

4 CASUÍSTICA E MÉTODO

4.1 Casuística

Foram selecionadas no ambulatório de Ginecologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, no período de 1994 a 1998, 67 mulheres portadoras de leiomioma uterino e estudadas segundo critérios clínicos, ultra-sonográficos e laboratoriais.

4.1.1 Critérios de inclusão

- Idade: 20 a 39 anos;
- Leiomiomatose uterina;
- Nuligestas.

4.1.2 Critérios de exclusão

- gravidez;
- doenças crônicas ou agudas;
- submetida a tratamento hormonal nos últimos 3 meses.

4.1.3 Pacientes

As pacientes foram divididas em dois grupos:

Grupo I: pacientes submetidas ao tratamento com análogos do GnRH (Goserelin) por um período de seis meses, a cada 28 dias e submetidas a

miomectomia no sexto mês de tratamento (tabela 1);

Grupo II (controle): pacientes submetidas a miomectomia sem uso prévio de análogo do GnRH (tabela 2).

As características das pacientes dos grupos I e II estão demonstradas nas Tabelas 1 e 2. A média etária das pacientes dos grupos I e II foi respectivamente de 33,9 e de 33,5 anos, ambas com variação de 24 a 39 anos.

TABELA 1: GRUPO I - PACIENTES QUE RECEBERAM ANÁLOGO DO GnRH

Registro	Idade	Número lâmina
2756842e ****	33	291431.00
2862075j ****	38	146283.00
2874288b ****	36	157338.00
2882644f ****	26	154111.00
2481235b ****	38	197910.00
2876959e ****	26	182870.00
2534361a ****	34	187153.00
2863465c ****	38	190441.00
2205348a ****	39	217089.00
3024792h ****	39	200167.00
2860840b ****	39	211156.00
5029716i ****	35	211677.00/345070.00
2992053d ****	38	280597.00
2998022f ****	36	224531.00
3031779e ****	34	215895.00
3000815b ****	35	XXX
2816978c ****	33	226718.00
2819746g ****	36	230347.00
3064221d ****	34	234228.00
3070965g ****	33	249676.00
3009638k ****	37	256157.00
3082506b ****	33	250473.00
3084911k ****	35	247641.00
3089139d ****	25	253978.00
3109968e ****	35	26565.00
3093115e ****	31	262361.00
3023881b ****	34	269056.00/326582.00
3126051j ****	35	271523.00
3105293e ****	35	277432.00
2654205k ****	24	302735.00
3169261d ****	32	323768.00

média etária: 33,9 anos

TABELA 2: GRUPO II - PACIENTES QUE NÃO RECEBERAM ANÁLOGO DO GnRH

Registro	Idade	Número lâmina
2264144-D	38	196319.00
2325621-E	26	190633.00
2986591-D	33	263127.00
2079318-F	36	225048.00
2922526-J	34	242069.00
3132120-H	39	255821.00
3008891-G	26	255209.00
2625604-I	38	259028.00
3104046-H	32	266615.00
2073976-G	38	262116.00
2382849-F	32	273665.00
2193317-G	31	274790.00
2986539-C	39	278867.00
2379588-K	32	279421.00
2950415-J	35	279518.00
2436884-B	39	283221.00
2654918-J	39	284324.00
2919050-I	32	286412.00
3174656-E	38	295540.00
3177007-F	36	299412.00
5091680-G	35	301818.00
2882644-F	32	301998.00
3163620-I	33	304311.00
2986424-D	34	308580.00
2060774-C	36	308989.00
2771127-C	31	309711.00
3157391-G	33	315628.00
3161129-H	26	318210.00
3189722-E	24	318060.00
3209582-C	35	311237.00
2836892-F	32	314996.00
3221050-G	33	322701.00
2998493-A	36	323106.00
3184088-A	35	340354.00
3138526-K	34	270133.00
3089207-K	31	239741.00

média etária: 33,5 anos

Após 6 meses do uso de análogo de GnRH, (goserelin) constatou-se pela ultra-sonografia diferentes reduções volumétricas do conjunto útero-leiomios, o que motivou a divisão do grupo I em 2 subgrupos: Ia e Ib. O subgrupo Ia apresentou os casos que tiveram redução igual ou inferior a 36% (tabela 3), enquanto que o

subgrupo Ib constituiu-se daqueles com redução acima deste valor (tabela 4).

- **Tabela 3: GRUPO Ia - Pacientes que ao ultra-som apresentaram redução do conjunto útero-leiomioma igual ou abaixo de 36%**

Registro - HC	vol. Inicial	vol. Final	% redução
	cm3	cm3	
2756842e *****	205,00	169,00	0,17561
2862075j *****	906,00	674,25	0,255795
2882644f *****	534,00	460,00	0,138577
2534361a *****	938,00	663,00	0,293177
2863465c *****	429,00	392,00	0,086247
3024792h *****	688,00	571,00	0,170058
2860840b *****	151,00	105,00	0,304636
2992053d *****	784,00	573,00	0,269133
3000815b *****	606,00	455,00	0,249175
2816978c *****	370,00	339,00	0,083784
3064221d *****	380,00	260,00	0,315789
3009638k *****	1275,00	1015,00	0,203922
3084911k *****	980,00	692,00	0,293878
3109968e *****	221,00	173,00	0,217195
3105293e *****	367,00	238,00	0,351499
3169261d *****	439,00	336,00	0,234624

- **Tabela 4: GRUPO Ib - Pacientes que ao ultra-som apresentaram redução do conjunto útero-leiomioma acima de 36%**

Registro - HC	vol. Inicial cm3	vol. Final cm3	% redução
2874288b ****	966,00	540,00	0,440994
2654205k ****	485,00	262,00	0,459794
3093115e ****	400,00	231,00	0,4225
3023881b ****	750,00	377,00	0,497333
3126051j ****	294,00	171,00	0,418367
3089139d ****	1643,00	848,00	0,483871
3082506b ****	372,00	161,00	0,567204
3070965g ****	338,00	202,00	0,402367
2819746g ****	315,00	199,00	0,368254
2998022f ****	100,00	63,00	0,37
3031779e ****	1516,00	827,00	0,454485
5029716i ****	189,00	53,00	0,719577
2205348a ****	445,80	170,10	0,618439
2481235b ****	191,00	78,00	0,591623
2876959e ****	528,00	315,00	0,403409

A tabela 5 ilustra a porcentagem de redução ao ultra-som do volume do conjunto útero-leiomioma nos subgrupos Ia e Ib.

TABELA 5. PORCENTAGEM DE REDUÇÃO NO GRUPO TRATADO E SEUS SUBGRUPOS REDUÇÃO ACIMA IB E REDUÇÃO ABAIXO IA

	N	Média	D.P.	Mediana	Mínimo	Máximo
Grupo tratado	31	35,03	15,67	35,14	8,37	71,95
Subgrupo redução acima Ib	15	46,12	10,11	45,44	36,62	71,95

Subgrupo redução abaixo Ia	16	22,76	8,00	24,18	8,37	35,14
----------------------------	----	-------	------	-------	------	-------

4.2 Método

4.2.1 Ultra-som

No grupo I, o ultra-som foi realizado antes da primeira aplicação de Goserelin, no terceiro e no sexto mês de tratamento, e no grupo II, previamente a cirurgia.

O aparelho de ultra-som utilizado foi Toshiba modelo Tosbee. O transdutor linear (abdominal) foi de 5mhz e o transdutor endovaginal foi de 6mhz

4.2.2 Exames complementares

Todas as pacientes dos grupos I e II foram submetidas aos exames laboratoriais de rotina: colpocitologia oncótica, hematológico, glicemia e urina tipo I.

4.2.3 Miomectomia

A miomectomia foi realizada até 30 dias após a última aplicação do análogo do GnRH no grupo I, e realizada na primeira fase do ciclo menstrual no grupo II.

4.2.3.1 Técnica Cirúrgica

1. Paciente sob anestesia peridural;
2. Colocação da paciente em posição semiginecológica;
3. Assepsia e antisepsia;
4. Colocação de campos cirúrgicos;
5. Incisão de Pfannenstiel;
6. Abertura por planos;

7. Avaliação dos leiomiomas em relação ao útero;
8. Exérese dos leiomiomas;
9. Sutura com Vicryl 00;
10. Colocação de Surgicell;
11. Revisão da cavidade abdominal;
12. Fechamento por planos.

4.2.4 Exame anatomopatológico

Os nódulos obtidos da miomectomia foram encaminhados para o Serviço de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para confirmação anatomopatológica do leiomioma, em rotina histológica.

Desse material foi selecionado, aleatoriamente, de cada caso, um bloco de parafina, contendo fragmento representativo do tumor. Os blocos foram encaminhados ao Laboratório de Anatomia Médico-Cirúrgica (LIM02) HC-FMUSP e ao Serviço de Anatomia Patológica do HU-USP para estudo da proliferação celular (por meio da expressão do AgNOR), da angiogênese (por meio da expressão do Fator VIII), da quantidade de colágeno, da concentração de células e da expressão dos receptores de estrógeno e progesterona.

4.2.5 Avaliação da expressão dos receptores de estrógeno e progesterona e do fator VIII

4.2.5.1 Preparo das lâminas

A partir dos blocos de parafina contendo fragmento dos nódulos leiomiomatosos, já estudados histologicamente, foram preparadas novas lâminas para análise imuno-histoquímica da expressão do Fator VIII e da expressão de receptores de estrógeno e progesterona. Para tal foram obtidos cortes de 3µm de espessura em micrótomo histológico AOTEC, que foram recolhidos em lâminas de vidro previamente tratadas com 3-Aminopropyl-triethoxy-silane (Sigma A-3648 USA), utilizado para garantir melhor adesão do corte à lâmina.

4.2.5.2 Método Imuno-histoquímico

Após obtenção de cortes com três micrômetros de espessura do espécime incluso em parafina, as lâminas foram deixadas por 24 horas em estufa a 60° centígrados para iniciar a desparafinização, que foi completada com banho em xilol quente e frio. Em seguida, foram submetidas à hidratação em banhos de etanol em graduação decrescente e finalmente água destilada.

A recuperação antigênica realizada para receptores de estrógenos e progesterona iniciou-se após a lavagem das lâminas em água corrente. Depois elas foram mergulhadas em solução de ácido cítrico 0,01M pH 6,0, colocadas no microondas, na potência máxima (700 watts), duas vezes durante 9 minutos cada, expostas à temperatura ambiente por 20 minutos e lavados com água corrente e destilada. Para a expressão do fator VIII foi realizada a digestão enzimática com tripsina 0,5%. A seguir procedeu-se ao bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada (3% - 10 volumes) com quatro banhos de 5 minutos cada.

As lâminas com os espécimes eram lavadas com água corrente e destilada e

com solução salina tamponada com fosfato (PBS-phosphate buffered saline) 0,01M pH 7.4 por 5 minutos.

Os anticorpos (fator VIII, estrógeno e progesterona) foram diluídos em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA) 1% (SIGMA A 9647 USA) e ázida sódica (NaN₃) 0,1%, durante 30 minutos a 37° centígrados e por 16 a 18 horas a 4° centígrados em câmara úmida. As lâminas com os espécimes eram lavadas em tampão PBS com três trocas de 2 minutos cada.

Para o anticorpo secundário biotinizado, a incubação foi realizada com reagente C (biotinylated goat anti-mouse/rabbit Ig) do “Kit” Strept ABCComplex/HRP Duet (mouse/rabbit) (Dako A/S K492 Denmark) no título 1:600, diluído em PBS, por 30 minutos a 37° centígrados, lavando-se após em tampão PBS com três trocas de 3 minutos cada.

Na amplificação, utilizou-se o complexo reagente A (streptavidin) no título 1:600 e o reagente B (biotinylated peroxidase) no título 1:600, diluído em PBS, por 30 minutos a 37° centígrados, lavando-se com tampão PBS com três trocas de 3 minutos cada.

A revelação foi realizada em solução de substrato cromógeno, 60 mg de DAB (3,3 diaminobenzidine-tetrahydrochloride - SIGMA D 5637 USA) e dimetilsulfóxido (SYNTH BRASIL) (DMSO) 1 ml, água oxigenada (6% - 20 volumes) 1 ml, PBS 100 ml. por 5 minutos a 37° ao abrigo da luz. A seguir lavou-se o material em água corrente e destilada por 3 minutos e contracorou-se com hematoxilina de Harris por 1 minuto.

As lâminas com os espécimes foram lavadas novamente em água corrente e destilada, imersas duas vezes em água amoniacal (solução aquosa de hidróxido de

amônia 0,5%) e lavadas outra vez em água corrente e destilada. Em seguida, foram desidratadas em etanol com graduação crescente e montaram-se novas as lâminas com Entellan (Merk 107961, Germany).

4.2.5.3 Avaliação histomorfométrica da expressão dos Receptores de Estrógeno e Progesterona

As lâminas, submetidas à imuno-histoquímica para esses antígenos foram analisadas sob microscópio de luz Zeiss com objetiva de imersão de 100 aumentos e ocular, de 10 aumentos.

Avaliaram-se 500 núcleos de cada lâmina, ou seja, de cada leiomioma. Considerou-se positivo para a expressão desses marcadores, quando o núcleo de contornos precisos era marcado com coloração marrom. Registrou-se, então, a quantidade de núcleos positivos e a de núcleos negativos. Marcações imprecisas e duvidosas foram excluídas.

4.2.6 Avaliação da quantidade de colágeno

Dos fragmentos teciduais dos leiomiomas uterinos emblocados em parafina foram obtidos cortes de 3 micrometros de espessura. Estes cortes foram submetidos a coloração seletiva para fibras colágenas pelo método de Picrosirius (Sirius-Red). A quantificação do colágeno foi realizada através de Sistema Analisador de Imagem (Kontron Eletronic 300). A estação de trabalho consiste de microscópio Zeiss trinocular, 1 vídeo-câmera colorida (SONY CCD - Iris), com placa digitalizadora de imagens, um microcomputador com processador Pentium 133MHz, IBM-PC compatível, operando em ambiente Windows 95[®]-32 bits. As laminas contendo cortes histológicos corados pelo Picrosirius foram analisadas no microscopio de luz

com objetiva de 20x e ocular de 10x. As imagens obtidas em 10 campos microscópicos foram digitalizadas com auxílio do software, proporcionando a possibilidade de compartilhamento de dados com o processador de textos (Microsoft Word[®]) e planilha eletrônica (Microsoft Excel[®]). A utilização deste programa proporcionou a análise, o tratamento, a interpretação e a obtenção de valores de mensuração das estruturas com todas as variáveis e a distribuição automática dos dados, gerados pela estação de análise de imagens, para planilhas eletrônicas e processadores de texto, de maneira automática.

A transmissão óptica foi quantificada afim de se processar e analisar a imagem e para que esta fosse quantificada em suas medidas originais, optou-se por transformar a medida da imagem digitalizada, o Pixel, em medida micrometrada. Para tal utilizamos a calibração de Pixel em micrômetros. A calibração das imagens foi realizada para imagens obtidas em aumentos de 10, 20, 40 e 100 vezes. O fator de calibração (CF) é calculado automaticamente, em pixels e este fator será utilizado pelo software para os cálculos correspondentes em micrômetros. As imagens são analisadas pelo software Kontron 300 (Zeiss) com recursos para determinação de área, volume, comprimento e contagem de partículas, ferramenta que permite identificar determinada estrutura, marca-la e automatizar sua identificação para os procedimentos a serem efetuados em seguida, utilização de filtros, emprego de múltiplas macros para automatização de variadas e múltiplas tarefas.

As lâminas assim preparadas, foram submetidas a este estudo. Após aquisição da imagem com objetiva de 20x e ocular de 10x, utilizamos o recurso de “threshold” para marcar as estruturas a serem quantificadas. Em seguida empregamos um procedimento de macro desenvolvido para: contagem, mensuração e quantificação de

colágeno total existente em cada imagem analisada. Esta rotina, semi-automatizada foi realizada em cada campo da lâmina em estudo - 10 campos por lâmina - e repetida consecutivamente para cada lâmina. Os resultados obtidos em cada campo correspondentes à área percentual de fibras colágenas, ou seja, fração de área foram arquivados em planilha Excel para posterior análise estatística.

4.2.7 Avaliação histomorfométrica da angiogênese

As lâminas, submetidas à imunohistoquímica para este fim, ou seja, a expressão do Fator VIII, que auxilia no reconhecimento dos vasos por meio da avaliação das células endoteliais, foram analisadas sob microscópio de luz Zeiss com objetiva de 20 aumentos e ocular de 10 aumentos. Em cada campo microscópico contou-se o número de vasos marcados e não marcados pela reação imunoenzimática da peroxidase. Um total de 15 campos microscópicos foram analisados e o total de vasos por tecido foi computado, sendo o resultado final a avaliação do número de vasos por campo microscópico.

4.2.8 Avaliação da expressão do AgNOR

4.2.8.1 Preparo das Lâminas

Para a coloração pela prata das proteínas argirófilas das regiões organizadoras nucleolares, as lâminas foram previamente preparadas, banhadas com 3-Aminopropyl-triethoxy-silane (SIGMA A-3648 USA).

Obtiveram-se então, cortes de 3 micrômetros dos espécimes inclusos em parafina e iniciou-se a desparafinação com xilol durante 30 minutos a 60° centígrados e em banhos de etanol com graduação decrescente. As lâminas com os espécimes eram lavadas com água destilada. A seguir gotejou-se uma solução de gelatina a 2% em ácido fórmico a 1% (preparada em estufa a 60° até a sua dissolução) para dois volumes de nitrato de prata a 50%. Essa reação foi realizada em câmara escura,

por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida lavou-se com água destilada a 45° centígrados, intensamente, e desidratou-se em etanol com graduação crescente. Após diafanizar o espécime, montou-se a lâmina com “Balsamo Canadá.”

4.2.8.2 Avaliação histomorfométrica da expressão do AgNOR

As lâminas confeccionadas eram identificadas de acordo com o grupo correspondente. Para essa avaliação utilizou-se o microscópio Zeiss com objetiva de imersão de 100X e ocular de 10X.

Avaliaram-se 200 núcleos em cada espécime. Em cada núcleo quantificou-se e registrou-se o número de regiões coradas pela prata (dots).

4.2.9 AVALIAÇÃO DA CELULARIDADE

A celularidade dos leiomiomas uterinos foi obtida através da análise dos cortes histológicos que foram submetidos a reação de imuno-histoquímica para receptor de progesterona. Estas lâminas foram analisadas sob microscópio de luz Zeiss com objetiva de 100X e ocular de 10X. Foram analisados 10 campos microscópicos escolhidos aleatoriamente. Em cada campo de grande aumento foi computado o número total de células. A celularidade foi dada pelo número de células por campo microscópico de grande aumento.

4.2.10 Método estatístico

Os valores obtidos das diferentes variáveis estudadas foram analisadas por estatística descritiva obtendo-se a média, o desvio padrão, a mediana, o valor

máximo e o valor mínimo. A análise estatística foi realizada em duas etapas. Inicialmente avaliamos a correlação entre as variáveis número de vasos, colágeno, número de células, porcentagem de células positivas para receptor de estrógeno, porcentagem de células positivas para receptor de progesterona e número de dots por células para AGNOR com a porcentagem de redução volumétrica do conjunto útero e leiomioma. Os testes de correlação foram precedidos pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk para todas as variáveis. Quando a hipótese de normalidade foi aceita, testamos as correlações pelo teste de Pearson e quando foi rejeitada pelo teste não paramétrico de Spearman (SIEGEL; CASTELLAN, 1988).

Na segunda etapa, o grupo dos pacientes tratados foi dividido em dois subgrupos, tomando-se como base a porcentagem de redução de 36%, correspondente à mediana deste parâmetro no grupo. Esses subgrupos foram então comparados entre si e com o grupo controle. Esta comparação foi precedida por testes de normalidade de Shapiro-Wilk e testes de homogeneidade de variâncias de Levene. Quando as hipóteses de normalidade e homogeneidade de variâncias foram aceitas, as médias dos três grupos foram comparadas por análise de variância seguida da identificação de diferenças específicas pelos testes de Scheffé. Quando uma ou ambas hipóteses foram rejeitadas a comparação entre médias foi feita pelo teste de Kruskal-Wallis (SIEGEL; CASTELLAN, 1988), seguido da identificação de diferenças específicas por testes não paramétricos de Mann-Whitney (SIEGEL; CASTELLAN, 1988).

Em todas as comparações utilizamos o nível crítico de 0,05. Nos casos dos testes de Mann-Whitney, como se tratava de três comparações este nível crítico foi ajustado, pelo método de Bonferroni, para 0,0167%.

Na apresentação gráfica dos resultados dos subgrupos e do grupo controle utilizamos a representação por gráficos de caixas (*boxplots*). Nesta modalidade, a mediana é representada por uma linha mais carregada. Os limites superior e inferior da “caixa” correspondem aos percentís 25 e 75%. As linhas mais superior e mais inferior correspondem aos valores extremos das amostras respectivas.

Todos os testes foram realizados empregando-se o programa de computador SPSS for Windows®, versão 6.0. As referências sobre os testes e a modalidade de gráfico empregados podem ser encontradas em NORUŠIS (1993)