

ALESSANDRA CACHUTÉ PELOGGIA PINTO

**QUIMIOCIAS ENDOMETRIAIS, CÉLULAS *NATURAL KILLER*
UTERINAS E MASTÓCITOS EM USUÁRIAS DO SISTEMA
INTRA-UTERINO LIBERADOR DE LEVONORGESTREL COM E
SEM SANGRAMENTO UTERINO NO TERCEIRO ANO DE USO**

Tese de Doutorado

ORIENTADOR: Prof. Dr. CARLOS ALBERTO PETTA

**Unicamp
2006**

ALESSANDRA CACHUTÉ PELOGGIA PINTO

**QUIMIOCIAS ENDOMETRIAIS, CÉLULAS *NATURAL KILLER*
UTERINAS E MASTÓCITOS EM USUÁRIAS DO SISTEMA
INTRA-UTERINO LIBERADOR DE LEVONORGESTREL COM E
SEM SANGRAMENTO UTERINO NO TERCEIRO ANO DE USO**

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

ORIENTADOR: Prof. Dr. CARLOS ALBERTO PETTA

**Unicamp
2006**

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

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

P658q Pinto, Alessandra Cachuté Pelligia
Quimiocinas endometriais, células natural *killer* uterinas e mastócitos em usuárias do sistema intra-uterino liberador de levonorgestrel com e sem sangramento uterino no terceiro ano de uso / Alessandra Cachuté Pelligia Pinto. Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador :Carlos Alberto Petta
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Quimiocinas. 2. Leucócitos. 3. Mastócitos. 4. Dispositivo intra-uterino. 5. Levonorgestrel. I. Petta, Carlos Alberto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluna: ALESSANDRA CACHUTÉ PELOGGIA PINTO

Orientador: Prof. Dr. CARLOS ALBERTO PETTA

Membros:

1.

2.

3.

4.

5.

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

Data: 10/04/2006

Dedico esta tese...

*... aos meus pais, Nestor e Elenilce,
pelo exemplo de disciplina, caráter, dignidade e amor.*

*...ao meu marido Rovilson,
pela paciência e compreensão, pelo amor e carinho,
e pelo significado em minha vida.*

*...aos meus filhos Guilherme e Maria Eduarda,
pela alegria e pelos momentos mágicos de nossas vidas.*

*...à minha irmã Camila,
pelo carinho, apoio e companheirismo.*

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Petta, pelo apoio e incentivo na realização deste estudo.

Ao Prof. Dr. Luis Bahamondes, grande incentivador e exemplo de profissionalismo.

À Dra. Lois Salamonsen, grande pesquisadora, pela paciência e desinteressada ajuda durante a realização deste trabalho no seu laboratório em Melbourne, Austrália.

À grande companheira Jin Zhang, pela atenção e carinho durante a realização da parte prática deste trabalho.

À Profa. Dra. Liliana Aparecida L. De A. Andrade, pelo exemplo de mulher e paciência nas suas orientações.

À companheira Marília Oliveira Ribeiro, que iniciou parte deste trabalho.

Às companheiras de laboratório do Prince's Henry Institute, que em nenhum momento deixaram faltar o espírito familiar durante as minhas atividades.

Às enfermeiras do Ambulatório de Reprodução Humana, pelo companheirismo e apoio durante a realização deste estudo.

Às amigas Verônica, Adriana, Luzia.....

A toda minha família, sogro,sogra, cunhados, Jacinta... pelo apoio e carinho.

A todos os amigos, professores, médicos e funcionários que auxiliaram na realização deste trabalho e cujos nomes deixo de citar, mas que ao lerem estas palavras incorporarão estes sinceros agradecimentos.

Às mulheres que participaram deste estudo, que a contribuição delas possa reverter numa melhoria da qualidade de vida da nossa população.

*“Por meio do trabalho as mãos dos homens podem dar
forma à vontade divina, construir a beleza e a
harmonia, mover-se com graça e perfeição,
ser instrumentos de espíritos criadores sublimes.”*

Trigueirinho

**ESTUDO PARCIALMENTE PATROCINADO PELA
FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO
DE SÃO PAULO (FAPESP) - FAPESP #03/083917**

E

**NATIONAL HEALTH AND MEDICAL RESEARCH
COUNCIL OF AUSTRALIA (#143798,#241000) THE
NIH (GRANT HD43192) AND THE WORLD HEALTH
ORGANIZATION HUMAN REPRODUCTION
PROGRAM (##15208)**

Sumário

Símbolos, Siglas e Abreviaturas	x
Resumo	xi
Summary	xiii
1. Introdução	15
1.1. Leucócitos Endometriais	28
1.1.1. Neutrófilos	28
1.1.2. Eosinófilos	28
1.1.3. Monócitos/Macrófagos	29
1.1.4. Mastócitos	29
1.1.5. Linfócitos B e Linfócitos T	30
1.1.6. Linfócitos Granulares Endometriais (Células <i>Natural Killer</i>)	31
2. Objetivos	37
2.1. Objetivo geral	37
2.2. Objetivos específicos	37
3. Publicação	38
4. Conclusões	44
5. Referências Bibliográficas	45
6. Bibliografia de Normatizações	56
7. Anexos	57
7.1. Anexo 1 – Ficha para coleta de dados	57
7.2. Anexo 2 – Consentimento livre e esclarecido	61

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

AMP-D: Acetato de Medroxiprogesterona de depósito

DIU: Dispositivo intra-uterino

IL-1: Interleucina –1

IL-8: Interleucina –8

ITMPs: Inibidores teciduais de metaloproteinases

LNG: Levonorgestrel

MMP: Metaloproteinases

NET: Noretisterona

PCE: Proteínas catiônicas eosinofílicas

RE: Receptores de estrógenos

RP: Receptores de progestógenos

SIU-LNG: Sistema intra-uterino liberador de levonorgestrel

Unicamp: Universidade Estadual de Campinas

Resumo

As alterações no padrão de sangramento são praticamente universais em usuárias de métodos contraceptivos contendo somente progestógenos, sendo uma importante causa de descontinuação destes métodos. Este estudo foi desenvolvido com o intuito de se avaliar as quimiocinas Interleucina 8 e 6 *CKine* no endométrio de usuárias do sistema intra-uterino liberador de levonorgestrel e correlacioná-las com as populações de leucócitos, células *natural killer* uterinas e mastócitos. Amostras de endométrio foram obtidas de dois grupos de usuárias do sistema intra-uterino liberador de levonorgestrel: 11 mulheres em amenorréia e 15 mulheres com algum tipo de sangramento. Os leucócitos foram determinados através de anticorpos específicos para neutrófilos, células *natural killer* uterinas e mastócitos. Foi realizada imuno-histoquímica para identificação das quimiocinas. Os neutrófilos encontravam-se em pequeno número, não havendo diferença entre os dois grupos. As células *natural killer* uterinas encontravam-se em número maior no grupo com sangramento ($p < 0,0001$). Não houve diferença entre o número total de mastócitos e mastócitos ativados, porém houve um aumento da área extracelular positiva para triptase ($p < 0,05$) nas mulheres com sangramento. As quimiocinas Interleucina-8 e 6 *CKine* mostravam-se abundantes no estroma e no

epitélio, não havendo diferença entre os dois grupos. Houve maior número de células *natural killer* uterinas e maior área extracelular positiva para triptase em pacientes que apresentavam sangramento. Apesar de não haver diferença entre o número total de mastócitos e mastócitos ativados e das quimiocinas Interleucina-8 e *6CKine*, as células *natural killer* uterinas e os produtos dos mastócitos podem ter exercido papel importante na perda da integridade endometrial em usuárias do sistema intra-uterino de levonorgestrel.

Summary

Changes in the bleeding pattern are almost universal in women using progestin-only methods of contraception, and are a frequent cause of discontinuation of these methods. The present study was designed to assess endometrial chemokines in users of the Levonorgestrel intrauterine system and correlate them with leukocyte populations, uterine natural killer cells, and mast cells. Endometrium was obtained from two groups of Levonorgestrel intrauterine users: 11 amenorrhoeic women and 15 women with some form of bleeding pattern. Leukocytes were assessed using specific antibodies for neutrophils, uterine natural killer cells and mast cells. Immunohistochemistry was performed to locate chemokines 6CKine and Interleukin-8. Neutrophils were few and without differences between the two groups. Uterine natural killer cells were significantly higher in the bleeding group ($p < 0.0001$). There was no difference between the total number of mast cells and activated mast cells but there was a greater extracellular area stained for mast cell tryptase ($p < 0.05$) in women with bleeding. Chemokines 6CKine and Interleukin-8 were abundant in the stroma and in the epithelium and there was no difference between the groups. We observed more uterine natural killer cells in users with bleeding, and a greater

extracellular area stained for mast cell tryptase, although there were no differences between the number of mast cells and activated mast cells or the chemokines 6CKine and Interleukin-8. Uterine natural killer cells and mast cells products may play a role in provoking break-through bleeding in long term users of the levonorgestrel intrauterine system.

1. Introdução

Os anticoncepcionais, contendo somente progestógenos, são usados por um número estimado de 20 milhões de mulheres em todo o mundo. Recentes avanços tecnológicos nos sistemas de liberação têm contribuído para o aumento da validade e aceitabilidade dos métodos com progestógenos de longa ação (Hickey *et al.*, 1999). Estes anticoncepcionais têm em comum a alta eficácia e a propriedade de agir por longo tempo, o que facilita seu uso (D'arcangues, 2000).

A maior limitação para o uso destas preparações tem sido a ocorrência de distúrbios nos padrões do sangramento menstrual, particularmente nos primeiros meses de uso (D'arcangues *et al.*, 1992; Fraser e Hickey, 2000).

Estas alterações menstruais variam desde a amenorréia, *spotting* ou sangramento irregular e leve até o fluxo sangüíneo prolongado e freqüente (Belsey *et al.*, 1986; Fraser, 1999). O sangramento volumoso é raro, embora episódios prolongados de sangramento leve possam provocar grande perda sangüínea, maior do que a mulher apresentaria durante os seus ciclos menstruais normais (Fraser e Hickey, 2000).

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

O sangramento uterino anormal não apenas reduz o uso destes medicamentos, mas pode restringir as opções anticonceptivas válidas para estas mulheres, reduzindo até mesmo a qualidade de vida das mesmas (Smith, 2000). Além disso, pode tornar insatisfeita a mulher que considera seu padrão menstrual como parâmetro de sua saúde reprodutiva, além da dimensão sociocultural que o sangramento uterino representa na vida destas mulheres (D'arcangues, 2000).

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

Nos últimos cinco anos, significativos avanços ocorreram na tentativa de identificar os mecanismos determinantes destes distúrbios de sangramento. No entanto, permanecem inúmeras dúvidas que exigem novos estudos. O aumento do conhecimento na área auxiliará no tratamento e na prevenção do sangramento endometrial imprevisível (Smith, 2000).

O uso de terapêuticas como estrogênios, anticoncepcionais orais combinados, progestógenos, antiinflamatórios não esteróides, vitaminas, ferro e ansiolíticos, algumas vezes podem ser eficazes a curto prazo, mas não alteram a frequência de episódios de sangramento/*spotting* e podem estar associados à ocorrência de outros efeitos colaterais (D´Arcanges, 2000).

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

Os contraceptivos contendo somente progestógenos pertencem a dois grandes grupos: os derivados da 19-norprogesterona e da 17-hidroxiprogesterona (acetato de medroxiprogesterona). As 19-norprogesteronas são divididas entre os derivados da progesterona (acetato de nomegestrol) e os da testosterona (levonorgestrel, etonogestrel e a noretisterona) (Hague *et al.*, 2002).

Dentre os anticoncepcionais contendo somente progestógenos de longa duração, encontra-se o acetato de medroxiprogesterona na forma de depósito (AMP-D), aprovado para uso em 1992, pelo *Food and Drug Administration* –

EUA. Estima-se que 13 milhões de mulheres sejam usuárias deste método para anticoncepção (D'Arcangues,2000).

Recentemente, passou a ser comercializado no Brasil o Implanon® (Organon, Holanda), um implante subdérmico com haste única contendo um sistema liberador de etonogestrel de 68mg e menos androgênico que o levonorgestrel (LNG) (Croxatto e Mäkäräinen, 1998).

Outros métodos contendo somente progestógenos incluem três sistemas de liberação prolongada de LNG. O implante subdérmico com seis hastes de silástico - Norplant® (Leiras Oy, Turku, Finlândia) - aprovado desde 1983 na Europa, mas não comercializado no Brasil, vem sendo usado por cerca de seis milhões de mulheres no mundo. O Jadelle®, outro implante subdérmico mais recentemente desenvolvido, contém duas hastes liberadoras da mesma quantidade de LNG das seis cápsulas do Norplant (Robertson *et al.*, 1983). O terceiro deles, o sistema intra-uterino liberador de 20µg diárias de levonorgestrel (SIU-LNG) é utilizado por cerca de um milhão de mulheres no mundo (D'Arcangues, 2000).

Estudos para a administração intra-uterina do LNG tiveram início no começo dos anos 70 (Scommegna *et al.*, 1970; El Mahgoub, 1975; Nilsson *et al.*, 1975). O SIU-LNG para contracepção foi desenvolvido por Luukkainen e Nilsson (1978), com o apoio do Population Council e do International Committee for Contraception Research. O produto final foi elaborado por Leiras Oy Pharmaceutical, Turku, Finlândia, e lançado em 1990. Atualmente é comercializado

na maior parte da Europa, nos EUA, em alguns países asiáticos e no Brasil, onde está disponível com o nome Mirena® (Schering, AG, Berlin).

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

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

Outras aplicações incluem casos de dismenorréia severa (Puolakka, Nilson, Haukkamaa, 1996), no alívio da dor associada à endometriose (Vercellini *et al.*, 1999; Lockhat *et al.*, 2005; Petta *et al.*, 2005) e no tratamento da endometriose do septo retovaginal (Fedele *et al.*, 2001).

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

O LNG liberado na cavidade endometrial é rapidamente absorvido pelos capilares para a circulação sistêmica. No entanto, a concentração sérica é menor que a observada em usuárias de implantes subcutâneos de LNG (NORPLANT®), contraceptivos orais combinados e minipílulas. A produção de estradiol não é alterada, permanecendo semelhante à do ciclo menstrual normal (Nilsson *et al.*,1984; Barbosa *et al.*,1995), correlacionando com a elevação inicial da concentração sérica do LNG (Xiao *et al.*,1995).

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

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

Nas mulheres que optam pelo uso do SIU-LNG, quando orientadas sobre a possibilidade de sangramento uterino imprevisível, o método é mais aceito e

as taxas de continuação anuais giram em torno de 75% (Nilsson et al.,1981; Faúndes et al.,1993; Diaz *et al.*, 2000).

Um estudo recente mostrou que a maioria das usuárias de SIU-LNG (74%) estava muito satisfeita, sendo que 70% haviam escolhido este método devido à insatisfação com a forma de anticoncepção anterior. A satisfação da usuária foi maior quando recebia informações, no dia da inserção, sobre possíveis alterações menstruais, sobretudo a ocorrência de amenorréia; aumento da oleosidade da pele e cabelos, risco de gravidez e doença inflamatória pélvica (Backman *et al.*, 2002).

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

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

A maior razão para o descontentamento com o uso do SIU-LNG e que constitui a causa mais comum de descontinuação é o sangramento uterino imprevisível (Luukkainen *et al.*, 1986; Ji *et al.*, 1990; Sivin *et al.*, 1990). A frequência dos episódios de sangramento é geralmente alta durante os primeiros três a seis meses após a inserção, com gradual melhora com a exposição contínua (Fraser

et al., 1996). A porcentagem de mulheres com oligo ou amenorréia foi de cerca de 30% no primeiro ano, em estudo realizado por Ji *et al.*, (1990).

Outro estudo mostrou que, nos seis primeiros meses de uso, 44% das mulheres relataram amenorréia e esta taxa estabilizou-se em 50% entre 12 a 24 meses de uso. O *spotting* ocorreu em 25% das usuárias em seis meses e diminuiu para 8% e 11% aos 18 e 24 meses de uso, respectivamente. A oligomenorréia ocorreu em um quarto das mulheres e esta taxa permaneceu igual em dois anos de observação. A menorragia e os ciclos regulares ocorreram em poucas mulheres após seis meses de uso (Hidalgo *et al.*, 2002).

Assim como ocorre com os outros métodos anticoncepcionais contendo somente progestógenos, os mecanismos do sangramento anormal não são bem conhecidos. Entretanto, sabe-se que o SIU-LNG induz a uma rápida e dramática diferenciação do endométrio (Nilsson *et al.*, 1978; Silverberg *et al.*, 1986). Estas mudanças são consistentes com a transformação mediada pela progesterona, observada durante a fase secretória do ciclo menstrual normal e na gestação. As alterações morfológicas incluem decidualização extensa do estroma, infiltração leucocitária, atrofias glandular e da superfície epitelial, além de alterações vasculares. A atividade secretória das glândulas epiteliais cessa e a função proliferativa do endométrio é inibida. Isto resulta em um afinamento generalizado das camadas funcionais do endométrio. Estas características de supressão endometrial estão presentes desde o primeiro até o sétimo ano de uso do SIU-LNG (Silverberg *et al.*, 1986).

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

Após três meses de uso do SIU-LNG, ocorre aumento da apoptose nas glândulas endometriais e no estroma, o que se associa ao aumento da expressão do antígeno Fas (também chamado CD95 ou Apo1), o qual é considerado um mediador de apoptose nas células hematopoéticas. Também se observa diminuição da proliferação endometrial associada à diminuição da proteína Bcl-2, que atua prevenindo a apoptose celular. Talvez estes sejam alguns dos mecanismos moleculares pelos quais a inserção do SIU-LNG cause a mudança atrófica do endométrio (Maruo *et al.*, 2001).

Os derivados da 19-nortestoterona como a norestisterona (NET) e LNG apresentam maiores efeitos no estroma, produzem maior decidualização e, conseqüentemente, maior atrofia do que os derivados da progesterona (Dallenbach-Hellweg, 1980). Em alguns casos a atrofia é extrema, observando-se presença de fibrose e calcificação (Silverberg *et al.*, 1986). Estas mudanças morfológicas ocorrem rapidamente, com perda da atividade cíclica após um

mês da inserção do SIU-LNG, embora, no início, algumas regiões do endométrio apresentem aparência secretória (Pekonen *et al.*, 1992).

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

Micropólipos endometriais vêm sendo identificados como resultado da exposição prolongada intra-uterina ao LNG, havendo um número significativamente maior quando o SIU-LNG permanece, pelo menos quatro anos (Silverberg *et al.*, 1986), o que explicaria o sangramento uterino anormal nestas mulheres, as quais não apresentam pólipos no momento da inserção do dispositivo. Qualquer novo padrão de sangramento, após a ocorrência de amenorréia ou a persistência de sangramento volumoso, deve fazer pensar em causa orgânica, como os pólipos endometriais (Brechin *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2002).

Um estudo com mulheres usuárias de baixas doses de progestógeno para anticoncepção (noretisterona 300µg/dia), observou mudanças histológicas endometriais não correlatas com a atividade ovariana. Em mulheres sem atividade folicular o endométrio apresentou, ocasionalmente, atividade proliferativa, apesar dos níveis baixos de estradiol circulante. Naquelas com atividade folicular, com altos níveis de estradiol, o endométrio variou da supressão proliferativa até

a atrofia. Com ovulação normal houve variação entre atrofia, supressão proliferativa, atividade secretória irregular e suprimida ou normal (Kim-Bjorklund *et al.*, 1991).

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

Baixas doses de progesterona também afetam os vasos endometriais, havendo diminuição no número de artérias na junção miométrio-endométrio e aumento no número e na dilatação de veias (Ludwig, 1982; Johannisson *et al.*, 1991).

Há muitos anos sabe-se que vasos anormais desenvolvem-se no endométrio de mulheres expostas à ação progestogênica, porém apenas recentemente pesquisadores começaram a compreender as mudanças estruturais e funcionais dos microvasos endometriais (Hickey e Fraser, 2000). Tipicamente, ocorre redução no número e tamanho das arteríolas espiraladas, bem como diminuição da tortuosidade destes vasos. Além disso, ocorre aumento no número dos microvasos endometriais em usuárias de progestógenos de baixas doses (Hourihan *et al.*, 1986).

Nos vasos superficiais são observadas paredes finas e dilatadas (Hourihan *et al.*, 1986; Song *et al.*, 1996). O papel destes vasos é incerto, pois na avaliação histológica eles não contêm hemácias e existe dificuldade para confirmar dilatação vascular *in vitro* devido ao colapso rápido dos vasos (Rogers *et al.*, 1993).

Um dos primeiros estudos que relaciona o antigo DIU liberador de 65µg/dia de progesterona (Progestasert) com os microvasos da superfície endometrial, avaliados por microscopia eletrônica, relata que estes se encontravam com número significativamente diminuído. Além disso, verificaram que havia um número maior de vasos com alterações degenerativas, quase três vezes mais que os controles, porém estes não apresentavam inibição na resposta hemostática. Concluíram que a manutenção da hemostasia atua reduzindo a perda sanguínea através dos vasos lesados (Shaw *et al.*, 1981).

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

Experiências em animais sugerem que a inibição da angiogênese pode prevenir o completo desenvolvimento endometrial (Klauber *et al.*, 1997) e o uso futuro destes agentes talvez previna o aparecimento destes vasos anormais e

frágeis, evitando o sangramento endometrial imprevisível em usuárias de progestógenos de ação prolongada (Fraser e Hickey, 2000; Hague *et al.*, 2002).

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

Existe um aumento no número total de leucócitos no endométrio previamente à menstruação, onde constituem mais de 40% do número total de células dentro do compartimento estromal (Salamonsen e Woolley, 1999). Em particular, as células da linhagem mielóide (neutrófilos, eosinófilos, macrófagos ou monócitos) são abundantes. Os mastócitos encontram-se altamente ativados, liberando componentes granulares ao microambiente local.

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

1.1. Leucócitos Endometriais

1.1.1. Neutrófilos

Os neutrófilos correspondem à população de leucócitos mais abundante no sistema imune humano, sendo que estão associadas à destruição dos tecidos nos distúrbios inflamatórios. Essas células são identificadas no tecido endometrial através de sua morfologia e da imunolocalização da sua protease específica, a elastase. Durante a maior parte do ciclo, os neutrófilos são pouco encontrados, porém seu número aumenta consideravelmente na fase perimenstrual, representando 6% a 15% do número total de células neste período (Salamonsen e Woolley, 1999). Os neutrófilos também foram encontrados em grande número em áreas de colapso estromal no endométrio de pacientes tratadas com altas doses de progestógeno oral (Song *et al.*, 1996) bem como em usuárias de implante com levonorgestrel (Norplant®; The Population Council, New York, NY, USA) (Vincent *et al.*, 1999), onde atingiram densidades semelhantes às encontradas no endométrio menstrual.

1.1.2. Eosinófilos

Os eosinófilos funcionam como células efetoras que desempenham um importante papel na patogênese da reação inflamatória do tipo tardia, sendo detectados no endométrio humano através da imunolocalização das proteínas catiônicas eosinofílicas (PCE1 e PCE2). Semelhante aos neutrófilos, os eosinófilos estão praticamente ausentes durante a maior parte do ciclo menstrual, mas

próximo à menstruação, existe aumento importante do seu número no tecido endometrial. A maioria deles é encontrada agregada e a localização extracelular das proteínas sugere a ativação destas células (Jeziorska *et al.*, 1995).

1.1.3. Monócitos/Macrófagos

Os macrófagos são monócitos diferenciados, os quais migram da corrente sanguínea. Estas células estão relacionadas com processos inflamatórios crônicos, sendo encontradas também em locais de remodelação tecidual. Os macrófagos estão presentes ao longo do ciclo menstrual com aumento do número da fase proliferativa até a fase menstrual (Bonatz *et al.*, 1992).

Os macrófagos encontram-se espalhados através do tecido, com algumas células agregadas e outras se concentrando ao redor das glândulas endometriais (Song e Fraser, 1995). Encontra-se também um número aumentado de macrófagos no endométrio de usuárias de Norplant® (Clark *et al.*, 1996), particularmente nos tecidos de mulheres com sangramento uterino anormal.

1.1.4. Mastócitos

Os mastócitos secretam muitas moléculas vasoativas, pró-inflamatórias e participam do processo inflamatório através da vasodilatação e aumento da infiltração leucocitária, bem como causam a lesão tecidual devido à liberação de proteases. Os mastócitos são encontrados ao longo do ciclo menstrual, sendo detectados por imuno-histoquímica através das proteinases específicas triptase

e quimase, sendo que a localização extracelular da enzima triptase é indicativa de ativação (Jeziorska *et al.*, 1995). Além disso, os mastócitos parecem regular a produção e ativação de metaloproteinases pelas células estromais endometriais *in vitro*, postulando assim, o seu envolvimento na regulação da ação das metaloproteinases na menstruação (Zhang *et al.*, 1998).

As proteases estão localizadas no endométrio, porém em regiões diferentes. A camada basal expressa as duas enzimas, contudo a camada funcional é positiva somente para a triptase (Jeziorska *et al.*, 1995). Apesar de ser a camada funcional que descama na menstruação, existe uma destruição considerável na interface das camadas basal e funcional, e assim, as duas enzimas podem contribuir para a menstruação. De maneira geral, a triptase pode exercer um importante papel em estabelecer a cascata de ativação das metaloproteinases, e isto pode representar uma função crucial destas células na menstruação.

1.1.5. Linfócitos B e Linfócitos T

Os linfócitos T apresentam-se, no endométrio, em número muito menor que os demais leucócitos (1% a 2% do total de células linfomielóides) e são encontradas em três sítios: no endométrio basal, no estroma e no epitélio. Seu número aumenta no pré-mênstruo, mas ao contrário do que ocorre no sangue periférico, as células T *helper* encontram-se em maior número que as T citotóxicas. A progesterona determina uma diminuição da atividade citolítica dos linfócitos T.

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

1.1.6. Linfócitos Granulares Endometriais (Células *Natural Killer*)

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

As células *natural killer* uterinas derivam das células *natural killer* da circulação periférica, as quais, sob ação hormonal, são recrutadas no útero, sendo encontradas em grande número em amostras de endométrio altamente decidualizado (Dosiou e Giudice, 2005).

São identificadas por imuno-histoquímica (CD56), sendo que as células são encontradas dispersas no estroma e em localizações intra-epiteliais, estando muito envolvidas com o trofoblasto. A partir da vigésima semana de gestação, quando a invasão trofoblástica já está completa, começa a haver um declínio das células *natural killer* uterinas, até não serem mais detectadas na decídua. O estímulo para a presença de tantas células *natural killer* uterinas ainda não foi compreendido. Em humanos, estas células estão presentes antes da implantação e também em endométrios não gravídicos, onde o número destas células varia de acordo com a fase do ciclo menstrual (Trundley e Moffett, 2004).

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

Fig. 1. Distribuição relativa de células inflamatórias específicas no endométrio funcional nos três estágios do ciclo menstrual normal, onde -, +, ++, +++ representam valores de 0, 1 - 2, 3 - 5 e 6 – 15% do total de células respectivamente. Somente macrófagos e mastócitos apresentam distribuição uniforme durante o ciclo; as demais células usualmente apresentam distribuição focal nos dias 26-28 imediatamente antes da menstruação (modificado de Salamonsen e Woolley, 1999).

Como os leucócitos penetram no endométrio ainda não se sabe, mas foi proposto um papel para as quimiocinas, potentes citocinas quimioatrativas que promovem o recrutamento de múltiplas linhagens de leucócitos e as quais atuam através de receptores específicos nas células atraídas (Kunkel *et al.*, 1995). A regulação da produção destas quimiocinas permanece pouco compreendida, mas a grande maioria é estimulada pela Interleucina 1 (IL-1) e inibida pelos glicocorticóides (Bem-Baruch *et al.*, 1995). Devido à grande similaridade estrutural entre a progesterona e os glicocorticóides e os seus receptores, é bem provável

que a progesterona possa atuar em tecidos dependentes da progesterona de uma maneira similar que os glicocorticóides em outros tecidos.

Dentre as nove quimicinas abundantemente expressas no endométrio humano, durante as diferentes fases do ciclo menstrual, Jones *et al.*, 2004 revelaram a expressão da 6CKine em níveis moderado/baixo, nas fases menstrual, proliferativa e fase média secretória, ao passo que a IL-8 estava expressa potencialmente somente na fase menstrual.

A Interleucina 8 (IL-8) é um quimioatrativo e ativador dos neutrófilos, bem como exerce atividade quimiotática para células T e fibroblastos. Em um estudo de tecido endometrial esta quimiocina estava localizada em células perivasculares dos vasos sanguíneos, aumentando significativamente na fase secretora tardia (Critchley *et al.*, 1994; Jones *et al.*, 1997). Contudo, em resultados de outro laboratório, a área mais marcante foi detectada na superfície epitelial e nas glândulas, com menor intensidade nas paredes do vaso e absolutamente nada no estroma (Arici *et al.*, 1998).

A imunoexpressão da IL-8 em usuárias de SIU-LNG foi previamente relatada por Jones *et al.*, (1997), os quais detectaram uma alta imunoexpressão de IL-8 um mês após a inserção, com um subsequente decréscimo na sua expressão após três e seis meses. Além disso, um grande número de outras citocinas, incluindo a 6CKine, encontram-se *upregulated* no estroma decidualizado das usuárias do SIU-LNG (Jones *et al.*, 2005).

As quimiocinas derivadas da decídua, como a *6CKine*, também estão implicadas no recrutamento das células *natural killer* uterinas no sítio de implantação (Jones *et al.*, 2004).

Um número de moléculas quimiotráticas (quimiocinas) são sintetizadas pelas células endometriais (Salamonsen *et al.*, 2002), e pelo menos uma destas (interleucina 8 –IL-8) é regulada negativamente pela progesterona (Kelly *et al.*, 1994). As quimiocinas produzidas atraem os leucócitos no endométrio antes da menstruação. Quando ativados, estes leucócitos produzem algumas moléculas reguladoras, incluindo as citocinas, quimioquinas e uma grande quantidade de enzimas que são importantes tanto diretamente na degradação da matriz, bem como indiretamente através da ativação de outras proteases.

Dentre estas enzimas encontram-se as metaloproteinases (MMPs), uma família de proteases zinco-dependentes, que atuam em substratos específicos para colágenos, proteoglicanos e outros, sendo responsáveis pela degradação de componentes do interstício e da membrana basal extracelular. (Birkedal-Hansen *et al.*, 1993). As MMPs podem contribuir com o sangramento uterino anormal através da perda do tecido endometrial e da fragilidade vascular devido à degradação da matriz extracelular (Salamonsen e Lathbury, 2000).

A partir da década de 90, a relação das MMPs com as fases do ciclo menstrual passou a ser estudada (Soini *et al.*, 1997). Sua síntese é mínima no tecido conectivo normal, sendo maior em condições patológicas, nas quais a quebra tecidual está presente. No endométrio, onde a remodelação ocorre

ciclicamente durante os anos reprodutivos, o papel das MMPs é considerado decisivo (Salamonsen e Lathbury, 2000).

As MMPs são secretadas, em sua maioria, na forma latente, sendo ativadas no meio extracelular, por uma variedade de proteases. Uma vez ativada, a enzima pode ter sua ação bloqueada por um dos quatro inibidores teciduais de metaloproteinases (ITMPs). Se o balanço entre MMP e ITMP é insuficiente, ocorre degradação da matriz extracelular, se isto ocorre sem controle, determina a completa destruição do tecido. Portanto, é necessário que ocorra uma maciça *up regulation* na produção das MMPs para a rápida e extrema destruição tecidual vista na menstruação (Salamonsen e Lathbury, 2000).

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

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

Embasado no que foi anteriormente exposto torna-se bastante sugestivo que a expressão e ativação das MMPs, bem como os leucócitos e citoquinas,

participem na iniciação dos episódios de sangramento em usuárias de anticoncepção contendo apenas progestógenos. Atualmente, as MMPs mais estudadas no endométrio são as 1, 3 e 9 (Salamonsen e Lathbury, 2000).

Diante disso, verifica-se que não há uma definição sobre a patogênese do sangramento uterino anormal associado ao uso dos anticoncepcionais contendo apenas progestógenos. Este trabalho tem como objetivo identificar algumas quimiocinas e correlacioná-las com populações leucocitárias como as células *natural killer* uterinas e os matócitos nas usuárias do SIU-LNG no terceiro ano de uso.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar quimiocinas e algumas populações de leucócitos no endométrio de mulheres usuárias do SIU-LNG, com e sem sangramento uterino após três anos de uso.

2.2. Objetivos específicos

Comparar nos grupos, de usuárias do SIU-LNG, com e sem sangramento uterino:

- A quantidade de neutrófilos.
- A quantidade de células *natural killer* uterinas.
- A área proporcional de ativação dos mastócitos através da positividade da triptase extracelular.
- A expressão das quimiocinas IL-8 e 6 *CKine* no endométrio.

3. Publicação

Endometrial chemokines, uterine natural killer cells and mast cells in long-term users of the levonorgestrel-releasing intrauterine system

Alessandra Peloggia¹, Carlos A. Petta^{1,3}, Luis Bahamondes¹, Marília Oliveira-Ribeiro¹, Jin Zhang² and Lois Salamonsen²

¹Human Reproduction Unit, Department of Obstetrics and Gynaecology, School of Medicine, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil and ²Prince Henry's Institute of Medical Research, Clayton, Victoria, Australia

³To whom correspondence should be addressed at: Human Reproduction Unit, Department of Obstetrics and Gynaecology, School of Medicine, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Caixa Postal 6181, 13084-971 Campinas, SP, Brazil. E-mail: cpetta@atglobal.net

OBJECTIVE: The objective was to assess endometrial chemokines in users of the levonorgestrel-releasing intrauterine system (LNG-IUS) and correlate them with leucocyte populations, uterine natural killer cells (uNK) and mast cells (MCs). **MATERIALS AND METHODS:** Endometrium was obtained from two groups of women who had been using LNG-IUS for 3 years or more: 11 amenorrhoeic women formed the non-bleeding group and 15 women who maintained some form of cyclic bleeding comprised the bleeding group. Specific antibodies were used for the assessment of neutrophils, uNK cells and MCs. Immunohistochemistry was performed to locate the chemokines 6CKine and interleukin-8 (IL-8). **RESULTS:** Neutrophils were few and without differences between the two groups. uNK cells were significantly higher in the bleeding group ($P < 0.0001$). There was no difference between the total number of MCs and activated MCs, but there was a greater extracellular area stained for MC tryptase ($P < 0.05$). Chemokines 6CKine and IL-8 were abundant in the stroma and in the epithelium, and there was no difference between the groups. **CONCLUSIONS:** We observed more uNK cells in users with bleeding and a greater extracellular area stained for MC tryptase, although there were no differences between the number of MCs and activated MCs or the chemokines 6CKine and IL-8. uNK cells and MC products may play a role in provoking breakthrough bleeding in long-term users of the LNG-IUS.

Key words: chemokines/leucocytes/LNG-IUS/mast cells

Introduction

The levonorgestrel-releasing intrauterine system (LNG-IUS) releases 20 µg/day of LNG into the uterine cavity. Its high contraceptive efficacy is related principally to an alteration in endometrial receptivity (Nilsson *et al.*, 1978), suppression of endometrial proliferation, inhibition of sperm migration and thickening of cervical mucus (Luukkainen *et al.*, 1990; Barbosa *et al.*, 1995). The introduction of the LNG-IUS increased the range of contraceptive options available to women and reduced some of the side effects suffered by some users of the copper IUDs, such as pelvic infection and ectopic pregnancy (Toivonen *et al.*, 1991; Odland, 1998).

In addition to the high contraceptive effectiveness of the LNG-IUS, this device also offers many non-contraceptive benefits such as the treatment of menorrhagia through a dramatic reduction in menstrual bleeding (Andersson and Rybo, 1990; Monteiro *et al.*, 2002; Hurskainen *et al.*, 2004), relief of endometriosis-associated pain (Lockhat *et al.*, 2005; Petta *et al.*, 2005) and endometrial protection during hormone therapy

in the post-menopause (Andersson *et al.*, 1992; Suhonen *et al.*, 1995).

The LNG-IUS induces some bleeding disturbances including unexpected breakthrough bleeding (BTB) (Odland and Fraser, 1990), and this is the main reason given by women for discontinuation of the method. The severity of menstrual bleeding disturbances varies according to the contraceptive method (Vincent and Salamonsen, 2000); however, the mechanisms involved in the pathogenesis of BTB are not fully understood.

One common consequence of all progestin-only (p-only) contraceptive methods, including the LNG-IUS, is an abnormal leucocyte infiltration (Salamonsen and Lathbury, 2000). The normal endometrium possesses an active and tightly regulated immune environment with significant immune cell populations that are associated with specific endometrial events (Bulmer *et al.*, 1991). In the late-secretory phase of the menstrual cycle, there is an increase in the number of leucocytes associated with decidualization and implantation (Bulmer *et al.*, 1988). Leucocyte products include a range of proteases,

chemokines and cytokines, which together result in focal production and activation of matrix metalloproteinases (MMPs) by endometrial cells, with the subsequent breakdown of tissue that characterizes menstruation (Salamonsen and Lathbury, 2000).

Leucocyte infiltration, particularly in the form of neutrophils, eosinophils, macrophages and uterine-specific natural killer cells (uNK), along with changes in the activation state of mast cells (MCs), appears to undergo changes in women using p-only contraceptive methods. Leucocyte subpopulations such as neutrophils and eosinophils are found predominantly in the shedding endometrium, whereas very few of these subtypes are present in atrophic or progestin-modified endometria (Vincent *et al.*, 1999). However, in the decidualized endometrium, there is a great number of uNK cells (Critchley *et al.*, 1998).

In humans, these uNK cells are present before implantation, but they are also present in the non-pregnant endometrium (Jones *et al.*, 2004). At the end of a non-pregnant cycle, approximately 2 days before menstruation, uNK cells undergo a nuclear change resembling apoptotic cell death (Trundley and Moffett, 2004). In addition, the MCs secrete many vasoactive and proinflammatory molecules and participate in inflammation by enhancing leucocyte infiltration, as well as causing direct tissue damage by their release of proteases. They are detectable by immunostaining for the MC-specific serine proteinase, tryptase, which plays an important role in MMP activation. This may represent a critical function for these cells at menstruation or in abnormal uterine bleeding (Salamonsen and Lathbury, 2000).

Many studies have focused on the local uterine environment and were conducted with the objective of understanding why the use of p-only contraceptives sometimes leads to BTB. The aim of this study was to assess the production of certain endometrial chemokines in long-term users of the LNG-IUS with and without endometrial bleeding and correlate these chemokines with the presence of leucocyte populations, with particular emphasis on the role of the uNK cells and MCs.

Subjects and methods

Characteristics of subjects and tissue collection

The study was conducted at the Department of Obstetrics and Gynaecology, School of Medicine, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil and at Prince Henry's Institute of Medical Research, Clayton, Victoria, Australia. The research protocol was approved by the ethical committees of the institution, and all women signed an informed consent form before being admitted to the study. Endometrial tissue was obtained from women using the LNG-IUS (Mirena®, Leiras Oy, Turku, Finland) as a contraceptive method by using Pipelle suction curette (Pipelle de Cornier, Prodimed, Neully-in Thele, France). A single endometrial biopsy was taken from each of the 26 women who had been using the LNG-IUS for contraception for more than 3 years. These women were divided into two groups according to whether or not they were in amenorrhoea: 11 amenorrhoeic women formed the non-bleeding group and 15 women who maintained some form of cyclic bleeding comprised the bleeding group.

The women included in this study answered a questionnaire regarding their menstrual pattern following the insertion of the LNG-IUS.

Women were considered to belong to the group of non-bleeding women if they had not had any uterine bleeding within the 3 months before biopsy. The women assigned to the bleeding group were those who had had some uterine bleeding in the 3 months before joining the study, but who were not bleeding at the time the endometrial biopsy was taken (Oliveira-Ribeiro *et al.*, 2004).

The endometrial samples were fixed in 10% buffered formalin and dehydrated. They then underwent routine histological processing to paraffin blocks. Sections measuring 5 µm were cut on a Leica RM 2135 microtome and placed on Super Frost® Plus glass slides (Menzel-Glasser, Strasburg, Germany). Paraffin sections were dewaxed in Histosol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and rehydrated through descending grades of alcohol to dH₂O. A standard haematoxylin and eosin section of each biopsy sample was submitted to a pathologist for classification according to Noyes' criteria (Noyes *et al.*, 1950).

Immunohistochemistry of leucocyte subtypes

Immunohistochemistry was performed on endometrial biopsies using specific antibodies for neutrophils [monoclonal mouse anti-human NEU elastase (DAKO Cytomation, Glostrup, Denmark, Cat M0752, clone NP57) IgG concentration 70 µg/ml], uNK [CD56 monoclonal mouse anti-human small cell lung cancer (SCLC) (Zymed, San Francisco, CA, USA, Cat# 18-0152)] and MCs [monoclonal mouse anti-human tryptase (DAKO, Clone AA1, Cat M-7052) IgG1 concentration 80 µg/ml]. Antigen retrieval for CD56 and tryptase immunohistochemistry was carried out by microwaving at high power for 2 × 5 min in 0.01 mol/l sodium citrate buffer (pH 6.0). Endogenous hydrogen peroxidase activity was blocked using 6% H₂O₂/in 100% methanol (1 : 1 v/v) for 10 min at room temperature (RT). Non-specific binding was prevented by using a non-immune blocking solution containing 20% normal horse serum in Tris-buffered saline (TBS) for 10 min at RT.

Primary antibodies were applied and incubated at 37°C for 60 min. Negative controls were included for each tissue by substituting the primary antibody for a matching concentration of non-immunized mouse IgG (DAKO). Following washing with 0.6% Tween 20/TBS, detection of positive binding was achieved by the sequential application of biotinylated horse anti-mouse IgG [1/200 in 10% fetal calf serum (FCS)/TBS: Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA] and STREP ABC/HRP (DAKO Cytomation) followed by the substrate diaminobenzidine (DAB SUBSTRATE, DAKO Cytomation) for 2 min at RT to achieve a brown coloration. Sections were then counterstained with Harris haematoxylin (Sigma Chemicals, St Louis, MO, USA) 1/10 in dH₂O, dehydrated through ascending grades of ethanol and mounted with DPX (ProSciTech, Thuringowa, Queensland, Australia).

Chemokine immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed to locate two chemokines [6Ckine and interleukin-8 (IL-8), which are chemoattractants for uNK cells and neutrophils, respectively] in formalin-fixed endometrial biopsies. Purified goat anti-human polyclonal antibodies [for IL-8: C-19, Cat SC 1269 and for 6Ckine: C-15, Cat SC 5808 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)] were used, each at 200 µg/ml. Immunohistochemistry for both chemokines was performed following antigen retrieval by microwaving as above. Primary antibodies and negative controls (goat IgG at the same concentration) were applied and incubated overnight (16–18 h) at 4°C. Detection of positive localization was performed using sequential application of biotinylated horse anti-goat IgG 1/200, Catalog BA 9500 (Vector Laboratories) and Strept ABC/HRP 1/100 (DAKO), followed by 3,3-diaminobenzidine (DAB) (DAKO). Sections were counterstained following the protocol described above.

Analysis of immunostaining

Staining was assessed with the use of an Olympus CH30 microscope (Olympus, Melville, NY, USA), and high-resolution images were captured with an HC-2000 digital camera (Fujix, Tokyo, Japan). A micro-computer imaging device (AIS) from Imaging Research (Brock University, St Catherine, Ontario, Canada) was used to assess the relative number of uNK cells and MCs in the intact pieces of tissue present in the tissue blocks. The investigators (J.Z. and A.P.) were blinded to the identity of the sections. Since the uNK cells were often clustered and thus not readily countable, data are expressed for each tissue as percentage of total tissue area strongly stained. For MCs, non-activated and activated cells were counted separately, depending on whether staining was intracellular or extracellular. Furthermore as an estimate of MC activation, the percentage of the total area that was stained diffusely with MC tryptase (MCT) is expressed as a percentage of the total area. Statistical analysis was performed to compare differences between bleeding and non-bleeding groups using Student's *t*-test for unpaired samples, and significance was established at $P < 0.05$. Data are presented graphically as mean \pm SEM.

Results

Leucocytes in bleeding and non-bleeding samples

Neutrophils

Since all the samples were collected from women who had been using Mirena for more than 3 years, all endometria were highly decidualized. Immunohistochemistry showed very few neutrophils in the tissues and no significant difference between the two groups (Figure 1A and B).

Uterine natural killer cells (uNK)

CD56-positive uNK cells were highly abundant (3% of total area stained) in the bleeding group compared to the non-bleeding group (0.05% of total area stained) (Figure 1C and D). This difference was highly significant ($P < 0.0001$) (Figure 2).

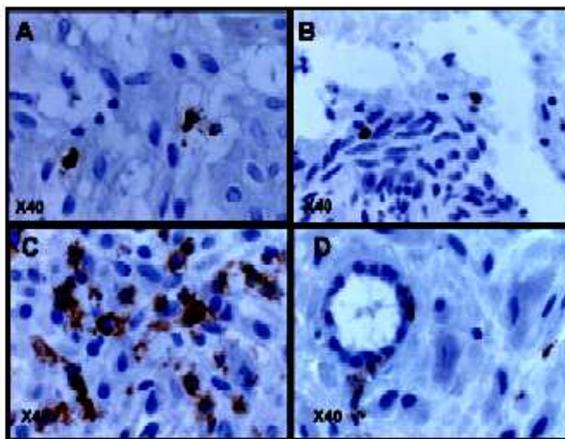


Figure 1. Leucocytes in endometrium from long-term users of a levonorgestrel-releasing intrauterine system. (A) Neutrophil-staining bleeding group, (B) neutrophil-staining non-bleeding group, (C) uterine natural killer (uNK) cell-staining bleeding group, (D) uNK cell-staining non-bleeding group.

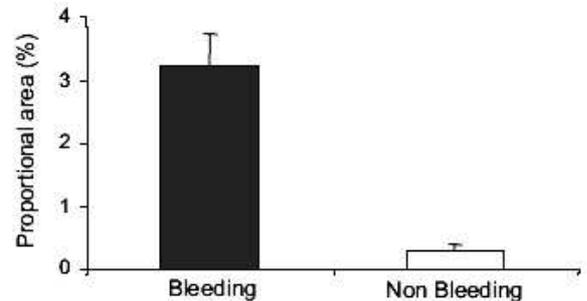


Figure 2. Relative area stained by uterine natural killer (uNK) cells in users of the levonorgestrel-releasing intrauterine system with and without bleeding episodes.

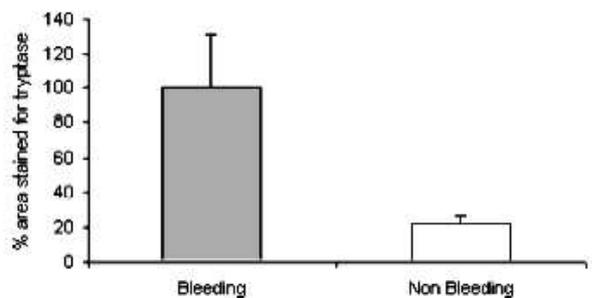


Figure 3. Area stained for extracellular mast cell tryptase (MCT) in users of the levonorgestrel-releasing intrauterine system with and without bleeding episodes ($P = 0.046$).

Mast cells (MC)

Evaluation of all MCs was performed. These may be either non-activated or activated. Positive staining for MCT was seen in most tissues (Figure 3). In each tissue block, there were some portions of tissue that had more MCT than others. MCT was either contained within the cell (representing a non-activated MCs) or extracellular (representing activated MCs), in each tissue. The total number of MCs in each tissue, expressed as $MC/X\mu m^2$, and the number of activated MCs in each tissue, expressed as $MC/X\mu m^2$, were assessed, and the proportion of total tissue area ($\times 100$) that was MCT stained was also measured.

Figure 4 shows that there were no significant differences in either the total number of MCs (22 versus 12%) or the number of activated MCs (8 versus 3%) in bleeding versus non-bleeding groups. However, a greater proportion of the total tissue area was stained in samples from the bleeding group (100%) than in samples from the non-bleeding group (Figure 3) (20%) ($P < 0.05$), indicating that there was increased extracellular tryptase in the tissue and hence more MC activation.

Chemokines

Chemokine immunostaining after insertion of LNG-IUS was consistent with the highly decidualized nature of the tissue. Immunoreactive 6Ckine and IL-8 were both abundant in the decidualized stromal cells, but there were no significant differences

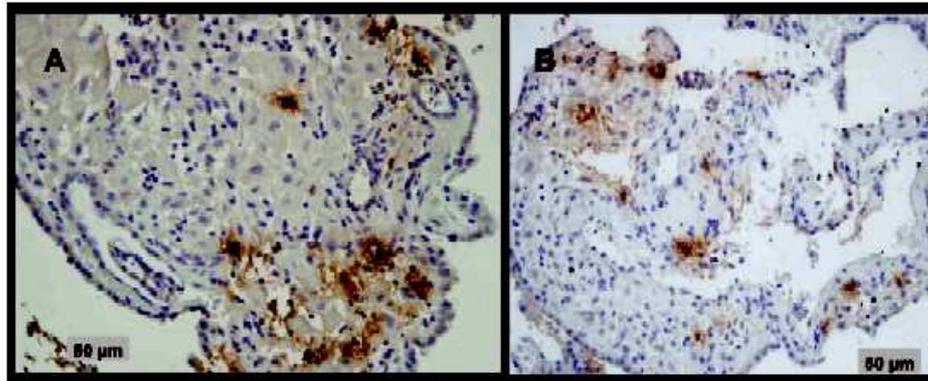


Figure 4. Area stained for extracellular trypsin in endometrium exposed to a levonorgestrel-releasing intrauterine system. (A) Bleeding group, (B) non-bleeding group.

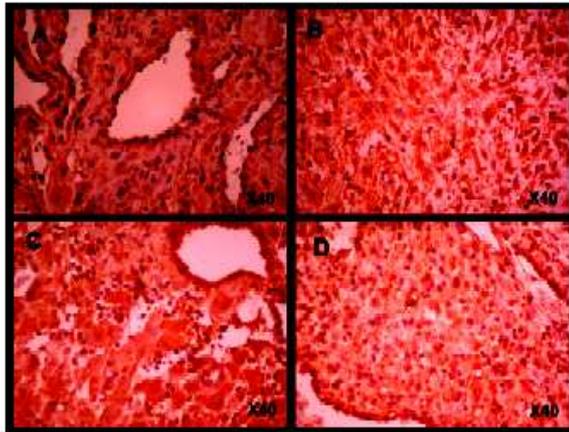


Figure 5. Immunohistochemical localization of chemokines in endometrium exposed to a levonorgestrel-releasing intrauterine system. (A) IL-8 in bleeding group, (B) IL-8 in non-bleeding group, (C) 6CKine in bleeding group, (D) 6CKine in non-bleeding group. IL, interleukin.

between bleeding and non-bleeding groups (Figure 5A and B). IL-8 was also strongly stained in the epithelium: once again, there was no difference between the groups (Figure 5C and D).

Discussion

Leucocyte populations and other endometrial parameters have been previously analysed in endometrial samples of women using the LNG-IUS (Critchley *et al.*, 1998; Oliveira-Ribeiro *et al.*, 2004). This study used two cohorts of LNG-IUS users, those who had no bleeding and those who reported bleeding in the previous 3 months. We examined endometrium from these women for subsets of leucocytes and the chemokines that may act as specific chemoattractants for these cells. P-only contraceptive methods, induce different effects on endometrial morphology (Vincent *et al.*, 2000), and these different

morphologies contain different populations of immune cells. In our study, we found few neutrophils in any of the tissues from LNG-IUS users. However, there were significantly more uNK cells along with evidence for increased MC activation in the bleeding group compared with the women who were not bleeding.

In many LNG-IUS users, the endometrium is highly decidualized, with macrophages and uNK cells being predominant (Critchley *et al.*, 1998). This phenomenon is normally seen in decidual samples taken in early pregnancy when uNK cells comprise 40% of all cells in the stromal compartment (Moffett-King, 2002). In the absence of pregnancy, an increase in the number of neutrophils and eosinophils is detectable in the uterine stroma (Poropatich *et al.*, 1987; Jeziorska *et al.*, 1995), and MCs become highly activated: these differing cohorts seem to differentiate between tissue that is prepared for implantation or that in which the inflammatory processes associated with menstruation and tissue repair have been initiated (Kamat and Isaacson, 1987; Bulmer *et al.*, 1988; Salamonsen, 1998). It is therefore interesting to observe the presence of increased uNK cell numbers and one of premenstrual tissue (highly activated MCs), both a feature of early pregnancy, in users of the LNG-IUS in which local levels of progestin are very high, but particularly in those who are experiencing uterine bleeding. This finding was also observed in a study first reporting the uNK cells and their association with regulating cytokines in postmenopausal endometrium, demonstrating a possible mechanism by which the hormonal therapy might induce the irregular bleeding (Hickey *et al.*, 2005).

Leucocyte subpopulations were previously examined in the LNG-exposed endometrium (Critchley *et al.*, 1998; Vincent *et al.*, 2000), and in accord with the present study, an elevated number of large granulated lymphocytes and macrophages were found 1 month after the insertion of the LNG-IUS. Clark *et al.* (1996) reported a negligible neutrophil influx in the endometrial samples exposed to local action of LNG in Norplant users. In contrast, Vincent *et al.* (1999) reported increased numbers of neutrophils and eosinophils in the endometrium of Norplant users in those samples that were

decidualized or showing signs of tissue breakdown. However, much higher levels of LNG are present in the endometrium in the case of LNG-IUS users than in users of contraceptive implants (Vincent and Salamonsen, 2000). Indeed, in users of the LNG-IUS, intrauterine levels of the steroid are 1000-fold greater than serum levels, and it is therefore not surprising that the effect of LNG on the endometrium is different in users of the two types of contraceptives (Nilsson *et al.*, 1982; Pekonen *et al.*, 1992).

The mechanisms involved in the influx of leucocytes in the endometrium are not fully understood. A large number of chemokines are produced in the endometrium, and their cyclical variation is correlated, at least to some extent, to the leucocyte subsets found during each phase; however, redundancy clearly exists (Jones *et al.*, 1997). Since such chemokines are important during the menstrual cycle, they may represent potential candidates as mediators related to BTB provoked by the action of LNG on the endometrium. For this reason, the two chemokines, 6CKine and IL-8, which are related to uNK cell and neutrophil recruitment, respectively, were chosen for evaluation in this study.

The cellular localization of these chemokines is critical since the endometrium is heterogeneous, particularly at the time of menstruation and decidualization. Among the nine chemokines abundantly expressed in the human endometrium at different stages of the menstrual cycle (Jones *et al.*, 2004), 6CKine was expressed at moderate/low levels in menstrual, proliferative and mid-secretory stages, whereas IL-8 was highly expressed only in the menstrual phase. The immunoeexpression of IL-8 in users of the LNG-IUS has been previously described by Jones *et al.* (1997), who detected high immunoreactive IL-8 levels 1 month after insertion of the LNG-IUS, with a subsequent decrease after 3 and 6 months. Furthermore, a number of other chemokines, including 6CKine, are up-regulated in the decidualized stroma in LNG-IUS users (Jones *et al.*, 2005), although these did not correlate with bleeding. In our study, we found no difference between the two groups, and this may be explained by the fact that all users had been using LNG-IUS for more than 3 years. It is well established that the percentage of highly decidualized samples in the endometrium of LNG-IUS users increases as the duration of use of the device increases (Luukkainen *et al.*, 1990). Decidual derived chemokines such as 6CKine have also been implicated in the recruitment of uNK cells to the implantation site (Jones *et al.*, 2004). The high chemokine production and the higher number of uNK cells in the study group that maintained some form of bleeding pattern seem to be a consequence of the extensive decidualization of the endometrium.

An important finding of this study was that there was a significantly higher area of extracellular tryptase in the samples obtained from women with bleeding than from non-bleeding samples. Extracellular tryptase is one of many regulatory factors released from MCs upon their activation: these include cytokines, and a range of enzymes, some of which can degrade extracellular matrix. Tryptase itself is an important activator of MMP-3, an enzyme that is central to an activation cascade for other MMPs, and which along with these other MMPs is important for tissue breakdown in endometrium (Salamonsen

and Lathbury, 2000). Although Drudy *et al.* (1991) related no significant differences in the MC count at different phases of the menstrual cycle and in women with dysfunctional uterine bleeding, this study did not take account of the activation state of the MCs.

It was not possible in this study to identify precisely whether the increased uNK cells and increased MC activation are responsible for BTB. It has been proposed that BTB is most likely caused by focal alterations in the endometrium, and this is confirmed by the hysteroscopic visualization of the dilated bleeding vessels (Hickey *et al.*, 2000) and histologically by focal areas of leucocyte infiltration in tissue breakdown, surrounded by unaltered atrophic endometrium (Clark *et al.*, 1996; Song *et al.*, 1996).

In a previous report (Oliveira-Ribeiro *et al.*, 2004) using the same endometrial samples, we identified significantly more immunoreactive MMP-3 in the women who maintained some form of bleeding pattern. Importantly, this enzyme is directly activated by MCT. Thus, focal action of MMP-3 could provide an explanation for the bleeding in those users. The lack of correlation between some of the other endometrial parameters evaluated in the present study and the presence or absence of a bleeding pattern could be explained by the fact that our study sample was composed of women who had used the LNG-IUS for a long time and mainly because the group with bleeding patterns maintained some form of bleeding pattern but not prolonged bleeding or menorrhagia. It is possible to identify the mediator and effector cells involved in BTB by carrying out a detailed analysis of bleeding sites versus non-bleeding areas in the same patient (Lockwood *et al.*, 2000), as identified by hysteroscopy. Unfortunately, this is an invasive procedure that causes discomfort to the patients, that is not widely used and not performed in our clinic.

In conclusion, we have demonstrated that neutrophils are not abundant in the endometrium of long-term users of the LNG-IUD and that while both IL-8 and 6CKine are highly expressed in the decidualized stromal cells, they did not differ between women with and without uterine bleeding. Importantly, uNK cells were more abundant in long-term users of the LNG-IUS who maintained some bleeding patterns, and the level of MC activation was also higher in these women than in those who do not bleed, suggesting that these factors may play a role in the uterine bleeding in long-term users of the LNG-IUD.

Acknowledgements

This study received partial financial support from the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil, award 03/083917. L.A.S. is supported by the National Health and Medical Research Council of Australia (143798, 241000) the NIH (grant HD43192) and the World Health Organisation Human Reproduction Program (15208).

References

- Andersson K and Rybo G (1990) Levonorgestrel-releasing intrauterine device in the treatment of menorrhagia. *Br J Obstet Gynaecol* 97,690-694.
- Andersson K, Mattsson LA, Rybo G and Stadberg E (1992) Intrauterine release of levonorgestrel - a new way of adding progestogen in hormone replacement therapy. *Obstet Gynecol* 79,963-967.

- Barbosa I, Olsson SE, Od lind V, Gonçalves T and Coutinho E (1995) Ovarian function after a seven years' use of a levonorgestrel IUD. *Adv Contracept* 11,85–95.
- Bulmer JN, Luny DP and Hagin SV (1988) Immunohistochemical characterization of stromal leukocytes in nonpregnant human endometrium. *Am J Reprod Immunol* 17,83–90.
- Bulmer JN, Longfellow M and Ritson A (1991) Leukocytes and resident blood cells in endometrium. *Ann N Y Acad Sci* 622,57–68.
- Clark DA, Wang SL, Rogers P, Vince G and Affandi B (1996) Endometrial lymphomyeloid cells in abnormal bleeding due to levonorgestrel (Norplant). *Hum Reprod* 11,1438–1444.
- Critchley HO, Wang H, Jones RL, Kelly RW, Drudy TA, Gebbie AE, Buckley CH, McNeilly AS and Glasier AF (1998) Morphological and functional features of endometrial decidualization following long term intrauterine levonorgestrel delivery. *Hum Reprod* 13,1218–1224.
- Drudy L, Sheppard B and Bonnar J (1991) Mast cells in the normal uterus and in dysfunctional uterine bleeding. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 39,193–201.
- Hickey M, Dewart D and Fraser IS (2000) Superficial endometrial vascular fragility in Norplant users and in women with ovulatory dysfunctional uterine bleeding. *Hum Reprod* 15,1509–1514.
- Hickey M, Crewe J, Goodridge JP, Witt CS, Fraser IS, Doherty D, Christiansen FT and Salamonsen LA (2005) Menopausal hormone therapy and irregular endometrial bleeding: a potential role for uterine natural killer cells? *J Clin Endocrinol Metab* 90,5528–5535.
- Hurskainen R, Teperi J, Rissanen P, Aalto AM, Grenman S, Kivela A, Kujansuu E, Vuorma S, Yliskoski M and Pravonen J (2004) Clinical outcomes and costs with the levonorgestrel-releasing intrauterine system or hysterectomy for treatment of menorrhagia: randomized trial 5-year follow-up. *JAMA* 291,1456–1463.
- Jeziorska M, Salamonsen LA and Woolley DE (1995) Mast cell and eosinophil distribution and activation in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Biol Reprod* 53,312–320.
- Jones RL, Kelly RW and Critchley HO (1997) Chemokine and cyclooxygenase-2 expression in human endometrium coincides with leukocyte accumulation. *Hum Reprod* 12,1300–1306.
- Jones RL, Hannan NJ, Kaituú TJ, Zhang J and Salamonsen LA (2004) Identification of chemokines important for leukocyte recruitment to the human endometrium at the times of embryo implantation and menstruation. *J Clin Endocrinol Metab* 89,6155–6167.
- Jones RL, Morison NB, Hannan NJ, Critchley HOD and Salamonsen LA (2005) Chemokine expression is dysregulated in the endometrium of women using progestin-only contraceptives and correlates to elevated recruitment of distinct leukocyte populations. *Hum Reprod* 20,2724–2735.
- Kamat BR and Isaacson PG (1987) The immunocytochemical distribution of leukocyte subpopulations in human endometrium. *Am J Pathol* 127,66–73.
- Lockhat FB, Ernembolu JO and Komje IC (2005) 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* 20,789–793.
- Lockwood CJ, Runic R, Wan L, Krikun G, Demopolous R and Schatz P (2000) The role of tissue factor in regulating endometrial haemostasis: implications for progestin-only contraception. *Hum Reprod* 15 (Suppl. 3),144–151.
- Luukkainen T, Lähteenmaki P and Toivonen J (1990) Levonorgestrel-releasing intrauterine device. *Ann Med* 22,85–90.
- Moffett-King A (2002) Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol* 2,656–663.
- Monteiro I, Bahamondes L, Diaz J, Perrotti M and Petta C (2002) Therapeutic use of levonorgestrel-releasing intrauterine system in women with menorrhagia: a pilot study. *Contraception* 65,325–328.
- Nilsson CJ, Luukkainen T and Arko H (1978) Endometrial morphology of women using a D-norgestrel-releasing intrauterine device. *Fertil Steril* 29,397–401.
- Nilsson G, Haukkamaa M, Vierola H and Luukkainen T (1982) Tissue concentrations of levonorgestrel in women using a levonorgestrel-releasing IUD. *Clin Endocrinol (Oxf)* 17,529–536.
- Noyes RN, Hertig AT and Rock J (1950) Dating the endometrial biopsy. *Fertil Steril* 1,3–25.
- Od lind V (1998) Disturbances of bleeding with intrauterine contraceptive devices and hormonal intrauterine systems. In Cameron IT, Fraser IS and Smith SK (eds) *Clinical Disorders of the Endometrium and Menstrual Cycle*. Oxford University Press, Oxford, UK, pp. 390–398.
- Od lind V and Fraser IS (1990) Hormonal contraception and bleeding disturbances: a clinical overview. In d'Arcangues C, Fraser IS, Newton JR and Od lind V (eds). *Contraception and Mechanism of Endometrial Bleeding*. WHO/Cambridge University Press, Cambridge, pp. 5–31.
- Oliveira-Ribeiro M, Petta CA, De Angelo Andrade LA, Bahamondes L and Hidalgo MM (2004) Correlation between endometrial histology, microvascular density and caliber, matrix metalloproteinase-3 and bleeding pattern in women using a levonorgestrel releasing intrauterine system. *Hum Reprod* 19,1778–1784.
- Pekonen F, Nyman T, Lahteenmaki P, Haukkamaa M and Rutanen EM (1992) Intrauterine progestin induces continuous insulin-like growth factor-binding protein production in the human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 75,660–664.
- Petta CA, Ferriani RA, Abrao MS, Hassan D, Rosa e Silva JC, Podagrac S and Bahamondes L (2005) 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* 20,1993–1998.
- Poropatich C, Rojas M and Silverberg SG (1987) Polymorphonuclear leukocytes in the endometrium during the normal menstrual cycle. *Int J Gynaecol Pathol* 6,230–234.
- Salamonsen LA (1998) Current concepts of the mechanisms of menstruation: a normal process of tissue destruction. *Trends Endocrinol Metab* 9,305–309.
- Salamonsen LA and Lathbury LJ (2000) Endometrial leukocytes and menstruation. *Hum Reprod Update* 6,16–27.
- Song JY, Russell P, Markham R, Manconi F and Fraser IS (1996) Effects of high dose progestogens on white cells and necrosis in human endometrium. *Hum Reprod* 11,1713–1718.
- Suhonen SP, Holmstrom T, Allonen HO and Lahteenmaki P (1995) Intrauterine and subdermal progestin administration in postmenopausal hormone replacement therapy. *Fertil Steril* 63,336–342.
- Toivonen J, Luukkainen T and Allonen H (1991) Protective effect of intrauterine release of levonorgestrel on pelvic infection: three years' comparative experience of levonorgestrel – and copper-releasing intrauterine devices. *Obstet Gynecol* 77,261–264.
- Trudley A and Moffett A (2004) Human uterine leukocytes and pregnancy. *Tissue Antigens* 63,1–12.
- Vincent AJ and Salamonsen LA (2000) The role of matrix metalloproteinases and leukocytes in abnormal uterine bleeding associated with progestin-only contraceptives. *Hum Reprod* 15 (Suppl. 3),135–143.
- Vincent AJ, Malakooti N, Zhang J, Rogers PA, Affandi B and Salamonsen LA (1999) Endometrial breakdown in women using Norplant is associated with migratory cells expressing matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B). *Hum Reprod* 14,807–815.
- Vincent AJ, Zhang J, Ostor A, Rogers PA, Affandi B, Kovacs G and Salamonsen LA (2000) Matrix metalloproteinase-1 and -3 and mast cells are present in the endometrium of women using progestin-only contraceptives. *Hum Reprod* 15,123–130.

Submitted on October 26, 2005; resubmitted on December 1, 2005; accepted on December 6, 2005

4. Conclusões

- Não houve diferença na quantidade de neutrófilos entre as mulheres com e sem sangramento uterino.
- As células *natural killer* uterinas foram encontradas em maior número em mulheres usuárias de SIU-LNG que mantinham sangramento.
- A área proporcional de ativação dos mastócitos apresentou-se maior em mulheres com sangramento do que em mulheres que não sangravam.
- Apesar de a IL-8 e 6CKine estarem presentes em células estromais decidualizadas, não houve diferença entre as mulheres com e sem sangramento uterino.

5. Referências Bibliográficas

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

Arici A, Seli E, Zeyneloglu HB, Senturk LM, Oral E, Olive DI Interleukin-8 induces proliferation of endometrial stromal cells:a potential autocrine growth factor. **J Clin Endocrinol Metab** 1998; 83:1201-5.

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

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

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

Ben-Baruch A, Michiel DF, Oppenheim JJ. Signals and receptors involved in recruitment of inflammatory cells. **J Biol Chem** 1995; 270:11703-6.

Birkedal-Hansen H, Moore WGI, Bodden MK et al. Matrix metalloproteinases: a review. **Crit Rev Oral Biol Med** 1993; 4:197-250.

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

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

Clark DA, Wang S, Rogers P, Vince G, Affandi B. Endometrial lymphomieloid cells in abnormal uterine bleeding due to levonorgestrel (Norplant®). *Hum Reprod* 1996; 11:1438-44.

Cox M, Tripp J, Blacksell S. Clinical performance of the levonorgestrel intrauterine system in routine use by the UK Family Planning and Reproductive Health Research network: 5-year report. *J Fam Plann Reprod Health Care* 2002; 28:73-7.

Critchley HOD, Kelly RW, Kooy J. Perivascular location of a chemokine interleukin-8 in human endometrium: a preliminary report. *Hum Reprod* 1994; 9:1406-9.

Critchley HOD, Wang H, Jones RI, Kelly RW Drudy T A, Gebbie AE Buckley CH Mcneilly AS Glasier AF. Morphological and functional features of endometrial decidualization following long-term intrauterine levonorgestrel delivery. *Hum Reprod* 1998; 13:1218–24.

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

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

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

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

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

Dosiu C, Giudice LC. Natural killer cells in pregnancy and recurrent pregnancy loss: endocrine and immunological perspectives. *Endocr Rev* 2005; 26:44-62.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Hourihan HM, Sheppard BI, Bonnar J. A morphometric study of the effects of oral norethisterone or levonorgestrel on endometrial blood vessels.

Contraception 1986; 38:603-12.

Hubacher D, Grimes DA. Non contraceptive health benefits of intrauterine devices: a systematic review. *Obstet Gynecol Surv* 2002; 57(2):120-8.

Hurskainen R, Teperi J, Rissanen P, Aalto AM, Grenman S, Kivela A, et al. Quality of life and cost-effectiveness of levonorgestrel releasing IUD and Norplant®. *Lancet* 2001; 357:273-7.

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

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

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

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

Jones RI, Kelly RW, Critchley HO. Chemokine and cyclooxygenase-2 expression in human endometrium coincides with leukocyte accumulation. *Hum Reprod* 1997;12:1300-1306.

Jones K, Georgiou M, Hyatt D, Spencer T, Thomas H. Endometrial adenocarcinoma following the insertion of a Mirena IUD. *Gynes Oncol* 2002; 87:216-8.

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

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

Kelly RW, Illingworth P, Baldie G, Leask R, Brouwer S, Calder AA. Progesterone control of interleukin-8 production in endometrium and chorio-decidual cells underlines the role of the neutrophil in menstruation and parturition. *Hum Reprod* 1994; 9:253-8.

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

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

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

Kunkel SI, Streiter RM, Lindley IJ, Westwick J. Chemokines: new ligands, receptors and activities. *Immunol Today* 1995; 16:559-61.

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

Landgren BM, Dada O, Aedo Ar, Johannisson E, Diczfalusy E. Pituitary, ovarian, and endometrial effects of 300 mg norethisterone and 30mg of levonorgestrel administered on cycle days 7 to 10. *Contraception* 1990; 41:569-81.

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

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

Luukkainen T, Nilsson CG. Sustained intrauterine release of d-Norgestrel. *Contraception* 1978; 18:451-8.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Puolakka J, Nilsson C, Haukkamaa M. Conservative treatment of excessive uterine bleeding and dysmenorrhoea with levonorgestrel intrauterine system as an alternative to hysterectomy. **Acta Obstet Gynecol Scand** 1996; 75:82-7.

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

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

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

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

Salamonsen LA, Zhang J, Brasted M. Leukocyte networks and human endometrial remodeling. **J Reprod Immunol** 2002; 57:95-108.

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

Shaw STJR, Macaulay LK, Aznar R, Gonzalez-Angulo A, Roy S. Effects of a progesterone-releasing intrauterine contraceptive device on endometrial blood vessels: a morphometric study. **Am J Obstet Gynecol** 1981; 14:821-81.

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

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

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

Song JY, Russell P, Markham R, Manconi F, Fraser IS. Effects of high dose progestogens on white cells and necrosis in human endometrium. **Hum Reprod** 1996; 11:1713-8.

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

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

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

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

Vincent AJ, Malakooti N, Zhang J, Rogers PA, Affandi B, Salamonsen LA. Endometrial breakdown bleeding in women using Norplant® is associated with migratory cell expressing of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B). **Hum Reprod** 1999;14:807-15.

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

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

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

6. Bibliografia de Normatizações

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

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

7. Anexos

7.1. Anexo 1 – Ficha para coleta de dados

**QUIMIOCINAS ENDOMETRIAIS, CÉLULAS *NATURAL KILLER* UTERINAS
E MASTÓCITOS EM USUÁRIAS DO SISTEMA INTRA-UTERINO LIBERADOR
DE LEVONORGESTREL (MIRENA®)**

1) Caso nº: [][]

Dados do prontuário

2) N.º PF: [][][][][]

3) N.º HC: [][][][][][][][][]

4) Endereço: Rua

nº	Qd	Lt	Bairro
Cidade	Ponto de referência:		

5) Telefone: residência:

trabalho:

recado:

Ficha para coleta de dados

1- CASO Nº : _____

2- GRUPO: _____ (1. **com** sangramento 2. **sem** sangramento)

3- Idade : _____ anos

4- Antecedentes Obstétricos: Gesta _____ Para _____ Abortos _____

5- **Antes** de iniciar o método, de quantos em quantos dias você menstruava?

_____ dias () Não se lembra

6.1. Quantos dias durava a menstruação?

_____ dias () Não se lembra

6.2. Quantos absorventes usava por dia?

_____ absorventes () Não se lembra

6.3. Ocorria sangramento, em borra de café, que não exigia uso de absorventes ou tampões?

_____ (1. Sim 2. Não) () Não se lembra

6.4. Quantos dias durava no mês?

_____ dias () Não se lembra

7. Patologias Associadas : _____ (1. Ausente 2. Presente)

Quais? _____

8. Medicação em uso : _____ (1. Ausente 2. Presente)

Quais? _____

Para o investigador: Padrão de sangramento:

Quanto ao intervalo: _____

- | | | |
|----------------|---------------------|------------------|
| 1. eumenorréia | 2. espaniomenorréia | 3. polimenorréia |
| 4. metrorragia | 5. amenorréia | |

Quanto ao número de dias do fluxo: _____

- | | | |
|------------------|-----------|-------------------|
| 1. hipomenorréia | 2. normal | 3. hipermenorréia |
|------------------|-----------|-------------------|

Quanto ao volume do fluxo: _____

- | | | |
|-------------------|-----------|---------------|
| 1. oligomenorréia | 2. normal | 3. menorragia |
|-------------------|-----------|---------------|

9. Após iniciar o método:

_____ Não menstrua há 3 meses ou mais. **Passa à questão 13.**

_____ Está menstruando. **Passa à questão 10.**

_____ Está menstruando e apresentando *spotting*. **Passa à questão 11.**

_____ Está apresentando apenas *spotting*. **Passa à questão 12.**

10. Nos últimos 3 meses

Qual o intervalo entre as suas menstruações? _____ dias () não se lembra

Quantos dias dura suas menstruações? _____ dias () não se lembra

Quantos absorventes você usa por dia? _____ absorventes () não se lembra

Os absorventes ficam encharcados? _____ (1. sim 2. não) () não se lembra

Para o investigador: Padrão de sangramento:

Quanto ao intervalo: _____

- | | | |
|----------------|---------------------|------------------|
| 1. eumenorréia | 2. espaniomenorréia | 3. polimenorréia |
| 4. metrorragia | 5. amenorréia | |

Quanto ao número de dias do fluxo: _____

- | | | |
|------------------|-----------|-------------------|
| 1. hipomenorréia | 2. normal | 3. hipermenorréia |
|------------------|-----------|-------------------|

Quanto ao volume do fluxo: _____

- | | | |
|-------------------|-----------|---------------|
| 1. oligomenorréia | 2. normal | 3. menorragia |
|-------------------|-----------|---------------|

11. Nos últimos 3 meses:

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

Para o investigador: Padrão de sangramento:

Quanto ao intervalo: _____

1. eumenorréia 2. espaniomenorréia 3. polimenorréia
4. metrorragia 5. amenorréia

Quanto ao número de dias do fluxo: _____

1. hipomenorréia 2. normal 3. hipermenorréia

Quanto ao volume do fluxo: _____

1. oligomenorréia 2. normal 3. menorragia

12. Nos últimos 3 meses

Os *spottings* ocorrem até quantos dias por mês? _____ dias () não se lembra

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

13. Dados do prontuário

Tempo de uso do método _____ meses

Peso _____ kg

Altura _____ m

IMC _____

7.2. Anexo 2 – Consentimento livre e esclarecido

TÍTULO DO ESTUDO: QUIMIOCINAS ENDOMETRIAIS, CÉLULAS *NATURAL KILLE* UTERINAS E MASTÓCITOS EM USUÁRIAS DO SISTEMA INTRA-UTERINO LIBERADOR DE LEVONORGESTREL (MIRENA®)

Eu, _____, RG _____, idade _____ anos, residente à _____, matrícula PF _____, fui informada por _____ que :

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

efeito ruim, relacionado ao estudo, receberei atenção médica adequada na Unicamp e não haverá qualquer ônus financeiro para mim.

- e) Minha participação neste estudo é totalmente livre, isto é, se não desejar participar, não terei nenhum prejuízo em meu atendimento no ambulatório. Não receberei nenhum benefício pela minha participação.
- f) Serei informada sobre este estudo sempre que quiser.
- g) Eu tenho o direito de solicitar minha saída da pesquisa, em qualquer momento, sem perder nenhum direito na clínica.
- h) As informações obtidas neste estudo serão transmitidas somente de forma que não possa identificar a minha participação.
- i) Em caso de algum problema ou dúvida, durante o período do estudo, poderei contactar a Dra Alessandra Pelliggia, telefone 3788-7176, de segunda a sexta-feira, das 8 às 17 horas.
- j) Se tiver alguma pergunta ou reclamação a respeito do meu atendimento e da minha participação neste estudo, poderei entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp, telefone (19) 3788-8936.

Voluntária

Pesquisador(a)

Campinas, ___/___/___