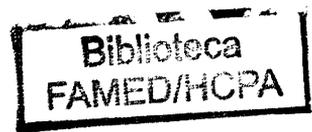


**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CLÍNICA MÉDICA
DOUTORADO**



**NÍVEIS DE INTEGRINA $\alpha v \beta 3$ NO ENDOMÉTRIO DE
MULHERES USUÁRIAS DO DIU T200**

AUTOR: RICARDO FRANCALACCI SAVARIS

ORIENTADOR: PROF. ARNALDO NICOLA FERRARI

Porto Alegre, 1999

NÍVEIS DE INTEGRINA $\alpha v \beta 3$ NO ENDOMÉTRIO DE MULHERES PORTADORAS DO DIU T200

Autor: Ricardo Francalacci Savaris

Tese submetida ao curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Clínica Médica.

Orientador:

Prof. Dr. Arnaldo Nicola Ferrari

Co-orientador:

Prof. Dr. Cláudio Galleano Zettler

Porto Alegre
22 de Março, 1999

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. **Arnaldo Nicola Ferrari**, Professor Titular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela orientação e incentivo nos momentos mais difíceis da realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **Bruce Arthur Lessey**, Professor Adjunto da Universidade da Carolina do Norte, pela amizade que surgiu entre nós, por ter me ensinado e auxiliado inúmeras vezes através do correio eletrônico e pessoalmente. E acima de tudo, por ter sido exemplo de médico, professor e pesquisador.

Ao Prof. Dr. **Marc Bygdeman** e à Dra. **Lena Marions**, ambos do Instituto Karolinska de Estocolmo, por terem me auxiliado nas técnicas de laboratório.

Ao Prof. Dr. **Cláudio Galleano Zettler**, Professor da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, por ter mantido a sua posição de apoio na utilização do laboratório.

À **Rosalva Bauenbar**, técnica do departamento de Patologia da Fundação Faculdade Federal Ciências Médicas Porto Alegre, por seu auxílio na imunoistoquímica.

Ao secretário da saúde do município de São Leopoldo, Dr. **João D. Lunardi**, por ter aberto as portas para realizar o projeto piloto.

À secretária **Nara Lemos** e todas as auxiliares do posto de Saúde do planejamento familiar de São Leopoldo, pela total cooperação na realização do projeto piloto.

Ao colega Dr. **Jorge Telles**, pela oportunidade de poder trabalhar no Centro de Saúde São José do Murialdo e conseguir terminar o projeto final.

Às Dras. **Ana Mattos** e **Adriana Bos-Mikich** pelos seus comentários e sugestões.

Ao Prof. **José Roberto Goldim**, do Centro de Pesquisa e Pós-Graduação pela supervisão estatística, metodológica e conselhos no preparo final da tese.

Por último, mas principalmente, às pacientes, pois sem elas não seria possível a realização desse trabalho.

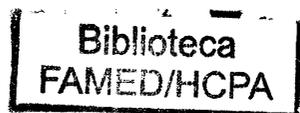
À minha querida e amada esposa
MICHELE,

aos meus pais
DANIEL (*em memória*) e MARIA DO CARMO

e acima de tudo, ao meu Senhor e Deus
JESUS CRISTO

o qual me amparou em todos os momentos da minha vida e na realização dessa tese.

ÍNDICE



RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
I INTRODUÇÃO	9
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
1.1 DISPOSITIVO INTRA-UTERINO	10
1.1.1 Histórico	10
1.1.2 Mecanismo de Ação	14
1.2 HISTOLOGIA E FISIOLOGIA DO ENDOMÉTRIO NORMAL PARA A DATAÇÃO ENDOMETRIAL.....	18
1.2.1 Fase Proliferativa.....	20
1.2.2 Fase Secretora.....	21
1.2.3 Fase Menstrual.....	24
1.3 CONSIDERAÇÕES TÉCNICAS NA INTERPRETAÇÃO DAS BIÓPSIAS.....	25
1.4 INTEGRINAS.....	28
1.4.1 Matriz Extracelular.....	28
1.4.2 Receptores de Matriz Extracelular nas Células Animais: As Integrinas.....	28
1.4.3 Família das Integrinas.....	29
1.4.4 Ligações das Integrinas e Sequência de Reconhecimento.....	33
1.4.5 Regulação da Expressão das Integrinas.....	35
1.4.6 Implantação - Janela de Implantação.....	37
1.4.7 Expressão das Integrinas no Endométrio e Janela de Implantação.....	39
1.4.8 As Integrinas nos Defeitos da Receptividade Uterina.....	42
2. JUSTIFICATIVA.....	44
3. OBJETIVO.....	45
II MATERIAL E MÉTODOS	46
1. AMOSTRA ESTUDADA.....	46
2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	46
3. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	46
4. MÉTODO.....	47
4.1 DETERMINAÇÃO DA OVULAÇÃO.....	47
4.2 BIÓPSIA DE ENDOMÉTRIO.....	48
4.3 LABORATÓRIO.....	48
4.3.1 Anatomia Patológica.....	48
4.3.2 Imunoistoquímica.....	49
4.3.3 Quantificação das Integrinas sob a Microscopia.....	49
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA E TAMANHO DA AMOSTRA.....	50
6. ASPECTOS ÉTICOS.....	51
III RESULTADOS	52
IV DISCUSSÃO	57
V CONCLUSÃO	67
VI REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
VII ANEXO	92

RESUMO

Objetivo: Medir a expressão da integrina $\alpha\beta3$ no endométrio de mulheres usuárias do DIUT200.

Desenho: Estudo observacional controlado.

Local realizado: Centro de saúde secundário e laboratório universitário.

Pacientes: Treze mulheres sadias e férteis (controles) e treze usuárias do DIUT200 (casos).

Intervenção: Biópsia endometrial realizada entre o 6^o~10^o dia pós-ovulatório do ciclo menstrual.

Principal Desfecho Avaliado: A expressão da integrina $\alpha\beta3$ através do HSCORE em amostras endometriais criopreservadas.

Resultados: O HSCORE das usuárias do DIUT200 foi $0,9 \pm 0,7$ (média \pm DP), enquanto que o dos controles foi $2,13 \pm 0,7$ (média \pm DP) ($p = 0.001$ Teste-*t* de Student). Todos os controles foram positivos para a expressão da integrina $\alpha\beta3$, mas as usuárias do DIUT200 não apresentou positividade para a integrina $\alpha\beta3$ em 38,5% dos casos ($p = 0,03$ Teste Exato de Fisher).

Conclusão: Os resultados apoiam a teoria que o DIUT200 de cobre também tem um mecanismo de ação que interfere diretamente com a receptividade uterina e a implantação.

Palavras-chave: anticoncepção / integrinas / DIU / endométrio / implantação

ABSTRACT

Objective: To measure the expression of $\alpha v\beta 3$ integrin in the endometrium of IUDT200 users.

Design: Observational controlled study

Setting: Secondary health care center and University laboratory

Patients: Thirteen healthy fertile women (controls) and thirteen IUDT200 users (cases).

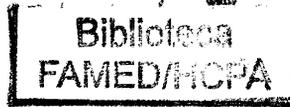
Intervention: Endometrial biopsy on postovulatory day 6~10 of the menstrual cycle.

Main Outcome Measure: The expression of $\alpha v\beta 3$ by HSCORE on cryopreserved endometrial sections.

Results: The HSCORE for IUD users was 0.9 ± 0.7 (mean \pm SEM), while for controls was 2.13 ± 0.7 (mean \pm SEM) ($p < 0.001$ Teste-*t* de Student). All controls were positive for $\alpha v\beta 3$, but women with IUD did not express $\alpha v\beta 3$ integrin in 38.5% of the cases ($p < 0.03$ Fisher's exact test).

Conclusion: These results support the theory that copper IUD T200 also has a mechanism of action that is directed at interference with uterine receptivity and implantation.

Key Words: contraception / integrins / IUD / endometrium / implantation



I INTRODUÇÃO

O dispositivo intra-uterino (DIU) com cobre foi introduzido para comercialização em meados dos anos 70 (190), sendo que quantidades maiores de cobre têm sido acrescentadas desde então (50). Hoje, o DIU de cobre é provavelmente, depois dos anticoncepcionais orais, o método anticoncepcional mais seguro e mais comumente utilizado (143). Apesar da ampla difusão e uso, o seu exato mecanismo de ação ainda não é totalmente compreendido. Acredita-se que o mesmo, entre outros locais de ação, exerça uma atividade local sobre o endométrio (34).

Esse mesmo local, o endométrio, é o ambiente onde ocorre o complexo mecanismo de implantação do embrião. Tal interação ocorre através de um intrincado sistema que envolve hormônios esteróides e peptídeos, juntamente com seus receptores, associado às citoquinas, aos fatores de crescimento, aos fatores parácrinos e às relações intercelulares (43; 97; 158). Mais recentemente, a integrina $\alpha v \beta 3$, uma molécula de adesão relacionada com o processo de implantação do embrião no endométrio, tem sido investigada com maior ênfase na tentativa de elucidar o processo de implantação (100).

Para que se entenda a possível influência do dispositivo intra-uterino de cobre sobre as integrinas durante o período de implantação embrionária, é necessário rever os trabalhos realizados sobre o seu mecanismo de ação, as alterações histológicas normais do endométrio e os conceitos sobre as integrinas e suas modulações.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 DISPOSITIVO INTRA-UTERINO

1.1.1 Histórico

A origem dos dispositivos intra-uterinos (DIUs) perde-se na história da humanidade. Um fato muito relatado, mas não confirmado, é que árabes e turcos colocavam pequenas pedras dentro do útero das camelas para prevenir a gravidez durante as longas viagens no deserto. Credita-se a Hipócrates o uso de um tubo de couro dentro do útero humano, mas há divergências quanto ao propósito (83). No século XI, o cientista maometano Avicena descreveu o uso de pessários anticoncepcionais em humanos (134).

Os antecedentes imediatos dos DIUs modernos surgiram no século XIX e início do XX. Tecnicamente, não se tratavam de dispositivos intra-uterinos, pois não eram inseridos inteiramente no útero. Consistiam em hastes que iniciavam na vagina, atravessavam o canal cervical e iam até a cavidade uterina (83). Os materiais utilizados variavam desde madeira até platina com diamante (168). Em 1902, na Alemanha, Hollweg patenteou um pessário na forma de "Y" e relatou que o havia inserido em mais de 700 mulheres para prevenir a gestação (79).

O primeiro dispositivo completamente intra-uterino, planejado especificamente para a anticoncepção humana, foi aperfeiçoado em 1909 por Richter, médico alemão. Tratava-se de um anel feito de intestino do bicho-da-seda (140).

Na metade da década de 20, Gräfenberg, na Alemanha, após experimentar vários modelos, desenvolveu um dispositivo anticoncepcional que permanecia dentro do útero; consistia em um anel firme de seda com fio de prata (66). Em 1934, Ota, no Japão, apresentou um dispositivo intra-uterino de ouro e prata, ou folheado a ouro, na forma de

anel, com um estabilizador central, que dificultava a sua deformação e expulsão da cavidade uterina (128).

O entusiasmo produzido pelo DIU no início dos anos 30 foi seguido por uma onda de protesto. Na Europa, os médicos recomendavam o não-uso do anel de Gräfenberg. Em 1936, o governo japonês proibiu o uso do anel de Ota e só revogou essa lei somente em 1974 (119).

O receio das infecções e a falta de antibióticos, associados ao fato da possibilidade de ser um método abortivo, dificultaram a aceitação e o desenvolvimento dos DIUs (182). Entretanto, em 1959, em Israel, Oppenheimer retomou os estudos sobre o anel de Gräfenberg, alegando tê-lo usado em 1.500 mulheres e verificado que era um método anticoncepcional simples e eficaz (124); no mesmo ano, Ishihama descreveu seu sucesso com o anel de Ota em 20.000 mulheres japonesas (86). Ambos os investigadores relataram baixas taxas de falha do método anticoncepcional e nenhum efeito colateral grave.

Um ano depois, Margulies, em Nova Iorque, iniciou a pesquisa com o primeiro DIU linear, na forma de espiral, que levou o seu nome, a espiral de Margulies (83). A espiral incorporava uma pequena quantidade de sulfato de bário para torná-la radiopaca. Por volta da mesma época, Lippes, de Buffalo, Nova Iorque, introduzia a alça de Lippes, a qual era feita de polietileno com sulfato de bário e uma “cauda” (111). O polietileno é um plástico inerte e a “cauda” era composta por dois fios de náilon. Essas duas associações permitiam a localização do DIU e a sua retirada (111). A alça de Lippes e a espiral de Margulies foram os primeiros DIUs de plástico, sendo que a alça de Lippes tornou-se o padrão de DIU para aquela época; o seu tamanho variava a fim de adaptar-se à cavidade uterina das usuárias (178). Essa euforia resultou no surgimento de novos projetos de DIUs de uma maneira intensa e desordenada, gerando vários trabalhos inadequados (190).

Em 1962, houve importantes desenvolvimentos nos DIUs. Zipper, no Chile, dava início à pesquisa da ação de diferentes tipos de metais sobre o endométrio de ratas e coelhas e publicou seus resultados no final dos anos 60 (191). Em Nova Iorque, em 1962, foi realizada a primeira Conferência Internacional sobre o Dispositivo Intra-Uterino, sob os auspícios da Organização Mundial de Saúde (OMS) e do *Population Council*, para estabelecer padrões para a manufatura e a uniformidade nos protocolos de estudo (83). Após 6 anos de pesquisa, surgiram algumas conclusões sobre a relação entre idade, paridade das pacientes, tamanho adequado do dispositivo e ocorrência de expulsão, sangramento e gestações. Os DIUs grandes, apesar de resistirem à expulsão e ocasionarem baixas taxas de gestação, eram freqüentemente removidos por sangramento e dor (39). Os dispositivos pequenos eram introduzidos mais facilmente, causavam menos efeitos colaterais, mas apresentavam maiores taxas de expulsão e gestação (177).

A partir de tais observações, surgiram novos DIUs. Aqueles que usavam somente o plástico inerte eram classificados como DIUs não-medicados (também conhecidos como de segunda geração) (143), enquanto aqueles que associavam metal ou hormônio eram considerados DIUs medicados (134), ou de terceira geração (143). Entre os primeiros DIUs medicados, aperfeiçoados por Zipper e Tatum, estavam o "T" e "7" de Cobre, os quais tinham um fio de cobre envolto ao redor para aumentar a sua eficácia e uma área relativamente pequena (176; 192). Entre os não-medicados, destacava-se o Dalkon Shield. A *Food and Drug Administration* (FDA – órgão governamental americano responsável pela regulamentação de medicamentos nos EUA) decidiu que os DIUs medicados deviam ser submetidos a experimentos em animais e depois em humanos, o que postergou a sua comercialização até a metade dos anos 70 (190). O Dalkon Shield, por sua vez, foi considerado um dispositivo, e não um medicamento, e não passou por esses rigorosos testes. Em 1971, começou a ser vendido nos EUA e os problemas de abortamento séptico e perfurações começaram a surgir; tais complicações geraram milhares de processos contra a empresa fabricante e milhões de dólares em multas e indenizações (190). Em junho de

1974, a FDA recomendou a retirada do Dalkon Shield do mercado (182) devido aos inúmeros casos litigiosos (190).

A "crise" do Dalkon Shield gerou processos contra empresas que produziam outros tipos de DIU, como o 7 de Cobre. Apesar de ser aprovado pela FDA, ser recomendado pela OMS e pelo Colégio Americano de Obstetrícia e Ginecologia, o T200 e 7 de Cobre foram retirados do mercado norte-americano por iniciativa da própria empresa (*G.D. Searle and Company*) em virtude do "crescente número de litígios" não-justificados (143; 178). Da mesma maneira, a alça de Lippes e outros DIUs foram colocados de lado por receio dos processos que poderiam surgir e pela imagem negativa gerada pela imprensa (190). Provavelmente, essas dificuldades impediram trabalhos mais aprofundados sobre o DIU.

Apesar disso, uma nova geração de dispositivos intra-uterinos "não-processáveis" surgiu. Entre esses novos tipos de DIUs, existem o TCU380A e o medicado com progesterona (Progestasert) (8; 151), ambos aprovados pela FDA. Além desses dispositivos, existe o GyneFix, que consiste num dispositivo fixado no fundo uterino (180).

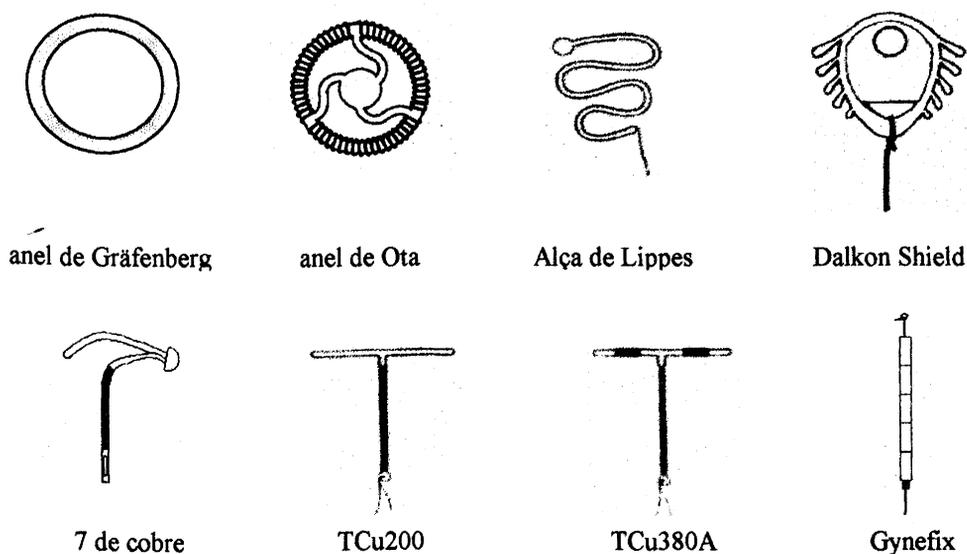
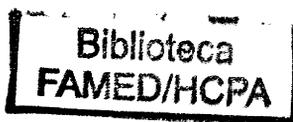


Figura 1.1 Diferentes tipos de DIUs



1.1.2 Mecanismo de Ação

Apesar de o DIU ser usado por milhões de mulheres em todo o mundo e de ter um índice de falha ao redor de 1 por 100 mulheres/ano (143), ainda não existe uma explicação sobre seu exato mecanismo de ação anticoncepcional nos seres humanos. Os estudos em animais não podem ser extrapolados para humanos, pois há variações entre as espécies (83; 126).

Nos seres humanos, Spinato acredita que o principal mecanismo de ação seja sobre a cavidade uterina (169). Por exemplo, Ferrari demonstrou que a introdução do DIU na cavidade uterina, em pacientes com amenorréia pós-pílula, induzia a menstruação (56). Todos os DIUs, medicados ou não, provocam um aumento significativo no número de neutrófilos e células mononucleares (42; 45). O aumento no número de leucócitos, o qual é compatível com uma reação a corpo estranho, é maior nas usuárias de DIU de cobre (156).

Quanto ao seu efeito anticoncepcional, existem evidências de que essa atividade poderia ocorrer tanto na pré como na pós-fertilização.

As evidências a favor de um mecanismo pré-fertilização preconizam a ação espermaticida do DIU de cobre. Entretanto, tais evidências são contraditórias e não permitem afirmar que o principal efeito do DIU de cobre seja sobre os espermatozoides (126).

As células trofoblásticas do blastocisto são responsáveis pela produção de β -hCG. A detecção desse hormônio tem sido usada para estabelecer a ação não-abortiva do DIU (153). Spinatto, entretanto, lembra que o blastocisto é formado cerca de 5 dias após a fertilização; portanto, a ausência de níveis de β -hCG na fase lútea prova pouco, ou quase nada, com respeito ao sucesso da fertilização que ocorreu antes da formação do blastocisto (169). Ylikorkala, após dosar β -hCG em 214 usuárias de DIU T200 entre o 25º e o 35º dia do

ciclo menstrual, concluiu que o DIU previne a gestação principalmente antes de que quantidades significativas do produto do trofoblasto sejam secretadas (189).

Alvarez e colaboradores tentaram demonstrar, por microscopia óptica e eletrônica, a ausência de ovos fertilizados nas trompas de mulheres que seriam submetidas a laqueadura tubária (7). Para tanto, fizeram uma lavagem das trompas uterinas, durante a cirurgia, nas pacientes que tiveram coito não-protetido entre -70 e +11 horas após a ovulação. Foram recuperados 10 ovos com desenvolvimento normal dos 20 controles. Das 14 usuárias de DIU não foram recuperados ovos com desenvolvimento normal. Entretanto, cinco ovos das pacientes com DIU de cobre não eram classificáveis (7). A falta de controle no momento da inseminação, as condições inadequadas dos ovos e o pequeno número de pacientes usuárias de DIU diminuem o valor dos resultados (169).

Os trabalhos que indicam uma atividade pós-fertilização do óvulo citam evidências indiretas. Quando o DIU é inserido até 72 horas após o coito, para prevenir a gestação, é virtualmente eficaz em 100% dos casos (112). Sua presença gera uma reação inflamatória que pode ser resultante da introdução de bactérias dentro de uma cavidade normalmente estéril (118). Por outro lado, o cobre utilizado em certos dispositivos aumenta essa resposta inflamatória e pode mudar o metabolismo dos carboidratos das células endometriais, a motilidade uterina, a sobrevivência dos espermatozóides e a atividade das enzimas, provavelmente inibindo a anidrase carbônica e o potencial elétrico do útero (69; 125).

Quanto maior for a quantidade de cobre utilizada no DIU, maior será a dissociação estroma/glândula no endométrio e seu efeito anticoncepcional (40; 50; 78). Essas transformações são mais intensas nos primeiros meses e tendem a desaparecer após um ano de uso; o DIU T200, que tem cerca de 200 mm² de cobre, não demonstrou uma dissociação significativa no endométrio (40).

Outra evidência da ação pós-fertilização exercida pelo DIU recai sobre as gestações que ocorreram durante o seu uso, mesmo quando bem-posicionado. Se o mecanismo de ação do DIU atua sobre o bloqueio da fertilização, então deveria haver uma redução na porcentagem de gestações intra-uterinas, a qual seria aproximadamente igual à das extra-uterinas. A hipótese de que o DIU causa um aumento das gestações ectópicas foi descartada em uma revisão com mais de 35.000 inserções de DIU com cobre (161). Um estudo bem-controlado em mais de 1.000 pacientes usuárias do DIU TCU380A, por um período de 4 anos, relata uma razão de 1:8 entre gestações ectópicas e intra-uterinas (163). Outros autores relataram razões que variavam entre 1:6 a 1:29 (1; 78; 161). Essas razões excedem substancialmente as observadas nas pacientes não-usuárias de anticoncepcionais que varia de 1 a 2 por 100 (169). Portanto, baseado em tais evidências, Spinatto sugere que a maior proteção do DIU contra a gestação intra-uterina dá-se através da prevenção da implantação do ovo (169).

Com a descoberta de mecanismos moleculares relacionados com a implantação endometrial (97), iniciou-se a investigação do mecanismo de ação do DIU sobre essa nova área de estudo. Por exemplo, a Glicodelina A (GdA), antigamente conhecida como Proteína Placentária 14 (PP14), é secretada ciclicamente pelas glândulas endometriais e é expressa durante e após a fase secretora média (20^o~24^o dia do ciclo) (155). O seu papel pode estar relacionado com a capacidade de modular o sistema imune, talvez permitindo que o enxerto fetal não seja rejeitado pelo sistema imune materno (31). Outra atividade da GdA é sua capacidade de inibir a fusão do espermatozóide com o óvulo no período periovulatório (123).

Essa proteína foi estudada por Seleem e colaboradores, na presença do DIU TCU380A (154). Eles observaram que os níveis séricos de PP14, entre os dias 5-25 do ciclo menstrual, tinham uma substancial redução nas usuárias de DIU de cobre, quando comparadas com os controles (154). Entretanto, Mandelin e colaboradores investigaram essa mesma proteína, através de técnicas de imunistoquímica, entre os dias 7-16 do ciclo

menstrual, em usuárias de DIU com levonorgestrel ou cobre (115). Apesar da diferença estatisticamente significativa da expressão da GdA no período periovulatório, o reduzido número de casos com positividade para GdA nas usuárias de DIU (4/11) pode não traduzir essa diferença clinicamente.

Rutanen e colaboradores verificaram os efeitos do DIU medicado com levonorgestrel (DIU-LNG) sobre a expressão do RNA mensageiro (mRNA) dos fatores de crescimento tipo insulina (IGF-I e IGF-II) e da proteína ligante do fator de crescimento tipo insulina (IGFBP-1) no endométrio humano (146). Foram observados os níveis detectáveis de mRNA do IGF-II e do IGFBP-1 e a supressão do mRNA do IGF-I nos endométrios expostos ao levonorgestrel. Tais achados sugerem que esse modo de tratamento hormonal pode inibir a ação da IGF-I no endométrio (146). Pelo fato de IGF-I e II estarem relacionados com a mediação da ação dos hormônios esteróides sobre o endométrio (64), a supressão do mRNA do IGF-I pode ser um dos mecanismos moleculares que contribuem para a atrofia do epitélio endometrial causada pelo DIU-LNG (146).

Critchley e colaboradores demonstraram que as usuárias do DIU-LNG tem uma regulação negativa sobre os receptores de estrogênio, de progesterona e da prostaglandina desidrogenase (37); contudo, após 12 meses da inserção, verificaram um aumento nos receptores de progesterona (subtipo A), de estrogênio e da atividade da prostaglandina desidrogenase (37). Essas alterações podem ter um papel na etiologia dos sangramentos uterinos anormais associados com o DIU-LNG (37).

Rowe conclui, no relatório técnico da OMS de 1992 sobre anticoncepção intra-uterina, que é pouco provável que um só mecanismo de ação desencadeie os efeitos sobre a fecundidade, apesar de esses mecanismos desencadeantes ainda não terem sido totalmente definidos. É *provável* que o mecanismo anticoncepcional do DIU de cobre no ser humano esteja mais relacionado com a alteração ou a inibição da migração dos

espermatozóides no trato genital superior feminino, a fecundação e o transporte do óvulo do que com a probabilidade de prevenir a implantação do mesmo (143).

1.2 HISTOLOGIA E FISILOGIA DO ENDOMÉTRIO NORMAL PARA A DATAÇÃO

ENDOMETRIAL

A compreensão da variação morfológica do endométrio por todo o ciclo menstrual é essencial para documentar se ocorreu a ovulação e para diagnosticar algumas causas de infertilidade, como, por exemplo, o defeito de fase lútea.

O endométrio é composto pela camada basal e pela camada funcional (17). A primeira corresponde a uma camada adjacente ao miométrio, composta por poucas glândulas proliferativas que são circundadas por um estroma denso (75). Essa parte mais densa está intimamente ligada ao miométrio (17) e não responde às alterações cíclicas dos hormônios ovarianos (53). Apesar disso, a camada basal tem a sua importância, pois participa da regeneração do endométrio, através das células de reserva que a mesma possui (116). Sua aparência, sob a microscopia óptica, é relativamente constante ao longo do ciclo menstrual. As glândulas possuem um fino epitélio proliferativo pseudo-estratificado, núcleos alongados, raras figuras de mitose e cromatina densa (75). É importante reconhecer a camada basal para que não haja confusão com a camada funcional.

A camada funcional do endométrio normal é composta por dois elementos: o *epitélio* (superficial e glandular) e o *mesênquima* (estroma e vasculatura) (13). A invaginação do epitélio superficial, ou luminal, na profundidade do estroma forma a glândula endometrial. (17). A camada funcional tem sido tradicionalmente dividida em duas partes, a camada compacta e a esponjosa, por causa da aparência durante a fase secretora tardia do ciclo menstrual e durante a gravidez (75). A camada compacta é relativamente estreita, apresenta pouco edema e as porções glandulares que alberga são bastante retilíneas (17). A camada

esponjosa compreende o componente principal do endométrio. É edematosa, suas glândulas são tortuosas e possuem luz ampla, responsável pela aparência esponjosa da região (17). Essas zonas só se tornam evidentes com o desenvolvimento do endométrio secretor (53). Esses detalhes podem ser observados na Figura 1.2.

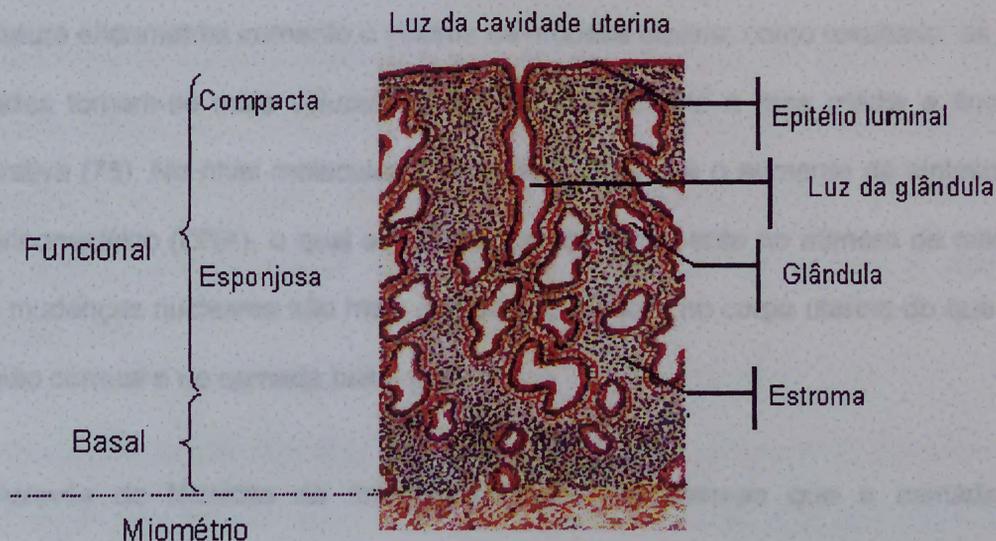


Figura 1.2 Representação esquemática da histologia do endométrio na fase secretora inicial.

O ciclo menstrual possui duas fases distintas: a proliferativa e a secretora. Durante a fase proliferativa, as alterações morfológicas diárias não são suficientemente óbvias para permitir uma datação adequada. Por outro lado, as mudanças diárias no endométrio, durante o período pós-ovulatório, são suficientemente distinguíveis para permitir uma avaliação acurada do ciclo endometrial (122).

Em 1950, Noyes e colaboradores publicaram o primeiro estudo, na edição de lançamento do periódico *Fertility and Sterility*, que se tornou o padrão-ouro para a datação endometrial (122). Essas duas fases e a datação endometrial através da biópsia endometrial serão revistas.

1.2.1 Fase Proliferativa

A fase pré-ovulatória é caracterizada pela predominância do estroma, em detrimento das células glandulares, e as poucas glândulas existentes apresentam-se retificadas na fase proliferativa inicial (122). A ação do estrogênio circulante no endométrio faz com que a vasculatura endometrial aumente o volume da mucosa uterina; como resultado, as glândulas retificadas tornam-se mais volumosas e tortuosas durante a fase média e final da fase proliferativa (75). No nível molecular, o estrogênio estimula o aumento da síntese do ácido desoxiribonucléico (DNA), o qual se reflete por um incremento no número de mitoses (53). Essas mudanças nucleares são mais notadas no fundo e no corpo uterino do que no istmo, na região cornual e na camada basal (54).

Através de técnicas de imunoistoquímica, percebeu-se que a camada superior funcional serve como um sítio adequado de implantação para o blastocisto (65). Por volta do 11º-14º dia do ciclo, ocorre um declínio na atividade de DNA, possivelmente devido à refratoriedade à hiperestimulação relativa do endométrio pré-ovulatório ao estrogênio (53). Além do estrogênio, os fatores de crescimento tipo insulina (IGF-1), bem como os agentes que aumentam a adenosina monofostada cíclica intracelular (AMPC), estimulam a síntese dos receptores de progesterona (15).

Nesse período, o estrogênio também leva à formação de organelas ultra-estruturais nas células (54). Tais estruturas irão confinar lisossomas primários derivados do complexo de Golgi, os quais contribuirão na destruição endometrial durante o período menstrual (53). As células glandulares do tipo proliferativo apresentam citoqueratina e vimentina (65). Essas glicoproteínas fazem parte do grupo de filamentos intermediários (6), os quais, por sua vez, fazem parte do citoesqueleto. Esse último é composto por uma rede de filamentos protéicos que se reorganiza continuamente estendendo-se por todo o citoplasma (6). É através dele que a célula tem a capacidade de mover-se e assumir diferentes formas (6). As células

epiteliais endometriais apresentam a citoqueratina, enquanto as células estromais apresentam somente a vimentina (65).

No período pré-ovulatório, os núcleos das células glandulares e estromais apresentam receptores para progesterona e estrogênio (65). A superfície das células glandulares adquirem numerosos cílios e microvilos ao redor das aberturas das glândulas, sendo que o surgimento desses cílios é dependente do estrogênio (52). As estruturas ciliares facilitam a mobilização e a distribuição das secreções endometriais na fase secretora do ciclo menstrual (55). Os microvilos são extensões citoplasmáticas e aumentam a superfície total das células (51).

Agregados linfóides podem ser vistos no estroma endometrial, particularmente na camada basal (65). Apesar de corarem para as imunoglobulinas A, M e G, esses agregados não têm, provavelmente, um papel significativo no sistema imune local (138). Essas observações são consistentes com a natureza estéril do endométrio normal (53).

Portanto, os cortes histológicos do endométrio proliferativo inicial apresentam-se como glândulas retificadas, curtas, estreitas e com mitose. O estroma é compacto e apresenta alguma mitose. O endométrio proliferativo médio apresenta glândulas mais longas, encurvadas e edema de estroma variável que tende a regredir. O estágio proliferativo tardio é caracterizado por glândulas mais tortuosas e com seu epitélio pseudo-estratificado (122).

1.2.2 Fase Secretora

Após a ovulação, sob a influência da progesterona, o endométrio, que foi preparado pelo estradiol, passa por uma diferenciação secretória muito rápida e bastante característica (122). As alterações morfológicas utilizadas para datar o endométrio estão resumidas na tabela abaixo.

Tabela 1.1 Evidências na morfologia endometrial da ocorrência da ovulação

Morfologia	Dias do ciclo
Vacuolização subnuclear com o enfileiramento das células glandulares	17-18
Edema do estroma com a cristalização do epitélio glandular	22-23
Pré-decidualização estromal e perivascular	23-28
Necrose pré-decidual e estromal difusa, inflamação e trombose vascular	1-2
Exsudato inflamatório, agregados de células estromais (aglomerados de estroma) com ou sem hipertrofia da superfície das células epiteliais	2-4

Fonte: Giudice e colaboradores (65)

Dia 1-3 pós-ovulação

No primeiro dia pós-ovulatório, a morfologia do endométrio não é significativamente diferente da vista na fase proliferativa tardia do ciclo menstrual. Porém, durante o segundo dia pós-ovulatório, pequenos vacúolos cilíndricos aparecem na base das células das glândulas, na camada funcional, o que diferencia da fase proliferativa tardia (122). As células permanecem altas com os núcleos pseudo-estratificados. Mudanças semelhantes podem ser produzidas somente com a administração de estrogênio, na ausência de ovulação (53). A primeira alteração histológica considerada específica da ovulação é vista no 3º dia após a ovulação e consiste na presença de vacúolos subnucleares bem-desenvolvidos e na disposição em paliçada dos núcleos das células (122). Esses vacúolos são resultantes do acúmulo de grânulos de glicogênio (53).

Dia 4-6 pós-ovulação

No 4º dia pós-ovulação, estabelece-se a vacuolização supranuclear e, entre o 4º e 5º dia pós-ovulação, os produtos citoplasmáticos supranucleares, ricos em glicoproteínas e mucopolissacarídeos, são excretados no lúmen glandular através de um mecanismo apócrino (185). Isso ocorre através da protrusão e do desabamento da porção apical das células. Os fluidos uterinos contêm transudatos derivados do sangue. O pico máximo da

secreção intraglandular coincide com a época da implantação do blastocisto, por volta do 8º dia pós-ovulatório, caso ocorra a fertilização (53).

Ao redor do 5º dia pós-ovulatório, os níveis elevados de progesterona circulante inibem a mitose nas células glandulares, ao mesmo tempo que a atividade secretória apócrina inicia (54).

Dia 7-10 pós-ovulação

A partir do 6º dia pós-ovulação, as alterações estromais são mais evidentes do que as alterações nas glândulas no que diz respeito à datação endometrial (53). As mudanças são o **edema de estroma** (6º ao 9º dia pós-ovulação), o **enrolamento das arteríolas espiraladas** (8º ao 11º dia pós-ovulação) e a **pré-decidualização do estroma** (9º ao 14º dia pós-ovulação) (122). Essas alterações são mediadas pelas prostaglandinas PGF2 e PGE2 (92). A PGE2 promove a permeabilidade capilar (165), levando o edema ao seu ponto máximo em torno do 8º dia pós-ovulação. O estradiol promove o aumento súbito da produção de leucotrienos e de prostaglandinas através do aumento da atividade da cicloxigenase (137). Esse aumento do estradiol no início da fase pós-ovulatória média pode ter um papel no preparo do endométrio para a implantação do blastocisto, através dos metabólitos do ácido araquidônico (165). A proliferação endometrial leva ao enrolamento do sistema arterial do endométrio, um fenômeno que produz agrupamentos vasculares na camada funcional superior (53).

A permeabilidade vascular e o edema do estroma são pré-requisitos essenciais para a transformação pré-decidual (147). A pré-decidualização estromal inicia pelo 8º~9º dia pós-ovulação, ao redor das arteríolas espiraladas e capilares da camada funcional (122). Junto com a pré-decidualização estromal no 9º dia pós-ovulação, as glândulas formam projeções epiteliais para dentro do lúmen, as quais são chamadas de **cristalização** (53). A pré-

decidualização perivascular é mais óbvia no 10º dia pós-ovulação e é caracterizada pela conversão das células estromais, com formato de fuso, em células tipo epiteliais, mais alargadas, com o núcleo aumentado ou duplicado (tetraploidia) e o citoplasma aumentado (75). O estradiol não toma parte nesse processo, pois não existem receptores de estrogênio nas células pré-decíduais (20). Por outro lado, os receptores de progesterona estão presentes (20). As células pré-decíduais têm várias funções metabólicas que estão relacionadas com a gestação ou com a menstruação, caso a concepção não ocorra (53). Por exemplo, as células pré-decíduais têm propriedades fagocíticas e digerem a matriz de colágeno extracelular (98).

Dia 11-13 pós-ovulação

A transformação pré-decidual das células estromais debaixo da camada epitelial ocorre por volta do 11º dia pós-ovulatório, produzindo uma camada compacta, enquanto, no 12º e 13º dia pós-ovulação, os dois terços superiores da camada funcional tornam-se pré-decidualizados e as glândulas demonstram um enovelamento com um padrão de cristalização. O estroma endometrial, nesse período, está infiltrado por leucócitos polimorfonucleares e pelas células de núcleo único em forma de rim, chamadas de granulócitos metriais (53).

1.2.3 Fase Menstrual

Com a queda dos níveis de progesterona e estradiol, a membrana dos lisossomas sofre uma instabilidade e libera o seu conteúdo (87). Essas alterações são mediadas pelas prostaglandinas PGE2, PGF2 e pelo tromboxano (170) e seu resultado final leva a múltiplos focos isquêmicos que duram alguns minutos e que culminam na necrose tecidual (139). A mucosa endometrial degenera rapidamente e cerca da metade do detrito menstrual é expelida nas primeiras 24 horas. O desabamento é seguido por uma regeneração (53). Os

dois terços superiores do endométrio, ao redor do 14º dia pós-ovulação, contêm fissuras e células pré-decíduais degenerativas misturadas com células glandulares epiteliais, bem como células inflamatórias. O reparo do epitélio endometrial ocorre, entre outros aspectos, através de uma nova reepitelização. Esse evento é reconhecido através de agregados de células estromais abaixo da superfície epitelial. Essas células são chamadas de *blue-balls* e estão associadas à regeneração tissular. A coloração intensa desse agregado de células estromais pela hematoxilina-eosina (HE) é devida ao núcleo proeminente e ao citoplasma escasso (53).

1.3 CONSIDERAÇÕES TÉCNICAS NA INTERPRETAÇÃO DAS BIÓPSIAS

As alterações histológicas descritas anteriormente foram baseadas no trabalho de Noyes e colaboradores, no qual foram analisadas 8.000 biópsias endometriais (122). A partir dessas alterações histológicas foi possível identificar o estágio da maturação do endométrio e datá-lo. Tal datação é importante, pois auxilia na investigação da infertilidade (57; 184).

A interpretação morfológica acurada do endométrio é possível, quando a amostra endometrial é obtida da região corporal ou fúndica do útero e é fixada imediatamente em formol a 10%, ou em solução de Bouin (122). Essa análise, incluindo a datação, é baseada na avaliação da camada funcional do endométrio, a qual é identificada pelo epitélio luminal que a recobre. Uma amostra sem o epitélio luminal pode levar a um erro diagnóstico, pois a camada basal não responde aos estímulos hormonais cíclicos (53). Além disso, a amostra geralmente apresenta quantidades aumentadas de glândulas e o estroma é compacto, com ilhotas de artérias basais, o que pode ser confundido com um pólipó ou uma hiperplasia endometrial.

A melhor época para realizar a biópsia de endométrio, com o intuito de verificar a ovulação, é a partir do 8º dia pós-ovulação (22º dia do ciclo) em diante (53). O endométrio

secretor geralmente demonstra mudanças sutis e combinações de padrões morfológicos que podem resultar em erro de $\pm 4-5$ dias (110).

A datação endometrial, mesmo em mãos experientes, não é altamente reproduzível (152). Geralmente se aceita uma variação de 2 dias com relação ao dia do ciclo, tendo-se por base a data da última menstruação. Infelizmente, em mãos menos experientes, diferenças diagnósticas entre os avaliadores de uma mesma biópsia podem atingir até 65%, podendo haver uma falha de reprodutividade interna de até 27% dos casos (63).

Para evitar viéses, o patologista deve estar ciente das informações clínicas, incluindo a data da última menstruação. Esse erro pode ser diminuído para ± 2 dias, se for levada em consideração a data das alterações menstruais que representam a fase mais avançada do ciclo menstrual. Por exemplo, uma biópsia endometrial pode mostrar mudanças compatíveis com o 16º, 17º e 18º dias do ciclo menstrual; o diagnóstico deve basear-se na data mais avançada, portanto, como endométrio secretor do 18º dia do ciclo, ao invés de endométrio secretor do 17º dia do ciclo (122).

A Figura 1.3 apresenta um fluxograma para a datação endometrial.

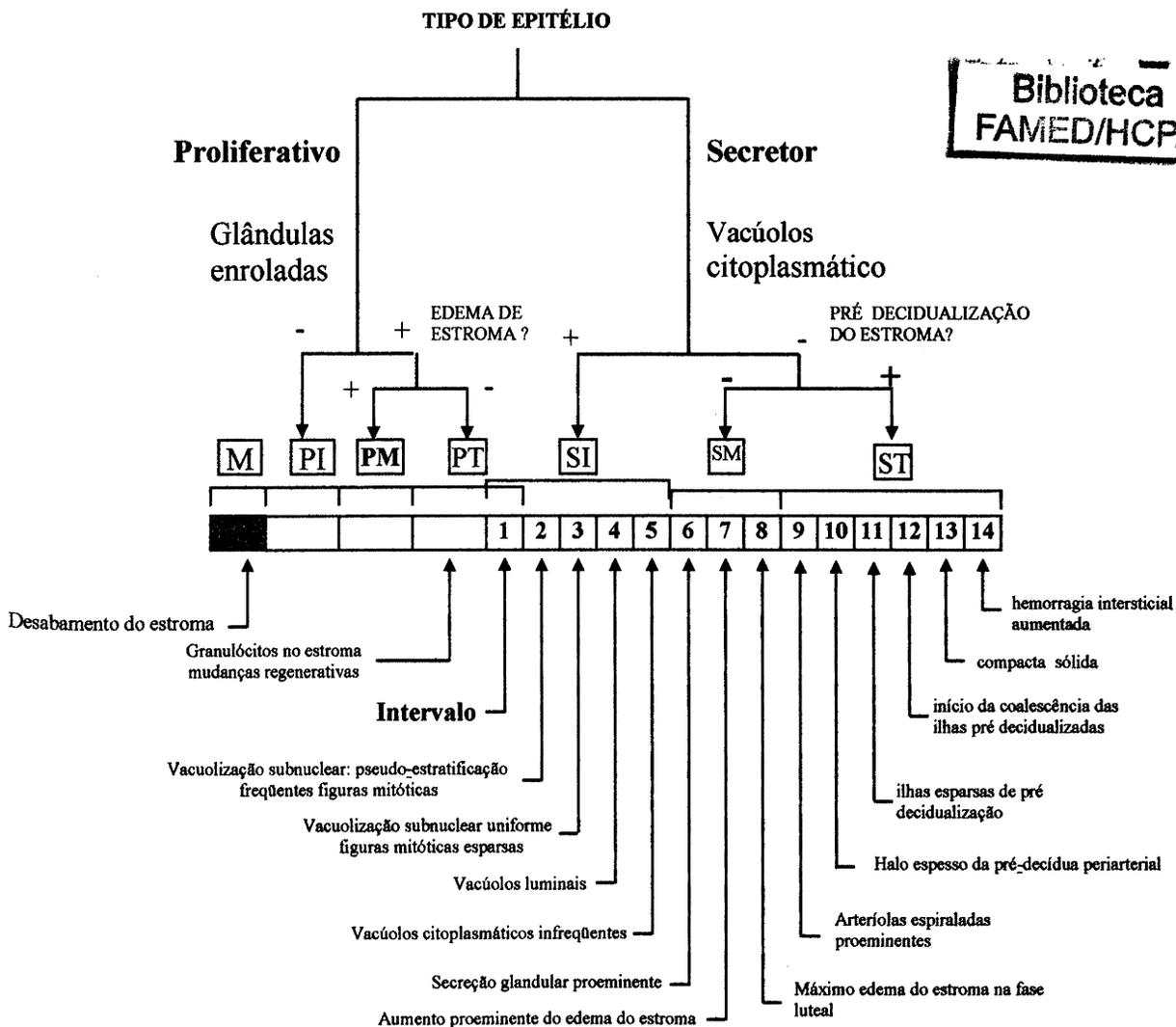


Figura 1.3 Fluxograma para a datação endometrial

M: Menstruação **PI:** Proliferativo Inicial **PM:** Proliferativo Médio **PT:** Proliferativo Tardio **SI:** Secretor Inicial **SM:** Secretor Médio **ST:** Secretor Tardio

Fonte: Hendrickson (75).

1.4 INTEGRINAS

1.4.1 Matriz Extracelular

Os tecidos são compostos por células. Entretanto, uma parte substancial do seu volume é o espaço extracelular, o qual é grandemente preenchido por uma intrincada rede de macromoléculas que constituem a **matriz extracelular** (5). A matriz é composta por uma variedade de proteínas e polissacarídeos que são secretados localmente e “montados” em uma malha organizada, próximos à superfície das células que os produzem (5). As moléculas que constituem a matriz extracelular são produzidas localmente pelas células. Na maioria dos tecidos conjuntivos, as macromoléculas são secretadas por células chamadas de fibroblastos. Quando os tecidos conjuntivos são especializados, como a cartilagem e o osso, essas macromoléculas são secretadas por células da família dos fibroblastos que têm nomes mais específicos: condroblastos para as cartilagens e osteoblastos para os ossos (22). As duas principais classes de macromoléculas extracelulares que formam a matriz são:

- *Glicosaminoglicanos*: geralmente ligados covalentemente com proteínas, formando os *proteoglicanos*.
- *Proteínas fibrosas funcionais*: podem ser estruturais, como o colágeno e a elastina, ou de adesão, como a fibronectina e a laminina. A fibronectina é amplamente distribuída nos tecidos conjuntivos, enquanto a laminina é encontrada principalmente na lâmina basal. (5)

1.4.2 Receptores de Matriz Extracelular nas Células Animais: As Integrinas

Para compreender como a matriz extracelular interage com as células, é necessário identificar as moléculas da superfície celular que se ligam aos componentes da matriz. Essa

ligação da célula com a matriz necessita de uma proteína transmembrana que une o citoesqueleto cortical à matriz extracelular: a integrina (5).

As integrinas pertencem à família de moléculas responsáveis pela adesão celular e foram assim nomeadas pela primeira vez no final dos anos 80 (82). A adesão celular é de fundamental importância para a célula, pois provê a ancoragem, orienta a migração celular e sinaliza o crescimento e a diferenciação (144). Essas proteínas ubíquas da parede celular estão presentes em praticamente todas as células do organismo (181). O nome integrina foi-lhes dado por integrarem o citoesqueleto interno da célula e ligarem-no à matriz extracelular (144). Sem as integrinas, as células perderiam a capacidade de ancorarem-se ao substrato matricial, de interagirem com as células adjacentes, impossibilitadas de receber informações do meio pericelular, e, conseqüentemente, de responderem ao meio extracelular (24). As integrinas não só são biologicamente importantes, mas também desempenham um papel médico relevante. Essas glicoproteínas parecem estar relacionadas à agregação das plaquetas, às funções imunes, ao reparo tecidual e à invasão tumoral (144).

1.4.3 Família das Integrinas

As integrinas são grandes glicoproteínas transmembrana celular compostas de duas subunidades: α e β como demonstra a Figura 1.4. Microfotografias eletrônicas sugerem que a molécula tenha o formato demonstrado na figura mencionada, com uma cabeça globosa projetando-se cerca de 20 nm da membrana plasmática. Ao ligar-se à matriz protéica, no exterior da célula, e ao citoesqueleto de actina (a ligação via proteínas talina e α -actina), no interior da célula, a integrina serve como uma ligação transmembrana. As subunidades α e β são glicosiladas (não demonstrado na Figura 1.4) e mantêm-se unidas por ligações não-covalentes. O receptor de fibronectina possui uma subunidade α , constituída por uma única cadeia de polipeptídeos, a qual é clivada em uma cadeia menor transmembrana e em uma maior extracelular mantidas juntas por uma ponte dissulfídica.

Essa cadeia é dobrada em quatro domínios com cátions divalentes. A parte extracelular da cadeia β contém uma região repetida rica em cisteína, dentro da qual há uma ligação dissulfídica.

O tamanho dessas subunidades varia de 90.000 dáltons para as menores subunidades β , como $\beta 2$ e $\beta 3$, a 200.000 dáltons para as maiores subunidades, como $\beta 4$ e $\alpha 1$ (25). As subunidades α podem existir como dois peptídeos ligados por uma ponte dissulfídica e possuem sítios de ligação para cátions divalentes, que são necessários para o acoplamento dos ligantes (58).

O segmento curto do citoplasma interage com o citoesqueleto. Uma porção curta transmembrana conecta-se a uma grande região extracelular que constitui o ligante matricial e o sítio de reconhecimento (181). A cauda citoplasmática pode regular a conformação extracelular, as preferências para a ligação (58) e o sinal de transdução (30). A cauda citoplasmática da subunidade β interage com os filamentos de actina do citoesqueleto através de componentes como a talina e α -actina (5). Isso confere à subunidade β uma atividade de transdução do sinal e o papel de regular a migração ou a parada dos leucócitos (61).

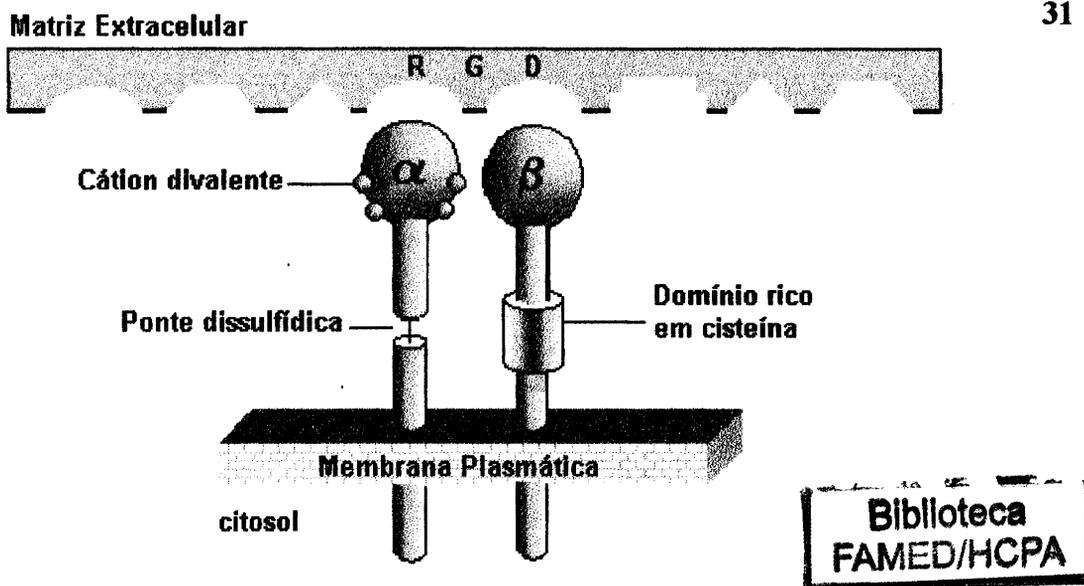


Figura 1.4 Estrutura das subunidades de uma integrina célula-superfície matricial.

A região ligante necessita de uma seqüência de reconhecimento de aminoácidos para ambas as subunidades α e β (144). Integrinas diferentes podem reconhecer ligantes diferentes, e a preferência por unir-se a determinado ligante pode variar de acordo com o tipo de célula, ou de acordo com a composição da membrana celular (73). Cada subtipo de integrina pode reconhecer um ou mais tipos diferentes de matriz extracelular. Algumas integrinas ligam-se somente a alguns tipos de macromoléculas da matriz extracelular, como a fibronectina ou a laminina, enquanto outras ligam-se a mais de uma, por exemplo, a integrina do fibroblasto liga-se ao colágeno, à fibronectina e à laminina.

As integrinas diferem dos receptores hormonais da superfície celular e de outras moléculas sinalizadoras solúveis, pois ligam-se aos seus receptores com afinidade relativamente baixa ($K_a = 10^6$ - 10^9 litros/mol) e estão presentes com uma concentração cerca de 10 a 100 vezes maior do que a dos receptores hormonais na superfície da célula (5).

domínio externo da subunidade $\beta 2$ da integrina. Tal ligação daria movimentação aos leucócitos (133).

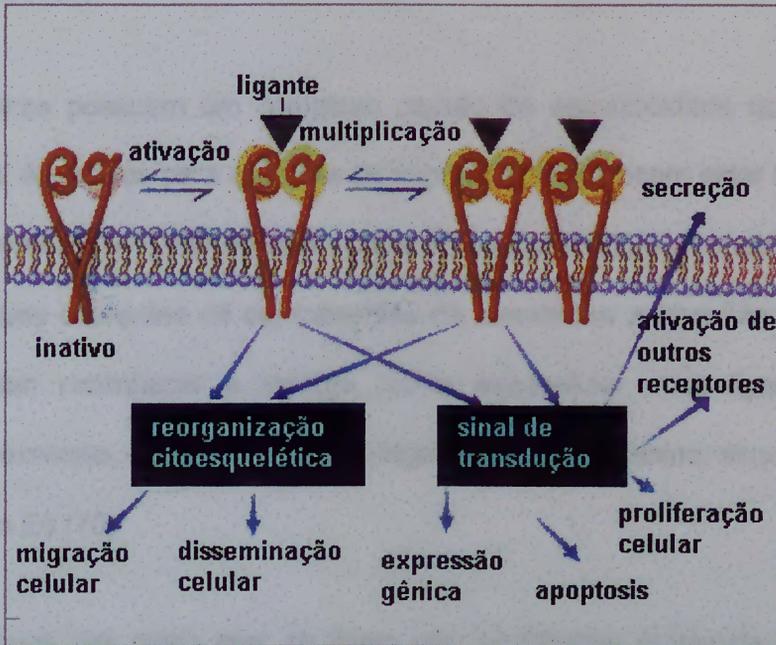


Figura 1.6 Eventos de sinalização acionados pela interação de um receptor hipotético de integrina com o seu ligante.

Adaptada de Frenette e col. (61)

1.4.4 Ligações das Integrinas e Seqüência de Reconhecimento

Todas as células do organismo apresentam integrinas em sua superfície (96). Em vários tecidos, os tipos celulares distintos expressam um padrão característico de integrina, e uma mesma integrina pode ser expressa em vários tipos celulares (181). A adesão celular envolve o reconhecimento de um componente específico da matriz extracelular, como o colágeno, a laminina e a fibronectina, através das subunidades α e β (144). Certas integrinas reconhecem certos componentes da membrana basal e ligam-se a eles, como o colágeno e a laminina, enquanto outras ligam-se à fibronectina ou a moléculas semelhantes no interstício. Dessa forma, algumas células estabelecem o seu fenótipo epitelial e interagem com a membrana basal, ao passo que outras, como as do estroma endometrial, mantêm o seu papel de suporte sem tomarem uma posição específica ou envolverem-se com a membrana basal. Por exemplo, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ e $\alpha 6\beta 4$ ligam-se ao colágeno e à laminina

e são comumente encontradas nas células epiteliais, enquanto os receptores de fibronectina ($\alpha 5\beta 1$) e vitronectina (αv) são tipicamente encontrados em células estromais e intersticiais, respectivamente (102).

As integrinas possuem um complexo padrão de especificidade que as sobrepõem umas às outras. As razões para que haja tal sobreposição parecem estar relacionadas com um precursor comum (144). Um exemplo disso é o receptor $\alpha v\beta 3$ vitronectina, que se liga a mais de sete tipos diferentes de componentes da membrana extracelular (164). Integrinas diferentes podem reconhecer a mesma matriz extracelular, mas ligam-se a epitopos diferentes. Por exemplo, $\alpha 1\beta 1$ reconhece o fragmento E1 da laminina, enquanto a $\alpha 6\beta 1$ liga-se ao fragmento E8 (70).

As estruturas nas quais elas se ligam são seqüências curtas de aminoácidos que estão presentes em vários locais, como demonstrado na Figura 1.7. A seqüência de reconhecimento mais comum é a seqüência arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) (144). As integrinas que contêm a subunidade αv reconhecem a seqüência de ligação de três aminoácidos (RGD) (145). As demais podem ser vistas na Tabela 1.2.

Tabela 1.2 Seqüências de aminoácidos e as integrinas que as reconhecem

Seqüência de Aminoácidos*				
RGD	KQAGDV	LDV	KRLDGS	DGEA
$\alpha 5\beta 1$	$\alpha 5\beta 1$			
$\alpha v\beta 1$				
$\alpha v\beta 3$				
$\alpha v\beta 5$				
$\alpha v\beta 6$				
$\alpha 11\beta 3$	$\alpha 11\beta 3$			$\alpha 2\beta 1$
$\alpha 2\beta 1$				
$\alpha 3\beta 1$				
		$\alpha 4\beta 1$		
			$\alpha M\beta 2$	

* R: Arginina S: Serina G: Glicina K: Lisina Q: Glutamina A: Alanina V: Valina
E: Ácido Glutâmico D: Ácido Aspártico

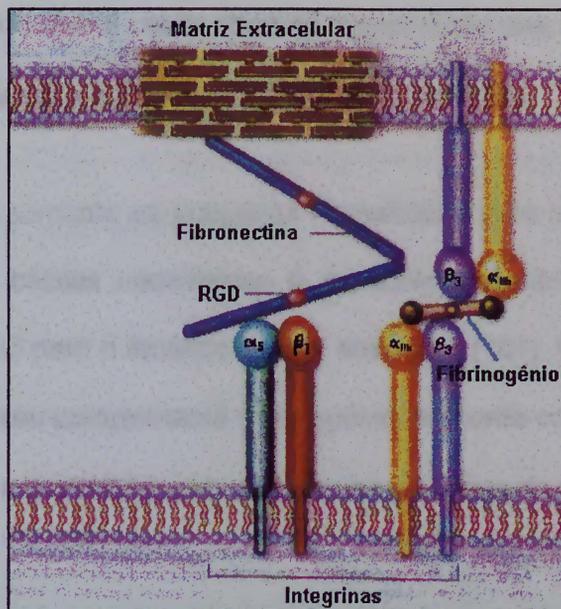


Figura 1.7 Ligação das integrinas representadas em uma membrana plasmática hipotética. Adaptada de Frenette e colaboradores (61).

Conforme demonstrado na Figura 1.7, as integrinas são compostas por duas subunidades diferentes (heterodímeros) que se ligam a proteínas da matriz extracelular, como demonstrado com $\alpha_5\beta_1$, a qual é um receptor de fibronectina e pode auxiliar na montagem da matriz de fibronectina. As integrinas também se ligam a moléculas de adesão solúveis, como o fibrinogênio, o qual forma um ligamento cruzado com a integrina plaquetária $\alpha_{IIb}\beta_3$ durante a agregação das plaquetas. Uma pequena seqüência de aminoácidos, como arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), é frequentemente o local primário de reconhecimento do receptor da integrina.

1.4.5 Regulação da Expressão das Integrinas

A regulação da expressão das integrinas é complexa e específica para cada tipo celular. Duas subunidades centrais de integrina, α_v e β_1 , são produzidas em abundância e podem ser pareadas com muitas outras subunidades (74; 157). O fator limitante de inserção de uma integrina na membrana citoplasmática é a disponibilidade de pareamento com a

subunidade α ou β , sendo que a célula controla a expressão das integrinas através de um controle da produção dessas subunidades (100).

A célula expressa somente as integrinas necessárias para manter a sua função. Um achado importante nas células neoplásicas é o padrão desordenado da expressão das integrinas, o que contribui para o fenótipo celular aberrante (101). Uma célula normal tem a capacidade de mudar o seu complemento de integrina de acordo com os sinais do seu meio, como ocorre com $\alpha 2\beta 1$, a qual se liga ao colágeno na presença do Mg^{+2} ; porém, o Ca^{+2} inibe tal ligação (68).

Os fatores de crescimento e as citocinas são importantes fatores reguladores da expressão das integrinas. Por exemplo, as células endoteliais aumentam a expressão de $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ e $\alpha v\beta 4$ em resposta ao fator básico de crescimento do fibroblasto (bFGF) e, simultaneamente, diminuem a expressão de $\alpha 1\beta 1$ e $\alpha v\beta 3$ (95). Entretanto, as citocinas inflamatórias, como a interleucina-1 α (IL-1 α) e o fator de necrose tumoral α (TNF- α), geram uma diminuição da expressão da integrina $\alpha 6\beta 1$ (41) e um aumento de $\alpha v\beta 3$ (67). O fator de crescimento transformador $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), por sua vez, aumenta a expressão da subunidade $\alpha 1$ em até três vezes mais do que os controles (67), além de promover a síntese da secreção de vários componentes da matriz extracelular, incluindo a fibronectina, a osteopontina e os proteoglicanos (18; 84; 121; 131).

A ligação da célula na matriz extracelular requer a presença de Ca^{+2} , Mg^{+2} e de um dos seguintes componentes da matriz: fibronectina, vitronectina, laminina ou colágeno. Essa necessidade para a adesão celular foi demonstrada ao incubar-se EDTA, um quelador de cálcio, em meio de cultura com células estromais do endométrio humano. O EDTA impediu a ligação desses componentes na matriz extracelular (67).

O meio hormonal também influencia a regulação das integrinas, sendo que a progesterona é o principal hormônio envolvido nesse processo. O surgimento da onda de progesterona após a ovulação, no ciclo menstrual humano, estaria relacionado com o aparecimento da integrina $\alpha v\beta 3$ no endométrio (109).

1.4.6 Implantação - Janela de Implantação

A implantação é um processo que pode ser dividido em estágios distintos. Após a fertilização do oócito, existe um processo de clivagem que continua e atinge a formação do blastocisto. O blastocisto, por sua vez, apresenta-se ao endométrio com a sua massa celular interna direcionada para o epitélio endometrial (*aposição*), realizando a adesão e a invasão no endométrio materno (2). O processo de implantação é coordenado pelos esteróides ovarianos de origem materna (33).

Em humanos, a fertilização do oócito pelo espermatozóide na trompa de Falópio caracteriza o **estágio I** (173). A divisão do zigoto determina o **estágio II** (173). O **estágio III** é caracterizado pelas clivagens sucessivas da mórula até que a massa de células formadas dê origem ao blastocisto (173). A mórula penetra na cavidade uterina cerca de 72-96 horas após a fertilização (27). Por volta do 5º dia pós-fertilização, o blastocisto humano, composto por uma camada celular externa (*trofoblasto*) e um grupo interno de células (*massa celular interna*), expande-se e rompe a zona pelúcida (*hatching*), penetrando na cavidade uterina para a implantação (44). De acordo com Croxatto e colaboradores, o blastocisto humano chega na cavidade endometrial 120 horas após a ovulação (38). Durante esse período, isto é, 120 horas após a ovulação, os blastocistos podem implantar-se quase em qualquer parte do organismo (113).

Fora do período de receptividade uterina, o endométrio apresenta uma barreira para a implantação, como demonstrado com embriões de camundongos (35). Nesse experimento,

Cowell e colaboradores removeram o endométrio através de uma curetagem uterina e verificaram que a implantação dos ovos ocorria fora desse período de receptividade uterina, sugerindo que o endométrio consistia em uma barreira para a nidação (35).

Sabe-se que o endométrio passa por um período definido de receptividade para a implantação do embrião (10; 142). A existência de uma “janela de implantação” foi sugerida pela primeira vez por Finn e colaboradores (59), a qual tem sido demonstrada em modelos animais (19; 136) e em humanos (21; 120).

Em humanos, o termo “janela de implantação” pode ser definido como o intervalo de tempo entre a chegada do blastocisto expandido na cavidade endometrial, durante o período de maior receptividade uterina, e o desenvolvimento da zona decidual primária (62; 72).

Em humanos, a maioria dos dados disponíveis sobre uma janela de implantação é derivada de amostras de histerectomia (76) e de resultados de ciclos de inseminação *in vitro* (120; 135). Hertig e colaboradores identificaram somente ovos flutuantes nos úteros histerectomizados antes dos dias 19~20 do ciclo menstrual, enquanto os embriões implantados foram identificados após o dia 21. Os trabalhos realizados por Navot e colaboradores e por Prapas e colaboradores propoem que o melhor momento para a transferência dos ovos deva ser entre os dias 17~19 de um ciclo menstrual de 28 dias (120; 135). A transferência bem-sucedida entre os dias 17~19, entretanto, não define a janela de implantação, mas uma janela de transferência; a implantação deve ocorrer alguns dias depois, tendo por base os trabalhos de Hertig e colaboradores (76). Uma revisão sobre a janela de implantação em humanos sugere que esse período pode ser menor. Rogers e colaboradores (142) calcularam uma janela de 3,5 dias, após revisarem 9 estudos. Uma janela excepcionalmente larga de 7 dias foi sugerida por Formigli e colaboradores (60), usando ovos fertilizados de doadores em receptoras hormonalmente preparadas. Com base nos dados histológicos e dos ciclos de fertilização assistida, propõe-se que o blastocisto

deva chegar na cavidade uterina por volta do 17º e implanta-se por volta do 19º~20º dia do ciclo menstrual.

O exato momento da implantação é desconhecido, mas supõe-se que a aposição do blastocisto tem seu início ao redor do 20º~21º dia e está completa ao redor do 24º dia do ciclo menstrual (62; 72; 97).

Com o estabelecimento da receptividade uterina, o blastocisto faz a aposição ao endométrio, caracterizando o **estágio IV** (173). A aposição é rapidamente seguida pela penetração no epitélio e invasão do blastocisto no endométrio (46), caracterizando o **estágio V** (173). O mecanismo que aciona essa disposição ordenada do blastocisto através da superfície epitelial é desconhecido, mas a interação do trofoblasto com o epitélio uterino e a decídua é, provavelmente, capacitada por sistemas parácrinos auto-regulados oriundos do disco embrionário e do endométrio (43). Os mediadores vasoativos, como a histamina (32), as prostaglandinas (114) e os leucotrienos (129), bem como os fatores de crescimento, por exemplo, o fator I de crescimento tipo insulina (IGF-I) (64), o fator de crescimento epidérmico (EGF) (167), o fator α e β de crescimento transformador com as suas isoformas (TGF- β s 1-3) (130; 174) e as citocinas, entre elas o fator inibidor leucêmico (LIF) (23; 71), parecem desempenhar funções no evento da implantação. As integrinas, como moléculas de adesão, são participantes desse sistema.

1.4.7 Expressão das Integrinas no Endométrio e Janela de Implantação

A imunistoquímica, em amostras criopreservadas, tem sido a técnica utilizada na pesquisa das integrinas endometriais (102; 166; 175). A primeira pesquisa sobre a presença das integrinas no endométrio foi realizada em 1992 (106). Reconheceu-se que o endométrio é o primeiro e o único tecido que possui integrinas permanentes e ciclo-dependentes (173). As integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ e $\alpha 6\beta 1$ estão sempre presentes no epitélio endometrial das

mulheres (173), mesmo em usuárias de pílulas anticoncepcionais (166). A Figura 1.8 demonstra os padrões das expressões de integrina de acordo com o ciclo menstrual. A imunorreatividade de algumas integrinas é continuamente encontrada nas glândulas endometriais durante todo o ciclo menstrual, enquanto outras são observadas em períodos definidos.

				$\alpha v\beta 3$	
			$\alpha 1\beta 1$		
		$\alpha 4\beta 1$			
Expressão Regulada	$\alpha 2\beta 1$ $\alpha 3\beta 1$ $\alpha 5\beta 1$ $\alpha 6\beta 1$ $\alpha 6\beta 4$				
Expressão contínua	PI	PM	SI	SM	ST

Figura 1.8 Padrão da expressão das integrinas nas glândulas do endométrio humano **P**: Proliferativo **S**: secretor **I**: inicial **M**: média **T**: tardia. Adaptada de Lessey (107) e Tabibzadeh (173).

As células epiteliais têm as integrinas com receptores para colágeno e laminina, as quais reconhecem os componentes da membrana basal e ligam-se a eles, enquanto a matriz extracelular tem os receptores para fibronectina e vitronectina (171). A integrina $\alpha 5\beta 1$ é expressa no estroma do endométrio (102). Esse achado era esperado, pois o compartimento do estroma é o principal sítio de produção de fibronectina (14). A expressão da subunidade $\alpha 2$, no endométrio de mulheres, é mais intensa no epitélio glandular do que no luminal (102). As duas integrinas com a subunidade $\beta 1$ ($\alpha 2\beta 1$ e $\alpha 3\beta 1$) exibem uma distribuição pericelular e basal, sugerindo uma interação célula-célula e célula-substrato, enquanto a integrina $\alpha 6\beta 1$ apresenta uma distribuição estritamente basal (172). A integrina $\alpha 6\beta 4$ é específica das células epiteliais (107).

Além das integrinas de expressão contínua, existem, no mínimo, três integrinas que são ciclo-dependentes: a $\alpha 1\beta 1$ é dependente da progesterona, sendo que a sua expressão é ausente nas células glandulares e estromais na fase proliferativa, mas intensa no epitélio glandular, durante a fase secretora do endométrio (107). A $\alpha 4\beta 1$, um receptor de

fibronectina, e a $\alpha v\beta 3$, um receptor de vitronectina, estão presentes no epitélio glandular do endométrio, na fase secretora até a menstruação. De fato, a subunidade αv está presente durante todo o ciclo menstrual, ao passo que a subunidade $\beta 3$ aparece abruptamente no epitélio glandular no 20º dia do ciclo (100; 107). Um achado importante sobre o aparecimento da $\beta 3$ é que ela ocorre quando os receptores de progesterona, no epitélio glandular endometrial, desaparecem por volta do dia 19-20 do ciclo menstrual (108). O padrão das integrinas ciclo-dependentes é demonstrado na Figura 1.9, na qual está representado a relação temporal entre essas três integrinas.

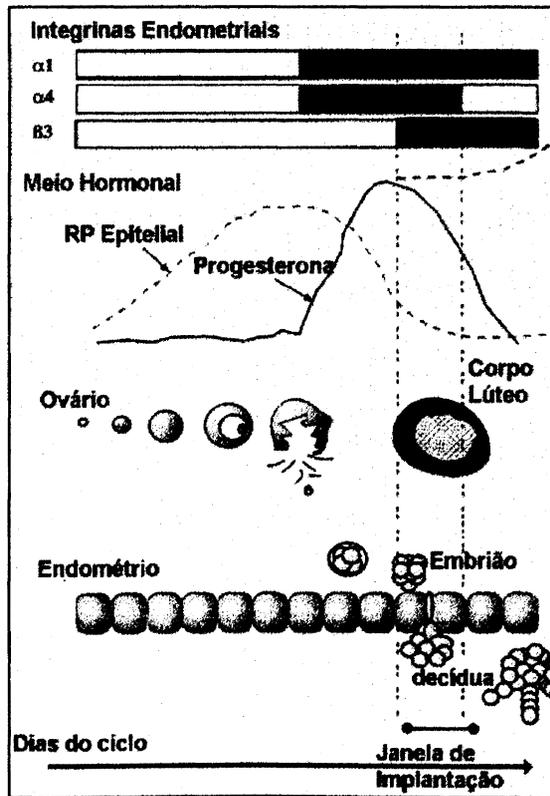


Figura 1.9 Expressão das integrinas e a janela de implantação. Adaptada de Lessey (99).

O padrão temporal da expressão das subunidades das integrinas $\alpha 1$, $\alpha 4$ e $\beta 3$ (demonstradas nas barras escuras) muda por toda a fase secretora. A expressão simultânea das subunidades $\alpha 4$ e $\beta 3$ coincide com a máxima receptividade uterina e a chegada do blastocisto na cavidade uterina. A mudança nos níveis de progesterona e a perda dos receptores epiteliais de progesterona (RP) correlacionam-se com o surgimento da $\beta 3$ e o

desaparecimento de $\alpha 4$. A perda de qualquer um desses componentes pode levar a um defeito da receptividade uterina e à infertilidade (99).

A localização da $\alpha v \beta 3$ pode estar relacionada à adesão entre o endométrio e as células epiteliais do ovo na época da implantação (171). O momento inicial da nidação do ovo, conforme estudos morfológicos, coincide com o surgimento luminal e glandular da integrina $\alpha v \beta 3$ (107). Três subunidades de integrinas são expressas de uma maneira dependente no ciclo menstrual: $\alpha 1$, $\alpha 4$, e $\beta 3$ (102). A co-expressão de $\alpha 4$ e $\beta 3$ determina a janela de implantação, a qual ocorre entre os dias 20 e 24 do ciclo menstrual (100).

A abertura da janela de implantação coincide com o surgimento abrupto da subunidade $\beta 3$ (pareada com αv) no 20º dia do ciclo menstrual, enquanto o seu fechamento coincide com o desaparecimento da subunidade $\alpha 4$ (100). Portanto, a coexpressão das subunidades $\alpha 4$ e $\beta 3$ serve, talvez, como o melhor marcador molecular para definir a janela de implantação (102). Dessas três integrinas, somente a $\alpha v \beta 3$ é observada no endométrio de gestantes (102). A partir de tais evidências, e considerando as integrinas como marcadores normais da função endometrial, pode-se inferir que a expressão anormal dessas moléculas de adesão estaria relacionada com defeitos de recepção endometrial (100).

1.4.8 As Integrinas nos Defeitos da Receptividade Uterina

Em 1950, o clássico trabalho de Noyes e colaboradores (122) iniciou uma era na qual o padrão-ouro para a datação endometrial baseava-se em critérios morfológicos. Em 1994, esse padrão começou a ser mudado para marcadores moleculares. O marcador ideal deveria ser específico do endométrio, ter suas funções conhecidas, não ser afetado pelos sinais do ovo e possuir uma sonda específica disponível para detectá-lo. Sua presença ou

ausência deveria estar relacionada com uma diminuição da fertilidade. Esse marcador é a $\alpha v\beta 3$, receptor de vitronectina, uma integrina com a função de adesão célula-célula e célula-substrato (100).

Tal marcador foi demonstrado pela primeira vez em 1992, quando mulheres inférteis com biópsia endometrial em dissincronia com a histologia demonstravam ausência da expressão da $\alpha v\beta 3$ (106). A expressão da integrina $\alpha v\beta 3$ é comparável com a expressão da subunidade da integrina $\beta 3$, o que permite utilizar mais de um tipo de anticorpo para verificar uma mesma situação (107). A expressão aberrante da integrina endometrial tem sido encontrada em associação com endometriose (105), hidrossalpinge (117), deficiência de fase lútea (106), no carcinoma endometrial (101) e na infertilidade sem causa aparente (103). Todavia, em uma recente publicação, Hii e Rogers não demonstraram a diminuição da integrina $\alpha v\beta 3$ na presença de endometriose (77).

A partir desses estudos com as integrinas, Lessey conceituou dois tipos de defeitos da recepção endometrial de acordo com a presença ou ausência da expressão da $\alpha v\beta 3$, associado com os critérios histológicos (100).

O **defeito tipo I** está associado com deficiência de fase lútea e pode ser usualmente corrigido com a suplementação de progesterona na segunda fase do ciclo menstrual. A integrina $\alpha v\beta 3$ está significativamente reduzida tanto no epitélio glandular como no epitélio luminal do endométrio de mulheres com deficiência de corpo lúteo e endometriose (105). Existe um retorno da normalidade na expressão da integrina $\alpha v\beta 3$ após a correção medicamentosa para a deficiência de corpo lúteo (100). A deficiência de fase lútea está associada com a falha de uma regulação negativa (*down-regulation*) dos receptores de progesterona. A presença continuada de tais receptores, por sua vez, inibe a expressão dos marcadores de receptividade endometrial (109).

O defeito tipo II está relacionado com endometriose de grau mínimo ou moderado e representa um exemplo de disfunção endometrial, uma vez que a histologia mostra um endométrio “em fase” (100). O acompanhamento de 40 mulheres com endometriose e defeito tipo II (expressão diminuída da $\alpha v\beta 3$ no endométrio “em fase”) por mais de 4 anos demonstrou que nenhuma mulher engravidou durante esse período, sugerindo um efeito adverso na fertilidade. Isso leva a crer na hipótese de que essa integrina tem um papel importante na cascata de eventos moleculares que leva à implantação embrionária bem-sucedida (107). Além do mais, a ausência de gestação nesse grupo de mulheres, que não engravidou com o manejo expectante, sugere a existência de um grave defeito em pacientes com endometriose mínima a moderada (107). A ausência da $\alpha v\beta 3$ em nulíparas inférteis pode ser utilizada como um achado preditivo de endometriose; contudo, isso não serve para múltiparas (105). O aumento específico da $\alpha v\beta 3$, durante a janela de implantação, está associado com a fertilidade normal (107).

2. JUSTIFICATIVA

A conclusão do relatório técnico da OMS sobre o DIU demonstra que ainda não foi esclarecido o seu exato mecanismo de ação (143). Os atuais conhecimentos sobre a integrina $\alpha v\beta 3$, possível marcador da implantação uterina, poderiam esclarecer se o DIU apresenta algum mecanismo de ação sobre a implantação. Nesse contexto, não é do nosso conhecimento a publicação de algum resultado (Medline ® 1966 – Fevereiro/1999) sobre a expressão da integrina $\alpha v\beta 3$ na presença do DIU de cobre.

A investigação da influência do DIU sobre esses marcadores endometriais poderá esclarecer algumas questões sobre o mecanismo de ação do dispositivo de cobre e adicionar novos conhecimentos para o seu aperfeiçoamento. Além disso, demonstrará se o DIU altera a receptividade uterina, o que acrescentaria mais uma evidência sobre a atividade pós-fertilização. Se for demonstrado que existe uma alteração da expressão da

integrina $\alpha\beta3$ na presença do DIU, mais especificamente com o DIU T200 de cobre, tal informação poderá auxiliar na compreensão do mecanismo de ação do DIU.

3. OBJETIVO

O objetivo desta tese é verificar os níveis de expressão da integrina $\alpha\beta3$ no endométrio humano, durante a fase secretora média (dias 20~24 do ciclo menstrual), na presença do DIU T200.

II MATERIAL E MÉTODOS

1. AMOSTRA ESTUDADA

As pacientes portadoras do DIU T200 de cobre há mais de 1 ano, registradas na Secretaria Estadual da Saúde do Rio Grande do Sul, no posto de saúde São José do Murialdo, em Porto Alegre, participaram como grupo de casos. O grupo controle, gentilmente cedido pelo Prof. B. Lessey, consistiu em mulheres férteis atendidas no ambulatório de ginecologia do Hospital Universitário da Carolina do Norte, EUA, que foram submetidas a esterilização cirúrgica ou a histerectomia por condições benignas.

2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Com idade ≥ 18 e ≤ 40 anos.
- Com ciclos menstruais normais, definidos como ≥ 21 e ≤ 35 dias.
- Sem uso de hormônios nos últimos 3 meses.
- Com parceiro fixo.
- Com uma ou mais gestações.
- Sem queixas ou clínica de vulvovaginites.
- Com exames negativos para gonococo e clamídia (do canal cervical).
- Sem história prévia de doença inflamatória pélvica.
- Com citopatológico recente, isso é, há menos de 3 meses, sem alterações para malignidade.
- Todas as pacientes deveriam ter suas amostras histológicas em fase com o ciclo menstrual, com no máximo 2 dias de diferença.

3. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Pacientes nulíparas.
- Com irregularidade menstrual.
- Com idade < 18 ou > 40 anos.

- Com assincronia entre o padrão histológico e o ciclo menstrual, isso é, com 3 ou mais dias de diferença em comparação com o ciclo menstrual.
- Com mais de um parceiro sexual nos últimos 6 meses.
- Com história prévia de doença inflamatória pélvica, ou endometriose.
- Usando outro DIU além do T200.
- Usando o DIU T200 por período inferior há 1 ano.

4. MÉTODO

As 152 pacientes usuárias de DIU T200 (*Population Council*, EUA) registradas no Centro de Saúde São José do Murialdo foram convidadas por meio de carta a participarem do presente trabalho. Na primeira consulta, eram explicados os detalhes da pesquisa e, se a paciente aceitasse participar, era assinado o termo de consentimento informado. A seguir, era coletado o citopatológico e o exame de secreção vaginal. O teste para clamídia (*Chlamy-Check 1*, RCS - Comércio de Produtos Farmacêuticos, Hospitalares e Diagnósticos Ltda, São Paulo, SP, Brasil) era coletado a partir do canal cervical e realizado conforme as orientações do fabricante. O exame para gonococo (por microbiologia) também era coletado do canal cervical. Se necessário, o tratamento apropriado para as vulvovaginites era instituído.

4.1 DETERMINAÇÃO DA OVULAÇÃO

A ovulação foi determinada pelo surgimento da onda do hormônio luteinizante (LH) por meio de *kits* de LH na urina (LH kit, Expomed Inc. San Antonio, CA, EUA), de acordo com as orientações do fabricante. Amostras da primeira urina da manhã foram analisadas diariamente a partir do 8º dia após a menstruação até a positividade da onda de LH. A correta utilização dos *kits* e os resultados foram verificados pessoalmente pelo autor, no domicílio da paciente.

4.2 BIÓPSIA DE ENDOMÉTRIO

A biópsia de endométrio foi agendada entre o 6º e o 10º dia após a positivação do LH na urina. Antes de realizar a biópsia, um teste de gravidez na urina (Chromatest, Syntron Beioresearch, Vista, CA, EUA) foi realizado para descartar gravidez. A biópsia de endométrio ocorreu sob condições assépticas, utilizando-se uma cureta de plástico flexível (Z-Sampler, BEI Medical Instruments, San Francisco, CA, EUA), sendo que o material foi obtido do fundo uterino. Quando necessário, realizou-se um bloqueio paracervical para dor. O colo só foi pinçado no caso de dificuldade para introduzir a cureta. Uma seringa descartável de 20 ml foi conectada à cureta e movimentos de vaivém foram feitos conjuntamente com a sucção do êmbolo da seringa. Após a biópsia, fez-se uma ecografia pélvica transabdominal (Aloka, SSD-500 Micrus, Tóquio, Japão) para verificar se houve deslocamento do DIU, de acordo com os critérios de Petta e colaboradores (132). Quando houve deslocamento, o mesmo foi substituído por um novo.

As amostras obtidas foram colocadas em uma superfície plástica estéril e separadas em duas partes. Uma porção foi colocada em formol a 10% para análise histológica e a outra em nitrogênio líquido, até a análise imunoistoquímica.

4.3 LABORATÓRIO

4.3.1 Anatomia Patológica

O tecido endometrial foi processado em parafina e corado com hematoxilina eosina, conforme técnicas habituais (81), e datado de acordo com os critérios de Noyes e colaboradores (122) por dois pesquisadores de forma independente e cega.

4.3.2 Imunoistoquímica

As amostras criopreservadas foram cortadas em 10 μ com criostato (Cryostat Microtome CM1900, Leica Instruments Gmb, Alemanha), colocadas sobre lâminas pré-tratadas com organocilano e fixadas em acetona a -20° C (Mallinckrodt, Paris, KY, EUA) por 10 minutos. As lâminas foram lavadas com solução tampão de fosfato (PBS) em pH 7,2~7,4 por 3 minutos. A peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio 0,3% (Sigma Chemical Company, Saint Louis, MO, EUA) em metanol absoluto por 30 minutos. Depois de nova lavagem com PBS, as amostras foram tratadas, por 10 minutos, com solução de Triton X-100 (Sigma) a 0,3% para melhorar a coloração da membrana. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com albumina de soro eqüino (Vector Laboratories, Burlingame, California, EUA) a 2% por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, o anticorpo monoclonal primário (camundongo anti-humano) específico para a subunidade $\beta 3$ da integrina $\alpha v\beta 3$ (106) (gentilmente cedido pelo Prof. Bruce Lessey), na diluição de 20 μ g/ml (em soro eqüino a 1% em PBS), foi incubado por 12 horas a 4° C. Após nova lavagem, o anticorpo secundário biotilado de cavalo contra camundongo (Vector Laboratories), na diluição de 1:2.500 em PBS, foi incubado por mais 30 minutos. A seguir, as lâminas foram lavadas com PBS e coradas com Vectastain Elite ABC kits (Vector), conforme as instruções do fabricante. A diaminobenzidina (DAB; Sigma) a 0,75% em solução Tris 100mM (Sigma) e 0,03% H₂O₂ com pH 7,6 foi usada como cromógeno. As lâminas foram novamente lavadas, contracoradas com hematoxilina e depois montadas para a microscopia óptica. Foram realizadas fotomicrografias utilizando-se filme Kodak Gold Color ASA 100 (Kodak, Rochester, NY, EUA) com microscópio Leitz DMRB (Leica). Utilizaram-se cortes de placenta humana como controles externos positivos e negativos.

4.3.3 Quantificação das Integrinas sob a Microscopia

As lâminas foram avaliadas por dois investigadores independentes (RFS e BAL) de forma cega. A intensidade da expressão da integrina foi observada em toda a lâmina e

calculada usando-se o HSCORE (26). Já foi demonstrado que esse método apresenta uma baixa variação interobservador ($r=0,994$) e intra-observador ($r=0,983$) (26):

$$\text{HSCORE} = \sum P_i (i + 1),$$

Onde,

P_i = porcentagem das células coradas para cada intensidade, variando de 0~100%.
 i = intensidade da coloração com um valor de 1, 2 e 3 (fraco, médio, forte).

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA E TAMANHO DA AMOSTRA

Como são utilizados dois grupos de pacientes para comparação e os dados são paramétricos, a análise estatística apropriada é o teste- t (90). Baseado nesse tipo de estudo e escolhendo o erro tipo α de 5% e o erro β de 20%, a fórmula a ser utilizada, conforme a literatura (89), deve ser:

$$\frac{(z_{\alpha} + z_{\beta})^2 \cdot 2 \cdot (s)^2}{(\bar{d})^2}$$

Onde,

N : tamanho da amostra

z_{α} : valor do erro α , (erro tipo I, a probabilidade máxima de um erro falso-positivo que se aceita) $p= 0,05$; portanto, 95% de confiança (teste de dupla cauda); o valor de $z_{\alpha} = 1,96$.

z_{β} : valor do erro β (erro tipo II, a probabilidade máxima de um erro falso-negativo que se aceita) de 20%; portanto, 80% de poder desejado; o valor de $z_{\beta} = 0,84$.

s^2 : variância de um conjunto de dados observados é a soma dos desvios dos quadrados da média, dividido pelo número de observações menos 1. Também pode ser visto como o desvio-padrão ao quadrado. O valor de 0,79 foi obtido de outros trabalhos que usaram controles (103).

d : diferença a ser detectada. A diferença mínima a ser detectada entre as amostras é de 0,9 entre um escore e outro. A escala utilizada varia de 0~4, tendo como ponto limítrofe de positividade $>0,77$ (105).

Substituindo os valores na fórmula, obteremos:

$$N = \frac{(1,96 + 0,84)^2 \cdot 2 \cdot (0,79)^2}{(0,9)^2}$$

$$N = 12,07$$

Portanto, deve haver no mínimo 13 pacientes por grupo, chegando a um total de 26 pacientes.

O teste exato de Fisher foi utilizado para comparar dados dicotômicos (expressão da integrina positiva/negativa x DIU presente/ausente), conforme recomendado na literatura (89).

A análise estatística dos dados foi realizada com o programa Excel 7.0 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, EUA) e EPI INFO 5.01b (*Center for Disease Control*, Atlanta, Georgia, EUA)

6. ASPECTOS ÉTICOS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, resolução número 98032.

III RESULTADOS

Foram convidadas 152 pacientes cadastradas como usuárias do DIUT200 na Secretaria Estadual da Saúde do posto Modelo São José do Murialdo, em Porto Alegre, para participar do trabalho (casos). Vinte e quatro compareceram para a primeira entrevista e aceitaram participar. Dessas 24 pacientes, 7 (29,16%) desistiram ou mudaram de endereço durante a pesquisa, não sendo possível dar prosseguimento. Três (12,5%) foram excluídas por não preencherem os critérios de inclusão. Foram realizadas 14 biópsias de endométrio. Não houve complicações pela biópsia, e a dor experimentada foi ausente em 10 (71,4%) e tolerável em 4 (28,6%). Uma biópsia estava fora de fase e foi excluída. Treze pacientes atendidas no departamento de Ginecologia da Universidade da Carolina do Norte, comprovadamente férteis, sem uso de anticoncepcionais, que foram submetidas a histerectomia por condições benignas ou à laqueadura tubária, foram utilizadas como controles. A Tabela 3.1 demonstra os dados sobre a caracterização da amostra.

Tabela 3.1 Caracterização da amostra

	Controles (n=13)	Casos (n=13)	Valor de <i>P</i>
	$\bar{X} \pm DP$	$\bar{X} \pm DP$	
Idade (Anos)	27,9 ± 5,18	30,1 ± 3,18	0,2 NS
Gestações	2,5 ± 0,77	3,2 ± 1,64	0,18 NS
Dia da Biópsia	23,3 ± 0,58	22,6 ± 1,58	0,13 NS

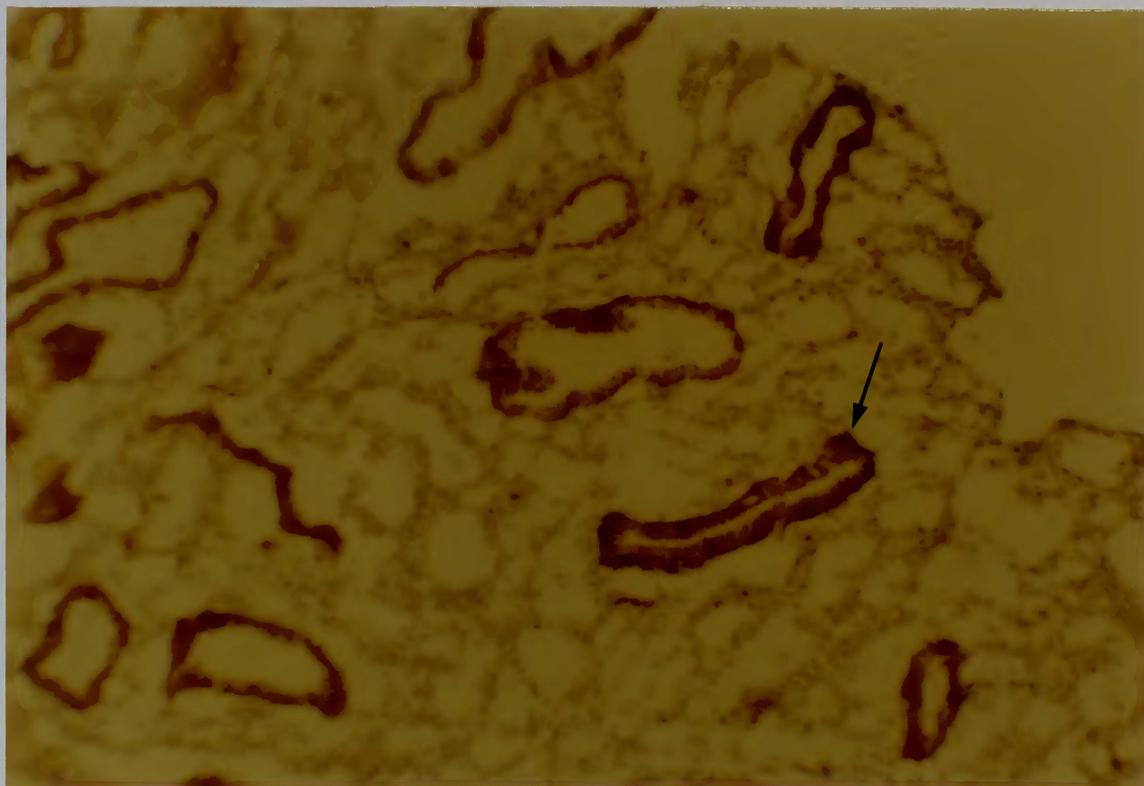
\bar{X} : média da amostra

DP: Desvio-Padrão

NS: Não-Significativo

A presença da integrina $\alpha v \beta 3$, no endométrio dos controles e dos casos, está demonstrada na Figura 3.1.

A



B

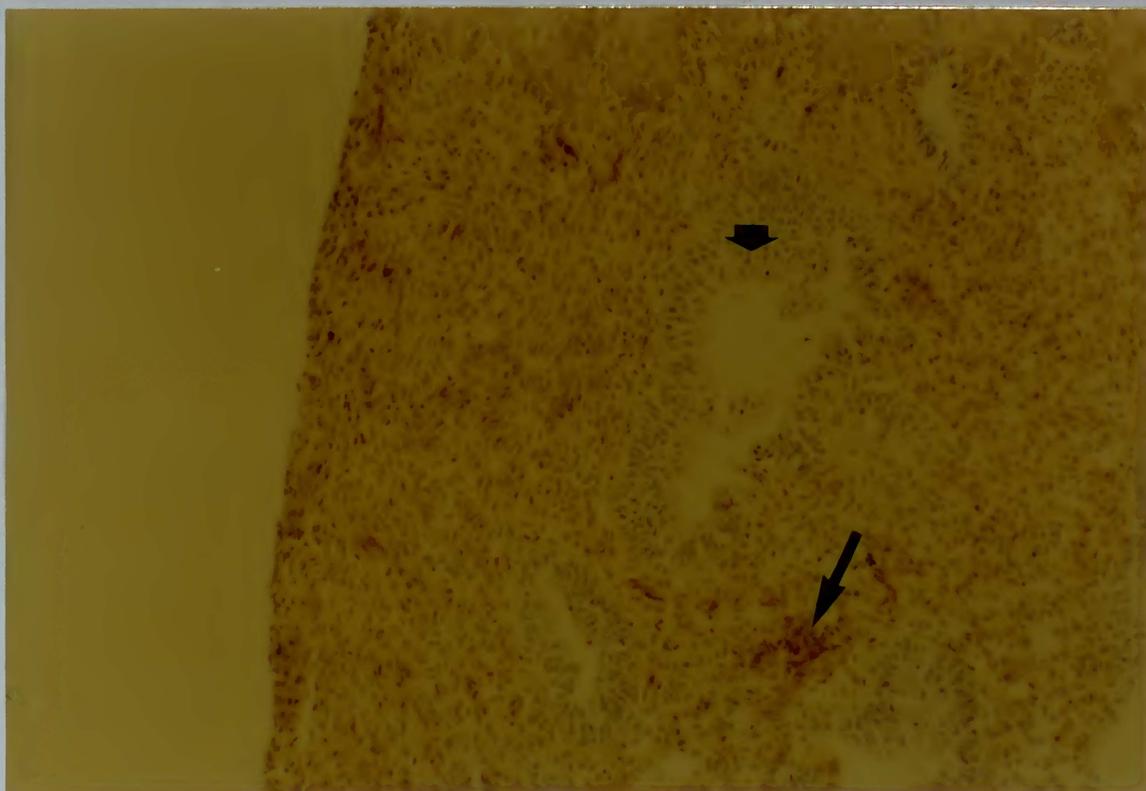
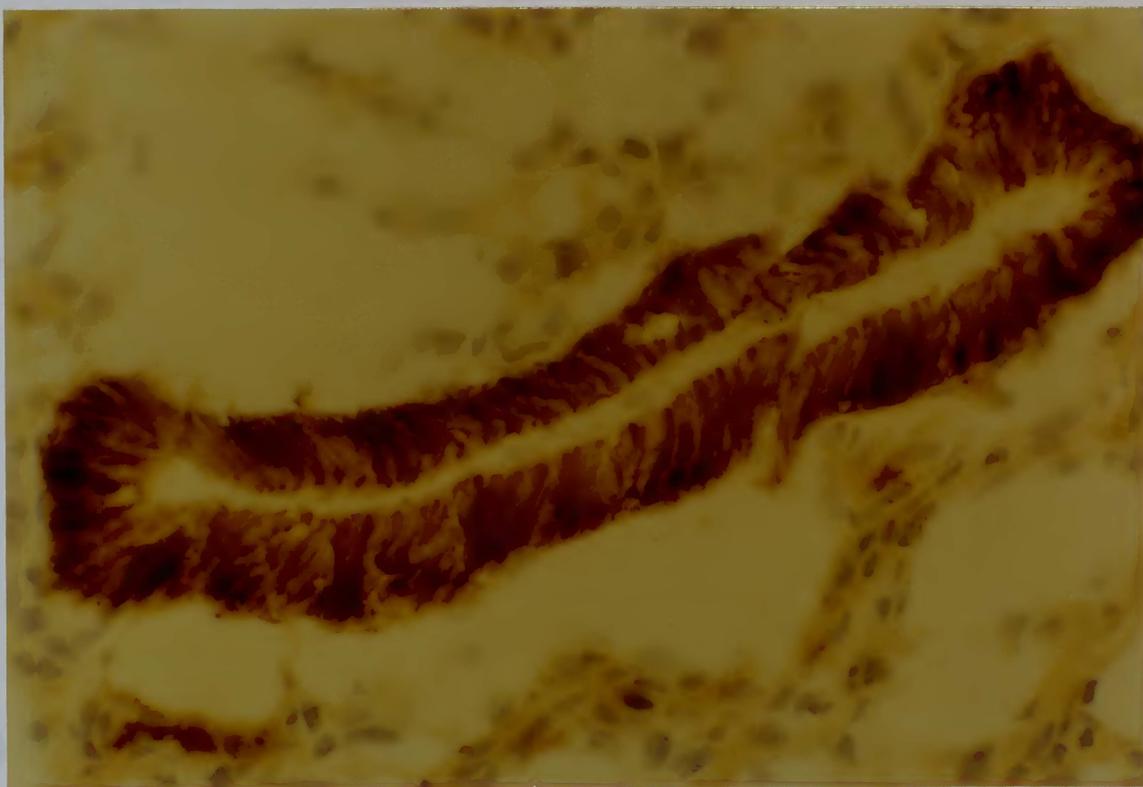


Figura 3.1 Localização por imunohistoquímica da expressão da integrina $\alpha\beta 3$ (seta fina) no endométrio dos controles (A) e nas usuárias de DIU T200 (B). Notar a ausência da expressão da integrina nas glândulas das usuárias de DIU (seta curta) e a presença positiva do vaso endometrial (controle interno positivo, seta longa) (magnificação 100x).

C



D

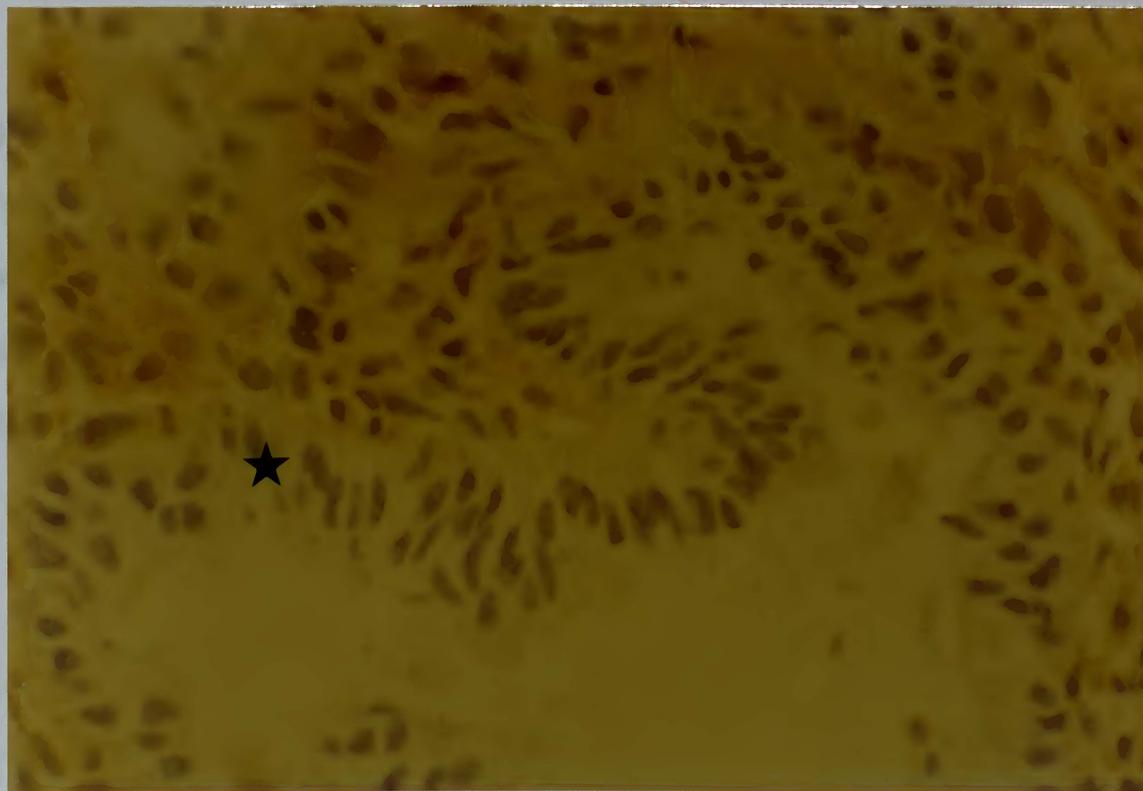


Figura 3.1 (continuação) Detalhe em maior aumento da localização por imunohistoquímica da expressão da integrina $\alpha_5\beta_3$ na glândula endometrial dos controles (C) e ausência da expressão na glândula endometrial (★) nas usuárias de DIU T200 (D) (magnificação 400x).

A expressão da integrina $\alpha v\beta 3$ pelo HSCORE nos controles foi de $2,13 \pm 0,7$ ($\bar{X} \pm DP$), enquanto nas usuárias do DIU foi de $0,96 \pm 0,7$ ($\bar{X} \pm DP$). A comparação das médias da expressão da integrina $\alpha v\beta 3$ encontradas nos dois grupos foi significativamente diferente ($p = 0,001$) e está representada no Gráfico 3.1.

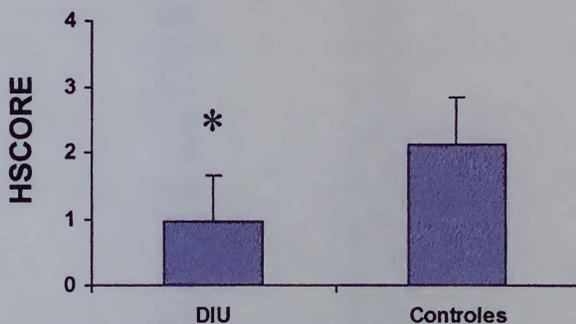


Gráfico 3.1 Níveis de integrina $\alpha v\beta 3$ no endométrio humano na presença do DIU T200
* $p = 0,001$.

O HSCORE de 0,77 foi utilizado como ponto de corte entre a expressão positiva e negativa da integrina $\alpha v\beta 3$, a partir de trabalhos anteriores (105). Todos os controles apresentaram a integrina $\alpha v\beta 3$ (100%); nas usuárias de DIU, 8 (61,5%) apresentaram a expressão da integrina $\alpha v\beta 3$, conforme demonstrado na Tabela 3.2. Para verificar se havia uma diferença quanto à positividade/negatividade da expressão da integrina entre os grupos, utilizou-se o teste exato de Fisher, o qual demonstrou uma diferença significativa ($p = 0,03$ para teste de dupla cauda).

Tabela 3.2 Valores individuais do HSCORE das usuárias de DIUT200 e controles*

Paciente	HSCORE	
	Controles	DIU T200
1	3,7	2,13
2	3,5	2,03
3	2,7	1,93
4	2,6	1,83
5	2,4	1,53
6	2,3	1,33
7	2	0,83
8	2	0,83
9	1,5	0,03
10	1,5	0,03
11	1,2	0,03
12	1,2	0,03
13	1,2	0,03
Positivo/total *	13/13	8/13

* $p = 0,03$ Teste exato de Fisher.

IV DISCUSSÃO

Apesar de o DIU de cobre ser utilizado por milhões de mulheres ao redor do mundo, o seu exato mecanismo de ação ainda não foi completamente esclarecido. Sabe-se, todavia, que os mesmos possuem algumas ações sistêmicas. Por exemplo, os níveis de progesterona e estradiol estão estatisticamente mais elevados nas usuárias de DIU de cobre do que nos controles (47), porém essa diferença não apresenta expressão clínica, a não ser por um encurtamento da fase lútea (47; 49). Foi demonstrado, entretanto, que os DIUs medicados (Nova T, Multiload) aumentam a incidência de anemia clínica em 10% das usuárias (94). Andrade e colaboradores, ao investigarem a presença de perda de sangue menstrual em usuárias de DIU de cobre (T200), verificaram que, nos primeiros meses após a inserção, havia um aumento da perda sangüínea, mas, após um ano, voltava aos níveis normais (11). O uso de quantidades maiores de cobre, todavia, prolongava a perda sangüínea aumentada (11). Por isso, os autores recomendam que as pacientes com baixos estoques de ferro devam utilizar DIUs com menor quantidade de cobre (DIU T200, 7 de cobre), ao invés dos DIUs T-220C, Multiload 250, 375 ou T-380 (12). Os DIUs de cobre também estão relacionados com alterações nos níveis séricos de metais essenciais (48). Porém, essa última observação não foi confirmada por outros autores (16). No que tange ao sistema imune, existe, inicialmente, uma elevação dos níveis de imunoglobulina G e M (80). Contudo, após uma média de 7,3 anos, essas imunoglobulinas retornam ao normal (148), demonstrando que, no nível sistêmico, o DIU não exerce ações significativas sobre o sistema imune (183). No que diz respeito aos níveis séricos de LDL, HDL, prolactina e à resistência do fluxo arterial da artéria uterina, os mesmos permanecem inalterados nas usuárias de DIU de cobre, quando comparados com controles (3; 88; 93).

Por outro lado, são muitos os achados que demonstram uma ação local do DIU. Está descrito que a introdução inadvertida do DIU em um útero bicornado permitiu que uma gestação fosse levada a termo no outro como (34). Há evidências de que o DIU de cobre gera uma reação inflamatória local pela presença de um corpo estranho (45; 91; 156),

diminui a motilidade dos espermatozoides e a presença do cobre inibe a interação entre o ócito e o espermatozoide (141). Essas alterações talvez possam explicar a razão elevada entre o RNA/DNA e a proteína/DNA do endométrio de usuárias de DIU de cobre, na fase secretora do ciclo menstrual (179). Wollen e colaboradores verificaram, em cortes criopreservados, níveis aumentados de cobre nas trompas de Falópio (186). Woolley e colaboradores, por sua vez, demonstraram o aumento significativo dos níveis séricos de interleucina-6, uma citocina produzida pelo trofoblasto que estimula a secreção de hCG (188), nas usuárias de DIUs de cobre (187). Tal observação, porém, ainda não foi clinicamente reconhecida, uma vez que não houve diferença entre usuárias de DIU e controles com respeito ao sangramento intermenstrual (187).

No nível molecular, mais especificamente sobre a integrina $\alpha v \beta 3$, não existem relatos sobre a sua expressão na presença do DIU de cobre. Apesar de não ser conhecida a função da integrina $\alpha v \beta 3$, já foi demonstrado que existe uma associação da sua expressão com a implantação do embrião (106). Já que existe a consideração de que o DIU possa apresentar um mecanismo de ação sobre a implantação (169), é importante avaliar a relação do DIU com a integrina $\alpha v \beta 3$. O surgimento abrupto da subunidade $\beta 3$, associada com a αv , em torno do 20º dia do ciclo menstrual, está relacionado com a abertura da janela de implantação. O fechamento dessa janela é demarcado com o desaparecimento da subunidade $\alpha 4$ por volta do 24º dia do ciclo (96).

A associação da integrina $\alpha v \beta 3$ com a janela de implantação tem levado alguns autores a considerar como um potencial marcador endometrial (85; 100; 166). As questões levantadas sobre a improvável ação do DIU sobre a nidificação (162) e a falta de informações sobre o DIU na integrina $\alpha v \beta 3$ nos levaram a realizar essa tese. O presente trabalho é o primeiro, de que se tem conhecimento, a demonstrar a relação do DIU de cobre com a expressão da subunidade $\beta 3$ durante a fase secretora média (20º ~24º dia do ciclo menstrual), em mulheres comprovadamente férteis.

Os nossos resultados demonstram que o DIU de cobre possui um efeito inibitório sobre a intensidade da expressão da $\alpha\upsilon\beta3$. Tais dados foram obtidos através de um rigoroso controle das pacientes no que diz respeito a ovulação, coleta, tamanho da amostra e análise do material.

A correta utilização dos *kits* de LH foi uma etapa decisiva na realização do presente trabalho, visto que as biópsias necessitavam estar dentro de um curto espaço de tempo, entre o 20º e o 24º dia do ciclo menstrual. Para tanto, a verificação diária da correta utilização do *kit* até a positivação da onda de LH, junto com a paciente, foi fundamental. Esse intervalo de tempo possui implicações importantes. Creus e colaboradores, ao investigarem a expressão da $\alpha\upsilon\beta3$ em pacientes com endometriose (36), realizaram a biópsia endometrial entre o 24º e o 26º dia do ciclo menstrual, diferente do período analisado por Lessey e colaboradores no seu trabalho original, isto é, o 20º e o 24º dia do ciclo menstrual (102). A biópsia endometrial a partir do 24º dia do ciclo menstrual alcança o final da janela de implantação descrita por Lessey e colaboradores (105). Deve-se levar em conta que a abertura da janela é determinada pelo aparecimento súbito da integrina $\alpha\upsilon\beta3$ por volta do 20º dia do ciclo menstrual. A expressão da $\alpha\upsilon\beta3$ estende-se até a menstruação. O fechamento da janela, por outro lado, é determinado pelo desaparecimento da subunidade $\alpha4$ ao redor do 24º dia do ciclo menstrual. Portanto, a expressão da integrina $\alpha\upsilon\beta3$ depois do 24º dia do ciclo menstrual demonstra pouco ou quase nada sobre o defeito de implantação (99).

O tamanho da amostra foi calculado com o intuito de obter-se um resultado considerando valores de erro α e β adequados. Tal cuidado não foi observado por Creus e colaboradores (36), porém, o próprio autor reconhece que o pequeno número de pacientes com endometriose (n=9) não tem poder estatístico para levar a alguma conclusão (36).

A análise das amostras através da imunoistoquímica foi motivo de intenso cuidado. Inicialmente, amostras de placenta foram utilizadas para estabelecer a técnica nos nossos laboratórios (149). Depois, as amostras dos DIUs foram preparadas e analisadas de acordo com a técnica estabelecida por nós utilizando o anticorpo policlonal para a subunidade $\beta 3$ (AB1932, Chemicon International, Temecula, CA, EUA) nas pacientes usuárias de DIU (150); como, porém, os controles haviam sido analisados utilizando-se outro anticorpo e uma técnica de imunoistoquímica diferente, decidiu-se refazer pessoalmente, nos laboratórios da Universidade da Carolina do Norte, todas as amostras de acordo com a técnica para o anticorpo SSA6.

As amostras aqui utilizadas foram de espécimes criopreservados. Esse fato é relevante, pois a utilização de amostras incluídas em parafina pode gerar artefatos e confundir a análise da expressão das integrinas. Por exemplo, ao utilizar amostras incluídas em parafina, Hii e colaboradores demonstraram a presença da integrina $\alpha\beta 3$ em 29 pacientes com endometriose (77). Todavia, Lessey e colaboradores, utilizando amostras criopreservadas, verificaram a ausência da integrina $\alpha\beta 3$ no endométrio de 241 mulheres com endometriose (105). Essa diferença entre os resultados pode ser devida às técnicas utilizadas e ao número de pacientes analisadas em cada amostra. O anticorpo primário utilizado por Hii e colaboradores foi o LM609 (Chemicon International). É interessante verificar que o próprio fabricante desse anticorpo adverte que o LM609 não é adequado para tecidos fixados em formalina, pois gera artefatos (29). Além disso, ainda existem as diferenças quanto à utilização de anticorpos primários diferentes. O anticorpo monoclonal produzido comercialmente, o LM609, foi utilizado por Hii e colaboradores (77), enquanto o anticorpo monoclonal produzido em laboratório com fins de pesquisa, o SSA6, foi utilizado por Lessey e colaboradores (105). Portanto, devido a essas diferenças, o trabalho de Hii e colaboradores é passível de críticas (104).

Um ponto crucial na análise dos dados foi a quantificação do HSCORE. Houve um período de aprendizagem do método junto com os pesquisadores da Universidade da Carolina do Norte para assegurar a sua correta utilização. Uma vez estabelecida essa etapa, as lâminas foram analisadas quanto à expressão da $\alpha v\beta 3$, de forma cega e independente, por dois pesquisadores.

Em vista de tais fatos, verificamos que a intensidade da expressão da integrina $\alpha v\beta 3$ está diminuída na presença do DIU T200, em comparação com os controles, durante a janela de implantação. Essa diferença entre as médias traduz-se através de uma negatividade significativamente maior da expressão da $\alpha v\beta 3$ em comparação com os controles, quando se aplica o teste exato de Fisher. A expressão diminuída da $\alpha v\beta 3$, na presença de um endométrio “em fase”, consiste em um defeito tipo II (100). Os mecanismos envolvidos nesse defeito são aqueles relacionados com endometriose e hidrossalpinge (105; 117). Portanto, devemos acrescentar o DIU T200 de cobre como mais uma associação nesse tipo de defeito.

As possíveis explicações para a negatificação da expressão da integrina $\alpha v\beta 3$ em 38,5% podem estar relacionadas a fatores mecânicos, parácrinos ou à associação desses. A separação das duas camadas endometriais pela presença do dispositivo, poderia inibir algum co-fator que estivesse relacionado com a expressão da integrina. Contudo, isso parece improvável, uma vez que a expressão da $\alpha v\beta 3$ *in vitro* tem sido obtida em células do tipo Ishikawa (28; 167). As células Ishikawa pertencem a uma linhagem de células de carcinoma endometrial que são comercializadas para pesquisa (167). A expressão das integrinas $\alpha v\beta 3$ tem sido demonstrada na monocamada formada por essas células e tal modelo tem sido utilizado para o estudo *in vitro* (167).

Por outro lado, uma mudança na população das células inflamatórias presentes no endométrio poderia estar relacionada com essa inibição da $\alpha v\beta 3$, já que o DIU aumenta a

população de linfócitos endometriais (91). Talvez, o DIU determine um aumento do fator básico do crescimento do fibroblasto (bFGF), o qual diminui a expressão de $\alpha v\beta 3$ (95). Seria interessante especular uma diminuição da integrina $\alpha v\beta 3$ via interleucina-1 (IL-1). Essa citocina inflamatória está relacionada com o aumento da $\alpha v\beta 3$ (67; 159; 160). Todavia, Ammala e colaboradores demonstraram que os níveis do RNA mensageiro do TNF- α e da IL-1 β estão aumentados no endométrio das usuárias de DIU de cobre (9). Isso pode significar que deva haver fatores independentes que sejam responsáveis pela inibição e pelo aumento de $\alpha v\beta 3$.

Uma hipótese interessante é a competição entre os cátions divalentes e os sais de cobre sobre a porção externa da subunidade α da integrina $\alpha v\beta 3$. Já foi demonstrado que o EDTA (um quelante do cálcio) impede a ligação da célula na matriz extracelular *in vitro* (67) e que a liberação de sais de cobre ou de cobre livre tem um impacto bioquímico sobre o endométrio (48). Logo, seria razoável considerar que o cobre também possa modular a expressão da integrina.

No que diz respeito aos receptores de progesterona no endométrio, já está bem estabelecido que a sua diminuição precede o surgimento de $\alpha v\beta 3$ e que o retardo em seu desaparecimento está associado a um atraso na abertura da janela de implantação (109). Esse é um dos mecanismos reguladores da expressão da $\alpha v\beta 3$ (109). Uma vez dito isso, é interessante especular uma presença prolongada desses receptores na presença do DIU T200, pois de Castro e colaboradores demonstraram, através de amostras endometriais a partir do 25º dia do ciclo menstrual, a presença de receptores de progesterona (40).

Nossos resultados são coerentes com os de outros pesquisadores que investigam outras moléculas endometriais relacionadas com a implantação. Por exemplo, Seleem e colaboradores (154) demonstraram a diminuição da Glicodelina A/PP14 nas pacientes usuárias de DIU de cobre. Essa glicoproteína é, normalmente, secretada pelas glândulas

endometriais e é expressa durante e após a janela de implantação (155). Especula-se que o seu papel esteja relacionado com a capacidade de modular o sistema imune, permitindo, talvez, que o enxerto fetal não seja rejeitado pelo sistema imune materno (31). Tal resultado, entretanto, não foi observado por Mandelin e colaboradores (115). Esse aparente paradoxo encontrado por Mandelin pode ser devido ao pequeno número de pacientes usuárias de DIU com cobre (4/11). Além disso, dessas quatro amostras, três foram obtidos no 7º e uma no 11º dia do ciclo menstrual. Esse número reduzido pode ter influenciado os resultados.

Apesar das fortes evidências apresentadas no presente estudo demonstrando a diminuição da integrina $\alpha\beta3$ no endométrio de usuárias do DIU T200, há limitações a serem consideradas. Existe a possibilidade de haver a presença de endometriose e hidrossalpinge nas pacientes em que foram realizadas as biópsias. Todavia, as chances devem ser menores devido ao perfil das pacientes, uma vez que todas elas são comprovadamente férteis e pertencem a um grupo de mulheres monogâmicas em um relacionamento estável. Para descartar tais condições, seria necessário realizar uma laparoscopia, o que causaria uma inadequação ética. Tentamos contornar essa dificuldade, durante a realização do projeto-piloto utilizando o DIU TCU380A, através de um estudo do tipo *antes-e-depois* em pacientes que haviam sido cirurgicamente esterilizadas. Esse projeto não foi concluído devido à elevada rejeição por parte das pacientes (96%) e pela maturação irregular do endométrio causada pelo DIU TCU380A (150).

Existe, ainda, uma possibilidade de que a diferença de etnias seja um viés de seleção, ao comparar-se pacientes brasileiras com americanas. Porém, isso parece ser improvável, no grupo aqui estudado, por dois motivos. Primeiro, está descrito na literatura que as integrinas são moléculas que estão presentes em todos os seres humanos (181). Segundo, no projeto-piloto foram obtidas sete biópsias endometriais de mulheres comprovadamente férteis que foram submetidas à laqueadura tubária. Essa pequena amostra foi comparada com os controles americanos, e ambos os grupos apresentaram a expressão da integrina

$\alpha\text{v}\beta\text{3}$. Esses resultados não foram apresentados por não fazerem parte dos objetivos do presente estudo.

As implicações da demonstração da diminuição da expressão da integrina $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ no endométrio das usuárias de DIU de cobre são importantes. A inibição significativa, mas parcial, da $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ na presença do DIU T200 de cobre pode auxiliar-nos na compreensão do aumento da razão das gestações ectópicas e intra-uterinas na presença do dispositivo *in situ* (161; 163) e a reconsiderar alguns postulados sobre o seu mecanismo de ação.

Como já foi demonstrado que o DIU não gera um aumento nas gestações ectópicas (161), fica a hipótese de que a implantação é inibida (169). As pacientes com expressão negativa da $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ enquadrar-se-iam nessa situação. Mais instigante ainda é o trabalho de Ortiz e colaboradores (127), que demonstraram a presença da $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ na trompa de Falópio na mesma época do que a janela de implantação endometrial. Esse relato, associado com a razão aumentada de gestações ectópicas, pode gerar razoáveis suposições. O ovo poderia ser atraído pela presença da $\alpha\text{v}\beta\text{3}$. Como essa integrina não se encontra no endométrio, mas no epitélio tubário, a implantação ocorreria nesse local. A combinação de tais eventos talvez explique as gestações ectópicas nas usuárias de DIU. Para que isso fosse melhor compreendido, seria necessário um experimento para verificar a presença da $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ no epitélio tubário na presença do DIU de cobre. Caso fosse demonstrado, mais uma evidência seria adicionada sobre a atividade local do dispositivo sobre o endométrio.

A negatividade da $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ em 38,5% das pacientes usuárias do DIU T200 demonstra que esse dispositivo também apresenta um sítio de ação sobre as integrinas e, possivelmente, sobre a implantação. Sob a luz de tais evidências, o postulado de Rowe, no relatório técnico da OMS sobre o mecanismo de ação do DIU, “...que a inibição ou a alteração da: a) migração dos espermatozóides no trato genital superior feminino; b) a fecundação, e c) o transporte do óvulo desempenham uma função mais importante no ser

humano, do que a probabilidade de prevenir a implantação” (143) deveria ser revisto no sentido da quantificação do efeito anti-implantação do DIU de cobre.

Autores como Sivin (162), Ortiz (126) e Segal (153) também informam que é improvável que o DIU de cobre tenha uma atuação significativa sobre o processo nidatório. Todavia, a demonstração de uma atividade de quase 40% sobre o $\alpha\beta 3$, considerada cada vez mais como um marcador endometrial da implantação (85; 100; 166), gera, no mínimo, uma reconsideração sobre essas afirmações.

Entretanto, é improvável que a presença ou a ausência da integrina $\alpha\beta 3$ seja, por si só, responsável pela explicação de todo o mecanismo de ação do DIU de cobre, uma vez que 61,5% das pacientes usuárias de DIU apresentaram níveis baixos, mas positivos, dessa integrina. Isso significa dizer que a significativa inibição de um marcador endometrial da implantação em 38,5% das usuárias do DIUT200 não explica a eficácia de quase 100% desse método anticoncepcional.

Logo, ao invés de utilizarmos um pensamento de causa e efeito, devemos apreciar com maior ênfase a possibilidade de que os mecanismos de ação envolvidos sobre o DIU sejam multifatoriais e multicausais, e devam incluir a inibição da implantação como um fator importante.

Cabe ressaltar que esses achados não podem ser extrapolados para outros tipos de DIU, inclusive com quantidades maiores de cobre. O trabalho realizado por de Castro e colaboradores demonstrou haver diferenças na morfologia endometrial que variavam de acordo com a quantidade de cobre empregada no DIU (40). Da mesma forma, a própria associação do cobre nos dispositivos de segunda geração aumenta a eficácia anticoncepcional (143); faz-se necessária, portanto, a realização de estudos *in vitro*, utilizando, por exemplo, células Ishikawa, com soluções de cobre que mimetizem as condições *in vivo*, ou modelos animais para que se possa identificar as substâncias mais

específicas relacionadas à inibição da implantação e para aperfeiçoar os métodos anticoncepcionais.

V CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos nessa amostra de pacientes e nessas condições sugere-se que a expressão da integrina $\alpha\beta3$ está diminuída nas usuárias do DIU T200, durante a fase secretora média (20^o~24^o dia do ciclo menstrual).

VI REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. A randomized multicentre trial of the Multiload 375 and TCU380A IUDs in parous women: three-year results. UNDP/UNFPA/WHO/World Bank, Special Programme of Research, Development and Research Training in Human Reproduction: IUD Research Group. *Contraception*. 1994;49:543-9.
2. Acosta AA. Implantación humana del pre-embrión: aspectos básicos, clínicos e investigación futura. *Revista Lat Amer Est Fert*. 1994;8:4-18.
3. Adejuwon CA, Segal SJ, Faundes A, Alvarez-Sanchez F. Comparative prolactin profiles in IUD users and non-IUD users. *Contraception*. 1982;25:613-8.
4. Ager A, Callard R, Ezine S, Gerard C, López-Botet M. Adhesion Molecules. *Immunol Today*. 1996;17-25.
5. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Cell Junctions, Cell Adhesion, and the Extracellular Matrix. In: Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD, eds. *Molecular Biology of The Cell*. 3 ed. New York: Garland Publishing; 1994:949-1009.
6. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. The Cytoskeleton. In: Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD, eds. *The Cell*. 3 ed. New York: Garland; 1994:786-861.
7. Alvarez F, Brache V, Fernandez E, Guerrero B, Guilloff E, Hess R. New insights on the mode of action of intrauterine contraceptive devices in women. *Fertil Steril*. 1988;49:768-73.

8. Alza Pharmaceuticals. The Progestasert: intrauterine progesterone contraception system: release rates 65 µg/day progesterone for one year: a new contraceptive. Alza Corporation. 1976;Palo Alto:California
9. Ammala M, Nyman T, Strengell L, Rutanen EM. Effect of intrauterine contraceptive devices on cytokine messenger ribonucleic acid expression in the human endometrium. *Fertil Steril*. 1995;63:773-8.
10. Anderson TL, Sieg SM, Hodgen GD. Membrane composition of the endometrial epithelium: Molecular markers of uterine receptivity to implantation. *Hum Reprod*. 1988;513-516.[Abstract]
11. Andrade AT, Pizarro E, Shaw STJ, Souza JP, Belsey EM, Rowe PJ. Consequences of uterine blood loss caused by various intrauterine contraceptive devices in South American women. World Health Organization Special Programme of Research, Development and Research Training in Human Reproduction. *Contraception*. 1988;38:1-8.
12. Andrade AT, Pizarro OE. Quantitative studies on menstrual blood loss in IUD users. *Contraception*. 1987;36:129-44.
13. Andrade DN. Biópsia de Endométrio. In: Ferrari AN, ed. *Esterilidade Conjugal*. 1 ed. Rio de Janeiro: ROCA; 1990:111-4.
14. Aplin JD, Charlton AK, Ayad S. An immunohistochemical study of human endometrial extracellular matrix during the menstrual cycle and first trimester of pregnancy. *Cell Tissue Res*. 1988;253:231-40.

15. Aronica SM, Katzenellenbogen BS. Progesterone receptor regulation in uterine cells: stimulation by estrogen, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, and insulin-like growth factor I and suppression by antiestrogens and protein kinase inhibitors. *Endocrinology*. 1991;128:2045-52.
16. Ayangade SO, Oyelola OO. Copper intrauterine contraceptive devices and serum essential metals. *Adv Contracept*. 1988;4:207-12.
17. Bailey FR, Copenhaver WM, Bunge RP, Bunge MB. O aparelho reprodutor feminino. In: Bailey FR, Copenhaver WM, Bunge RP, Bunge MB, eds. *Histologia*. 16 ed. São Paulo: Edagard Blücher; 1973:496-527.
18. Bassols A, Massague J. Transforming growth factor beta regulates the expression and structure of extracellular matrix chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem*. 1988;263:3039-45.
19. Beier H. Oviductal and uterine fluids. *J Reprod Fert*. 1974;37:221-37.
20. Bergeron C, Ferenczy A, Toft DO, Schneider W, Shyamala G. Immunocytochemical study of progesterone receptors in the human endometrium during the menstrual cycle. *Lab Invest*. 1988;59:862-9.
21. Bergh PA, Navot D. The impact of embryonic development and endometrial maturity on the timing of implantation. *Fertil Steril*. 1992;122:537-42.
22. Birk DE, Silver FH, Trelstad RL. Matrix assembly. In: Hay ED, ed. *Cell Biology of Extracellular Matrix*. 2 ed. New York: Plenum Press; 1991:221-54.

23. Bischof P, Campana A. Effect of leukemia inhibitory factor on human cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway. *Am J Reprod Immunol.* 1995;34:225-30.
24. Bissel MJ, Aggeler J. Dynamic reciprocity: How do extracellular matrix and hormones direct gene expression? In: Smoe J, ed. *Mechanisms of Signal Transduction by Hormones and Growth Factors.* 1 ed. New York: Alan R. Liss; 1987:251-62.
25. Bronson RA, Fusi FM. Integrins and human reproduction. *Mol Hum Reprod.* 1996;2:153-68.
26. Budwit-Nowotny DA, McCarty KS, Cox EB, et al. Immunohistochemical analyses of estrogen receptor in endometrial adenocarcinoma using a monoclonal antibody. *Cancer Res.* 1986;46:5419-25.
27. Buster J, Bustillo M, Rodi I, et al. Biologic and morphologic development of donated human ova recovered by nonsurgical uterine lavage. *Am J Obstet Gynecol.* 1985;153:211-7.
28. Castelbaum AJ, Ying L, Somkuti SG, Sun J , Ilesanmi AO, Lessey BA. Characterization of Integrin Expression in a Well Differentiated Endometrial Adenocarcinoma Cell Line (Ishikawa). *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82:136-42.
29. Cattoretti G, Pileri S, Parravicini C, et al. Antigen unmasking on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. *J Pathol.* 1993;171:83-98.
30. Chan BM, Kassner PD, Schiro JA, Byers HR , Kupper TS, Hemler ME. Distinct cellular functions mediated by different VLA integrin alpha subunit cytoplasmic domains. *Cell.* 1992;68:1051-60.

31. Clark GF, Oehninger S, Patankar MS, et al. A role for glycoconjugates in human development: the human feto-embryonic defense system hypothesis. *Hum Reprod.* 1996;11:467-73.
32. Cocchiara R, Albeggiani G, Di Trapani G, et al. Oestradiol enhances in vitro the histamine release induced by embryonic histamine-releasing factor (EHRF) from uterine mast cells. *Hum Reprod.* 1992;7:1036-41.
33. Coutifaris C, Omigbodun A, Coukos G. Integrins, endometrial maturation, & human embryo implantation. *Seminars in Reproductive Endocrinology.* 1998;16:219-29.
34. Coutinho EM. Dispositivos Intra-uterinos, mecanismo de ação. In: Coutinho EM, ed. *DIU: Dispositivo Intra-Uterino. Uso clínico e em Planejamento Familiar.* 1 ed. Salvador: Universidade Federal da Bahia; 1981:9-18.
35. Cowell TP. Implantation and development of mouse eggs transferred to the uteri of non-progestational mice. *J Reprod Fert.* 1969;19:239-45.
36. Creus M, Balash J, Ordi J, et al. Integrin expression in normal and out-of-phase endometria. *Hum Reprod.* 1998;13:3460-8.
37. Critchley HO, Wang H, Kelly RW, Gebbie AE, Glasier AF. Progesterin receptor isoforms and prostaglandin dehydrogenase in the endometrium of women using a levonorgestrel-releasing intrauterine system. *Hum Reprod.* 1998;13:1210-7.
38. Croxatto HB, Ortiz ME. Oocyte pickup and oviduct transport. In: Capitano GL, Asch RH, De Cecco L, eds. *Gift: from basics to clinics.* New York: Raven Press ; 1988:137-47.

39. Davis HJ, Lesinski H. Uterine variables in IUD design. In: Intrauterine devices: development eapi, ed. [Proceedings of a Workshop on Advances in IUDs, Battelle, Seattle Research Center, Washington, October 18-20, 1973]. New York: Academic Press; 1974:91-7.
40. de Castro A, Gancedo GP, Contreras F, Lapena G. The effect of copper ions in vivo on specific hormonal endometrial receptors. *Adv Contracept.* 1986;2:399-404.
41. Defilippi P, Silengo L, Tarone G. Alpha 6 beta 1 integrin (laminin receptor) is down-regulated by tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta in human endothelial cells. *J Biol Chem.* 1992;267:18303-7.
42. Edelman DA, Berger GS, Keith LG. Development, mechanisms of action and evaluation of IUD performance. In: Edelman DA, Berger GS, Keith LG, eds. *Intrauterine Devices and Their Complications.* 1 ed. Boston: G.K. Hall & Co.; 1979:3-27.
43. Edwards RG. Physiological and molecular aspects of human implantation. *Hum Reprod.* 1996;10:1-13.
44. Edwards RG, Surani MAH. The primate blastocyst and its enviroment. *Uppsala J Med Sci.* 1978;22:39-50.
45. el-Sahwi S, Moyer DL. The leukocytic response to an intrauterine foreign body in the rabbit. *Fertil Steril.* 1971;22:398-408.
46. Enders AC. Current topic: structural responses of the primate endometrium to implantation. *Placenta.* 1991;12:309-25.

47. Fahmy K, el-Gazar A, Eisa I, Ghonaim M, Saad S, Afifi A. Levels of serum steroid hormones in intrauterine contraceptive device users. *Gynecol Endocrinol.* 1991;5:1-5.
48. Fahmy K, Ghoneim M, Eisa I, el-Gazar A, Afifi A. Serum and endometrial copper, zinc, iron and cobalt with inert and copper-containing IUCDs. *Contraception.* 1993;47:483-90.
49. Faundes A, Segal SJ, Adejuwon CA, Brache V, Leon P, Alvarez-Sanchez F. Menstrual cycle in women using an intrauterine device. *Fertil Steril.* 1980;34:427-30.
50. FEBRASGO. Dispositivo Intra-Uterino. In: Federação Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia, ed. *Anticoncepção, Manual de Orientação.* 1 ed. Rio de Janeiro: FEBRASGO; 1997:46-56.
51. Ferenczy A. Studies on the cytodynamics of human endometrial regeneration II. Transmission electron microscopy and histochemistry. *Am J Obstet Gynecol.* 1976;124:582-95.
52. Ferenczy A. Studies on the cytodynamics of human endometrial regeneration. I. Scanning electron microscopy. *Am J Obstet Gynecol.* 1976;124:64-74.
53. Ferenczy A. Anatomy and Histology of the Uterine Corpus. In: Kurman RJ, ed. *Blaunstein's Pathology of the Female Genital Tract.* 4 ed. New York: Springer-Verlag; 1994:327-66.
54. Ferenczy A, Bertrand C, Gelfand MM. Proliferation kinetics of human endometrium during the normal menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol.* 1979;133:859-67.

55. Ferenczy A, Richart RM, Agate Jr FJ, Purkerson ML, Dempsey EW. Scanning electron microscopy of the human endometrial surface epithelium. *Fertil Steril*. 1972;23:515-21.
56. Ferrari AN. Utilization of an IUD in post-pill amenorrhea, a preliminary report. *Contraception*. 1975;11:85-9.
57. Ferrari AN, Filho CI. Investigação de esterilidade. Nossa rotina. *Revista Lat Amer Est Fert*. 1987; 1:70-4.
58. Filardo EJ, Cheresch DA. A β turn in the cytoplasmatic tail of the integrins αv subunit influences conformation and ligand binding of $\alpha v\beta 3$. *J Biol Chem*. 1994;269:4641-7.
59. Finn CA, Martin L. The control of implantation. *J Reprod Fert*. 1974;39:195-206.
60. Formigli L, Formigli G, Roccio C. Donation of fertilized uterine ova to infertile women. *Fertil Steril*. 1987;47:62-5.
61. Frenette PS, Wagner DD. Molecular Medicine Adhesion Molecules - Part 1. *N Engl J Med*. 1996;334:1526-9.
62. Garcia JE. The implantation window. 31st Annual Meeting Postgraduate Course ASRM, Oct., 3-4, San Francisco. 1998;Course V:153-6.
63. Gibson M, Badger GJ, Byrn F, Lee KR, Korson R, Trainer TD. Error in histologic dating of secretory endometrium: variance component analysis. *Fertil Steril*. 1991;56:242-7.
64. Giudice LC, Dsupin BA, Jin IH, Vu TH, Hoffman AR. Differential expression of messenger ribonucleic acids encoding insulin-like growth factors

and their receptors in human uterine endometrium and decidua. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993;76:1115-22.

65. Giudice LC, Ferenczy A. The Endometrial Cycle. In: Adashi EY, Rock JA, Rosenwaks Z, eds. *Reproductive Endocrinology, Surgery and Technology.* 1 ed. Philadelphia : Lippincott-Raven; 1996:271-300.
66. Graefenberg E. An intrauterine contraceptive method. In: Sanger M, Stone HM, eds. *The Practice of Contraception.*[Proceedings of the 7th International Birth Control Conference]. Baltimore: Williams & Wilkins; 1930:33-47.
67. Grosskinsky CM, Yowell CW, Sun J, Parise LV, Lessey BA. Modulation of Integrin Expression in Endometrial Stromal Cells In Vitro. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81:2047-54.
68. Grzesiak JJ, Davis GE, Kirchhofer D, Pierschbacher MD. Regulation of alpha 2 beta 1-mediated fibroblast migration on type I collagen by shifts in the concentrations of extracellular Mg^{2+} and Ca^{2+} . *J Cell Biol.* 1992;117:1109-17.
69. Hafez ESE, Audebert AJM. Development of copper IUDs. In: Hafez ESE, ed. *IUD Technology.* 1 ed. Boston: MTP Press; 1982:37-49.
70. Hall DE, Reichardt LF, Crowley E, et al. The alpha 1/beta 1 and alpha 6/beta 1 integrin heterodimers mediate cell attachment to distinct sites on laminin. *J Cell Biol.* 1990;110:2175-84.
71. Handwerger S. Editorial: A critical Role for Interleukin-1 (IL-1) and the type 1 IL-1 receptor in Blastocyst implantation. *Endocrinology.* 1994;134:519-20.

72. Harper MJK. The implantation window. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol.* 1992;6:351-71.
73. Hautanen A, Gailit J, Mann DM, Ruoslahti E. Effects of modifications of the RGD sequence and its context on recognition by the fibronectin receptor. *J Biol Chem.* 1989;25:1437-42.
74. Heino J. Regulation of cell adhesion receptors by transforming growth factor-beta. Concomitant regulation of integrins that share a common beta 1 subunit. *J Biol Chem.* 1989;264:380-8.
75. Hendrickson MR, Kempson RL. The Normal Endometrium: The Baseline . In: Bennington JL, ed. *Surgical Pathology of Uterine Corpus.* 1 ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 1980:36-98.
76. Hertig AT, Rock J, Adams EC. A description of 34 human ova within the first 17 days of developmet. *Am J Anat.* 1956;98:435-93.
77. Hii LL, Rogers PA. Endometrial vascular and glandular expression of integrin alpha(v)beta3 in women with and without endometriosis. *Hum Reprod.* 1998;13:1030-5.
78. Ho J, Wu Z, Cai S, Han J, Liu M, Singxhwo H. A randomized comparative trial of the MLCu375, TCu220C, steel ring and uterine cavity-shaped IUDs. *Adv Contracept.* 1992;8:161-6.
79. Hollweg C. Ueber Intrauterin pessarien. *Therapeutische Monatshefte.* 1902;16:463-6.
80. Holub WR, Reyner FC, Forman GH. Increased levels of serum immunoglobulins G and M in women using intrauterine contraceptive devices. *Am J Obstet Gynecol.* 1971;110:326-5.

81. Hopwood D. Fixation and fixatives. In: Bancroft JD, Stevens A, eds. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 2 ed. New York: Churchill Livingstone; 1982:20-40.
82. Horwitz A, Duggan K, Buck C, Beckerle MC, Burridge K. Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin--a transmembrane linkage. *Nature*. 1986;320:531-3.
83. Huber SC, Piotrow PT, Orlands FB, et al. Intrauterine Devices. *Popul Rep B*. 1975;21-48.
84. Ignatz RA, Massague J. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem*. 1986;261:4337-45.
85. Ilesanmi AO, Hawkins DA, Lessey BA. Immunohistochemical Markers of Uterine Receptivity in the Human Endometrium. *Microsc Res Tech*. 1993;25:208-22.
86. Ishihama A. Clinical studies on intrauterine rings, especially the present state of contraception in Japan and the experiences in the use of intra-uterine rings. *Yokohama Med Bull*. 1959;10:89-105.
87. Israel R, Mishell Jr. DR, Labudovich M. Mechanisms of normal and dysfunctional uterine bleeding. *Clin Obstet Gynecol*. 1970;13:386-99.
88. Jarvela I, Tekay A, Jouppila P. The effects of a copper-intrauterine device on the uterine artery blood flow in regularly menstruating women. *Hum Reprod*. 1998;13:1841-5.

89. Jekel JF, Elmore JG, Katz DL. Sample Size, Randomization, and Probability Theory. In: Jekel JF, ed. *Epidemiology, Biostatistics and Preventive Medicine*. 1 ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 1996:159-71.
90. Jekel JF, Elmore JG, Katz DL. Statistical Inference and Hypothesis Testing. In: Jekel JF, ed. *Epidemiology, Biostatistics and Preventive Medicine*. 1 ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 1996:123-37.
91. Johannisson E. Mechanism of action of intrauterine devices: biochemical changes. *Contraception*. 1998;36:11-22.
92. Kelly RW, Cheng L, Thong J, Yong EL, Baird DT. Synthesis and Metabolism of Uterine Prostaglandins. In: Drife JO, Calder AA, eds. *Prostaglandins and the Uterus*. Berlin: Springer-Verlag; 1992:3-15.
93. Kesseru E, Albornoz H, Diaz M, Socolsky R. Serum lipid variations in women on copper intrauterine devices, triphasic oral contraceptives and monthly injectable contraceptives. *Contraception*. 1991;44:235-44.
94. Kivijarvi A, Timonen H, Rajamaki A, Gronroos M. Iron deficiency in women using modern copper intrauterine devices. *Obstet Gynecol*. 1986; 67:95-8.
95. Klein S, Giancotti FG, Presta M, Albelda SM, Buck CA, Rifkin DB. Basic Fibroblast growth factor modulates integrin expression in microvascular endothelial cells. *Mol Biol Cell*. 1993;4:973-82.
96. Klentzeris LD. Adhesion molecules in reproduction. *Br J Obstet Gynaecol*. 1997;104:401-9.

97. Klentzeris LD. The role of endometrium in implantation. *Hum Reprod.* 1997;2:179-5.
98. Lawn AM, Wilson EW, Finn CA. The ultrastructure of human decidual and predecidual cells. *J Reprod Fert.* 1971;26:85-90.
99. Lessey BA. Integrins in the endometrium. *Reprod Med Rev.* 1995;4:43-58.
100. Lessey BA. Integrins and the Endometrium: New Markers of Uterine Receptivity. *Ann N Y Acad Sci.* 1997;828:111-22.
101. Lessey BA, Albelda S, Buck CA, et al. Distribution of Integrin Cell Adhesion Molecules in Endometrial Cancer. *Am J Pathol.* 1995;146:717-26.
102. Lessey BA, Castelbaum A, Buck CA, Lei Y , Yowell CW, Sun J. Further characterization of endometrial integrins during the menstrual cycle and in pregnancy. *Fertil Steril.* 1994;62:497-506.
103. Lessey BA, Castelbaum A, Sawin SW, Sun J. Integrins as markers of uterine receptivity in women with primary unexplained infertility. *Fertil Steril .* 1995;63:535-42.
104. Lessey BA, Castelbaum AJ. Integrins and endometriosis: fact or artifact? *Hum Reprod.* 1998;13:3578-80.
105. Lessey BA, Castelbaum AJ, Sawin SW, et al. Aberrant Integrin Expression in the Endometrium of Women with Endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994;79:643-9.
106. Lessey BA, Damjanovich L, Coutifaris C, Castelbaum A, Albeida SM, Buck CA. Integrins Adhesion Molecules in the Human Endometrium -

Correlation with the Normal and Abnormal Menstrual Cycle. *J Clin Invest.* 1992;90:188-95.

107. Lessey BA, Ilesanmi AO, Lessey MA, Riben M, Harris JE, Chwalisz K. Luminal and Glandular Endometrial Epithelium Express Integrins Differentially Throughout the Menstrual Cycle: Implications for Implantation, Contraception, and Infertility. *Am J Reprod Immunol.* 1996;35:195-204.
108. Lessey BA, Metzger DA, Haney AF, McCarty Jr KS. Immunohistochemical analysis of estrogen and progesterone receptors in endometriosis: comparison with normal endometrium during the menstrual cycle and the effect of medical therapy. *Fertil Steril.* 1989;51:409-15.
109. Lessey BA, Yeh I, Castelbaum AJ, et al. Endometrial progesterone receptors and markers of uterine receptivity in the window of implantation. *Fertil Steril.* 1996;65:477-83.
110. Li TC, Dockery P, Rogers AW, Cooke ID. How precise is histologic dating of endometrium using the standard dating criteria? *Fertil Steril.* 1989;51:759-63.
111. Lippes J. A study of intra-uterine contraception: development of a plastic loop. In: Tietze C, Lewit S, eds. *Intra-uterine contraceptive devices.* Amsterdam: Excerpta Medica; 1962:69-75.
112. Lippes J, Malik T, Tatum HJ. The post-coital copper T. *Adv Plann Parent.* 1976;11:24-9.

113. Lopata A. Blastocyst Development and Implantation. 31st Annual Meeting Postgraduate Course ASRM, Oct., 3-4, San Francisco. 1998;Course V:101-20.
114. Majerus PW. Prostaglandins: critical roles in pregnancy and colon cancer. *Curr Biol.* 1998;8:R87-R89
115. Mandelin E, Koistinen H, Koistinen R, Affandi B, Seppälä M. Levonorgestrel-releasing intrauterine device-wearing women express contraceptive glycodeclin A in endometrium during midcycle: another contraceptive mechanism? *Hum Reprod.* 1997;12:2671-5.
116. McLennan CE, Rydell AH. Extent of endometrial shedding during normal menstruation. *Obstet Gynecol.* 1965;26:605-21.
117. Meyer WR, Castelbaum AJ, Somkuti S, et al. Hydrosalpinges adversely affect markers of endometrial receptivity. *Hum Reprod.* 1997;12:1393-8.
118. Moyer DL, Mishell Jr DR, Bell J. Reactions of human endometrium to the intrauterine device. I. Correlation of the endometrial histology with the bacterial environment of the uterus following short-term insertion of the IUD. *Am J Obstet Gynecol.* 1970;106:799-809.
119. Nagano M. [The history of IUD]. *Sanfunjinka no Sekai.* 1974;26:11-5.
120. Navot D, Bergh PA, Williams M, et al. An insight into early reproductive processes through the in vivo model of ovum donation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991;72:408-14.

121. Noda M, Yoon K, Prince CW, Butler WT, Rodan GA. Transcriptional regulation of osteopontin production in rat osteosarcoma cells by type beta transforming growth factor. *J Biol Chem.* 1988;263:13916-21.
122. Noyes RW, Hertig AT, Rock J. Dating the endometrial biopsy. *Fertil Steril.* 1950;1:3-25.
123. Oehninger S, Coddington CC, Hodgen GD, Seppälä M. Factors affecting fertilization: endometrial placental protein 14 reduces the capacity of human spermatozoa to bind to the human zona pellucida. *Fertil Steril.* 1995;63:377-83.
124. Oppenheimer W. Prevention of pregnancy by the Grafenberg ring method: A re-evaluation after 28 years' experience. *Am J Obstet Gynecol.* 1959;78:446-54.
125. Orlans FB. Dispositivos Intra-uterinos. *Popul Rep B.* 1974;1-20.
126. Ortiz ME, Croxatto HB, Hardin CW. Mechanisms of Action of Intrauterine Device. *Obstet Gynecol Surv.* 1996;51:S42-S51
127. Ortiz ME, Valenzuela JP, Salvatierra AM, Croxatto HB. The expression of alpha(v) and beta3 integrin subunits in the normal human Fallopian tube epithelium suggests the occurrence of a tubal implantation window. *Hum Reprod.* 1998;13:2916-20.
128. Ota T. A study on the birth control with an intrauterine instrument. *Jpn J Obst Gynecol.* 1934;17:210-4.
129. Pakrasi PL, Becka R, Dey SK. Cyclooxygenase and lipoxygenase pathways in the preimplantation rabbit uterus and blastocyst. *Prostaglandins.* 1985;29:481-95.

130. Paria BC, Jones KL, Flanders KC, Dey SK . Localization and binding of transforming growth factor-beta isoforms in mouse preimplantation embryos and in delayed and activated blastocysts. *Dev Biol.* 1992;151:91-104.
131. Pearson CA, Pearson D, Shibahara S, Hofsteenge J, Chiquet-Ehrismann R. Tenascin: cDNA cloning and induction by TGF-beta. *EMBO J.* 1988;7:2977-82.
132. Petta CA, Faúndes D, Pimentel E, Diaz J, Bahamondes L. The Use of Vaginal Ultrasound to Identify Copper IUDs at Risk of Expulsion. *Contraception.* 1996;54:287-99.
133. Petty HR, Todd III RF. Integrins as promiscuous signal transduction devices. *Immunol Today.* 1996;17:209-12.
134. Piotrow PT, Rinehart W, Schmidt JC. Dispositivos Intra-uterinos. *Popul Rep B.* 1979;51-100.
135. Prapas Y, Prapas N, Jones EE, et al. The window for embryo transfer in oocyte donation cycles depends on the duration of progesterone therapy. *Hum Reprod.* 1998;13:720-3.
136. Psychoyos A. Hormonal control of ovoimplantation. *Vitam Horm.* 1973;31:201-56.
137. Psychoyos A, Nikas G, Gravanis A. The role of prostaglandins in blastocyst implantation. *Hum Reprod.* 1995;10:30-42.
138. Rebello R, Green FH, Fox H. A study of the secretory immune system of the female genital tract. *Br J Obstet Gynaecol.* 1975;82:812-6.

139. Rees MC. Human menstruation and eicosanoids. *Reprod Fertil Dev* . 1990;2:467-76.
140. Richter R. Ein Mittel zur Verhütung der Konzeption. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*. 1909;35:1525-7.
141. Roblero L, Guadarrama A, Lopez T, Zegers-Hochschild F. Effect of copper ion on the motility, viability, acrosome reaction and fertilizing capacity of human spermatozoa in vitro. *Reprod Fertil Dev*. 1996;8:871-4.
142. Rogers PAW, Murphy CR. Uterine receptivity for implantation: human studies. In: Yoshinaga K, ed. *Blastocyst Implantation*. USA: Serono Symposia; 1989:231-8.
143. Rowe PJ. Anticoncepcion intrauterina: adelantos y perspectivas. In: López G, Yunes J, Solís JA, Omran AR, eds. *Salud Reproductiva en las Américas*. Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud; 1992:256-95.
144. Ruoslahti E, Noble NA, Kagami S, Border WA. Integrins. *Kidney Int*. 1994;45:S-17-S-22
145. Ruoslahti E, Pierschbacher MD. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science*. 1987;238:491-7.
146. Rutanen EM, Salmi A, Nyman T. mRNA expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) is suppressed and those of IGF-II and IGF-binding protein-1 are constantly expressed in the endometrium during use of an intrauterine levonorgestrel system. *Mol Hum Reprod*. 1997;3:749-54.

147. Sananes N. Prostaglandin(s) as inductive factor of decidualization in the rat uterus. *Mol Cell Endocrinol.* 1976;6:153-.
148. Sandvei R, Matre R. Serum concentrations of immunoglobulins and complement components in women using an intra-uterine contraceptive device (IUCD). *Acta Obst Gynecol Scand.* 1997;66:297-9.
149. Savaris R, Ferrari AN, Zettler CG. Demonstração da integrina $\alpha v \beta 3$ na placenta humana. *Reprod Clim.* 1998;13:31[Abstract]
150. Savaris R, Zettler CG. Efeito do DIU TCU380A sobre o endométrio humano. *Reprod Clim.* 1998;13:60[Abstract]
151. Scommegna A, Pandya GN, Christ M, Lee AW, Cohen MR. Intrauterine administration of progesterone by a slow-release device. *Fertil Steril.* 1970;21:201-10.
152. Scott RT, Snyder RR, Bagnall JW, Reed KD, Adair.C.F., Hensley SD. Evaluation of the impact of intraobserver variability on endometrial dating and the diagnosis of luteal phase defects. *Fertil Steril.* 1993;60:652-7.
153. Segal SJ, Alvarez S, Adejuwon CA, Brache de Mejia V, Leon P, Faundes A. Absence of chorionic gonadotropin in sera of women who use intrauterine devices. *Fertil Steril.* 1985;44:214-8.
154. Seleem S, Hills FA, Salem HT, El-Nashar EM, Chard T. Mechanism of action of the intrauterine contraceptive device: evidence for a specific biochemical deficiency in the endometrium. *Hum Reprod.* 1996;11:1220-2.

155. Seppälä M, Angervo M, Koistinen R, Riittinen L, Julkunen M. Human endometrial protein secretion relative to implantation. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol.* 1991;5:61-72.
156. Sheppard BL. Endometrial morphological changes in IUD users: a review. *Contraception.* 1987;36:1-10.
157. Sheppard D, Cohen DS, Wang A, Busk M. Transforming growth factor beta differentially regulates expression of integrin subunits in guinea pig airway epithelial cells. *J Biol Chem.* 1992;267:17409-14.
158. Simón C, Pellicer A, Polan ML. Interleukin-1 system crosstalk between embryo and endometrium in implantation. *Hum Reprod.* 1995;10:43-54.
159. Simón C, Sanchez-Cuenca J, Herrer R, Pellicer A. Molecular mechanisms of implantation. In: 10th World Congress on In Vitro Fertilization and Assisted Reproduction, Vancouver, Canada, May, 24-25. 1997:737-41.
160. Simón C, Valbuena D, Krüssel J, et al. Interleukin-1 receptor antagonist prevents embryonic implantation by a direct effect on the endometrial epithelium. *Fertil Steril.* 1998;70:896-906.
161. Sivin I. Copper T IUD use and ectopic pregnancy rates in the United States. *Contraception.* 1979;19:151-72.
162. Sivin I. IUDs are contraceptives, not abortifacients: a comment on research and belief. *Stud Fam Plann.* 1989;20:355-9.
163. Sivin I, Tatum HJ. Four years of experience with the TCU380A intrauterine contraception devices. *Fertil Steril.* 1981;36:159-63.

164. Smith JW, Cheresch DA. Integrin (alpha v beta 3)- ligand interaction. Identification of a heterodimeric RGD binding site on the vitronectin receptor. *J Biol Chem.* 1990;265:2168-72.
165. Smith SK, Abel MH, Baird DT. Effect of 17 β -estradiol and progesterone on the levels of prostaglandin F_{2 α} and E₂ in human endometrium . *Prostaglandins.* 1984;27:591-7.
166. Somkuti SG, Sun J, Yowell CW, Fritz MA, Lessey BA. The effect of oral contraceptive pills on markers of endometrial receptivity. *Fertil Steril.* 1996;65:484-8.
167. Somkuti SG, Yuan L, Fritz MA, Lessey BA . Epidermal Growth Factor and Sex Steroids Dynamically Regulate a Marker of Endometrial Receptivity in Ishikawa Cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82:2192-7.
168. Southam AL. Historical review of intra-uterine devices. In: Segal SJ, Southam AL, Shaffer KD, eds. *Intra-uterine contraception (Proceedings of the 2nd International Conference)*. New York: Excerpta Medica; 1965:3-5.
169. Spinnato JA. Mechanism of action of intrauterine contraceptive devices and its relation to informed consent. *Am J Obstet Gynecol.* 1997;176:503-6.
170. Strauss III JF, Gurpide E. The Endometrium. In: Yen SSC, Jaffe RB, eds. *Reproductive Endocrinology.* 3 ed. Philadelphia: W.B.Saunders; 1991:309-56.

171. Sueoka K, Shigetatsu S, Miyazaki T, Kuji N, Tanaka M, Yoshimura Y. Integrins and reproductive physiology: expression and modulation in fertilization, embryogenesis, and implantation. *Fertil Steril.* 1997;67:799-811.
172. Tabibzadeh S. Patterns of expression of integrin molecules in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Hum Reprod.* 1992;7:876-82.
173. Tabibzadeh S, Babaknia A. The signals and molecular pathways involved in implantation, a symbiotic interaction between blastocyst and endometrium involving adhesion and tissue invasion. *Hum Reprod.* 1995;10:1579-602.
174. Tamada H, Das SK, Andrews GK, Dey SK. Cell-type-specific expression of transforming growth factor- α in the mouse uterus during the peri-implantation period. *Biol Reprod.* 1991;45:365-72.
175. Taskin O, Brown RW, Young DC, Poindexter AN, Wiehle RD. High doses of oral contraceptives do not alter endometrial $\alpha 1$ and $\alpha v\beta 3$ integrins in the late implantation window. *Fertil Steril.* 1994;61:850-5.
176. Tatum HJ, Zipper JA. The "T" intrauterine contraception device and recent advances in hormonal anticonceptual therapy. 6th Northeast Obstetrics Gynecology Congress, Bahia, Brazil. 1968;6-.
177. Tietze C. Evaluation of intrauterine devices: ninth progress report of the Cooperative Statistical Program. *Stud Fam Plann.* 1970;1:1-40.
178. Treiman K, Liskin L. Dispositivo Intra-uterino. *Popul Rep B.* 1988;5:2-17.

179. Umaphysivm K, Jones WR. Effects of contraceptive agents on the biochemical and protein composition of human endometrium. *Contraception*. 1980;22:425-40.
180. Van Kets H, Van der Pas H, Thiery M, et al. The GyneFix implant systems for interval, postabortal and postpartum contraception: a significant advance in long-term reversible contraception. International Study Group on Intrauterine Drug Delivery. *Eur J Contracept Reprod Health Care*. 1999;2:1-13.
181. Vinatier D. Integrins and reproduction. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1995;59:71-81.
182. Westhoff C. The IUD in Evolution. *Obst Gynecol Surv*. 1996;51:S20-S24
183. Wiedermann D, Kriz J, Cidl K. Specific serum protein levels in women using intrauterine contraceptive device. *Czech Med*. 1980;3:239-47.
184. Wild RA, Sanfilippo JS, Toledo AA. Endometrial Biopsy in the Infertility Investigation The Experience at Two Institutions. *J Reprod Med*. 1986;31:954-7.
185. Wilkinson N, Buckley CH, Chawner L, Fox H. Nucleolar organiser regions in normal, hyperplastic and neoplastic endometrium. *Int J Gynecol Pathol*. 1990;9:55-9.
186. Wollen AL, Sandvei R, Skare A, Justesen NP. The localization and concentration of copper in the fallopian tube in women with or without an intrauterine contraceptive device. *Acta Obst Gynecol Scand*. 1994;73:195-9.

187. Woolley JA, Seleem S, Hills FA, Salem H , el-Nashar E, Chard T. Raised circulating levels of interleukin-6 in women with an intrauterine contraceptive device. *Gynecol Obstet Invest.* 1996;42:241-3.
188. Yen SSC. Endocrine-Metabolic Adaptations in Pregnancy. In: Yen SSC, Jaffe RB, eds. *Reproductive Endocrinology.* 3 ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co.; 1991:936-81.
189. Ylikorkala O, Siljander M, Huhtaniemi IT, Kauppila A, Seppälä M. Trophoblastic markers in women using intrauterine contraception. *Obstet Gynecol.* 1980;55:329-32.
190. Zimmer Jr. DF. Avoiding Litigation in a New Age of IUDs. *Obstet Gynecol Surv.* 1996;51:S56-S60
191. Zipper J, Medel M, Prager R. Suppression of fertility by intrauterine copper and zinc in rabbits. A new approach to intrauterine contraception. *Am J Obstet Gynecol.* 1969;105:529-34.
192. Zipper JA, Tatum HJ, Pastene L, Medel M , Rivera M. Metallic copper as an intrauterine contraceptive adjunct to the "T" device. *Am J Obstet Gynecol.* 1969;105:1274-8.

VII ANEXO

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Até o momento não se sabe como é que o DIU (dispositivo intra-uterino) funciona sobre pequenas substâncias que estão relacionadas com a capacidade de uma mulher engravidar. Esse trabalho irá servir no auxílio do entendimento médico/científico com respeito ao funcionamento do dispositivo intra uterino sobre essas substâncias. Em troca, obterá um exame gratuito para verificar se existe câncer ou infecção no útero. O material será coletado cerca de 6 a 10 dias após a ovulação, de dentro do útero, através de uma biópsia de endométrio, procedimento já consagrado na prática médica e utilizado em consultório. A biópsia geralmente não gera desconforto nas pacientes que já tiveram filho, mas poderá sentir certo grau de dor (dói mais do que a coleta do preventivo de câncer, mas dói menos do que uma histerossalpingografia, assemelhando-se a dor experimentada numa obturação de dente). Caso a paciente experimente dor, poderá ser administrada uma medicação ou o uso de anestesia local. Raramente ocorrem problemas para a biópsia de endométrio, e quando ocorrem não são sérios ou duradouros. Pode haver dificuldade de passar a cureta pelo canal cervical, o que pode gerar a dor; caso esteja grávida, pode haver um sangramento aumentado, mal estar, febre. O risco de abortamento pelo procedimento é muito baixo. Como será utilizado uma cureta de plástico flexível e descartável e o procedimento será realizado em condições assépticas (limpa), o risco de perfuração uterina e o de infecção pélvica são desprezíveis, eles são menores do que a colocação do DIU.

Não existem métodos alternativos para esse procedimento. O Dr. Ricardo F. Savaris ficará responsável pelo acompanhamento da paciente, a sua assistência, escolha da medicação e pelos custos relacionados com exames de laboratório e medicamentos, caso seja necessário. Fica esclarecido que não existe a presença de um grupo placebo (que usa um remédio falso), bem como a garantia do sigilo que assegure a privacidade e a liberdade de sair desse trabalho quando bem quiser sem penalização ou prejuízo ao seu cuidado. A paciente não terá despesas para participar desse trabalho.

O material obtido nesse trabalho não será utilizado com fins comerciais.

Esse documento se encontra em duas vias iguais de igual conteúdo e valor.

Eu, _____, abaixo assinado, ciente dos termos acima descritos, aceito a participar desse trabalho (Níveis de integrina $\alpha v\beta 3$ no endométrio de mulheres usuárias do DIUT200), por livre e espontânea vontade.

assinatura da paciente

Porto Alegre, ____/____/____

**ARTIGO EM INGLÊS SUBMETIDO AO MOLECULAR HUMAN
REPRODUCTION**

1 **Title:** Expression of the $\alpha\beta 3$ integrin in the endometrium of women using the copper IUD
2 T200

3 **Key words:**

4 contraception/ integrins/ IUD/ endometrium/ implantation

5 **Authors:**

6 Ferrari, A.N., Fundação Universitária de Endocrinologia e Fertilidade, FUEFE, Porto Alegre,
7 CEP 90630-130, Brazil

8 Savaris, R.F., Pós-Graduação em Clínica Médica, UFRGS, Porto Alegre, CEP 90630-130,
9 Brazil

10 Zettler, C.G., Departamento de Patologia, Fundação Faculdade Federal Ciências Médicas de
11 Porto Alegre, Porto Alegre, CEP 90050-170, Brazil

12 **Abstract:**

13 Despite their use for many years, the precise mechanism by which copper-containing
14 intrauterine devices (IUDs) function is still not well understood. It has been postulated that
15 IUDs also exert contraceptive action on implantation. The $\alpha\beta 3$ integrin is an adhesion
16 molecule that is increasingly recognized as an endometrial marker of uterine receptivity. We
17 hypothesized that $\alpha\beta 3$ expression might be diminished in endometrium of IUD users during
18 the window of implantation. To investigate this possibility, 13 IUD T200 users underwent
19 timed endometrial biopsy and were compared with regard to histology and integrin expression
20 with 13 normal fertile controls. All women had endometrial biopsies during the middle
21 secretory phase (days 20~24), analyzed by conventional histological criteria and stained for

22 integrin $\beta 3$ subunit in cryosections samples. The HSCORE for IUD users was 0.9 ± 0.7 (mean
23 \pm SEM), while for controls was 2.13 ± 0.7 (mean \pm SEM) ($P < 0,001$ Student's t -test). All
24 controls were positive for $\alpha v\beta 3$, but women with IUD did not expressed $\alpha v\beta 3$ integrin in
25 38,5% of the cases ($P < 0.03$ Fisher's exact test). These results support the theory that copper
26 IUD T200 also has a mechanism of action that is directed at interference with uterine
27 receptivity and implantation.

28 Introduction

29 The intrauterine device (IUD) probably is the safest and the commonest contraceptive method
30 used in the world, after the oral contraceptives (Rowe, 1992). However, its mechanism of
31 action is not well understood yet and it is controversial (Ortiz *et al.*, 1996; Spinnato, 1997). It
32 has been suggested that IUDs act by interfering with sperm transport (Tredway *et al.*, 1975),
33 fertilization (Alvarez *et al.*, 1988) and implantation (el-Sahwi and Moyer, 1971; Ortiz and
34 Croxatto, 1987). It is also believed that IUDs stimulate an inflammatory response in the
35 uterus (Spinnato, 1997).

36 Integrins, a family of cell adhesions molecules, consist of transmembrane α and β subunits
37 and are involved in cell-cell and cell-substratum interactions (Lessey *et al.*, 1996b). These cell
38 adhesion receptors are involved in a variety of human processes (Ruoslahti *et al.*, 1994).
39 Recently, the integrins expression in the human endometrium was described (Lessey *et al.*,
40 1992). Immunohistochemistry has been the standard method to evaluate integrin expression
41 (Béliard *et al.*, 1997; Lessey *et al.*, 1992; Ortiz *et al.*, 1998). Three specific integrin subunits
42 ($\alpha 1$, $\alpha 4$ and $\beta 3$) show cycle-specific patterns of expression in glandular and luminal
43 epithelium in human endometrium during the menstrual cycle (Lessey *et al.*, 1996a). The
44 abrupt appearance of $\alpha v\beta 3$ on cycle 20 of the menstrual cycle (Tabibzadeh, 1992) is

45 coincident with the opening of the window of implantation as described by Hertig *et al.*
46 (Hertig *et al.*, 1956) while the disappearance of $\alpha 4$ -subunit on cycle day 24 sets its closure
47 (Lessey *et al.*, 1996a). The coexpression of these three integrins subunits is related to the
48 putative "window of implantation" thought to occur on cycle day 20 to 24 (Lessey *et al.*,
49 1994a). The expression of the endometrial $\alpha v \beta 3$ is aberrant in women with endometriosis
50 (Lessey *et al.*, 1994b), hydrosalpinges (Meyer *et al.*, 1997), luteal phase defect (Lessey *et al.*,
51 1996b) and unexplained infertility (Lessey *et al.*, 1995), although some authors did not find
52 the same results in patients with endometriosis (Hii and Rogers, 1998). Because of the
53 temporal pattern of their expression around the time of implantation and their absence in
54 conditions related to infertility, these integrins might have an important role as a potential
55 marker of uterine receptivity (Lessey, 1994; Tabibzadeh, 1997).

56 We conducted the present study in order to determine if copper intrauterine devices induce
57 abnormal integrins expression. We aimed to evaluate the expression of the $\beta 3$ integrin subunit
58 in the endometrium of copper IUD users during the putative window of implantation. To our
59 knowledge, this is the first prospective and controlled investigation of the expression of this
60 integrin in the endometrium of copper IUD users.

61 **Materials and methods**

62 *Study design*

63 The use of human tissue for research was based on informed consent and approved by the
64 Ethical Committee of the General Hospital of Porto Alegre (HCPA). A prospective, case-
65 controlled study was performed comparing the expression of $\alpha v \beta 3$ integrin in copper IUD
66 users (cases), from a secondary health care unit, to fertile controls that were submitted to
67 hysterectomy for benign conditions or tubal sterilisation. The cases were invited by letter. The

68 criteria for inclusion were normally cycling women with ≥ 18 and ≤ 40 year-old, no use of
69 hormones over the last 3 months, a fixed partner, proven fertility (parity ≥ 1), negative exams
70 for sexual transmitted disease (gonorrhoea and chlamydia), no previous history of pelvic
71 inflammatory disease or endometriosis, normal and recent pap smear and endometrial
72 biopsies "in phase" (dyssynchrony of ≤ 2 days) based on the time of ovulation. All women
73 who did not fulfil these inclusion criterion were excluded.

74 *Tissue evaluation*

75 All biopsies were obtained during the mid-luteal phase between cycle days postovulatory day
76 6 ~10 (LH +6 ~ +10) with a plastic flexible curette (Z-Sampler, BEI Medical Instruments, San
77 Francisco, CA) based on urinary LH surge (LH kit, Expomed Inc. San Antonio, CA).
78 Endometrial samples were divided for histological dating and immunohistochemical staining.
79 Endometrial histological dating was performed according to the criteria of Noyes *et al* (Noyes
80 *et al.*, 1950). Immunoperoxidase staining was performed using the monoclonal mouse anti-
81 human antibody for $\beta 3$ -subunit, SSA6 (kindly provided by Prof. B.A. Lessey), which
82 correlates with the expression of $\alpha v \beta 3$ in the human endometrium (Lessey *et al.*, 1996a).
83 Serial cryosections, 8 μm thick, were placed onto poly-L-lysine coated slides, fixed in acetone
84 at -20°C for 10 min. After a phosphate-buffered saline (PBS) at pH 7.2-7.4 rinse, endogenous
85 peroxidases were quenched with a 30 min incubation with 0.3% H_2O_2 (Sigma Chemical Co.,
86 St. Louis, MO, USA) in absolute methanol (Mallinckrodt, Paris, KY, USA). Slides were
87 incubated with 0.3% Triton X-100 (Sigma) diluted in PBS for 10 min after 2 x 5 min PBS
88 rinse. After new rinse with PBS, unspecific sites were blocked with 2% horse serum albumin
89 (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) for 30 min. Primary antibody at dilution of
90 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 1% horse serum (Vector) was incubated overnight at $+4^{\circ}\text{C}$. After a rinse with PBS
91 for 3 min, secondary antibody consisting of biotinylated horse anti-mouse (Vector) was

92 incubated for 30 min at room temperature. Avidin-biotinylated horseradish peroxidase
93 macromolecular complex (ABC-Vector) was then incubated on the sections for 30 min. The
94 diaminobenzadine was used as a chromagen (DAB; Sigma) for 3 min to complete the
95 reaction. Samples were counter staining with haematoxylin and mounted. The resulting
96 staining was evaluated on a Nikon microscope at low (100x) and higher (400x) magnification
97 by two independent readers in a blind fashion using the histological score (HSCORE) as
98 previously described (Lessey *et al.*, 1994b), having 0.7 as a cut-off between positive and
99 negative staining (Lessey *et al.*, 1994b). The use of HSCORE has been used clinically with
100 low inter- and intra-observer variation (Budwit-Nowotny *et al.*, 1986).

101 ***Statistical analysis***

102 Comparison of the means of HSCORE of both groups was performed using Student's *t*-test.
103 The Fisher exact test was used to compare dichotomic data (IUD/controls x integrin
104 positive/negative).

105 Statistical analysis was performed using Excel 7.0 software (Microsoft Corporation,
106 Redmond, WA, USA) and EPI Info 5.01b software (Centre for Disease Control, Atlanta, GA,
107 USA)

108 **Results**

109 One hundred and fifty two copper IUD users registered in a secondary health care unit were
110 invited by letter to participate in the study. Twenty four patients attended the first consult and
111 accepted to participate. From these 24 patients, 7 (29.16%) quit or changed address and
112 follow up was not possible. Three (12.5%) were excluded for not fulfilling the including
113 criteria. Fourteen endometrial samples were obtained from the remain patients. One biopsy
114 from an IUD user was out of phase and was excluded. Controls were obtained from patients

115 submitted to tubal sterilisation or hysterectomy for benign conditions from a tertiary health
116 care centre. No difference was observed between the two groups when age, parity, and day of
117 biopsies were compared (Table 1). No complications or displacements of the contraceptive
118 devices were observed in IUD group. The expression of $\alpha v\beta 3$ at days LH+6~+10 of the cycle
119 was substantially lower (Student's *t*-test; $P=0.001$) in IUD users (HSCORE= 0.96 ± 0.7 ; mean
120 \pm SEM) when compared to controls (HSCORE= 2.13 ± 0.7 ; mean \pm SEM) as shown in Figure
121 1 and Graph 1. All controls were positive for $\alpha v\beta 3$ (100%), while 8/13 (61.5%) of IUD users
122 had a positive expression when the HSCORE of 0.7 was considered as the cut off for positive
123 and negative expression. Five out of 13 (38.5%) had a negative expression of $\alpha v\beta 3$ in IUD
124 users. These results were significantly different between the two groups (Fisher exact test;
125 $P=0.03$) as shown in Table 2. All samples were well stained, having no background.

126 Discussion

127 Intrauterine devices are thought to function in part by interfering with uterine receptivity.
128 Unfortunately, there are few studies that have established this with certainty. The $\alpha v\beta 3$
129 integrin is increasingly recognised and used as a marker of uterine receptivity (Ilesanmi *et al.*,
130 1993; Lessey *et al.*, 1995; Tabibzadeh, 1997). The lack of studies on the expression of the
131 $\alpha v\beta 3$ in the presence of copper IUD lead us to perform this present study. Both groups were
132 matched for all relevant variables, except for the presence of copper IUD.
133 Immunohistochemistry was performed in cryosections in order to avoid artefact. Comparison
134 of endometrial samples of women with copper IUD and normal fertile controls demonstrated
135 that $\alpha v\beta 3$ levels are significantly lower in the endometrium of copper IUD users. The $\alpha v\beta 3$
136 may be decreased for two reasons. First, due to a histological delay (type I defect) (Lessey,
137 1997) and secondly $\alpha v\beta 3$ can be missing during the window of implantation without a

138 histological delay (type II defect) (Lessey, 1997). Type II defect has been noted in women
139 with hydrosalpinx (Meyer *et al.*, 1997) and endometriosis (Lessey *et al.*, 1994b). Therefore,
140 the aberrant expression of $\alpha\beta 3$ in the presence of copper IUD is a type II defect.

141 The possible explanations for our findings could be related with mechanical, paracrine factors
142 or both. The separation of the two endometrial lining by the IUD could inhibit some cofactor,
143 which might be related to integrin expression.

144 The local inflammatory response caused by IUD is intensified by the presence of copper
145 (Newton and Tacchi, 1990). Consequently, there is a shift of the normal lymphocytes cells
146 and an increase in neutrophils, mononuclear cells and plasma cells in the endometrium,
147 which is unrelated to the inflammatory cells' infiltration that occurs pre-menstrually
148 (Johannisson E, 1998). These cells might secrete some factor, such as basic fibroblast growth
149 factor (bFGF) which is related to diminished expression of $\alpha\beta 3$ (Klein *et al.*, 1993).

150 The copper IUD releases free copper and copper salts which have a biochemical and a
151 morphological impact in the endometrium (Vessey *et al.*, 1979). In respect of the integrins,
152 EDTA, a calcium chelator, prevents the binding of $\alpha 1$ and $\alpha 6$ to the extracellular matrix
153 (Grosskinsky *et al.*, 1996). One possible explanation is that copper ions might also modulate
154 the integrin expression.

155 Failure of progesterone receptors (PR) down-regulation is associated with aberrant $\alpha\beta 3$
156 expression (Lessey *et al.*, 1996b). It was demonstrated that PR are still expressed from day 25
157 onwards of the menstrual cycle in the presence of IUD T200 (de Castro *et al.*, 1986). Thus is
158 reasonable to speculate in a prolonged and aberrant expression of PR, which would influence
159 the low levels of $\alpha\beta 3$.

160 Despite of the strong evidences favouring the inhibition of $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ in the presence of copper
161 IUD, some limitations should be addressed. Could be argued that the lower levels of $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ in
162 IUD users could be due to other reasons, such as the presence of endometriosis or
163 hydrosalpinx. There is a small possibility that IUD users might have hydrosalpinx and/or
164 endometriosis. However, laparoscopy would be the choice to rule out these conditions, and
165 doing that would implicate in ethical issues. We tried to overcome this problem in a *before*
166 *and after* type pilot project in surgically sterilised patients, but there was a great rejection
167 from them. Therefore, we opted for this methodology.

168 The diminished expression of integrin $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ in endometrium of copper IUD was
169 demonstrated. The expression of $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ was diminished in 38.5% of the IUD users. This find
170 add new data for the theory that copper IUD also has a mechanism of action on the
171 implantation site. The $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ expression itself cannot explain alone the mechanism of action
172 of the copper IUD, since 61.5% of them had a positive expression. This result does not
173 explain the almost 100% contraceptive efficacy of copper IUD (Rowe, 1992). Therefore, we
174 should appreciate with more caution the possibility that the mechanisms of action of copper
175 IUD are related to more than one site and have more than one cause, having the implantation
176 inhibition as an important factor. It should be stressed that these results cannot be
177 extrapolated to other IUD types, even the ones with different amounts of copper. The paper
178 published by de Castro *et al.* (de Castro *et al.*, 1986) demonstrated that histological and
179 cellular alterations in the endometrium occurred according to the amount of copper on the
180 IUDs. Thus, the specific mechanism involved in this reduced expression, if it is due to copper
181 ions, mechanical, or paracrine factors, is a matter that needs further research.

182 **Acknowledgements**

183 The authors would like to thank Prof. Bruce Lessey (Department of Obstetrics and
 184 Gynaecology of the University of North Carolina, NC, USA), Prof. Marc Bygdeman, Dr. Lena
 185 Marions for their laboratorial help and expertise. This research was supported in part by
 186 Conselho Nacional de Pesquisa - CNPq grant 142161/97-7.

187 **References**

- 188 Alvarez, F., Brache, V., Fernandez, E., *et al.* (1988) New insights on the mode of action of
 189 intrauterine contraceptive devices in women. *Fertil Steril* **49**, 768-773.
- 190 Béliard, A., Donnez, J., Nisolle, M., Foidart, J.M. (1997) Localization of laminin, fibronectin,
 191 E-cadherin, and integrins in endometrium and endometriosis. *Fertil Steril* **67**, 266-72-272.
- 192 Budwit-Nowotny, D.A., McCarty, K.S., Cox, E.B., *et al.* (1986) Immunohistochemical
 193 analyses of estrogen receptor in endometrial adenocarcinoma using a monoclonal antibody.
 194 *Cancer Res* **46**, 5419-5425.
- 195 de Castro, A., Gancedo, G.P., Contreras, F., *et al.* (1986) The effect of copper ions in vivo on
 196 specific hormonal endometrial receptors. *Adv Contracept* **2**, 399-404.
- 197 el-Sahwi, S., Moyer, D.L. (1971) The leukocytic response to an intrauterine foreign body in
 198 the rabbit. *Fertil Steril* **22**, 398-408.
- 199 Grosskinsky, C.M., Yowell, C.W., Sun, J., *et al.* (1996) Modulation of Integrin Expression in
 200 Endometrial Stromal Cells In Vitro. *J Clin Endocrinol Metab* **81**, 2047-2054.
- 201 Hertig, A.T., Rock, J., Adams, E.C. (1956) A description of 34 human ova within the first 17
 202 days of developmet. *Am J Anat* **98**, 435-493.
- 203 Hii, L.L., Rogers, P.A. (1998) Endometrial vascular and glandular expression of integrin
 204 alpha(v)beta3 in women with and without endometriosis. *Hum Reprod* **13**, 1030-1035.
- 205 Ilesanmi, A.O., Hawkins, D.A., Lessey, B.A. (1993) Immunohistochemical Markers of

206 Uterine Receptivity in the Human Endometrium. *Microsc Res Tech* **25**, 208-222.

207 Johannisson E (1998) Mechanism of action of intrauterine devices: biochemical changes.
208 *Contraception* **36**, 11-22.

209 Klein, S., Giancotti, F.G., Presta, M., *et al.* (1993) Basic Fibroblast growth factor modulates
210 integrin expression in microvascular endothelial cells. *Mol Biol Cell* **4**, 973-982.

211 Lessey, B.A. (1994) The use of integrins for the assessment of uterine receptivity. *Fertil*
212 *Steril* **61**, 812-814.

213 Lessey, B.A. (1997) Integrins and the Edometrium: New Markers of Uterine Receptivity. *Ann*
214 *NY Acad Sci* **828**, 111-122.

215 Lessey, B.A., Castelbaum, A., Buck, C.A., *et al.* (1994a) Further characterization of
216 endometrial integrins during the menstrual cycle and in pregnancy. *Fertil Steril* **62**, 497-
217 506.

218 Lessey, B.A., Castelbaum, A., Sawin, S.W., *et al.* (1995) Integrins as markers of uterine
219 receptivity in women with primary unexplained infertility. *Fertil Steril* **63**, 535-542.

220 Lessey, B.A., Castelbaum, A.J., Sawin, S.W., *et al.* (1994b) Aberrant Integrin Expression in
221 the Endometrium of Women with Endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* **79**, 643-649.

222 Lessey, B.A., Damjanovich, L., Coutifaris, C., *et al.* (1992) Integrins Adhesion Molecules in
223 the Human Endometrium - Correlation with the Normal and Abnormal Menstrual Cycle. *J*
224 *Clin Invest* **90**, 188-195.

225 Lessey, B.A., Ilesanmi, A.O., Lessey, M.A., *et al.* (1996a) Luminal and Glandular
226 Endometrial Epithelium Express Integrins Differentially Throughout the Menstrual Cycle:
227 Implications for Implantation, Contraception, and Infertility. *Am J Reprod Immunol* **35**,
228 195-204.

229 Lessey, B.A., Yeh, I., Castelbaum, A.J., *et al.* (1996b) Endometrial progesterone receptors
230 and markers of uterine receptivity in the window of implantation. *Fertil Steril* **65**, 477-483.

- 231 Meyer, W.R., Castelbaum, A.J., Somkuti, S., *et al.* (1997) Hydrosalpinges adversely affect
232 markers of endometrial receptivity. *Hum Reprod* **12**, 1393-1398.
- 233 Newton, J., Tacchi, D. (1990) Long-term use of copper intrauterine devices. *Lancet* **335**,
234 1322-1323.
- 235 Noyes, R.W., Hertig, A.T., Rock, J. (1950) Dating the endometrial biopsy. *Fertil Steril* **1**, 3-
236 25.
- 237 Ortiz, M.E., Croxatto, H.B. (1987) The mode of action of IUDs. *Contraception* **36**, 37-53.
- 238 Ortiz, M.E., Croxatto, H.B., Hardin, C.W. (1996) Mechanisms of Action of Intrauterine
239 Device. *Obstet Gynecol Surv* **51**, S42-S51
- 240 Ortiz, M.E., Valenzuela, J.P., Salvatierra, A.M., *et al.* (1998) The expression of alpha(v) and
241 beta3 integrin subunits in the normal human Fallopian tube epithelium suggests the
242 occurrence of a tubal implantation window. *Hum Reprod* **13**, 2916-2920.
- 243 Rowe, P.J. (1992) Anticoncepcion intrauterina: adelantos y perspectivas. In: *Salud*
244 *Reproductiva en las Américas*, 256-295. Edited by López, G., Yunes, J., Solís, J.A., and
245 Omran, A.R., Washington, D.C., Organización Panamericana de la Salud.
- 246 Ruoslahti, E., Noble, N.A., Kagami, S., *et al.* (1994) Integrins. *Kidney Int* **45**, S-17-S-22
- 247 Spinnato, J.A. (1997) Mechanism of action of intrauterine contraceptive devices and its
248 relation to informed consent. *Am J Obstet Gynecol* **176**, 503-506.
- 249 Tabibzadeh, S. (1992) Patterns of expression of integrin molecules in human endometrium
250 throughout the menstrual cycle. *Hum Reprod* **7**, 876-882.
- 251 Tabibzadeh, S. (1997) Implantation: From Basics to the Clinic. *Ann NY Acad Sci* **828**, 131-
252 136.
- 253 Tredway, D.R., Umezaki, C.U., Mishell, D.R.J., *et al.* (1975) Effect of intrauterine devices on
254 sperm transportation in the human being: preliminary report. *Am J Obstet Gynecol* **123**,
255 734-735.

256 Vessey, M., Meisler, L., Flavel, R., *et al.* (1979) Outcome of pregnancy in women using
 257 different methods of contraception. *Br J Obstet Gynaecol* **86**, 548-556.

258 **Table 1** Sample characterization

	Controls (n=13) Mean \pm SEM	IUDs (n= 13) Mean \pm SEM	<i>P</i> value *
Age (years)	27.9 \pm 5.18	30.1 \pm 3.18	0.2 NS
Parity	2.5 \pm 0.77	3.2 \pm 1.64	0.18 NS
Day of biopsy	23.3 \pm 0.58	22.6 \pm 1.58	0.13 NS

259 *NS: non significant

260

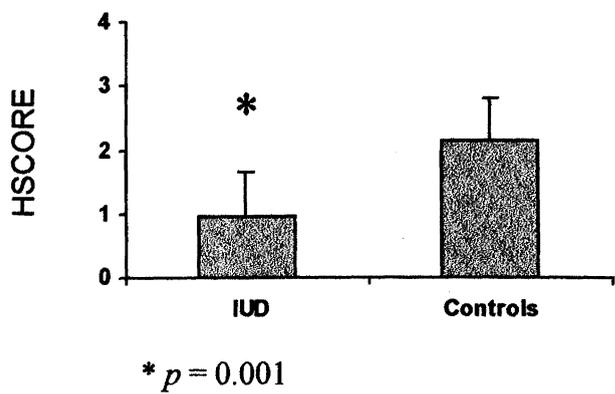
261 **Table 2** Individual results of immunoperoxidase staining (HSCORE) between controls and
 262 copper intrauterine device (IUD) users.

Patient #	HSCORE CONTROL	HSCORE IUD
1	3.7	2.13
2	3.5	2.03
3	2.7	1.93
4	2.6	1.83
5	2.4	1.53
6	2.3	1.33
7	2	0.83
8	2	0.83
9	1.5	0.03
10	1.5	0.03
11	1.2	0.03
12	1.2	0.03
13	1.2	0.03
Positive/Total*	13/13	8/13

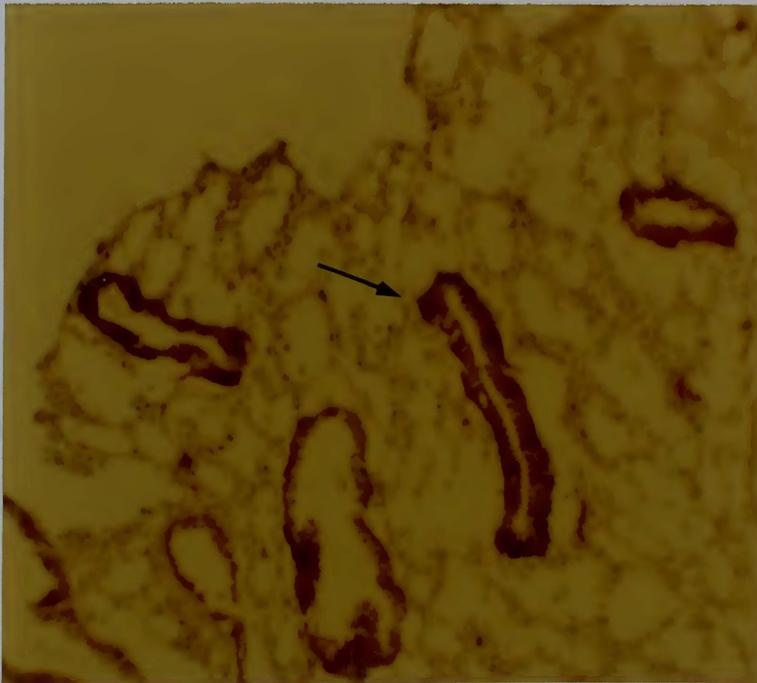
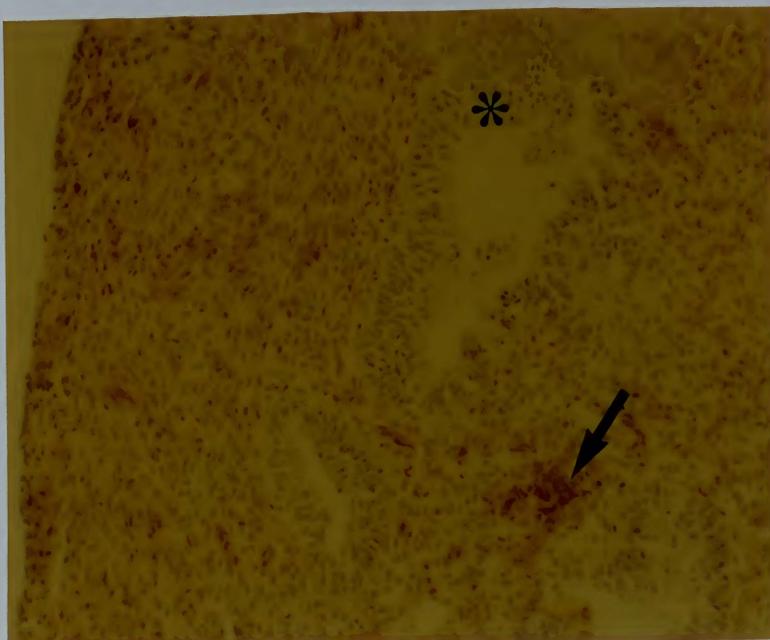
263

* *p* = 0.03 (Fisher's exact test)

264 **Graph 1** Expression of $\beta 3$ integrin subunit in the endometrium of copper IUD T200 users
265 and controls.



266 **Figure 1** Immunohistochemical localization of $\beta 3$ integrin subunit in the endometrium from
267 controls and in copper IUD T200 users. (A) A typical positive staining for mouse anti-human
268 $\beta 3$ -subunit in the endometrial gland (thin arrow) on post-ovulatory day 8 of the menstrual
269 cycle of a control. (B) An example of no staining for $\beta 3$ (asterisk) in the endometrial gland of
270 copper IUD users on post-ovulatory day 7 of the menstrual cycle. Note the presence of $\beta 3$ in
271 the endothelium as a positive internal control (short arrow). (Original magnification X100)

272 **A**280 **B**

**VERSÃO EM PORTUGUÊS DO ARTIGO SUBMETIDO AO MOLECULAR
HUMAN REPRODUCTION**

1 **Título:** Expressão da integrina $\alpha\beta 3$ no endométrio de mulheres usuárias do DIUT200 de
2 cobre.

3 **Palavras Chaves:**

4 Anticoncepção/ integrinas/ DIU/ endométrio/ implantação

5 **Autores:**

6 Ferrari, A.N., Fundação Universitária de Endocrinologia e Fertilidade, FUEFE, Porto Alegre,
7 CEP 90630-130, Brazil

8 Savaris, R.F., Pós-Graduação em Clínica Médica, UFRGS, Porto Alegre, CEP 90630-130,
9 Brazil

10 Zettler, C.G., Departamento de Patologia, Fundação Faculdade Federal Ciências Médicas de
11 Porto Alegre, Porto Alegre, CEP 90050-170, Brazil

12

13 **Resumo:**

14 Apesar de ser utilizado por muitos anos, o mecanismo exato pelo qual os dispositivos
15 intra-uterinos de cobre (DIU) funcionam ainda não foi completamente compreendido. Tem
16 sido postulado que o DIU também exerce a sua atividade anticoncepcional sobre a
17 implantação. A integrina $\alpha\beta 3$ é uma molécula de adesão que tem sido cada vez mais
18 reconhecida como um marcador endometrial da receptividade uterina. A nossa hipótese é que
19 a expressão da integrina $\alpha\beta 3$ possa estar diminuída no endométrio de mulheres usuárias do
20 DIU durante a janela de implantação. Para investigar essa possibilidade, 13 usuárias do DIU
21 T200 foram submetidas a uma biópsia endometrial e foram comparadas com relação a

22 histologia e a expressão da integrina $\alpha v\beta 3$ com 13 controles normais e férteis. Todas as
23 mulheres tiveram a sua biópsia endometrial durante a fase secretora média (dias 20~24),
24 analisadas de acordo com os critérios convencionais para histologia e coradas para a
25 subunidade $\beta 3$ da integrina em amostras criopreservadas. O HSCORE para as usuárias do
26 DIU foi de $0,9 \pm 0,7$ (média \pm DP), enquanto que nos controles foi de $2,13 \pm 0,7$ (média \pm
27 DP) ($P < 0,001$ Test-*t* de Student). Todos os controles foram positivos para $\alpha v\beta 3$, mas as
28 mulheres com DIU não expressaram a integrina $\alpha v\beta 3$ 38,5% dos casos ($P < 0,03$ Teste exato
29 de Fisher). Esses resultados apoiam a teoria de que o DIU T200 de cobre também tem um
30 mecanismo de ação que interfere diretamente com a receptividade uterina e a implantação.

31 **introdução**

32 O dispositivo intra-uterino (DIU) é, provavelmente, o método anticoncepcional mais seguro e
33 mais comumente utilizado no mundo, depois dos anticoncepcionais orais (Rowe, 1992).
34 Todavia, o seu mecanismo de ação ainda não foi bem compreendido e é controverso (Ortiz *et*
35 *al.*, 1996; Spinnato, 1997). Tem sido sugerido que o DIU atua através da interferência do
36 transporte de espermatozoides (Tredway *et al.*, 1975), fertilização (Alvarez *et al.*, 1988) e da
37 implantação (el-Sahwi and Moyer, 1971; Ortiz and Croxatto, 1987). Também está descrito
38 que o DIU estimula uma resposta inflamatória no útero (Spinnato, 1997).

39 As integrinas, uma família de moléculas de adesão, consistem em subunidades α e β que são
40 transmembranas e estão envolvidas nas interações célula-célula e célula-substrato (Lessey *et*
41 *al.*, 1996b). Esses receptores de adesão das células estão envolvidos numa variedade de
42 processos humanos (Ruoslahti *et al.*, 1994). Recentemente, a expressão das integrinas no
43 endométrio humano foi descrito (Lessey *et al.*, 1992). A imunistoquímica tem sido o método
44 padrão para avaliar a expressão das integrinas (Béliard *et al.*, 1997; Lessey *et al.*, 1992; Ortiz

45 *et al.*, 1998). Três subunidades específicas ($\alpha 1$, $\alpha 4$ e $\beta 3$) demonstram um padrão de
46 expressão que é dependente do ciclo menstrual nas glândulas e no epitélio luminal do
47 endométrio humano durante o ciclo menstrual (Lessey *et al.*, 1996a). O surgimento abrupto
48 da $\alpha v\beta 3$ no 20º dia do ciclo menstrual (Tabibzadeh, 1992) é coincidente com a abertura da
49 janela de implantação como foi descrito por Hertig *et al.* (Hertig *et al.*, 1956) enquanto que o
50 desaparecimento da subunidade $\alpha 4$ no 24º dia do ciclo menstrual estabelece o seu
51 fechamento (Lessey *et al.*, 1996a). A coexpressão dessas três subunidades de integrina está
52 relacionada com a “dita” janela de implantação, que se acredita ocorrer entre o 20º e 24º dia
53 do ciclo menstrual (Lessey *et al.*, 1994a). A expressão endometrial da $\alpha v\beta 3$ é aberrante em
54 mulheres com endometriose (Lessey *et al.*, 1994b), hidrossalpinge (Meyer *et al.*, 1997),
55 deficiência de corpo lúteo (Lessey *et al.*, 1996b) e infertilidade sem causa aparente (Lessey *et*
56 *al.*, 1995), apesar de que alguns autores não tenham encontrado os mesmos resultados em
57 pacientes com endometriose (Hii and Rogers, 1998). Pelo fato do seu padrão de expressão
58 temporal ao redor da janela de implantação e a sua ausência em condições relacionadas com
59 a infertilidade, essas integrinas podem Ter um papel importante como potenciais marcadores
60 da receptividade uterina (Lessey, 1994; Tabibzadeh, 1997).

61 O presente estudo foi conduzido para determinar se o dispositivo intra-uterino de cobre induz
62 uma expressão anormal da expressão da integrina. O objetivo é avaliar a expressão da
63 subunidade $\beta 3$ no endométrio de mulheres usuárias do DIUT200 durante a janela de
64 implantação. Para o nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo prospectivo e controlado
65 que investiga a expressão dessa integrina no endométrio de mulheres usuárias do DIUT200 de
66 cobre.

67 **Material e métodos**

68 ***Delineamento***

69 O uso de tecido humano para pesquisa foi realizado através do consentimento informado a
70 aprovado pelo comitê de ética do hospital de clínicas de Porto Alegre (HCPA). Um estudo
71 prospectivo, caso-controlado foi realizado comparando a expressão da integrina $\alpha\beta 3$ em
72 usuárias de DIUT200 de cobre (casos), de um posto de saúde de atendimento secundário, com
73 mulheres comprovadamente férteis que foram submetidas a histerectomia por condições
74 benignas ou à esterilização cirúrgica. Os casos foram convidados a participar através de
75 cartas. Os critérios de inclusão foram a presença de ciclos menstruais regulares, idade ≥ 18 e \leq
76 40 anos de idade, ser usuária do DIUT200 há mais de 1 ano, não estar usando hormônios nos
77 últimos 3 meses, parceiro fixo, fertilidade comprovada (paridade ≥ 1), negatividade de exames
78 para doenças sexualmente transmissíveis (gonorréia e clamídia), sem história prévia de
79 doença inflamatória pélvica ou endometriose, citopatológico de colo uterino recente e normal
80 e biópsia endometrial “em fase” (dissincronia ≤ 2 dias) baseado no momento da ovulação.
81 Todas as mulheres que não preenchessem esses critérios seriam excluídas.

82 ***Avaliação histológica***

83 Todas as biópsias foram obtidas durante a fase média, entre os dias 6 ~10 pós-ovulação (LH
84 +6 ~ +10) com uma cureta plástica flexível (Z-Sampler, BEI Medical Instruments, San
85 Francisco, CA) de acordo com a onda do hormônio luteinizante na urina (LH kit, Expomed
86 Inc. San Antonio, CA). As amostras endometriais foram divididas em duas partes : uma para a
87 histologia e outra para a imunoistoquímica. A datação endometrial foi realizada de acordo
88 com o s critérios de Noyes *et al* (Noyes *et al.*, 1950). A colocação por imunoperoxidase foi
89 realizada utilizando o anticorpo monoclonal de camundongo anti-humano para a subunidade
90 $\beta 3$, SSA6 (gentilmente cedido pelo Prof. B.A. Lessey), o qual se correlaciona com a

91 expressão da integrina $\alpha\beta 3$ no endométrio humano(Lessey *et al.*, 1996a). Cortes
92 criopreservados com 8 μm de espessura foram colocados sobre lâminas tratadas com poli-L-
93 lisine, fixadas em acetona a -20°C por 10 min. Após lavagem com solução salina tamponada
94 de fosfato (PBS) com pH 7,2-7,4, a peroxidase endógena foi quebrada com a incubação por
95 30 min com 0,3% H_2O_2 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) em metanol absoluto
96 (Mallinckrodt, Paris, KY, USA). As lâminas foram incubadas com 0,3% Triton X-100
97 (Sigma) diluído em PBS por 10 min depois de terem sido lavadas por 2 x 5 min com PBS.
98 Após nova lavagem com PBS, os locais inespecíficos foram bloqueados com albumina eqüina
99 a 2% (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) por 30 min. A diluição do anticorpo
100 primário foi de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ em soro eqüino a 1% (Vector) e foi incubado durante a noite à $+4^{\circ}\text{C}$.
101 Após lavagem com PBS por 3 min, o anticorpo secundário biotinizado que consistia de cavalo
102 anti-camundongo (Vector) foi incubado por 30 min em temperatura ambiente. O complexo
103 macromolecular biotinizado avidina- peroxidase horseadish (ABC-Vector) foi então incubado
104 nas lâminas por 30 min. O diaminobenzidina foi usado como cromógeno (DAB; Sigma) por 3
105 min para completar a reação. As amostras foram contra-coradas com hematoxilina e
106 montadas. O resultado final da colocação foi realizado sob microscopia óptica Nikon em
107 aumentos de 100x e 400x por dois pesquisadores independentes de forma cega, usando o
108 escore histológico(HSCORE) como descrito previamente (Lessey *et al.*, 1994b), tendo por
109 limite entre colocação positiva e negativa o escore de 0,7 (Lessey *et al.*, 1994b). O uso do
110 HSCORE tem sido utilizado clinicamente com uma baixa variação inter e intra-observador
111 (Budwit-Nowotny *et al.*, 1986).

112 *Análise estatística*

113 A comparação das médias do HSCORE de ambos os grupos foi realizada usando o Teste-*t* de
114 Student. O teste exato de Fisher foi utilizado para comparar os dados dicotômicos
115 (DIU/controles x integrina positiva/negativa).

116 A análise estatística foi realizada utilizando o software Excel 7.0 (Microsoft Corporation,
117 Redmond, WA, USA) e EPI Info 5.01b (Centre for Disease Control, Atlanta, GA, USA)

118 **Resultados**

119 Cento e cinquenta e duas pacientes usuárias do DIUT200 de cobre registradas no centro
120 secundário de saúde foram convidadas por carta para participar do estudo. Vinte e quatro
121 pacientes compareceram à primeira consulta e aceitaram participar. Dessas 24 pacientes, 7
122 (29,16%) desistiram ou mudaram de endereço e o seguimento não foi possível. Três (12,5%)
123 foram excluídas por não preencherem os critérios de inclusão. Quatorze biópsias
124 endometriais foram obtidas das pacientes restantes. Uma biópsia de uma usuária do DIU
125 estava fora de fase e foi excluída. Os controles foram obtidos de pacientes submetidas a
126 histerectomia por condições benignas ou à esterilização cirúrgica num centro de saúde
127 terciário. Nenhuma diferença foi observada entre os dois grupos quando a paridade, idade e
128 dia da biópsia foram comparados (Tabela 1). Nenhuma complicação ou deslocamento do
129 dispositivo intra-uterino foi observado no grupo das usuárias de DIU. A expressão da
130 integrina $\alpha\beta3$ nos dias LH+6~+10 do ciclo menstrual foi substancialmente mais baixa
131 (Teste-*t* de Student ; $P=0.001$) nas usuárias de DIU (HSCORE= $0,96 \pm 0,7$; média \pm DP)
132 quando comparada com os controles (HSCORE= $2,13 \pm 0,7$; média \pm DP) como demonstrado
133 na Figura 1 e Gráfico 1. Todos os controles foram positivos para $\alpha\beta3$ (100%), enquanto que
134 8/13 (61,5%) das usuárias de DIU tiveram uma expressão positiva quando o HSCORE de 0,7
135 foi considerado como ponto limite entre positivo e negativo. Cinco entre 13 (38,5%) tiveram
136 uma expressão negativa da $\alpha\beta3$ nas usuárias de DIU. Esses resultados foram diferentes
137 significativamente entre os dois grupos (Teste exato de Fisher; $P=0.03$) como demonstrado na
138 Tabela 2. Todas as amostras foram coradas adequadamente não apresentando *background*.

139 **Discussão**

140 Acredita-se que os dispositivos intra-uterinos atuem em parte através da interferência da
141 receptividade uterina. Infelizmente, existem poucos estudos que demonstrem isso com
142 certeza. A integrina $\alpha\beta3$ tem sido reconhecida, cada vez mais, como um marcador da
143 receptividade uterina (Ilesanmi *et al.*, 1993; Lessey *et al.*, 1995; Tabibzadeh, 1997). A falta de
144 estudos sobre a expressão da integrina $\alpha\beta3$ na presença do DIU de cobre nos levou a
145 conduzir o presente estudo. Os dois grupos foram comparados quanto a todas as variáveis
146 relevantes, exceto à presença do DIU de cobre. A imunistoquímica foi realizada em
147 amostras criopreservadas para evitar artefatos. A comparação das amostras criopreservadas
148 das usuárias do DIU com os controles demonstrou que os níveis de $\alpha\beta3$ estão
149 significativamente mais baixos no endométrio das usuárias do DIU de cobre. A $\alpha\beta3$ pode
150 estar diminuída por duas razões. Primeiro, por um atraso histológico (defeito Tipo I) (Lessey,
151 1997) e segundo, a $\alpha\beta3$ pode estar ausente durante a janela de implantação sem a presença
152 de um atraso histológico (defeito Tipo II) (Lessey, 1997). O defeito tipo II tem sido notado
153 em mulheres com hidrossalpinge (Meyer *et al.*, 1997) e endometriose (Lessey *et al.*, 1994b).
154 Portanto, a expressão aberrante da $\alpha\beta3$ na presença do DIU de cobre é um defeito tipo II.

155 As explicações possíveis para nossos achados podem estar relacionadas com fatores
156 mecânicos, parácrinos ou ambos. A separação das camadas endometriais pelo DIU pode
157 inibir algum cofator, o qual pode estar relacionado com a expressão da integrina.

158 A resposta inflamatória local causada pelo DIU é intensificada pela presença do cobre
159 (Newton and Tacchi, 1990). Consequentemente, existe uma mudança dos linfócitos normais
160 para um aumento dos neutrófilos, monócitos e plasmócitos no endométrio, os quais ao estão
161 relacionados com o infiltrado inflamatório que ocorre normalmente na pré-menstruação

162 (Johannisson E, 1998). Essas células podem secretar algum co-fator, como o fator de
163 crescimento de fibroblasto básico (bFGF) o qual está relacionado com a diminuição da
164 integrina $\alpha v \beta 3$ (Klein *et al.*, 1993).

165 O DIU de cobre libera sais de cobre e o cobre livre, o quais possuem um impacto bioquímico
166 e morfológico no endométrio (Vessey *et al.*, 1979). Com respeito às integrinas, o EDTA, um
167 quelante de cálcio, previne a ligação das subunidades $\alpha 1$ e $\alpha 6$ na matriz extra-celular
168 (Grosskinsky *et al.*, 1996). Uma possível explicação é que os íons de cobre possam modular a
169 expressão da integrina.

170 A falha do *down-regulation* dos receptores de progesterona (PR) está relacionada com a
171 expressão aberrante da $\alpha v \beta 3$ (Lessey *et al.*, 1996b). Foi demonstrado que os PR ainda estão
172 presentes a partir do 25º dia em diante do ciclo menstrual na presença do DIUT200 (de Castro
173 *et al.*, 1986). Logo, é razoável especular numa expressão prolongada e aberrante dos PR, os
174 quais podem influenciar nos baixos níveis da $\alpha v \beta 3$.

175 Apesar das fortes evidências favorecendo a inibição da $\alpha v \beta 3$ na presença do DIU de cobre,
176 existem algumas limitações que devem ser abordadas. Poderia-se questionar que os baixos
177 níveis de $\alpha v \beta 3$ nas usuárias do DIU possa ser devido a outros fatores, como a presença de
178 endometriose ou hidrossalpinge. Existe uma pequena possibilidade de que as usuárias do DIU
179 devam Ter hidrossalpinge e/ou endometriose. Entretanto, a laparoscopia seria a única escolha
180 para descartar essas condições simultaneamente, e, o fazer isso, implicaria em questões
181 éticas. Tentamos superar esse problema realizando um projeto piloto do tipo *antes-e-depois*
182 em mulheres que haviam sido cirurgicamente esterilizadas, mas houve uma grande rejeição
183 por parte das mesmas em participar do estudo. Por isso, optamos por esse delineamento.

184 A diminuição da expressão da integrina $\alpha v\beta 3$ no endométrio de usuárias do DIU de cobre foi
185 demonstrada. A expressão foi negativa em 38,5% das usuárias do DIU. Esse achado adiciona
186 novos dados para a teoria de que o DIU de cobre também tem uma mecanismo de ação sobre
187 o local da implantação. A expressão da $\alpha v\beta 3$ por si só não explica o mecanismo de ação do
188 DIU de cobre, uma vez que 61,5% delas tinham uma expressão positiva. Esse resultado não
189 explica os quase 100% de eficácia do DIU de cobre como método anticoncepcional (Rowe,
190 1992). Portanto, devemos apreciar com maior cuidado a possibilidade de que o mecanismo de
191 ação do DIU de cobre está relacionado com mais de um local de ação, tendo a inibição da
192 implantação como um fator importante. Deve se lembrado que esses resultados não devem ser
193 extrapolados para outros tipos de DIU ou com quantidades diferentes de cobre. O artigo
194 publicado por de Castro *et al.* (de Castro *et al.*, 1986) demonstrou que as alterações
195 histológicas e celulares no endométrio ocorrem de acordo com a quantidade de cobre nos
196 DIUs. Portanto, o mecanismo específico envolvido na expressão reduzida da $\alpha v\beta 3$, se é
197 devido aos íons de cobre, ou aos fatores parácrinos ou mecânicos é uma questão que aguarda
198 outras pesquisas.

199 **Agradecimentos**

200 Os autores gostariam de agradecer o Prof. Bruce Lessey (Departamento de Obstetricia e
201 Ginecologia da Universidade da Carolina do Norte, NC, EUA), Prof. Marc Bygdeman, Dr.
202 Lena Marions por seus auxílios laboratoriais. Esse trabalho foi financiado em parte pelo
203 Conselho Nacional de Pesquisa - CNPq processo 142161/97-7.

204 **Referências**

- 205 Alvarez, F., Brache, V., Fernandez, E., *et al.* (1988) New insights on the mode of action of
206 intrauterine contraceptive devices in women. *Fertil Steril* **49**, 768-773.
- 207 Béliard, A., Donnez, J., Nisolle, M., Foidart, J.M. (1997) Localization of laminin, fibronectin,
208 E-cadherin, and integrins in endometrium and endometriosis. *Fertil Steril* **67**, 266-72-272.
- 209 Budwit-Nowotny, D.A., McCarty, K.S., Cox, E.B., *et al.* (1986) Immunohistochemical
210 analyses of estrogen receptor in endometrial adenocarcinoma using a monoclonal antibody.
211 *Cancer Res* **46**, 5419-5425.
- 212 de Castro, A., Gancedo, G.P., Contreras, F., *et al.* (1986) The effect of copper ions in vivo on
213 specific hormonal endometrial receptors. *Adv Contracept* **2**, 399-404.
- 214 el-Sahwi, S., Moyer, D.L. (1971) The leukocytic response to an intrauterine foreign body in
215 the rabbit. *Fertil Steril* **22**, 398-408.
- 216 Grosskinsky, C.M., Yowell, C.W., Sun, J., *et al.* (1996) Modulation of Integrin Expression in
217 Endometrial Stromal Cells In Vitro. *J Clin Endocrinol Metab* **81**, 2047-2054.
- 218 Hertig, A.T., Rock, J., Adams, E.C. (1956) A description of 34 human ova within the first 17
219 days of developmet. *Am J Anat* **98**, 435-493.
- 220 Hii, L.L., Rogers, P.A. (1998) Endometrial vascular and glandular expression of integrin
221 alpha(v)beta3 in women with and without endometriosis. *Hum Reprod* **13**, 1030-1035.
- 222 Ilesanmi, A.O., Hawkins, D.A., Lessey, B.A. (1993) Immunohistochemical Markers of

- 223 Uterine Receptivity in the Human Endometrium. *Microsc Res Tech* **25**, 208-222.
- 224 Johannisson E (1998) Mechanism of action of intrauterine devices: biochemical changes.
225 *Contraception* **36**, 11-22.
- 226 Klein, S., Giancotti, F.G., Presta, M., *et al.* (1993) Basic Fibroblast growth factor modulates
227 integrin expression in microvascular endothelial cells. *Mol Biol Cell* **4**, 973-982.
- 228 Lessey, B.A. (1994) The use of integrins for the assessment of uterine receptivity. *Fertil*
229 *Steril* **61**, 812-814.
- 230 Lessey, B.A. (1997) Integrins and the Endometrium: New Markers of Uterine Receptivity. *Ann*
231 *N Y Acad Sci* **828**, 111-122.
- 232 Lessey, B.A., Castelbaum, A., Buck, C.A., *et al.* (1994a) Further characterization of
233 endometrial integrins during the menstrual cycle and in pregnancy. *Fertil Steril* **62**, 497-
234 506.
- 235 Lessey, B.A., Castelbaum, A., Sawin, S.W., *et al.* (1995) Integrins as markers of uterine
236 receptivity in women with primary unexplained infertility. *Fertil Steril* **63**, 535-542.
- 237 Lessey, B.A., Castelbaum, A.J., Sawin, S.W., *et al.* (1994b) Aberrant Integrin Expression in
238 the Endometrium of Women with Endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* **79**, 643-649.
- 239 Lessey, B.A., Damjanovich, L., Coutifaris, C., *et al.* (1992) Integrins Adhesion Molecules in
240 the Human Endometrium - Correlation with the Normal and Abnormal Menstrual Cycle. *J*
241 *Clin Invest* **90**, 188-195.
- 242 Lessey, B.A., Ilesanmi, A.O., Lessey, M.A., *et al.* (1996a) Luminal and Glandular
243 Endometrial Epithelium Express Integrins Differentially Throughout the Menstrual Cycle:
244 Implications for Implantation, Contraception, and Infertility. *Am J Reprod Immunol* **35**,
245 195-204.
- 246 Lessey, B.A., Yeh, I., Castelbaum, A.J., *et al.* (1996b) Endometrial progesterone receptors
247 and markers of uterine receptivity in the window of implantation. *Fertil Steril* **65**, 477-483.

- 248 Meyer, W.R., Castelbaum, A.J., Somkuti, S., *et al.* (1997) Hydrosalpinges adversely affect
249 markers of endometrial receptivity. *Hum Reprod* **12**, 1393-1398.
- 250 Newton, J., Tacchi, D. (1990) Long-term use of copper intrauterine devices. *Lancet* **335**,
251 1322-1323.
- 252 Noyes, R.W., Hertig, A.T., Rock, J. (1950) Dating the endometrial biopsy. *Fertil Steril* **1**, 3-
253 25.
- 254 Ortiz, M.E., Croxatto, H.B. (1987) The mode of action of IUDs. *Contraception* **36**, 37-53.
- 255 Ortiz, M.E., Croxatto, H.B., Hardin, C.W. (1996) Mechanisms of Action of Intrauterine
256 Device. *Obstet Gynecol Surv* **51**, S42-S51
- 257 Ortiz, M.E., Valenzuela, J.P., Salvatierra, A.M., *et al.* (1998) The expression of alpha(v) and
258 beta3 integrin subunits in the normal human Fallopian tube epithelium suggests the
259 occurrence of a tubal implantation window. *Hum Reprod* **13**, 2916-2920.
- 260 Rowe, P.J. (1992) Anticoncepcion intrauterina: adelantos y perspectivas. In: *Salud*
261 *Reproductiva en las Américas*, 256-295. Edited by López, G., Yunes, J., Solís, J.A., and
262 Omran, A.R., Washington, D.C., Organización Panamericana de la Salud.
- 263 Ruoslahti, E., Noble, N.A., Kagami, S., *et al.* (1994) Integrins. *Kidney Int* **45**, S-17-S-22
- 264 Spinnato, J.A. (1997) Mechanism of action of intrauterine contraceptive devices and its
265 relation to informed consent. *Am J Obstet Gynecol* **176**, 503-506.
- 266 Tabibzadeh, S. (1992) Patterns of expression of integrin molecules in human endometrium
267 throughout the menstrual cycle. *Hum Reprod* **7**, 876-882.
- 268 Tabibzadeh, S. (1997) Implantation: From Basics to the Clinic. *Ann NY Acad Sci* **828**, 131-
269 136.
- 270 Tredway, D.R., Umezaki, C.U., Mishell, D.R.J., *et al.* (1975) Effect of intrauterine devices on
271 sperm transportation in the human being: preliminary report. *Am J Obstet Gynecol* **123**,
272 734-735.

273 Vessey, M., Meisler, L., Flavel, R., *et al.* (1979) Outcome of pregnancy in women using
 274 different methods of contraception. *Br J Obstet Gynaecol* **86**, 548-556.

275 **Tabela 1** Caracterização da amostra

	Controles (n=13) Média ± DP	DIUs (n= 13) Média ± DP	valor de P *
Idade (anos)	27.9 ± 5.18	30.1 ± 3.18	0.2 NS
Paridade	2.5 ± 0.77	3.2 ± 1.64	0.18 NS
Dia da biópsia	23.3 ± 0.58	22.6 ± 1.58	0.13 NS

276 *NS: não-significativo

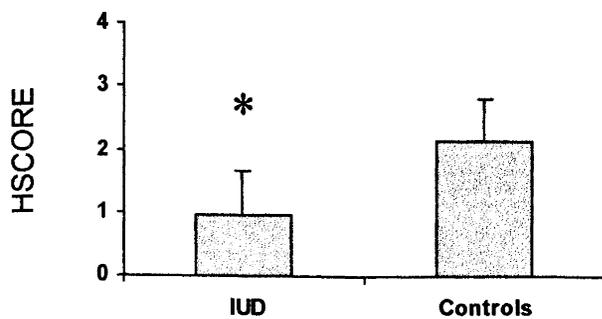
277

278 **Tabela 2** Resultados individuais da colocação por imunoperoxidase (HSCORE) entre
 279 controles e usuárias di dispositivo intra-uterino de cobre (DIU).

Paciente #	HSCORE CONTROLE	HSCORE DIU
1	3.7	2.13
2	3.5	2.03
3	2.7	1.93
4	2.6	1.83
5	2.4	1.53
6	2.3	1.33
7	2	0.83
8	2	0.83
9	1.5	0.03
10	1.5	0.03
11	1.2	0.03
12	1.2	0.03
13	1.2	0.03
Positivo/Total*	13/13	8/13

280 * $p = 0.03$ (Teste exato de Fisher)

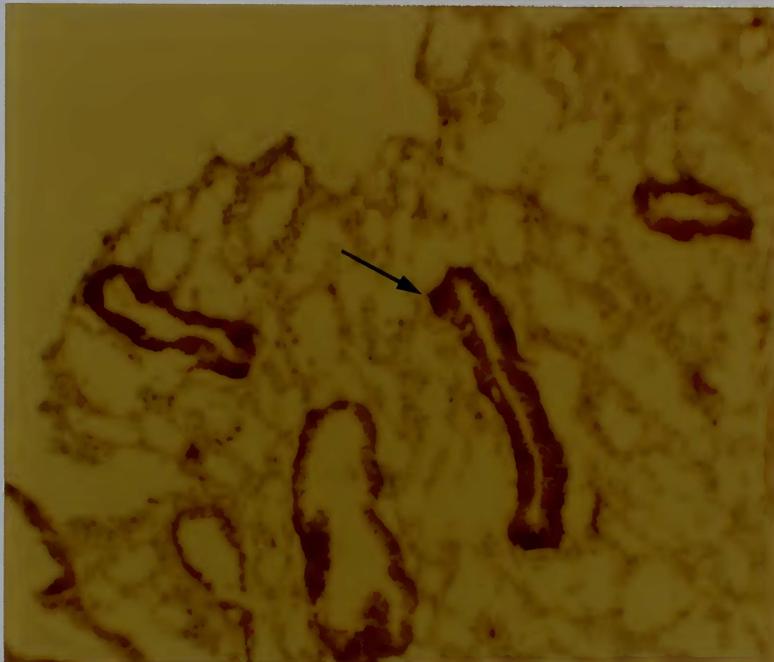
281 **Gráfico 1** Expressão da subunidade $\beta 3$ no endométrio de usuárias do DIU T200 de cobre e
282 nos controles.



* $p = 0.001$

283 **Figura 1** Localização por imunohistoquímica da subunidade $\beta 3$ no endométrio dos controles e
284 das usuárias do DIUT200 de cobre (A) Colocação típica de uma glândula endometrial para
285 anticorpo de camundongo anti-humano para a subunidade $\beta 3$ no endométrio (seta fina) no 8°
286 dia pós-ovulatório do controle. (B) Um exemplo de não-coloração para $\beta 3$ (asterisco) na
287 glândula endometrial de uma usuária do DIU de cobre no 7° dia pós-ovulatório do ciclo
288 menstrual. Observe a presença da $\beta 3$ no endotélio como controle interno positivo (seta curta).
289 (Magnificação original de X100).

290 **A**



298 **B**

