S, Miranda P, Croxatto H. Milk and plasma concentrations of the progestin ST-1435 in women treated parenterally with ST-1435. **Contraception** 1990; 42:555-2.

Lähteenmäki P, Haukkamaa M, Puollakka J, Rííkonen U, Sainio S. Open randomised study of use of levonorgestrel releasing intrauterine system as alternative to hysterectomy. **Br Med J** 1998; 316:1122-6.

Landgren B-M, Dada O, Aedo A-R, Johannisson E, Diczfalusy E. Pituitary, ovarian, and endometrial effects of 300 mg norethisterone and 30 mg of levonorgestrel administered on cycle days 7 to 10. **Contraception** 1990; 41:569-1.

Laurikka-Routti M, Haukkamaa M, Heikiheimo O. A contraceptive vaginal ring releasing ethinyl estradiol and the progestin ST-1435: bleeding control, serum steroid concentration, serum lipid and serum chemistry. **Contraception** 1990; 42:111-20.

Laurikka-Routti M, Haukkamaa M. A contraceptive subdermal implant releasing the progestin ST-1435: ovarian function, bleeding patterns and side effects. **Fertil steril** 1992; 51:142-7

Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, Hart I, Foltz CM, Shafie S. Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. **Nature** 1980; 284:67-8.

Lockhat FB, Emembolu JO, Komje JC. The efficacy, side-effects and continuation rates in women with symptomatic endometriosis undergoing treatment with an intra-uterine administered progestogen (Levonorgestrel): a 3 year follow-up. **Hum Reprod** 2005; 20:789-93.

Ludwig H. The morphologic response of the human endometrium to long-term treatment with progestational agents. ***Am J Obstet Gynecol*** 1982; 142:796-808.

Luukkainen T, Nilsson CG. Sustained intrauterine release of d-norgestrel. ***Contraception*** 1978; 18:451-4.

Luukkainen T, Allonen H, Haukkamaa M, Lähteenmäki P, Nilsson CG, Toivonen J. Five years experience with levonorgestrel-releasing IUDs. ***Contraception*** 1986; 33:139-48.

McGavigan CJ, Dockery P, Metaxa-Mariatou V, Campbell D, Stewart JRC, Cameron It, et al. Hormonally mediated disturbance of angiogenesis in the human endometrium after exposure to intrauterine levonorgestrel. ***Hum Reprod*** 2003; 18:77-84.

Marbaix E, Vekemans M, Galant C, Rigot V, Lemoine P, Dubois D, et al. Circulating sex hormones and endometrial stromelysin-1 (matrix metalloproteinase-3) at the start of bleeding episodes in levonorgestrel-implant users. ***Hum Reprod*** 2000; 15(suppl 3):120-34.

Martinez-Manautou J, Maqueo M, Aznar R, Pharriss BB, Zaffaroni A. Endometrial morphology in the exposed to uterine systems releasing progesterone. ***Am J Obstet Gynecol*** 1975;15:175-9.

Maruo T, Laoag-Fernandez JB, Pakarinen P, Murakoshi H, Spitz IM, Johansson E. Effects of the levonorgestrel-releasing intrauterine system on proliferation and apoptosis in the endometrium. ***Hum Reprod*** 2001; 16:2103-8.

Massai R, Diaz S, Jackanicz T, Croxatto HB. Vaginal rings for contraception in lactating women. ***Steroids*** 2000; 65:703-7.

Mazur MT, Kurman RJ. Dysfunctional Uterine Bleedings. In: Mazur MT, Kurman RJ. **Diagnosis of endometrial biopsies and curettings. A practical approach.** Nova Yorque: Verlag, 1995. p.89-108.

McGavigan CJ, Dockery P, Metaxa-Mariatou V, Campbell D, Stewart JRC, Cameron It, et al. Hormonally mediated disturbance of angiogenesis in the human endometrium after exposure to intrauterine levonorgestrel. ***Hum Reprod*** 2003; 18:77-84.

Monteiro I, Bahamondes L, Diaz J, Perrotti M, Petta C. Therapeutic use of levonorgestrel–releasing intrauterine system in women with menorrhagia: a pilot study. ***Contraception*** 2002; 65:325-8.

Nascimento R, Bahamondes L, Hidalgo M, Perrotti M, Espejo-Arce X, Petta C. User's perspectives on bleeding patterns after two years of levonorgestrel releasing intrauterine system use. ***Drugs*** 2002; 3:1-5.

Nilsson CG, Johannisson EDB, Jackanicz TM, Luukkainen T. Biodegradable polyactate as a steroid – releasing polymer: intrauterine administration of d-norgestrel. ***Am J Obstet Gynecol*** 1975; 122:90-5.

Nilsson CG, Luukkainen T, Arko H. Endometrial morphology of women using a D-norgestrel releasing intrauterine device. ***Fertil Steril*** 1978; 29:397-401.

Nilsson CG, Luukkainen T, Díaz J, Allonen H. Intrauterine contraception with levonorgestrel: a comparative clinical performance study. ***Lancet*** 1981; 1:577-80.

Nilsson CG, Lähteenmäki PLA, Luukkainen T. Ovarian function in amenorrheic and menstruating users of levonorgestrel–releasing intrauterine device. ***Fertil Steril*** 1984; 41:52-5.

Odland V, Lithell H, Selinus I, Vessby B. Unaltered lipoprotein and carbohydrate metabolism during treatment with contraceptive subdermal implants containing ST-1435. ***Ups J Med Sci*** 1984; 89:151-8.

Pekonen F, Nyman T, Lähteenmäki P, Haukkamaa M, Rutanen EM. Intrauterine progestin induces continuous insulin-like growth factor-binding protein production in the human endometrium. ***J Clin Endocrinol Metab*** 1992; 75:660-4.

Peloggia A, Petta CA, Bahamondes L, Oliveira-Ribeiro M, Zhang J, Salamonsen L. Endometrial chemokines, uterine natural killer cells and mast cells in long-term users of the levonorgestrel-releasing intrauterine system. **Hum Reprod** 2006; 25.

Pengdi Z, Xiaoqun L, Hongzhi L, Zhao G, Jie C, Ruhua X. et al. The effect of levonorgestrel-releasing intrauterine device on human endometrial oestrogen and progesterone receptors after one year of use. **Hum Reprod** 1999; 14:970-75.

Petta CA, Ferriani RA, Abrão MS, Hassan D, Rosa e Silva JC, Podagaec S, et al. Randomized clinical trial of a levonorgestrel-releasing intrauterine system and a depot GnRH analogue for the treatment of chronic pelvic pain in women with endometriosis. **Hum Reprod** 2005; 20:1993-8.

Phillips V, Graham CT, Manek S, McCluggage WG. The effects of the levonorgestrel intrauterine system (Mirena coil) on endometrial morphology. **J Clin Pathol** 2003; 56:305-7.

Puolakka J, Nilsson C, Haukkamaa M. Conservative treatment of excessive uterine bleeding and dysmenorrhoea with levonorgestrel intrauterine system as an alternative to hysterectomy. **Acta Obstet Gynecol Scand** 1996; 75(suppl):82.

Rhoton-Vlasak A, Chegini N, Hardt N, Williams RS. Histological characteristics and altered expression of interleukins (IL) IL-13 and IL-15 in endometria of levonorgestrel users with different uterine bleeding patterns. **Fertil Steril** 2005; 83:659-65.

Robertson DCN, Sivin I, Nash HA, Braun J, Dinh J. Release rates of levonorgestrel from Silastic capsule, homogeneous rods and covered rods in humans. **Contraception** 1983; 27:483-95.

Rogers P, Au CL, Affandi B. Endometrial microvascular density during the normal menstrua cycle and following exposure to long-term levonorgestrel. **Hum Reprod** 1993; 8:1396-404.

Rodgers WH, Matrisian LM, Giudice LC, et al. Patterns of matrix metalloproteinase expression in cycling endometrium imply differential functions and regulation by steroid hormones. **J Clin Invest** 1994; 94:946-53.

Salamonsen LA, Woolley, DE. Menstruation: induction by matrix metalloproteinases and inflammatory cells. **J Reprod Immun** 1999; 44:1-27.

Salamonsen LA, Lathbury L. Endometrial leukocytes and menstruation. **Hum Reprod Update** 2000; 6:16-27.

Salamonsen LA, Zahng J, Hampton A, Lathbury L. Regulation of matrix metalloproteinases in human endometrium. **Hum Reprod** 2000; 15(suppl 3):112-9.

Scommegma A, Pandya GN, Christ M, Lee AW, Cohen MR. Intrauterine administration of progesterone by a slow releasing device. **Fertil Steril** 1970; 21:201-9.

Shaw ST Jr, Macaulay LK, Aznar R, Gonzalez-Angulo A, Roy S. Effects of a progesterone-releasing intrauterine contraceptive device on endometrial blood vessels: a morphometris study. **Am J Obstet Gynecol** 1981; 14:821-7.

Silverberg SG, Haukkamaa M, Arko H, Nilsson CG, Luukkainen T. Endometrial morphology during long-term use of levonorgestrel-releasing intrauterine devices. **Int J Gynecol Pathol** 1986; 5:235-41.

Sitruk-Ware R. New progestagens for contraceptive use. **Hum Reprod Update** 2006; 12:169-78.

Sivin I, El Mahgoub S, Mccarthy T, Mishell DR, Shoupe D, Alvarez F. et al. Long-term contraception with the levonorgestrel 20 mcg/day (LNG 20) and the Cooper T380 A intrauterine devices: a five-year randomized study. **Contraception** 1990; 42:361-78.

Sivin I, Croxatto H, Bahamondes L, Brache V, Alvarez F, Massai R. Two-year performance of a Nestorone-releasing contraceptive implant: a three-center study of 300 women. **Contraception** 2004; 69:137-44.

Sivin I, Mishell DR Jr, Alvarez F, Brache V, Elomaa K, Lahteenmaki P. Contraceptive vaginal rings releasing Nestorone and ethinylestradiol: a 1-year dose-finding trial. **Contraception** 2005; 71:122-9.

Skinner JL, Ruley SC, Gebbie AE, Glasier AF, Critchley HO. Regulation of matrix metalloproteinase-9 in endometrium during the menstrual cycle and following administration of intrauterine levonorgestrel. **Hum Rep** 1999; 14:793-9.

Smith SK. Steroids and endometrial breakthrough bleeding: future directions for research. **Hum Reprod** 2000; 15(suppl.3):197-202.

Soini Y, Alarakkola E, Autio-Harmainen H. Expression of messenger RNAs for metalloproteinases 2 and 9, type IV collagen, and laminin in nonneoplastic and neoplastic endometrium. **Human Pathol** 1997; 28:220-6.

Song JY, Fraser IS. Effects of progestogens on human endometrium. **Obstet Gynecol Survey** 1995; 50:385-94.

Song JY, Russell P, Markham R, Manconi F, Fraser IS. Effects of high dose progestogens on white cells and necrosis in human endometrium. **Human Reprod** 1998; 11:1713-8.

Speroff L, Glass R, Kase N. Hemorragia uterina disfuncional. In: Speroff L, Glass R, Kase. **Endocrinologia ginecológica clínica e infertilidade**. São Paulo: Manole; 1995. 557p.

Suhonen S, Haukkamaa M, Lahteenmaki P, Holmstrom T. Endometrial effect of transdermal estradiol and progestin ST-1435 in postmenopausal women. **Fertil Steril** 1992; 57:1211-5.

Suhonen SP, Holmstrom T, Allonen HO, Lahteenmaki P. Intrauterine and subdermal progestin administration in postmenopausal hormone replacement therapy. **Fertil Steril** 1995; 63:336-42.

Trundley A, Moffett A. Human uterine leukocytes and pregnancy. **Tissue Antigens** 2004; 63:1-12.

Vercellini P, Aimi G, Panazza S, De Giorgi O, Pesole A, Crosegni PG. A levonorgestrel-releasing intrauterine system for the treatment of dysmenorrhea associated with endometriosis: a pilot study. **Fertil Steril** 1999; 72:505-8.

Vincent AJ, Salamonsen LA. The role of matrix metalloproteinases and leukocytes in abnormal uterine bleeding associated with progestin-only contraceptives. **Hum Reprod** 2000; 15(suppl 3):135-43.

Vincent AJ, Zhang J, Ostor A, Rogers PAW, Affandi B, Kovacs G. et al. Matrix metalloproteinase-1 and -3 and mast cells are present in the endometrium of women using progestin-only contraceptives. **Hum Reprod** 2000; 15:123-30.

Vincent AJ, Zhang J, Östör A, Rogers PAW, Affandi B, Kovacs G, et al. Decreased tissue inhibition of metalloproteinase in the endometrium of women using depot medroxyprogesterone acetate: a role for altered endometrial matrix metalloproteinase/tissue inhibition of metalloproteinase balance in the pathogenesis of abnormal uterine bleeding? **Human Reprod** 2002; 17:1189-98.

Wang IYS, Russel P, Fraser IS. Endometrial morphometry in users of intrauterine contraceptive devices and women with ovulatory dysfunctional uterine bleeding: a comparison with normal endometrium. **Contraception** 1995; 51:243-8.

Weisberg E, Brache V, Alvarez F, Massai R, Mishell DR Jr, Apter D. Clinical performance and menstrual bleeding patterns with three dosage combinations of a Nestorone progestogen/ethinyl estradiol contraceptive vaginal ring used on a bleeding-signal regimen. **Contraception** 2005; 72:46-52.

Xiao B, Zeng T, Wu S, Sun H, Xiao N. Effect of levonorgestrel–releasing intrauterine device on hormonal profile and menstrual patterns after long-term use. **Contraception** 1995; 51:359-65.

Ylänen K, Laatikainen T, Lahteenmaki P, Moo-Young AJ. Subdermal progestin implant (Nestorone) in the treatment of endometriosis: clinical response to various doses. **Acta Obstet Gynecol Scand** 2003; 82:167-72.

Zhang J, Nie G, Jian W, Woolley DE, Salamonsen LA. Mast cell regulation of endometrial stromal cell matrix metalloproteinases: a mechanism underlying menstruation. **Biol Reprod** 1998; 59:693-703.

7. Bibliografia de Normatizações

FRANÇA, J.L.; BORGES, S.M.; VASCONCELLOS, A.C.; MAGALHÃES, M.H.A.
– **Manual para normatização de publicações técnico-científicas**. 4^a ed.,
Editora UFMG, Belo Horizonte, 1998. 213p.

Normas e procedimentos para publicação de dissertações e teses. Faculdade
de Ciências Médicas, UNICAMP. Ed. SAD – Deliberação CCPG-001/98
(alterada 2005).

8. Anexos

8.1. Anexo 1 – Termo de consentimento livre e esclarecido

**HISTOLOGIA ENDOMETRIAL, DENSIDADE, CALIBRE MICROVASCULAR E
MATRIZ-METALOPROTEINASE-3 EM USUÁRIAS DO SISTEMA INTRA-UTERINO
LIBERADOR DE LEVONORGESTREL OU DO IMPLANTE SUBDÉRMICO
LIBERADOR DE NESTORONE COM E SEM SANGRAMENTO ENDOMETRIAL**

Eu, _____,
RG nº: _____, idade: _____ anos, residente à
_____,
matrícula PF: _____, fui informada por _____, que:

- a) Este trabalho tem como objetivo estudar as características microscópicas, da camada de dentro do útero (endométrio), de usuárias de Mirena ou do implante de Nestorone; para tentar descobrir o que leva algumas mulheres a apresentarem sangramento uterino imprevisível e outras a não apresentarem sangramento. Se isto for encontrado, será um caminho para determinar o tratamento do sangramento alterado, evitando que muitas mulheres desistam de usar estes métodos anticoncepcionais.
- b) Caso aceite participar do estudo, inicialmente, irei responder a um questionário, sobre minhas características pessoais, minhas gestações e meus fluxos menstruais antes e após começar o uso do Mirena ou do implante de Nestorone.
- c) Se aceito participar do estudo, hoje, serei submetida à retirada de uma pequena amostra de dentro do meu útero. Este procedimento será feito, pelo(a) médico(a). Eu ficarei em posição de exame ginecológico, após o toque vaginal, será colocado um espécuro, realizada a limpeza do colo uterino, podendo ser necessário ou não a colocação de uma pinça no colo uterino e então, será introduzida uma cânula fina, de plástico e estéril, em meu útero; seguido por movimento rápido, porém delicado, desta cânula. O material retirado, de dentro do meu útero, será mostrado para mim e a seguir enviado, para avaliação, no Departamento de Patologia da UNICAMP.
- d) Estou ciente que poderá haver cólica, semelhante à de uma menstruação, durante e após a retirada da amostra; bem como sangramento, na maioria das vezes, leve. Outros riscos, que podem acontecer são: infecção dentro do útero (endometrite), saída

do DIU do lugar (em quem usa o Mirena) e perfuração do útero. Todos os cuidados serão tomados para que estes problemas não ocorram. Fui informada de que, diante de qualquer efeito ruim, relacionado ao estudo, receberei atenção médica adequada na UNICAMP e não haverá qualquer ônus financeiro para mim.

- e) Minha participação neste estudo é totalmente livre, isto é, se não desejar participar, não terei nenhum prejuízo em meu atendimento no ambulatório. Não receberei nenhum benefício pela minha participação.
- f) Serei informada sobre este estudo sempre que eu quiser.
- g) Eu tenho o direito de solicitar minha saída da pesquisa, em qualquer momento, sem perder nenhum direito na clínica.
- h) As informações obtidas desse estudo serão transmitidas somente de forma que não possa ser identificada minha participação.
- i) No caso de algum problema ou dúvida, durante o período do estudo, poderei contactar a Dra. Marília Oliveira Ribeiro, telefone 3788-7176, de 2^a a 6^a, das 8 às 17 horas.
- j) Se tiver alguma pergunta ou reclamação a respeito do meu atendimento e da minha participação, neste estudo, poderei entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, da UNICAMP, telefone (19) 3788-8936.
- k) Com relação a necessidade da pesquisadora responsável entrar em contato comigo, solicitando meu retorno, antes da próxima consulta agendada:

☐ **Autorizo** - ☐ Por telefone:
☐ na minha residência,
☐ no trabalho,
☐ de recado;
☐ Por carta

☐ **Não autorizo**

Voluntária

Pesquisador(a)

Unicamp, Campinas - SP, ____ / ____ / 200__

8.2. Anexo 2 – Ficha para coleta de dados

HISTOLOGIA ENDOMETRIAL, DENSIDADE, CALIBRE MICROVASCULAR E MATRIZ-METALOPROTEINASE-3 EM USUÁRIAS DO SISTEMA INTRA-UTERINO LIBERADOR DE LEVONORGESTREL OU DO IMPLANTE SUBDÉRMICO LIBERADOR DE NESTORONE COM E SEM SANGRAMENTO ENDOMETRIAL

1) Caso nº: [][]

Dados do prontuário

2) N.º PF: [][][][][]

3) N.º HC: [][][][][][][][]

4) Endereço: Rua

Qd _____ nº _____ Qd _____ Lt _____

Bairro _____

Cidade _____

Ponto de referência: _____

5) Telefone: residência: _____

trabalho: _____

recado: _____

FICHA PARA COLETA DE DADOS

HISTOLOGIA ENDOMETRIAL, DENSIDADE, CALIBRE MICROVASCULAR E MATRIZ-METALOPROTEINASE-3 EM USUÁRIAS DO SISTEMA INTRA-UTERINO LIBERADOR DE LEVONORGESTREL OU DO IMPLANTE SUBDÉRMICO LIBERADOR DE NESTORONE COM E SEM SANGRAMENTO ENDOMETRIAL

Entrevistador(a): _____

- 1) Caso n°:
- 2) Grupo: ☐ (1.com sangramento 2.sem sangramento)
- 3) Qual a sua idade? anos
- 4) Qual a sua cor? ☐ (1.Branca 2.Negra 3.Amarela 4.Outra)
- 5) Você já engravidou? ☐ (1.sim 2.não). Se não, passe à questão n° 10
- 6) Quantas gestações você teve? gestações
- 7) Quantos partos você teve? partos
- 8) Quantos abortos você teve? abortos
- 9) **Antes** de iniciar o método, de quantos em quantos dias você menstruava?
 dias ☐ Não se lembra
- 9.1) Quantos dias durava sua menstruação? dias ☐ Não se lembra
- 9.2) Quantos absorventes você usava por dia? absorventes ☐ Não se lembra
- 9.3) Os absorventes ficavam encharcados? ☐ (1.sim 2.não) ☐ Não se lembra
- 9.4) Ocorria sangramento, em borra de café, que não exigia uso de absorventes ou tampões (*spottings*)? ☐ (1.sim 2.não) ☐ Não se lembra. **Se não, passe à questão 11.**
- 9.5) Quantos dias durava no mês? dias ☐ Não se lembra

Para o investigador: Padrão de sangramento: 9.6) Quanto ao intervalo: ☐ (1.eumenorréia 2.espaniomenorréia 3.polimenorréia 4.metrorragia 5.amenorréia)

9.7) Quanto ao número de dias de fluxo: ☐ (1. hipomenorréia 2.normal 3. hipermenorréia)

9.8) Quanto ao volume do fluxo : ☐ (1.oligomenorréia 2.normal 3. menorragia)

10) **Após iniciar este método anticoncepcional**

1. ☐ Não menstrua há 3 meses ou mais. **Encerre a entrevista. Preencha o item 15.**
2. ☐ Está menstruando. **Passe à questão 11.**
3. ☐ Está menstruando e apresentando *spotting*. **Passe à questão 12.**
4. ☐ Está apresentando apenas *spotting*. **Passe à questão 13.**

11) **Nos últimos 3 meses**

- Qual o intervalo entre suas menstruações? ☐☐ dias ☐ Não se lembra
- 11.1) Quantos dias duram suas menstruações? ☐☐ dias ☐ Não se lembra
- 11.2) Quantos absorventes você usa por dia? ☐☐ absorventes ☐ Não se lembra
- 11.3) Os absorventes ficam encharcados? ☐ (1.sim 2.não) ☐ Não se lembra

Passe à questão 14

Para o investigador : Padrão de sangramento: 11.4) Quanto ao intervalo: ☐
(1.eumenorréia 2.espaniomenorréia 3.polimenorréia 4.metrorragia)

11.5) Quanto ao número de dias de fluxo: ☐ (1. hipomenorréia 2. normal 3. hipermenorréia)

11.6) Quanto ao volume do fluxo : ☐ (1.oligomenorréia 2.normal 3. menorragia
4.aumentada)

12) **Nos últimos 3 meses**

- Qual o intervalo entre suas menstruações ? ☐☐ dias ☐ Não se lembra
- 12.1) Quantos dias duram suas menstruações? ☐☐ dias ☐ Não se lembra
- 12.2) Quantos absorventes você usa por dia? ☐☐ absorventes ☐ Não se lembra
- 12.3) Os absorventes ficam encharcados? ☐ (1.sim 2.não) ☐ Não se lembra
- 12.4) Os *spottings* ocorrem até quantos dias por mês? ☐☐ dias ☐ Não se lembra

Passe à questão 14

Para o investigador : Padrão de sangramento: 12.5) Quanto ao intervalo: ☐
(1.eumenorréia 2.espaniomenorréia 3.polimenorréia 4.metrorragia)

12.6) Quanto ao número de dias de fluxo: ☐ (1. hipomenorréia 2. normal 3. hipermenorréia)

12.7) Quanto ao volume do fluxo menstrual: ☐ (1.oligomenorréia 2.normal 3. menorragia
4. aumentada)

13) Nos últimos 3 meses

Os *spottings* ocorrem até quantos dias por mês? dias ☐ Não se lembra

14) Você está menstruada ou com *spotting* hoje? ☐ (1.sim 2. não)

Encerre a entrevista. Preencha o item 15 para as usuárias do Implante subdérmico liberador de NES ou passe para o 16 para as usuárias do SIU-LNG

15) Calendário menstrual

15.1) Número de episódios de sangramento nos últimos 3 meses:

15.2) Duração de cada episódio de sangramento:

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

Dados do prontuário:

16.1) Tempo de uso do método: meses

16.2) Peso: , kg

16.3) Altura: , m

16.4) IMC =

Histopatológico:

17) Avaliação qualitativa

- 17.1) Endométrio progesteracional ☐
- 17.2) Endométrio atrófico ☐
- 17.3) Endométrio secretor ☐
- 17.4) Endométrio proliferativo ☐
- 17.5) Hiperplasia endometrial típica ☐
- 17.6) Hiperplasia endometrial atípica ☐
- 17.7) Câncer endometrial ☐
- 17.8) Endometrite ☐
- 17.9) Necrose estromal ☐
- 17.10) Erosão de superfície com reepitelização focal ☐
- 17.11) Colapso Estromal ☐
- 17.12) Pseudo-estratificação ☐ (0. Nenhuma; 1. < 25%; 2. 25-50%; 3. Intenso)
- 17.13) Edema ☐ (0. Ausente; 1. Leve; 2. Moderado; 3. Intenso)

18) Avaliação quantitativa

- 18.1) Mitoses (nº/5 campos de grande aumento) ☐☐
- 18.2) Leucócitos (nº/5 campos de grande aumento) ☐☐☐
- 18.3) Eosinófilos (nº/5 campos de grande aumento) ☐☐
- 18.4) Plasmócitos (nº/5 campos de grande aumento) ☐☐
- 18.5) Glândulas (nº/5 campos de grande aumento) ☐☐
- 18.6) Mitoses glandulares (nº/5 campos de grande aumento) ☐☐
- 18.7) Área glandular (μm) ☐☐☐☐☐
- 18.8) Perímetro glandular (μm) ☐☐☐
- 18.9) Maior diâmetro glandular (μm) ☐☐☐
- 18.10) Menor diâmetro glandular (μm) ☐☐☐
- 18.11) Altura glandular (μm) ☐☐

19) Imunoistoquímica para CD 34

- 19.1) Número de vasos por mm^2 = ☐☐☐☐☐
- 19.2) Maior diâmetro vascular em μm = ☐☐☐☐☐

20) Imunoistoquímica para MMP-3

- 20.1) Número de células estromais = ☐☐☐☐☐
- 20.2) Índice de positividade por 1000 células estromais = ☐☐☐☐☐☐☐

8.3. Anexo 3 – Calendário menstrual

DAILY MENSTRUAL RECORD KEEP A DAILY RECORD OF MENSTRUAL BLEEDING AND SPOTTING.

X=BLEEDING; I=SPOTTING.

BRING THIS RECORD AT EACH CLINIC VISIT

REGISTRO DIARIO DE SANGRADO MARQUE DIARIAMENTE COM EL SIMBOL QUE CORRESPONDA A SU ESTADO MENS TRUAL. X=SANGRA; I=MANCHAS.

TRAIGA ESTE REGISTRO A CADA CONSULTA

PROTOCOL NO:

CLINIC NO:

SUBJECTS'NO.

SUBJECTS INITIALS:

YEAR AÑO	NAME NOMBRE	PROTOCOL PROTOCOLO	CLINIC CLINICA	PATIENT PACIENTE
-------------	----------------	-----------------------	-------------------	---------------------

MONTH MES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
JAN ERE																															
FEB																															
MAR																															
APR ABR																															
MAY																															
JUN																															
JUL																															
AUG AGO																															
SEP																															
OCT																															
NOV																															
DEC DIC																															

Dates covered by this record: First date:
D M Y

Fechas cubiertas por este registro: Fecha primeira:
D M Y

Last date:
D M Y

Última fecha:
D M Y

NOTE: Records should be continuous from admission date

NOTE: Registros deben ser continuos desde la fecha de admission