

*JOSÉ AUGUSTO HART MADUREIRA FILHO*

*COMPARAÇÃO ENTRE TÉCNICAS MORFOMÉTRICAS  
APLICADAS AO EPITÉLIO VAGINAL APÓS USO  
PROLONGADO DO CONTRACEPTIVO INJETÁVEL  
ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA DE DEPÓSITO*

*CAMPINAS*

*2001*

***JOSÉ AUGUSTO HART MADUREIRA FILHO***

***COMPARAÇÃO ENTRE TÉCNICAS MORFOMÉTRICAS  
APLICADAS AO EPITÉLIO VAGINAL APÓS USO  
PROLONGADO DO CONTRACEPTIVO INJETÁVEL  
ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA DE DEPÓSITO***

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação  
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade  
Estadual de Campinas, para a obtenção do título de  
Mestre em Ciências Médicas, área de Anatomia  
Patológica.*

***ORIENTADOR – PROF. DR. KONRADIN METZE.***

***CO-ORIENTADOR – PROF. DR. LUÍS GUILHERMO BAHAMONDES.***

***CAMPINAS***

***2001***

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

M267c

Madureira Filho, José Augusto Hart

Comparação entre técnicas morfométricas aplicadas ao epitélio vaginal após uso prolongado do contraceptivo injetável acetato de medroxiprogesterona de depósito / José Augusto Hart Madureira Filho. Campinas, SP: [s.n.], 2001.

Orientadores : Konradin Metze, Luís Guilherme Bahamondes  
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Processamento de imagens técnicas digitais. I. Konradin Metze.  
II. Luís Guilherme Bahamondes. III. Universidade Estadual de  
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

# Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

---

**Orientador: Prof. Dr. Konradin Metze**

---

---

## **Membros:**

---

**1.**

---

**2.**

---

**3.**

---

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, Área de Concentração em Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

**Data:**

## ***DEDICATÓRIA***

*Ao Dr. Madureira e D. Nilza, meus pais,  
pelos ensinamentos de sempre buscar novos caminhos.*

*A minha esposa Mônica,  
pelo incentivo a esta procura.*

*A meus filhos Juliana, José Augusto, Soane, Pedro e Victória,  
por serem as forças que movem e motivam esta caminhada.*

## *AGRADECIMENTOS*

---

A realização deste estudo só foi possível graças à colaboração direta ou indireta de muitas pessoas. Manifesto minha imensa gratidão a todos e de forma particular:

À Profa. Dra. Miriam Aparecida da Silva Trevisan, pela orientação, apoio, confiança e a forma paciente e dedicada de transmitir seus conhecimentos e experiências; sem a sua participação, esta tese não teria acontecido.

Ao Prof. Dr. Luís Guilherme Bahamondes, co-orientador, pela amizade, confiança, apoio, discussões e sugestões sempre pertinentes e enriquecedoras, que muito contribuíram para o desenvolvimento da nossa pesquisa.

Ao Prof. Dr. Konradin Metze, orientador, pela atenção, motivação científica e pelo auxílio no levantamento dos dados estatísticos.

Às Dras. Kazue Panetta e Júlia Tambascia, pela chance do aprendizado de forma universal e na sua mais ampla complexidade.

Ao Dr. Sérgio Bruno Barbosa, pela oportunidade de participar do estágio na área de Patologia do Trato Genital Feminino, de onde surgiu a semente da proposição de uma tese, que culminou neste trabalho.

Ao Aparecido Paulo de Moraes, Geralda Domiciana Pádua, Maria José Silvestre e equipe do Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas, pelo carinho, respeito, amizade e, principalmente, pela convivência harmoniosa e cooperativa, importantes para a realização deste trabalho.

Ao biólogo Rogério Augusto Paes, do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, pelo auxílio na execução dos testes de análise de imagem, além do apoio logístico e solidário nas diversas etapas do desenvolvimento do projeto.

Aos amigos do Serviço de Informática da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Evaldo Silva, Ernani, e ao Dr. Fernando Oliveira, pelas instruções e orientações técnicas sempre pertinentes.

Ao Ismael Vêncio e à Lea de Magalhães Simões, pelo apoio nas etapas de corte, montagem e coloração das lâminas para este estudo.

À Equipe de Citologia do Centro de Assistência Integral à Saúde da Mulher – Caism da Universidade Estadual de Campinas, em especial para Jamira Catharino, José Carlos Pissolito, José Maria, Luiz Borges, Rivaldo Pinheiro, pela atenção e treinamento em citologia, iniciação fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Anderson Souza, Alex Souza, João Neves e Paulo Sérgio Souza, representantes e técnicos da Carl Zeiss, pelo apoio e aconselhamento técnico sempre que solicitado, quando da utilização do KS na análise das imagens que compuseram este trabalho.

À Márcia de Almeida Queiroz e Rogério Marcon, do Laboratório do CEB, pela atenção e colaboração nas consultas técnicas relativas a equipamentos neste trabalho.

Ao Wagner José da Silva, técnico do Audiovisual, pela sua competente atuação na confecção dos slides deste trabalho.

À Maria Rita B. Frezzarin, pela atenção e primorosa correção de português.

À Elisabeth Justi Rodrigues e Maria do Carmo Machado da Silva pelo apoio e auxílio, em todos os momentos necessários desta trajetória.

Aos colegas do Departamento de Anatomia Patológica, pela cooperação sempre demonstrada.

Agradecimento especial ao Departamento de Anatomia Patológica que me acolheu e disponibilizou todos os seus recursos para a conclusão deste trabalho.

Às pacientes do Cemicamp, meio e fim deste estudo.

*Nunca é tarde.*

*Cada manhã, o começo.*

*Cada começo, um desafio.*

*Cada desafio, novo aprendizado.*

*Nada sei...*

*Nunca é tarde.*

**(GHERÉ TETHÊLES)**

*Olha-me.*

*Ver-te em mim.*

*Sê minha vontade, minha dúvida, meu medo.*

*Ver-te na minha glória, no meu fracasso.*

*Acha-te no outro.*

*Serás melhor.*

**(GHERÉ TETHÊLES)**

## *LISTA DE ABREVIATURAS*

---

AMPD	Acetato de medroxiprogesterona de depósito.
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida.
CCD	Change compled device.
DNA	Ácido desoxirribonucléico.
DST	Doença sexualmente transmissível.
HIV	Human immunodeficiency virus
pH	Quantificação da acidez ou alcalinidade de uma solução .
RNA	Ácido ribonucléico
SIV	Símios immunodeficiency virus.

## *LISTA DE TABELAS*

---

	<i>PÁG.</i>
<b>Tabela 1:</b> Características demográficas e antropométricas de usuários e não usuários de AMPD.....	35
<b>Tabela 2:</b> Medidas das espessuras do epitélio vaginal das 40 mulheres, comparando-se os dos métodos de leitura.....	36
<b>Tabela 3:</b> Valores médios das espessuras do epitélio vaginal avaliados pelos dois métodos de leitura.....	37

## *LISTA DE FIGURAS*

---

	<i>PÁG.</i>
<b>Figura 1:</b> Corte de epitélio vaginal, com indicações dos cinco locais de medida com o uso de micrômetro ocular (Hematoxilina-osina, 2,5x).....	30
<b>Figura 2:</b> Corte de epitélio vaginal, com indicações dos locais de medida para seleção posterior pelo programa KS400 (Hematoxilina-eosina, 10x).....	32

	<i>PÁG.</i>
<b>Gráfico 1:</b> Comparação entre as espessuras maiores medidas pelo método ocular e KS400.....	38
<b>Gráfico 2:</b> Comparação entre as espessuras menores medidas pelo método ocular e KS400.....	39
<b>Gráfico 3:</b> Comparação entre as médias finais das espessuras medidas pelo método ocular e KS400.....	40
<b>Gráfico 4:</b> Poder estatístico vs diferença a ser detectada nas medidas de maior espessura.....	42
<b>Gráfico 5:</b> Poder estatístico dos cálculos baseados em dados obtidos, KS400 e ocular milimetrada, nas medidas de menor espessura.....	43
<b>Gráfico 6:</b> Comparação do poder estatístico em relação à ‘média final’ entre os grupos.....	44

	<i>PÁG.</i>
<b>Imagem 1:</b> Programa KS400, mostrando os passos pré-estabelecidos de uma ‘macro’.....	65
<b>Imagem 2:</b> Tela do computador que mostra área com artefato, que deverá ser excluída do processo, por ser imprópria para à medição.....	66
<b>Imagem 3:</b> A ‘Macro’ avança e mostra a execução da função “dislev”, que favorece demarcar regiões na imagem, excluindo defeitos. (item 9).....	67
<b>Imagem 4:</b> Passo seqüente, o histograma que permite a segmentação (binarização).....	68
<b>Imagem 5:</b> Mostra a binarização da imagem, que é a sua transformação em linguagem computacional ou de máquina. Reduz a imagem ao pixel, sua forma mais primitiva. Abaixo, tabela para aonde os valores numéricos migram automaticamente, a cada operação executada pela ‘macro’ .....	69



*RESUMO*

O acetato de medroxiprogesterona de depósito (AMPD) é um contraceptivo de depósito, de absorção lenta, extensamente usado no mundo. Tem sido sugerido que esta droga possa alterar a mucosa vaginal e assim poderia aumentar o risco de transmissão de doenças sexualmente transmissíveis, facilitando, por exemplo, a aquisição do vírus da imunodeficiência humana (HIV).

Em experiências com animais, foi mostrado que injeções de AMPD provocavam uma atrofia no epitélio vaginal, ocorrendo um aumento na incidência de infecções pelo vírus da imunodeficiência do símio (SIV). Estudos clínicos são contraditórios. MAUCK *et al.*, (1998) realizaram um estudo prospectivo no qual 16 mulheres submeteram-se à biópsia vaginal depois de três meses da administração de uma dose de AMPD e os resultados mostraram que não houve mudança na espessura do epitélio vaginal. MILLER *et al.*, (2000) mostrou que o número de camadas de células no epitélio estava significativamente reduzido, a espessura epitelial estava diminuída tanto quanto a camada de glicogênio, depois de 6 meses de uso do AMPD, o que poderia prejudicar a barreira epitelial vaginal para infecções.

A diferença entre estes dois estudos poderia ser em razão das características individuais de ambos, tais como, escolha das pacientes ou, simplesmente, em virtude dos métodos morfométricos usados. Para tornar claro o último tópico, comparam-se dois métodos diferentes de avaliação morfométrica da espessura do epitélio vaginal de mulheres, depois de uso prolongado de AMPD.

Vinte usuárias de 150 mg AMPD, como um método anticoncepcional utilizado durante pelo menos 2 anos e nenhum mais de três anos e 20 não usuárias de qualquer hormônio, foram pareadas para participarem do estudo. Uma biópsia foi coletada a direita ou à esquerda da parede vaginal, fixada em uma solução de formaldeído aquosa a 4% e foi incluída em parafina. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina. A avaliação morfométrica foi feita da seguinte forma: 1) morfometria manual: usando uma ocular milimetrada, tendo os observadores, medidas a menor e a maior espessuras do epitélio, como também as espessuras de três pontos escolhidos ao acaso; 2) morfométrico interativo: Imagens do epitélio vaginal foram digitalizadas pelo sistema KS400. Então uma imagem binária, contrastando o epitélio vaginal, foi selecionada e os valores, menor, maior e três

áreas aleatoriamente escolhidas, eram automaticamente determinadas por um algoritmo especial, escrito para este propósito.

Para análise final, foi definida a variável ‘média final’ como a média aritmética da maior medida, menor medida e das três medidas aleatórias.

Para comparar a qualidade das medidas dos dois métodos calculam-se as distribuições de poder do teste dos dois métodos. O poder do teste é definido como a probabilidade do teste estatístico aplicado detectar diferenças existentes. O poder do teste depende: da diferença a ser detectada, do desvio- padrão das distribuições e do número de elementos por grupo. Os resultados mostraram que as avaliações morfométricas, baseadas em morfometria computadorizada interativa são superiores às avaliações baseadas em avaliação manual, através de ocular milimetrada, em relação ao poder do teste pareado, para o estudo dos grupos.

Na nossa comparação entre os dois métodos, baseada na simulação dos valores em ambos os grupos independentes, nós poderíamos mostra-se a superioridade do poder de teste baseado no cálculo feito por morfometria interativa em imagens digitalizadas. Em resumo, estudos baseados em morfometria interativa de imagens digitalizadas podem revelar mais poder do teste e prover resultados mais fidedignos que investigações baseadas em método micrométrico ocular manual.

	<b>PÁG.</b>
<b>RESUMO</b> .....	<i>xv</i>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	18
1.1. AMPD – Acetato de medroxiprogesterona de depósito.....	19
1.1.1. Efeitos adversos do AMPD.....	19
1.1.2. Estudos prospectivos em mulheres com biópsias de vagina.....	20
1.2. Morfometria.....	21
1.2.1. Definição.....	21
1.2.2. História.....	22
1.2.3. Análise de imagem.....	22
1.2.4. Representação de imagens digitais.....	23
1.2.5. O sistema KS.....	24
<b>2. OBJETIVO</b> .....	25
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	27
3.1. Casuística.....	28
3.2. Procedimentos.....	29
3.2.1. Coleta da biópsia da vagina.....	29
3.2.2. Processamento da biópsia vaginal.....	29
3.2.3. Morfometria feita com o uso de micrômetro ocular.....	30
3.2.4. Morfometria interativa.....	31
3.3. Análise estatística.....	32

<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
4.1. Resultados gerais.....	35
4.2. Correlações entre os valores obtidos pelos dois métodos.....	38
4.3. Poder estatístico do Test t de Student (pareados).....	41
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>45</b>
5.1. Pareamento entre os dois grupos.....	46
5.2. Espessuras do epitélio vaginal.....	46
5.3. Métodos de medidas de espessura.....	51
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>54</b>
<b>7. SUMMARY.....</b>	<b>56</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>59</b>
<b>9. APÊNDICE.....</b>	<b>64</b>



***INTRODUÇÃO***

## **1.1. AMPD - ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA DE DEPÓSITO**

O uso do Acetato de Medroxiprogesterona de Depósito (AMPD) tem causado ao longo dos anos, uma polêmica não só por suas propriedades farmacológicas, químicas e biológicas, mas também pela aplicação em muitas mulheres. Somente nos Estados Unidos, existem aproximadamente três milhões de mulheres usuárias (MILLER *et al.*, 2000) e em algumas regiões da Ásia o número de usuárias chega a 40% (NAGACHINTA *et al.*, 1997).

O AMPD ( $17\alpha$ -acetoxy- $6\alpha$ -methyl-pregn4-ene-3.20-dione) foi desenvolvido em 1958 e teve seu primeiro uso clínico para o tratamento de aborto e endometriose. É apresentado como uma suspensão de microcristais e administrado na dose de 150 mg, por meio de injeção intramuscular profunda a cada trimestre, proporcionando uma prolongada duração na circulação sanguínea (RINGROSE, 1972; FRASER & WEISBERG, 1981; SAID, S.; ORNAR, K.; KOETSAWANG, S; et al. 1986; HILD-PETITO, et al., 1998; MILLER, et al., 2000). Seu efeito contraceptivo resulta principalmente da inibição da ovulação. Além disso, o AMPD aumenta a viscosidade do muco cervical, evitando assim a penetração do espermatozóide; provoca atrofia endometrial e diminuição da motilidade da tuba uterina (KAUNITZ, et al., 1994).

Devido às comodidades oferecidas, o uso de contraceptivos de longa duração tem forte atração para muitas mulheres (SCHWALLIE & ASSENZO, 1973); são drogas de alta eficácia, igual, ou melhor, que as combinações dos contraceptivos orais; têm longa ação, com uma única injeção; são de simples administração; não há esquecimento, conforme ocorre com a pílula e seu uso, independe do coito.

### **1.1.1. Efeitos adversos do AMPD**

Alterações menstruais ocorrem na maioria das mulheres que usam AMPD. O somatório dos efeitos diretamente relacionados ao uso deste contraceptivo e a interação do AMPD com outros agentes progestacionais, aumentam a supressão endometrial e conseqüentemente a atrofia se manifesta como sangramento irregular e “spotting”. Estes efeitos são relativamente comuns durante os primeiros meses de uso. Porém, com a continuação do método, a frequência e duração desses episódios diminuem e a amenorréia torna-se mais comum (CULLINS, 1996).

Além disso, estudos realizados por MARX *et al.*, (1996) e HILD-PETITO *et al.*, (1998), utilizando a administração de implantes subcutâneos com progesterona ou injeções de AMPD em macacas rhesus “in vivo” e demonstraram a diminuição da espessura do epitélio vaginal dos símios. Um epitélio atrófico pode permitir que mais vírions atravessem através dele ou pode expor mais facilmente células mais susceptíveis (como as células de Langerhan’s e as células dendríticas) (SOTO-RAMIREZ, *et al.*, 1996). Estes estudos evidenciaram claramente um aumento de infecções por imunodeficiência (SIV), nos animais.

Esses resultados causaram uma preocupação sobre a possibilidade de um efeito semelhante em humanos, pois é conhecido que a progesterona endógena pode causar atrofia temporária do epitélio vaginal, aumentar o pH local, reduzir a quantidade de muco e aumentar sua viscosidade, diminuindo a sua resistência a infecções.

As mulheres usuárias de AMPD poderiam estar expostas a um maior risco de infecção de HIV, (MARX *et al.*, 1996; MARTIN *et al.*, 1998).

Entretanto, algumas publicações exploraram a associação entre o uso de contraceptivos hormonais injetáveis e o risco para adquirir infecção por HIV e outras DST (doença sexualmente transmissível), apresentando resultados conflitantes (FRASER & WEISBERG, 1981; REHLE *et al.*, 1992.; NAGACHINTA *et al.*, 1997; HILD-PETITO *et al.*, 1998; MILLER *et al.*, 2000).

### **1.1.2. Estudos prospectivos em mulheres com biópsias de vagina**

Em relação à atrofia do epitélio vaginal MAUCK *et al.*, (1998) publicaram um estudo prospectivo, no qual 16 mulheres submeteram-se a várias biópsias vaginais antes e depois de três meses da administração de uma dose de AMPD. Os resultados mostraram que não houve mudança na espessura do epitélio vaginal, nem mudanças no número de células de Langerhan’s.

Entre as 38 mulheres observadas no trabalho de MILLER *et al.*, (2000), durante 6 meses, houve redução significativa do estradiol no soro, em níveis de  $(99,9 \pm 9,3 \text{ pg/mL})$  para  $(26,6 \pm 1,6 \text{ pg/mL})$ ,  $P < 0,01$ ).

Segundo os autores, o número de camadas de células no epitélio estava significativamente reduzido de  $28,1 \pm 0,7$  a  $25,9 \pm 0,9$  ( $P=0,05$ ); a espessura epitelial diminuída de  $1,02 \pm 0,04 \text{ mm}$  para  $0,89 \pm 0,05 \text{ mm}$  ( $P=0,05$ ), tanto quanto a camada glicogênio-positiva de  $0,81 \pm 0,04 \text{ mm}$  para  $0,66 \pm 0,05 \text{ mm}$ , depois de 6 meses de uso do AMPD ( $P=0,05$ ).

Baseado nos resultados dos estudos de MAX *et al.*, (1996) e HILD-PETITO *et al.*, (1998), e nos seus próprios resultados, MILLER *et al.*, (2000), sugerem seguimento das pacientes ao longo de pelo menos dois anos, para avaliar uma possível redução da espessura do epitélio vaginal.

BAHAMONDES *et al.*, (2000) realizaram um estudo prospectivo por um período de quatro meses de junho a outubro de 1999 (do qual foram coletados os dados referentes à ocular milimetrada utilizados neste trabalho) avaliando um grupo de 20 mulheres sem uso de hormônio e 20 usuárias de AMPD por no mínimo de 2 anos e no máximo 3 anos e não encontraram atrofia significativa nas camadas de células do epitélio vaginal, em usuárias de AMPD.

Diversos métodos podem ser utilizados na medida da espessura de um tecido, como a morfometria por ocular, como nos trabalhos de Mauck, Miller e Bahamondes. A análise de imagens digitalizadas permitiu uma nova abordagem, com aumento da precisão.

## **1.2. MORFOMETRIA**

### **1.2.1. Definição**

Morfometria é o estudo das técnicas através das quais são mensurados caracteres relativos à forma e ao tamanho do objeto.

Segundo OBERHOLZER (1963), morfometria pode ser definida como; “Método de medir elementos estruturais nos compartimentos histológicos e citológicos, como partículas”(pág.171).

### **1.2.2. História**

A primeira análise morfométrica de uma célula parece ter sido realizada em hemácias por Antoni van Leeuwenhoek, no ano de 1674. Este trabalho pioneiro abriu caminho para que nos séculos posteriores fossem desenvolvidos métodos morfométricos cada vez mais sofisticados e precisos. (CALIARI, 1997).

A morfometria pode ser realizada mediante vários métodos, por exemplo, a técnica manual, em que se utiliza uma ocular milimetrada que é um instrumento na prática diária do patologista ou através de métodos mais sofisticados, como a análise de imagens digitais, necessitando-se de equipamentos mais sofisticados, como microscópios com adaptação para acoplagem de câmaras especiais, que capturam a imagem e de “software” específico para este fim. Estes métodos interativos de morfometria estão intimamente ligados à análise de imagem.

### **1.2.3. Análise de imagem**

O interesse em métodos de processamento de imagens digitais decorre de uma melhoria de informação visual para a interpretação humana.

No ano de 1920, foi utilizado o primeiro Sistema Bartlane para a análise de imagens digitalizadas que codificava cinco tons de cinza. Apenas nove anos depois, já era possível a codificação de quinze tonalidades de cinza.

Uma das aplicações técnicas deste sistema foi o melhoramento de imagens digitalizadas para jornais, enviadas através de cabo submarino de Londres a Nova Iorque. Em análise de imagens, esse processo se chama transformação radiométrica, em que se procura melhorar o contraste das imagens e realizar mudanças da escala de tons de cinza, com ampliações e reduções (GONZALES & WOODS, 2000).

Em 1964, o Jet Propulsion Laboratory (Pasadena, Califórnia), empregou técnicas de computação para o melhoramento de imagens produzidas por uma sonda espacial.

Nos últimos trinta e cinco anos, as técnicas foram se aperfeiçoando e hoje pode-se contar com equipamentos que codificam até duzentas e cinquenta e seis tonalidades de cinza.

Em Medicina, por exemplo, procedimentos interativos melhoram o contraste ou codificam os níveis de intensidade em cores, a isso se dá o nome de quantização da luminância das cores (GONZALES & WOODS, 2000).

Na década de 1980, surgiu a primeira geração de analisadores de imagens, capazes de mensurar a quantidade de células, outras estruturas e formas, por intermédio de um computador (CALIARI, 1997).

A medida é baseada na quantificação da unidade básica da imagem digitalizada, os pixels, abreviação de “picture element” (CALIARI, 1997).

Os programas interativos não se restringem somente à forma do objeto do estudo, mas são capazes de processar a densidade óptica, que se denomina densitometria. Padronizações para a densitometria estão concluídas ou em fase de elaboração para que os analisadores possam quantificar precisamente proteínas, hormônios, DNA, RNA e outras moléculas, com a vantagem de poder topografar nos tecidos, a distribuição destas substâncias (GONZALES & WOODS, 2000).

#### **1.2.4. Representação de imagens digitais**

A imagem digital, monocromática, pode ser interpretada por uma equação, a qual refere-se à função bidimensional de intensidade da luz, função logarítmica dos níveis de cinza,  $f(x, y)$ , onde  $x$  e  $y$  denotam as coordenadas espaciais e o valor que tem qualquer ponto  $(x, y)$  que é proporcional ao brilho, ou níveis de cinza, da imagem naquele ponto (GONZALES & WOODS, 2000). Pode ser também chamada de luminância. Visto dessa maneira, aparecerá uma série de picos em regiões com numerosas modificações do nível de brilho e regiões planas ou platôs em que os níveis de brilho variam pouco ou são constantes. Utilizando-se a convenção em que se atribui proporcional valor mais alto para áreas com maior brilho, fará com que a altura dos componentes de uma figura sejam proporcionais ao brilho correspondente na imagem.

Uma imagem digital é uma imagem  $f(x, y)$  discreta e quantizada tanto em coordenadas espaciais quanto em brilho. Uma imagem digital pode ser considerada como sendo uma matriz, cujos índices de linhas e de colunas identificam um ponto na imagem e o correspondente valor do elemento da matriz identifica o nível de cinza daquele ponto. Os elementos dessa matriz digital são chamados de elementos da imagem, elementos da figura, pixels ou pels, estes últimos são abreviações de “picture elements” (GONZALES & WOODS, 2000).

### **1.2.5. O sistema KS**

O KS400 é um “software” produzido pela Kontron Electronics GmbH e Carl Zeiss Óptica<sup>®</sup> que, inicialmente, foi desenvolvido para a indústria com a finalidade de analisar as emissões de micropartículas nos despejos de poluição ambiental (manual do equipamento). Em razão do grau de precisão, da vasta gama de recursos de que se acercava o “software”, foi então adaptado às necessidades das áreas biomédicas, anatomia patológica, sendo seu uso cada vez mais freqüente em morfometria, em neurocirurgia.

O neuronavegador é um equipamento que trabalha com interpretação de imagens tridimensionais.

O KS400 adquire imagens em 256 tons de cinza. Estas imagens são capturadas através de câmera CCD. Depois de adquiridas as imagens, o “software” apresenta uma opção para que se monte um programa com informações do que deverá avaliar nas imagens em arquivo. Isso feito, aciona-se o programa de rotina, chamado ‘macro’, e o “software” executará em segundos, todos os processamentos comandados.

Estas facilidades permitem, por exemplo, analisar um grande volume de peças em curtíssimo espaço de tempo e com enorme precisão.

Surgiu, assim, o projeto de comparação de diferentes métodos de medidas, em estudos de alterações teciduais, causada pelo AMPD.



***OBJETIVOS***

O objetivo deste estudo é medir a espessura do epitélio vaginal em pacientes usuárias de AMPD, por longo prazo, através de dois métodos morfométricos, a fim de se observar se existe atrofia deste epitélio.

Os métodos morfométricos utilizados foram comparados entre si, por meio de ocular milimetrada e modo interativo através do “software” KS400.



***MATERIAS E  
MÉTODOS***

### 3.1. CASUÍSTICA

Originalmente, o estudo foi executado por um período de quatro meses, de junho a outubro de 1999, na Unidade de Reprodução Humana do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas. Este estudo recebeu a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas. Todas as voluntárias assinaram um termo de consentimento informado.

O grupo de estudo consistiu em 20 mulheres, entre 18 e 40 anos, usuárias de 150 mg de AMPD (Depo-Provera® Upjohn, São Paulo, Brasil) como método anticoncepcional trimestral, durante pelo menos dois anos (8 doses) e não mais que três anos (12 doses) e que não tenham usado qualquer outro tipo de método anticoncepcional hormonal.

O grupo de controle incluiu 20 mulheres, entre 18 e 40 anos, que nunca tivessem usado método contraceptivo hormonal ou AMPD por mais de seis meses durante sua vida reprodutiva, nem nos seis meses anteriores ao estudo, e que tiveram ciclos menstruais regulares durante os últimos três meses. Cada usuária foi pareada com uma mulher de controle, para a pesquisa por idade ( $\pm 1$  ano), índice de massa corpórea ( $\pm 1$ ), número de gravidezes ( $\pm 1$ ), idade da primeira relação sexual ( $\pm 1$  ano) e número de parceiros durante a vida ( $\pm 1$ ), anos de vida sexual ( $\pm 1$  ano).

Para ser elegível, as mulheres nos dois grupos tiveram que cumprir os seguintes critérios de inclusão: idade entre 18 e 40 anos, boa saúde geral, não grávida, que a última gravidez tenha terminado há seis meses, não ter amamentado durante os últimos seis meses, ter uma relação mutuamente monógama, não ser usuária de droga que possa afetar o nível estrogênico, ser livre de infecção hematológica conhecida, não ser fumante, não ter sinais ou sintomas de infecção vaginal / cervical, e com cultura negativa para clamídia e gonorréia.

## **3.2. PROCEDIMENTOS**

A coleta de sangue, a biópsia da vagina e os esfregaços para índice de maturação foram coletados no dia em que as mulheres do grupo de estudo, retornaram à clínica para receber uma dose de AMPD, 90 ( $\pm 7$ ), dias depois da injeção prévia. No grupo de controle, os procedimentos foram executados no meio da fase lútea do ciclo (entre o 20° e 25° dia do ciclo menstrual).

### **3.2.1. Coleta da biópsia da vagina**

Uma biópsia de vagina foi coletada, aleatoriamente, à direita ou à esquerda da parede vaginal, aproximadamente a quatro cm do anel himenal. Após anestesia tópica, com “spray” de Lidocaína, a vagina foi limpa com solução de povidine iodado. Em seguida, foi relaxada a tensão do espéculo para permitir o enrugamento natural da mucosa vaginal e a biópsia foi coletada com pinça de Schubert-van Doren (Sklar, Chester, Pa, USA). A hemostasia foi executada com uma embebição em solução de Monsel®. Quando não havia boa dobra, foi utilizado um fórceps de Allis para tração da parede vaginal e permitir a coleta da amostra da parede vaginal (MAUCK *et al.*, 1998). O fragmento de tecido, com aproximadamente 4X7 mm, incluiu epitélio, e lâmina própria. Em duas mulheres, o sangramento, não controlado através da solução de Monsel®, foi resolvido mediante suturas. Não houve experiência adversa além dos sangramentos que necessitaram de suturas, e os locais de biópsias, cicatrizaram adequadamente, em todas as mulheres.

### **3.2.2. Processamento da biópsia vaginal**

As amostras foram fixadas em formol a 10%, incluídas em parafina. Cortes de 5 $\mu$  de espessura e foram coradas com hematoxilina e eosina.

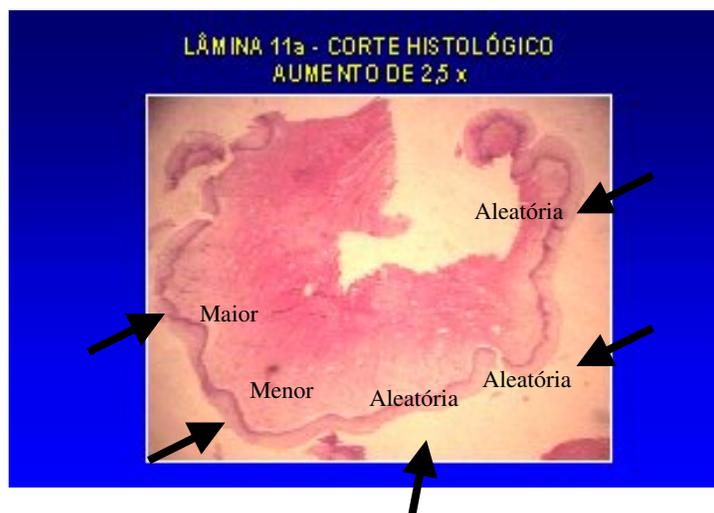
### 3.2.3. Morfometria feita com uso de micrômetro ocular

As lâminas referentes às biópsias foram avaliadas por um patologista sênior, não sendo informado a qual grupo a amostra pertencia. A altura epitelial foi avaliada na parte mais espessa e menos espessa da amostra e em três outros locais escolhidos ao acaso. As amostras foram analisadas, usando-se uma lente ocular milimetrada. A objetiva com aumento de 10X foi utilizada para as medições. Para fins de reprodutibilidade, as leituras foram realizadas conforme método preconizado por MAUCK *et al.*, (1998) e MILLER, *et al.*, (2000).

Desta forma, para que as referidas aferições fossem feitas, foram escolhidos cinco campos, como se segue:

- a) De maior espessura do epitélio;
- b) De menor espessura do epitélio;
- c) E três outras medidas feitas de forma aleatória, excluindo-se as anteriormente feitas.

A Figura 1 mostra um corte de paciente do grupo controle, ilustrando locais de medida com a ocular graduada.



**Figura 1:** Corte de epitélio vaginal, com indicações dos cinco locais de medida com o uso de micrômetro ocular. (Hematoxilina-eosina, objetiva 2,5x).

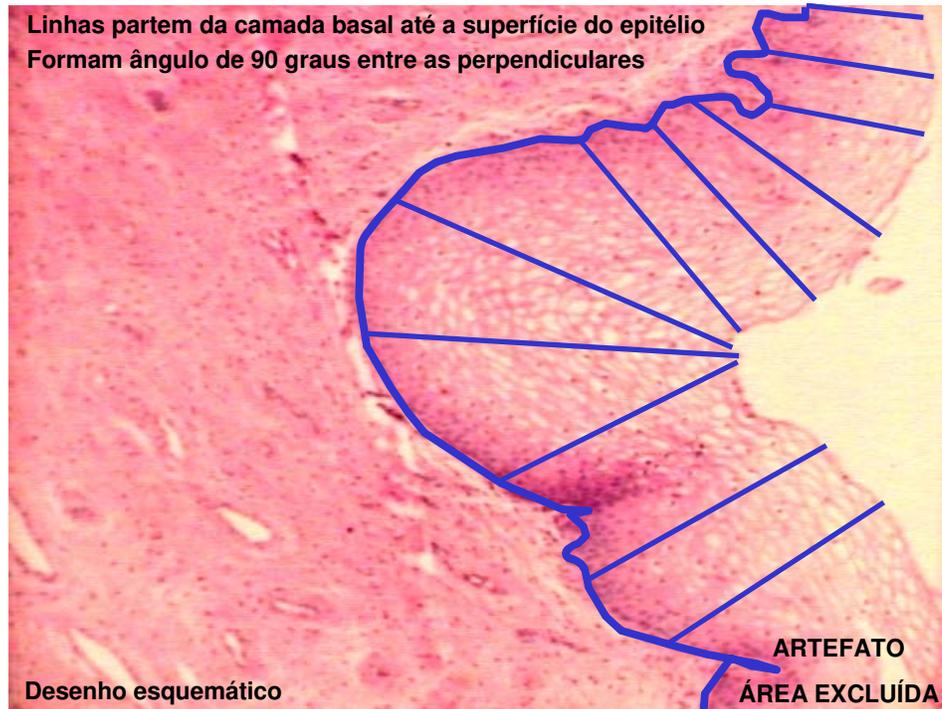
### **3.2.4. Morfometria interativa**

A análise interativa com sistema KS400, (Carl Zeiss Optical®) como uma ferramenta auxiliar, em medidas de precisão, tal qual na microscopia óptica é feita sob lentes objetivas calibradas com retícula milimetrada, específica para tal fim, inclusa no “software”.

As imagens são então processadas através de uma ‘macro’, programa pré-estabelecido com variáveis escolhidas pelo operador do “software”.

Neste estudo, as imagens foram trabalhadas, marcando-se a camada basal do epitélio a ser medido, escolhendo-se depois as áreas a serem medidas. As medidas e obtenção das médias e de outros dados que se queira são feitos, automaticamente pelo programa.

As medidas realizadas por meio do “software” KS400 foram executadas com as imagens capturadas através de câmara digital CCD (Charge Complred Device) , com base na imagem visualizada pelo monitor. Cada corte foi avaliado, subdividido-o em diversas imagens parciais, tendo sido realizadas as mesmas cinco medidas (maior, menor e aleatórias) em cada uma delas.



**Figura 2:**Corte de epitélio vaginal, com indicações dos locais de medida para seleção posterior pelo programa KS400. (Hematoxilina-eosina, objetiva 10x).

### 3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística foram feitos os seguintes testes:

- a) Kolmogorov-Smirnov, que compara as distribuições das mensurações dos dois grupos, usuárias e controle, com a curva de GAUSS.
- b) Coeficiente de Spearman, para avaliar o grau de correlação entre os resultados obtidos pelos dois métodos de leitura, nos grupos de estudo.
- c) Comparação entre os grupos com e sem hormônio, os dados com base na leitura manual; Teste t de Student, para valores pareados, e cálculo de poder estatístico, conforme o programa estatístico Primer Biostatistics, (1991).

- d) Comparação entre os grupos com e sem hormônio, baseando-se os dados na leitura digital interativa, Teste t de Student para valores pareados, e cálculo de poder estatístico, conforme o programa estatístico Primer Biostatistics, (1991).

Um nível de significância de 0,5 foi estabelecido.



***RESULTADOS***

#### 4.1. RESULTADOS GERAIS

O grupo de usuárias incluiu 15 mulheres brancas e 5 mulheres negras. As não-usuárias eram 13 mulheres brancas e 7 mulheres negras. O número de ampolas recebidas pelas usuárias do AMPD foi de  $9,2 \pm 1,5$  (intervalo de 8 a 12). As características sócio-demográficas de usuárias e não usuárias estão apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1:** Características demográficas e antropométricas de usuárias e não-usuárias de AMPD.

VARIÁVEIS	AMPD		VALOR DE P
	USUÁRIAS	NÃO-USUÁRIAS	
Idade (anos)	$30,6 \pm 1,3$	$30,3 \pm 1,3$	NS
Índice de massa corporal (Kg/m <sup>2</sup> )	$24,50 \pm 0,94$	$24,54 \pm 0,85$	NS
Idade da primeira relação (anos)	$18,5 \pm 0,90$	$18,0 \pm 0,94$	NS
Anos de atividade sexual	$11,5 \pm 1,21$	$12,2 \pm 1,21$	NS
Número de parceiros	$2,05 \pm 0,31$	$2,36 \pm 0,44$	NS
Número de gestações	$2,7 \pm 0,32$	$1,8 \pm 0,27$	NS
Estradiol (pg/ml)	$39,7 \pm 2,4$	$91,2 \pm 9,00$	0,0001
AMP (ng/ml)	--	$1,231 \pm 0,528$	--

Nota: Todos os valores foram médias  $\pm$  EPM; NS: não significante (BAHAMONDES *et al.*, 2000).

Não ocorreram diferenças significativas nos achados entre os dois grupos (usuárias e controle), confirmando o pareamento das pacientes. O nível de estradiol foi significativamente menor nas mulheres usuárias de AMPD que nas mulheres do controle, mostrando a supressão do hormônio endógeno, causada pelo AMPD.

A Tabela 2 mostra as medidas encontradas pelos observadores, relativas a todas as lâminas analisadas ao microscópio convencional e pelo método interativo. Os resultados de medidas aleatórias realizadas pela ocular não foram apresentados isoladamente. Entretanto, foram incluídos no cálculo da média final.

Os valores médios e desvio-padrão das medidas, nos dois grupos de estudo, estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 2:** Medidas das espessuras do epitélio vaginal das 40 mulheres, comparando-se os dois métodos de leitura.

ESPESSURA MAIOR		MÉDIA DAS ESPESSURAS ALEATÓRIAS		ESPESSURA MENOR		MÉDIA FINAL	
KS400	Ocular	KS400	Ocular	KS400	Ocular	KS400	Ocular
<b>0,321</b>	<b>0,390</b>	<b>0,140</b>	--	<b>0,056</b>	<b>0,150</b>	<b>0,143</b>	<b>0,250</b>
<b>0,333</b>	<b>0,540</b>	<b>0,210</b>	--	<b>0,070</b>	<b>0,200</b>	<b>0,210</b>	<b>0,420</b>
<b>0,290</b>	<b>0,500</b>	<b>0,200</b>	--	<b>0,121</b>	<b>0,120</b>	<b>0,203</b>	<b>0,350</b>
<b>0,300</b>	<b>0,430</b>	<b>0,170</b>	--	<b>0,089</b>	<b>0,200</b>	<b>0,163</b>	<b>0,310</b>
0,303	0,450	0,180	--	0,068	0,250	0,161	0,240
0,138	0,150	0,074	--	0,051	0,060	0,077	0,100
<b>0,139</b>	<b>0,210</b>	<b>0,095</b>	--	<b>0,053</b>	<b>0,100</b>	<b>0,096</b>	<b>0,140</b>
<b>0,309</b>	<b>0,400</b>	<b>0,140</b>	--	<b>0,050</b>	<b>0,020</b>	<b>0,106</b>	<b>0,240</b>
0,248	0,350	0,130	--	0,055	0,080	0,125	0,210
0,353	0,340	0,160	--	0,094	0,170	0,160	0,260
0,285	0,390	0,170	--	0,078	0,210	0,160	0,280
0,353	0,500	0,220	--	0,076	0,150	0,152	0,360
<b>0,193</b>	<b>0,290</b>	<b>0,150</b>	--	<b>0,101</b>	<b>0,160</b>	<b>0,157</b>	<b>0,230</b>
<b>0,231</b>	<b>0,430</b>	<b>0,170</b>	--	<b>0,122</b>	<b>0,060</b>	<b>0,131</b>	<b>0,300</b>
<b>0,186</b>	<b>0,310</b>	<b>0,130</b>	--	<b>0,077</b>	<b>0,120</b>	<b>0,100</b>	<b>0,210</b>
0,319	0,450	0,190	--	0,079	0,070	0,155	0,300
0,188	0,250	0,084	--	0,051	0,050	0,086	0,140
<b>0,220</b>	<b>0,310</b>	<b>0,130</b>	--	<b>0,078</b>	<b>0,060</b>	<b>0,097</b>	<b>0,180</b>
<b>0,227</b>	<b>0,370</b>	<b>0,140</b>	--	<b>0,062</b>	<b>0,050</b>	<b>0,107</b>	<b>0,240</b>
0,168	0,370	0,140	--	0,061	0,030	0,109	0,220
0,174	0,260	0,100	--	0,072	0,060	0,079	0,200
<b>0,251</b>	<b>0,350</b>	<b>0,140</b>	--	<b>0,093</b>	<b>0,016</b>	<b>0,140</b>	<b>0,250</b>
<b>0,149</b>	<b>0,510</b>	<b>0,220</b>	--	<b>0,156</b>	<b>0,110</b>	<b>0,162</b>	<b>0,270</b>
<b>0,130</b>	<b>0,240</b>	<b>0,120</b>	--	<b>0,074</b>	<b>0,110</b>	<b>0,117</b>	<b>0,760</b>
<b>0,200</b>	<b>0,250</b>	<b>0,130</b>	--	0,074	<b>0,030</b>	<b>0,128</b>	<b>0,150</b>
0,202	0,220	0,130	--	0,075	0,120	0,130	0,860
0,144	<b>0,360</b>	<b>0,120</b>	--	<b>0,082</b>	<b>0,150</b>	<b>0,114</b>	<b>0,260</b>
0,136	<b>0,180</b>	<b>0,094</b>	--	<b>0,060</b>	<b>0,100</b>	<b>0,095</b>	<b>0,130</b>
0,206	0,370	0,150	--	0,053	0,120	0,138	0,260
<b>0,170</b>	<b>0,290</b>	<b>0,130</b>	--	<b>0,053</b>	<b>0,050</b>	<b>0,100</b>	<b>0,150</b>
<b>0,155</b>	<b>0,260</b>	<b>0,120</b>	--	<b>0,054</b>	<b>0,060</b>	<b>0,120</b>	<b>0,180</b>
0,148	0,200	0,110	--	0,075	0,080	0,083	0,420
<b>0,234</b>	<b>0,490</b>	<b>0,160</b>	--	<b>0,067</b>	<b>0,100</b>	<b>0,093</b>	<b>0,220</b>
0,212	0,350	0,160	--	0,067	0,050	0,120	0,230
0,177	0,350	0,130	--	0,058	0,080	0,096	0,180
0,179	0,310	0,130	--	0,058	0,110	0,096	0,180
0,258	0,270	0,170	--	0,121	0,100	0,131	0,180
0,203	0,350	0,120	--	0,049	0,060	0,114	0,160
0,246	0,390	0,130	--	0,078	0,100	0,104	0,210
0,309	0,270	0,190	--	0,076	0,080	0,142	0,200

**Nota:** Os dados em negrito correspondem às mulheres do grupo de usuárias.

**Tabela 3:** Valores médios das espessuras do epitélio vaginal, avaliados pelos dois métodos de leitura.

	KS400			Ocular Graduada		
	maior	menor	final	maior	menor	final
<b>USUÁRIAS</b>	0,233	0,065	0,144	0,336	0,102	0,250
	DP ± 0,005	DP ± 0,017	DP ± 0,037	DP ± 0,086	DP ± 0,056	DP ± 0,160
<b>NÃO-USUÁRIAS</b>	0,215	0,0564	0,146	0,355	0,106	0,262
	DP ± 0,063	DP ± 0,026	DP ± 0,036	DP ± 0,0105	DP ± 0,0532	DP ± 0,138
<b>P</b>	0,440	0,213	0,390	0,434	0,770	0,730

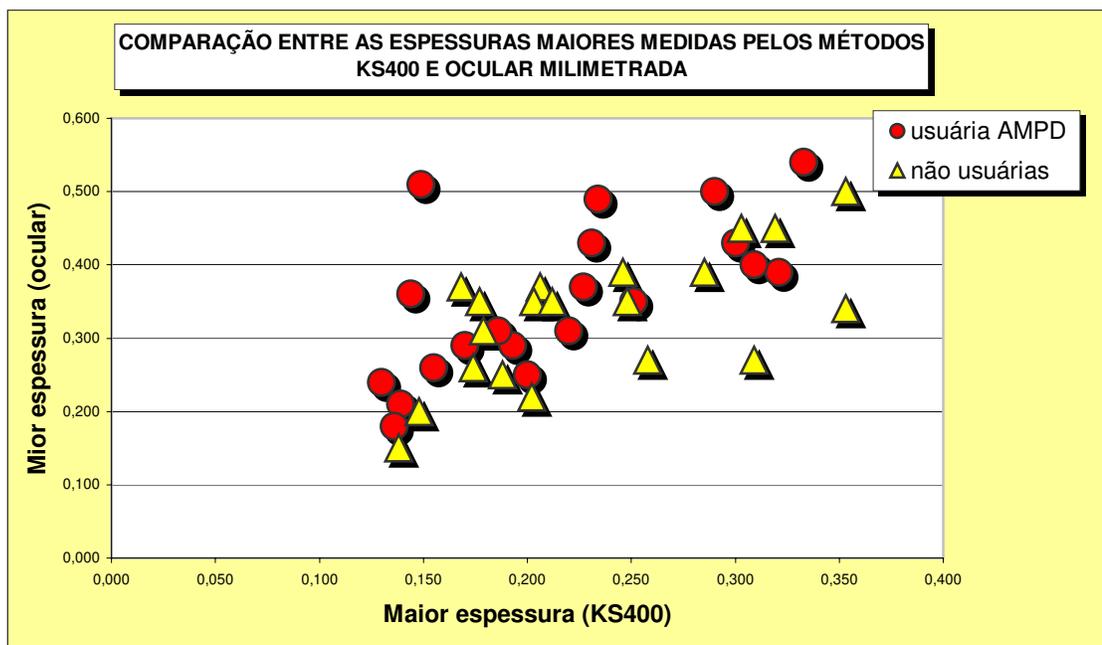
**Nota:** DP = desvio-padrão; P = nível de significância; Teste t de Student para grupos pareados.

Portanto, nos dois métodos não foram obtidas diferenças significativas entre o grupo de usuárias do AMPD e o grupo de controle.

Os Testes t, pareados, baseados em dados obtidos pelo sistema KS400 não indicam diferença nas médias finais entre as mulheres não usuárias e mulheres usuárias ( $p=0,39$ ), assim como os dados obtidos pelo micrômetro ocular ( $p=0,73$ ).

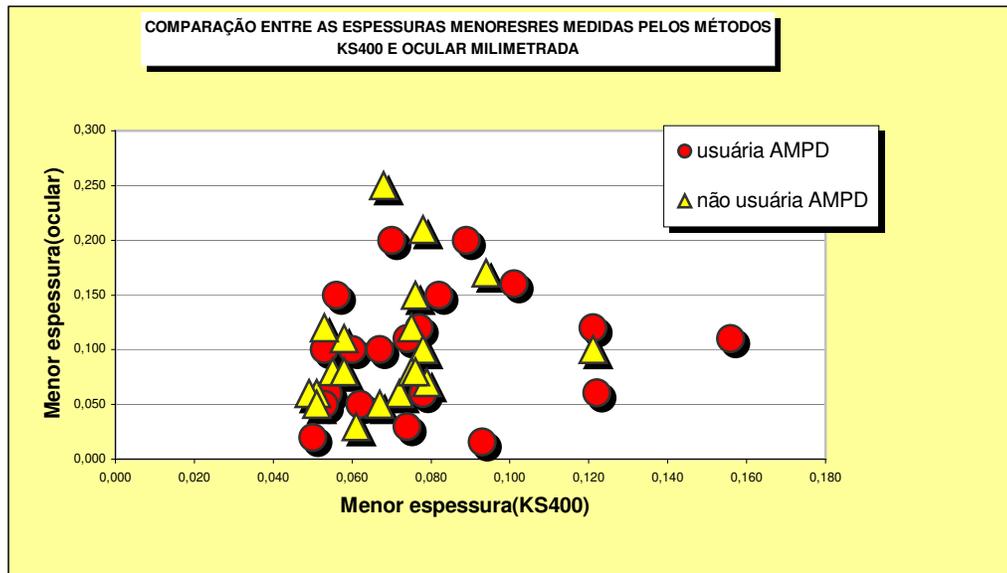
## 4.2. CORRELAÇÕES ENTRE OS VALORES OBTIDOS PELOS DOIS MÉTODOS

As correlações entre os resultados das medidas de espessura maior, menor e médias finais das espessuras podem ser vistas nos gráficos 1, 2 e 3.



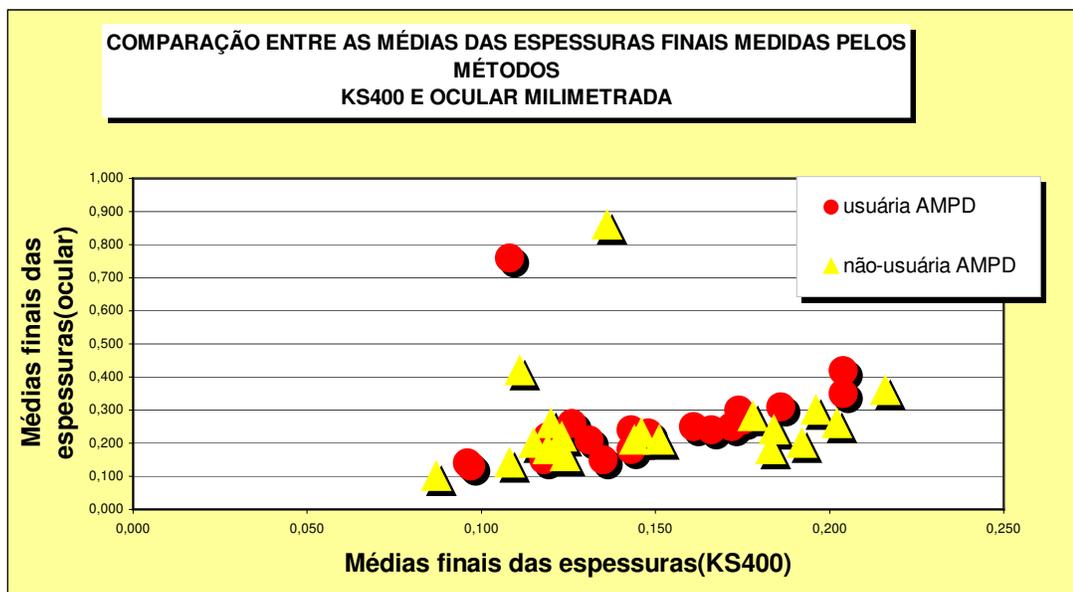
**Gráfico 1:** Comparação entre as espessuras maiores medidas pelo método ocular e KS400.

O Coeficiente de Correlação de Spearman, calculado para a variável espessura maior é  $r = 0,725$ ,  $p < 0,0001$  (bicaudal). As medidas concentram-se, numa mesma região no Gráfico, não sendo observada uma variação importante que mostre significância estatística.



**Gráfico 2:** Comparação entre as espessuras menores medidas pelo método ocular e KS400.

Não há correlação significativa, segundo Spearman, entre as medidas menores, com  $r = 0,21$  e  $p = 0,18$  (bicaudal)



**Gráfico 3:** Comparação entre as médias finais das espessuras medidas pelo método ocular e KS400.

O Coeficiente de Correlação Spearman, calculado a partir dos resultados médios finais demonstra uma correlação entre as duas variáveis, com  $r = 0,626$  e  $p < 0,0001$  (bicaudal).

Portanto, ambos os testes estatísticos (Teste t de Student e Coeficiente de Correlação de Spearman) não constataram uma diferença significativa entre as medidas de espessuras nas mulheres que fizeram uso do contraceptivo em relação às não-usuárias.

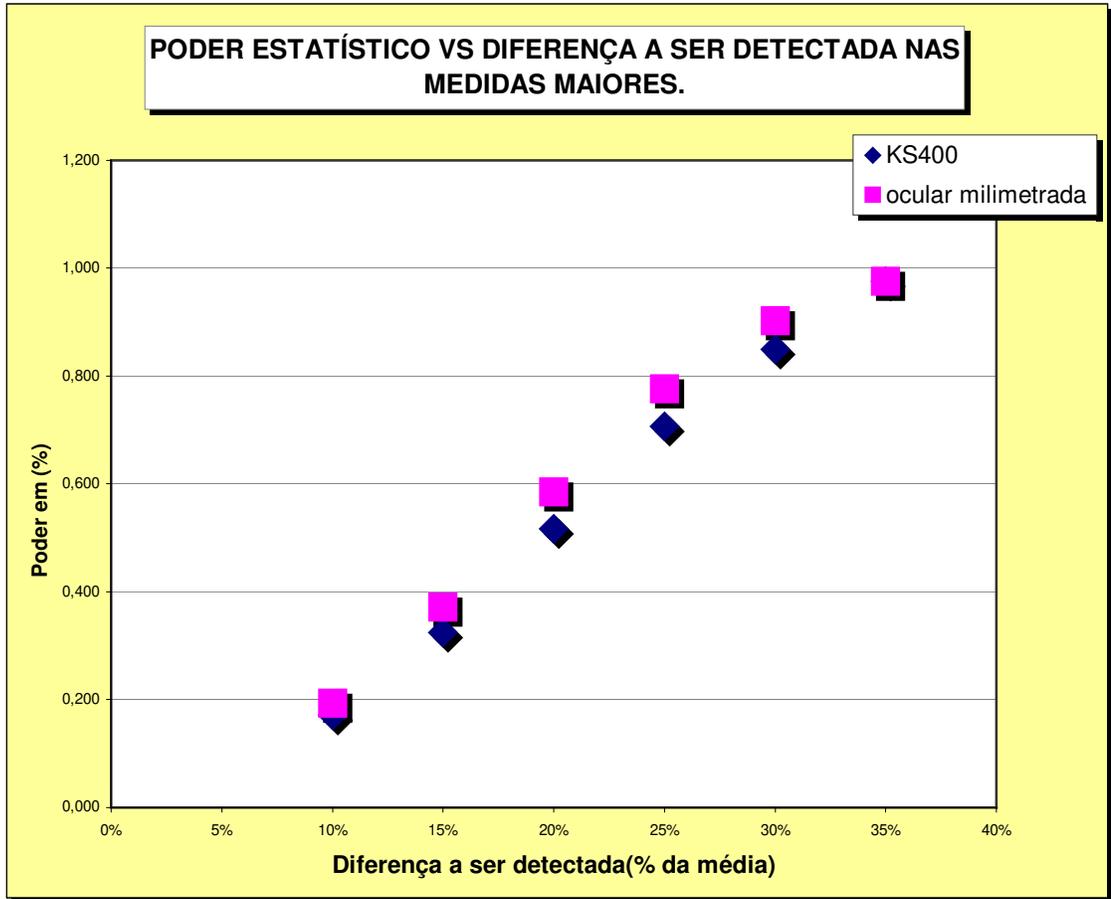
### **4.3. PODER ESTATÍSTICO DO TESTE T DE STUDENT (PAREADOS)**

O poder estatístico de um teste depende do tamanho da diferença a ser demonstrada; no caso desse estudo, utilizou-se o Teste t de Student na comparação dos dois métodos de leitura.

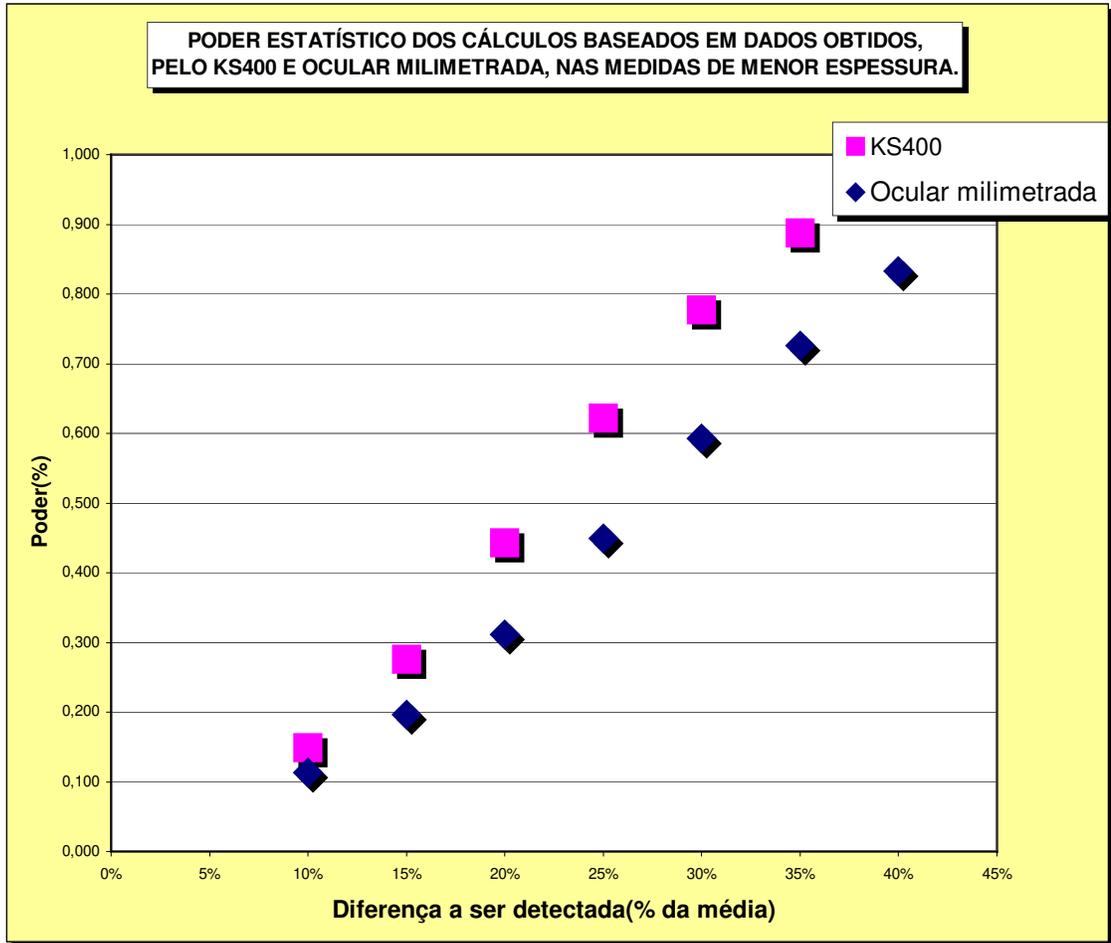
A Tabela 3 apresenta as médias, mais ou menos os desvios-padrão e as probabilidades obtidas a partir da aplicação do Teste t Student.

Nos Gráficos 4, 5 e 6, representa-se na abscissa a diferença a ser demonstrada como uma fração (em %) do valor médio absoluto da variável. Se, por exemplo, a média das espessuras é 0,15mm e a diferença a ser detectada seria de 0,015mm, o valor correspondente no eixo x seria de 10%.

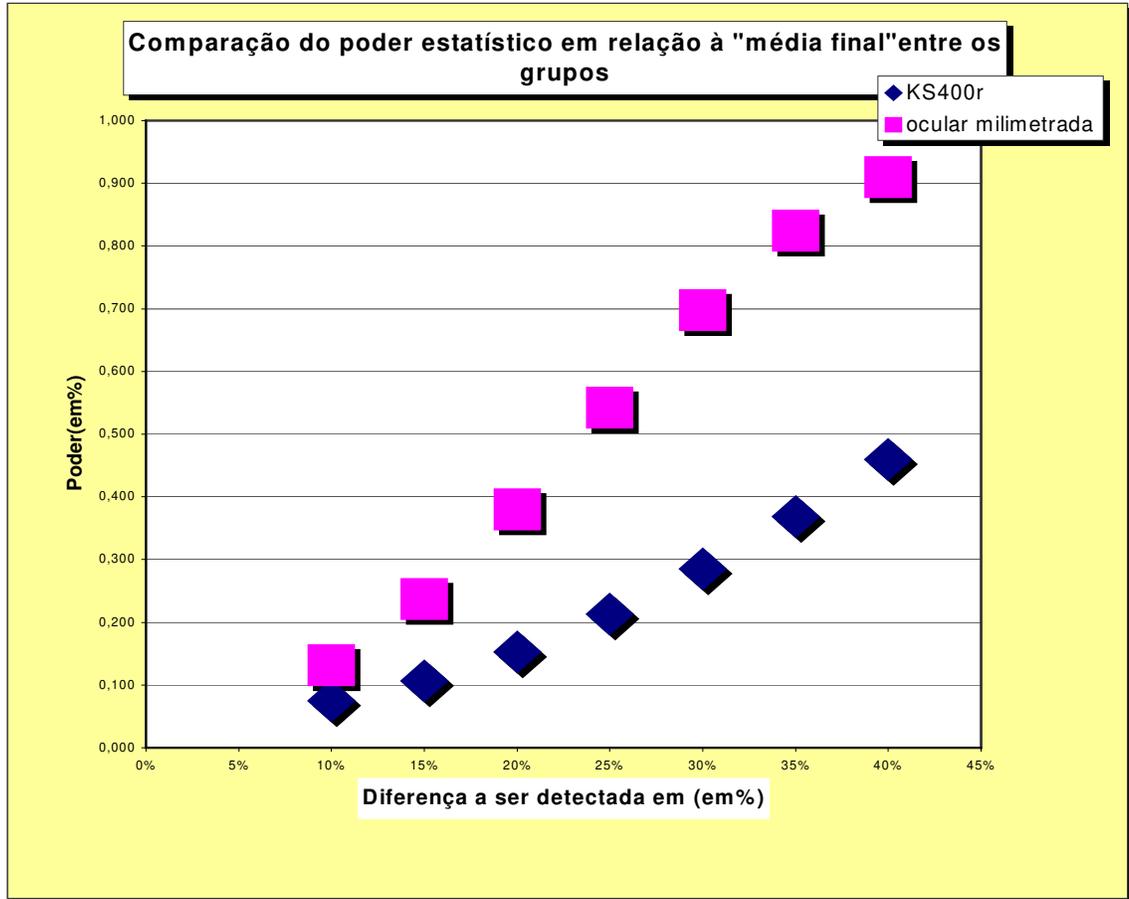
O poder estatístico dos cálculos baseados em dados obtidos pelo sistema KS é maior que em dados baseados em morfometria com micrômetro ocular, tanto nas medidas maiores, quanto nas menores e nas médias finais.



**Gráfico 4:** Poder estatístico vs diferença a ser detectada nas medidas de maior espessura.



**Gráfico 5:** Poder estatístico dos cálculos baseados em dados obtidos, pelo KS400 e ocular milimetrada, nas medidas de menor espessura.



**Gráfico 6:** Comparação do poder estatístico em relação à “média final” entre os grupos

Comparando o poder estatístico, vemos novamente o maior poder estatístico dos testes baseados em dados obtidos pelo sistema KS400.



*DISCUSSÃO*

## 5.1. PAREAMENTO ENTRE OS DOIS GRUPOS

Os resultados antropométricos e demográficos mostram um rigoroso pareamento das mulheres, minimizando a interferência de outros fatores que não o uso do AMPD.

## 5.2. ESPESSURA DO EPITÉLIO VAGINAL

Uma imensa literatura que reporta a mais de 1000 referências refere-se ao tema dos contraceptivos esteróides injetáveis, incluindo o acetato de medroxiprogesterona de depósito (AMPD - Depo-provera<sup>®</sup>, Upjohn).

O conceito de contraceptivo de longa duração tem forte atração para muitos grupos de mulheres pela comodidade posológica. Calcula-se que milhões de mulheres, ao redor do mundo, estejam usando atualmente contraceptivos injetáveis, principalmente nos países em desenvolvimento. Mesmo assim, continuam as controvérsias acerca de vários problemas não resolvidos sobre a sua utilização.

Vários pesquisadores mostraram que hormônios promovem alterações metabólicas tanto em animais quanto em humanos (UNGCHUSAK *et al.*, 1996; MARX *et al.*, 1996; NAGACHINTA *et al.*, 1997; COSTELLO *et al.*, 1994; MILLER *et al.*, 2000).

Os resultados apresentados neste estudo mostraram que o uso prolongado de AMPD esteve associado a um estado hipoestrogênico significativo, quando comparado com os valores normais obtidos ao meio da fase lútea em controles.

Não foi possível detectar nenhuma redução na espessura do epitélio vaginal nos dois métodos de análise utilizados.

Estes resultados estão de acordo com os achados prévios de MAUCK *et al.*, (1998), que mostraram dados semelhantes em mulheres expostas a uma única dose de (AMPD). Dezesesseis mulheres foram submetidas a biópsia um mês antes e três meses depois da injeção de AMPD. Neste estudo foram avaliados o número de camadas de células e a espessura epitelial e não foram encontradas diferenças significativas nas duas variáveis, quando comparadas com os achados controles.

\*ZONDEK & FRIEDMAN, 1936, fizeram biópsias vaginais em mulheres, em diferentes períodos do ciclo menstrual, e não acharam nenhuma mudança no número de camadas epiteliais vaginais entre mulheres que menstruam, comparadas a mulheres com amenorréia primária ou secundária. Neste estudo, nenhuma mulher era usuária de contraceptivo hormonal.

Por outro lado, nos estudos de MILLER *et al.*, (2000) com seguimento de seis meses de uso do AMPD, a redução do nível de estrógenos, mostrou uma leve diminuição, porém, significativa do número de camadas de células do epitélio vaginal. A espessura, entretanto, reduziu significativamente ( $p=0,005$ ). Os autores concluem que essas pequenas reduções possivelmente comprometam a barreira vaginal para infecções.

Os achados do presente estudo também estão em conflito com vários estudos epidemiológicos, os quais sugerem que o uso de contraceptivos injetáveis de progestogênicos está associado ao risco aumentado de transmissão do HIV, atribuído a uma diminuição da espessura do epitélio da mucosa vaginal causada pelo progestogênio (UNGCHUSAK *et al.*, 1996; NAGACHINTA *et al.*, 1997). Essa redução epitelial pode conduzir à ocorrência de lesões superficiais durante o coito e facilitar assim a transmissão da doença (COSTELLO *et al.*, 1994).

O problema principal com os estudos epidemiológicos que acharam um risco aumentado de transmissão de HIV, em usuárias de AMPD, é que eles foram realizados entre trabalhadoras do sexo que apresentam várias características que podem agir como confundidoras da vinculação do uso do contraceptivo com o risco aumentado para infecção pelo HIV.

O número de parceiros, sexo anal, compartilhamento de seringas e agulhas estão fortemente associados com a transmissão de HIV. As características especiais das participantes desse estudo e as variáveis específicas, que tornam este grupo especialmente susceptível a contrair HIV, confundiriam facilmente os resultados e permitem dúvidas de consistência dos mesmos.

---

\* ZONDEK & FRIEDMAN, 1936, apud MILLER *et al.*, (2000)

A possibilidade de alterações, quando essas variáveis ambientais estão presentes, é reforçada pela ausência de risco aumentado, informada por estudos entre usuárias AMPD que não eram trabalhadoras do sexo e foram expostas à contaminação pelo HIV por parceiros sexuais HIV positivos (BULTERYS *et al.*, 1994; KAPIGA *et al.*, 1998).

A diminuição da espessura do epitélio vaginal é um efeito conhecido da progesterona natural, durante a fase lútea do ciclo menstrual normal.

A possibilidade de que os contraceptivos injetáveis, com uma única substância ativa, o progestogênio, pudessem ter o mesmo efeito, foi reforçada pelos resultados em macacas que apresentaram uma atrofia na mucosa vaginal durante uso de AMPD ou implantes Norplant e um risco aumentado de transmissão de SIV (HILD-PETITO *et al.*, 1998; UNGCHUSAK *et al.*, 1996; MARX *et al.*, 1996). À luz destes achados, parece que as mulheres não respondem aos progestogênios exógenamente, com a atrofia do epitélio vaginal de forma tão acentuada quanto o visto em macacas *rhesus*.

A ausência de um padrão para comparação da mucosa dos símios com a mucosa normal das mulheres sugere que estes resultados, distintos entre as duas espécies, não são um artefato dos estudos. Embora a confirmação por outros investigadores seja sempre requerida, os resultados lançaram dúvida sobre a utilidade do modelo símio e sobre a validade dos estudos epidemiológicos citados acima (NAGACHINTA *et al.*, 1997).

Os progestogênios também foram suspeitos de causar mudanças na cérvix, mas a hipótese não foi confirmada. Em estudo recente com um grupo de usuárias de AMPD não houve aumento da prevalência de rompimento visível do epitélio cervical ou ectrópio cervical (KUHN *et al.*, 1999). Também não foram observadas mudança no número de células de Langerhan's em espécimes de parede vaginais e nenhuma mudança no ectrópio cervical no trabalho de CONNOR *et al.*, (1999).

BAHAMONDES *et al.*, (1998); ORR-WALKER *et al.*, (1998); SCHOLETS *et al.*, (1999) e PERROTTI *et al.*, (2001), estudando a associação de AMPD e osteoporose, concluíram que mulheres que tinham usado o contraceptivo por períodos longos apresentaram resultados semelhantes quanto à avaliação da densidade mineral óssea, comparadas a mulheres que não tinham usado qualquer tipo de preservativo hormonal.

Caso as interferências bioquímicas do AMPD mantenham a mesma coerência quanto as suas interações biológicas no epitélio vaginal, tal qual no tecido ósseo, obtém-se um indício favorável para um uso mais seguro desta poderosa droga. Até que estudos sejam levados a cabo, com um seguimento longo, bem além dos três anos incluídos neste trabalho, o assunto permanecerá controverso.

Tem-se então, três conclusões distintas, conforme a pesquisa efetuada:

- a) Na primeira, os resultados de MAUCK *et al.*, (1998) foram obtidos, usando AMPD por curtíssimo tempo de três meses além de índices de alterações no epitélio vaginal, que não comprometeram a espessura da mucosa, não foram encontrados sinais que comprometessem a sanidade das pacientes.
- b) Na pesquisa desenvolvida por MILLER *et al.* (2000), os resultados obtidos pelo uso do AMPD, por curto espaço de tempo (seis meses), indicaram que existem lesões induzidas na mucosa vaginal pelo uso do AMPD e conseqüente facilitação na aquisição de DST's.
- c) E finalmente, nos resultados desse estudo, baseado nos dados cedidos por BAHAMONDES *et al.* (2000), que utilizou AMPD por longo espaço de tempo (entre 2 e 3 anos), mostraram semelhanças com os resultados de MAUCK *et al.*, (1998), não desabonando o uso do AMPD.

Assim, a partir das observações acima, uma hipótese a ser investigada seria a de que a medida da espessura do epitélio vaginal deveria ser executada em períodos de tempo diferentes na mesma pessoa, podendo assim coletar amostras de todas as fases dos respectivos ciclos hormonais, sejam fisiológicos ou induzidos por droga. Esta forma, talvez, seja a mais adequada para avaliar, com precisão, as alterações em cada período.

O uso do acetato de medroxiprogesterona de depósito esteve associado com a aquisição do HIV em diferentes circunstâncias e freqüências, em dois estudos BULTERYS *et al.* (1994); KAPIGA *et al.* (1998). Por outro lado, em estudos com uma seleção mais restrita, em clínica de planejamento familiar em Dar es Salaam, Tanzânia, o uso de AMPD não esteve constantemente associado à infecção de HIV KAPIGA *et al.* (1998).

Acredita-se, contudo, que muitos fatores poderiam confundir a relação entre HIV e AMPD, a soroconversão do vírus da imunodeficiência humana ou a soroprevalência foi unida à infecção cervical, inflamação, ectrópio; úlceras genitais, cândida, e *vaginosis* bacteriana. A maioria dos relatórios não proveu dados extensos sobre o contraceptivo ou informação sobre a duração do uso do AMPD. Até mesmo um ajuste em análise multivariada, poderia não controlar adequadamente os dados, por confundir as variáveis.

A despeito da existência de literatura detalhada e revisada sobre a contracepção injetável, esta continua gerando discussão considerável e informações novas continuam aparecendo na literatura a uma velocidade muito rápida, gerando acaloradas discussões já há duas décadas (FRASER & WEISBERG, 1981).

Este estudo, porém, não deu uma resposta decisiva, por ser uma coorte transversal, não tão poderosa quanto uma coorte longitudinal, a qual cada mulher é seu próprio controle. Tal estudo está exigindo um maior número de voluntários e investigadores; pois mais tempo e recursos serão necessários, mas é possivelmente, o único modo para que uma resposta definitiva possa ser dada a esta pergunta.

Fatores sociais também afetam a taxa de mudança de parceiros sexuais, o que pode promover o crescimento epidêmico dramaticamente. Tais fatores incluem a facilidade de sexo comercial, a presença de casas que fornecem “crack“ e cocaína (FRASER & WEISBERG, 1981). A exposição a fatores de riscos sócioambientais indica uma vulnerabilidade social que, em grande parte, é consequência da má distribuição de recursos sociais e econômicos.

Portanto, no tocante à aquisição de DST / AIDS, aparentemente, foram a promiscuidade, a miséria, a falta de esclarecimentos das populações fatores de grande relevância, mais que as eventuais formulações de contraceptivos orais ou injetáveis.

As conclusões que os trabalhos supracitados oferecem, deixam uma considerável margem de dúvidas e questionamentos, apesar dos resultados animadores, uma vez que não fecham a questão ou encerram o caso de milhões de mulheres, em todo o mundo que usam este preparado farmacológico com a ‘certeza’ dos seus efeitos benéficos.

Cabe à pesquisa que possui instrumentos, manter uma constante vigilância, e uma incessante busca desta certeza, em prol das usuárias. A proposta de mensuração digital dos dados manuais deste trabalho foi tentar oferecer novas opções que sirvam como instrumentos de aferição ou de complementação diagnóstica, para participar deste contingente de pesquisadores que buscam incessantemente uma resposta definitiva.

### **5.3. MÉTODOS DE MEDIDAS DE ESPESSURA**

Para a aferição de um dado real e confiável se faz imperativo cercar-se de todos os aparatos matemáticos e estatísticos. Uma das ferramentas que se tem hoje à disposição, com facilidade, são os programas de estatísticas para computadores, os “softwares”, que são bastante interativos, facilitando sua utilização numa escala muito grande.

O poder estatístico, não calculado em muitos trabalhos e não mencionado em outros tantos, pode provocar conclusões equivocadas, tornando-os algumas vezes trabalhos sem importância científica.

As distribuições das diferentes medidas morfométricas de todas as pacientes foram avaliadas com o Teste de Kolmogorov-Smirnov, que compara as distribuições em questão com a curva de GAUSS. Como uma distribuição, a média fina obtida pela morfometria com ocular, é significativamente ( $p = 0,03$ ) diferente da curva de GAUSS, usaram-se, para cálculos que visam todas as pacientes, métodos não paramétricos.

Subdividindo em grupos de pacientes usuárias e não-usuárias de hormônio, porém, todas as distribuições mostraram uma aproximação no mínimo satisfatória da distribuição de GAUSS. Portanto aplicaram-se testes paramétricos.

Compreende-se que, com tantas facilidades tecnológicas, utilizá-las é boa prática científica, para se certificar de que as informações que se oferecem, são confiáveis e de valor, para que se tornem ferramentas em outros trabalhos. Desta forma acredita-se que os cálculos do poder estatísticos destes dados serviram de aferição aos achados que se expôs.

A morfometria executada por “software”, no nosso caso o KS400, é seguramente uma ferramenta na captura, análise e processamento de imagem, visto o grau de precisão em que a imagem é analisada.

Partindo-se do princípio de que a imagem é desmontada em sua forma mais primitiva, o pixel, toda e qualquer nuance naquele elemento, será criteriosamente analisado, suplantando assim as limitações do olho humano.

A comparação dos valores absolutos entre as medidas feitas com ocular milimetrada e com o sistema KS400 mostra que as maiores espessuras das medidas feitas pelo KS, são menores que as obtidas pelo micrômetro ocular, apresentando uma diferença média 0,12mm;  $p < 0,0001$ ; Teste de Wilcoxon.

Não houve diferença entre os valores das espessuras menores, conforme mostra o Teste de Wilcoxon um de  $p = 0,63$ . Constatou-se, porém uma diferença entre as ‘médias finais’ (diferença média = 0,09;  $p < 0,0001$ ; Teste de Wilcoxon).

Por ter sido feita apenas uma medida maior e menor, na medida simples com ocular milimetrada, não se pode garantir que estas medidas sejam a maior e menor do espécime, por ser um dado subjetivo, dependendo da habilidade do patologista de coordenar o conjunto de informações. Decerto, elas são próximas do desejado, pois não houve diferença estatística significativa. Houve, no entanto, grande diferença no poder do teste de avaliação, Teste t de Student, que mostrou grande superioridade na análise digital sobre a convencional.

Os dados para a análise digital foram obtidos, em princípio da mesma forma, porém com uma diferença logística, de que o material contido na lâmina foi ‘varrido por uma câmara CCD’ na sua totalidade, subdividido em imagens que ocupassem todo o campo da ocular, capturado pela câmara, e enviadas ao “software” KS400, medidas através de uma ‘macro’ pré-estabelecida.

Analizados da mesma forma, sua maior e menor espessura além das três outras medidas selecionadas de forma aleatória, em cada campo ocular.

Além do ganho em tempo na execução das medidas, com mínima possibilidade de erro, pulam-se todas as etapas de anotações, cálculos e gráficos.

Utilizando-se o “software” KS400, pelo seu conjunto de ferramentas, é possível garantir que medidas sejam feitas de forma inequívoca.

Utilizando-se métodos manuais, são necessárias várias etapas mecânicas como marcar o campo, mudar a objetiva, fazer a medida com ocular milimetrada, realizar os cálculos de conversões e anotações de dados.

Para se realizar tantas medidas quanto às propostas neste trabalho, cinco medidas por campo, de forma manual, o tempo e quantidade de dados dificultariam o andamento do trabalho, havendo também maior possibilidade de erro. Caso seja utilizado o padrão ouro vigente, o tempo consumido com os passos de cada processo, inviabilizaria a prática laboratorial para um grande número de casos .

Utilizando-se, porém de um “software” adequado, o trabalho é realizado rapidamente, com grande quantidade de informações, melhorando o poder do teste estatístico, que é essencial ao trabalho de pesquisa.

Na comparação entre os resultados obtidos pela medida manual e pela medida interativa com o “software”, não houve diferença estatística significativa. No entanto, o poder, calculado pelo Teste t de Student, demonstrou a superioridade da análise digital sobre a convencional.

Ao finalizar este trabalho, conclui-se que esta nova vertente de congregar recursos de informática, na aferição de dados científicos conseguidos através dos métodos tradicionais, oferece, substrato para que se possa não só avaliar, mas melhorar o padrão estabelecido, produzindo trabalhos de melhor qualidade, ou seja, que realmente tenham valor científico.



*CONCLUSÃO*

Conclui-se que não há atrofia significativa do epitélio vaginal nas pacientes usuárias de AMPD, por longo período de tempo e que através dos estudos e dos testes estatísticos realizados, o método digital mostrou-se superior, em relação ao poder estatístico, sobre o método convencional.



*SUMMARY*

Depot medroxyprogesterone acetate (DMPA) is a contraceptive with depot effect widely used in the world. It has been claimed that this drug could change the vaginal mucosa and thus increase the risk of infectious disease transmission for instance of the human – immunodeficiency virus (HIV). In animal experiments it had been shown that DMPA injections thinned the vaginal epithelium and thus enhanced the Simian immunodeficiency virus infection (SIV) clinical studies are contradictory.

Other studies, however could I----- find charges.

The difference between these studies might be due to the study design, choose of the patients or, simply due to the morphometric methods used. In order to clarify the last topic we compared two different methods of morphometric evaluation of vaginal epithelium of women after prolonged use of DMPA.

Twenty users and 20 paired non-users of 150 mg DMPA as a contraceptive method (for at least 2 years and no more than three years) participated the study. A biopsy was taken was taken, fixed in a 4% aqueous formaldehyde solution, and paraffin-embedded. Routine sections were stained by haematoxylin-eosin. Morphometric evaluation was done in following way:

- 1) manual morphometry: Using a eye piece graticule in the ocular the observer measured the minimum and maximum thickness of the epithelium, as well as the thickness at three points randomly chooses “at convenience”;
- 2) Interactive morphometry: Images of the vaginal epithelium were digitalized by the KS400 system. Then a binary image, contrasting the vaginal epithelium, was selected and an algorithm especially written for this purpose determined the values of minimum, maximum and three randomly chosen areas automatically.

For the final analysis we defined the variable “final mean“ as the arithmetic mean of the sum built up from the minimum value, maximum value and three randomly values of epithelial thickness.

In our comparison between the two methods, we could clearly show the superiority of the test power based on the calculus done by interactive morphometry on digitized images. Since in these comparisons the case numbers and the proportions of the differences to be detected were identical, the latter can only be explained by a smaller variability of the measurements, or in other words greater precision of the measurements of an individual case.

In summary studies based on interactive morphometry of digitized images may reveal more test power and therefore provide more reliable results than investigations based on manual ocular micrometry.



*REFERÊNCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS*

BAHAMONDES, L.; PERROTTI, M.; CASTRO, S.; FAUNDES, D.; PETTA, C.;

BEDONE, A. – Forearm bone density in users of Depo-Provera as a contraceptive method. **Fertil. Steril.**, **71**:849-852, 1998.

BAHAMONDES, L.; TREVISAN, M.; ANDRADE, L.; MARCHI, N.M.; CASTRO,

C.; DIAZ, J.; FAUNDES, A. – The effect upon the human vaginal histology of the long-term use of the injectable contraceptive Depo-Provera.

**Contraception**, **62**:23-27, 2000.

BULTERYS, M.; CHAO, A.; HABIMANA, P.; DUSHIMIRNANA, A.; NAWROCKI,

P.; SAAH, A. - Incident HIV-I infection in a cohort of young women in Butare, Rwanda. **AIDS**, **8**:1585-91, 1994.

CALIARI, M.V. - Princípios de morfometria digital - KS300 para iniciantes.

**The New England J Med** **17**:133, 1997.

CONNOR, J.P.; FERRER, K.; KANE, J.P.; GOLDBERG, J.M. - Evaluation of

Langerhans cells in cervical epithelium of women with cervical intraepithelial neoplasia. **Gynecol Oncol**, **75**:130-135, 1999.

COSTELLO, D.C.; HELLING-GIESE, G.E.; MATI, J.K.; HUNTER, D.J. –

Contraceptive methods and the transmission of HIV: Implications for family planning. **Genitour Med**, **70**:110-117, 1994.

CULLINS, V.E. – Non contraceptive benefits and therapeutic uses of depot medroxyprogesterone acetate. **J Reprod Med**, 41:428-33, 1996.

FRASER, I.S.; WEISBERG, E. - A comprehensive review of injectable contraception with special emphasis on depot medroxyprogesterone acetate. **Med J Aust** 1: 1-20, 1981.

GONZALES, R.C. & WOODS, R.E. – **Processamento de imagens digitais**. São Paulo, Ed. Edgard Blücher Ltda. 2000, 509p.

HILD-PETITO, S.; VEAZEY, R.S.; LAMER, J.M.; REEL.JR.; BLYE. R.P.; - Effects of two progestin-only contraceptives, Depo-Provera and Norplant II, on the vaginal epithelium of rhesus monkeys. **Mas Res Human Retroviruses**, 1451:S125-130, 1998.

KAPIGA, S.H.; LYAMUYA, E.F.; LWIHULA, G.K.; HUNTER, D.J. - The incidence of HIV infection among women using family planning methods in Dar es Salaam, Tanzania. **AIDS**, 12:75-84, 1998.

KAUNITZ, A.M.&MISHELL, D.R.Jr. - Progestin-only contraceptives: current perspectives and future directions. **Dialogues Contracept**, 4:1-10, 1994.

KUHN, L.; DENNY, L.; POLLACK, A.; WRIGHT, T. - Prevalence of visible disruption of cervical epithelium and cervical ectopy in African women

using Depo-Provera. **Contraception**, **59**:363-367. 1999.

MARTIN, H.L.; NYANGE, P.M.; RICHARDSON, B.A.; MANDALIYA.K;  
JACKSON. DJ.; NDINYA-ACHOLA.JO.;KREISS.J.; - Hormonal contraception,  
sexually transmitted disease, and risk of heterosexual transmission of HIV-1. **J  
Infect Dis**, **178**:1053-1059, 1998.

MARX, P.A.; SPIRA, A.I.; GETTIE, A.; DAILEY, P.J.; VEAZEY, R.S.; –  
Progesterone implants enhance SIV vaginal transmission and early virus  
load. **Nat Med**, **102**:1083-1089, 1996.

MAUCK, C.K.; CALLAHAN, M.M.; BAKER, J.; et al. - The effect of one injection  
of Depo-Provera on the human vaginal epithelium and cervical ectropy.  
**Contraception**, **60**:15-24, 1998.

MILLER, L.; PATTON, D.L.; MEIER, A.; THWIN, S.S.; HOOTON, T.M.;  
ESCHENBACH, D.A.. - Depomedroxyprogesterone – induced  
Hypoestrogenism and Changes in Vaginal Flora and Epithelium.  
**Obstet Gynecol**, **96(3)**:431-9, 2000.

NAGACHINTA, T.; DUERR, A.; SURIYANON, V.; NANTACHITT,N.; RUGPAO.  
S.; WANAPIRAK. C.; SRISOMBOON.J.; , KAMTORN.N.; TOVANABUTRA.S.;  
MUNDEE.Y. YUTRABUTR.Y.; KAEWVICHIT. R.; RÚNGRUENGTHANAKIT.R.;

BOER. M.;TANSUHAJ. A.; FLOWERS. F.;KHAMBOONRUANG. C.;  
CELENTANO.D.; AND NELSON. E.KENRAD.- Risk factors for HIV-1

transmission from HIV–seropositive male blood donors to their regular  
female partners in North Thailand. **AIDS**, **11**:1765-72, 1997.

OBERHOLZER, M. - **Morphometrie in der klinischen Patologie –**

**Algemeine Grundlagen**. 1<sup>a</sup> ed. Heidelberg, Springer-Verlag. 1963, 251p.

ORR-WALKER, B.J.; EVANS, M.C.; AMES, R.W.; CLEARWATER, J.M.;

CUNDY, T.; REID, I.R. - The effect of past use of the injectable  
contraceptive depot medroxyprogesterone acetate on bone mineral  
density in normal post-menopausal women.

**Clin Endocrinol**, **49**:615-618, 1998.

PERROTTI, M.; BAHAMONDES, L.; PETTA, C.; CASTRO, S. – Forearm bone

density in long-term users of oral combined contraceptives and depot  
medroxyprogesterone acetate. **Fertil Steril**, **76**:469-473, 2001

REHLE, T.; BRINKMANN, U.K.; SIRAPRAPASIRI, T.; - Risk factors of

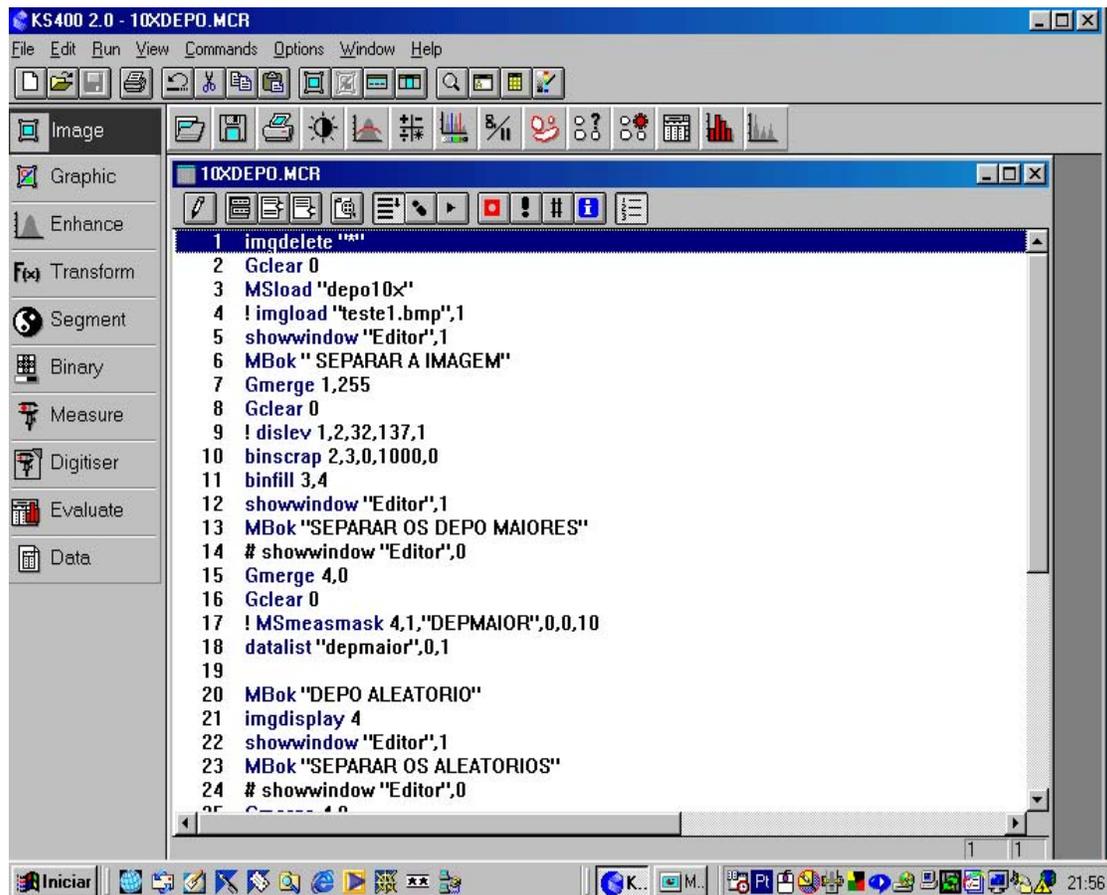
HIV-1 infection among female prostitutes in Khon Kaen, Northeast  
Thailand. **Infection**, **20**:328-331, 1992.

RINGROSE, C.A. - Effects of medroxyprogesterone acetate employed as a  
long-term injectable contraceptive. **J Report Med.**, **8**:75-9, 1972.

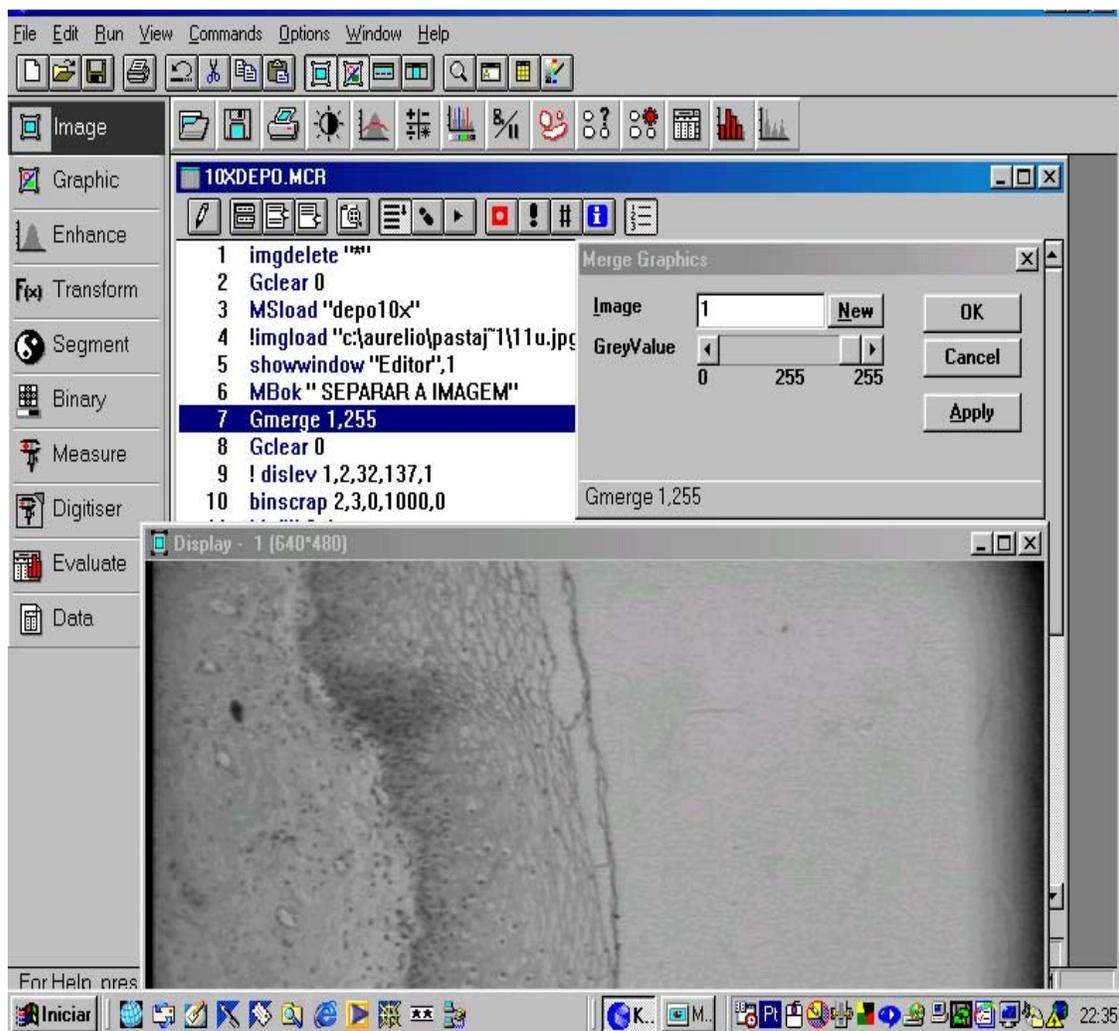
- SAID, S.; ORNAR, K.; KOETSAWANG, S.; - A multicentered phase III comparative clinical trial of depot medroxyprogesterone acetate given three monthly at doses of 100 mg or 150 mg: I. Contraceptive efficacy and side effects. **Contraception**, **34**:223-35, 1986.
- SCHOLES, D.; LACROIX, A.Z.; OTT, S.M.; ICHIKAWA, L.E.; BARLOW, W.E. – Bone mineral density in women using depot medroxyprogesterone acetate for contraception. **Obstet Gynecol.**, **93**:233-8, 1999.
- SCHWALLIE, P.C.; ASSENZO, J.R.. - Contraceptive use- efficacy study utilizing medroxyprogesterone acetate administered as an intramuscular injection once every 90 days. **Fertil Steril**, **24**:331-9, 1973.
- SOTO-RAMIREZ, L.E.; RENJIFO, B.; MCLANE, M.F.; MARLINK, R.; O'HARA, C.; SUTTHENT, R.; WASI, C.; VITHAYASAI, P.; VITHAYSAI, V.; APICHARTPIYAKUL, C.; AUEWARAKUL, P.; CRUZ, V.P.; CHUI, D.S.; OSATHANONDH, R.; MAYER, K.; LEE, T.H.; ESSEX, M. - HIV-1 Langerhan's Cell Tropism Associated With Heterosexual Transmission of HIV. **Science**:271, 1996.
- UNGCHUSAK, K.; REHLE, T.; THAMMAPORNPILAP, P.; SPIEGELMAN, D.; BRINKMAN, U.; SIRAPRAPASIRI, T.. - Determinants of HIV infection among female commercial sex workers in Northeast Thailand: results from a longitudinal study. **J Acquir Immun Defic Syndr**, **12**:500-507, 1996.



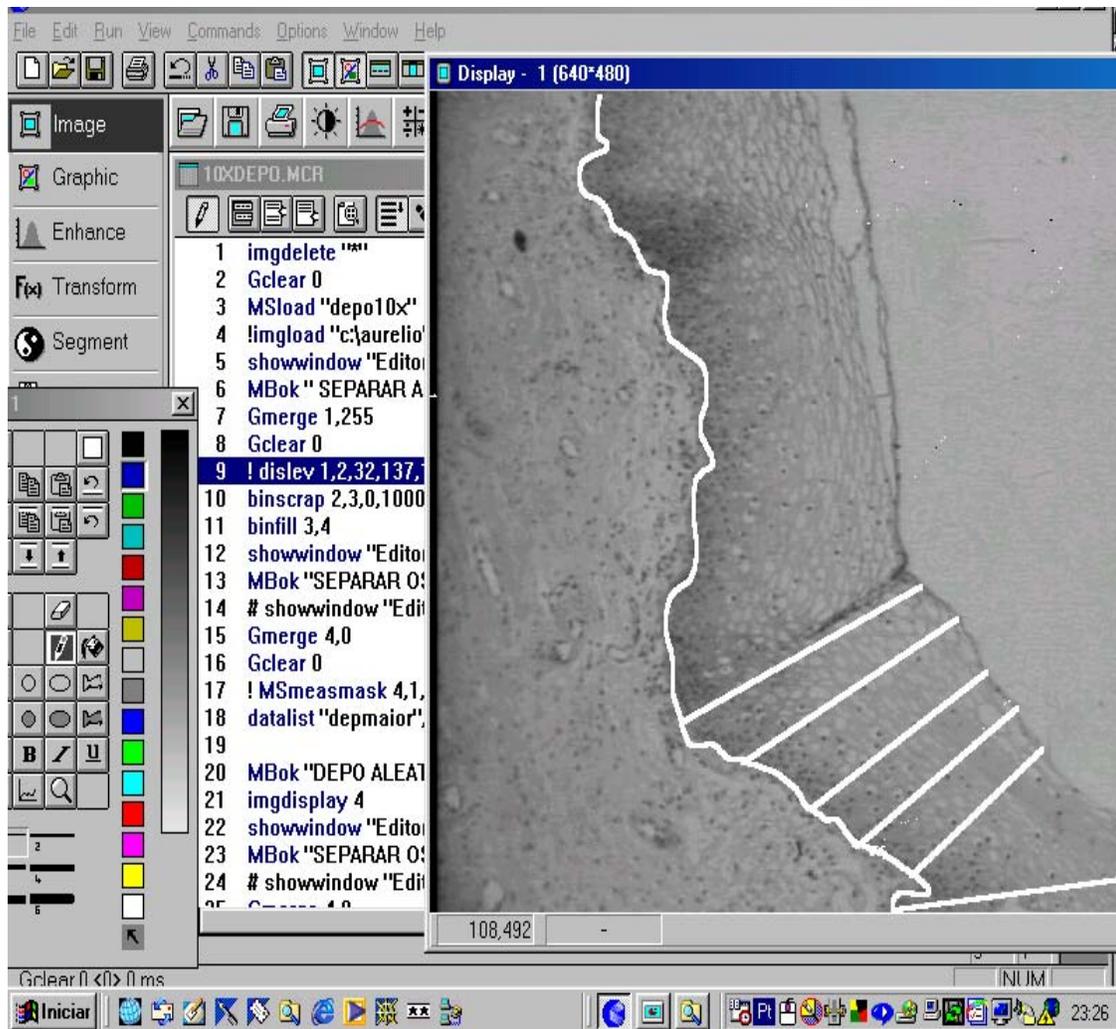
*APÊNDICES*



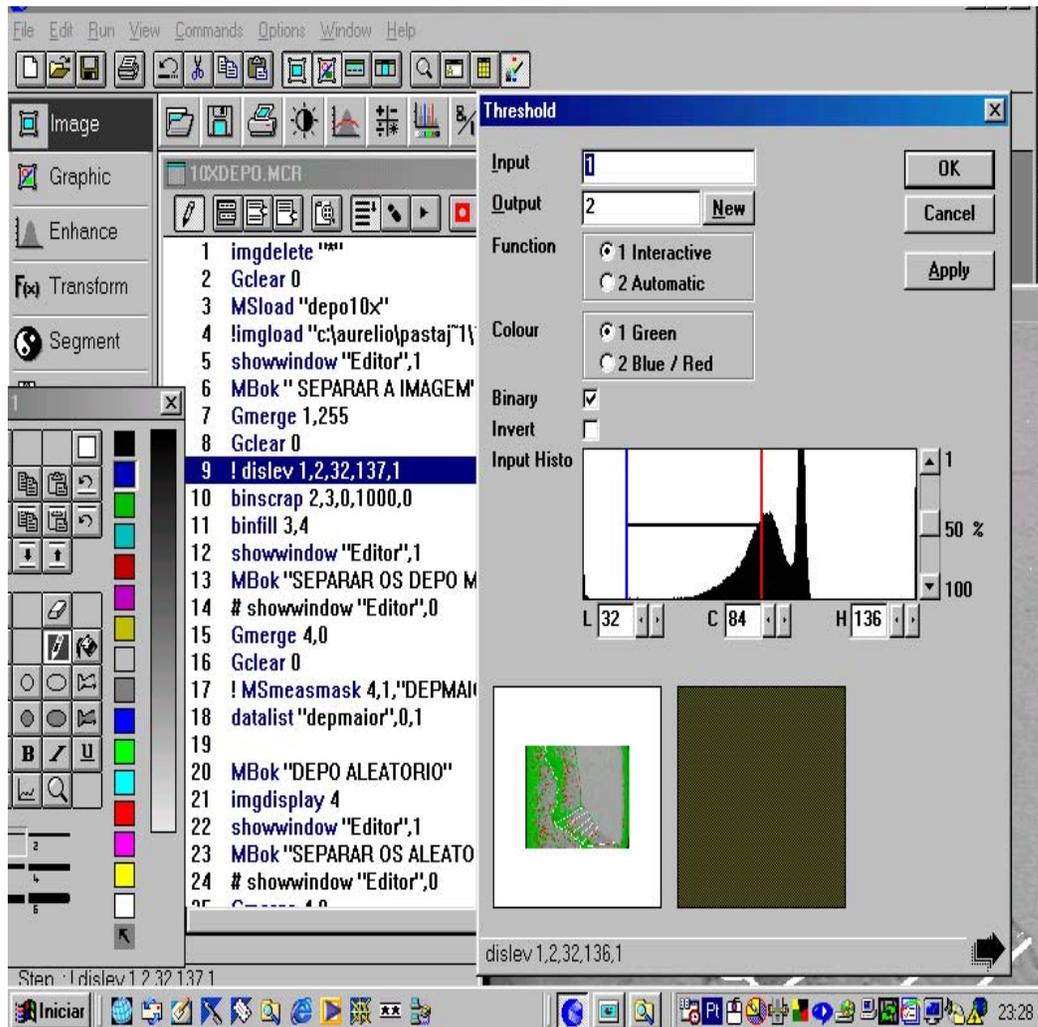
**Imagem 1:** Programa KS400, mostrando os passos pré-estabelecidos de uma 'macro'.



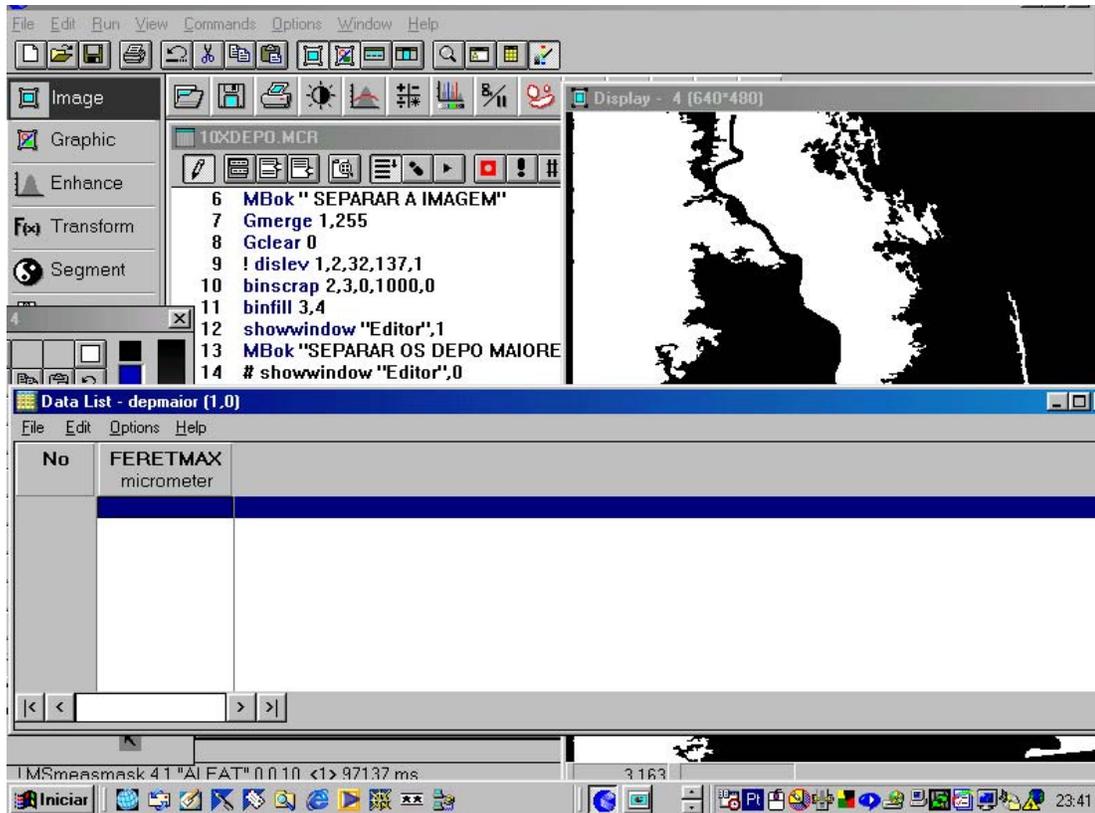
**Imagem 2:** Tela do computador que mostra área com artefato, que deverá ser excluída do processo, por ser imprópria para à medição.



**Imagem 3:** A ‘macro’ avança e mostra a execução da função “dislev”, que favorece demarcar regiões na imagem, excluindo defeitos. (item 9).



**Imagem 4:** Passo seqüente, o histograma que permite a segmentação(binarização).



**Imagem 5:** Mostra a binarização da imagem, que é a sua transformação em linguagem computacional ou de máquina. Reduz a imagem ao pixel, sua forma mais primitiva. Abaixo, tabela para aonde os valores numéricos migram automaticamente, a cada operação executada pela 'macro'.