

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

MARIANA KEFALÁS OLIVEIRA GOMES

**Sistema intra-uterino de levonorgestrel comparado a agonista do
GnRH no tratamento da endometriose: efeitos sobre o
estadiamento laparoscópico e alterações histológicas do
endométrio eutópico e ectópico**

RIBEIRÃO PRETO
2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MARIANA KEFALÁS OLIVEIRA GOMES

**Sistema intra-uterino de levonorgestrel comparado a agonista do
GnRH no tratamento da endometriose: efeitos sobre o
estadiamento laparoscópico e alterações histológicas do
endométrio eutópico e ectópico**

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Doutor em
Medicina.

Área de concentração: Tocoginecologia
Orientador: Prof. Dr. Rui Alberto Ferriani

RIBEIRÃO PRETO
2007

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Gomes, Mariana Kefalás Oliveira

Sistema intra-uterino de levonorgestrel comparado a agonista do GnRH no tratamento da endometriose: efeitos sobre o estadiamento laparoscópico e alterações histológicas do endométrio eutópico e ectópico. Ribeirão Preto, 2007.

97p.: il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Tocoginecologia.

Orientador: Ferriani, Rui Alberto.

1. Endometriose. 2. Agonista do GnRH. 3. Sistema intra-uterino de levonorgestrel. 4. Apoptose. 5. Receptor esteróides.

DEDICATÓRIA

A **Deus** e a **Nossa Senhora**

“Confio em teu poder, em tua bondade;

Em ti confio com filialidade.

Confio, cego, em toda a situação,

Mãe, no teu Filho e na tua proteção.”

A meus pais, **Renato e Ilza**, exemplos de que a busca do saber é um alicerce de nossa construção. Não mediram esforços para nos tornarmos pessoas de glória. Esta tese é uma conquista **nossa**...

Ao **Sandro**, “amore mio”... só um grande amor compreende as dedicações e as renúncias... Dividir mais esta vitória contigo muito me emociona!

A **nossa filhota**, muito entusiasmada neste momento dentro de meu ventre... está lançada a sementinha do amor, da dedicação, da renúncia e da determinação...

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e seu Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, por propiciar parte da minha formação profissional e científica.

Às mulheres que participaram desse estudo como voluntárias, que por motivos éticos não posso agradecer nominalmente, pela inestimável colaboração e pela confiança depositada.

Ao Prof. Dr. Rui Alberto Ferriani, amigo e mestre, um grande orientador que, com muita dedicação, me ensinou a construir as asas para voar... Para mim, uma referência científica, acadêmica e de valorização do ser humano. Serei eternamente grata por tudo que me proporcionou.

Às amigas do coração Carol e Elaine, com quem pude compartilhar tantos momentos deste crescimento. Em 2008, seremos todas “doutoras”, ficaremos fisicamente mais distantes, mas nosso laço de amizade nunca se desatará...

Aos grandes amigos Júlio e Carol Rosa e Silva, que não mediram esforços para a concretização desta obra. Sempre disponíveis e presentes... uma verdadeira amizade! Palavras aqui escritas são singelas frente à gratidão que tenho por eles.

Ao Prof. Dr. Marcos Felipe Silva de Sá, pela dedicação à pós-graduação e pela preocupação constante com a melhoria da qualidade do nosso ensino. Obrigada pela amizade e incentivo.

Ao Prof. Dr. Sérgio Britto Garcia, que, com tanto carinho, nos abriu a porta de seu laboratório de Oncopatologia e colaborou ativamente para a realização deste projeto. Obrigada pela paciência, dedicação, pelas fundamentais contribuições na concretização desta obra e por participar da minha banca de doutorado.

Às companheiras Rosângela Orlandin Lopes, Aline Turatti e Patrícia Modiano, pela forma acolhedora com que me receberam no Departamento de Patologia. Nem saberia como agradecer tanta colaboração e presteza para que toda a parte histológica desta obra desse certo.

À Profa. Dra. Paula Andréa de Albuquerque por participar de minha banca, trazendo valiosas contribuições a essa tese, mas, antes de tudo, pela grande amizade.

Ao Prof. Dr. Eddie Fernando Murta por acreditar no meu trabalho, me estimular e apoiar na Universidade Federal do Triângulo Mineiro. É uma satisfação tê-lo como um integrante da banca desta tese.

À Prof. Dra. Helena Corleto, pela sua disponibilidade de integrar minha banca de doutorado.

Ao Prof. Dr. Antônio Alberto Nogueira e ao Prof. Dr. Francisco Cândido dos Reis, pela amizade, pelos ensinamentos no Ambulatório de Endoscopia e Algia Pélvica e pelas contribuições na construção deste trabalho.

Ao médico contratado Rodrigo Ferreira pelas contribuições e pela amizade.

À equipe do Laboratório de Reprodução Humana (Sandra Aparecida C. Vianna, Maria Auxiliadora de Pádua Rosa, Marilda H. Y. Dantas, Maria Aparecida C. Vasconcelos, Maria Albina V. Bortolheiro e Maria Cristina Picinato M. de Araújo) que sempre se mostrou prestativa, e, sobretudo, muito agradável e amiga.

À Sra. Ilza Resende Mazzocato, sempre eficiente na árdua tarefa de vencer os entraves burocráticos; disponível para garantir ajuda sempre que necessário. Uma amiga...

A todos que compõem o Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (professores e médicos contratados), pela minha formação profissional. Com certeza, onde quer que eu esteja, esse departamento será sempre minha referência acadêmica.

A todos funcionários do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela disponibilidade em ajudar quando necessário.

À Comissão de Pós-graduação em Tocoginecologia, pela oportunidade de fazer meu doutorado nesse setor, o que é motivo de muito orgulho para mim.

Ao Prof. Dr. Marco Fábio Prata Lima, pelos incentivos, confiança, apoio e amizade em Uberaba.

Aos meus irmãos Aninha, Paulinho, Lilica e Ana pelas companhias nas viagens, pelos incentivos, pelas palavras de conforto e pela paciência.

Aos meus tios, Troncon e Bete, que, carinhosamente, lapidaram esta obra. Obrigada pelo acolhimento e apoio nos momentos árduos.

Aos meus padrinhos, Alexandre e Ângela, que, com doces palavras, sempre me incentivaram e apoiaram.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do HCFMRP-USP (FAEPA) pelos auxílios financeiros concedidos.

Ao laboratório Schering pela cessão dos medicamentos para o estudo.

A todos os que contribuíram, direta ou indiretamente, para realização desse trabalho.

“Fica decretado que,
a partir deste instante,
haverá girassóis em todas as janelas,
que os girassóis terão direito
a abrir-se dentro da sombra;
e que as janelas devem permanecer,
o dia inteiro, abertas para o verde
onde cresce a esperança.”

(Os Estatutos do Homem.
Thiago de Mello)

RESUMO

GOMES, M.K.O. **Sistema intra-uterino de levonorgestrel comparado a agonista do GnRH no tratamento da endometriose: efeitos sobre o estadiamento laparoscópico e alterações histológicas do endométrio eutópico e ectópico.** 2007. 97 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

O objetivo desse estudo prospectivo e controlado foi avaliar a ação do SIU-LNG no endométrio eutópico e ectópico de mulheres com algia pélvica crônica e endometriose, utilizando, como controle, pacientes tratadas com agonista do GnRH (aGnRH). **Método:** Vinte e duas mulheres entre 18 e 40 anos, com dor pélvica crônica, foram randomizadas para receber tratamento com SIU-LNG (n = 11) ou injeções mensais de aGnRH (n = 11) por 6 meses. Foi realizado “second-look” laparoscópico e o estadiamento da endometriose segundo os critérios da *American Society for Reproductive Medicine* (ASRM) foi comparado àquele da cirurgia pré-tratamento. Amostras de endométrio eutópico e ectópico obtidas pré- e pós tratamento foram analisadas por imuno-histoquímica. Modificações na expressão do marcador de apoptose Fas, receptor de progesterona tipo A (PRA) e receptor de estrogênio- α (ER- α) foram quantificadas por *H-score* (um método microscópico quantitativo que avalia o número e a intensidade de células marcadas). Também foi quantificado o número de células marcadas pelo *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) (em 1000 células contadas), sendo expresso em índice de proliferação celular (IPC). A análise estatística foi realizada pelo teste bicaudal de Mann-Whitney. **Resultados:** Quatro pacientes (1 no grupo SIU-LNG e 3 no grupo aGnRH) foram excluídas por terem se recusado a realizar a laparoscopia de revisão. Após 6 meses de tratamento, o estadiamento reduziu em 6/10 pacientes (60%) no grupo SIU-LNG e em 3/8 pacientes no grupo aGnRH (p=0,1698). O IPC reduziu após tratamento com SIU-LNG e com aGnRH, no epitélio (EP) e estroma (ST) do endométrio eutópico e ectópico (p<0,05). Apenas as usuárias de SIU-LNG apresentaram aumento do *H-score* para Fas no EP do endométrio eutópico e do ectópico (p<0,05). No ST, não houve modificação. A expressão de

ER- α e PRA pelo EP glandular foi menor no endométrio eutópico após ambos os tratamentos, mas no EP glandular do endométrio ectópico houve redução apenas após o uso de SIU-LNG ($p < 0,05$). No ST, observou-se menor expressão de ER- α no endométrio eutópico e ectópico das usuárias de SIU-LNG e somente no endométrio eutópico das pacientes tratadas com aGnRH ($p < 0,05$). Houve menor expressão de PRA no ST do endométrio eutópico e ectópico apenas nas usuárias de SIU-LNG ($p < 0,05$). Para todos os marcadores avaliados, nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos. **Conclusões:** Ambos os tratamentos apresentaram tendência a reduzir a extensão das lesões endometrióticas em pacientes com algia pélvica crônica. De maneira semelhante ao aGnRH, o SIU-LNG reduziu a proliferação celular, a expressão de PRA e ER- α e aumentou a apoptose no endométrio eutópico e ectópico de pacientes com endometriose. Este mecanismo possivelmente explica a ação do SIU-LNG na redução da algia pélvica.

Palavras-chave: endometriose; sistema intra-uterino de levonorgestrel; agonista do GnRH; apoptose; receptor esteróide.

ABSTRACT

GOMES, M.K.O. **Levonorgestrel-releasing intrauterine system compared to GnRH agonist: effects on endometriosis staging and on histological changes of eutopic and ectopic endometrium.** 2007. 97 f. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

The aim of this prospective and controlled study was to evaluate the effects of the levonorgestrel-releasing intrauterine system (LNG-IUS) on the eutopic and on the ectopic endometrium of women with endometriosis-related pain and to compare the results with those obtained with a GnRH agonist (GnRHa). **Methods:** Twenty-two women aged 18–40 years old, with endometriosis and pelvic pain, were randomized to receive LNG-IUS insertion (n = 11) or GnRHa monthly injection (n = 11) during a 6 months treatment. In the baseline laparoscopy, as well as in the second-look laparoscopy, the disease was staged according to the criteria established by the American Society for Reproductive Medicine (ASRM). Pre- and post-treatment paraffin-embedded endometrium and endometriosis specimens were examined immunohistochemically. Changes in the expression of progesterone receptor A (PRA), estrogen receptor- α (ER- α) and Fas (a mediator of apoptotic signal) were evaluated by the H-score (a quantitative microscopical method evaluating staining intensity and number of stained cells). Also, the number of stained endometrial glands cells obtained with proliferating cell nuclear antigen (PCNA) was counted and a proliferation cellular index (PCI) was determined (number of stained cells in 1000 cells counted). Statistical analysis included the Mann-Whitney two tailed test. **Results:** Four patients (1 in the LNG-IUS group and 3 in the GnRHa group) were excluded for having refused to be submitted to the second-look laparoscopy. After 6 months of treatment, the ASRM stage was lower in 6 (60%) of the 10 LNG-IUS group patients and in 3 (37.5%) of the 8 GnRHa group patients ($p = 0.1698$). The PCI was markedly reduced after LNG-IUS and GnRHa treatment in both epithelium (EP) and stroma (S) of eutopic and ectopic endometrium ($p < 0.05$). H-score of Fas significantly

increased on the EP of the eutopic ($p<0.05$) and the ectopic ($p<0.05$) endometrium only after LNG-IUS treatment. On the ST of LNG-IUS users, there was no change for H-score of Fas. Expression of ER- α and of PRA significantly reduced after both treatments on the EP of the eutopic endometrium ($p<0.05$), but on the EP of the ectopic endometrium there was a significant reduction that occurred only after LNG-IUS treatment ($p<0.05$) for both receptors. On the ST, the expression of ER- α decreased on the eutopic and ectopic endometrium of patients treated with LNG-IUS and only on the eutopic endometrium of GnRHa users ($p<0.05$). Moreover, the expression of PRA on the ST of the eutopic and ectopic endometrium decreased only in patients treated with LNG-IUS ($p<0.05$). However, for all markers tested, there were no statistically differences between the groups. **Conclusions:** Both treatments appeared to reduce the extent of pelvic endometriotic lesions in patients with chronic pelvic pain. Similar to GnRHa, LNG-IUS decreased cell proliferation, PRA and ER- α expression and increased apoptosis in endometrium of patients with endometriosis. This mechanism possibly explains its effects on pelvic pain reduction.

Keywords: endometriosis; levonorgestrel-releasing intrauterine system; GnRH agonist; apoptosis; steroid receptor.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 (artigo original 1) - Estadiamento laparoscópico da endometriose segundo a <i>American Society for Reproductive Medicine</i> antes (estadio basal) e após 6 meses (estadio 2nd-look) de tratamento com SIU-LNG ou aGnRH em mulheres com algia pélvica crônica.....	43
Tabela 1 (artigo original 2) – Características dos anticorpos primários.....	57
Tabela 2 (artigo original 2) - Distribuição das mulheres nos grupos de tratamento de acordo com as características basais.....	59

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 (Introdução) - Modelo esquemático do sistema intra-uterino de levonorgestrel (Mirena®) na cavidade endometrial.....22
- Figura 1 (Artigo original 1) – Cirurgia laparoscópica pré- (fig. A, B e C) e pós-tratamento com sistema intra-uterino de levonorgestrel (SIU-LNG) (D e E) de uma paciente cujo estadiamento da endometriose proposto pela *American Society for Reproductive Medicine* na laparoscopia basal foi estadio IV (grave) (fig. A). Durante o procedimento inicial, foi realizada a lise das aderências e cauterização dos focos de endometriose (fig. B e C). Após 6 meses da inserção do SIU-LNG, a laparoscopia de revisão evidenciou estadio I (endometriose mínima) (fig D e E).....44
- Figura 2 (Artigo original 1) – Cirurgia laparoscópica pré- (fig. A) e pós-tratamento com agonista do GnRH (aGnRH) (fig. B) de uma paciente cujo estadiamento da endometriose proposto pela *American Society for Reproductive Medicine* na laparoscopia basal foi estadio III (moderado) (fig A). Durante o procedimento inicial, foi realizada a cauterização dos focos de endometriose. Após 6 meses de tratamento com aGnRH, a laparoscopia de revisão evidenciou estadio II (endometriose leve) (fig B).45
- Figura 3 (Artigo original 1) - Cirurgia laparoscópica pré- (fig. A) e pós-tratamento com agonista do GnRH (aGnRH) (fig. B) de uma paciente cujo estadiamento da endometriose proposto pela *American Society for Reproductive Medicine* na laparoscopia basal foi estadio III (moderado) (fig. A). Durante o procedimento inicial,

foi realizada a lise das aderências e exérese do endometrioma em ovário direito (fig. A - seta). Após 6 meses tratamento com aGnRH, a laparoscopia de revisão evidenciou estadio II (endometriose leve) (fig. B).45

Figura 1 (Artigo original 2) - Fotomicrografias de reações imuno-histoquímicas: (A) marcação por PCNA em endométrio ectópico pré-tratamento (setas) – 400X; (a) controle negativo da marcação por PCNA – 400X. (B) Marcação por Fas em endométrio eutópico pré-tratamento (seta) – 200X; (b) controle negativo da marcação por Fas – 400X. (C) Marcação por receptor de estrogênio tipo α (ER- α) em endométrio ectópico pré-tratamento (seta) – 400X; (c) controle negativo da marcação por ER- α – 400X . (D) Marcação por receptor de progesterona tipo A (PRA) em endométrio ectópico pós-tratamento com agonista do GnRH (seta) – 400X; (d) controle negativo da marcação por PRA – 400X. S – estroma; E – epitélio. (*).....60

Figura 2 (Artigo original 2) – Efeito do sistema intra-uterino de levonorgestrel (SIU-LNG) e do agonista do GnRH (aGnRH) na proliferação celular do endométrio eutópico (A) e ectópico (B) de pacientes com endometriose.....62

Figura 3 (Artigo original 2) – Efeito do sistema intra-uterino de levonorgestrel (SIU-LNG) e do agonista do GnRH (aGnRH) na apoptose, avaliada pela expressão do Fas, do endométrio eutópico (A) e ectópico (B) de pacientes com endometriose.....64

* Observação: os campos da figura acima representam a reação imuno-histoquímica e não a quantificação da marcação.

Figura 4 (Artigo original 2) – Efeito do sistema intra-uterino de levonorgestrel (SIU-LNG) e do agonista do GnRH (aGnRH) sobre o receptor de estrogênio α (ER- α) do endométrio eutópico (A) e ectópico (B) de pacientes com endometriose.....66

Figura 5 (Artigo original 2) - Efeito do sistema intra-uterino de levonorgestrel (SIU-LNG) e do agonista do GnRH (aGnRH) sobre o receptor de progesterona A (PRA) do endométrio eutópico (A) e ectópico (B) de pacientes com endometriose.....68

LISTA DE ABREVIATURAS

aGnRH - agonista do hormônio liberador de gonadotrofinas

ASRM – Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (*American Society for Reproductive Medicine*)

Bcl-2 - *B cell lymphoma/leukemia gene-2*

bFGF - fator de crescimento básico de fibroblasto

DAB – diaminobenzidina

DNA – ácido desoxirribonucléico

ER – receptor de estrogênio

ER- α – receptor de estrogênio tipo α

ER- β – receptor de estrogênio tipo β

FasL – *Fas ligand*

Fig. - figura

GM-CSF - fator estimulador de colônias de macrófago

GnRH - hormônio liberador de gonadotrofinas

HCFMRP-USP - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto –
Universidade de São Paulo

H-score - escore histológico imuno-histoquímico

IGF-I – fator de crescimento insulina-*like* tipo I

IGFBP-I proteína ligante do fator de crescimento insulina-*like* tipo I

IMC – índice de massa corporal

IPC – índice de proliferação celular

LNG – levonorgestrel

MMPs - metaloproteases

mRNA – ácido ribonucléico mensageiro

NS – não significativo

PCNA – *Proliferating Cell Nuclear Antigen*

PR – receptor de progesterona

PRA – receptor de progesterona tipo A

PRB – receptor de progesterona tipo B

RNA – ácido ribonucléico

SE – erro padrão da média

SIU – sistema intra-uterino

SIU-LNG – sistema intra-uterino de levonorgestrel

TGF- β 1 - fator de crescimento transformador β 1

TNF - fator de necrose tumoral (Tumoral necrosis factor)

VAS – escala visual analógica

VEGF - fator de crescimento de endotélio vascular

Vs. – versus

17 β HSD-2 - 17 β hidroxí-esteróide dehidrogenase isoforma 2

SUMÁRIO*

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Efeitos endometriais do sistema intra-uterino de levonorgestrel.....	20
1.2 Sistema intra-uterino liberador de levonorgestrel e endometriose.....	26
REFERÊNCIAS	30
2 OBJETIVOS	35
2.1 Objetivo geral.....	36
2.2 Objetivos específicos.....	36
3 PACIENTES E MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO (Formato de manuscrito)	37
3.1 Artigo original 1.....	38
3.2 Artigo original 2.....	51
4 CONCLUSÕES	82
ANEXOS	84
ANEXO A – Aprovação Comitê de Ética HCFMRP-USP.....	85
ANEXO B – Termo de consentimento pós-informação	86
ANEXO C – Contra-indicações para o uso do SIU-LNG de acordo com a última revisão da Organização Mundial de Saúde (<i>World Health Organization</i> , 2004).....	90
ANEXO D – Estadiamento laparoscópico da endometriose segundo os critérios propostos pela <i>American Society for Reproductive Medicine</i> (1997).....	92
ANEXO E - Correspondência publicada referente ao artigo original 1.....	93

* A redação desta tese foi realizada segundo as “Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP” (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Diretrizes para a apresentação de dissertações e teses da USP: documentos eletrônicos ou impressos. São Paulo: SIBi-USP, 2004, 110p.).

1 Introdução

1.1 Efeitos endometriais do sistema intra-uterino de levonorgestrel

Um dos mais versáteis métodos de contracepção reversível de longa duração é o sistema intra-uterino de levonorgestrel (SIU-LNG). Como contraceptivo, é extremamente eficaz, sendo comparável à esterilização feminina. Estudos comparativos acumularam uma experiência clínica de mais de 12.000 mulheres-ano de uso deste contraceptivo (LAHTEENMAKI; RAURAMO; BACKMAN, 2000). A taxa cumulativa de gravidez em 5 anos é de 0,5-1,1% (SIVIN et al., 1990; ANDERSON; ODLIND; RYBO, 1994). Atualmente, grande ênfase é dada aos benefícios não contraceptivos do SIU-LNG. Supressão da menstruação, controle da reserva de ferro, melhora da dismenorréia e proteção endometrial na terapia hormonal durante o climatério são alguns destes benefícios. Há evidências crescentes quanto ao seu uso em endometriose, miomatose uterina, adenomiose e hiperplasia endometrial (PETTA et al., 2005; VARMA; SINHA; GUPTA, 2006).

Estudos pioneiros sobre a administração intra-uterina de progestogênios foram realizados em animais em 1968 e em humanos por Scommegna et al. em 1970 (SCOMMEGNA et al., 1970; DOYLE & CLEWE, 1986; BRUCE, 1989). Na Escandinávia em 1978, foram realizadas as primeiras experiências com os SIU-LNG como uma alternativa para contracepção. Os autores publicaram o primeiro estudo com um SIU "T" de Tatum (NOVA-T), no qual o cobre foi trocado por uma cápsula de polidimetilsiloxano (Silastic®), liberando aproximadamente 50 µg de levonorgestrel (LNG) ao dia. Observou-se que as voluntárias apresentavam sangramentos menstruais irregulares, porém com uma diminuição da quantidade total de perda sanguínea em relação ao nível anterior e supressão da ovulação em 83,4% dos casos (NILSSON; JOHANSSON; LUUKKAINEN, 1976).

Os resultados até então obtidos estimularam o desenvolvimento de dispositivos intra-uterinos liberadores de doses mais baixas de LNG, sendo, entre eles, dois novos modelos

liberadores de 20 e 30 µg de LNG. Os autores observaram que, à biópsia de endométrio, todas as usuárias apresentaram supressão endometrial. Outro achado foi que mais da metade das usuárias do dispositivo com 20 µg não obtiveram a completa supressão da ovulação, pois apresentaram níveis de progesterona elevados durante o uso (LUUKKAINEN et al., 1986).

Comprovando a redução do sangramento em mulheres usuárias do SIU-LNG, um outro estudo observou o nível sanguíneo de LNG e sua ação sobre o endométrio. Em 12 amostras, houve supressão do epitélio glandular e decidualização do estroma (NILSSON; LUUKKAINEN; ARKO, 1978). Os bons resultados deste SIU na fase I e II dos estudos clínicos, encorajaram os autores a programarem uma terceira fase colaborativa do estudo. Este estudo fase III visou comparar a ação dos dois modelos de SIU-LNG, liberando 20 e 30 µg, com o NOVA-T. Os resultados desta pesquisa mostraram, finalmente, que o SIU-LNG foi altamente eficaz como endoceptivo. Demonstrou-se elevada taxa de continuação, baixa taxa de complicações e com níveis estáveis de LNG ao longo dos anos (NILSSON et al., 1981; NILSSON et al., 1982; LUUKKAINEN et al., 1987; SIVIN et al., 1987).

Desta maneira, em 1990, o SIU-LNG foi introduzido pelo laboratório *Leiras* para seu uso na Finlândia, progredindo para Europa, Estados Unidos e já no Brasil na segunda metade do ano de 2002, comercializado assim com o nome de Mirena® (Schering Oy, Turku, Finland) (LUUKKAINEN et al., 1987).

O SIU-LNG consiste de uma estrutura de polietileno em forma de “T” que no seu corpo vertical (com 32 mm) apresenta um cilindro. Neste cilindro, há uma mistura contendo 52 mg de LNG e polidimetilsiloxano (Silastic®), uma membrana que regula a liberação de LNG (figura 1), na proporção de 1:1. Em um período de 5 anos, o cilindro libera 20 µg em 24 horas, reduzindo para 14 e 11 µg/dia após cinco anos, quando deve ser removido (LUUKKAINEN; LAHTEENMAKI; TOIVONEN, 1990). O LNG liberado na cavidade uterina é absorvido sistemicamente e a concentração sérica máxima é atingida em poucas

horas. Os níveis séricos variam de 150 a 200 $\mu\text{g/mL}$ e não são suficientes para suprimir a ovulação, uma vez que para isso seriam necessários 50 μg de LNG por 24h (LAHTEENMAKI; RAURAMO; BACKMAN, 2000). Aproximadamente 85% das usuárias do SIU-LNG permanecem ovulando (XIAO et al., 1995).

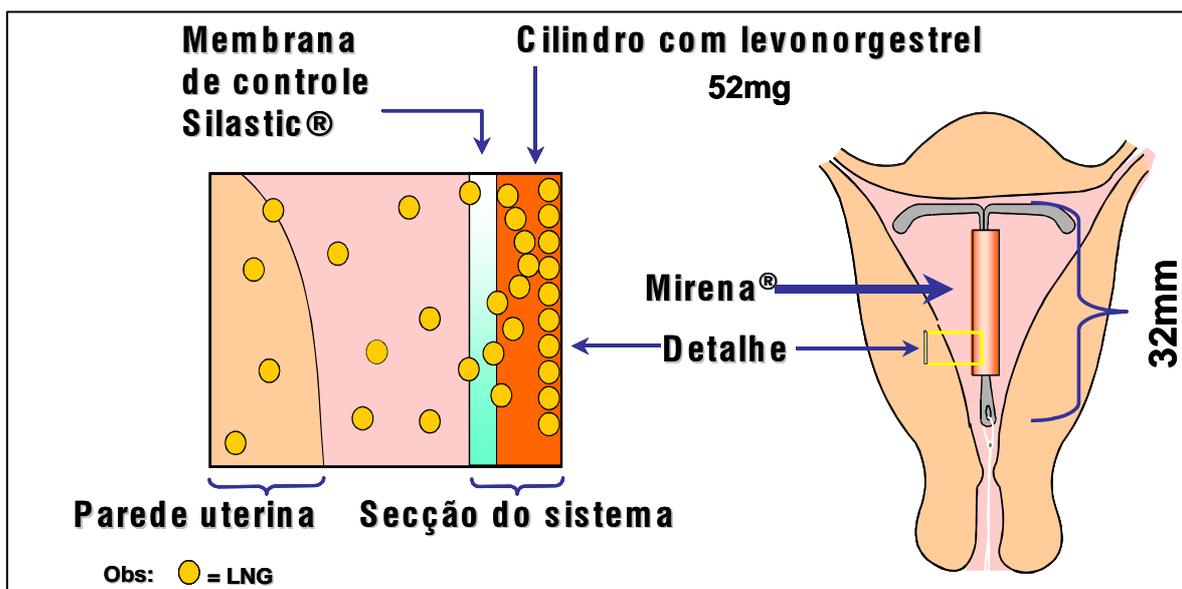


Figura 1 – Modelo esquemático do sistema intra-uterino de levonorgestrel (Mirena®) na cavidade endometrial.

O LNG liberado pelo SIU na cavidade uterina é um derivado da 19-nortestosterona, com forte ação progesterônica sobre o tecido endometrial. A eficácia contraceptiva do SIU-LNG está relacionada principalmente com alteração na receptividade endometrial (NILSSON; LUUKKAINEN; ARKO, 1978), supressão uniforme da proliferação endometrial, inibição da migração espermática e espessamento do muco cervical (LUUKKAINEN; LAHTEENMAKI; TOIVONEN, 1990; BARBOSA et al., 1995).

A administração intra-uterina de LNG resulta em imediata e profunda modificação da morfologia e da função endometrial. Há uma decidualização estromal, atrofia glandular e da superfície do epitélio e alterações na morfologia vascular (MILLING SMITH &

CRITCHLEY, 2005). Além destas modificações histológicas locais, alterações na expressão de receptores esteróides sexuais e no sistema de fator de crescimento insulina-*like* (IGF), alterações imunológicas e de fatores locais uterinos também são descritas e serão detalhadas a seguir.

1.1.1 Modificações Histológicas

À microscopia de luz, observa-se que o uso de progestógenos intra-útero leva à atrofia glandular e o estroma torna-se decidualizado (SILVERBERG et al., 1986). A matriz extracelular modifica-se de edematosa para compacta.

À microscopia eletrônica, a ultra-estrutura do endométrio durante o uso de SIU-LNG difere parcialmente daquela durante a fase secretora normal. Pakarinen et al. (1998) observou uma redução das projeções das células epiteliais sobre a lâmina basal. Sugere-se que a diferenciação e a função do epitélio endometrial podem ser dirigidas por mensagens do estroma, sendo as projeções das células epiteliais a ponte entre os dois tecidos (ROBERTS; WALKER; LAVIA, 1988). Desta forma, os achados de Pakarinen et al. (1998) podem justificar a atrofia proporcionada pelo LNG tópico. Outro achado foi lâmina basal mais desenvolvida entre os dois tipos de células, o que poderia estar prevenindo a penetração do processo atrófico além do endométrio. No estroma, há infiltração de neutrófilos (PAKARINEN et al., 1998).

Foram descritas alterações na formação das artérias espiraladas e a ocorrência de microvasos superficiais mais finos e frágeis (HICKEY et al., 1996). Contudo, as alterações vasculares parecem ser temporárias e apresentam correlação com a melhora do padrão de sangramento irregular (McGAVIGAN et al., 2003).

1.1.2 Modificações na expressão de receptores de esteróides sexuais e sistema IGF

O endométrio das usuárias de LNG é caracterizado por uma marcante diminuição da expressão dos receptores de progesterona (PR), de estrogênio (ER) e de androgênio tanto no epitélio glandular como no estroma (CRITCHLEY et al., 1998; PENGDI et al., 1999; BURTON et al., 2003). Em um estudo comparativo com pacientes apresentando hiperplasia de endométrio, o SIU-LNG causou total depleção da expressão de PR dos tipos A (PRA) e B (PRB) e expressiva diminuição da expressão de ER dos tipos α (ER- α) e β (ER- β). Nas pacientes tratadas com acetato de medroxiprogesterona oral, a redução foi bem menos marcante (VEREIDE et al., 2006).

O endométrio exposto ao SIU-LNG experimenta um ambiente local intracelular de “deficiência estrogênica”. Isto, provavelmente, se deve a uma modulação intrácrina de uma enzima responsável em converter o estradiol em estrona, um estrogênio menos potente. Esta enzima, a 17 β hidroxí-esteróide dehidrogenase isoforma 2 (17 β HSD-2), é estimulada pela progesterona. Nos primeiros meses de uso do SIU-LNG, a expressão de mRNA da 17 β HSD-2 se mantém elevada com um declínio da sua expressão 6 meses após a inserção (BURTON et al., 2003). Estudos correlacionam estas modulações intrácrinas com episódios de sangramento anormal nas usuárias de SIU-LNG (BURTON et al., 2003; CRITCHLEY et al., 2006).

Outro fator que parece contribuir para o endométrio das usuárias de SIU-LNG tornar-se insensível ao estradiol circulante é a inibição da ação do fator de crescimento insulina-*like* I (IGF-I). O IGF-I é um dos responsáveis pelo efeito mitótico do estrogênio no endométrio. Rutanen, Salmi e Nyman (1997) demonstraram supressão da expressão de IGF-I e simultânea indução de sua proteína ligante IGFBP-I no endométrio exposto ao SIU-LNG. Estes achados refletem como o efeito inibitório da ação mitogênica do estradiol no endométrio, proporcionado pelo LNG intra-útero, pode ocorrer por sistemas parácrinos.

1.1.3 Modificações Imunológicas e de fatores locais

A infiltração leucocitária é marcante no endométrio exposto ao SIU-LNG. A maioria dos leucócitos são células *natural killer* endométrio-específicas e macrófagos (JONES & CRITCHLEY, 2000). Há um significativo aumento de fator estimulador de colônias de macrófago (GM-CSF) de maneira semelhante ao que ocorre na decídua verdadeira durante o primeiro trimestre de gestação (CRITCHLEY et al., 1998). Findlay (1996) observou que endométrio exposto a progestogênios pode produzir fatores que não são normalmente associados à decídua verdadeira. Estes fatores podem danificar os vasos sanguíneos do endométrio exposto. Há evidências de expressão alterada de citocinas, tais como IL-8, IL-13 e IL-15, dependendo do progestogênio ao qual é exposto o endométrio (JONES et al., 2005; RHOTHON-VLASAK et al., 2005).

Mediadores locais envolvidos no processo menstrual, incluindo IL-8 e ciclo-oxigenase 2, estão aumentados logo após a inserção do SIU-LNG. Há decréscimo dos mesmos 6 meses após a inserção. Assim, concentrações maiores de prostaglandinas são encontradas no endométrio nos primeiros meses de exposição (JONES & CRITCHLEY, 2000).

Endométrio exposto ao SIU-LNG apresenta notável aumento de fatores estimuladores de angiogênese até 12 meses após sua inserção. Em biópsias endometriais seriadas pré- e pós-inserção de SIU-LNG, Roopa et al. (2003) verificaram aumento dos níveis teciduais de fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF), fator de crescimento transformador β 1 (TGF- β 1) e fator de crescimento básico de fibroblasto (bFGF). Esta alteração poderia contribuir para aumentar a permeabilidade vascular e propiciar sangramento. Já pacientes com adeniose tratadas com SIU-LNG apresentaram expressiva redução da expressão de VEGF tanto pelo epitélio glandular como pelo estroma (LOAG-FERNANDEZ et al., 2003). Estes

autores demonstraram aumento na expressão de adrenomedulina pelo epitélio e estroma endometrial, a qual também está envolvida na angiogênese.

No endométrio de usuárias de SIU-LNG, observa-se ainda aumento da expressão de metaloproteases (MMPs), que, por sua ação proteolítica, estão envolvidas na remodelação endometrial (SKINNER et al., 1999; OLIVEIRA-RIBEIRO et al., 2004).

Em suma, além da atrofia glandular e decidualização estromal, muitas são as particularidades do endométrio exposto ao SIU-LNG. O conhecimento das inúmeras modificações endometriais proporcionadas pelo SIU-LNG amplia seu uso para indicações que não as contraceptivas.

1.2 Sistema intra-uterino liberador de levonorgestrel e endometriose

As evidências vêm favorecendo o uso do SIU-LNG no tratamento da algia pélvica associada à endometriose (BAHAMONDES et al., 2007). Os efeitos colaterais, a dificuldade de adesão e o tratamento por longo prazo são as grandes limitações do arsenal terapêutico até então existente para controlar a algia pélvica relacionada com a endometriose. As drogas comumente utilizadas para tratar esta entidade incluem os anti-inflamatórios não-esteroidais, anti-estrogênios (p. ex. progestogênios, androgênios como o danazol) e drogas que induzem ou pseudomenopausa (p. ex. agonistas do GnRH - aGnRH) ou pseudogravidez (p. ex. contraceptivos orais combinados) (GAMBONE et al., 2002). Diferentemente de algumas dessas medicações, o SIU-LNG não causa hipoestrogenismo, e seus efeitos adversos, e não leva a um bloqueio total da ovulação na grande maioria das usuárias. Ressalta-se, ainda, que as portadoras de SIU-LNG mantêm baixos níveis séricos de LNG, apresentando a

possibilidade do uso prolongado, durante cinco anos (NILSSON et al., 1980; NILSSON et al., 1982; BARBOSA et al., 1990).

Estudos não comparativos foram realizados para avaliar a tolerabilidade, a eficácia e o grau de satisfação das usuárias do SIU-LNG no tratamento da dor pélvica associada a endometriose. Um dos primeiros estudos piloto verificou que a amenorréia e hipomenorréia causada pelo SIU estavam associadas à melhora da dismenorréia e ao alto grau de satisfação das mulheres com o uso do método. Por meio de uma análise subjetiva e objetiva da dor pélvica, observou-se nesta pesquisa uma redução significativa da dismenorréia em 12 meses de seguimento (VERCELLINI et al., 1999).

Fedele et al. (2001) analisaram durante doze meses, o efeito do SIU-LNG em 11 mulheres com endometriose de septo retovaginal altamente sintomáticas. Houve regressão de 100% dos sintomas dolorosos severos com apenas três meses de tratamento, principalmente da dismenorréia e da dor pélvica não cíclica. Quanto à dispareunia de profundidade, apesar de não ter ocorrido a sua regressão total, houve melhora significativa do quadro, assim como do tenesmo retal. Outro achado foi redução do tamanho e volume das lesões e nódulos endometrióticos após doze meses de seguimento.

Em um estudo de casos, avaliaram-se, por laparoscopia, mulheres portadoras de endometriose em uso do SIU-LNG (LOCKHAT; EMEMBOLU; KONJE, 2004). Foi observado que, além da importante melhora da dor pélvica em seis meses de seguimento, ocorreram mudanças satisfatórias no estadiamento laparoscópico da endometriose. Este estudo não comparativo demonstrou, pela primeira vez, que o SIU-LNG reduz as lesões endometrióticas. No entanto, a melhora dos sintomas não estaria diretamente relacionada à mudança no estadiamento. O mesmo grupo correlacionou os efeitos benéficos do SIU-LNG na endometriose com o nível elevado de LNG no fluido peritoneal e no sangue venoso periférico das usuárias (LOCKHAT; EMEMBOLU; KONJE, 2005a). Estes níveis foram

observados no fluido e no soro logo após a inserção do SIU. Posteriormente, estes autores reportaram persistência da melhora clínica dos sintomas associados à endometriose 3 anos após a inserção do SIU-LNG (LOCKHAT; EMEMBOLU; KONJE, 2005b). Os efeitos adversos foram mínimos e manteve-se alta a taxa de aceitabilidade do tratamento com o dispositivo. Não foram observadas modificações significativas na qualidade de vida das usuárias.

São poucos os estudos comparativos entre o SIU-LNG e outras formas terapêuticas para tratamento da algia pélvica associada a endometriose. Um dos primeiros neste contexto avaliou dois grupos de mulheres com endometriose submetidas a tratamento cirúrgico laparoscópico (VERCELLINI et al., 2003). Em um grupo, foi inserido o SIU-LNG logo após a cirurgia e o outro grupo limitou-se apenas ao procedimento cirúrgico. Após um ano de evolução, foi observada uma redução na recorrência da dismenorréia moderada e severa, da dispareunia e da dor pélvica nas usuárias do endoceptivo. As pacientes tratadas com SIU-LNG apresentaram alto grau de satisfação. Recentemente, Petta et al. (2005) avaliaram 82 mulheres com algia pélvica crônica e endometriose (estádio I a IV) randomizadas entre 6 meses de tratamento com SIU-LNG ou aGnRH. Os autores demonstraram que o SIU-LNG apresenta efeito semelhante ao aGnRH no controle da dor, sendo a melhora da dor presente já no fim do primeiro mês de tratamento e persistente durante os 6 meses de seguimento. Contudo, nenhuma diferença na qualidade de vida após o tratamento foi observada em ambos os grupos. Os autores ressaltaram que o uso do SIU-LNG para tratar a algia pélvica crônica associada à endometriose apresenta a vantagem de não causar sintoma de hipoestrogenismo, requer apenas uma intervenção médica em 5 anos e, no Brasil, apresenta um melhor custo-benefício que o aGnRH.

Como supracitado, as evidências apontam para uma ação eficaz do SIU-LNG sobre a dor pélvica crônica em pacientes com endometriose. No entanto, pouco se conhece sobre os

efeitos locais do SIU-LNG em pacientes com endometriose e seus possíveis mecanismos de ação no controle da doença. Neste sentido, a proposta deste estudo consiste em avaliar e comparar a ação do SIU-LNG com a do aGnRH no estadiamento laparoscópico e no endométrio eutópico e ectópico em mulheres com algia pélvica crônica e endometriose, após 6 meses de tratamento. Desta forma, espera-se contribuir para elucidar os mecanismos de ação do SIU-LNG no controle desta doença.

REFERÊNCIAS*

Anderson K, Odland V, Rybo G. Levonorgestrel-releasing and copper-releasing (Nova T) IUDs during five years of use: a randomized comparative trial. *Contraception* 1994;49:56–72.

Bahamondes L, Petta CA, Fernandes A, Monteiro I. Use of the levonorgestrel-releasing intrauterine system in women with endometriosis, chronic pelvic pain and dysmenorrhea. *Contraception* 2007;75:S134-9.

Barbosa I, Olsson SE, Odland V, Gonçalves T, Coutinho E. Ovarian function after a seven years' use of a levonorgestrel IUD. *Adv Contracept* 1995;11:85–95.

Bruce, J. Fundamental elements of the Quality of Care: A simple Framework. Work Papers Programs Division. The Population Council, New York, 1989.1p.

Burton K, Henderson TA, Hillier SG, Mason JJ, Habib F, Brenner RM, Critchley HO. Local levonorgestrel regulation of androgen receptor and 17 α -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in human endometrium. *Hum Reprod* 2003;18:2610–7.

Critchley HO, Kelly RW, Baird DT, Brenner RM. Regulation of human endometrial function: mechanisms relevant to uterine bleeding. *Reprod Biol Endocrinol* 2006;4(Suppl 1):S5.

Critchley HO, Wang H, Kelly RW, Gebbie AE, Glasier AF. Progesterone receptor isoforms and prostaglandin dehydrogenase in the endometrium of women using a levonorgestrel-releasing intrauterine system. *Hum Reprod* 1998;13:1210–7.

Doyle LL, Clewe TH. Preliminary studies on the effect of hormones releasing intrauterine devices. *Am J Obstet Gynecol* 1986;101:564-8.

Fedele L, Bianchi S, Zanconato G, Portuese A, Raffaelli R. Use of levonorgestrel-releasing intrauterine device in the treatment of rectovaginal endometriosis. *Fertil Steril* 2001;75:485-8.

Findlay JK. Future direction for research on endometrial bleeding. *Hum Reprod* 1996;11 (Suppl 2):179–83.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors (Vancouver Style) – grupo de Vancouver. *JAMA* 1997;277:927-934.

Gambone JC, Mittman BS, Munro MG, Scialli AR, Winkel CA, Chronic Pelvic Pain/Endometriosis Working Group. Consensus statement for the management of chronic pelvic pain and endometriosis: proceedings of an expert-panel consensus process. *Fertil Steril* 2002;78:961-72.

Hickey M, Fraser I, Dwarte D, Graham S. Endometrial vasculature in Norplant users: preliminary results from a hysteroscopic study. *Hum Reprod* 1996;11(Suppl 2):S35– S44.

Jones RL, Critchley HOD. Morphological and functional changes in human endometrium following intrauterine levonorgestrel delivery. *Hum Reprod* 2000;15(Suppl 3):S162–72.

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

Lahteenmaki P, Rauramo I, Backman T. The levonorgestrel intrauterine system in contraception. *Steroids* 2000;65:693–7.

Laoag-Fernandez JB, Maruo T, Pakarinen P *et al.* Effects of levonorgestrel-releasing intra-uterine system on the expression of vascular endothelial growth factor and adrenomedullin in the endometrium in adenomyosis. *Hum Reprod* 2003;18:694-9.

Lockhat FB, Emembolu JO, Konje JC. The evaluation of the effectiveness of intrauterine-administered progesterone (levonorgestrel) in the symptomatic treatment of endometriosis and in the staging of the disease. *Hum Reprod* 2004;19:179-84.

Lockhat FB, Emembolu JE, Konje JC. Serum and peritoneal fluid levels of levonorgestrel in women with endometriosis who were treated with an intrauterine contraceptive device containing levonorgestrel. *Fertil Steril* 2005a;83:398-404.

Lockhat FB, Emembolu JO, Konje 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* 2005b;20:789-93.

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

Luukkainen T, Allonen H, Haukkamaa M, Holma P, Pyörälä T, Terho J et al.. Effective contraception the levonorgestrel-releasing intrauterine device. 12-month report of a European multicenter study. *Contraception* 1987;36:169-79.

Luukkainen, T.; Lähtenmäki, P.; Toivonen, J. Levonorgestrel-releasing intrauterine device. *Ann. Med* 1990;22:85-90.

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

Milling Smith OP, Critchley HOD. Progestogen only contraception and endometrial break through bleeding. *Angiogenesis* 2005;7:1–10

Nilsson CG, Johansson EDB, Luukkainen T. A d-Norgestrel-releasing IUD. *Contraception* 1976;13:503-14.

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

Nilsson CG, Lahtenmaki T, Robertson DN and Luukkainen T. Plasma concentrations of levonorgestrel as a function of the release rate of levonorgestrel from medicated intrauterine devices. *Acta Endocrinol* 1980;93:380-84.

Nilsson CG, Luukkainen T, Díaz J, Allonen H. Intrauterine contraception with levonorgestrel: a comparative randomized clinical performance study. *Lancet* 1981;1:577-81.

Nilsson CG, Luukkainen T, Díaz J, Allonen H. Clinical performance of a new levonorgestrel-releasing intrauterine device. A randomized comparison with a Nova-T Cooper device. *Contraception* 1982;125:345-56.

Oliveira-Ribeiro M, Petta CA, Andrade LALA, 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.

Pakarinen PI, Lahtenmaki P, Lehtonen E, Reima I. The ultrastructure of human endometrium is altered by administration of intrauterine levonorgestrel. *Hum Reprod* 1998;13:1846– 53.

Pengdi Z, Xiaoqun L, Hongzhi L, Zhao G, Jie C, Ruhua X, Shizhu L, Shangchun W, Jiedong W. The effect of a levonorgestrel-releasing intrauterine device on human endometrial oestrogen and progesterone receptors after one year of use. *Hum Reprod* 1999;14:970–975.

Petta CA, Ferriani RA, Abrao MS, Hassan D, Rosa e Silva JC, Podgaec S, Bahamondes L. 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.

Rhoton-Vlasak A, Chegnini N, Hardt N, Williams S. 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.

Roberts DK, Walker NJ, Lavia LA. Ultrastructural evidence of stromal/epithelial interactions in the human endometrial cycle. *Am.J Obstet Gynecol* 1988;158:854–61.

Roopa BA, Loganath A, Singh K. The effect of a levonorgestrel-releasing intrauterine system on angiogenic growth factors in the endometrium. *Hum Reprod* 2003;18:1809-19.

Rutanen EM, Salmi A, Nyman T. mRNA expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) is suppressed and those of IGF-II and IGF-binding protein-1 are constantly expressed in the endometrium during use of an intrauterine levonorgestrel system. *Mol Hum Reprod* 1997;3:749-54.

Scommegna A, Pandya GN, Christ M, Lee AW, Cohen MR. Intrauterine administration of progesterone by a slow release device. *Fertil.Steril* 1970; 21:201-10.

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.

Sivin I, Stern J, Díaz J, Díaz MM, Faúndes A, El Mahgoub S, et al.. Two years of intrauterine contraception with levonorgestrel and cooper: a randomized comparison of the T-Cu 380Ag and Levonorgestrel 20µg/day devices. *Contraception* 1987; 35: 245-55.

Sivin I, Stern J, Díaz J, Díaz MM, Faúndes A, El Mahgoub S et al.. Long-term contraception with the levonorgestrel 20 µg/day and the copper T380Ag intrauterine devices: a five year randomized study. *Contraception* 1990;42:361–77.

Varma R, Sinha D, Gupta JK. Non contraceptive uses of levonorgestrel-releasing hormone system (LNG-IUS) — a systemic enquiry and overview. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006;125:9–28.

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

Skinner JL, Riley SC, Gebbie AE, Glasier AF, Critchley OH. Regulation of matrix metalloproteinase-9 in endometrium during menstrual cycle and following administration of intrauterine levonorgestrel. *Hum Reprod* 1999;14:807-15.

Vercellini P, Frontino G, De Giorgi O, Aimi G, Zaina B, Crosignani PG. Comparison of a levonorgestrel-releasing intrauterine device versus expectant management after conservative surgery for symptomatic endometriosis: a pilot study. *Fertil Steril* 2003;80:305-9.

Vereide AB, Kaino T, Sager G, Arnes M, Orbo A. Effect of levonorgestrel IUD and oral medroxyprogesterone acetate on glandular and stromal progesterone receptors (PRA and PRB), and estrogen receptors (ER- α and ER- β) in human endometrial hyperplasia. *Gynecologic Oncology* 2006;101:214-23.

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

2 Objetivos

2.1 Geral

O presente estudo tem como objetivo comparar o efeito do SIU-LNG (Mirena®) com o do aGnRH (Lupron®) sobre o estadiamento e sobre as alterações histológicas do endométrio e das lesões endometrióticas de pacientes com algia pélvica crônica relacionada à endometriose.

2.2 Específicos

2.2.1 Avaliar o efeito do uso do SIU-LNG, e compará-lo com o uso do aGnRH, no estadiamento laparoscópico em mulheres com algia pélvica crônica relacionada à endometriose após seis meses de tratamento.

2.2.2 Avaliar o efeito do uso do SIU-LNG, e compará-lo com o uso do aGnRH, nas seguintes alterações histológicas do tecido endometrial eutópico e ectópico de mulheres com algia pélvica crônica relacionada à endometriose após seis meses de tratamento:

- o índice de proliferação celular por meio do PCNA;
- marcador de apoptose por meio do Fas;
- receptor de estrogênio tipo α ;
- receptor de progesterona tipo A.

3 Pacientes e métodos, resultados e discussão

(Formato de manuscrito)

3.1 Artigo original 1 – “Short communication”

Sistema intra-uterino de levonorgestrel e estadiamento da endometriose*

The levonorgestrel-releasing intrauterine system and endometriosis staging*

Mariana Kefalás Oliveira Gomes M.D.; Rui Alberto Ferriani M.D.,PhD.; Júlio Cesar Rosa e Silva M.D.; Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva M.D., PhD.; Carolina Sales Vieira M.D.; Francisco José Cândido dos Reis M.D.,PhD; Antônio Alberto Nogueira M.D.PhD

*Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto –
Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil*

*O sistema intra-uterino de levonorgestrel (Mirena[®]) e as ampolas do agonista do GnRH foram fornecidos pela Schering, São Paulo, Brasil.

Resumo:

Este estudo tem como objetivo determinar se o sistema intra-uterino de levonorgestrel (SIU-LNG) pode influenciar no estadiamento da endometriose proposto pela Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (ASRM). Para isso, foi realizado o “second-look” laparoscópico e os resultados foram comparados àqueles obtidos após tratamento com agonista do GnRH (aGnRH). Ambos os tratamentos reduziram a extensão das lesões endometrióticas em pacientes com algia pélvica crônica.

Palavras-chave: Endometriosis, second-look laparoscopy, staging, levonorgestrel-releasing intrauterine system, GnRH agonist

Estudos demonstram que o sistema intra-uterino de levonorgestrel (SIU-LNG) é uma opção terapêutica viável para o tratamento da algia pélvica em pacientes com endometriose (1-3). As drogas utilizadas no tratamento desta dor incluem os progestogênios (tais como danazol e gestrinona), que exercem efeitos anti-estrogênicos. Outros medicamentos utilizados são aqueles que induzem à pseudomenopausa (p. ex. agonista do GnRH – aGnRH) ou à pseudogravidez (p. ex. contraceptivos orais combinados). Apesar de efetivas, a maioria destas opções está associada a efeitos colaterais sistêmicos, que podem interferir na adesão e tratamento por longo prazo. Em adição, a necessidade de administração repetida ou regular também compromete a adesão ao tratamento e, assim, sua eficácia.

A liberação de levonorgestrel (LNG), um 19-C progestogênio, pelo SIU-LNG na cavidade uterina restringe seu efeito quase que exclusivamente ao endométrio, pois as altas concentrações de LNG induzem à atrofia e à pseudodecidualização (4,5). Está bem estabelecido que o tratamento com SIU-LNG reduz a algia pélvica crônica relacionada à endometriose. Porém, no tocante ao efeito deste dispositivo sobre o estadiamento da endometriose, apenas um estudo observacional não comparativo foi realizado. Os autores demonstraram alterações favoráveis no estadiamento da endometriose 6 meses após o uso de SIU-LNG (6). Desta forma, foi conduzido um estudo clínico controlado e randomizado em pacientes com endometriose para investigar tanto a eficácia de 6 meses de tratamento com SIU-LNG no alívio da dor como as modificações no estadiamento laparoscópico da doença após o tratamento. Os resultados foram comparados àqueles obtidos após 6 meses de tratamento com aGnRH.

Vinte e duas mulheres, idade entre 18 e 40 anos, foram incluídas neste estudo clínico controlado. Todas as participantes estavam em tratamento no Ambulatório de Algia Pélvica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP). Para serem incluídas no estudo as pacientes deveriam apresentar

diagnóstico laparoscópico e histológico confirmatório de endometriose (realizado até 3 meses antes de iniciar o estudo) e algia pélvica crônica cíclica. Ainda como critério de inclusão, foram selecionadas pacientes que apresentavam a escala visual analógica (VAS) de dor (3) \geq 3 na fase pré-tratamento. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP – processo nº 11608 / 2003 (Anexo A). As pacientes leram e assinaram o termo de consentimento informado (Anexo B).

Todas as pacientes apresentaram ciclos menstruais regulares (25-35 dias de intervalo) e não utilizaram qualquer terapia hormonal por pelo menos 3 meses antes. Nos 9 meses precedentes, não se realizou tratamento com progesterona de depósito ou aGnRH. Nenhuma paciente estava amamentando ou estava grávida nos 3 meses que precederam o estudo. Nenhuma participante apresentou história de osteoporose, distúrbio da coagulação ou contra-indicações definidas pela Organização Mundial de Saúde (2004) ao uso do SIU-LNG (Anexo C).

As pacientes foram randomizadas através de um esquema de randomização gerado por computador, em envelopes opacos e selados, e foram admitidas por ordem de entrada na pesquisa. Foram alocadas para receber 6 meses de tratamento com um SIU-LNG (Mirena[®]; Schering Oy, Helsinki, Finland) ou 6 meses de tratamento com um aGnRH (Lupron[®] depot 3,75 mg; TAP Pharmaceuticals, Lake Forest, IL, USA), o último administrado em 6 doses (1 ampola a cada 28 ± 3 dias). Cada grupo foi constituído por 11 pacientes. O SIU-LNG foi inserido ou o tratamento com aGnRH foi iniciado dentro dos primeiros 7 dias do ciclo menstrual. As pacientes foram orientadas a não utilizar nenhum medicamento além daqueles oferecidos pelo estudo. As visitas de seguimento foram agendadas a cada 28 ± 3 dias após o início do tratamento, perfazendo pelo menos 6 visitas completas durante o período de estudo.

Para avaliação da dor, utilizou-se a VAS, critério de avaliação subjetiva de quadros algícos. As pacientes anotaram a ocorrência diária de dor e sua intensidade em um diário, em

que a VAS foi determinada através da marcação de um ponto sobre uma linha de 10 cm (3). Esta escala tem uma variação de 0 a 10, sendo 0 a ausência de dor e 10, o grau mais severo de dor. Desta forma, comparou-se o escore médio da VAS registrada em cada mês com a VAS basal. O escore mensal da VAS foi calculado a partir da soma dos escores diários dividida pelo número de dias do período de observação calculada ao final do tratamento.

Tanto na laparoscopia basal como na *second-look* (cirurgia de revisão), a doença foi estadiada segundo os critérios propostos pela *American Society for Reproductive Medicine* modificada de 1997 (7) sob vídeo-documentação (Anexo D). O seguimento clínico e os procedimentos cirúrgicos pré- e pós-tratamento foram realizados por médicos diferentes. Desta forma, o cirurgião que realizou o *second-look* desconhecia o estadiamento prévio da endometriose.

Para análise estatística, empregou-se o programa GraphPad Prism[®] 2.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Foi utilizado o teste-t Student para avaliar as variáveis quantitativas com distribuição normal. As variáveis qualitativas foram analisadas pelo teste exato de Fisher. Os valores pré- e pós-tratamento foram comparados através do teste-t Student pareado ou pelo teste Wilcoxon. Definiram-se como estatisticamente significativas as diferenças em que $p < 0,05$.

Dentre as vinte e duas mulheres inicialmente selecionadas para o estudo, quatro (uma no grupo SIU-LNG e três no grupo aGnRH) foram excluídas por terem se recusado a realizar a cirurgia laparoscópica para *second-look*. Não houve diferença significativa entre os dois grupos no tocante aos dados basais, incluindo idade, estadiamento da endometriose e paridade (tabela 2). Nenhuma paciente era tabagista. A idade média das pacientes que completaram o estudo foi de $29,2 \pm 5,5$ e $32,6 \pm 5,3$ anos, nos grupos SIU-LNG e aGnRH, respectivamente.

A VAS pré-tratamento no grupo SIU-LNG foi entre 3 e 7 em 3 pacientes e, > 7 em 7 pacientes. No grupo aGnRH, 6 apresentaram VAS pré-tratamento entre 3 e 7, enquanto 2 mulheres apresentaram > 7. Não houve diferença entre os grupos ($p = 0,0698$).

Após 6 meses de tratamento, o estadiamento da endometriose proposto pela ASRM reduziu em 6 (60%) de 10 pacientes do grupo SIU-LNG e em 3 (37,5%) de 8 pacientes tratadas com aGnRH ($p=0,1698$). Os estadiamentos pré- e pós-tratamento estão demonstrados na tabela 1. O escore laparoscópico, segundo critérios da ASRM, diminuiu de $34 \pm 27,9$ para $21,3 \pm 20,5$ no grupo SIU-LNG ($p=0,1612$) e de $42,4 \pm 30,3$ para $30,8 \pm 22,8$ no grupo aGnRH ($p = 0,0546$), sem diferença entre os grupos. Apenas uma paciente em cada grupo apresentou piora do estadio. As figuras 1, 2 e 3 ilustram alguns achados laparoscópicos pré- e pós-tratamento nos dois grupos estudados.

Tabela 1 - Estadiamento laparoscópico da endometriose segundo a *American Society for Reproductive Medicine* antes (estadio basal) e após 6 meses (estadio 2nd-look) de tratamento com SIU-LNG ou aGnRH em mulheres com algia pélvica crônica.

	Estadio basal (n) Estadio 2nd-look (n)	
Grupo SIU-LNG 6 em 10 melhoraram (60,0%)	Leve (3)	Mínima (2) Leve (1)
	Moderado (3)	Leve (1) Moderado (1) Grave (1)
	Grave (4)	Leve (1) Moderado (2) Grave (1)
		Moderado (1)
Grupo aGnRH 3 em 8 melhoraram (37,5%)	Leve (1)	Moderado (1)
	Moderado (3)	Leve (2) Moderado (1)
	Grave (4)	Moderado (1) Grave (3)

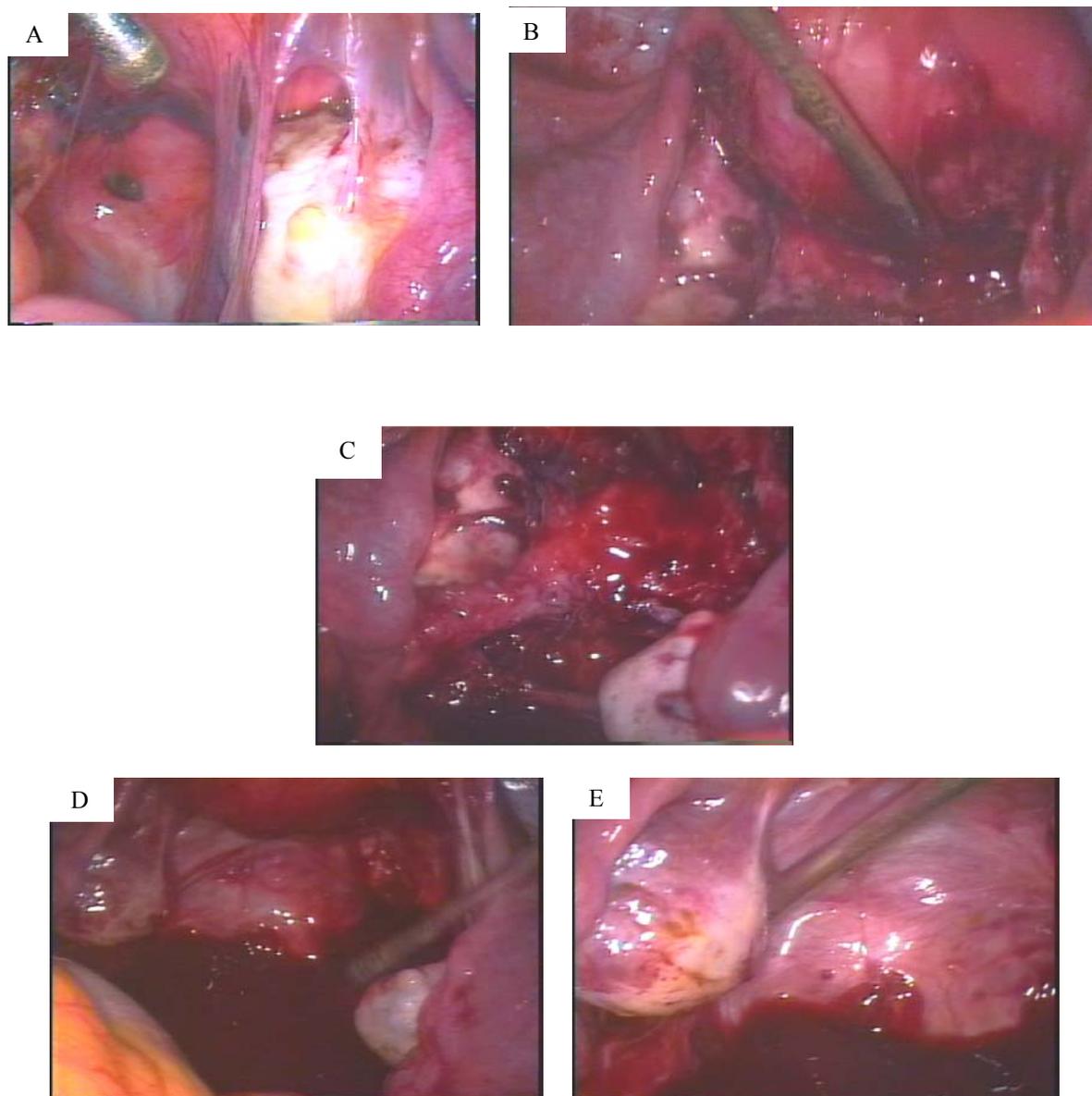


Figura 1 – Cirurgia laparoscópica pré- (fig. A, B e C) e pós-tratamento com sistema intrauterino de levonorgestrel (SIU-LNG) (D e E) de uma paciente cujo estadiamento da endometriose proposto pela *American Society for Reproductive Medicine* na laparoscopia basal foi estadio IV (grave) (fig. A). Durante o procedimento inicial, foi realizada a lise das aderências e cauterização dos focos de endometriose (fig. B e C). Após 6 meses da inserção do SIU-LNG, a laparoscopia de revisão evidenciou estadio I (endometriose mínima) (fig D e E).

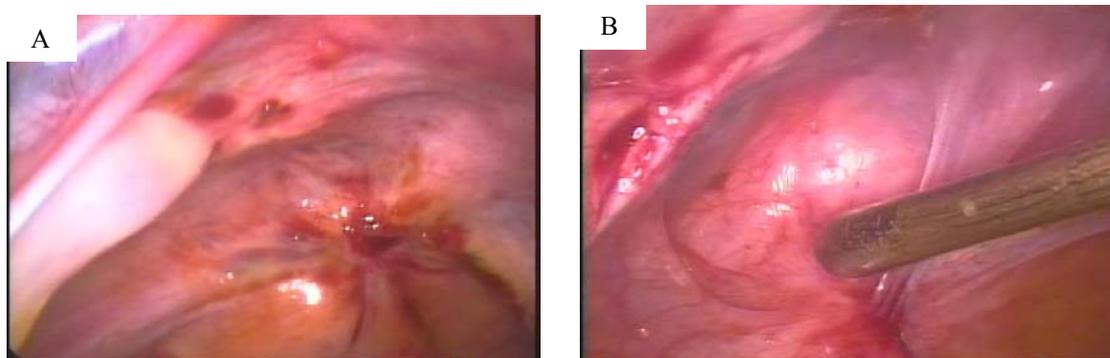


Figura 2 – Cirurgia laparoscópica pré- (fig. A) e pós-tratamento com agonista do GnRH (aGnRH) (fig. B) de uma paciente cujo estadiamento da endometriose proposto pela *American Society for Reproductive Medicine* na laparoscopia basal foi estadio III (moderado) (fig A). Durante o procedimento inicial, foi realizada a cauterização dos focos de endometriose. Após 6 meses de tratamento com aGnRH, a laparoscopia de revisão evidenciou estadio II (endometriose leve) (fig B).



Figura 3 - Cirurgia laparoscópica pré- (fig. A) e pós-tratamento com agonista do GnRH (aGnRH) (fig. B) de uma paciente cujo estadiamento da endometriose proposto pela *American Society for Reproductive Medicine* na laparoscopia basal foi estadio III (moderado) (fig. A). Durante o procedimento inicial, foi realizada a lise das aderências e exérese do endometrioma em ovário direito (fig. A - seta). Após 6 meses tratamento com aGnRH, a laparoscopia de revisão evidenciou estadio II (endometriose leve) (fig. B).

Antes da instituição dos tratamentos, a VAS média para a dor foi $7,9 \pm 1,2$ cm no grupo SIU-LNG e $6,5 \pm 1,1$ cm no grupo aGnRH. Redução significativa neste escore foi obtida 6 meses após a terapêutica em ambos os grupos: $2,1 \pm 2,7$ cm ($p < 0,0001$) e $0,4 \pm 1,1$ cm ($p < 0,0001$), respectivamente. Não houve diferença entre os grupos. A diminuição da dor ocorreu tanto para as pacientes que obtiveram melhora no estadiamento laparoscópico quanto para as que não a obtiveram. Nas pacientes que obtiveram melhora do estadiamento da endometriose, o escore de dor diminuiu de $8,1 \pm 1,2$ para $2,1 \pm 2,9$ cm no grupo SIU-LNG ($p = 0,0313$) e de $5,7 \pm 0,6$ para $1 \pm 1,7$ cm ($p = 0,25$) no grupo aGnRH. Entre as pacientes que não apresentaram melhora do estadiamento da doença, esta modificação da intensidade da dor pré e pós-tratamento foi, respectivamente, de $7,5 \pm 1,3$ para $2 \pm 2,8$ cm ($p = 0,125$) no grupo SIU-LNG e de 7 ± 1 para 0 cm no grupo aGnRH. Todos os escores de dor pós-tratamento foram < 3 , com exceção de 3 pacientes do grupo SIU-LNG que reportaram VAS entre 3 e 7 após 6 meses de tratamento. Nestes três casos, o estadiamento da endometriose na cirurgia de *second-look* foi leve ou mínimo.

Pelo que se consta, este é o primeiro estudo clínico randomizado que compara a ação do SIU-LNG com a ação do aGnRH no estadiamento laparoscópico da endometriose em pacientes com dor pélvica crônica associada à endometriose. Embora não se tenha encontrado redução significativa no escore de endometriose (ASRM) no *second-look* laparoscópico, 60% das pacientes usuárias do SIU-LNG apresentaram diminuição no estadiamento da doença *versus* 37,5% das usuárias de aGnRH. Nossos achados de não piora do estadiamento da endometriose são corroborados por estudos clínicos não controlados que encontraram melhora significativa do escore após o uso isolado de aGnRH (8) ou do SIU-LNG (6). Provavelmente, o presente estudo não alcançou diferença estatística em virtude do pequeno “n” amostral analisado. A redução no escore e no estadiamento de endometriose nas pacientes submetidas ao uso de aGnRH, provavelmente, se deve ao intenso efeito anti-estrogênico desta droga (9).

Sendo a endometriose sabidamente uma doença estrogênio dependente (10), este efeito inibiria a proliferação de tecido endometrial ectópico. Estudo prévio demonstrou que o aGnRH reduziu a proliferação endometriótica através de um aumento da apoptose (11). Vale ressaltar que, em mulheres com endometriose, a apoptose é tipicamente mínima no tecido endometriótico.

Deve-se considerar que o tratamento clínico, seja o SIU-LNG ou o aGnRH, não foi empregado isoladamente. Desta forma, é de suma importância testar um método novo de tratamento (SIU-LNG) comparado a um método clássico (aGnRH). Todas as pacientes foram previamente submetidas à laparoscopia, que além de diagnóstica, foi também terapêutica. Durante o procedimento cirúrgico, realizaram-se cauterização das lesões peritoniais e exérese de lesões de endometriose profunda. Estas intervenções, provavelmente, tiveram influência sobre o escore das lesões na cirurgia de revisão.

Nenhuma correlação foi estabelecida entre o estadió da endometriose e intensidade da dor pélvica associada (12). Portanto, não podemos inferir que a melhora clínica do quadro de dor pélvica em pacientes com endometriose associada ao uso do SIU-LNG necessariamente se relacione com diminuição das lesões. Contudo, alguns marcadores séricos, que parecem estar relacionados à atividade da doença, como o CA-125, sofrem redução com o uso do sistema (13), sugerindo um efeito do mesmo sobre as lesões.

O mecanismo exato pelo qual o SIU-LNG influencia o curso da endometriose permanece obscuro. Segundo Critchley et al. (14), o SIU-LNG libera altas doses de LNG na cavidade uterina, promovendo rápida decidualização do estroma endometrial. Em adição, foi demonstrado que o SIU-LNG induz à diminuição e subsequente bloqueio da síntese de DNA e da atividade mitótica (15). Estas modificações sugerem que a progesterona exerce um papel frenador importante na proliferação endometrial. Esta modulação endometrial também foi observada por Vereide et al. (16). Estes autores demonstraram que o SIU-LNG estimula a

apoptose endometrial através da redução da expressão do gene Bcl-2, o qual apresenta efeito anti-apoptótico. Apesar do efeito do LNG ser primariamente local no endométrio, este hormônio foi detectado no fluido peritoneal das usuárias do dispositivo (17). Portanto, o mesmo efeito que o LNG exerce no endométrio eutópico poderia estar presente no endométrio ectópico. Esta possível ação nos focos de endometriose poderia explicar a redução da progressão da doença observada pelo presente estudo.

Conclui-se, pelos resultados demonstrados, que o SIU-LNG e o aGnRH propiciaram resultados clínicos e laparoscópicos semelhantes no tratamento da dor pélvica crônica associada à endometriose. Uma tendência à melhora do estadiamento da endometriose foi observada na laparoscopia de *second-look* realizada 6 meses após instituição das terapêuticas. Contudo, a potencial influência da intervenção cirúrgica realizada na laparoscopia inicial deve ser considerada. Ressalta-se ainda que a redução da dor pélvica não necessariamente está relacionada com diminuição no escore ou no estadiamento cirúrgico para endometriose. É possível que estudos adicionais, envolvendo uma amostra maior, possa demonstrar uma melhora significativa do estadiamento laparoscópico da endometriose nas usuárias de SIU-LNG. Além do exposto, o uso do SIU-LNG, em relação ao uso do aGnRH, para tratamento da dor pélvica causada pela endometriose é mais atraente. Este dispositivo pode ser utilizado por um período mais prolongado que o aGnRH e apresenta melhor custo-benefício.

REFERÊNCIAS*

1. Vercellini P, Frontino G, De Giorgi O, Aimi G, Zaina B, Crosignani PG. Comparison of a levonorgestrel-releasing intrauterine device versus expectant management after conservative surgery for symptomatic endometriosis: a pilot study. *Fertil Steril* 2003;80:305-9.
2. Lockhat FB, Emembolu JO, Konje 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.
3. Petta CA, Ferriani RA, Abrao MS, Hassan D, Rosa e Silva JC, Podgaec S, Bahamondes L. 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.
4. Silverberg SG, Haukkamaa M, Arko H, Nilsson CG, Luukkainen T. Endometrial morphometry of women during long term use of levonorgestrel intrauterine system. *Int Gynaecol Pathol* 1986;5:235-41.
5. Maruo T, Laoag-Fernandez JB, Pakarinen P, Murakoshi H, Spitz IM, Johansson E. Use of a levonorgestrel intrauterine system on proliferation and apoptosis in the endometrium. *Hum Reprod* 2001;16:2103-8.
6. Lockhat FB, Emembolu JO, Konje JC. The evaluation of the effectiveness of an intrauterine-administered progesterone (levonorgestrel) in the symptomatic treatment of endometriosis and in the staging of the disease. *Hum Reprod* 2004;19:179-84.
7. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril* 1997;67:817-21.
8. Mettler L, Steinmuller H, Schachner-Wunschmann E. Experience with a depot GnRH-agonist (Zoladex) in the treatment of genital endometriosis. *Hum Reprod* 1991;6:694-8.

* De acordo com as normas propostas pela revista *Fertility and Sterility*.

9. Casper RF. Clinical uses of gonadotropin-releasing hormone analogues. *CMAJ* 1991;144:153-8.
10. Bruner KL; Matrisian LM; Rodgers WH, Gorstein F, Osteen KG. Suppression of matrix metalloproteinases inhibits establishment of ectopic lesions by human endometrium in nude mice. *J Clin Invest* 1997;99:2851-7.
11. Meresman GF, Bilotas MA, Lombardi E, Tesone M, Sueldo C, Baranao RI. Effect of GnRH analogues on apoptosis and release of interleukin-1beta and vascular endothelial growth factor in endometrial cell cultures from patients with endometriosis. *Hum Reprod* 2003;18:1767-71.
12. Whiteside JL, Facone T. Endometriosis-related pelvic pain: what is the evidence? *Clin Obstet Gynecol* 2003;46:824-30.
13. Rosa e Silva ACJS, Rosa e Silva JC, Nogueira AA, Petta CA, Abrão MA, Ferriani RA. The levonorgestrel-releasing intrauterine device reduces CA-125 serum levels in patients with endometriosis. *Fertil Steril* 2006;86:742-4.
14. Critchley HO, Wang H, Jones RL, Kelly RW, Drudy TA, Gebbie AE, Buckley CH, McNeilly AS, Glasier AF. Morphological and functional features of endometrial decidualization following long-term intra-uterine Levonorgestrel delivery. *Hum Reprod* 1998;13:1218-24.
15. Bergeron C. Morphological changes and protein secretion induced by progesterone in the endometrium during the luteal phase in preparation for nidation. *Hum Reprod* 2000;15(Suppl 1):119-28.
16. Vereide AB, Kaino T, Sager G, Orbo A; Scottish Gynaecological Clinical Trials Group. Bcl-2, BAX, and apoptosis in endometrial hyperplasia after high dose gestagen therapy: a comparison of responses in patients treated with intrauterine levonorgestrel and systemic medroxyprogesterone. *Gynecol Oncol.* 2005;97:740-50.
17. Lockhat FB, Emembolu JE, Konje JC. Serum and peritoneal fluid levels of levonorgestrel in women with endometriosis who were treated with an intrauterine contraceptive device containing levonorgestrel. *Fertil Steril* 2005;83:398-404.

Publicado em:

Gomes MKO, Ferriani RA, Rosa e Silva JC, De Sá Rosa e Silva AC, Vieira CS, Reis FJC, Nogueira AA. The levonorgestrel-releasing intrauterine system and endometriosis staging. *Fertil Steril* 2007;87:1231-1233. (Anexo E)

3.2 Artigo original 2

Sistema Intra-uterino de Levonorgestrel e endometriose: efeitos sobre a proliferação celular, apoptose, receptores de estrogênio e de progesterona do endométrio eutópico e ectópico.

Introdução

O uso do sistema intra-uterino de levonorgestrel (SIU-LNG) ganhou popularidade não só como um método contraceptivo (STURRIDGE; GUILLEBAUD, 1997), mas também como um meio de controlar a dor pélvica em pacientes com endometriose (VERCELLINI et al., 2003; LOCKHAT; EMEMBOLU; KONJE, 2005; PETTA et al., 2005). A eficácia do SIU-LNG em controlar a dor em pacientes com endometriose foi similar àquela do agonista do GnRH (aGnRH), com a vantagem de que o SIU-LNG não provoca hipoestrogenismo e requer apenas uma única intervenção médica a cada cinco anos para sua inserção (PETTA et al., 2005). Além do controle da dor, Rosa e Silva et al. (2006) demonstraram que o SIU-LNG reduz a atividade da endometriose, indicada por marcadores séricos, de maneira similar ao aGnRH. O mecanismo molecular pelo qual o SIU-LNG atua no endométrio eutópico e ectópico, para controlar a dor pélvica em pacientes com endometriose, é ainda motivo de especulação.

O desbalanço entre proliferação celular e apoptose exerce um papel importante na patogênese da endometriose (FUJISHITA et al., 1999; DMOWSKI et al., 2001; BRAUN et al., 2002). Estudos demonstraram redução e perda da ciclicidade da apoptose tanto no

endométrio eutópico como no ectópico de pacientes com endometriose em comparação ao endométrio de mulheres normais (GEBEL et al., 1998; DMOWSKI et al., 2001). Há relatos indicando que um dos mecanismos pelo qual algumas drogas atuam no controle clínico da endometriose é através da redução da proliferação celular e aumento da apoptose. Meresman et al. (2002) demonstraram que apenas um mês de contraceptivo oral combinado foi suficiente para reduzir, significativamente, marcadores de proliferação celular e aumentar o índice apoptótico no endométrio eutópico de pacientes com endometriose. O aGnRH também foi capaz de induzir apoptose em pacientes com endometriose, tanto nas células endometriais tóxicas como nas ectópicas (IMAI et al., 2000; MERESMAN et al., 2003). Tem sido proposto que o efeito anti-proliferativo do aGnRH seria mediado pela ativação do sistema Fas-FasL, estimulando a morte celular por apoptose (IMAI & TAMAYA, 2000).

O efeito do SIU-LNG na proliferação celular e na apoptose do endométrio foi previamente demonstrado em mulheres com menorragia por adenomiose (MARUO et al., 2001). O SIU-LNG reduziu a proliferação endometrial, e estimulou a apoptose, tanto no epitélio glandular como no estroma endometrial..

A apoptose apresenta uma variação cíclica ao longo do ciclo menstrual de mulheres saudáveis, sendo detectada principalmente no endométrio secretor tardio e menstrual. Na fase proliferativa e secretora inicial, discreta atividade apoptótica foi detectada no endométrio normal (KOKAWA; SHIKONE; NAKANO, 1996; VASKIVUO et al., 2000). A expressão cíclica da proteína repressora da apoptose Bcl-2 (B cell lymphoma/leukemia gene-2) no epitélio glandular endometrial foi correlacionada com variações na expressão de receptores de estrogênio (ER) e progesterona (PR) ao longo do ciclo menstrual (OTSUKI et al., 1994). Desta forma, vários autores sugerem que os esteróides ovarianos podem controlar a apoptose endometrial (ROTELLO et al., 1992; TABIBZADEH, 1995; CRITCHLEY et al., 1999). No tocante ao SIU-LNG, Pengdi et al. (1999) demonstraram que o levonorgestrel (LNG) liberado

localmente pelo dispositivo intra-uterino reduziu a expressão de ER e de PR no endométrio humano.

Tendo em vista que o desbalanço na homeostase tecidual exerce um papel na patogênese da endometriose e que os esteróides ovarianos podem controlar a apoptose endometrial, alguns questionamentos podem ser levantados quanto ao efeito do SIU-LNG na patogênese da endometriose. Qual é o efeito do SIU-LNG na proliferação celular e na apoptose do endométrio eutópico e ectópico de pacientes com endometriose? O SIU-LNG modifica a expressão de receptores para os esteróides ovarianos no endométrio eutópico e ectópico? Existe correlação entre os efeitos do SIU-LNG sobre a proliferação celular e sobre a apoptose e a modificação na expressão dos receptores hormonais?

Até o presente momento, não há estudo controlado avaliando o efeito do SIU-LNG sobre a proliferação celular, a apoptose e sobre os ER e PR, no endométrio eutópico e ectópico de pacientes com endometriose. Desta forma, a proposta deste estudo clínico, controlado e randomizado, foi investigar o efeito de seis meses do SIU-LNG sobre os marcadores de proliferação celular, de apoptose e sobre a expressão dos ER tipo α (ER- α) e PR tipo A (PRA) nos endométrios eutópicos e ectópicos de pacientes com algia pélvica crônica relacionada à endometriose e comparar os resultados com aqueles obtidos após seis meses de tratamento com aGnRH.

Material e Método

Pacientes

Vinte e duas pacientes do sexo feminino, idade entre 18 e 40 anos, foram incluídas neste estudo clínico controlado. O estudo foi conduzido de dezembro de 2003 a maio de 2005. Todas as pacientes estavam em tratamento no Ambulatório de Algia Pélvica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP). Incluíram-se pacientes que apresentavam dor pélvica crônica cíclica e endometriose laparoscópica e histologicamente confirmada. Ainda como critério de inclusão, foram selecionadas pacientes que apresentavam a escala visual analógica (VAS) de dor (WOODFORDE; MERSKEY, 1972) ≥ 5 na fase pré-tratamento. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP – processo nº 11608 / 2003 (Anexo A) e todas as pacientes leram e assinaram o termo de consentimento informado (Anexo B).

Todas as pacientes apresentaram ciclos menstruais regulares (24-35 dias de intervalo) e não utilizaram qualquer terapia hormonal por pelo menos 3 meses antes. Nos 9 meses precedentes, não se realizou tratamento com progesterona de depósito ou aGnRH. Nenhuma paciente estava amamentando ou estava grávida nos 3 meses precedentes ao estudo. Nenhuma participante apresentou história de osteoporose, distúrbio da coagulação ou contra-indicações definidas pela Organização Mundial de Saúde (2004) ao uso do SIU-LNG (Anexo C). A presença de diabete mellitus, doença cardiovascular, dislipidemia, lúpus eritematoso sistêmico e outras doenças reumatológicas, infecção pelo vírus HIV, qualquer infecção ativa ou tabagismo também foram critérios de exclusão para os dois grupos de estudo.

As pacientes foram randomizadas por meio de um esquema de randomização gerado por computador, em envelopes opacos e selados, e foram admitidas por ordem de entrada na

pesquisa. Foram alocadas para receber 6 meses de tratamento com um SIU-LNG (Mirena[®]; Schering Oy, Helsinki, Finland) ou 6 meses de tratamento com um aGnRH (Lupron[®] depot 3,75 mg; TAP Pharmaceuticals, Lake Forest, IL, USA), o último administrado em 6 doses (1 ampola a cada 28 ± 3 dias). Cada grupo foi constituído por 11 pacientes. O SIU-LNG foi inserido ou o tratamento com aGnRH foi iniciado dentro dos primeiros 7 dias do ciclo menstrual. As pacientes foram orientadas a não utilizar nenhum medicamento além daqueles oferecidos pelo estudo. As visitas de seguimento foram agendadas a cada 28 ± 3 dias após o início do tratamento, perfazendo pelo menos 6 visitas completas durante o período de estudo.

Para avaliação da dor, utilizou-se a VAS, critério de avaliação subjetiva de quadros algícos. As pacientes anotaram a ocorrência diária de dor e sua intensidade em um diário, em que a VAS foi determinada através da marcação de um ponto sobre uma linha de 10 cm (WOODFORDE; MERSKEY, 1972). Esta escala tem uma variação de 0 a 10, sendo 0 a ausência de dor e 10, o grau mais severo de dor (HOWARD, 2003). Desta forma, comparou-se o escore médio da VAS registrada em cada mês com a VAS basal. O escore mensal da VAS foi calculado dividindo-se a soma dos escores diários pelo número de dias do período de observação.

A fim de se obter o diagnóstico e o estadiamento da endometriose, foi realizada uma cirurgia vídeo-laparoscópica pré-tratamento até 3 meses antes do início do estudo. Uma nova cirurgia pós-tratamento (*second-look*) foi oferecida a fim de avaliar a eficácia terapêutica dos tratamentos instituídos. Tanto na laparoscopia basal como no *second-look*, a doença foi estadiada segundo os critérios propostos pela *American Society for Reproductive Medicine* (1997) sob vídeo-documentação (Anexo D). Em ambos os procedimentos, o tratamento cirúrgico da endometriose foi realizado e só foram incluídas no estudo pacientes que permaneceram com $VAS \geq 5$ após o procedimento cirúrgico basal. O seguimento clínico e os procedimentos cirúrgicos pré e pós-tratamento foram realizados por médicos diferentes. Desta

forma, o cirurgião que realizou o *second-look* desconhecia o estadiamento prévio da endometriose. A laparoscopia basal foi realizada na fase folicular inicial do ciclo menstrual e a laparoscopia para *second-look* foi realizada após 6 meses de tratamento. Durante o procedimento cirúrgico, foram realizadas biópsias das lesões endometrióticas e do endométrio, esta última realizada por meio de uma cureta de Novak. As amostras obtidas de endométrio eutópico e ectópico foram fixadas em formol 10% e processadas como de rotina para inclusão em parafina. Cortes de 4 µm de diâmetro foram desparafinados e submetidos à reação imuno-histoquímica.

Imuno-histoquímica

As reações de imuno-histoquímica foram realizadas por meio da reação antígeno-anticorpo seguida de revelação da reação com marcador visível ao microscópio. As lâminas desparafinadas e hidratadas foram recuperadas antigenicamente através da incubação em panela a vapor em meio tamponado (citrato pH 6,0) por 40 minutos. Após resfriamento do material, as peroxidases teciduais endógenas foram removidas pela adição de peróxido de hidrogênio e ligações inespecíficas do anticorpo primário foram evitadas por adição de soro de cavalo. As lâminas foram então incubadas com anticorpo primário por 12 horas em câmara úmida. Em seguida, houve a incubação com anticorpo secundário e, por último, a etapa avidina-biotina. A reação foi identificada após a revelação por tratamento com diaminobenzidina (DAB - Sigma-Aldrich Inc., USA) por cinco minutos e contra coloração com Hematoxilina de Harris seguida de montagem das lâminas.

A tabela 1 demonstra os anticorpos, os clones, a localização celular de marcação e a diluição utilizada neste estudo. Foram utilizados anticorpos primários fornecidos pela *Novocastra Laboratories Ltda. (Newcastle upon Tyne, UK)*. Para avaliação da proliferação celular utilizou-se o *Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)*. O Fas foi utilizado para

avaliação da apoptose. Os receptores de estrogênio e de progesterona foram avaliados por meio do receptor de estrogênio tipo α (ER- α) e do receptor de progesterona tipo A (PRA), respectivamente.

Tabela 1 - Características dos anticorpos primários.

Anticorpos	Código do produto	Clone	Localização celular	Diluição
PCNA ¹	NCL-PCNA	PC10	Nuclear	1:200
Fas ²	NCL-FAS-310	GM30	Membrana	1:100
Receptor de progesterona (tipo A) ³	NCL-PGR-312	16	Nuclear	1:100
Receptor de estrogênio (tipo α) ⁴	NCL-ER-6F11	6F11	Nuclear	1:50

1 - PCNA - *Proliferating Cell Nuclear Antigen*: marcador de proliferação celular, uma vez que é um antígeno que funciona como um co-fator da DNA polimerase na fase S do ciclo celular e também está associado com mecanismos de reparos do DNA. **2** - Fas, também conhecido como antígeno CD 95, é uma glicoproteína transmembrana que media a apoptose através de ligação com receptor próprio. **3** - Receptor que intermedeia a ação da progesterona, pode ser de dois tipos: receptor de progesterona tipo A (PRA) e tipo B (PRB). Apenas foi avaliado o PRA. **4** - Receptor que intermedeia a ação do estradiol, pode ser de dois tipos: receptor de estrogênio tipo α (ER- α) e tipo β (ER- β). Apenas foi avaliado o ER- α .

O corte de amígdala foi utilizado como controle positivo para o PCNA e o tecido de intestino delgado, como controle positivo para o Fas. Endométrio de mulher sadia foi o controle positivo para ER- α e para PRA. Como controle negativo, foi utilizada imunoglobulina da mesma classe e concentração do anticorpo primário. O controle negativo demonstrou ausência de marcação específica.

Crítérios de avaliação imuno-histoquímica

Foram descartados os cortes com marcação inadequada ou com material insuficiente para quantificação de células marcadas.

Na avaliação do PCNA, foi utilizado o método quantitativo, através da contagem de células marcadas pela imuno-histoquímica em 1000 células contadas na lâmina, contando-se células nos quatro quadrantes de cada lâmina. Com base neste cálculo, obtivemos o *Índice de*

Proliferação Celular (IPC): número de células marcadas para o PCNA em 1000 células contadas, tanto células glandulares quanto estromais, que foram analisadas separadamente.

Os resultados da imunomarcação pelo Fas, PRA e ER- α foram analisados, semiquantitativamente, utilizando um escore histológico imunohistoquímico (*H-score*). Este escore avalia tanto a distribuição da marcação específica como sua intensidade. O *H-score* tem sido descrito pela fórmula $HS = \sum (Pi \times i)/100$, onde *Pi* denota a porcentagem de células marcadas e *i* denota a intensidade da marcação variando de 1 a 3 (HUANG; PETTIGREW; WATSON, 1996). Escores de 1, 2 e 3 indicam imunorreatividade fraca, moderada e forte, respectivamente. Glândulas e estroma foram classificados separadamente para cada espécime. Estudaram-se as lâminas nas regiões de imunomarcação mais intensa, ou seja, *Hot spots*, área com 1,0 cm de diâmetro (aumento de 40x). Com menos que 10% de células marcadas, considerou-se uma marcação negativa, ou seja, escore igual a zero. Mais que 10% de positividade foi considerada marcação positiva e a porcentagem de células marcadas foi analisada pela fórmula do *H-score*. As análises foram realizadas por um patologista treinado que desconhecia os grupos de tratamento originais e suas respostas às medicações utilizadas. A análise da glândula e do estroma foram realizadas na mesma lâmina.

Análise estatística

As análises estatísticas dos dados foram realizadas com o auxílio do *software GraphPad Prism 3.0®* (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Para as variáveis numéricas envolvendo escores, utilizou-se o teste bicaudal de Mann-Whitney. As variáveis foram expressas em média \pm erro padrão da média (SE). Já as variáveis qualitativas foram analisadas pelos testes χ^2 ou o teste exato de Fisher. Para correlação, utilizou-se o teste de Spearman. Definiram-se como estatisticamente significativas as diferenças em que $p < 0,05$.

Resultados

Dentre as vinte e duas mulheres inicialmente selecionadas para o estudo, quatro (uma no grupo SIU-LNG e três no grupo aGnRH) foram excluídas por terem se recusado a realizar a cirurgia laparoscópica para *second-look*. Não houve diferença significativa entre os dois grupos no tocante às características basais, incluindo idade, estadiamento da endometriose e paridade (tabela 2). A idade média das pacientes que completaram o estudo foi de $29,2 \pm 5,5$ e $32,6 \pm 5,3$ anos, nos grupos SIU-LNG e aGnRH, respectivamente.

Tabela 2 - Distribuição das mulheres nos grupos de tratamento de acordo com as características basais (n).

Variáveis	Grupo de tratamento		p
	SIU-LNG (n=10)	aGnRH (n=8)	
Nº de partos			1,000
0	5	4	
≥ 1	5	4	
Estadio da endometriose*			0,675
I ou II	3	1	
III	3	3	
IV	4	4	
Escore de dor VAS basal			0,155
≥ 5-7	3	6	
> 7-10	7	2	

*Estadio segundo a *American Society for Reproductive Medicine*
VAS: escala visual analógica.

Os dados da melhora clínica e dos achados laparoscópicos foram recentemente publicados (GOMES et al., 2007) (Anexo D). A expressão dos marcadores estudados, PCNA, Fas, ER- α e PRA, pré-tratamento, tanto no epitélio glandular quanto no estroma, foram similares nos grupos SIU-LNG e aGnRH ($p > 0,05$). A figura 1 ilustra a imunomarcção, por todos os marcadores analisados, de algumas amostras de tecido endometrial eutópico e ectópico analisados. Comparando a expressão dos marcadores pelo endométrio eutópico

versus (vs.) o ectópico, todos apresentaram marcação semelhante no epitélio e no estroma. Exceção foi no *H*-score para o Fas, que, apesar de marcação fraca pré-tratamento, foi maior no endométrio eutópico, epitélio ($p= 0,0008$) e estroma ($p=0,0217$), do que no ectópico (dados não demonstrados).

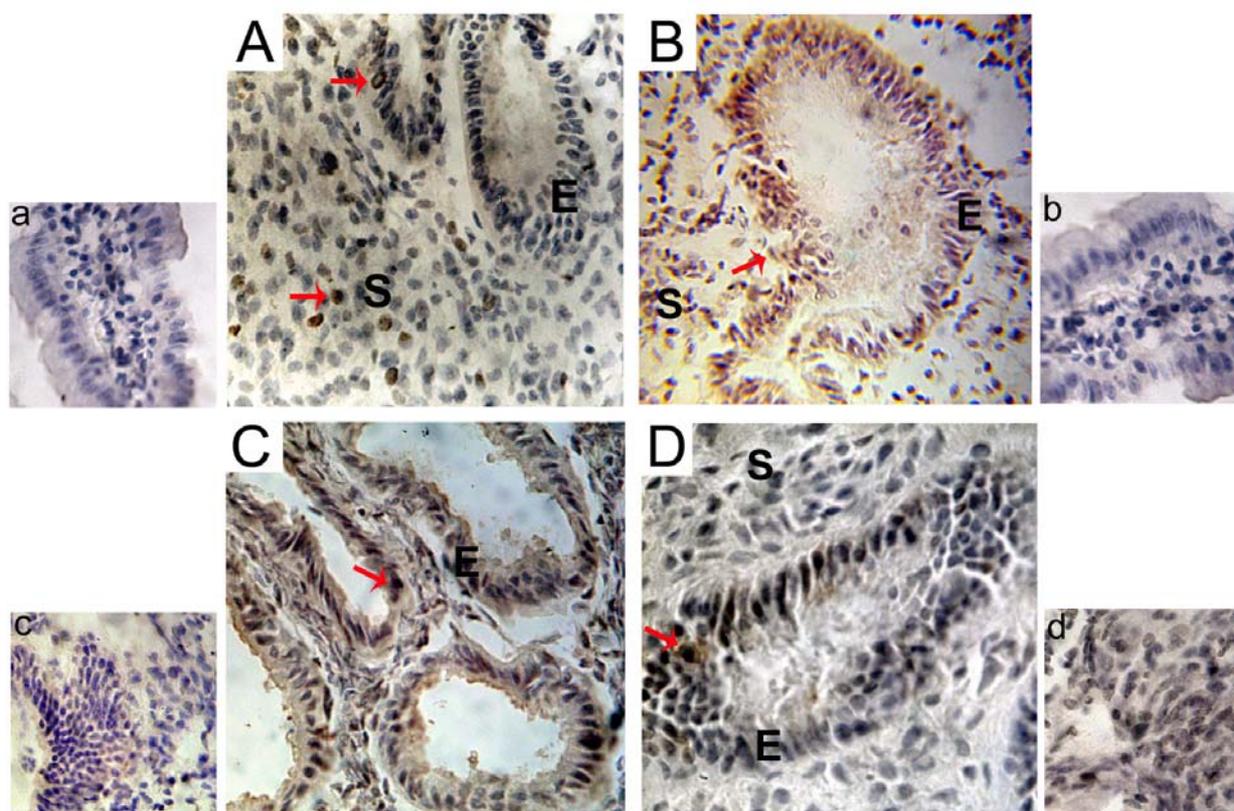


Figura 1. Fotomicrografias de reações imuno-histoquímicas: (A) marcação por PCNA em endométrio ectópico pré-tratamento (setas) – 400X; (a) controle negativo da marcação por PCNA – 400X. (B) Marcação por Fas em endométrio eutópico pré-tratamento (seta) – 200X; (b) controle negativo da marcação por Fas – 400X. (C) Marcação por receptor de estrogênio tipo α (ER- α) em endométrio ectópico pré-tratamento (seta) – 400X; (c) controle negativo da marcação por ER- α – 400X. (D) Marcação por receptor de progesterona tipo A (PRA) em endométrio ectópico pós-tratamento com agonista do GnRH (seta) – 400X; (d) controle negativo da marcação por PRA – 400X. S – estroma; E – epitélio. (*)

* Observação: os campos da figura acima representam a reação imuno-histoquímica e não a quantificação da marcação.

Efeito dos tratamentos sobre a expressão do PCNA no endométrio eutópico e ectópico

Nas amostras de endométrio eutópico do grupo que usou LNG-IUS, 6 amostras pré- e 8 amostras pós-tratamento foram adequadas para análise. Já no grupo aGnRH, foram consideradas adequadas para análise 6 amostras pré- e 7 pós-tratamento.

O epitélio do endométrio de ambos os grupos demonstrou redução da proliferação celular avaliada pelo IPC após o tratamento (SIU-LNG: $35,5 \pm 3,8$ vs. $18,9 \pm 1,5$, $p=0,001$; aGnRH: $32,8 \pm 5,3$ vs. $19,8 \pm 0,8$, $p=0,005$). No estroma, o IPC também apresentou uma redução após exposição a ambos tratamentos (SIU-LNG: $19,0 \pm 1,4$ vs. $10,5 \pm 0,8$, $p=0,0008$; aGnRH: $14,6 \pm 1,6$ vs. $9,9 \pm 1,3$, $p=0,0350$). Não houve diferença entre os grupos no tocante a esta redução do IPC (figura 2A).

Nas lesões endometrióticas, foram consideradas adequadas para análise imunohistoquímica 6 amostras pré- e 5 amostras pós-uso do SIU-LNG e 5 amostras tanto pré- como pós-aGnRH. Ambos os tratamentos em questão diminuíram o IPC nas células epiteliais (SIU-LNG: $36,8 \pm 3,4$ vs. $20,2 \pm 3,5$, $p=0,005$; aGnRH: $49,5 \pm 3,7$ vs. $17,9 \pm 2,2$, $p=0,002$) e estromais (SIU-LNG: $16,5 \pm 1,8$ vs. $10,2 \pm 1,0$, $p=0,014$; aGnRH: $20,1 \pm 0,6$ vs. $8,8 \pm 0,8$, $p=0,002$) do endométrio ectópico (figura 2B). Não houve diferença entre os grupos no tocante a esta redução do IPC.

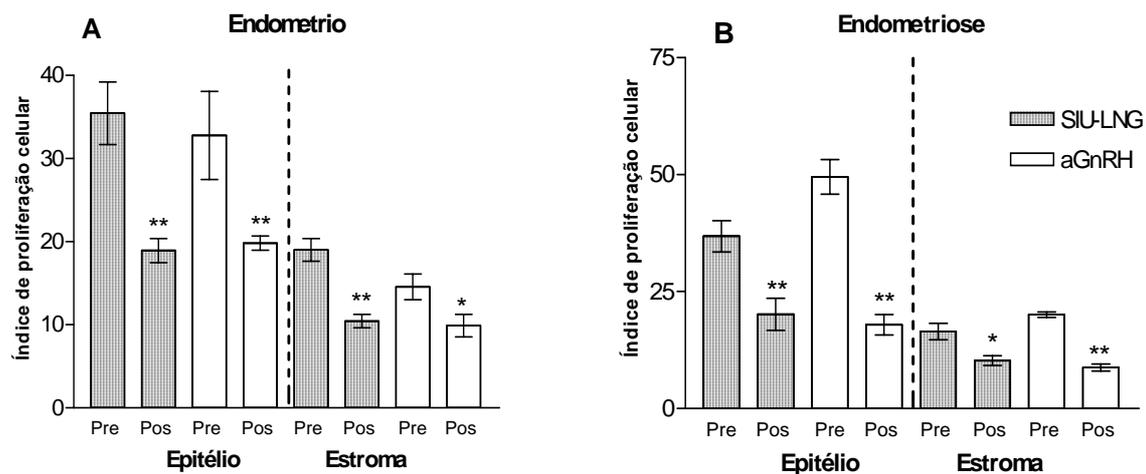


Figura 2 - Efeito do Sistema intra-uterino de levonorgestrel (SIU-LNG) e do agonista do GnRH (aGnRH) na proliferação celular do endométrio eutópico (A) e ectópico (B) de pacientes com endometriose.

Nota: Os valores são expressos como índice de proliferação celular (média \pm SE), ou seja, número de células marcadas para o PCNA em 1000 células contadas, tanto para o epitélio como para o estroma. * $p < 0,05$ vs. pré-tratamento; ** $p < 0,005$ vs. pré-tratamento.

Efeito dos tratamentos sobre a expressão do Fas no endométrio eutópico e ectópico

Foi possível avaliar o marcador de apoptose, Fas, em 7 amostras de endométrio eutópico pré- e em 10 amostras de endométrio eutópico pós-SIU-LNG, e em 7 e 6 amostras de endométrio eutópico pré- e pós-aGnRH, respectivamente. Houve aumento significativo dos valores do *H*-score para o Fas no epitélio do endométrio eutópico durante o tratamento com o SIU-LNG ($0,8 \pm 0,0$ vs. $1,3 \pm 0,2$, $p=0,019$). Já no grupo que usou aGnRH, este aumento da expressão do Fas nas glândulas do endométrio eutópico não foi observado (*H*-score $0,8 \pm 0,1$ vs. $0,9 \pm 0,3$, $p=0,710$). No estroma, após ambos os tratamentos, não houve aumento significativo do *H*-score para o Fas (SIU-LNG: $0,1 \pm 0,1$ vs. $0,2 \pm 0,1$, $p=0,743$; aGnRH: $0,1 \pm 0,0$ vs. $0,1 \pm 0,0$, $p=0,754$). Estes dados encontram-se resumidos na figura 3A.

Foram analisadas 6 amostras de lesões endometrióticas pré- e 7 pós-SIU-LNG e 5 e 4 amostras pré- e pós-aGnRH, respectivamente. No endométrio ectópico, a expressão do Fas apresentou expressão semelhante àquele do endométrio eutópico (figura 3B). Houve aumento significativo do *H*-score para o Fas somente no epitélio glandular da lesão endometriótica após tratamento com o SIU-LNG ($0,2 \pm 0,0$ vs. $0,9 \pm 0,2$, $p=0,035$). No grupo aGnRH, *H*-score para o Fas do endométrio ectópico aumentou de $0,3 \pm 0,1$ para $0,8 \pm 0,1$, porém não foi estatisticamente significativo ($p=0,052$). No estroma do endométrio ectópico, o marcador de apoptose teve uma expressão basal pouco significativa que não se modificou após os tratamentos (SIU-LNG: $0,0 \pm 0,0$ vs. $0,1 \pm 0,0$, $p=0,059$; aGnRH: $0,1 \pm 0,0$ vs. $0,0 \pm 0,0$, $p=1,000$). Não houve diferença do *H*-score para o Fas entre os tratamentos, tanto para epitélio como para estroma, do endométrio eutópico e do ectópico.

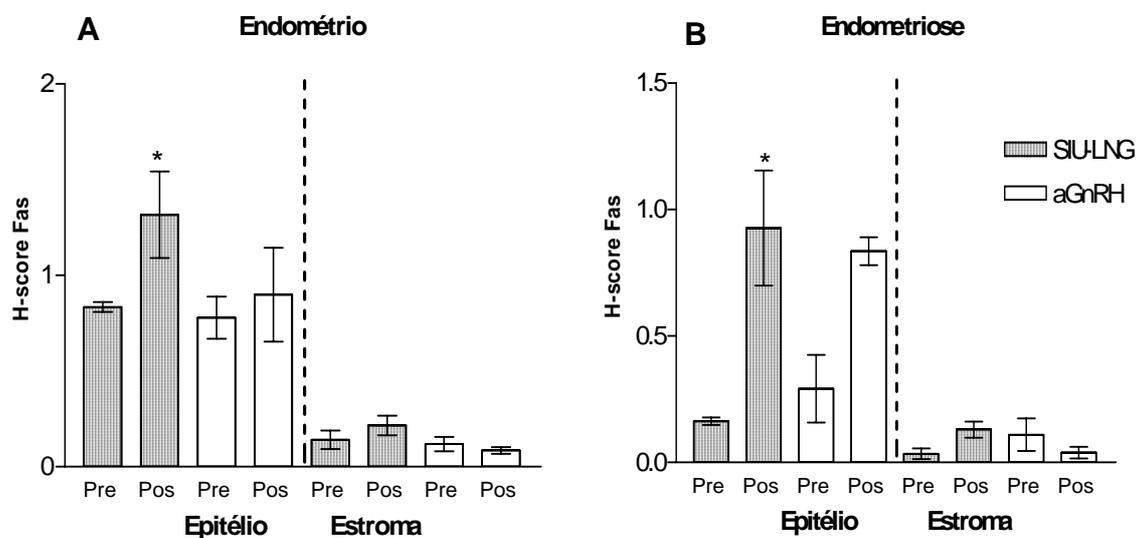


Figura 3. Efeito do Sistema intra-uterino de levonorgestrel (SIU-LNG) e do agonista do GnRH (aGnRH) na apoptose do endométrio eutópico (A) e ectópico (B) de pacientes com endometriose. A apoptose foi avaliada pela expressão do Fas.

Nota: O lado esquerdo de cada gráfico representa o *H*-score das glândulas marcadas pelo Fas antes e após o tratamento e, do lado direito, o *H*-score das células estromais marcada pelo Fas antes e após o tratamento. Os valores são expressos em média \pm SE. * $p < 0,05$ vs. pré-tratamento.

Efeito dos tratamentos sobre a expressão do ER- α no endométrio eutópico e ectópico

Foi possível avaliar o marcador de receptor de estrogênio, ER- α , em 5 amostras de endométrio eutópico pré- e em 6 amostras de endométrio eutópico pós-SIU-LNG, e em 5 amostras de endométrio eutópico pré- e pós-aGnRH. Tanto no grupo SIU-LNG como no grupo aGnRH, houve significativa redução do *H*-score para ER- α no endométrio eutópico após o tratamento; esta redução foi no epitélio glandular (SIU-LNG: $1,9 \pm 0,3$ vs. $0,3 \pm 0,1$, $p=0,004$; aGnRH: $2,4 \pm 0,3$ vs. $0,3 \pm 0,0$, $p=0,008$) e no estroma (SIU-LNG: $1,1 \pm 0,2$ vs. $0,2 \pm 0,0$, $p=0,004$; aGnRH: $1,5 \pm 0,2$ vs. $0,1 \pm 0,0$, $p=0,008$), respectivamente (figura 4A).

Foram analisadas 5 amostras de lesões endometrióticas pré- e 4 amostras de lesões endometrióticas pós-SIU-LNG e 3 amostras pré- e 2 pós-aGnRH. A escassez de material de lesão endometriótica dificultou a qualidade da marcação. No epitélio ectópico, houve redução significativa do *H*-score para ER- α apenas no grupo SIU-LNG, tanto no epitélio ($1,6 \pm 0,3$ vs. $0,2 \pm 0,1$; $p=0,024$) como no estroma ($0,9 \pm 0,2$ vs. $0,2 \pm 0,0$; $p=0,024$). No grupo aGnRH, a análise ficou prejudicada pelo escasso número de amostras (figura 4B). Não houve diferença do *H*-score para o ER- α entre os tratamentos, tanto para epitélio como para estroma, do endométrio eutópico e do ectópico.

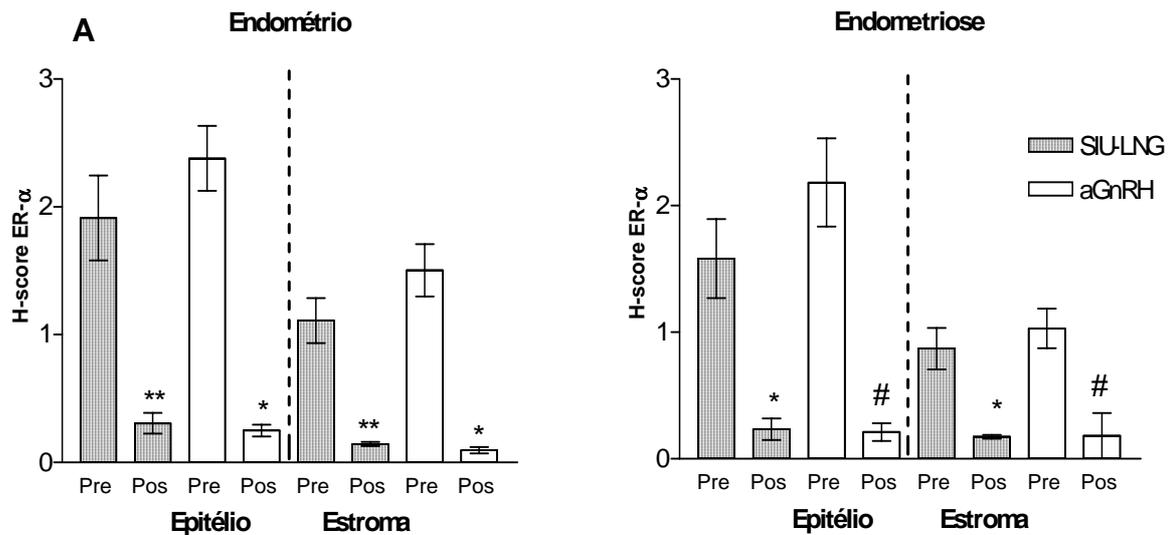


Figura 4. Efeito do Sistema intra-uterino de levonorgestrel (SIU-LNG) e do agonista do GnRH (aGnRH) sobre o receptor de estrogênio α (ER- α) do endométrio eutópico (A) e ectópico (B) de pacientes com endometriose.

Nota: O lado esquerdo de cada gráfico representa o *H*-score das glândulas marcadas pelo ER- α antes e após o tratamento e, do lado direito, o *H*-score das células estromais marcada pelo ER- α antes e após o tratamento. Os valores são expressos em média \pm SE. * $p < 0,05$ vs. pré-tratamento; ** $p \leq 0,005$ vs. pré-tratamento; # "n" insuficiente para análise estatística.

Efeito dos tratamentos sobre a expressão do PRA no endométrio eutópico e ectópico

Foi possível avaliar o marcador de receptor de progesterona, PRA, em 6 amostras de endométrio eutópico pré- e pós-SIU-LNG, e em 6 amostras de endométrio eutópico pré- e 4 amostras de endométrio eutópico pós-aGnRH. Tanto no grupo SIU-LNG como no grupo aGnRH, houve significativa redução do *H*-score para PRA no epitélio do endométrio eutópico após o tratamento (SIU-LNG: $1,9 \pm 0,3$ vs. $0,0 \pm 0,0$, $p=0,002$; aGnRH: $2,0 \pm 0,2$ vs. $0,3 \pm 0,1$, $p=0,001$). No estroma do endométrio eutópico, a redução da expressão do PRA foi estatisticamente significativa apenas no grupo SIU-LNG ($0,7 \pm 0,2$ vs. $0,0 \pm 0,0$, $p=0,001$). No grupo aGnRH, essa redução não foi significativa ($0,6 \pm 0,2$ vs. $0,2 \pm 0,0$, $p=0,1709$). A figura 5A ilustra a expressão do PRA no endométrio pré- e pós-tratamento. Ao comparar os dois grupos, apenas a redução proporcionada pelo SIU-LNG no estroma do endométrio foi superior àquela ocasionada pelo aGnRH ($p=0,003$).

Foram analisadas 6 amostras de lesões endometrióticas pré- e 5 amostras de lesões endometrióticas pós-SIU-LNG e 5 e 3 amostras pré- e pós-aGnRH, respectivamente. A escassez de material de lesão endometriótica dificultou a qualidade da marcação. Houve redução estatisticamente significativa do *H*-score para PRA no endométrio ectópico apenas no grupo SIU-LNG, tanto para o epitélio ($2,0 \pm 0,3$ vs. $0,0 \pm 0,0$, $p=0,002$), como para o estroma ($0,5 \pm 0,1$ vs. $0,0 \pm 0,0$, $p=0,045$). No grupo aGnRH, esta redução não foi significativa (Epitélio: $1,4 \pm 0,3$ vs. $0,3 \pm 0,2$, $p=0,064$; Estroma: $0,5 \pm 0,2$ vs. $0,2 \pm 0,1$, $p=0,714$). Estes dados estão ilustrados na figura 5B. Da mesma forma que no endométrio eutópico, apenas a redução proporcionada pelo SIU-LNG no estroma da lesão endometriótica foi superior àquela ocasionada pelo aGnRH ($p=0,036$).

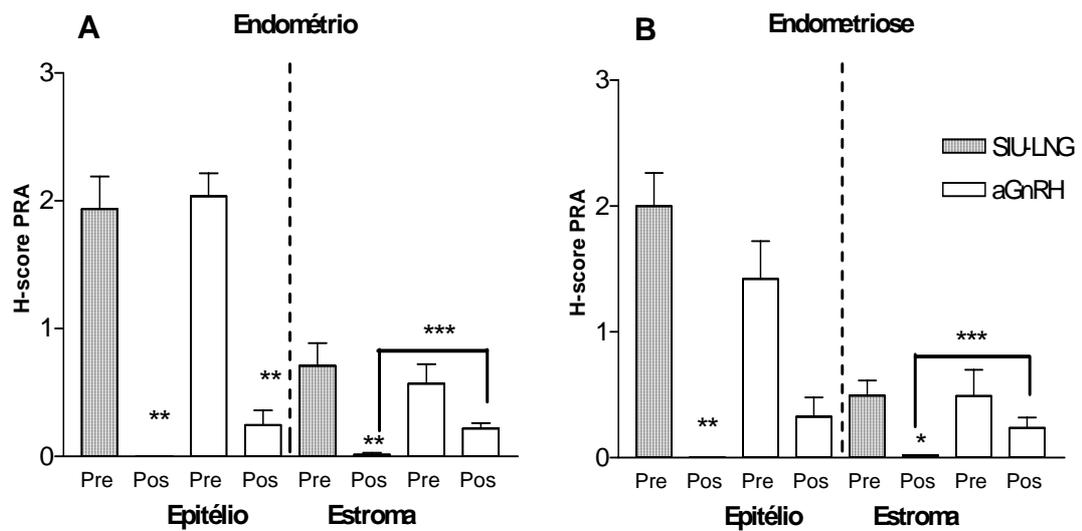


Figura 5. Efeito do Sistema intra-uterino de levonorgestrel (SIU-LNG) e do agonista do GnRH (aGnRH) sobre o receptor de progesterona A (PRA) do endométrio eutópico (A) e ectópico (B) de pacientes com endometriose.

Nota: O lado esquerdo de cada gráfico representa o *H*-score das glândulas marcadas pelo PRA antes e após o tratamento e, do lado direito, o *H*-score das células estromais marcada pelo PRA antes e após o tratamento. Os valores são expressos em média \pm SE. * $p < 0,05$ vs. pré-tratamento; ** $p < 0,005$ vs. pré-tratamento; *** $p < 0,05$ pós-SIU-LNG vs. pós-aGnRH.

Não houve correla o entre modifica es no IPC e *H*-score para o Fas vs. modifica es na expressão dos receptores ER- α e PRA.

Discussão

Objetivando elucidar mecanismos locais de ação do SIU-LNG, o presente estudo demonstrou que o SIU-LNG atua modificando a homeostase do tecido eutópico e ectópico de mulheres com algia pélvica crônica relacionada à endometriose. Observou-se significativa redução da expressão de marcadores de proliferação celular (PCNA), de ER- α e de PRA nos epitélios glandulares e estromais do endométrio eutópico e ectópico, após 6 meses de tratamento com o SIU-LNG. Demonstrou-se, também, que o dispositivo aumentou a expressão do marcador de apoptose no epitélio do endométrio eutópico e do ectópico. Desconhecemos relatos prévios de estudo prospectivo, randomizado e controlado que tenha reportado tais achados em endométrio eutópico e ectópico em pacientes com endometriose.

O endométrio eutópico das pacientes com endometriose apresenta diferenças fundamentais quando comparado ao endométrio de mulheres sem a doença. Estas diferenças são a base do conceito de que o endométrio exerce um papel importante na patogênese desta enfermidade (MERESMAN et al., 2000; SHARPE-TIMMS, 2001). O aumento da viabilidade celular no endométrio destas pacientes, como consequência de uma reduzida morte celular por apoptose, assim como por um aumento na proliferação celular, indica que esta condição pode facilitar o comportamento invasivo deste endométrio (JOHNSON et al., 2005).

Tanto a apoptose quanto a proliferação celular são alvos das terapêuticas habitualmente utilizadas para controle da dor em pacientes com endometriose. Mizutani et al. (1999), em um relato de caso, observaram que o uso de aGnRH em uma paciente com endometriose de septo retovaginal reduziu a expressão da proteína marcadora de proliferação celular Ki-67 nas glândulas endometrióticas. Em cultura de células epiteliais de endométrio eutópico de pacientes com endometriose, a adição de aGnRH provocou a redução da síntese

de DNA por essas células (MERESMAN et al., 2003). Este resultado só foi evidente no meio de cultivo acrescido por TGF β , substância utilizada para sensibilizar a análise da proliferação celular. O uso do aGnRH em cultivo de células de leiomioma humano demonstrou inibir a proliferação celular avaliada pelo PCNA (WANG et al., 2002). No presente estudo, as usuárias de aGnRH apresentaram redução da proliferação celular, avaliada pelo PCNA, tanto nas células estromais quanto nas glandulares do endométrio eutópico e ectópico.

Nas pacientes tratadas com SIU-LNG, similarmente ao observado com as usuárias de aGnRH, a proliferação celular apresentou-se reduzida após 6 meses de tratamento, tanto no endométrio eutópico, como no ectópico. Maruo et al. (2001) já demonstraram expressiva diminuição da marcação do PCNA no estroma e epitélio endometrial eutópico 3 meses após uso de SIU-LNG em pacientes com menorragia por adenomiose.

Estudos experimentais sugeriram que a apoptose, pelo menos em parte, é alvo da ação terapêutica do aGnRH no tratamento da endometriose. Imai, Takagi e Tamaya (2000) demonstraram que o aGnRH, em cultivo de células estromais e glandulares, aumentou a taxa de apoptose no endométrio eutópico e ectópico de mulheres com endometriose a taxas comparáveis às do endométrio de pacientes controle. Este efeito do aGnRH não foi evidenciado em mulheres sem endometriose. Outro estudo experimental com cultura de células endometriais veio reforçar a ação direta do aGnRH sobre a apoptose (MERESMAN et al., 2003). Desta forma, sugere-se que o efeito antiproliferativo local do aGnRH sobre o endométrio ectópico parece ser não somente por meio da supressão gonadal, mas, também, por meio de um efeito direto no crescimento celular (BORRONI et al., 2000, SICA et al., 2001).

O mecanismo pelo qual o aGnRH estimula a apoptose ainda é motivo de controvérsias. Como a ativação da apoptose pode ser observada por dois mecanismos principais, a sua análise varia entre os estudos. Um dos mecanismos de ativação é pela via

mitocondrial. O balanço entre moléculas anti- e pró-apoptóticas, como Bcl-2/Bax respectivamente, constitui o reostato que define a susceptibilidade à apoptose. Esta via intrínseca utiliza organelas, como as mitocôndrias, para amplificar o sinal de morte celular, resultando em ativação de caspases que provocam a apoptose (CHINNAIYAN et al., 1997; DANIAL & KORSMEYER, 2004). Por meio desta interação, a proteína Bax antagoniza a função do Bcl-2, anulando seu efeito de prolongar a sobrevivência celular. A segunda via de ativação é a via receptor de morte. Esta via, que envolve o sistema de ligação Fas-Fas ligand (FasL), é a mais estudada por ser o principal mecanismo de indução da apoptose nas diversas células e tecidos (CURTIN & COTTER, 2003). O Fas (também conhecido por CD95 ou Apo-1 e, atualmente, por TNFRSF6) é o maior representante da família de receptor de fator de necrose tumoral (TNF) (LOCKSLEY et al., 2001) e induz à apoptose por meio da ligação com o FasL. Esta ligação desencadeia a morte celular com condensação nuclear e fragmentação do DNA (NAGATA & GOLSTEIN, 1995).

A expressão do Fas foi observada nas células glandulares, mas não no estroma, do endométrio eutópico e do ectópico de mulheres com endometriose (WATANABE et al., 1997). Nenhuma variação cíclica foi demonstrada por estes autores. Já outros estudos demonstraram maior expressão do Fas na fase secretora (YAMASHITA et al., 1999; ATASOY et al., 2003). No presente estudo, antes dos tratamentos realizados, as amostras de endométrio eutópico e ectópico obtidas na fase proliferativa inicial também detectaram fraca expressão de Fas no epitélio e expressão praticamente nula no estroma.

Nas usuárias de aGnRH da presente casuística, não foi possível avaliar aumento da apoptose, por meio do marcador Fas. Estes achados são concordantes com os de Bilotas et al. (2007). A adição de agonista e/ou antagonista de GnRH em cultura de células epiteliais de endométrio não modificou a expressão do Fas. O maior número de células apoptóticas, com o uso do aGnRH, encontrado por estes autores foi associado a um aumento da expressão das

proteínas pró-apoptóticas FasL e Bax e redução na expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2. Já foi previamente demonstrado que o aGnRH aumentou a expressão do Fas e induziu à expressão de FasL em culturas de células de leiomiomas (WANG et al., 2002). Provavelmente, a limitada análise de apenas um marcador de apoptose e a pequena casuística foram as razões para os achados nesse presente estudo.

Já o comportamento do SIU-LNG sobre a expressão do Fas, diferiu-se daquele exercido pelo aGnRH. Apesar da fraca expressão do marcador nas amostras pré-inserção, observou-se, pela primeira vez, um significativo aumento na expressão do Fas no epitélio glandular tanto do endométrio como da lesão endometriótica 6 meses após a inserção. No estroma, este aumento não ocorreu. Efeito semelhante foi relatado no estudo de Maruo et al. (2004), que evidenciou maior expressão do Fas também no estroma de biópsias endometriais, após 3 meses de SIU-LNG. Este grupo demonstrou ainda diminuição da expressão de Bcl-2 associada ao aumento da apoptose. O estudo de Critchley et al. (1999) confirmou os efeitos inibitórios dos progestogênios na proliferação endometrial e os autores propuseram que estes hormônios ajam estimulando a apoptose no endométrio.

O aumento da apoptose, que parece ser estimulado pelas duas vias de ativação, pode ser um dos mecanismos pelo qual o SIU-LNG causa alterações atróficas no endométrio e este efeito pode ser extensivo ao endométrio ectópico em mulheres com endometriose.

Os estudos são controversos quanto ao padrão de expressão de ER e PR ao longo do ciclo menstrual, no endométrio eutópico e ectópico de mulheres com endometriose (BERGQVIST; LJUNGBERG; SKOOG, 1993; JONES; BULMER; SEARLE, 1995; NISOLLE; CASANAS-ROUX; DONNEZ, 1997). Mas a expressão destes receptores de esteróides parece não se diferenciar entre o endométrio eutópico de mulheres normais e o de pacientes com endometriose (JONES; BULMER; SEARLE, 1995). No endométrio normal, as variações cíclicas hormonais estão associadas às modificações da expressão dos ER e PR.

Postula-se que o estradiol estimule a expressão de ER e PR, enquanto a progesterona iniba os mesmos (LESSEY et al., 1988).

Na pós-menopausa, há expressão dos ER e PR, mas numa intensidade menor que no menacme. No endométrio atrófico, foi observada uma “downregulation” (inibição) da expressão do ER- α e ER- β comparada ao epitélio proliferativo, provavelmente secundária ao hipoestrogenismo. Enquanto o PRB diminuiu significativamente no endométrio atrófico, foi detectada maior expressão de PRA comparada ao endométrio secretor tardio (MYLONAS et al., 2007). Este padrão de expressão secundário ao hipoestrogenismo seria semelhante àquele proporcionado pelo uso de aGnRH nas pacientes com endometriose, como podemos observar nos resultados do presente estudo. No endométrio eutópico, o aGnRH diminuiu a expressão de ER- α no epitélio e estroma e de PRA somente no epitélio. Na lesão endometriótica, tanto no epitélio como no estroma, não foi possível observar modificações significativas na expressão de ER- α e PRA após o tratamento com aGnRH. Foram poucas as amostras suficientes para estudo, com fraca marcação, o que prejudicou a análise dos resultados. Matsuzaki et al. (2000) encontraram a redução dos níveis de mRNA de ER- α , mas não de ER- β , em endometriomas após longo período de tratamento com aGnRH.

Nas usuárias do SIU-LNG, os achados aqui relatados são concordantes com a literatura (JANNE & YLOSTALO,1980; LU,1991; PENGDI et al., 1999, VEREIDE et al., 2006). O interessante é que foi possível demonstrar que a redução na expressão dos ER- α e PRA estende-se, também, ao epitélio e ao estroma do endométrio ectópico. O LNG liberado pelo SIU não mimetiza o efeito da progesterona no endométrio normal. No endométrio normal, os receptores declinam na fase secretora tardia, existindo uma diferença entre a queda do epitélio e do estroma, enquanto nas usuárias de SIU-LNG há um decréscimo uniforme, independente do tipo da célula (PENGDI et al., 1999).

Acredita-se que a redução na expressão dos receptores de esteróides, proporcionada pelo SIU-LNG e pelo aGnRH, tenha influência no controle da apoptose e da proliferação celular, embora nenhuma correlação tenha sido encontrada em nossa casuística. A diminuição da proteína repressora da apoptose Bcl-2 e, possivelmente, o aumento da expressão de FasL, na fase secretora tardia, têm correlação positiva com a fraca expressão dos ER e PR nesta mesma fase (OTSUKI et al, 1994). Desta forma, com base nos achados do presente estudo, pode-se sugerir que, nas usuárias de aGnRH, o hipoestrogenismo seria responsável pela diminuição dos receptores esteróides no endométrio, o que estimularia a apoptose e reduziria a proliferação celular, tanto no endométrio eutópico, como no ectópico. Porém, nas usuárias do SIU-LNG, não há hipoestrogenismo. Estudos prévios avaliando a função ovariana em usuárias de SIU-LNG sugerem que a maioria das mulheres apresenta ciclos ovulatórios (NILSSON; LAHTEENMAKI; LUUKKAINEN, 1984; LUUKKAINEN & TOIVONEN, 1995). Desta forma, sugere-se que a alta concentração local de LNG iniba a expressão dos receptores, que fazem com que o endométrio torne-se insensível ao estradiol circulante. Esta insensibilidade estimularia a apoptose, predominando o efeito antiproliferativo no endométrio (PENGDI et al., 1999). Este mecanismo explicaria a ação no endométrio eutópico, mas não no ectópico.

Hipóteses foram levantadas para explicar o meio pelo qual o SIU-LNG atuou no endométrio ectópico (BAHAMONDES et al., 2007). Uma das formas de atuação poderia ser por ação direta sobre as lesões. Contudo, a concentração de LNG é alta somente no endométrio eutópico, contrariando esta hipótese. A administração oral de LNG em dose dez vezes superior àquela liberada pelo SIU resultou em concentrações endometriais de LNG semelhantes às dos tecidos adjacentes e os efeitos atróficos sobre o endométrio eutópico foram bem menos intensos que os efeitos promovidos pelo SIU-LNG (NILSSON et al., 1982). Outra forma possível de atuação do SIU-LNG na lesão endometriótica seria por meio

de altas concentrações de LNG no fluido peritoneal agindo diretamente no endométrio ectópico. Porém, em um recente estudo, Lockhat et al. (2004) demonstrou que os níveis de LNG no fluido peritoneal de pacientes com endometriose e tratadas com SIU-LNG eram tão baixos quanto aos níveis séricos periféricos de LNG previamente dosados por Nilsson, Lahteenmaki e Luukkainen (1980). Lockhat et al. (2004) observaram também que os níveis no fluido peritoneal foram semelhantes em pacientes laqueadas e não laqueadas, sugerindo que as tubas uterinas, provavelmente, não sejam as vias de dispersão do LNG para o peritônio. Segundo estes autores, a rapidez com que o LNG foi detectado na circulação e no fluido peritoneal sugere que as mais prováveis vias de dispersão do LNG para o peritônio sejam as vias hematogênica ou linfática. Para nós, assim como para Bahamondes et al. (2007), a hipótese mais provável parece ser que o SIU-LNG atuaria diretamente na lesão de forma similar à atuação dos progestogênios no endométrio normal. O endométrio ectópico, constantemente exposto a uma concentração de LNG (mesmo que baixa, mas não fisiológica) reduziria a expressão dos ER e PR, expressão essa observada no presente estudo. As lesões endometrióticas tornar-se-iam insensíveis ao estradiol circulante, assim como parece ocorrer no endométrio eutópico. Conseqüentemente, com esta insensibilidade ao estradiol, predominaria um efeito antiproliferativo no endométrio ectópico exposto ao tratamento com SIU-LNG. Este efeito antiproliferativo estaria em conformidade com os achados do presente estudo de diminuição da proliferação celular e aumento da apoptose.

Por fim, este estudo demonstrou que 6 meses de tratamento com SIU-LNG reduz a expressão de marcadores de proliferação celular, ER- α e PRA e aumenta a expressão de marcadores de apoptose no epitélio glandular e no estroma do endométrio eutópico e ectópico de pacientes com algia pélvica relacionada à endometriose. Estas modificações foram semelhantes às observadas no grupo tratado com aGnRH. Estes achados explicam, pelo menos em parte, o mecanismo de melhora clínica (VERCELLINI et al., 2003; LOCKHAT;

EMEMBOLU; KONJE, 2005; PETTA et al., 2005) e não piora do estadiamento laparoscópico (GOMES et al., 2007) nas pacientes com endometriose, usuárias do SIU-LNG. Certamente, há vários outros fatores, tais como imunológicos, angiogênicos e hormonais envolvidos. Pela primeira vez, foi possível demonstrar efeitos antiproliferativos no endométrio ectópico de pacientes com algia pélvica e endometriose tratadas com SIU-LNG. A melhora clínica da endometriose em usuárias de SIU-LNG, previamente observada por vários autores, agora ganha subsídio histológico. A avaliação dos resultados aqui demonstrados requer cautela, uma vez que o número de amostras disponíveis para análise foi pequeno. Este estudo oferece subsídios para investigações adicionais sobre a atuação do SIU-LNG nas lesões endometrióticas.

REFERÊNCIAS*

Atasoy P, Bozdoğan O, Ereku S, Bozdoğan N, Bayram M. Fas-mediated pathway and apoptosis in normal, hyperplastic, and neoplastic endometrium. *Gynecol Oncol* 2003;91:309-17.

Bergqvist A, Ljungberg O, Skoog L. Immunohistochemical analysis of oestrogen and progesterone receptors in endometriotic tissue and endometrium. *Hum Reprod* 1993;8:1915-22.

Bilotas M, Barañao RI, Buquet R, Sueldo C, Tesone M, Meresman. Effect of GnRH analogues on apoptosis and expression of Bcl-2, Bax, Fas and FasL proteins in endometrial epithelial cell cultures from patients with endometriosis and controls. *Hum Reprod* 2007;22:644-53.

Borroni R, Di Blasio AM, Gaffuri B, Santorsola R, Busacca M, Viganò P, Vignali M. Expression of GnRH receptor gene in human ectopic endometrial cells and inhibition of their proliferation by leuprolide acetate. *Mol Cell Endocrinol* 2000;159:37-43.

Braun DP, Ding J, Shen J, Rana N, Fernandez BB, Dmowski WP. Relationship between apoptosis and the number of macrophages in eutopic endometrium from women with and without endometriosis. *Fert Steril* 2002;78:830-5.

Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Lane BR, Dixit VM. Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death. *Science* 1997;275:1122-6.

Critchley HOD, Tong S, Cameron ST, Drudy TA, Kelly RW, Baird DT. Regulation of bcl-2 gene family members in human endometrium by antiprogestin administration in vivo. *J Reprod Fertil* 1999;115:389-95.

Curtin JF and Cotter TG. Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. *Cell Signal* 2003;15:983-92.

Daniel NN and Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 2004 ;116:205-19.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors (Vancouver Style) – grupo de Vancouver. *JAMA* 1997;277:927-934.

De Sá Rosa e Silva AC, Rosa e Silva JC, Nogueira AA, Petta CA, Abrão MS, Ferriani RA. The levonorgestrel-releasing intrauterine device reduces CA-125 serum levels in patients with endometriosis. *Fertil Steril* 2006;86:742-4.

Dmowski WP, Ding J, Shen, Rana N, Fernandez BB, Braun DP. Apoptosis in endometrial glandular and stromal cells in women with or without endometriosis. *Hum Reprod* 2001; 16:1802-8.

Fujishita A, Hauso A, Khan KN, Masuzaki H, Nakashima H, Ishimaru T. Immunohistochemical study of angiogenic factors in endometrium and endometriosis. *Gynecol Obstet Invest* 1999 ;48 (Supl1):36-44.

Gebel HM, Braun DP, Tambur A, Frame D, Rana N, Dmowski DP. Spontaneous apoptosis of endometrial tissue is impaired in women with endometriosis. *Fertil Steril* 1998;9:1042-7.

Gomes MKO, Ferriani RA, Rosa e Silva JC, De Sá Rosa e Silva AC, Vieira CS, Reis FJC, Nogueira AA. The levonorgestrel-releasing intrauterine system and endometriosis staging. *Fertil Steril* 2007;87:1231-3.

Howard F. Chronic pelvic pain. *Obstet Gynecol* 2003;101:594–611.

Huang A, Pettigrew NM, Watson PH. Immunohistochemical assay for oestrogen receptors in paraffin wax sections of breast carcinoma using a new monoclonal antibody. *J Pathol* 1996;180:223-7.

Imai A and Tamaya T. GnRH receptor and apoptotic signaling. *Vitam Horm* 2000;59:1–33.

Imai A, Takagi A, Tamaya T. Gonadotropin-releasing hormone analog repairs reduced endometrial cell apoptosis in endometriosis in vitro. *Am J Obstet Gynecol* 2000;182:1142–6.

Janne, O and Ylostalo, P. Endometrial estrogen and progestin receptors in women bearing a progesterone-releasing intrauterine device. *Contraception* 1980;22:19–23.

Johnson MC, Torres M, Alves A, Bacallao K, Fuentes A, Vega M, Boric MA. Augmented cell survival in eutopic endometrium from women with endometriosis: expression of c-myc, TGF-beta1 and bax genes. *Reprod Biol Endocrinol* 2005;3:45.

Jones RK, Bulmer JN, Searle RF. Immunohistochemical characterization of proliferation, oestrogen receptor and progesterone receptor expression in endometriosis: comparison of

eutopic and ectopic endometrium with normal cycling endometrium. *Hum Reprod* 1995;10:3272-9.

Kokawa K, Shikone T, Nakano R. Apoptosis in the human uterine endometrium during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:4144-7.

Lessey BA, Killam AP, Metzger DA, Haney AF, Greene GL, McCarty KS Jr. Immunohistochemical analysis of human uterine estrogen and progesterone receptors throughout the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;67:334-40.

Lockhat FB, Emembolu JO, Konje 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.

Lu SM. Effect of levonorgestrel intrauterine device on human endometrial estrogen and progesterone receptors. *Chin J Obstet Gynecol* 1991;26:293-4.

Luukkainen T and Toivonen J. Levonorgestrel-releasing IUD as a method of contraception with therapeutic properties. *Contraception* 1995;52: 269-76.

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

Matsuzaki S, Uehara T, Murakami J, Fujiwara J, Funato T, Okamura K. Quantitative analysis of estrogen receptor alpha and beta messenger ribonucleic acid levels in normal endometrium and ovarian endometriotic cysts using a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *Fertil Steril* 2000;74:753-9.

Meresman GF, Vighi S, Buquet RA, Contreras-Ortiz O, Tesone M, Rumi LS. Apoptosis and expresión of Bcl-2 and Bax in eutopic endometrium from women with endometriosis. *Fertil Steril* 2000;74:760-6.

Meresman GF, Augé L, Barañao RI, Lombardi E, Tesone, M, Sueldo C. Oral contraceptives treatment suppresses proliferation and enhances apoptosis of eutopic endometrial tissue from patients with endometriosis. *Fertil Steril* 2002;77:1141-7.

Meresman GF, Buquet RA, Bilotas M, Barañao RI, Sueldo C, Tesone M. Gonadotropin-releasing hormone agonist induces apoptosis and reduces cell proliferation in eutopic endometrial cultures from women with endometriosis. *Fertil Steril* 2003;80(Suppl 2):702-7.

Mizutani T, Sugihara A, Nakamuro K, Suehara N, Terada N. The gonadotropin-releasing hormone agonist leuprolide acetate induces apoptosis and suppresses cell proliferative activity in rectovaginal endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1999;181(3):750-751.

Mylonas I, Jeschke U, Shabani N, Kuhn C, Kunze S, Dian D, Friedl C, Kupka MS, Friese K. Steroid receptors ER α , ER β , PR-A and PR-B are differentially expressed in normal and atrophic human endometrium. *Histol Histopathol* 2007;22:169-76.

Nagata S and Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995;267:1449–56.

Nilsson CG, Lahteenmaki P, Luukkainen T. Levonorgestrel plasma concentrations and hormone profiles after insertion and after one year of treatment with a levonorgestrel-IUD. *Contraception* 1980;21:225-33.

Nilsson CG, Haukkamaa M, Vierola H, Luukkainen T. Tissue concentrations of levonorgestrel in women using a levonorgestrel releasing IUD. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1982;17:529–36.

Nilsson CG, Lahteenmaki P, Luukkainen T. Ovarian function in amenorrhoeic and menstruating users of levonorgestrel-releasing intrauterine devices. *Fertil Steril* 1984;41:52–5.

Nisolle M, Casanas-Roux F, Donnez J. Immunohistochemical analysis of proliferative activity and steroid receptor expression in peritoneal and ovarian endometriosis. *Fertil Steril* 1997;68:912–9.

Pengdi Z, Xiaoqun L, Hongzhi L, Zhao G, Jie C, Ruhua X, Shizhu L, Shangchun W, Jiedong W. The effect of a levonorgestrel-releasing intrauterine device on human endometrial oestrogen and progesterone receptors after one year of use. *Hum Reprod* 1999;14:970–5.

Petta CA, Ferriani RA, Abrao MS, Hassan D, Rosa e Silva JC, Podgaec S, Bahamondes L. 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.

Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril* 1997;67:817-21.

Rice VM. Conventional medical therapies for endometriosis. *Ann. NY Acad Sci* 2002;955: 343-52.

Rotello R, Lieberman RC, Lepoff RB, Gerschenson LE. Characterization of uterine epithelium apoptotic cell death kinetics and regulation by progesterone and RU 486. *Am J Pathol* 1992;140:449-56.

Sharpe-Timms KL. Endometrial anomalies in women with endometriosis. *Ann NY Acad Sci* 2001;943:131-47.

Sica G, Schinzari G, Angelucci C, Lama G and Iacopino F. Direct effects of GnRH agonists in human hormone-sensitive endometrial cells. *Mol Cell Endocrinol* 2001;176:121-8.

Sturridge F, Guilleband J. Gynecological aspects of levonorgestrel-releasing intrauterine system. *Br J Obstet Gynaecol* 1997;104: 285-9.

Tabibzadeh S. Signals and molecular pathways involved in apoptosis with special emphasis on human endometrium. *Hum Reprod* 1995;1:303-23.

Vaskivuo TE, Stenback F, Karhumaa P, Risteli J, Dunkel L, Tapanainen JS. Apoptosis and apoptosis-related proteins in human endometrium. *Mol Cell Endocrinol* 2000;165:75-83.

Vercellini P, Frontino G, De Giorgi O, Aimi G, Zaina B, Crosignani PG. Comparison of a levonorgestrel-releasing intrauterine device versus expectant management after conservative surgery for symptomatic endometriosis: a pilot study. *Fertil Steril* 2003;80:305-9.

Wang Y, Matsuo H, Kurachi O, Maruo T. Down-regulation of proliferation and up-regulation of apoptosis by gonadotropin-releasing hormone agonist in cultured uterine leiomyoma cells. *Eur J Endocrinol* 2002;146:447-56.

Woodforde JM, Merskey H. Some relationships between subjective measures of pain. *J Psychosom Res* 1972;16:173-8.

World Health Organization. *Medical Eligibility Criteria for Contraceptives*, 3rd ed. Geneva: WHO, 2004. 186p.

4 Conclusões

- O SIU-LNG, assim como o aGnRH, não modificaram, significativamente, o estadiamento laparoscópico da endometriose em pacientes com algia pélvica crônica.
- Houve significativa redução da expressão de marcadores de proliferação celular (PCNA), de ER- α e de PRA nos epitélios glandulares e estromais do endométrio eutópico e ectópico, após 6 meses de tratamento de pacientes com algia pélvica crônica associada à endometriose, tanto com o uso de SIU-LNG quanto com o de aGnRH. Não houve diferença significativa entre os grupos estudados.
- Demonstrou-se também que o uso de 6 meses de SIU-LNG aumentou a expressão do marcador de apoptose, avaliado pelo Fas, no epitélio do endométrio eutópico e do ectópico. O mesmo tempo de uso do aGnRH não alterou, significativamente, a expressão do marcador de apoptose Fas em nenhum dos sítios avaliados.

Anexos

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



CEP. 14048-900
RIBEIRÃO PRETO - S.P.
BRASIL

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CAMPUS UNIVERSITÁRIO – MONTE ALEGRE
FONE: 602-1000 - FAX (016) 633-1144

Ribeirão Preto, 18 de dezembro de 2003

Ofício nº 3792/2003
CEP/SPC

Prezada Senhora:

O trabalho intitulado “EFEITOS DO SISTEMA INTRA-UTERINO DE LEVONORGESTREL SOBRE O ENDOMÉTRIO TÓPICO E ECTÓPICO DE PACIENTES COM ENDOMETRIOSE”, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 171ª Reunião Ordinária realizada em 15/12/2003, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, de acordo com o Processo HCRP nº 11608/2003.

Aproveito a oportunidade para apresentar a Vossa Senhoria protestos de estima e consideração.

[Handwritten signature]
PROF. DR. SÉRGIO PEREIRA DA CUNHA
Coordenador do Comitê de Ética
em Pesquisa do HCFMRP-USP e da FMRP-USP

Ilustríssima Senhora
MARIANA KEFALÁS OLIVEIRA
PROF. DR. RUI ALBERTO FERRIANI (Orientador)
Depto. de Ginecologia e Obstetrícia
Em mãos

*De acordo com a
atualização
Sérgio
12-02-04*

ANEXO B – Termo de consentimento pós-informação

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campos Universitário Monte Alegre - Fone: 602-1000 - Fax: 633-1144
CEP: 14048-900 Ribeirão Preto - São Paulo.

ESCLARECIMENTOS AO SUJEITO DA PESQUISA**Nome da pesquisa:**

Efeitos do Sistema intra-uterino de levonorgestrel sobre o endométrio tópico e ectópico de pacientes com endometriose.

Pesquisador responsável:

Dra. Mariana Kefalás Oliveira – CRM/SP: 99.899.

1. Justificativa e objetivo da pesquisa:

A endometriose é uma doença que ainda não tem bem estabelecida a sua causa, o seu modo de agir e a sua cura. O tratamento é voltado para controle da doença diminuindo os sintomas, principalmente de dor. Milhares de estudos estão sendo realizados na tentativa de esclarecer todos estes aspectos tendo como principal finalidade encontrar uma cura para esta doença.

Queremos com este estudo avaliar a resposta da sua lesão de endometriose e do seu endométrio (camada mais interna do útero) ao tratamento da endometriose com o *Mirena* ou com o *Lupron*. Este termo complementa outros dois Termos de Consentimento que explicam como será o tratamento. O objetivo desta pesquisa é estudar como se comporta o endométrio após 6 meses de tratamento e com isso sabermos como agem e se estas drogas são realmente eficazes em controlar a doença.

Para o diagnóstico de endometriose normalmente fazemos laparoscopia (cirurgia que se faz por um corte no umbigo e se observa a cavidade abdominal através de uma mini câmara). A certeza absoluta da presença da endometriose é dada pela análise microscópica de um pedacinho da lesão que é retirado durante a cirurgia (biópsia). Fazemos também biópsia do endométrio das pacientes com endometriose para ver a influência dos hormônios sobre este tecido e verificar a fase do ciclo menstrual, e parece que o endométrio de pacientes com endometriose pode ter propriedades diferentes dos endométrios de pacientes sem endometriose e pode ser que também sofram modificações com o tratamento.

A proposta deste estudo é estudar um pouco mais este tecido de endométrio que será retirado, com o uso de técnicas que permitem ver como é a proliferação deste tecido, e estamos solicitando sua autorização para este estudo.

2. Os procedimentos que serão utilizados e seus propósitos:

Para se ter o diagnóstico de certeza da endometriose é necessário realizar laparoscopia, uma cirurgia geralmente sob anestesia geral, na qual se introduz uma mini câmara pelo umbigo, como previamente citado. Esta cirurgia é melhor explicada em outro Termo que tem que ser lido e assinado para realizá-la. Como nem sempre só de olhar pode-se ter certeza que a doença está presente, é necessário retirar um pedacinho da lesão presente para mandar para exame. Pequena quantidade de lesão é necessária para diagnóstico. Geralmente sobra material que pode ser estocado em freezer para estudar outras coisas e é isso que estamos propondo neste estudo, utilizar este material que sobra para avaliar a proliferação da lesão.

Para estudar o endométrio, é necessário realizar uma biópsia dentro do útero. Neste estudo, ela será feita após a laparoscopia, quando você ainda estiver anestesiada.

Após 6 meses de tratamento (*Mirena* ou *Lupron*) nós vamos reavaliar o estado da doença através dos mesmos procedimentos acima relacionados. A realização de nova laparoscopia é importante não só para ver se realmente respondeu ao tratamento, mas, sobretudo, para queimar lesões que sobraram e que podem causar dor, agora provavelmente menos inflamadas e com maior chance de sumir. Esta segunda laparoscopia é frequentemente realizada em nosso serviço e em vários outros, assim não é um procedimento exclusivamente proposto para as pacientes que estão no trabalho.

Os pedacinhos de lesões e de endométrio colhidos ficarão armazenados no freezer e serão todos juntos enviados para análise no laboratório. Será estudado o *índice de proliferação celular* para saber se a doença está em atividade. Marcadores de atividade da doença, tais como metalotioneína, P 63, metaloprotease e inibidor tecidual de metaloprotease também serão dosados no mesmo material.

Para sabermos se a endometriose respondeu, também faremos dosagens de algumas substâncias que indicam isso, como o CA-125 e CA19-9. Estas dosagens serão feitas no sangue, como você já foi esclarecida em outro Termo de Consentimento, e estamos também propondo realizar as mesmas dosagens no líquido que fica dentro da barriga, que pode ser colhido durante a laparoscopia, e que você nada sentirá.

3. Os desconfortos e riscos esperados:

Os riscos da laparoscopia estão descritos no Termo específico que tem que ser assinado para a sua realização e ele estará anexado a este.

As biópsias do endométrio dentro do útero ou fora dele (que é a lesão da endometriose) têm como principal risco a perfuração do útero e, mais raramente pode ter infecção da cavidade uterina ou um pequeno sangramento. Estes riscos são pequenos. Não há nenhum risco em se colher o líquido da barriga.

Como os procedimentos serão todos realizados sob anestesia, não há nenhum desconforto devido a eles, e são procedimentos rápidos que não aumentam o tempo de cirurgia.

4. Formas de ressarcimento e indenização:

Não haverá recompensa financeira para os pacientes que participarem do estudo. Porém o preço dos medicamentos para tratamento da endometriose é alto e nem todos eles são fornecidos pelo SUS. Todos os medicamentos utilizados neste estudo para o seu tratamento da endometriose serão fornecidos de graça.

Quanto à indenização, esclarecemos que se trata de um projeto sem financiamento externo e que será desenvolvido com recursos próprios da instituição. Assim sendo, não há uma previsão de seguro para cobertura de indenização. Neste sentido, este projeto não se diferencia dos outros que não contam com financiamento externo, e que ainda assim, são regularmente desenvolvidos sob responsabilidade do pesquisador e da Instituição correspondente. Entretanto, em nenhum momento desconsidera-se o direito da paciente obter indenização por eventuais danos que julgar pertinente.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de _____.

Mariana Kefalás Oliveira
Pesquisadora Responsável
CRM/SP 99.899

Fone para contato: (16) 9136 8828 ou (16) 602 2815

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____,
RG Nº _____, abaixo assinada, tendo sido devidamente esclarecida sobre todas as condições que constam no documento “ESCLARECIMENTOS AO SUJEITO DA PESQUISA”, de que trata o Projeto de Pesquisa intitulado “Efeitos do Sistema intra-uterino de levonorgestrel sobre o endométrio tópico e ectópico de pacientes com endometriose” que tem como pesquisador responsável a Sra. Mariana Kefalás Oliveira, especialmente no que diz respeito ao objetivo da pesquisa, aos procedimentos que serei submetida, aos riscos e aos benefícios, à forma de ressarcimento no caso de eventuais despesas, bem como a forma de indenização por danos decorrentes da pesquisa, declaro que tenho pleno conhecimento dos direitos e das condições que me foram assegurados, a seguir relacionados:

1. A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e de outras situações relacionadas com a pesquisa e o tratamento a que serei submetido;
2. A liberdade de retirar o meu consentimento e deixar de participar do estudo, a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo à continuidade do meu tratamento;
3. A segurança de que não serei identificada e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada a minha privacidade;
4. O compromisso de que me será prestada informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar a minha vontade de continuar dele participando;
5. O compromisso de que serei devidamente acompanhada e assistida durante todo o período de minha participação no projeto, bem como de que será garantida a continuidade do meu tratamento, após a conclusão dos trabalhos da pesquisa.

Declaro ainda, que concordo inteiramente com as condições que me foram apresentadas e que, livremente, manifesto a minha vontade em participar do referido projeto.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de _____.

Assinatura da paciente

ANEXO C - Contra-indicações para o uso do SIU-LNG de acordo com a última revisão da Organização Mundial de Saúde (World Health Organization, 2004)*:

Contra-indicações relativas:

1. Pós-parto com ou sem amamentação e incluindo pós-cesareana, menor que quatro semanas.
2. Trombose venosa profunda/ Embolia pulmonar atual.
3. Presença ou história de doença cardíaca isquêmica.
4. Enxaqueca com sintomas neurológicos focais.
5. Doença trofoblástica gestacional benigna.
6. Câncer mamário no passado e sem evidência de doença atual por cinco anos.
7. Câncer de ovário.
8. Risco aumentado de doença sexualmente transmissível, por exemplo, múltiplos parceiros ou parceiro que tem múltiplos parceiros.
9. Alto risco para HIV.
10. Hepatite viral ativa.
11. Cirrose hepática não compensada severa.
12. Tumores hepáticos benignos ou malignos.

* World Health Organization. Medical Eligibility Criteria for Contraceptives. 3rd ed. Geneva: WHO, 2004. 186p.

Contra-indicações absolutas:

1. Gravidez.
2. Sepses Puerperal.
3. Pós-aborto séptico.
4. Cavidade uterina deformada.
5. Sangramento vaginal inexplicado antes da avaliação.
6. Doença Trofoblástica Gestacional maligna.
7. Câncer cervical.
8. Câncer mamário atual.
9. Câncer de endométrio.
10. Miomatose uterina com distorção da cavidade uterina.
11. Doença inflamatória pélvica atual ou dentro dos últimos três meses.
12. Doenças sexualmente transmissíveis atual ou dentro dos últimos três meses.
13. Tuberculose prévia.

ANEXO D – Estadiamento laparoscópico da endometriose segundo os critérios propostos pela *American Society for Reproductive Medicine* (1997)

Estádio I (mínima)	1-5
Estádio II (leve)	6-15
Estádio III (moderada)	16-40
Estádio IV (grave)	16-40

Escores:
 Estadiamento: _____
 Obs.: _____
 Tratamento cirúrgico: _____
 Seguimento proposto: _____

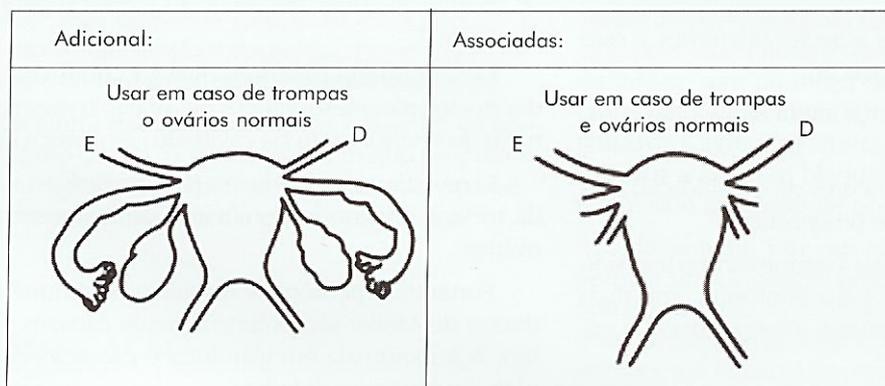
Endometriose		< 1cm	1-3cm	> 3cm
Peritônio	Superficial	1	2	4
	Profunda	2	4	6
	D. Superficial	1	2	4
Ovário	Profunda	4	16	20
	E. Superficial	1	2	4
	Profunda	4	16	20
Obliteração do fundo-de-saco posterior	Parcial	4		
	Completa	40		
Aderência		< 1/3 envolvido	1/3-2/3 envolvidos	> 2/3 envolvidos
Ovário	D. velamentosa	1	2	4
	Densa	4	8	16
	E. velamentosa	1	2	4
	Densa	4	8	16
Trompa	D. velamentosa	1	2	4
	Densa	4*	8*	16
	E. velamentosa	1	2	4
	Densa	4*	8*	16

*Se as fímbrias tubárias estiverem totalmente envolvidas por aderências, mude o escore para 16

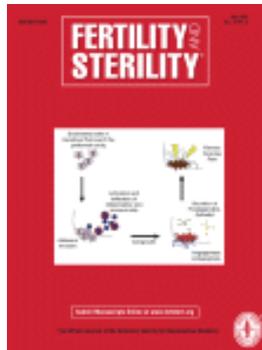
Porcentagem de implantes:

- Lesões vermelhas (lesões claras, vermelhas, rosadas, em chama, vesículas): _____ %
- Lesões brancas (brancas, amareladas, marrons, defeitos peritoneais): _____ %
- Lesões pretas (pretas, depósito de hemossiderina e azuis): _____ %

Endometriose Adicional: _____ Patologias Associadas: _____



ANEXO E – Correspondência publicada referente ao artigo original 1



The levonorgestrel-releasing intrauterine system and endometriosis staging

Pages 1231-1234

Mariana Kefalás Oliveira Gomes, Rui Alberto Ferriani, Júlio Cesar Rosa e Silva, Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva, Carolina Sales Vieira and Francisco José Cândido dos Reis

The levonorgestrel-releasing intrauterine system and endometriosis staging

This study aims to determine whether the levonorgestrel-releasing intrauterine system can influence American Society for Reproductive Medicine endometriosis staging scores, as assessed through second-look laparoscopies, and to compare the results with those obtained with a GnRH agonist. Both treatments reduced the extent of pelvic endometriotic lesions in patients with chronic pelvic pain. (*Fertil Steril*® 2007;87:1231–4. © 2007 by American Society for Reproductive Medicine.)

It has been shown that the levonorgestrel-releasing intrauterine system (LNG-IUS) is a viable therapeutic option for the treatment of pelvic pain in patients with endometriosis (1–3). The drugs previously used to treat such pain included progestagens (such as danazol and gestrinone), which have an antiestrogen effect, as well as drugs that induce pseudomenopause (e.g., GnRH agonists) or pseudopregnancy (e.g., combined oral contraceptives). Although effective, most of these options have been associated with systemic side effects that can affect treatment adherence and preclude long-term use. In addition, the need for repeated or regular administration also compromises treatment adherence and therefore efficacy.

The LNG-IUS release of levonorgestrel (a 19-C progestogen) into the uterine cavity restricts its effects almost exclusively to within the endometrium, where the high concentrations of levonorgestrel induce atrophy and pseudodecidualization (4, 5). It is well established that LNG-IUS treatment reduces the chronic pelvic pain accompanying endometriosis. However, only one observational, noncomparative study, in which patients were treated with the LNG-IUS for 6 months, has shown a favorable alteration in the staging of endometriosis (6). Therefore, a randomized, controlled clinical study was conducted to investigate the efficacy of 6 months of LNG-IUS treatment in the symptomatic relief of endometriosis, as well as the posttreatment changes in the laparoscopic staging of the disease, and to compare the results to those obtained after 6 months of treatment with a GnRH agonist (GnRHa).

Twenty-two female patients ages 18 to 40 years were included in this controlled clinical study, which was conducted from February 2003 to May 2005. All participating patients were under treatment at the pelvic pain clinic of a

university hospital. Initial inclusion criteria were having laparoscopically and histologically confirmed endometriosis (made 3 months before enrollment in the study) and presenting chronic pelvic pain that was cyclic. In addition, the visual analog scale (VAS), which consists of subjective evaluation of pain on a scale from 0 to 10 (0 being no pain and 10 being the most severe pain), was applied during the pretreatment phase, and only those patients scoring ≥ 3 were included in the study. All subjects gave written informed consent, and the study protocol was approved by the institutional review boards of the university. All of the patients had been having regular menstrual periods (at 25- to 35-day intervals) for ≥ 3 months before entering the study, had not used any hormonal therapy for at least 3 months before the study, and had not taken long-acting progestins or GnRHa therapy within the preceding 9 months. None of the patients had been breastfeeding or had been pregnant during the 3 months preceding the study, and none had a history of osteoporosis, coagulation disorders, or contraindications to the LNG-IUS as defined by the World Health Organization. A computer-generated system of sealed envelopes was used to randomly allocate the patients to receive 6 months of treatment with an LNG-IUS (Mirena; Schering Oy, Helsinki, Finland) or 6 months of treatment with a GnRHa (Lupron depot 3.75 mg; TAP Pharmaceuticals, Lake Forest, IL), the latter administered in 6 doses (1 ampule IM every 28 ± 3 days). Each group initially consisted of 11 patients. The LNG-IUS was inserted or GnRHa treatment was initiated within the first 7 days of the menstrual cycle. Patients were instructed to use no medication other than that provided during the study. Follow-up visits were scheduled every 28 ± 3 days after initiation of treatment to have at least six completed visits during the study period.

Pain was evaluated by comparing the mean VAS score recorded each month with that registered in the month before the study outset. In addition, the patients recorded the daily occurrence and intensity of their pain in a VAS-based pain diary (3). The score was recorded in the diary by marking a single point along a 10-cm line. The monthly VAS-based pain diary score was calculated as the sum of

Received June 8, 2005; revised and accepted November 8, 2006.
The levonorgestrel-releasing intrauterine system (Mirena) and GnRH-agonist ampules were provided free of charge by Schering, São Paulo, Brazil.

Reprint requests: Rui Alberto Ferriani, M.D., Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, Avenida Bandeirantes, 3900 8º Andar, Ribeirão Preto-SP, Brasil (FAX: 16-3633-9633; E-mail: raferriani@fmp.usp.br).

the daily scores divided by the number of days in each observation period.

In the baseline laparoscopy, as well as in the second-look laparoscopy, the disease was staged, with video documentation, according to the criteria established by the American Society for Reproductive Medicine (ASRM) in 1997 (7). The pretreatment and posttreatment clinical evaluations and surgical procedures were performed by different physicians. Therefore, those performing the second-look procedures and evaluations were blinded regarding the pretreatment endometriosis staging.

The GraphPad Prism 2.01 program (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) was used for the statistical analysis, using Student's *t* test for the quantitative variables with normal distribution. For qualitative variables, Fisher's exact test was used. Values at the time of insertion of the IUS were compared with those at 6 months after insertion using paired Student's *t* test or the Wilcoxon test, as appropriate. Values of $P < .05$ were considered statistically significant.

Of the 22 female patients initially selected for study, 4 (1 in the LNG-IUS group and 3 in the GnRHa group) were excluded for having refused to be submitted to the second-look laparoscopy. There were no statistically significant differences between the two groups with respect to baseline data, including age, stage of endometriosis, smoking habits, parity, and use of medication before the study outset. The mean age of the remaining subjects was 29.2 ± 5.5 and 32.6 ± 5.3 years, respectively, in the LNG-IUS and GnRHa groups. In the LNG-IUS group, three patients scored between 3 and 7 on the pretreatment VAS, whereas seven patients scored >7 . In the GnRHa group, six scored between 3 and 7, whereas two scored >7 , on the pretreatment VAS. The difference between the two groups was not statistically significant ($P = .0698$).

After 6 months of treatment, the ASRM stage was lower in 6 (60%) of the 10 LNG-IUS group patients and in 3 (37.5%) of the 8 GnRHa group patients ($P = .1698$). The pretreatment and posttreatment ASRM stages are shown in Table 1. The mean ASRM scores decreased from 34 ± 27.9 to 21.3 ± 20.5 in the LNG-IUS group ($P = .1612$) and from 42.4 ± 30.3 to 30.8 ± 22.8 in the GnRHa group ($P = .0546$), with no intergroup difference. Only one patient in each group presented an increase in the ASRM score after treatment.

Mean pretreatment VAS pain scores were 7.9 ± 1.2 in the LNG-IUS group and 6.5 ± 1.1 in the GnRHa group. A significant reduction in this score was achieved after 6 months of treatment: 2.1 ± 2.7 ($P < .0001$) and 0.4 ± 1.1 ($P < .0001$), respectively. There was no intergroup difference. Pain was found to have been reduced in all patients, in those who presented improved staging in the second-look laparoscopy, as well as in those who did not. Among the patients who presented such an improvement, the mean

TABLE 1

Laparoscopic staging of endometriosis according to ASRM criteria before and after 6 months of treatment with the LNG-IUS or a GnRHa in female patients with chronic pelvic pain.

Group	Baseline stage (n)	Second-look stage (n)
LNG-IUS Improvement in 6 (60%) of the 10	Mild (3)	Minimal (2) Mild (1)
	Moderate (3)	Mild (1) Moderate (1) Severe (1)
	Severe (4)	Mild (1) Moderate (2) Severe (1)
GnRHa Improvement in 3 (37.5%) of the 8	Mild (1)	Moderate (1)
	Moderate (3)	Mild (2) Moderate (1)
	Severe (4)	Moderate (1) Severe (3)

Gomes. The LNG-IUS and endometriosis staging. *Fertil Steril* 2007.

VAS pain score decreased from 8.1 ± 1.2 to 2.1 ± 2.9 in the LNG-IUS group ($P = .0313$) and from 5.7 ± 0.6 cm to 1 ± 1.7 cm ($P = .25$) in the GnRHa group. Among the patients who presented no improvement in staging, the mean VAS pain score decreased from 7.5 ± 1.3 to 2 ± 2.8 ($P = .125$) in the LNG-IUS group and from 7 ± 1 to 0 in the GnRHa group. All posttreatment VAS pain scores were <3 , with the exception of those reported by three patients in the LNG-IUS group, who presented VAS pain scores between 3 and 7 after 6 months of treatment. For all three of those patients, the endometriosis was staged as mild or minimal in the second-look laparoscopy.

To the best of our knowledge, this is the first randomized study comparing the LNG-IUS with a GnRHa and evaluating the effect of these two drugs on the laparoscopic staging of endometriosis and on endometriosis-associated chronic pelvic pain. Despite the fact that we found no significant reduction in the ASRM endometriosis score in the second-look laparoscopy, 60% of the patients in the LNG-IUS group presented altered (lower) disease stage, compared with 37.5% of those in the GnRHa group. This finding is corroborated by the results of uncontrolled clinical trials, in which significant improvements in staging after the isolated use of a GnRHa (8) or of the LNG-IUS (6) were found. It is likely that the lack of a statistically significant difference in the present study is related to the small size of the study sample. The reduction in endometriosis score and staging in the patients treated with the

GnRHa is probably attributable to the intense antiestrogen effect of the drug (9) because endometriosis is known to be an estrogen-dependent disease (10), a fact that would imply inhibition of the proliferation of ectopic endometrial tissue. Therefore, the GnRHa was shown to be efficacious in decreasing endometriosis proliferation by increasing apoptosis (11), which is typically minimal in endometriotic tissue. It must be borne in mind that the clinical treatment, whether with the LNG-IUS or with the GnRHa, was not administered in isolation. Therein lies the importance of testing a new treatment modality (the LNG-IUS) in comparison with a classic treatment (a GnRHa). All of the patients had previously undergone laparoscopy, which, although primarily diagnostic, had a therapeutic function (cauterization of the peritoneal lesions and excision of the deeper endometriotic lesions), thereby influencing the staging in the second-look laparoscopy.

No correlation has been found between endometriosis stage and the intensity of the accompanying pelvic pain (12). Therefore, we cannot infer that the clinical improvement in the level of pelvic pain in endometriosis patients treated with the LNG-IUS is directly related to a reduction in the number and extent of the lesions. However, production of some serum markers, such as CA-125, that seem to be related to endometriosis progression is reduced by the use of LNG-IUS (13), suggesting that the system has an effect on endometriosis lesions.

The exact mechanism by which the LNG-IUS influences the course of endometriosis remains unclear. According to Critchley et al. (14), the LNG-IUS releases high doses of levonorgestrel into the uterine cavity, promoting rapid decidualization of the endometrial stroma. In addition, it has been shown that the LNG-IUS induces a decrease in and subsequent blockage of DNA synthesis and mitotic activity (15), suggesting that progesterone plays a moderating role in the endometrial proliferation. Such moderation was also observed by Vereide et al. (16), who found that the LNG-IUS promotes endometrial apoptosis by reducing expression of the Bcl-2 gene, which has an antiapoptotic effect. Although the effect of levonorgestrel is primarily local, it is also found in the peritoneal fluid of its users (17). Therefore, the effects that levonorgestrel has on the normal endometrium might also be seen in the ectopic endometrium, which could explain the reduced disease progression.

In this study, we found that treatment with the LNG-IUS and with the GnRHa provided similar results, presenting a tendency toward improvement in the endometriosis stage, as assessed after 6 months in the second-look laparoscopy. Nevertheless, the potential influence of the surgical intervention performed during the initial laparoscopy must be taken into consideration. In addition, it is of note that reduced pelvic pain was not found to be necessarily related to altered ASRM score or endometriosis surgical staging. It is possible that further studies of these drugs, involving

larger patient samples, would show a statistically significant improvement in the laparoscopic staging of endometriosis. However, the LNG-IUS can be used for longer periods and is more cost-effective, making it a more attractive option for the treatment of chronic pelvic pain caused by endometriosis.

Mariana Kefalás Oliveira Gomes, M.D.
Rui Alberto Ferriani, M.D.
Júlio Cesar Rosa e Silva, M.D.
Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva, M.D.
Carolina Sales Vieira, M.D.
Francisco José Cândido dos Reis, M.D.

Department of Gynecology and Obstetrics, University of São Paulo at Ribeirão Preto School of Medicine, Ribeirão Preto, Brazil

REFERENCES

1. Vercellini P, Frontino G, De Giorgi O, Aimi G, Zaina B, Crosignani PG. Comparison of a levonorgestrel-releasing intrauterine device versus expectant management after conservative surgery for symptomatic endometriosis: a pilot study. *Fertil Steril* 2003;80:305-9.
2. Lockhat FB, Emembolu JO, Konje 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.
3. Petta CA, Ferriani RA, Abrão MS, Hassan D, Rosa e Silva JC, Podgac 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.
4. Silverberg SG, Haukkamaa M, Arko H, Nilsson CG, Luukkainen T. Endometrial morphometry of women during long term use of levonorgestrel intrauterine system. *Int Gynaecol Pathol* 1986;5: 235-41.
5. Maruo T, Laoag-Fernandez JB, Pakarinen P, Murakoshi H, Spitz IM, Johansson E. Use of a levonorgestrel intrauterine system on proliferation and apoptosis in the endometrium. *Hum Reprod* 2001;16: 2103-8.
6. Lockhat FB, Emembolu JO, Konje JC. The evaluation of the effectiveness of an intrauterine-administered progesterone (levonorgestrel) in the symptomatic treatment of endometriosis and in the staging of the disease. *Hum Reprod* 2004;19:179-84.
7. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril* 1997;67:817-21.
8. Mettler L, Steinmüller H, Schachner-Wunschmann E. Experience with a depot GnRH-agonist (Zoladex) in the treatment of genital endometriosis. *Hum Reprod* 1991;6:694-8.
9. Casper RF. Clinical uses of gonadotropin-releasing hormone analogues. *CMAJ* 1991;144:153-8.
10. Bruner KL, Matrisian LM, Rodgers WH, Gorstein F, Osteen KG. Suppression of matrix metalloproteinases inhibits establishment of ectopic lesions by human endometrium in nude mice. *J Clin Invest* 1997;99:2851-7.
11. Meresman GF, Bilotas MA, Lombardi E, Tesone M, Sueldo C, Baranao RJ. Effect of GnRH analogues on apoptosis and release of interleukin-1beta and vascular endothelial growth factor in endometrial cell cultures from patients with endometriosis. *Hum Reprod* 2003;18:1767-71.
12. Whiteside JL, Facone T. Endometriosis-related pelvic pain: what is the evidence? *Clin Obstet Gynecol* 2003;46:824-30.
13. Rosa e Silva ACJS, Rosa e Silva JC, Nogueira AA, Petta CA, Abrão MA, Ferriani RA. The levonorgestrel-releasing intrauterine device

- reduces CA-125 serum levels in patients with endometriosis. *Fertil Steril*. In press.
14. Critchley HO, Wang H, Jones RL, Kelly RW, Drudy TA, Gebbie AE, et al. Morphological and functional features of endometrial decidualization following long-term intra-uterine levonorgestrel delivery. *Hum Reprod* 1998;13:1218–24.
 15. Bergeron C. Morphological changes and protein secretion induced by progesterone in the endometrium during the luteal phase in preparation for nidation. *Hum Reprod* 2000;15 Suppl 1:119–28.
 16. Verside AB, Kaino T, Sager G, Orbo A, Scottish Gynaecological Clinical Trials Group. Bcl-2, BAX, and apoptosis in endometrial hyperplasia after high dose gestagen therapy: a comparison of responses in patients treated with intrauterine levonorgestrel and systemic medroxyprogesterone. *Gynecol Oncol* 2005;97:740–50.
 17. Lokhat FB, Emembolu JE, Konje JC. Serum and peritoneal fluid levels of levonorgestrel in women with endometriosis who were treated with an intrauterine contraceptive device containing levonorgestrel. *Fertil Steril* 2005;83:398–404.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)