SANDRO GARCIA HILÁRIO

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA RELACIONADA À RECEPTIVIDADE ENDOMETRIAL EM PACIENTES SUBMETIDAS À EMBOLIZAÇÃO DO MIOMA UTERINO

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa de Obstetrícia e Ginecologia
Orientador: Prof. Dr. Nilo Bozzini

SÃO PAULO

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Hilário, Sandro Garcia

Avaliação da expressão gênica relacionada à receptividade endometrial em pacientes submetidas à embolização do mioma uterino / Sandro Garcia Hilário. -- São Paulo, 2012.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Obstetrícia e Ginecologia.

Orientador: Nilo Bozzini

Descritores: 1.Leiomioma 2.Embolização da artéria uterina 3.Expressão gênica 4.Endométrio 5.Implantação do embrião 6.Reação em cadeia da polimerase

USP/FM/DBD-072/12

DEDICO ESTE TRABALHO

Aos meus ***pais***, por terem construído um alicerce sólido para minha vida através de muito amor, dedicação e bons exemplos.

À minha esposa ***Fabiana***, pela incondicional colaboração e compreensão, frutos do nosso amor eterno.

Aos meus filhos ***André*** e ***Bruno***, a quem tanto amo e tento passar os mesmos bons exemplos.

AGRADECIMENTOS

Às ***pacientes*** que contribuíram e contribuem diariamente para o meu aprendizado médico, e principalmente àquelas que participaram diretamente deste trabalho.

Ao Prof. ***Edmund Chada Baracat***, pela oportunidade de executar esse trabalho e por toda sua boa vontade em contribuir sempre.

Ao Prof. Dr. ***Nilo Bozzini***, antes de tudo meu amigo, que me vem orientando não só nesta tese, mas ao longo de toda minha vida profissional e acadêmica.

Ao Dr. ***Marcos de Lorenzo Messina***, pelo empenho e dedicação na execução desta tese, um exemplo que tenho dentro da profissão.

Ao Dr. ***Rodrigo Borsari***, meu amigo desde o primeiro dia da Faculdade de Medicina, que me encoraja e me acompanha nos momentos difíceis.

À Dra. ***Kátia Cândido Carvalho***, por toda sua dedicação e paciência em me ensinar tudo que consegui aprender sobre o dia-a-dia do laboratório de biologia molecular.

Ao Dr. ***Gustavo Arantes Rosa Maciel***, por sua colaboração desde a execução do projeto de pesquisa até a conclusão do trabalho.

Aos amigos do LIM-58, ***Marinalva de Almeida, Thiago Hideki, Rodrigo Marcondes, Natalia Garcia, Fernanda Condi, Vinicius Cestari, Luiz Fernando Portugal, Daniele Coelho*** que me apoiaram e ajudaram no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do Hospital Israelita Albert Einstein, Dr. ***Felipe Nasser***, médico radiologista intervencionista, Dr. ***Breno Boueri Affonso***, médico radiologista intervencionista, Dr. ***Ronaldo Hueb Baroni***, médico radiologista, Dr. ***Eduardo Zlotnik***, médico responsável pelo Instituto de Responsabilidade Social do HIAE e Sra. ***Aretha Bley Pestana***, assitente social, que contribuíram de forma essencial para a concretização deste estudo.

Ao Prof. Dr. ***Bernardo Eisenberg***, que me incentivou a retomar os trabalhos acadêmicos.

À Sra. ***Claudia Vieira***, por sua orientação em todo o processo de pós-graduação na FMUSP, desde a matrícula até a execução da versão final da tese.

A Sra. ***Célia Conceição Morais***, Sra. ***Mara Núbia***, Sra. ***Sônia Regina Rodrigues***, Sr. ***Moacir Lopes*** e Sr. ***Leslie Santos***, por seus tão valiosos préstimos diários.

Aos ***residentes*** de ginecologia, que ajudaram no atendimento às pacientes do protocolo de pesquisa.

A todas ***colaboradoras*** do ambulatório de ginecologia, por sua contribuição diária no atendimento às pacientes.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver);Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e Siglas
Lista de Tabelas
Lista de Gráficos
Resumo
Summary
1 Introdução..... 1
1.1 Embolização do Mioma Uterino..... 4
1.2 Receptividade Hormonal..... 9
1.2.1 Fator Inibidor de Leucemia (Leukemia Inihibitor Factor – LIF)..... 9
1.2.2 Interleucina -11 (IL-11)..... 12
1.2.3 Interleucina -6 (IL-6)..... 15
1.2.4 Claudina -4..... 17
1.2.5 Genes Hox..... 18
2 Objetivos
2.1 Geral..... 21
2.2 Específico..... 21
3 Casuística
3.1 Casuística..... 22
3.1.1Pacientes..... 22
3.1.2 Critérios de Inclusão..... 29
3.1.3 Critérios de Exclusão..... 29
3.2 Métodos..... 30
3.2.1 Processamento de amostras..... 31
3.2.2 Extração de RNA..... 32
3.2.3 Síntese de cDNA e reações de PCR quantitativo em tempo real (QRT-PCR)..... 34
3.2.4 Análise estatística..... 35
4 Resultados
4.1 Expressão relativa dos genes estudados..... 37
4.2 Avaliação do escore dos sintomas..... 39
4.3 Avaliação da expressão dos genes estudados..... 40
5 Discussão..... 46
6 Conclusões..... 52
7 Anexos..... 53
8 Referências..... 59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IMC	Índice de Massa Corpórea
EMU	Embolização do Mioma Uterino
cm	Centímetro
PVA	Acetato de Polivinila
LIF	Fator Inibidor de Leucemia
kDa	Quilo Dalton
IL	Interleucina
JAC/STAT	Janus Kinase/ Sinal Transdutor e Ativador de Transcrição
mRNA	Ácido Ribonucléico Mensageiro
TGF	Fator de Crescimento Transformante
LIF-R	Receptor do Fator Inibidor de Leucemia
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
IL 11-Rα	Receptor Alfa para Interleucina 11
STAT	Sinal Transdutor e Ativador de Transcrição
RNA	Ácido Ribonucléico
IL6-R	Receptor de Interleucina 6
LH	Hormônio Luteinizante
RE	Receptor de Estrogênio
RP	Receptor de Progesterona
FIV	Fertilização *in vitro*
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
cc	centímetro cúbico
mL	Mililitro
°C	grau Célsius
rpm	rotações por minuto
µL	Microlitro
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
QRT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementar
min	Minuto
GAPDH	gliceraldeído fosfato desidrogenase
TBP	proteína tata Box
B2M	beta-2-microglobulina
HPRT	transferase hipoxantina-guanina fosforibosil
RQ	expressão relativa
n	Número
dp	desvio padrão

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Características gerais das pacientes..... 24
Tabela 2 Variação do volume uterino..... 25
Tabela 3 Avaliação dos sintomas relacionados ao leiomioma uterino..... 27
Tabela 4 Resultantes da avaliação dos sintomas relacionados ao leiomioma nos momentos pré e pós-embolização. 28
Tabela 5 Taxas de expressão relativa para cada gene estudado nas diversas amostras..... 38
Tabela 6 Valores de média, desvio-padrão, mediana, mínimo e máximo do escore de sintomas nos momentos pré e pós-embolização..... 39
Tabela 7 Valores de média, desvio-padrão, mediana, mínimo e máximo da expressão de LIF nos momentos pré e pós-embolização..... 40
Tabela 8 Valores de média, desvio-padrão, mediana, mínimo e máximo da expressão de IL-11 nos momentos pré e pós-embolização..... 41
Tabela 9 Valores de média, desvio-padrão, mediana, mínimo e máximo da expressão de IL-6 nos momentos pré e pós-embolização..... 42
Tabela 10 Valores de média, desvio-padrão, mediana, mínimo e máximo da expressão de claudina-4 nos momentos pré e pós-embolização..... 43
Tabela 11 Valores de média, desvio-padrão, mediana, mínimo e máximo da expressão de HoxA-10 nos momentos pré e pós-embolização..... 43
Tabela 12 Valores de média, desvio-padrão, mediana, mínimo e máximo da expressão de HoxA-11 nos momentos pré e pós-embolização..... 44
Tabela 13 Valores de média, desvio-padrão, mediana, mínimo e máximo da expressão do receptor de estrogênio nos momentos pré e pós-embolização..... 45
Tabela 14 Valores de média, desvio-padrão, mediana, mínimo e máximo da expressão do receptor de progesterona nos momentos pré e pós-embolização..... 45

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Expressão de LIF nos momentos pré e pós-embolização..... 41
Gráfico 2 Expressão de IL-11 nos momentos pré e pós-embolização..... 42
Gráfico 3 Expressão de HoxA-11 nos momentos pré e pós-embolização..... 44

RESUMO

Hilário SG. *Avaliação da expressão gênica relaciona à receptividade endometrial em pacientes submetidas à embolização do mioma uterino* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

OBJETIVO: Avaliar a receptividade endometrial de pacientes submetidas à embolização do mioma uterino, analisando a expressão gênica de LIF, IL-11, IL-6, claudina-4, HoxA-10, HoxA-11, receptor de estrogênio e receptor de progesterona antes e após este procedimento. CASUÍSTICA E MÉTODOS: Foram colhidas biópsias aspirativas de endométrio de 30 pacientes previamente à embolização do mioma uterino e repetida a coleta 3 a 4 meses após este procedimento. A média etária do grupo estudado foi de 36,2 anos. O volume uterino médio pré-embolização foi de 662,1 cc e o pós-embolização foi de 338,2 cc, medidos através de ressonância nuclear magnética. INTERVENÇÃO: As amostras de endométrio foram analisadas pela técnica de RT-PCR para os genes LIF, IL-11, IL-6, claudina-4, HoxA-10, HoxA-11, receptor de estrogênio e receptor de progesterona. RESULTADOS: Dentre os genes estudados, LIF (p=0,005), IL-11 (p=0,001) e HoxA-11 (p=0,021) apresentaram redução estatisticamente significante da expressão no endométrio após a embolização. Os demais genes não apresentaram alteração da expressão estatisticamente significante. CONCLUSÃO: Houve alteração da expressão de genes relacionados à receptividade endometrial, no endométrio de pacientes tratadas pela técnica da embolização do mioma uterino.

Descritores: Leiomioma, embolização da artéria uterina, expressão gênica, endométrio, implantação do embrião, reação em cadeia da polimerase.

SUMMARY

Hilario SG. Evaluation of gene expression related to endometrial receptivity in patients undergoing uterine leiomyoma embolization [thesis]. Sao Paulo: Faculty of Medicine, University of Sao Paulo, 2012.

OBJECTIVE: Assessing endometrial receptivity in patients undergoing uterine fibroid embolization by analyzing the gene expression of LIF, IL-11, IL-6, claudin-4, Hoxa-10, Hoxa-11, estrogen receptor and progesterone receptor before and after this procedure. METHODS: Endometrial aspiration biopsies were collected from 30 patients prior to embolization of uterine myoma, and the collections were repeated 3 to 4 months after this procedure. The average age of the study group was 36.2 years old. The mean uterine volume pre-embolization was 662. 1 cc and post-embolization was 338.2cc as measured by Magnectic Resonance Imaging (MRI). INTERVENTION: Endometrial samples were analyzed by RT-PCR for genes LIF, IL-11, IL-6, claudin-4, Hoxa-10, Hoxa-11, estrogen receptor and progesterone receptor. RESULTS: Among the studied genes, LIF (p=0.005), IL-11 (p=0.001) and Hoxa-11 (p=0.021) showed statistically significant reduction of expression in the endometrium after embolization. The remaining genes showed no statistically significant change in expression. CONCLUSION: There was altered expression of genes related to endometrial receptivity in the endometrium of patients treated by the technique of embolization of uterine myoma.

Descriptors: Leiomyoma, uterine artery embolization, gene expression, endometrium, embryo implantation, polymerase chain reaction.

1 INTRODUÇÃO

O leiomioma do útero é o tumor pélvico sólido mais frequente nas mulheres. Pode se apresentar nas diferentes porções do útero e em variadas posições em relação ao miométrio. Quando se considera nódulos de até dois milímetros em peças de histerectomia, sua incidência chega a até 77%. Em achados de ultrassom, varia de 30 a 80 %, dependendo da idade da paciente. Por ser, na maioria dos casos, assintomático têm sua prevalência incerta (PARKER, 2007).

Aproximadamente seiscentas mil histerectomias são realizadas anualmente nos Estados Unidos (EUA), e destas 40,7% são realizadas por leiomiomas. Além das histerectomias, cerca de vinte mil miomectomias são indicadas naquele país em virtude dos sintomas causados por essa doença (ACOG, 2009). No Brasil, foram realizadas cerca de 107.000 histerectomias pelo Sistema Único de Saúde em 2005, sendo que destas a grande maioria por leiomioma (DATASUS).

Entre os fatores de risco, destacam-se a raça negra (razão de chance de 9,4 em relação às brancas), menarca precoce (antes dos 11 anos tem razão de chance de 2,4 em relação à menarca após os 13 anos), história familiar (antecedente de leiomioma em parentes de primeiro grau aumenta o risco da doença em 4 a 5 vezes) e o índice de massa corpórea elevado

(obesas com IMC> 30 kg/m2 possuem razão de chance de 2,3 em relação àquelas com IMC< 25 kg/m2).

Como fatores protetores, citam-se o uso habitual de anticoncepcionais orais (razão de chance de 0,2), paridade (multíparas apresentam risco menor em relação às nuligestas), idade da primeira gestação (entre 25 e 29 anos de idade confere proteção quando comparada a gestação abaixo dos 25 anos e acima dos 30 anos) e tabagismo com mais de 19 anos de duração (razão de chance de 0,6) (SCHWARTZ, 2001; PARKER, 2007).

Manifesta-se clinicamente de diversas formas, a depender do tamanho e da posição dos tumores no útero. Os sintomas mais comuns são: sangramento uterino excessivo, dismenorréia, dispareunia, dor pélvica crônica, compressão de vísceras adjacentes (bexiga e intestino), aumento do volume abdominal, infertilidade e abortamento de repetição.

O sangramento uterino excessivo (hipermenorragia), com freqüência causa anemia; a dispareunia e a dor pélvica crônica prejudicam sobremaneira a qualidade de vida da paciente. O aumento do volume abdominal, geralmente observado nos casos de leiomiomas subserosos, traz desconforto estético, além de propiciar alteração no ritmo intestinal e urinário, devido à compressão exercida nos órgãos circunvizinhos. Os casos que cursam com infertilidade ou abortamento de repetição estão via de regra, relacionados a nódulos que se apresentam distorcendo a cavidade endometrial ou obstruindo o óstio tubário (HANEY, 2000).

O diagnóstico do leiomioma do útero, na maioria dos casos, pode ser feito pela anamnese, exame físico geral e ginecológico. Porém a confirmação diagnóstica, bem como a localização e definição das características dos nódulos, necessita de exames de imagem complementares.

A ultrassonografia pélvica, devido à sua precisão na identificação dos tumores, facilidade de execução e baixo custo operacional, é o exame mais utilizado. Outros métodos, como a ressonância nuclear magnética, a histerossonografia e a histerossalpingografia, podem ser usados como complementares à ultrassonografia (DUEHOLM et al., 2002). A ressonância nuclear magnética de pelve tem mostrado maior acurácia que o ultrassom quando se faz necessário individualizar e caracterizar os nódulos miometriais, principalmente na avaliação que precede a tratamentos conservadores do útero (RAJAN et al.,2011).

O objetivo do tratamento do leiomioma é o controle dos sintomas e/ou retorno à capacidade reprodutiva, quando assim desejada. Dessa forma, a escolha do melhor tipo de tratamento deve ser individualizada (STEWART, 2001).

O tratamento clínico tem como finalidade o controle dos sintomas, evitando ou postergando possível intervenção cirúrgica. Pode ser feito com o uso de anti-inflamatórios não hormonais, antifibrinolíticos, progestagênios ou anticoncepcionais hormonais. Outro papel do tratamento clínico pode ser a neoadjuvância, buscando a redução do volume dos nódulos de leiomioma e

a melhora das condições clínicas da paciente para posterior cirurgia. Nesse sentido, destaca-se o emprego dos análogos agonistas do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) (BOZZINI et al., 2003).

O tratamento cirúrgico, por sua vez, pode ser conservador ou radical. O tratamento conservador é realizado pela miomectomia convencional laparotômica, ou ainda através da videolaparoscopia ou histeroscopia. A terapêutica radical, ou seja, a histerectomia pode ser efetuada por laparotomia, videolaparoscopia, ou por via vaginal (DAVIDS,1952; ALELEZ,1995; VERCELLINI et al., 1998).

1.1 Embolização do Mioma Uterino

A embolização do mioma uterino (EMU) surge como uma efetiva alternativa no tratamento do leiomioma do útero. Trata-se de um tratamento multidisciplinar, cujo diagnóstico e indicação são feitos pelo ginecologista e o processo de embolização pelo radiologista vascular intervencionista.

Com objetivo de reduzir o tamanho dos leiomiomas e possibilitar acesso cirúrgico menos extenso, RAVINA et al. (1995) descrevem inicialmente a EMU como tratamento prévio na cirurgia dos leiomiomas.

A melhora da sintomatologia observada após o procedimento é tão significativa que a EMU é considerada atualmente opção terapêutica no tratamento dos leiomiomas uterinos em mulheres que apresentam contra-inidicação ao tratamento cirúrgico convencional (GOODWIN et al., 1998).

RAVINA et al. (1997) relatam controle da menorragia em 89% das pacientes submetidas à EMU. O volume do útero e do maior leiomioma reduziu em média 55% e 69%, respectivamente, após 6 meses do tratamento.

HUTCHINS et al. (1999), descrevem acompanhamento de 305 pacientes submetidas à EMU pelo período de dois anos. O índice de sucesso terapêutico foi de 96%. O controle da menorragia e dos sintomas compressivos ocorreu em 92% das pacientes. Nesta série, seis pacientes foram submetidas à histerectomia, 2 delas por síndrome pós-embolização refratária a tratamento clínico. Cinco pacientes foram submetidas à miomectomia, 3 por insucesso técnico e duas eletivamente por infertilidade.

RAVINA et al. (1999) apresentam resultados do tratamento de 184 pacientes portadoras de leiomioma uterino durante um período de seis anos (1991 a 1997). A média etária das pacientes foi de 43 anos, e 80% das mesmas tinham 3 ou mais leiomiomas com diâmetro médio de 5,8cm. O insucesso técnico ocorreu em 8 (4,3%) dos casos e perdeu-se seguimento de 19 pacientes. As pacientes remanescentes foram acompanhadas por período médio de 30 meses. Das 157 mulheres, 146 (93%) ficaram assintomáticas e 11 não apresentaram resposta ao tratamento. As complicações foram: expulsão de leiomioma em seis pacientes, piometra em três pacientes, que foram então tratadas com antibióticoterapia. Uma paciente desenvolveu necrose de leiomioma pediculado subseroso, o que resultou em abdome agudo inflamatório e indicação de laparotomia. Verificou-se amenorréia pós-EMU em 5 pacientes com idade de 30, 39, 40,

47 e 48 anos. Diagnóstico de gestação ocorreu em 7 pacientes, 6 evoluíram para gravidez a termo e 1 aborto espontâneo.

MESSINA et al. (2002) descreveram melhora da menorragia e cólica menstrual em 90% das mulheres portadoras de leiomiomatose uterina submetidas à embolização do mioma uterino com partículas de PVA. O volume uterino diminui em média 43,7% após um ano da EMU.

A EMU apresenta vantagem de tratar todos leiomiomas simultaneamente, ser minimamente invasiva, não provocar aderências dos órgãos pélvicos e permitir o retorno precoce ao trabalho (SPIES et al. ,2001).

As partículas de PVA injetadas nas artérias uterinas impactam em vasos que nutrem os nódulos de leiomioma, os quais apresentam maior calibre quando comparados à circulação intrínseca do útero. Plaquetas aderem às partículas e o fluxo arterial diminui. Simultaneamente, ocorre processo de coagulação intravascular. Quando um número suficiente de artérias é ocluído a coagulação se propaga de modo retrógrado até atingir a artéria uterina.

A EMU promove isquemia do leiomioma sem afetar o miométrio. Essa resposta diferenciada pode ser explicada pelo modo de irrigação destas estruturas e pelo diâmetro das partículas de PVA. Este material embolizante tem diâmetro médio de 500 micra, tamanho suficiente para ocluir vasos calibrosos que irrigam os leiomiomas, mas o seu diâmetro excede aquele dos vasos que nutrem o miométrio e por isso não ocorre a sua oclusão. A viabilidade do miométrio também é mantida pela circulação colateral que

apresenta importante contribuição das artérias ovarianas. Dessa maneira é possível promover a isquemia dos leiomiomas e manter viável o miométrio.

Com o desenvolvimento de novas técnicas, utilização de micro cateteres, e principalmente com a utilização de novo material emboligênico, como as embosferas (esferas calibradas de copolímero acrílico- Trisacryl), hidrofílicas, cobertas com gelatina porcina com 700 a 900 micra de diâmetro, a probabilidade de complicações diminui significantemente, obtendo-se melhora dos sintomas de menorragia e cólica menstrual e maior redução do volume dos leiomiomas (KATSUMORI et al.,2002; CHIESA e HART,2004; CHUA et al.,2005).

As tradicionais partículas de PVA apresentam formato irregular, proporcionando embolização não uniforme e mais proximal, enquanto as partículas de Trisacryl têm como característica pouca agregação, embolização mais uniforme e distal, aumentando a seletividade do procedimento (SPIES et al., 2005).

As partículas de Trisacryl são insolúveis em fluidos orgânicos, semi-rígidas quando secas, mas maleáveis quando úmidas, prevenindo deste modo a agregação das partículas no interior do cateter.

A avaliação da cavidade endometrial após a EMU através de histeroscopia fornece dados macroscópicos e até mesmo a oportunidade de coleta de material para análise anatomopatológica, que excluem doença maligna do endométrio, e avalia a resposta do manto endometrial secundário a produção hormonal ovariana principalmente quando realizada na segunda

fase do ciclo menstrual. A gravidez pós-EMU é relatada por diversos autores demonstrando a viabilidade deste tecido endometrial (RAVINA et al., 2001)

Entretanto a atrofia endometrial também é descrita, conferindo deste modo, importância na avaliação do comportamento do endométrio frente à produção hormonal ovariana, viabilizando a ocorrência de futuras gestações (TROPEANO et al., 2003).

Como qualquer outra modalidade de intervenção conservadora, clínica ou cirúrgica, a EMU não prescinde do acompanhamento evolutivo da doença, visando assegurar à paciente que a doença está controlada de modo temporário ou definitivo e, também, que não há surgimento ou agravamento de um processo patológico associado, exigindo a reavaliação da conduta terapêutica (MESSINA, 2004).

Argumentos que resgatam a EMU incluem a natureza conservadora, a característica minimamente invasiva do procedimento e a baixa possibilidade de transformação maligna do leiomioma (TAKAMIZAWA et al., 1999).

A EMU em pacientes com infertilidade ou com desejo futuro de gravidez é tema polêmico. No início indicava-se a embolização em mulheres com prole definida pelo receio das eventuais complicações, como necrose massiça do útero, insuficiência ovariana pós-embolização. Mas com a melhora da técnica e dos agentes embolizantes, esses riscos diminuíram e atualmente, o procedimento pode ser indicado em casos selecionados de mulheres que desejam gravidez. Segundo alguns autores, a taxa de gravidez se assemelha às das pacientes que foram submetidas à

miomectomia. No entanto, a opinião não é unânime, pois se deve considerar a quantidade, volume e localização dos leiomiomas no útero (RAVINA, 1995; Mc LUCAS et al., 2001) .

1.2 Receptividade Endometrial

A preservação da cavidade endometrial, garantindo futuro reprodutivo à paciente submetida à EMU, sempre foi alvo de estudo dos centros que desenvolvem esta técnica como alternativa ao tratamento do leiomioma uterino. Está claro que a implantação do embrião humano requer uma interação coordenada entre o próprio concepto e o útero. Embora, há muito se conheça que os esteróides ovarianos medeiem esse processo, foi apenas nas últimas duas décadas que alguns fatores locais foram identificados. A regulação esteroidal das funções uterinas é mediada fundamentalmente por fatores de crescimento e citocinas, bem como pela expressão de seus receptores.

1.2.1 Fator Inibidor de Leucemia (*Leukemia Inhibitory Factor – LIF*)

O fator inibidor de leucemia (LIF) foi inicialmente reconhecido como sendo capaz de induzir a diferenciação de macrófagos da linhagem de células leucêmicas mielóides M1 (TOMIDA et al.,1984). Porém, atualmente

se sabe que tem atuação relacionada à proliferação, diferenciação e sobrevivência celular em múltiplos sistemas, tais como, imunológico, cardíaco, nervoso e reprodutivo (OZAKI e LEONARD, 2002). É uma citocina altamente glicosilada, com peso molecular entre 40 e 50 kDa.

LIF está expresso em vários tecidos embrionários e adultos (SCHAFER-SOMI, 2003) com níveis particularmente altos no útero. Na superfície da célula, o receptor –β para LIF (LIF-Rβ) se liga a uma glicoproteína gp-130 (receptor comum para família IL-6), formando um agregado de alta afinidade pelo qual o sinal transmitido pelo LIF é deflagrado (HEINRICH et al., 2003). A tradução do sinal ocorre pela ativação de diversas vias, sendo a principal delas a JAK/STAT. A supressão do sinal pode ser obtida por supressores da citocina ou por proteínas inibidoras da ativação de STAT (PIAS) (DUVAL et al., 2000).

Em humanos, LIF mRNA e proteína são expressos em glândulas endometriais durante a fase lútea do ciclo menstrual, período em que ocorre a implantação (CHEN et al., 1995). LIF-Rβ e gp-130 são expressos no epitélio luminal ao longo do ciclo de mulheres comprovadamente férteis (GULLINAN et al., 1996). A expressão de LIF está reduzida em análise de endométrio de pacientes com infertilidade sem causa aparente, quando comparada com mulheres sem comprometimento da fertilidade (LAIRD et al., 1997). Em mulheres inférteis, registraram presença de mutação do gene LIF em 2,7 % das nulíparas e 6,9 % nas pacientes com infertilidade secundária (KRALICHOVA et al., 2006).

A ação biológica do LIF no endométrio permanece ainda desconhecida, embora a sua expressão em glândulas desse tecido indique importância nas alterações da cavidade endometrial ao longo do ciclo. A proteína LIF tem sua expressão maximizada em biópsias endometriais na segunda metade da fase secretória do ciclo menstrual em mulheres férteis, sugerindo um papel na receptividade uterina (LEDEE-BATAILLE et al., 2002).

Algumas evidências sugerem que esta citocina produzida pelo endométrio e pelo blastocisto participa do mecanismo de interação entre o embrião e o útero, associada a várias outras citocinas, fatores de crescimento, fatores de crescimento transformantes (TGF) e moléculas de aderência, que iniciam o processo de nidação e atuam também na fase de invasão embrionária (DOMINGUEZ et al., 2003; HERRLER et al., 2003). Dessa forma, a relação materno-fetal não constitui um simples mecanismo de tolerância a um ser diferente, mas uma série de complexas interações de citocinas que modulam o diálogo imunológico (CHAOUAT et al., 2004).

O receptor do LIF (LIF-R) está expresso tanto no endométrio como no ó. A transcrição de LIF-R se evidencia nas fases de mórula e blastocisto, indicando que o LIF embrionário pode agir de maneira parácrina no desenvolvimento do blastocisto (LEI et al., 2004).

Observações em cultura de células endometriais apontam a ligação entre o LIF e as vias inflamatórias, principalmente com IL-1 e fator de necrose tumoral – alfa (TNF-α), deixando margem a questão, se o LIF está

ligado a fenômenos inflamatórios ou a implantação (ou ambos). IL-1β estimula a secreção de LIF por células epiteliais endometriais *in vitro* (PIERRER d'HAUTERIVE et al., 2004).

O LIF, em camundongos, tem fundamental importância na capacidade reprodutiva, uma vez que fêmeas *knock-out* para esse gene apresentam falha de implantação embrionária (DIMITRIADES et al., 2005)

Progesterona parece ser o maior modulador da expressão de LIF. Não somente a expressão endometrial de LIF coincide com a fase de predomínio de atuação da progesterona sobre o epitélio luminar, como o tratamento de mulheres com mifepristone (RU 486) imediatamente após a ovulação, reduz a imunorreatividade de LIF no período esperado de implantação (GEMZELL-DANIELSSON, 1997).

A relação entre a expressão de LIF no endométrio na fase lútea e o sucesso em uma gestação permite inclusive a possibilidade do seu uso clínico através da detecção por imunohistoquímica na janela de implantação, relacionando esse achado com o prognóstico do tratamento por fertilização *in vitro* (SERAFINI et al., 2008).

1.2.2 Interleucina-11 (IL-11)

IL-11 foi inicialmente descrita como um fator de crescimento atuante em múltiplos estágios da hematopoiese, em sinergia com outros fatores (DU

e WILLIAMS, 1994). Mais recentemente, foi demonstrada importante ação anti-inflamatória (SANDS et al., 1999), bem como ação pleiotrófica em múltiplos tipos celulares.

Diversos estudos identificaram tanto IL-11 quanto IL-11Rα em células deciduais de endométrio gravídico em fase secretória tardia (KARPOVICH et al., 2003). Além disso, células de trofoblasto invasivo são ricas em IL-11 e IL-11Rα durante o início de gestação em primatas, sugerindo envolvimento na placentação (DIMITRIAIDIS et al., 2003).

IL-11, assim como LIF, faz parte de um restrito grupo de fatores conhecidos que comprovadamente participam do mecanismo de implantação em ratos (BILINSKI et al., 1998; ROBB et al., 1998). Ambos, LIF e IL-11, são membros da família IL-6 de citocinas que inclui oncostatina M, cardiotrofina-1, fator neurotrófico ciliar, entre outros. Eles dividem uma subunidade de sinal acessório de transdução que é uma glicoproteína 130, embora possuam unidades receptoras separadas. A IL-11, ligando-se em seu receptor ativa várias vias, inclusive a JAK/STAT, como o LIF (HEINRICH et al., 1998).

Muito embora, LIF e IL-11 sejam importantes na implantação em ratos, suas produções no endométrio ocorrem em momentos e locais distintos. A IL-11 e IL-11Rα têm sua produção restrita às células estromais decidualizadas pós-implantação (STEWART et al., 1992). Ratas com mutação no gene IL11Rα são inférteis por uma resposta de decidualização defeituosa que ocorre no período pós-implantação. Está claro que o

mecanismo de infertilidade ligado a defeitos do LIF e IL-11 estão presentes quando essas mutações são maternas. Quando blastocistos com mutações para esses genes são colocados em fêmeas normais a implantação ocorre de forma perfeita (CHEN et al., 2000).

Estudos *in vitro* identificaram um papel da IL-11 e LIF na adesão endometrial. Ambos participam da adesão das células endometriais humanas à fibronectina e colágeno IV (MARWOOD et al., 2009), duas matrizes que estão presentes na superfície dos blastocistos (SHIMOMURA et al., 2006) e células trofoblásticas humanas no primeiro trimestre (KUROSAWA et al., 1985). Além disso, o tratamento com IL-11 do epitélio endometrial humano primário amplia a adesão do trofoblasto com as células endometriais. Esse efeito é abolido após adição de anticorpo neutralizante de IL-11, o qual inibe a ação de fosforilação de STAT3 (MARWOOD et al., 2009).

Em contraste com LIF, a expressão de mRNA para IL-11 está reduzida na decídua e trofoblasto de mulheres com gestação anembrionada que resulta em abortamento precoce. IL-11 e IL-11Rα também estão reduzidos no endométrio de mulheres com infertilidade e endometriose em comparação com mulheres férteis durante a janela de implantação (STOIKOS et al., 2003).

Os mecanismos pelos quais IL-11 e LIF endometriais regulam a adesão do trofoblasto foram revelados por estudos genéticos de “microarray” nos quais essas citocinas se apresentaram em diferentes modelos de

expressão de RNA mensageiros envolvidos nessa regulação. LIF e IL-11 aumentam a integrina α2 mRNA e a expressão dessa proteína pelas células do epitélio endometrial. LIF mas não IL-11, regula a adesão dessas células ao colágeno IV pela via da proteína integrina α2β1. LIF em sinergia com IL-11 aumentam TGFβ1 e a secreção de CD44 nas células endometriais, enquanto LIF e IL-11 regulam de forma diferente a expressão do mRNA do CD44, demonstrando como é complexo esse mecanismo de adesão celular (MARWOOD et al., 2009).

1.2.3 Interleucina-6 (IL-6)

IL-6 é uma citocina multifuncional que regula vários aspectos da resposta imunológica, reação de fase aguda e hematopoiese, além de ter alguma função redundante com a IL-11 e LIF. A deficiência de IL-6 em ratas levou a redução da fertilidade e redução no número de sítios de implantação viáveis (ROBERTSON et al., 2000). Em humanos, a IL-6 é fracamente expressa na fase proliferativa do endométrio, mas apresenta forte imunorreatividade na fase secretória, predominantemente nas células glandulares e luminais do epitélio (TABZADEH et al., 1995; VANDERMOLEN e GU, 1996). Além disso, IL-6-R é encontrado no epitélio glandular durante o ciclo menstrual. Dessa forma, um papel na implantação do embrião humano pode ser conferido a essa citocina.

IL-6 sérica tem se demonstrado aumentada em pacientes com aborto de repetição (ZENCLUSSEN et al., 2003), embora níveis locais uterinos não tenham sido obtidos. Quantificando a secreção de IL-6 através de biópsias endometriais de pacientes inférteis em comparação com pacientes férteis entre os dias LH+6 (6° dia após o pico de LH) e LH+13, não foi verificada diferença (SHERWIN et al., 2002), isso ocorre provavelmente porque a IL-6 tem um papel redundante na receptividade endometrial. Também foi sugerido que a IL-6 possa contribuir para o crescimento do trofoblasto e o desenvolvimento da placenta em humanos (NISHINO et al., 1990). O fato da IL-6 ser superexpressa durante a janela de implantação e de seu receptor ser encontrado tanto no blastocisto quanto no endométrio sugerem uma função parácrina/autócrina dessa citocina no período peri-implantacional.

A regulação da expressão de IL-6 através de hormônios esteroidais é controversa. Estimulação e supressão da secreção endometrial de IL-6 por estrogênio e progesterona já foram ambos descritos (TABIBZADEH et al., 1989; LAIRD et al., 1993; TSENG et al., 1996). Nenhum efeito direto do tratamento com estrogênio e/ou progesterona pode ser estabelecido na secreção de IL-6 endometrial. Em outro estudo, no entanto, foi demonstrado que estradiol media uma sobre-regulação de IL-6 em cultura de endométrio, enquanto estradiol e progesterona mediam uma sobre-regulação de seu receptor. Por outro lado, IL-6 é sem dúvida expressa de forma máxima na fase secretória, em seus períodos médios e tardios, no mesmo momento em que o endométrio está exposto aos maiores níveis de progesterona e estradiol. Esse fato pode permitir especular que mesmo que a IL-6 não seja

diretamente regulada por esses hormônios esteroidais, a ação deles pode indiretamente influenciar na expressão desta citocina (Von WOLFF et al., 2002).

1.2.4 Claudina-4

Claudina-4, inicialmente chamada de *Clostridium perfiringens enterotoxin receptor (CPER)*, sugere ter um importante papel no mecanismo de implantação (CARSON et al., 2002). Claudina-4 é uma proteína tetravalente com 27 kDa. A família claudina é composta por mais de 20 elementos que estão presentes nas junções celulares (TSUKITA e FURUSE, 2000; SCHNNEEBERGER e LYNCH, 2004).

A claudina-4 tem sua expressão aumentada em quatro vezes no endométrio humano, do início até a metade da fase lútea do ciclo menstrual (CARSON et al., 2002; TALBI et al., 2006). Essa proteína esta presente no epitélio luminal no sítio de aposição e de aderência dos embriões ao endométrio de camundongas e parece ser importante para formação de barreiras e permeabilidade, além de poder regular a invasão e a ancoragem do embrião e determinar o espaçamento entre eles (WANG et al., 2004).

Apesar de sua importância não ter sido determinada totalmente, a Claudina-4 está envolvida na produção de junções oclusivas no endométrio,

sugerindo papel relevante na implantação. Essa proteína tem sua produção, provavelmente, estimulada pela progesterona (TALBI et al., 2006).

Recente trabalho publicado sugere que a determinação da relação entre a expressão de claudina-4 e LIF em um ciclo menstrual espontâneo precedendo um tratamento com fertilização *in vitro* (FIV), pode ser usada como biomarcador de receptividade endometrial, sendo que uma forte imunorreatividade para Claudina-4 foi associada com falha na obtenção de gestação após FIV, nessas pacientes a chance de gestação foi 10,5 vezes menor que naquelas com imunorreatividade fraca (SERAFINI et al., 2009).

1.2.5 Genes Hox

Genes Hox são fatores de transcrição que pertencem a uma família multigênica, são evolutivamente muito conservados e atuam como reguladores da morfogênese embrionária e diferenciação. Eles têm seu mecanismo de regulação e sua sequência de elementos comuns denominada de *Homeobox* que codifica 61aminoácidos de ligação na fita de DNA. Embora as espécies animais sejam fortemente diferentes em sua aparência, todas usam os genes Hox para estabelecer seus planos estruturais (KRUMLAUF, 1994). Existem dois genes Hox que parecem ser essenciais para a implantação em ratos, HoxA-10 e HoxA-11, já que mutantes homozigóticos desses genes são inférteis por possuírem endométrio não receptivo.

Os genes HoxA-10 e HoxA-11 são expressos nas glândulas endometriais e no estroma uterino ao longo de todo o ciclo menstrual em humanos (BENSON et al., 1996). A expressão de ambos esses genes aumenta drasticamente no período de implantação, durante a metade da fase lútea, e permanece aumentado por todo o restante do ciclo, bem como na decídua de mulheres grávidas. Esse padrão de expressão em adultos sugere que os genes Hox desenvolvem um papel na implantação embrionária em humanos, assim como é observada em ratos (BENSON et al., 1996; LIM et al., 1999).

O mecanismo pelo qual os genes Hox interferem na implantação é ainda desconhecido, mas ratos homozigóticos para deficiência de HoxA-10 mostram transformação do terço proximal do útero, implantação defeituosa e reabsorção embrionária no período pós-implantacional recente, sugerindo que HoxA-10 pode ser importante durante a morfogênese do próprio trato genital e no endométrio adulto para a adequada implantação (BENSON et al., 1996). Células estromais uterinas de ratas com deficiência de HoxA-10 mostram proliferação reduzida em resposta à progesterona, levando a defeitos de decidualização (LIM et al., 1999). Além disso, devido a genes responsivos à progesterona estarem desregulados no estroma de ratas mutantes para HoxA-10, esse gene pode regular a resposta à progesterona no estroma uterino através de regulação da expressão gênica. Igualmente, o útero em ratas mutadas para HoxA-11é hipoplásico e glândulas do epitélio uterino apresentam erros de desenvolvimento (HSIEH-LI et al., 1990; DAFTARY e TAYLOR, 2001).

Considerando os achados de literatura relacionando a expressão de determinados genes com a receptividade endometrial, e a escassez de estudos avaliando o endométrio de pacientes submetidas à embolização do mioma uterino, propomos o presente estudo para avaliar estes aspectos em nosso meio.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Avaliar a receptividade endometrial de pacientes com leiomioma do útero, antes e após a embolização do mioma uterino.

2.2 Específico

- Analisar a expressão gênica de LIF, IL-11, IL-6, claudina-4, HoxA-10, HoxA-11, receptor de estrogênio e receptor de progesterona no endométrio de pacientes com leiomioma do útero, antes e após a embolização do mioma uterino.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Casuística

3.1.1 Pacientes

Foram realizados 125 procedimentos de embolização do mioma uterino no período de Janeiro de 2009 e Julho de 2010, em pacientes assistidas no Setor de Leiomioma Uterino da Divisão de Clínica Ginecológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP). Este procedimento foi executado no Serviço de Radiologia Vascular Intervencionista do Hospital Israelita Albert Einstein, mediante acordo de cooperação entre as instituições. Para a indicação destes procedimentos seguiu-se protocolo interno do setor.

O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia e pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CAPPesq) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, além do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein (anexos 1 e 2). As pacientes selecionadas receberam informação detalhada sobre a pesquisa e concordaram espontaneamente em participar do protocolo, mediante assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido pós-informado (anexo 3).

Do grupo total de pacientes submetidas à embolização, foram selecionadas 30 que se enquadravam nos critérios de inclusão e exclusão deste protocolo de pesquisa. O material emboligênico utilizado foi constituído de embosferas (esferas calibradas de copolímero acrílico- Trisacryl, hidrofílicas, cobertas com gelatina Porcina) de 500-700 micra.

A média etária das 30 pacientes foi 36,2 anos (+/- 3,2 anos). Vinte pacientes eram de etnia branca e 10 de etnia negra, conforme referência da própria paciente. Quanto a paridade, 16 pacientes eram nuligestas, seis já haviam tido uma gestação, quatro com antecedente de 2 gestações, duas pacientes com 3 gestações e duas com 4 gestações anteriores (Tabela 1).

Tabela 1- Características Gerais das Pacientes

Paciente	Idade	Raça	Paridade
1	44	BRANCA	2G 2CES
2	37	NEGRA	NULIGESTA
3	39	BRANCA	NULIGESTA
4	33	BRANCA	NULIGESTA
5	31	BRANCA	NULIGESTA
6	33	BRANCA	NULIGESTA
7	34	BRANCA	4G 4AB
8	37	NEGRA	NULIGESTA
9	40	BRANCA	1G 1AB
10	37	BRANCA	NULIGESTA
11	38	BRANCA	1G 1AB
12	32	NEGRA	2G 1Nl 1AB
13	35	NEGRA	NULIGESTA
14	40	NEGRA	2G 2CES
15	34	BRANCA	3G1NL1C1AB
16	39	BRANCA	1G 1 CES
17	40	NEGRA	4G 1CES 3 AB
18	38	NEGRA	NULIGESTA
19	39	BRANCA	NULIGESTA
20	34	BRANCA	3G 3AB
21	40	BRANCA	1G 1CES
22	32	BRANCA	1G 1AB
23	37	NEGRA	NULIGESTA
24	36	BRANCA	2G 2NL
25	35	BRANCA	NULIGESTA
26	38	BRANCA	1G 1AB
27	33	BRANCA	NULIGESTA
28	33	NEGRA	NULIGESTA
29	32	NEGRA	NULIGESTA
30	37	BRANCA	NULIGESTA

O volume uterino médio pré-embolização foi de 662,1 cc (+/- 447,9 cc) e o pós-embolização foi de 338,2 cc (+/- 247,5 cc). A redução média do volume uterino obtido com a embolização dos miomas uterinos foi de 45,03 % (Tabela 2).

Tabela 2 - Variação do Volume Uterino

Paciente Nº	Volume Pré	Volume Pós	Redução %
1	453	174	61,59
2	645	243	62,33
3	118	99	16,10
4	433	257	40,65
5	1098	NC	NC
6	1320	535	59,47
7	1660	953	42,59
8	303	188	37,95
9	958	417	56,47
10	293	152	48,12
11	395	275	30,38
12	521	193	62,96
13	311	256	17,68
14	391	170	56,52
15	313	198	36,74
16	677	194	71,34
17	201	102	49,25
18	1587	764	51,86
19	1086	695	36,00
20	148	124	16,22
21	367	180	50,95
22	332	185	44,28
23	460	276	40,00
24	445	330	25,84
25	778	183	76,48
26	681	398	41,56
27	524	250	52,29
28	1599	940	41,21
29	537	320	40,41
30	1230	756	38,54

Dentre as pacientes, três eram portadoras de hipertensão arterial sistêmica, uma tinha arterite de Takayasu e, outra, anemia. Nenhuma delas possuía contra-indicação ao procedimento de embolização ou à coleta da amostra endometrial por aspiração.

Uma paciente apresentou complicação por necrose e expulsão do mioma, tendo sido submetida à miomectomia 10 dias após o procedimento, com boa recuperação e manutenção do útero.

Para a avaliação objetiva dos sintomas relacionados ao leiomioma uterino foi utilizado sistema de pontuação levando em consideração o volume menstrual, a duração do fluxo e a presença de dismenorréia. Para cada item foi atribuído valor de 1 a 3 e fez-se somatória, totalizando 3 a 9 pontos, que reflete os sintomas da paciente e permite acompanhamento comparativo em cada momento do tratamento (Tabela 3).

Tabela 3 - Avaliação dos sintomas relacionados ao leiomioma uterino

Pontos	Volume Menstrual	Duração da menstruação	Dismenorréia
1	Normal	3-7 dias	Ausente
2	Aumentado	> 7 dias	Leve
3	muito aumentado	metrorragia	Incapacitante

Volume Menstrual

-Normal: *habitual para a paciente*

-Aumentado: *volume maior que o habitual sem interferir na qualidade de vida*

-Muito aumentado: *volume maior que o habitual trazendo prejuízo às atividades cotidianas*

Dismenorréia

- Ausente: *ausência de cólica menstrual*

-Leve: *cólica menstrual que não interfere nas atividades cotidianas*

-Incapacitante: *cólica menstrual que impede ou impossibilita a execução das atividades cotidianas*

Todas as pacientes referiram melhora significativa do quadro clínico após a embolização dos miomas uterinos (Tabela 4).

Tabela 4 - Resultantes da avaliação dos sintomas relacionados ao leiomioma nos momentos pré e pós-embolização

Paciente Nº	Sintomatologia Pré	Sintomatologia Pós
1	6	3
2	7	3
3	5	3
4	7	5
5	8	NA
6	8	NA
7	3	3
8	8	3
9	6	3
10	8	3
11	4	3
12	5	3
13	4	NA
14	5	3
15	6	3
16	6	3
17	5	3
18	4	4
19	4	3
20	6	3
21	6	3
22	7	3
23	4	3
24	7	3
25	7	3
26	3	3
27	4	3
28	7	3
29	5	NA
30	6	3

NA – Não avaliada

3.1.2 Critérios de Inclusão

- Mulheres portadoras de leiomioma uterino com idade entre 30 e 45 anos;
- Presença de sintomas relacionados ao Leiomioma Uterino (menorragia e/ou dor pélvica);
- Desejo de tratamento conservador do útero com miomectomia avaliada como de elevada morbidade.

3.1.3 Critérios de Exclusão

- Gestação;
- Utilização de Método contraceptivo hormonal;
- Utilização de medicação hormonal para controle do ciclo dos sintomas;
- Neoplasia maligna genital;
- Moléstia inflamatória pélvica aguda;
- Coagulopatia;
- Irradiação pélvica prévia.

3.2 Métodos

As pacientes foram inicialmente submetidas à Ressonância Nuclear Magnética de Pelve para avaliação do volume uterino e localização exata dos nódulos de leiomioma. Após esse procedimento, foi realizada coleta de biópsia aspirativa de endométrio com Cureta de Novak na segunda fase do ciclo menstrual (fase secretória), determinada pela data da última menstruação e média dos últimos ciclos menstruais de cada paciente. A coleta da biópsia foi feita no próprio ambulatório de ginecologia sem uso de analgesia.

A obtenção da amostra seguiu cuidadoso processo de coleta: a) paciente em posição litotômica; b) colocação do espéculo de Graves; c) antissepsia com Povidine® seguida de limpeza com gaze estéril para remoção do excesso do produto; d) pinçamento do lábio anterior do colo uterino com pinça de Pozzi, e) suave tração para retificação da angulação do útero, acompanhado de palpação abdominal supra-púbica para retificação do corpo do útero; f) introdução delicada da cureta de Novak até o fundo do útero; g) realização de vácuo com seringa de 20 ml acoplada na cureta de Novak; h)execução de delicados movimentos no eixo do útero com a cureta para obtenção da amostra; i) obtenção de aproximadamente 3 a 5 mL de aspirado; j) retidas a cureta e as pinças; l) hemostasia no colo uterino quando necessário; m) retirada do espéculo.

Cada paciente e sua respectiva amostra recebeu a designação numérica de 1 a 30, seguida da letra P, na amostra obtida após o procedimento de embolização.

O material obtido, em média 3 mL, foi dividido em duas amostras que imediatamente foram acondicionadas em recipiente com nitrogênio líquido para transporte. No período máximo de duas horas as amostras foram transferidas para Freezer a - 80° C.

Uma nova coleta de aspirado endometrial, seguindo as mesmas diretrizes da primeira, foi realizada 3 a 4 meses após a embolização do mioma uterino. Desta segunda fase participaram vinte e seis pacientes das trinta que iniciaram o protocolo. Uma foi excluída por ter sido realizada miomectomia no período pós-embolização e outras três recusaram-se a coleta por desconforto no procedimento.

Estas pacientes realizaram também uma nova Ressonância Nuclear Magnética 6 meses após o procedimento de embolização, obtendo-se novo valor do volume uterino (Tabela 2).

3.2.1 Processamento das Amostras

Dentre as duas amostras colhidas de cada paciente nos momentos pré e pós-tratamento selecionou-se a com maior volume para ser submetida ao procedimento de extração de RNA total.

3.2.2 Extração de RNA

A extração de RNA total foi realizada utilizando o método do *Trizol® Reagent.* Os passos seguintes foram realizados conforme sugestão do fabricante para extração de RNA total de tecido:

1. Ao volume total da amostra foi acrescentado Trizol®, em uma quantidade proporcional ao volume da amostra (mantendo a proporção de 1:10).
2. O preparado foi homogeneizado em triturador de tecidos (Ultra Stirrer, modelo Ultra 80), e colocado em repouso por 5 minutos a temperatura ambiente.
3. Adicionou-se 0,2 mL de clorofórmio para cada 1 mL de Trizol utilizado, procedendo-se agitação vigorosa aproximadamente 15 segundos. Seguiu-se incubação por 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Realizada centrifugação da mistura em 6.000 rpm à 4° C, por 30 minutos.
5. Separado e transferido para novo tubo, a fase aquosa superior do material (RNA).
6. Adicionou-se 0,5 mL de Isopropanol para cada 1 mL de Trizol utilizado, com intuito de precipitar o RNA.
7. Após incubação por 10 minutos a temperatura ambiente (ou por toda uma noite a - 20º C) foi realizada centrifugação da mistura a 6.000 rpm à 4° C, por 20 minutos.

8. Observou-se a formação do *pellet* no fundo do tubo, desprezando-se o sobrenadante.
9. O precipitado foi lavado em Etanol 75%, na proporção de 1:1 de Trizol utilizado inicialmente.
10. Realizada centrifugação da mistura em 5.000 rpm à 4° C, por 10 minutos.
11. Desprezando o sobrenadante, procedeu-se a secagem do *pellet.*
12. Ressuspendido o *pellet* com 50 a 100 µL de H2O MilliQ autoclavada.
13. O material foi então incubado à 60º C por 10 minutos para dissolver o precipitado, o RNA obtido foi quantificado por espectrofotometria em aparelho Nano Drop (Thermo scientific, USA) e armazenado em freezer a -80 ºC, até o momento do uso.

Concluída a etapa de extração do RNA e procedida a quantificação de todas as amostras, foi realizada a análise do seu perfil de integridade por eletroforese em gel de agarose a 1% (*Life Biosciences*). Nesta primeira etapa verificou-se a necessidade de nova extração do RNA em 18 amostras, a saber, amostras 1, 21, 26, 27, 28, 29, 30, 1P, 2P, 3P, 12P, 14P, 16P, 17P, 19P, 25P, 27P e 30P. Nova avaliação em gel de agarose a 1% foi realizada para estas amostras.

3.2.3 Síntese de cDNA e reações de PCR quantitativo em tempo real (QRT-PCR)

Os cDNAs foram sintetizados a partir de 2 μg do RNA total utilizando o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), seguindo especificações do fabricante. Para checar a eficiência das reações de transcrição reversa e ausência de contaminação com DNA genômico foram realizadas reações de PCR convencional, utilizando iniciadores específicos para amplificação da β-actina (sense - TGGCACCCAGCACAATGA, anti-sense - CCGATCCACACGGACTACTTG). Os produtos das reações de PCR foram analisados através de eletroforese em géis de agarose (1,5 %) impregnados com brometo dietídeo.

As reações de *QRT-PCR* foram realizadas no aparelho *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System* (Applied Biosystem). O sistema de detecção utilizado nas análises foi o *TaqMan Universal PCR Master Mix®* *(*Applied Biosystems), seguindo as especificações do fabricante. Os iniciadores utilizados foram *LIF* (Hs01055668_M1), *IL-6* (Hs00985639_M1), *IL-11* (Hs001744148_M1), *HOXA-10* (Hs00538183_M1), *HOXA-11* (Hs00194149_M1), claudina-4 (Hs00533616_M1), Receptor de Estrogênio (Hs01046816_M1) e Receptor de Progesterona (Hs01556702_M1).

Todas as reações de QRT-PCR foram desenvolvidas no volume total de 20 µL, contendo: 10 ng de cDNA diluídos em 9 µL de água Milli-Q, 10 µL de *TaqMan Universal PCR Master Mix®* e 1 µL do *assay (*Applied Biosystems) específico. As reações foram realizadas utilizando os “assays”

(mistura de iniciadores e sondas) inventoriados pelo fabricante na concentração final de 1X (1:20).

O Valor do ciclo *Threshold* (Ct) foi definido manualmente de acordo com o perfil da curva de amplificação obtida para cada gene (fase exponencial). Foi utilizada a ciclagem padrão do aparelho: 2 min a 50 ºC, 10 min a 95 ºC, 45 ciclos de 10 segundos a 95 ºC e 1 min a 60 ºC.

Como controles endógenos foram testados *GAPDH* (gliceraldeído fosfato desidrogenase), β-actina, *TBP* (Tata box protein), *B2M* (β-2-microglobulina,) e *HPRT* (hipoxantina – guanina fosforibosil transferase). O perfil de eficiência dos genes constitutivos e a seleção do melhor gene normalizador para as amostras analisadas foram realizados com o auxílio do programa GeNorm (http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/).

Os cálculos de expressão relativa para os marcadores foram realizados utilizando o método do ΔΔCT, utilizando os softwares SDS 2.3 *(*Applied Biosystems) e o Excel.

3.2.4 Análise estatística

Inicialmente todas as variáveis foram analisadas descritivamente. Para as variáveis quantitativas esta análise foi feita através da observação dos valores mínimos e máximos, e do cálculo de médias, desvios-padrão e

mediana. Para as variáveis qualitativas calculou-se freqüências absolutas e relativas.

Para a comparação de médias de dois grupos foi utilizado o teste t de Student, quando a suposição de normalidade dos dados foi rejeitada foi utilizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

Para a comparação dos momentos em cada grupo foi utilizado o teste não-paramétrico de Wilcoxon.

Para o estudo da correlação foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman[(1)].

O nível de significância utilizado para os testes foi de 5%.

4. RESULTADOS

Foram avaliadas amostras de 25 pacientes, dentre as 30 inicialmente selecionadas. As pacientes identificadas pelos números 5, 6, 13 e 29, foram excluídas, pois a biópsia endometrial pós-embolização não foi colhida. As amostras da paciente de número 19 foram descartadas por não conterem material genético suficiente para análise adequada.

4.1 Expressão relativa dos genes estudados

As taxas de expressão relativa para os genes estudados estão expostos na tabela 5.

Tabela 5 – Taxas de expressão relativa para cada gene estudado nas diversas amostras

	HOXA10	HOXA11	IL11	LIF	IL6	Claudin 4	RP	RE
Amostra	**RQ**	**RQ**	**RQ**	**RQ**	**RQ**	**RQ**	**RQ**	**RQ**
1	4,93812	4,74020	7,09359	0,28193	#	#	2,09401	5,66825
2	0,68595	0,61028	0,92331	1,87068	2,21249	0,96985	0,24468	0,46203
3	2,37913	2,88348	2,48034	0,03501	4,97338	0,30151	1,16261	2,40244
4	2,99357	3,16092	1,85045	0,07983	3,32275	0,19527	3,78238	6,51837
7	0,45020	0,31016	1,52856	2,59152	1,93975	1,37897	0,24324	1,21824
8	2,91835	3,47403	1,50150	0,05168	1,61365	0,21738	4,66722	5,77231
9	0,33468	0,33269	1,15065	2,18549	0,45753	0,91387	0,41005	0,75505
10	0,88442	0,81678	1,53766	0,01285	1,20995	0,37310	1,01064	2,22914
11	1,10604	1,12425	1,35935	0,02280	2,67302	0,11594	1,16812	2,73817
12	2,40854	1,25706	1,78466	0,42329	4,16446	1,08429	0,55197	2,27480
14	0,61043	0,50495	0,66247	1,79293	0,79074	0,54990	0,20238	0,29751
15	1,24607	1,31768	1,06860	0,03564	0,44372	0,05027	1,38799	2,45889
16	1,16947	1,77700	1,11829	5,17762	0,17600	0,33796	2,88069	4,57654
17	0,15471	0,30900	3,97153	1,42967	0,64328	0,40786	0,31729	0,88890
18	1,21133	1,70100	2,42359	2,09927	0,01000	0,21588	1,10268	1,83078
20	2,05333	3,70600	3,02517	0,79105	0,03248	0,29128	1,57598	4,39556
21	1,72288	2,14000	4,23692	8,96564	0,26469	2,96059	1,25903	9,55056
22	1,38078	1,28300	0,80734	0,10273	0,13501	0,07777	3,93130	3,13563
23	1,11885	1,34000	4,87320	0,47710	0,96063	1,12413	0,58787	0,86892
24	3,64518	5,25300	1,98228	0,27504	0,56772	0,27023	4,64506	3,43394
25	1,23030	2,50700	0,51405	0,16136	0,07540	0,12199	4,01818	3,29617
26	0,41847	0,79100	72,63804	4,67448	46,53695	1,17363	0,12473	1,34257
27	3,97526	2,20300	4,90044	5,83362	1,13629	4,78590	0,31435	0,60941
28	0,82246	1,48100	2,51511	1,65434	1,48915	1,16499	0,25590	0,31508
30	0,77400	0,71377	2,55399	3,77783	3,20361	1,39506	0,35507	0,61101
1P	3,71376	3,82121	#	#	#	5,27523	7,61131	#
2P	1,89243	1,96478	1,45351	0,21958	10,61699	0,70379	1,20135	1,78947
3P	0,94470	1,00025	1,00850	0,05600	0,72976	0,33291	0,99761	1,75818
4P	1,14367	1,28943	1,31626	0,02477	0,91344	0,05265	1,64692	2,37725
7P	0,63209	0,65670	0,96617	0,02119	0,31226	0,15182	0,37806	0,98268
8P	0,64600	0,75862	0,51824	0,80932	0,98091	2,24975	0,88283	1,34738
9P	0,53347	0,54959	1,27109	0,03880	0,20681	0,66889	0,89762	2,03804
10P	1,47052	1,25011	1,25020	0,01943	1,47606	0,17827	1,31875	3,62869
11P	0,64395	0,60894	0,88571	0,02108	0,37145	0,27550	1,87292	9,37456
12P	1,08624	0,89739	0,97708	0,06868	2,30921	0,28096	1,28936	2,52948

continua

continuação

14P	2,16304	1,96440	1,78335	0,07184	6,18121	0,57862	2,14525	5,83576
15P	0,94802	1,14450	1,12771	0,04364	0,53743	0,43131	2,98551	5,81422
16P	0,56269	0,72372	0,80017	1,74974	1,03068	2,50693	0,92382	1,04504
17P	0,94301	0,96591	0,97413	0,93260	1,09587	1,16039	1,43646	3,60137
18P	1,10641	0,98570	1,12743	0,02403	1,53217	0,42086	2,15699	5,55675
20P	1,15282	1,44398	0,64700	0,22836	0,08683	0,15853	3,43641	3,35668
21P	1,02634	1,03195	1,83646	0,01227	1,22357	0,16350	0,77475	2,22924
22P	0,83695	0,93201	1,18432	0,03344	1,01407	0,24368	0,42621	1,26656
23P	1,39354	1,71075	2,19427	0,04494	0,99872	0,11410	2,05932	4,70912
24P	0,55828	0,65902	0,81908	1,48161	0,48502	0,94631	0,33031	0,51004
25P	1,03724	1,05937	0,60322	0,55492	0,74688	1,23093	1,99770	2,19730
26P	0,45798	0,71937	0,32112	0,48641	0,41644	0,65131	0,82445	1,91898
27P	0,29240	0,25025	1,29554	2,21288	0,47299	0,22162	0,31947	1,54572
28P	0,74318	1,01833	0,69818	1,72861	0,85488	1,22229	0,40127	0,46464
30P	0,98312	0,91850	2,01295	1,09281	3,77304	11,48474	0,28201	0,33167

RQ= Taxa de expressão relativa # Falha na amplificação do gene

4.2 Avaliação do escore de sintomas

As pacientes foram avaliadas em relação ao seu quadro clinico através de um escore nos dois momentos. Na tabela a seguir apresentamos a comparação do quadro clinico pré e pós através deste escore.

Tabela 6 - Valores de média, desvio-padrão, mediana, mínimo e máximo do escore de sintomas nos momentos pré e pós-embolização

Escore	n	Média	dp	Mediana	Mínimo	Máximo	p*
Pré	25	5,68	1,44	6	3	8	< 0,001
Pós	25	3,12	0,44	3	3	5	

(*) nível descritivo de probabilidade do teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

Na tabela 6, observamos que há decréscimo significativo do escore de quadro clinico do momento pré para o momento pós-embolização.

4.3 Avaliação da expressão dos genes estudados

Nas tabelas abaixo apresentamos a comparação das expressões gênicas de LIF, IL-11, IL-6, claudina-4, HoxA-10, HoxA-11, Receptor de Estrogênio e Receptor de Progesterona nos momentos pré e pós embolização.

Tabela 7 - Valores de média, desvio-padrão, mediana, mínimo e máximo da expressão relativa de LIF nos momentos pré e pós-embolização

Escore	n	Média	dp	Mínimo	Máximo	Mediana	p*
Pré	24	1,86	2,32	0,01	8,97	1,11	0,005
Pós	24	0,50	0,68	0,01	2,21	0,07	

(*) nível descritivo de probabilidade do teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

Na tabela 7, observamos que há decréscimo significativo da expressão relativa de LIF do momento pré para o momento pós-embolização (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Expressão relativa de LIF nos momentos pré e pós-embolização

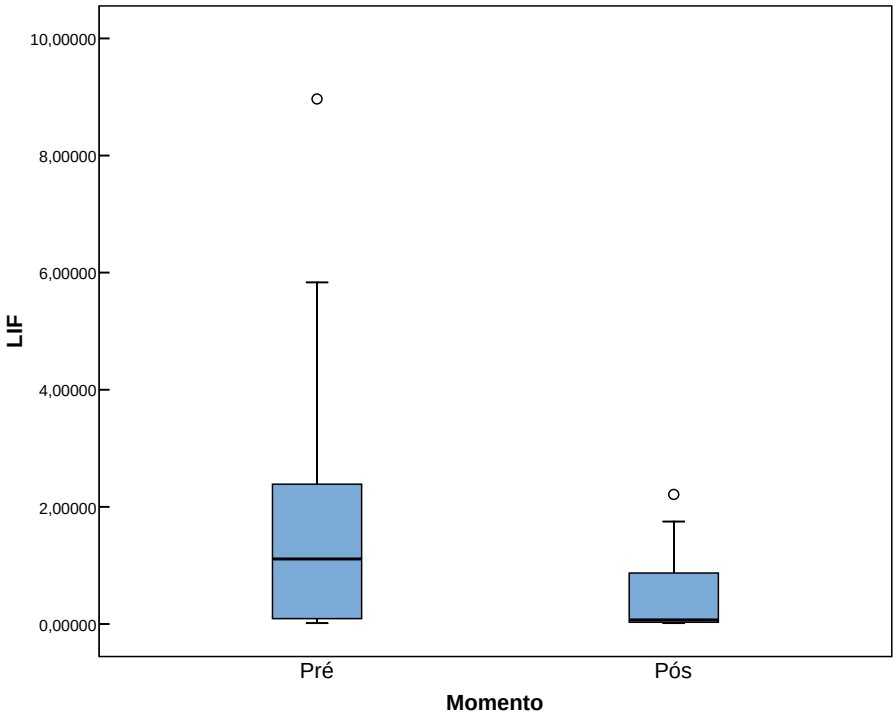

Tabela 8 - Valores de média, desvio-padrão, mediana, mínimo e máximo da expressão relativa de IL-11 nos momentos pré e pós-embolização

Escore	n	Média	dp	Mínimo	Máximo	Mediana	p*
Pré	24	5,06	14,45	0,51	72,64	1,82	0,001
Pós	24	1,13	0,47	0,32	2,19	1,07	

(*) nível descritivo de probabilidade do teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

Na tabela 8, observamos que há decréscimo significativo da expressão relativa de IL-11 do momento pré para o momento pós-embolização (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Expressão relativa de IL-11 nos momentos pré e pós-embolização

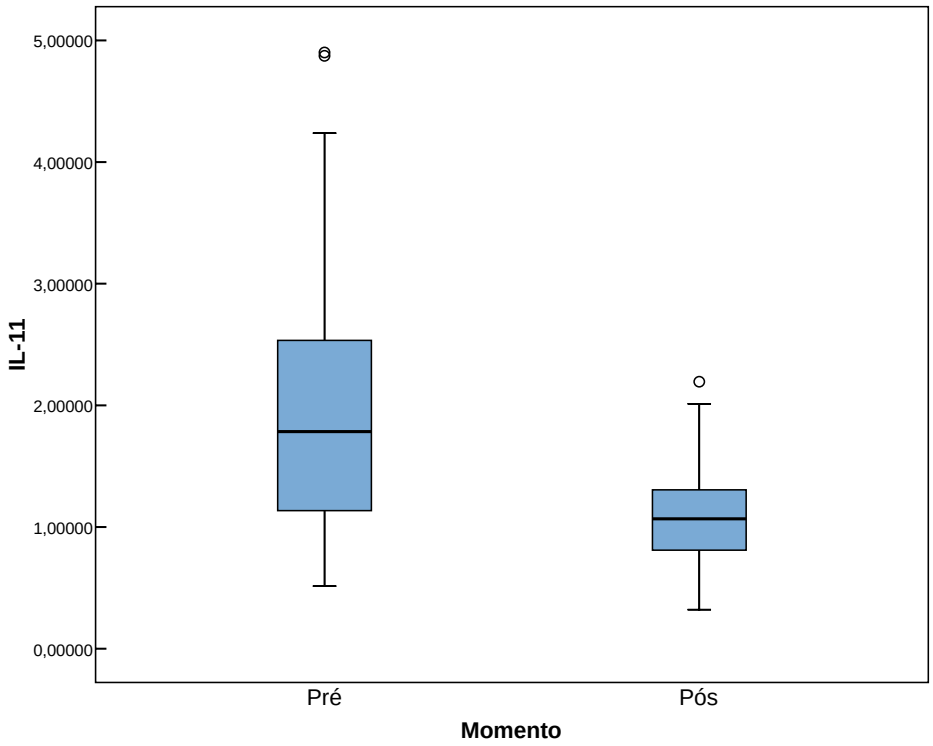

Tabela 9 - Valores de média, desvio-padrão, mediana, mínimo e máximo da expressão relativa de IL-6 nos momentos pré e pós-embolização

Escore	n	Média	dp	Mínimo	Máximo	Mediana	p*
Pré	24	3,29	9,31	0,01	46,54	1,05	0,841
Pós	24	1,60	2,32	0,09	10,62	0,95	

(*) nível descritivo de probabilidade do teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

Na tabela 9, observamos que não há alteração significativa da expressão relativa de IL-6 do momento pré para o momento pós-embolização.

Tabela 10 - Valores de média, desvio-padrão, mediana, mínimo e máximo da expressão relativa de claudina-4 nos momentos pré e pós-embolização

Escore	n	Média	dp	Mínimo	Máximo	Mediana	p*
Pré	24	0,85	1,07	0,05	4,79	0,39	0,954
Pós	24	1,10	2,30	0,05	11,48	0,43	

(*) nível descritivo de probabilidade do teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

Na tabela 10, observamos que não há alteração significativa da expressão relativa claudina-4 do momento pré para o momento pós-embolização.

Tabela 11 - Valores de média, desvio-padrão, mediana, mínimo e máximo da expressão relativa de HoxA-10 nos momentos pré e pós-embolização

Escore	n	Média	dp	Mínimo	Máximo	Mediana	p*
Pré	25	1,63	1,25	0,15	4,94	1,21	0,054
Pós	25	1,08	0,70	0,29	3,71	0,95	

(*) nível descritivo de probabilidade do teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

Na tabela 11, observamos que não há alteração significativa da expressão relativa de HoxA-10 do momento pré para o momento pós-embolização.

Tabela 12 - Valores de média, desvio-padrão, mediana, mínimo e máximo da expressão relativa de HoxA-11 nos momentos pré e pós-embolização

Escore	n	Média	dp	Mínimo	Máximo	Mediana	p*
Pré	25	1,83	1,37	0,31	5,25	1,34	0,021
Pós	25	1,13	0,70	0,25	3,82	0,99	

(*) nível descritivo de probabilidade do teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

Na tabela 12, observamos que há decréscimo significativo da expressão relativa de HoxA-11 do momento pré para o momento pós-embolização (Gráfico 3).

Gráfico 3 – Expressão relativa de HoxA-11 nos momentos pré e pós-embolização

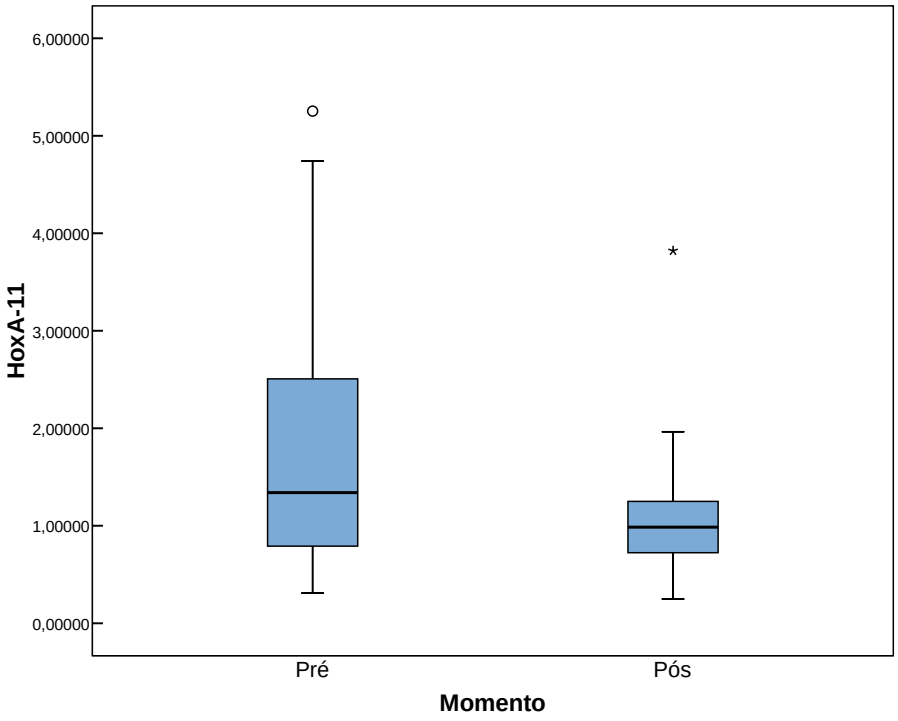

Tabela 13 - Valores de média, desvio-padrão, mediana, mínimo e máximo da expressão relativa do receptor de estrogênio nos momentos pré e pós-embolização

Escore	n	Média	dp	Mínimo	Máximo	Mediana	p*
Pré	24	2,58	2,28	0,30	9,55	2,25	0,753
Pós	24	2,76	2,17	0,33	9,37	2,12	

(*) nível descritivo de probabilidade do teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

Na tabela 13, observamos que não há alteração significativa da expressão relativa do Receptor de Estrogênio do momento pré para o momento pós-embolização.

Tabela 14 - Valores de média, desvio-padrão, mediana, mínimo e máximo da expressão relativa do receptor de progesterona nos momentos pré e pós-embolização.

Escore	n	Média	dp	Mínimo	Máximo	Mediana	p*
Pré	25	1,53	1,52	0,12	4,67	1,10	0,600
Pós	25	1,54	1,52	0,28	7,61	1,20	

(*) nível descritivo de probabilidade do teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

Na tabela 14, observamos que não há alteração significativa da expressão relativa do Receptor de Progesterona do momento pré para o momento pós-embolização.

5 DISCUSSÃO

O leiomioma do útero é o tumor pélvico mais comum nas mulheres, e como tal, trás frequentemente grandes prejuízos à qualidade de vida dessa pacientes. O desenvolvimento de um tratamento seguro, eficaz e menos invasivo, que possibilite o retorno das pacientes às suas atividades diárias com maior brevidade, foi sempre um objetivo dos profissionais que desenvolvem seu trabalho nesta área da medicina.

A Embolização do Mioma Uterino (EAU) cumpre em parte com esse papel. Esta modalidade terapêutica além de ser menos invasiva que os procedimentos cirúrgicos, trata de uma única vez todos os nódulos de leiomioma presentes no útero, é eficaz no controle dos sintomas e requer um menor período de afastamento das atividades sociais e profissionais. Porém, este procedimento não está livre dos efeitos colaterais indesejados como, necrose e expulsão de nódulos submucosos, infecção, alteração da irrigação ovariana, entre outros (RAVINA et al., 1999).

Um dos grandes questionamentos está no efeito que a EMU teria sobre o endométrio e, principalmente, se as possíveis modificações no endométrio das mulheres submetidas a esse procedimento implicariam em redução da fertilidade.

A avaliação da principal função endometrial, sua receptividade ao embrião, através do estudo da expressão de determinados genes

relacionados a esse fenômeno, já configura uma prática freqüente na literatura médica.

Alguns genes expressos nas células endometriais têm seu papel determinado na complexa interação entre o embrião e o útero, viabilizando uma adequada interação do tecido endometrial ao concepto.

SERAFINI et al., em 2008, estudou a expressão de LIF no endométrio de pacientes inférteis e determinou uma relação direta entre a expressão desse gene e o prognóstico do tratamento por fertilização *in vitro*.

Da mesma forma, buscamos através do presente estudo, avaliar a ação da EMU na expressão de determinados genes, sendo estes os mais frequentemente relacionados à receptividade endometrial na literatura.

Selecionamos um grupo de mulheres portadoras de leiomioma, homogêneo quanto aos sintomas e idade, e colhemos amostra do endométrio na segunda fase do ciclo menstrual para analisarmos a expressão desses genes mediante ao mesmo regime hormonal, pré e pós EMU.

Uma dificuldade no desenvolvimento de trabalhos envolvendo pacientes com leiomioma uterino é a homogeneidade quanto ao volume do útero e apresentação espacial dos nódulos em relação a esse órgão. Esse fato é minimizado nos resultados, quando observamos uma ação uniforme do tratamento por EMU, refletido através do decréscimo volumétrico semelhante entre todas as pacientes (média de redução do volume de 45,03%).

Outro fato que demonstra a efetividade do procedimento de EMU, no grupo estudado é a redução significativa dos sintomas relacionados ao leiomioma do útero ($p<0,001$). Essa avaliação da sintomatologia se deu através de um escore previamente testado e de uso diário em nossa prática ambulatorial.

Uma característica importante em nossa casuística é o envolvimento de pacientes nuligestas e pacientes com antecedentes de gestação levadas ao termo, dessa forma, podemos afastar a presença de características particulares àquelas pacientes portadoras de infertilidade primária, que influenciariam os resultados desse estudo.

Para a avaliação da expressão dos genes determinados, nos valemos de técnicas de RT-PCR extremamente modernas e igualmente praticadas em outros grandes centros de pesquisa, que dão segurança aos resultados apresentados.

Apenas uma paciente foi excluída por inadequação da amostra, o que reflete um processo adequado de coleta e armazenagem do material.

A análise da expressão de LIF antes e após o procedimento de EMU, mostrou uma redução significativa ($p=0,005$), levando a inferirmos que este tratamento influenciou direta ou indiretamente na expressão desse gene.

A expressão do gene LIF parece ter importante papel na receptividade endometrial, estando presente tanto no blastocisto quanto no endométrio, além de estar subexpresso em pacientes inférteis (LEDEE-BATAILE et al., 2002; LEI et al., 2004).

Outro gene que apresentou decréscimo significativo em sua expressão após a EMU foi a IL-11 (p=0,001). Este gene tem sua participação comprovada na receptividade endometrial, fazendo parte da mesma família do gene LIF e parecendo ter sinergismo em suas ações (BILINSKI et al., 1998; HEINRICH et al., 1998). LIF e IL-11 são os genes mais estudados relacionados ao processo de adesão do blastocisto ao endométrio.

A expressão do gene HoxA-11 também foi reduzida significativamente (p=0,021) após o procedimento de EMU em nosso estudo. Já seu co-familiar, HoxA-10, apresentou redução de expressão, porém não de forma significativa (p=0,054). Estes genes estão relacionados ao processo de implantação embrionária e desenvolvimento estrutural do útero (BENSON et al., 1996; LIM et al., 1999).

A claudina-4, outro gene que tem sua participação já determinada no processo de receptividade endometrial, teve sua expressão aumentada após EMU, porém não de forma significativa (p=0,954).

Sabe-se que a claudina-4 tem importante papel no desenvolvimento de junções oclusivas no endométrio e está superexpressa na primeira metade da fase lútea do ciclo menstrual, sugerindo fortemente estar relacionada à implantação embrionária adequada (CARSON et al., 2002; TALBI et al., 2006). Por outro lado, Serafini et al., em 2009, observaram que um aumento excessivo na expressão de claudina-4, estava inversamente relacionada ao sucesso do procedimento de fertilização *in vitro*,

provavelmente por alteração da porosidade das junções oclusivas estabelecidas entre células endometriais e embrionárias, levando a distúrbios eletrolíticos.

A expressão do gene IL-6 não apresentou modificação significativa após o procedimento de EMU (p=0,841). Esse gene está superexpresso no período peri-implantacional e seu receptor pode ser encontrado tanto no blastocisto quanto no endométrio, relacionando positivamente a expressão de Il-6 ao mecanismo de implantação embrionária (NISHINI et al., 1990).

A expressão dos genes do receptor de estrogênio e progesterona se manteve estável após a EMU (p=0,753 e p=0,600). Este dado nos mostra que o endométrio permanece igualmente responsivo aos hormônios esteroidais, mesmo após o procedimento. Além disso, podemos constatar que as amostras foram colhidas em fase semelhante antes e após a embolização, já que a expressão desses genes é variável ao longo do ciclo menstrual.

A alteração da expressão de alguns genes observada neste estudo, mesmo que sabidamente relacionados ao processo de receptividade endometrial, não nos permite concluir sobre o futuro reprodutivo das pacientes tratadas através da EMU, já que esse mecanismo de interação entre o embrião e o endométrio materno é envolto em uma complexidade tal, que apenas nos cabe admitir que conhecemos uma pequena parte desse processo. Muitos fatores compensatórios podem estar presentes nesse fenômeno.

Este estudo trás mais algumas informações relevantes para esse universo de interações moleculares ainda não totalmente desvendado, que ao longo da evolução vem garantindo a perpetuação das espécies, e abre margem para novos trabalhos científicos.

6 CONCLUSÕES

- A expressão dos genes LIF, IL-11 e HoxA-11 no endométrio apresentou decréscimo significante após a embolização do mioma uterino.

- A expressão dos genes IL-6, claudina-4, Hoxa-10, receptor de estrogênio e receptor de progesterona no endométrio não se alterou de modo significativo após a embolização do mioma uterino.

7 ANEXOS

Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética HC/FMUSP

HC

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 05/08/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0771/09**, intitulado: "**AVALIAÇÃO DA RECEPTIVIDADE ENDOMETRIAL APÓS EMBOLIZAÇÃO SELETIVA DAS ARTÉRIAS UTERINAS PARA TRATAMENTO DO LEIOMIOMA**" apresentado pelo Departamento de **OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Nilo Bozzini**
Pesquisador (a) Executante: **Sandro Hilário Garcia**

CAPPesq, 06 de Agosto de 2009

PROF. DR. CLAUDIO LEONE
Vice - Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo – SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

Anexo 2 Aprovação Comitê Hospital Albert Einstein

ALBERT EINSTEIN
INSTITUTO ISRAELITA DE
ENSINO E PESQUISA

São Paulo, 06 de julho de 2009

Processo CEP/Einstein 09/1129 **CAAE: 0109.0.028.000-09**

Título: Avaliação da receptividade endometrial após embolização seletiva das artérias uterinas para tratamento do leomioma.

Investigador Responsável: Dr. Sandro Garcia Hilario

Ilmo. Sr.
Dr. Sandro Garcia Hilario

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein **analisou** e **aprovou** o projeto de pesquisa supracitado, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Aproveitamos a oportunidade para orientar o pesquisador sobre os seguintes itens:

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2d).

- O Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res.CNS 196 Item III. 3z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.

Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein
Av. Albert Einstein, 627 – Morumbi – São Paulo – SP – 05651 901 – Brasil
Tel: (55 – 11) 3747 0291 *Fax: (55 – 11) 3747 0273*
Internet: www.einstein.br *e-mail: cep@einstein.br*

Anexo 2 Aprovação Comitê Hospital Albert Einstein

ALBERT EINSTEIN
INSTITUTO ISRAELITA DE
ENSINO E PESQUISA

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido
(mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97. item III.2.e).

- Relatórios parciais e finais devem ser apresentados ao CEP, inicialmente em dezembro de 2009.

Atenciosamente,

Comitê de Ética em Pesquisa
CEP/Einstein

Prof. Dr. José Pinus
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
do Hospital Israelita Albert Einstein

Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein
Av. Albert Einstein, 627 – Morumbi – São Paulo – SP – 05651 901 – Brasil
Tel: (55 – 11) 3747 0291 Fax: (55 – 11) 3747 0273
Internet: www.einstein.br e-mail: cep@einstein.br

Anexo 3 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: .:.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : .M □ F □

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE .....

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

2.RESPONSÁVEL LEGAL .....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M □ F □

DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....

ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE: .....

CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA **AVALIAÇÃO DA RECEPTIVIDADE ENDOMETRIAL APÓS EMBOLIZAÇÃO SELETIVA DAS ARTÉRIAS UTERINAS PARA TRATAMENTO DO LEIOMIOMA**

2.PESQUISADOR : SANDRO GARCIA HILÁRIO

CARGO/FUNÇÃO: MÉDICO INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 100.1780

UNIDADE DO HCFMUSP: ICHC - GINECOLOGIA

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO □ RISCO MÉDIO X

RISCO BAIXO □ RISCO MAIOR □

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 ANOS

1 – Você está sendo convidada a participar de uma pesquisa cujo objetivo é avaliar algumas características do endométrio (camada interna do útero) de pacientes que se submetem a embolização das artérias uterinas, tratamento que você fará para o mioma do útero no Hospital Israelita Albert Einstein. Esses parâmetros estudos estão relacionados com a capacidade da paciente engravidar com sucesso.

2 – Para essa avaliação, será colhida uma amostra através de aspiração do endométrio antes da realização da embolização e outra amostra semelhante 3 meses após o procedimento de embolização das artérias uterinas. Essa coleta será realizada no Ambulatório de Mioma do Hospital das Clínicas, local onde você já é atendida, pelo Dr. Sandro Garcia Hilário. O material obtido com essa aspiração será guardado no laboratório para posterior avaliação através de técnica apropriada, visando analisar alguns parâmetros que talvez se modifiquem com a embolização. Essa coleta, antes e depois da embolização das artérias uterinas, é parte dessa pesquisa, não sendo realizada de rotina em todas as pacientes que fazem um procedimento semelhante.

3 – A coleta da amostra de aspirado endometrial é feita da seguinte forma: coloca-se a paciente em posição ginecológica e introduz-se o espéculo na vagina (mesma maneira que é feita para coleta do Papanicolaou). Faz-se a limpeza da vagina com produto adequado para tal. Então coloca-se uma sonda de calibre fino (como se fosse um pequeno canudo) dentro do canal cervical (canal de abertura do útero – por onde passa a menstruação). Dessa forma, aspira-se para dentro de uma seringa o conteúdo da cavidade uterina (aproximadamente 3 mL), e retira-se a sonda e o espéculo.

4 – Durante a aspiração a paciente pode sentir cólicas, que passam logo após a coleta.

5 – Esse procedimento não traz benefício imediato à paciente. Somente ao final do estudo poderemos, comparando as amostras antes e depois da embolização, de diversas pacientes, concluir sobre os efeitos da embolização das artérias uterinas nessas moléculas estudadas.

6 – Você pode optar por não realizar a coleta da amostra e fazer a embolização das artérias uterinas normalmente.

7 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr SANDRO GARCIA HILÁRIO. que pode ser encontrado no endereço Rua Enéas de Carvalho Aguiar, 255 – Pinheiros – Tel. 3069-6000. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br e Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Israelita Albert Eisntein na Av. Albert Einstein, 627 - 2ss - Morumbi - São Paulo - 05652-000 - Tel.: (11) 3747-0291

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;
9 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;
10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;
11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.
12 – Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.
13 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informada a respeito do assunto que li, ou que foi lido para mim, descrevendo o estudo" AVALIAÇÃO DA RECEPTIVIDADE ENDOMETRIAL APÓS EMBOLIZAÇÃO SELETIVA DAS ARTÉRIAS UTERINAS PARA TRATAMENTO DO LEIOMIOMA"
Eu discuti com o Dr.Sandro Garcia Hilário sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de

esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

---------- Data ___/___/___

Assinatura do paciente/representante legal

_____ Data ___/___/___

Assinatura da testemunha

(*Somente para o responsável do projeto*)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

_____ Data ___/___/___

Assinatura do responsável pelo estudo

8 REFERÊNCIAS

ACOG Committee on Gynecologic Practice. *Obstet Gynecol*. 2009;114:1156-1158.

Alelez JP. Single-stage total hysteroscopic myomectomies: indications, techniques and results. *Fertil Steril*. 1995; 63:703-8.

Benson GV, Lim H, Praria BC. Mechanisms of reduced fertility in Hoa-10 mutant mice: uterine homeosis and loss of maternal Hoxa-10 expression. *Development*. 1996;122:2687-96.

Bilinsk P, Roopenian D, Gossler A. Maternal IL-11 Ralpha function is required for normal deciduas and fetoplacental development in mice. *Genes Dev*. 1998; 12(14):2234-43.

Bozzini N, Rodrigues CJ, Petti DA, Bevilacqua RG, Gonçalves SP,Pinotti JA. Effects of treatment with gonadotrophin releasing hormone agonist on the uterine leiomyomata structure. *Acta Obstet Gynnecol Scand*. 2003;82:330-4.

Carson DS, Largow E, Thathiah A, Al-Shimi R, Farach-Carson MC, Vernon M, Yuan L, Fritz MA, Lessey B. Changes in gene expression during early to mind luteal (receptive phase) transition in human endometrium detected by high density microarray screening. *Mol Human Reprod*. 2002; 8:871-9.

Chaouat G, Lappree-Delage G, Dubanchet S, Zourbas S, Sandra O, Martal J. Rproductive Immunology: ressessing the TH1/TH2 paradigm? *Immunol Lett*. 2004;92:207-14.

Chen DB, Hilsenrath R, Yang ZM, Le SP, Kim SR, Chuong CJ, Poindexter NA, Harper MJ. Leukemia inhibitory factor in human endometrium during the menstrual cycle: cellular origin and action on production of glandular epithelial cell prostaglandin in vitro. *Human Reprod*. 1995; 10: 911-8.

Chen JR, Cheng JG, Shatzer T, Swell L, Hernandez L, Stewart CL. Leukemia Inhibitory factor can substitute for nidatory estrogen and is essential to inducing a receptive uterus for implantation but is not essential for subsequent embryogenesis. *Endocrinology*. 2000;141(12): 4365-72.

Chiesa AG, Hart WR. Uterine artery embolization of leiomyomas with trisacryl gelatin microspheres (TGM): pathologic features and comparison with

polyvinyl alcohol emboli. [Case Reports. Journal Article] *International Journal of Gynecological Pathology*. 2004;23(4):386-92.

Chua GC. Wilsher M. Young MP. Manyonda I. Morgan R. Belli AM. Comparison of particle penetration with non-spherical polyvinyl alcohol versus trisacryl gelatin microspheres in women undergoing premyomectomy uterine artery embolization. [Clinical Trial. Controlled Clinical Trial. Journal Article] *Clinical Radiology*. 2005;60(1):116-22.

Daftary GS, Taylor HS. Molecular markers of implantation: clinical implications. *Current Opinion Obst Gynecol*. 2001;13:269-74.

Davids A. Myomectomy: surgical techniques and results in a series of 1150 cases. *Am J Obst Gynecol*. 1952; 63:592-604.

Dimitriades E, White CA, Jones RL, Salamonsen LA. Cytokines, chemokines and growth factor in endometrium related to implantation. *Hum Reprod Update*. 2005;11:613-30.

Dimitriadis E, Robb L, Liu YX, Enders AC, Martin H, Stoikos C, Wallace EM, Salamonsen LA. IL-11 and IL-11 Ralpha Immunolocalisation at primate implantation sites supports a role for IL-11 in placentation and fetal development. *Reprod Biol Endocrinol*. 2003; 11:34.

Dominguez F, Pellicer A, Simon C. The chemokine connection: hormonal and embryonic regulation at the human maternal-embryonic interface – a review. *Placenta*. 2003;24(Suppl B):S48-S55.

Du XX, Willians DA. Interleukin-11: a multifactorial growth factor derived from the hematopoietic microenvironment. *Blood*. 1994;83: 2023-30.

Dueholm M, Lundorf E, Sorensen JS, Ledetoug S, Olesen F, Lauresen H. Reproducibility of evaluation of the uterus by transvaginal sonography, hysterographic examination, hysteroscopy and magnetic resonance imaging. *Hum Reprod*. 2002; 17:195-200.

Duval D, Reinhardt B, Kedinger C, Boeuf H. Role of supressors of cytokine signaling (Socs) in leukemia inhibitory factor (LIF)-dependent embryonic stem cell survival. *FASEB Journal*. 2000;14:1577-84.

Gemzell-Danielsson K, Swahn M-L. The effects of various doses of milepristone on endometrial leukemia inhibitory factor in the midluteal phase – an immunohistochemical study. *Hum Reprod*. 1997;12:1293-7.

Goodwin S, Vedanthan S, mclucas B, Forno A, Perrella R. Preliminary experience with uterine artery embolization for uterine fibroids. *JVIR*. 1997;8:517-26.

Gullinan EB, Abbondanzo SJ, Anderson OS, Pollard JW, Lessey BA, Stewart CL. Leukemia inhibitoy factor (LIF) and LIF receptor expression in human endometrium suggests a potential autocrine/paracrine function in regulating embryo implantation. *PNAS*. 1996; 93: 3115-20.

Haney AF. Clinical decision making regarding leiomyomata: What we need in the next millennium. *Env Health Perspec*. 2000; 108: supplement 5.

Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6 type cytokine dignalling and its regulation. *Biochem J*. 2003; 374:1-20.

Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Graeve L. Interleukin-6-type cytocine signaling though the gp 130/Jak/STAT pathway. *Biochem J*. 1998;334:297-314.

Herrler A, von Rango U, Beier HM. Embryo-maternal signaling: how the embryo starts talking to its mother to accomplish implantation. *Reprod Biomer Online*. 2003; 6:244-56.

Hsieh-Li HM, Witte DP, Weinstein M. Hoxa11 structure, extensive antisense transcription, and function in male and female fertility. Development. 1990;121:1373-85.

Hutchins, F.L.; Worthington-Kirsch, R.L.; Berkowitz, R.P. Selective uterine artery embolization as a primary treatement for symptomatic leiomyomata uteri. *J Am Assoc Gynecol Laparos***.** 1999;6: 279-84.

Karpovich N, Chobotava K, Carver J, Heath JK, Barlow DH, Mardon HJ. Expression and function of interleukin-11 and its receptor alpha in the human endometrium. Mol Hum Reprod. 2003; 9(2): 75-80.

Katsumori T. Nakajima K. Mihara T. Tokuhiro M. Uterine artery embolization using gelatin sponge particles alone for symptomatic uterine fibroids: midterm results. [Journal Article] AJR. Am J Roentgenology. 2002;178(1):135-9.

Kralickova M, Sima R, Vanecek T, Sima P, Rokyta Z, Ulcova-Gallova Z, Sucha R, Uher P, Hess O. Leukemia Inhibitory factor gene mutations inthe population of infertile women are not restricted to nulligravid patients. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2006; 127:231-5.

Krumlauf R. Hox genes in vertebrate development. *Cell*. 1994;78:191-201.

Kurosawa K, Isemura M, Yamaguchi Y, Yosizawa Z, Furuyama T, Yoshinaga K. Changes in distribution of connective tissue components of human placentae with maturation. *Tohoku J Exp Med*. 1985;147(3): 261-5.

Laird Sm, Li TC, Bolton AE. The production of placental protein 14 and ilterleukin 6by human endometrial cells in culture. *Hum Reprod*. 1993;8:793-8.

Laird SM, Tuckerman EM, Dalton CF, Dunphy BC, Li TC, Zhang X. The production of leukemia inhibitory factor by human endometrium: presence in uterine flushings and production by cells in culture. *Hum Reprod*. 1997;12:569-74.

Ledee-Bataille N, Lapree-Delage G, Taupin JL, Dubanchet S, Frydman R, Chaouat G. Concentration of leukemia inhibitory factor (LIF) in uterine flushing fluid is highly predictive of embryo implantation. *Hum Reprod*. 2002;17:213-8.

Lei T, Yang ZQ, Xia T, Chen ZD, Yuan JH, Zhu Y. Stage-specific expression of leukemia inhibitor factor and its receptor in habbit pre-implantation embryo and uterine epithelium during early pregnancy. *Reprod Domest Anim*. 2004;39:13-8.

Lim H, Ma L, Ma WG. Hoxa-10 regulates uterine stromal cell responsiveness to progesterone during implantation and decidualization in the mouse. *Mol Endoc*. 1999;13:1005-17.

Marwood M, Visser K, Salamonsen LA, Dimitriadis E. Interleukin-11 and leukemia inhibitory factor regulate the adhesion of endometrial epithelial cells: implications in fertility regulatin. *Endocrinology*. 2009;150(6): 2915-23.

Mc Lucas B, Goodwin S, Adler L, Rappaport A, Reed R, Perrella R. Pregnancy following uterine fibroid embolization. *Int J Gynaecol Obstet*. 2001; 74:1-7.

Messina M.L. Função ovariana em pacientes portadoras de leiomioma uterino submetidas à embolização das artérias uterinas. São Paulo, 2004. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Messina. M.L. A embolização das artérias uterinas no tratamento do leiomioma uterino. São Paulo, 2002. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Nishini E, Matsuzaki K, Kameda T, Taniguchi T, Takagi T, Saji F, Tanizawa O. Trphoblast-derived interleukin-6 (IL-6) regulates human chorionic

gonadotropin release though IL-6 receptor on human trophoblasts. *J Clin Endocrinol Metab*. 1990;7:736-41.

Ozaki K, Leonard WJ. Cytokine and cytokine receptor pleiotropy and redundancy. J Biol Chen. 2002;277:29355-8.

Parker WH. Etiology, symptomatology and diagnosis of uterine myomas. *Fertil Steril*. 2007;87(4):725-36.

Perrier d'Hauterive S, Chalet-Renard C, Berndt S, Dubois M, Munaut C, et al. Human chronic gonadatropin and growth factors at the embryonic-endometrial interface control leukemia inhibitor factor (LIF) and interleukin 6 (IL-6) secretion by human endometrial epithelium. *Hum Reprod*. 2004;19:2633-43.

Rajan DK, Margau R, Kroll RR, Simons ME, Tan KT, Jaskolka JD, Kashura JR, Sniderman KW, Beekroft JR, Haider M. Clinical utility of ultrasound versus magnetic resonance imaging for deciding to proceed with uterine artery embolization for presumed symptomatic fibroids. *Clin Radiol*. 2011;66(1):57-62.

Ravina J, Bouret J, Ciraru-Vigneron N, et al. Aplication of particulate arterial embolization in the treatment of uterine fibromyomata. *Bull Natl Med*. 1997;181:233-43.

Ravina J, Herbreteau D, Ciraru-Vigneron N, et al. Arterial embolization to treat uterine myomata. *Lancet*. 1995;346:671-2.

Ravina, JH.; Ciraru-Vigneron, N.; Aymard, A.; Ferrand, J.; Merland, J.J. Uterine artery embolisation for fibroids disease: results of a 6 years study. Min invas Ther & Allied Technol. 1999;8:441-7.

Ravina JH, Ciraru-Vigneron N, Aymard A, Le Dref O, Merland JJ. Pregnancy after embolization of uterine myoma: report of 12 cases. *Fertil Steril*. 2001;73:1241-3.

Robb L, Li R, Hartley L, Nandurkar HH, Koentgen F, Begley CG. Infertility in female mice lacking the receptor for interleukin 11 is due to a defective uterine response to implantation. *Nat Med*. 1998;4(3):303-8.

Robertson AS, O'Connell A, Ramsey A. The effect of interleukin-6 deficiency on implantation, fetal development and parturition in mice. *Proc Aust Soc Reprod Biol*. 2000;31:97.

Sands Be, Bank S, Sninsky CA, Robinson M, Katz S, Singleton JW, Miner PB, Safdi MA, Galandiuk S, Hanauer Sb. Preliminary evaluation of safety and

activity of recombinant human interleukin 11 in patients with active Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1999;117:58-64.

Schafer-Somi S. Cytokines during early pregnancy of mammals: a review. *Anim Repro Scie*. 2003;75:73-94.

Schneeberger EE, Lynch RD. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell*. 2004;286:1213-28.

Schwartz SM. Epidemiology of uterine leiomyomata. *Clin Obstet Gynecol*. 2001;44(2):316-26.

Serafini P, Rocha AM, osório CT, Silva I, Motta EL, Baracat EC. Endometrial leukemia inhibitory factor as predictor of pregnancy after in vitro fertilization. *Inter J Gynecol Obstet*. 2008;102:23-7.

Serafini PC, Silva IDCG, Smith GD, Motta ELA, Rocha AM, Baracat EC. Endometrial claudin-4 and leukemia inhibitory factor are associated with assisted reproduction outcome. *Reprod Biol Endoc*. 2009;7:30-9.

Sherwin JR, Smith SK, Wilson A and Sharkey AM. Solube gp 130 is up-regulated in the implantation window and shows altered secretion in patients with primary unexplained infertitlity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87:3953-60.

Shimomura Y, Ando H, Furugori K, Kajiyama H, Suzuki M, Iwase A, et al. Possible involvement of crostalk cell-adhesion mechanism by endometrial CD26/dispeptidyl peptidase IV and embryoanl fibronectin in human blastocyst implantation. *Mol Hum Reprod*. 2006;12(8):491-5.

Spies JB, Allison S, Flick P, Cramp M, Bruno J, Jha RC, Ascher SA. Spherical plyvinyl alcohol versus Tris-acryl gelatin micorspheres for uterine artery embolization for leiomyomas: results of a limited randomized comparative study. *J Vasc Interv Radiol*. 2005;16:1431-7.

Spies JB, Roth Ar, Gonsalves SM, Murphy-Skrzyniarz KM. Ovarian function after uterine artery embolization for leiomyomata: Assessment with use of serum follicle stimulating hormone assay*. J Vasc Interv Radiol.* 2001;12:437-42.

Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Kontgen F, et al. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature*. 1992;359(6390):76-9.

Stewart EA. Uterine fibroids. *Lancet*. 2001;357:293-8.

Stoikos C, Dimitriadis e, Stafford-Bell MA, Kovacs G, Salamonsen LA. Immunolocalisation of interleukin 11 and its receptor in endometrium of infertile women during the implantation window. *Reprod Fertil Dev*. 2003;15:31.

Tabbzadeh S, Kong QF, Babaknia A, Mary LT. Progressive rise in the expression of interlukin-6 in human endometrium during menstrual cycle is initiated during the implantation window. *Hum Reprod*. 1995;10:2793-9.

Takamizawa,S, Minakami H, Usui R, Nogushi S, Ohwada M, Suzuki M, Sato I. Risk of complications and uterine malignancies in women undergoing hysterectomy for presumed benign leiomyomas. *Gynecol Obstet Invest*. 1999;48:193-6.

Talbi S, Hamilton AE, Vo KC, Overgaard MT, Dosiou C, Le Shay N, Nezhat CN, Kempson R, Lessey BA, Nayak NR, Giudice LC. Molecular phenotyping of human endometrium distinguishes menstrual cycle phases and underlying biological processes in normo-ovulatory women. *Endocrinology*. 2006;147:1097-121.

Tomida M, Yamamoto-Yamaguchi Y, Hozumi M. Purification of a factor inducing differentiation of mouse myeloid leukemia M1 cells from conditional medium of mouse fibroblast L 929 cells. *J Biol Chen*. 1984; 259:10978-82.

Tropeano G, Litwicka K, Di Stasi C, Romano D, Mancuso S. Permanent amenorrhea associated with endometrial atrophy after uterine artery embolization for symptomatic uterine fibroids. *Fertility & Sterility*. 2003;79(1):132-5.

Tseng JF, Ryan IP, Milam TD, Murai JT, Schriock ED, Landers DV, Taylor RN. Interleukin-6 secretion in vitro is up-regulated in ectopic and eutopic endometrial stromal cell from women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996;81:1118-22.

Tsukita S, Furuse M. Pores in the wall: claudins constitute tight junction strands containing aqueos pores. *J Cell Biol*. 2000;149:13-6.

Vandermolen DT, Gu Y. Human endometrial interleukin-6 (IL-6): in vivo messenger ribonucleic acid espression, in vitro protein production, and stimulation thereof by IL-1 beta . *Fertil Steril*. 1996; 66:741-7.

Vercellini P, Maddalena S, DeGiorgi O, Aimi G, Crosignaini PG. Abdominal myomectomy for infertility: a comprehensive review. *Hum Reprod*. 1998; 13:873-9.

Von Wolff M, Stieger S, Lumpp K, Bucking J, Strowitzki T, Thaler CJ. Endometrial Interleukin-6 in vitro is not regulated directly by female steroids hormones, but by pro-inflamatory citokynes and hypoxia. *Mol Hum Reprod*. 2002; 8:1096-102.

Wang X, Matsumoto H, Zhao X, Das SH, Paria BC. Embryonic signals direct the formation of tight junctional permeability barrier in the decidualizing stroma during embryo implantation. *J Cell Scienc*. 2004;117:53-62.

Zenclussen AC, Blois S, Stumpo R, Olmos S, Arias K, Malan BI, Roux ME, Margini RA. Murine abortion is associated with enhanced interleukin-6 levels at the feto-maternal interface. *Cytokine*. 2003;24:150-60.