

Lívia Leni de Oliveira do Nascimento

Detecção de ativina A e folistatina no sangue menstrual: comparação entre mulheres sadias e portadoras de sangramento uterino disfuncional

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina - Saúde da Mulher, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Medicina.

Orientador: Prof. Dr. Fernando M. Reis

Belo Horizonte
2006

Nascimento, Lívia Leni de Oliveira do
N244d Detecção de ativina A e folistatina no sangue menstrual:
comparação entre mulheres sadias e portadores de sangramento
uterino disfuncional/Lívia Leni de Oliveira do Nascimento. Belo
Horizonte, 2006.
55f.
Dissertação.(mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais.
Faculdade de Medicina.
Área de concentração: Saúde da Mulher
Orientador: Fernando M. Reis
1.Menstruação/fisiologia 2.Hemorragia uterina/fisiopatologia
3.Ativinas/sangue 4.Ativinas/análise 5.Folistatina/sangue
6.Folistatina/análise 7.Reprodução/fisiologia 8.Biologia molecular
9.Testes sorológicos I.Título

NLM: WP 550

CDU: 618.17-008.8

Trabalho realizado no Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, com a colaboração da Prefeitura de Belo Horizonte e da Universidade de Siena, Itália.

Apoio Financeiro: CNPq

Agradecimentos

- A Deus;
- Ao professor Dr. Fernando Marcos dos Reis pela orientação prestada;
- Ao meu querido marido Anderson, pela paciência e dedicação;
- Aos meus pais pelo apoio;
- Aos meus filhos Estêvão e Carolina que me enchem o coração de alegria;
- Aos membros da banca e demais professores do mestrado;
- Ao professor Dr. Aroldo Fernando Camargos pela credibilidade;
- Ao Dr. José Augusto pelo incentivo;
- Aos colegas do Posto de Saúde Floramar I, e principalmente pela enfermeira Irene Magela Dias pela disponibilidade na realização do trabalho;
- À Dra. Anastasia Tsigkou, pela colaboração nas dosagens hormonais;
- Aos amigos pela cooperação constante.

Resumo

A ativina A é um fator de crescimento produzido pelo endométrio e a folistatina é a sua proteína ligante que neutraliza a biodisponibilidade da ativina A. A produção endometrial de ativina A aumenta durante a fase secretora do ciclo menstrual. A proposta do presente estudo foi avaliar se a ativina A e a folistatina são mensuráveis no soro do sangue menstrual, e se essas duas proteínas estão alteradas em mulheres com sangramento uterino disfuncional. Avaliamos 15 mulheres (grupo 1) com ciclos menstruais regulares, que inseriram dispositivo intra-uterino (DIU) para contracepção, e comparamos com 12 mulheres com sangramento uterino disfuncional (grupo 2) na unidade Floramar I de atendimento básico da Prefeitura de Belo Horizonte. Ativina A e a folistatina foram medidas no sangue menstrual e periférico usando ensaio-imunoenzimático (ELISA). As concentrações de ativina A foram quatro vezes maiores no soro menstrual que no soro periférico nas mulheres com ciclos normais (média \pm desvio padrão $4,24 \pm 0,19$ vs $1,00 \pm 0,15$ ng/ml), e foram significativamente menores em mulheres com sangramento uterino disfuncional ($2,70 \pm 0,42$ ng/ml e $0,23 \pm 0,03$ ng/ml no sangue menstrual e periférico, respectivamente; $p < 0,001$). As concentrações de folistatina foram oito vezes mais altas no soro do sangue menstrual que no periférico das mulheres com ciclos normais ($3,94 \pm 0,49$ vs $0,49 \pm 0,05$ ng/ml; $p < 0,001$). Os níveis de folistatina foram significativamente, mais baixos no soro menstrual das mulheres com sangramento uterino disfuncional ($1,24 \pm 0,22$ ng/ml) comparado com os controles ($p < 0,01$), mas não no soro periférico ($0,62 \pm 0,09$ ng/ml). Não houve nenhuma correlação entre as concentrações dessas proteínas no sangue menstrual e suas respectivas concentrações no soro periférico. Concluindo, ambas a ativina A e a folistatina são mensuráveis no sangue menstrual, e as concentrações delas são relativamente mais baixas nas mulheres com sangramento uterino disfuncional. Devido ao fácil acesso do sangue menstrual que ao periférico comparado à biópsia de endométrio, a avaliação quantitativa de ativina A e folistatina no soro menstrual pode ser um importante marcador da função endometrial.

Abstract

Activin A and follistatin are growth factors produced by several organs and are both measurable in systemic circulation. Human endometrium also expresses activin A and follistatin. The purpose of the present study was to evaluate whether activin A and follistatin are measurable in the menstrual blood, and whether their concentration change in women with dysfunctional uterine bleeding (DUB). Normal cycling women requesting intrauterine contraception (n=15) and a group of women with DUB (n=12) were studied on day 2 of menstrual bleeding. Activin A and follistatin were measured in both menstrual and peripheral sera by using specific ELISA. Activin A concentration in menstrual serum was fourfold higher than in peripheral serum of healthy women (mean \pm SE 4.24 ± 0.18 vs. 1.00 ± 0.15 ng/ml) and was significantly lower in women with DUB (2.70 ± 0.42 ng/ml and 0.23 ± 0.02 ng/ml in menstrual and peripheral serum, respectively; $p < 0.05$). Follistatin concentration in menstrual serum was eightfold higher than in peripheral serum of healthy women (3.94 ± 0.49 vs. 0.49 ± 0.04 ng/ml), while was significantly lower in the menstrual serum of women with DUB (1.24 ± 0.22 ng/ml). There was no correlation between concentrations in menstrual serum and peripheral serum. In conclusion, both activin A and follistatin are measurable in high concentration in human menstrual blood and are relatively lower in women with DUB. The quantitative assessment of activin A and follistatin in menstrual serum might be a putative clinical marker of endometrial function.

Lista de Siglas e Abreviaturas

ActR I	receptor de ativina tipo I
ActRIA ou ALK2	1º subtipo de receptor tipo I da ativina
ActRIB ou ALK4	2º subtipo de receptor tipo I da ativina
ActRII	receptor da ativina tipo II
ActRII A	1º subtipo de receptor tipo II da ativina
ActRIIB	2º subtipo de receptor da ativina
DIU	dispositivo intra-uterino
ebaf	fator associado ao sangramento endometrial
cAMP	monofosfato cíclico adenosina
ELISA	ensaio imunoenzimático
FIV	fertilização in vitro
FLRG	gene relacionado à folistatina
FSTL3	gene relacionado à folistatina
FSH	hormônio folículo-estimulante
FS-288	isoforma curta da folistatina
FS-315	isoforma longa da folistatina
IMC	índice de massa corporal
MMP	metaloproteinases
PG	prostaglandina
PGE2	prostanglandina E2
PGI2	prostaciclina I 2
PGF2 α	prostaglandina F 2 alfa
SDS	dodecil sulfato de sódio
TNF α	fator de necrose tumoral alfa
TGF β	fatores de crescimento transformadores beta
TGF β 4	fator associado ao sangramento endometrial
TMB	tetrametil benzidina
TSH	hormônio tireoestimulante
USTV	ultra-sonografia transvaginal
VEGF	fator de crescimento do endotélio vascular

Lista de Unidades de Medida

°C	Grau Celsius
cm	Centímetro
cm ³	Centímetro
m ²	Metros quadrados
μl	Microlitro
m	Molar
ml	Mililitro
mm	Milímetro
ng	Nanograma
%	Porcento
rpm	Rotações por minuto
Kg	Kilograma

Sumário

1. Introdução	2
1.1. Ativinas, inibinas e folistatinas	3
1.2. Ativina A e folistatina no endométrio.....	6
1.3. Menstruação normal – mecanismos locais de descamação e remodelagem.....	8
1.4. Sangramento uterino disfuncional	11
1.5. Ativina A e folistatina no sangramento uterino disfuncional.....	16
2. Objetivos	17
3. Metodologia.....	19
3.1 Sujeitos da Pesquisa	20
3.2 Coleta de amostras.....	22
3.3. Dosagem de Ativina A	23
3.4 Dosagem de Folistatina	24
3.5 Análise estatística.....	25
Resultados	26
4.1. Identificação de ativina A e folistatina no sangue menstrual de mulheres com ciclos regulares (grupo controle).....	27
4.2. Alterações associadas ao sangramento uterino disfuncional	27
4.3. Análises de correlação.....	30
5. Discussão.....	32
6. Conclusão	39
7. Referências	41
Anexos	52

1. Introdução

1.1. Ativinas, inibinas e folistatinas

As ativinas são uma família de proteínas formadas por homodímeros das subunidades β da inibina (ativina A: $\beta A-\beta A$, ativina B: $\beta B-\beta B$) e heterodímeros subunidades β da inibina (ativina AB: $\beta A-\beta B$) ligadas por pontes de dissulfeto (Figura 1). Inicialmente, elas foram isoladas das gônadas como estimuladoras do hormônio folículo estimulante (FSH) (Vale *et al.*, 1986) e são membros da superfamília de fatores de crescimento transformadores β (TGF β) (de Kretser & Robertson 1989; Lin *et al.*, 2003; Muttukrishna *et al.*, 2004). Recentemente, identificaram-se três outras subunidades β chamadas βC (Hötten *et al.*, 1995), βD (Oda *et al.*, 1995) e βE (Fang *et al.*, 1996), cujo papel permanece desconhecido.

A ativina A participa da diferenciação celular, remodelagem celular e processo inflamatório (Munz *et al.*, 1999; Hübner *et al.*, 1999), embriogênese (Smith *et al.*, 1990; He *et al.*, 1999), esteroidogênese (Ni *et al.*, 2000), apoptose celular (Luisi *et al.*, 2001) e eritropoiese (Mather *et al.*, 1992; Findlay, 1993; Woodruff, 1998). Também pode inibir a proliferação celular em muitos tecidos humanos, incluindo linhas celulares de câncer de mama (Kalkhoven *et al.*, 1995) e células do endotélio vascular (McCarthy & Bicknell 1993; Kozian *et al.*, 1997). É também produzida no cérebro, hipófise, placenta, gônadas, medula óssea e endométrio (Florio *et al.*, 2003).

Existem dois tipos de receptores de ativina (Figura 2), denominados receptor tipo I (ActRI) e tipo II (ActRII). A ligação da ativina se faz com o ActRII, provocando o recrutamento e ativação do ActRI. O ActRI ativado fosforila uma molécula sinalizadora da família *Smad* (*Smad 2* ou *Smad 3*), que então

interage com a *Smad 4* e este complexo se transloca para o núcleo, onde promove expressão gênica (Attisano *et al.*,2001; Bernard *et al.*,2001;Jones *et al.*,2002; Lin *et al.*,2003). A família Smad é um conjunto de moléculas responsáveis pela sinalização intracelular. Existem três classes destas moléculas de transdução: as *R-Smad*, que são as moléculas ativadas pela subunidade RI do receptor, as *Common Smad*, ou mediadores comuns que formam um complexo heteromérico com as R-smad e translocam para o núcleo para ativar as respostas gênicas específicas, e as *Inhibitory Smad* que são potentes inibidores do sinal de ativina (Attisano *et al.*, 2001; Tsuchida K *et al.*, 2001; Gray *et al.* 2001; Bernard *et al.* 2001).

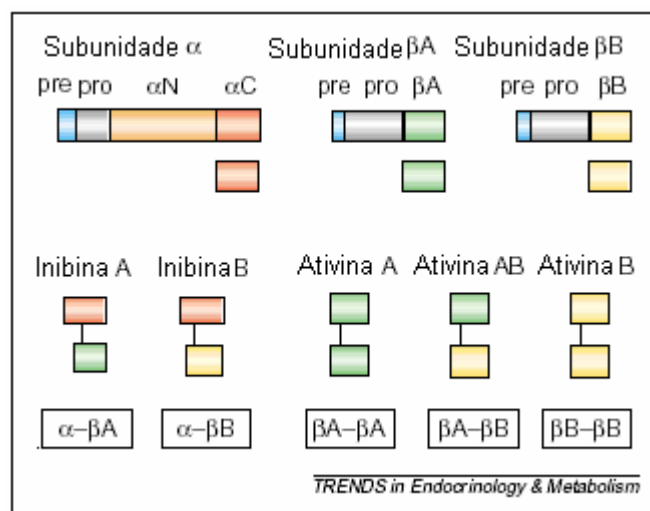


Figura 1 – Subunidades proteicas formadoras de inibinas e ativinas.

Adaptado de Jones RL *et al.* Trends Endocrinol Metab 2002;13:144-150.

Já foram identificados dois subtipos de receptores tipo II (ActRIIA e ActRIIB) e dois subtipos de receptores tipo I (ActRIA ou ALK2-activin receptor-like kinase 2-e ActRIB ou ALK4). Entretanto, o ActRIA está mais associado à sinalização das BMPs (*bone morphogenetic proteins*) do hormônio

antimulleriano, indicando que o ActRIB é o principal receptor tipo I envolvido no mecanismo de ação da ativina (Jones *et al.*,2002).

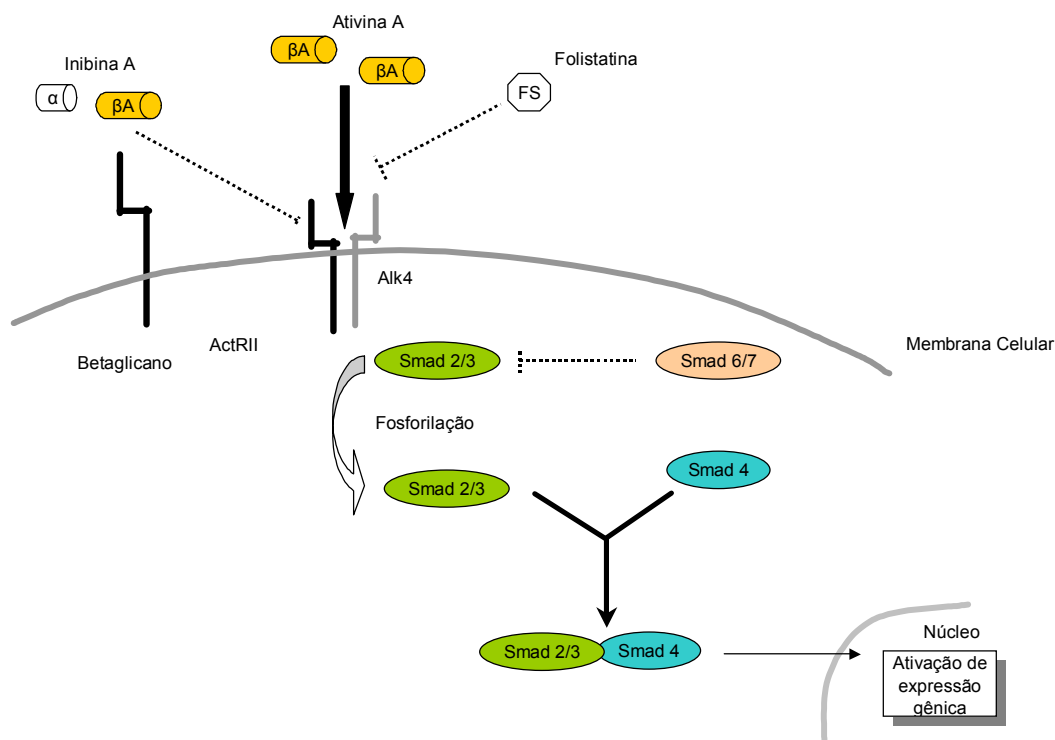


Figura 2 – Mecanismo de sinalização celular das ativinas

A folistatina é um peptídeo produzido por várias células hipofisárias, incluindo os gonadotrofos, bem como pelas células da granulosa (Lin *et al.*,2003; Bilezikjian *et al.*,2004). No endométrio, é produzida pelas células epiteliais glandulares e pelas células estromais decidualizadas (Jones *et al.*,2002; Jones *et al.*,2006). A folistatina liga-se com alta afinidade à ativina (Shimonaka *et al.*,1991) e neutraliza a bioatividade desta glicoproteína (Philips & de Kretser 1998). A folistatina produzida de forma coordenada com a ativina liga-se com a mesma afinidade aos receptores ActRII (Schneyer *et al.*,1994;

Tsuchida *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2002) inibindo as ações da ativina. Existem várias isoformas da folistatina (Lin *et al.*, 2003), mas as mais estudadas são a forma longa (FS-315), que é encontrada em complexo com a ativina circulante, e a forma curta (FS-288), que se liga aos proteoglicanos das membranas celulares. Esta última parece ter um papel no clareamento de excesso de ativina, por internalização e degradação do complexo folistatina-ativina (Jones *et al.*, 2002). Foram descritas outras moléculas semelhantes com a mesma função, como o gene relacionado a folistatina (FLRG), atualmente chamado *follistatin-like 3* (FSTL3), e osteonectina (Schneyer *et al.*, 2003; Wang *et al.* 2003).

A biodisponibilidade da ativina é também, regulada pela inibina. Essa glicoproteína tem baixa afinidade com o ActRII. Recentemente, foi descoberto que a inibina liga-se com alta afinidade ao receptor betaglicano TGF β III, facilitando a interação com o receptor tipo II da ativina, inibindo as ações da ativina (Gray *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2002).

1.2. Ativina A e folistatina no endométrio

O endométrio humano expressa ativina A (Otani *et al.*, 1998; Leung *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 2000; Reis *et al.*, 2001) e seus receptores (Jones *et al.*, 2002), e a intensidade de sua imunorreatividade aumenta progressivamente da fase proliferativa para a fase secretora (Leung *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 2000; Florio *et al.*, 2003; Mylomas *et al.*, 2004). Sob o comando da progesterona, durante a fase secretora, as células estromais do endométrio se diferenciam para células decíduais. A adição de ativina A em cultura de células endometriais humanas induziu decidualização das células estromais (Jones *et*

al., 2002 a), e a ativina A é necessária na decidualização estromal endometrial via monosfosfato cíclico adenosina (Tierney E.P&Giudice.,2004). A co-localização da folistatina com as subunidades de ativina e receptores em células estromais decidualizadas evidencia papel importante da ativina A na função endometrial (Luisi *et al.*,2001).

Um ponto crítico da decidualização é a remodelagem da matriz extracelular (Jones *et al.*,2006). As metaloproteinases da matriz (MMPs) são enzimas que degradam os componentes da matriz extracelular, permitindo expansão e remodelagem tecidual. A ativina A aumenta a produção de MMPs (Jones *et al.*, 2006), o que explicaria, em parte, seu efeito pro-decidualização.

Alterações na expressão e secreção de ativina A ocorrem na endometriose, hiperplasia e adenocarcinoma endometrial (Florio *et al.*, 1998; Reis *et al.*, 2001; Petraglia *et al.*, 1998; Otani *et al.*, 2001) e, possivelmente, no sangramento uterino disfuncional.

A ativina A e a folistatina são possíveis mediadores da angiogênese endometrial (Kozian *et al.*, 1997; Maeshima *et al.*, 2004). A angiogênese é definida como a formação de novos vasos capilares a partir de vasos sangüíneos pré-existentes (Folkman, 1985; Gargett & Rogers 2001). Em tecidos saudáveis a angiogênese é rara, ocorrendo no folículo ovariano, corpo lúteo e endométrio (Findlay, 1986). No trato genital feminino, defeitos da angiogênese estão envolvidos na fisiopatologia da insuficiência lútea, endometriose, perdas gestacionais, pré-eclâmpsia e câncer (Gordon *et al.*, 1995). A angiogênese normal é controlada pelo balanço de seus promotores e inibidores. A ativina A, seus receptores e a folistatina estão co-localizadas nas células do endotélio dos vasos endometriais, que são fontes de ativina A

(Jones *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2002). A ativina A inibe, enquanto a folistatina estimula a resposta angiogênica *in vivo* (McCarthy & Bicknell., 1993; Kozian *et al.*, 1997) e em cultura de células do endotélio (Kozian *et al.*, 1997).

O fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), originalmente identificado como fator de permeabilidade vascular (Leung *et al.*, 1999), é um dos fatores mais importantes de regulação da angiogênese, tanto fisiológica quanto patológica (Ferrara *et al.*, 2001). Maeshima *et al.* (2004) observaram que a ativina A aumentou a produção *in vitro* de VEGF, e a folistatina bloqueou a tubulogênese das células endoteliais induzidas por VEGF. A ativina A amplificou a ação de VEGF na formação de capilares. Na ausência do receptor de ativina ActRII, produzida pela transfecção de um receptor truncado em células endoteliais da aorta bovina, a capacidade do VEGF de induzir novos capilares *in vitro* foi abolida (Maeshima *et al.*, 2004).

1.3. Menstruação normal – mecanismos locais de descamação e remodelagem

A cada ciclo menstrual normal o endométrio sofre intensa remodelagem, proliferação e ruptura. Após a ovulação, alterações funcionais e morfológicas são evidentes no epitélio funcional, glandular, vascular e nas células estromais. Durante a fase secretora média e tardia, as células estromais se diferenciam para as células deciduais – um processo conhecido como decidualização. As células deciduais produzem vários fatores de crescimento, citocinas e hormônios peptídeos que as tornam funcionalmente distintas. A decidualização é um evento essencial para implantação do blastocisto e estabelecimento da gravidez, bem como para a invasão

trofoblástica (Fazleabas & Strakova , 2002). A progesterona controla este processo, e a queda dos seus níveis, na ausência de gravidez, estimula a ruptura e perda da decídua, com conseqüente sangramento uterino.

A primeira alteração morfológica da queda dos níveis de progesterona é o adelgaçamento tecidual devido à vasoconstrição das arteríolas espiraladas pelas prostaglandinas (PG) $PGF2\alpha$ e pela endotelina 1 (Marsh *et al.*,1995). A isquemia tecidual que se segue libera citocinas, tais como fator de necrose tumoral (TNF)- α e outras moléculas sinalizadoras (Tabibzadeh.,1996).

Intensa destruição da matriz extracelular pode ser observada durante a menstruação (Salamonsen & Wooley., 1999). Não está claro se a ativação das citocinas pro-inflamatória e liberação de certas MMPs em resposta à queda de progesterona antecede ou acompanha a vasoconstrição (Sallamonsen & Woolley., 1999), mas está claro que várias MMPs estão aumentadas pela queda dos níveis de progesterona (Salamonsen *et al.*,1997). As MMPs expressas no endométrio humano estão associadas com a ruptura endometrial durante a menstruação, e este processo é independente da vasoconstrição das arteríolas espiraladas (Salamonsen *et al.*, 1996; Plaisier *et al.*,2006)). Alterações na produção das MMPs podem contribuir para anormalidades da ruptura endometrial e do sangramento uterino (Salamonsen *et al.*, 2000).

Os lisossomas liberam enzimas proteolíticas após a queda dos níveis de progesterona, que contribuem para a ruptura tecidual (Wang *et al.*, 2000).

Os macrófagos, polimorfonucleares e linfócitos granulados estão aumentados no endométrio durante a menstruação. Esses leucócitos liberam moléculas que alteram a permeabilidade vascular e a integridade tecidual, incluindo as MMPs (Lathbury & Salamonsen., 1999). A presença de células

deciduais, fluxo de leucócitos e edema tecidual no tecido que descama do endométrio levanta a hipótese de que a menstruação seja um processo inflamatório (Finn.,1996). A interleucina-8, que é quimiostática para leucócitos, é liberada junto aos vasos sanguíneos do endométrio, podendo influenciar a migração de leucócitos para facilitar a ruptura ,remodelagem e reparo tecidual (Arici *et al.*, 1998).

O balanço entre os fatores de coagulação para geração de trombos e os de fibrinólise para impedir a organização destes é importante mecanismo para um sangramento normal. Na fase secretora predominam os fatores hemostáticos e na menstruação os fibrinolíticos.

Os estudos mais recentes não mais corroboram a teoria clássica da hipóxia tecidual como essencial para a ruptura endometrial (Gannon *et al.*, 1997). Os eventos vasculares desempenham papel chave dos mecanismos que iniciam e terminam a menstruação. Os mecanismos de coagulação, vasoconstrição e reepitelização contribuem para a hemostasia no endométrio menstrual, mas os eventos vasculares fazem o papel principal (Ferenczy., 2003; Salamonsen., 2003).

Os fatores angiogênicos são muito importantes para o processo de reparo epitelial, e o VEGF é um dos mais estudados. No endométrio, a angiogênese ocorre para reparar o leito vascular durante a menstruação, durante o rápido crescimento endometrial na fase proliferativa e durante a fase secretora, quando as arteríolas espiraladas mostram grande crescimento (Gargett & Rogers, 2001). Mas o VEGF é também encontrado em secreções de outros tecidos não angiogênicos, tais como a saliva, leite e sêmen. Nem a

produção total de VEGF glandular e nem a produção estromal correlaciona-se com a proliferação endotelial (Gargett *et al.*, 1999).

O VEGF que se correlaciona com a angiogênese endometrial é aquele encontrado margeando e aderido aos neutrófilos, predominantemente na fase proliferativa (Gargett & Rogers., 2001).

1.4. Sangramento uterino disfuncional

O sangramento uterino disfuncional ou endócrino é diagnóstico de exclusão, isto é, não decorrente de doença pélvica e/ou uterina benigna ou maligna, nem de problemas extragenitais, como distúrbios da coagulação, doenças sistêmicas, endocrinopatias extra-ovarianas, uso de medicamentos que interferem com a ação hormonal ou com os mecanismos de coagulação, ou relacionado à gravidez. É distúrbio freqüente, que pode ocorrer em qualquer época do período reprodutivo da mulher, mas concentra-se principalmente em seus extremos, isto é, logo após a menarca e no período perimenopausa.

A menorragia é a manifestação clínica mais comum de sangramento uterino disfuncional. É definida como perda menstrual que excede 80ml por ciclo, e geralmente está associada com anemia ferropriva e microcítica. A menorragia é causa comum de histerectomias (Kucuk & Okuman, 2005) afetando 10-30% das mulheres, e pode ocorrer na perimenopausa em 50% delas (Ballinger *et al.*, 1987). A percepção do sangramento menstrual varia consideravelmente entre as mulheres. Portanto, o que pode ser normal para uma mulher pode ser anormal para outra.

A quantificação exata da menorragia em cada paciente, através do método hematina alcalina é difícil, cara, e necessita de um tempo prolongado

de avaliação (Halberg & Nilson, 1964), e menos de 50% destas pacientes terão menorragia confirmada (Fraser *et al.*, 1984). Muitas vezes, estas mulheres apresentam depressão subclínica e tolerância reduzida ao fluxo menstrual (Greenberg., 1983).

A história menstrual detalhada sobre a quantidade de absorventes diários, tipo de absorventes (diurnos ou noturnos), a frequência de trocas (cada 30 min à 2hs), assim como o nível de hemoglobina e a presença de coágulos são a avaliação clínica mais prática (Warner *et al.*, 2004).

O sangramento uterino disfuncional pode ser ovulatório e não ovulatório. O sangramento uterino disfuncional está presente na metade das mulheres com sangramento uterino anormal (Ewenstein., 1996), sendo anovulatório em aproximadamente 80% dos casos (Cameron., 1989; Fraser., 1989).

1.4.1. Sangramento disfuncional ovulatório

No sangramento uterino ovulatório, 90% da perda menstrual ocorre nos três primeiros dias do ciclo (Haynes *et al.*, 1979). Não há nenhum distúrbio no eixo hipotálamo-hipófise-ovário. Nestes casos os níveis de gonadotrofinas e hormônios esteróides não são diferentes daqueles vistos no ciclo menstrual normal (Eldred & Thomas., 1994). O sangramento uterino disfuncional ovulatório está associado à diminuição da vasosconstrição endometrial e formação do coágulo hemostático, portanto, há defeito no controle do volume de sangue que é perdido na menstruação.

Muitos sistemas moleculares foram estudados nas mulheres com sangramento uterino disfuncional ovulatório assim como foram descritas algumas anormalidades funcionais. As endotelinas, provavelmente agem nos

receptores na interface endométrio-miométrio controlando o tempo normal de menstruação (Cameron *et al.*, 1992). Os níveis reduzidos de endotelinas podem aumentar a perda de sangue. Marsh *et al.* (1996) demonstraram baixa imunorreatividade para as endotelinas no epitélio glandular e luminal nas mulheres com menorragia do que o grupo controle.

Os vasos sangüíneos de mulheres com sangramento uterino disfuncional ovulatório foram avaliados pela histeroscopia (Hickey *et al.*, 1996), e estes vasos aparentemente eram similares àqueles das mulheres com ciclo menstrual normal (Hickey *et al.*, 1996,1998).

As prostaglandinas têm potente efeito vasoativo, e evidências fortes sugerem papel importante dessas substâncias na prevenção da perda menstrual excessiva (Baird *et al.*, 1996). A liberação de prostaglandina endometrial é muito influenciada pelos níveis de esteróides circulantes (Smith & Kelly.,1987). A prostaglandina F2a induz vasoconstrição e a prostaglandina E2 e a prostaciclina (PGI2) induzem vasodilatação. A PGI2 também é a mais potente substância conhecida com efeito anti-agregante plaquetário e anti-trombogênico. O aumento da prostaglandina total com desproporcional aumento para PGE2 foi demonstrada em mulheres com sangramento uterino ovulatório (Smith *et al.*, 1981 a). Há aumento de receptores para PGE2 e PGI2 predispondo assim à vasodilatação em mulheres com menorragia (Adelantado *et al.*, 1988). Além disso, há aumento de síntese de PGI2 pelo miométrio e endométrio (Smith *et al.*, 1981 b). Os medicamentos antiprostaglandinas são efetivos no tratamento de sangramento ovulatório provavelmente por reduzir a síntese endometrial de todas as prostaglandinas, mas também por inibir a ligação de PGE2 em seus receptores.

Os níveis dos receptores de estrogênio e progesterona podem estar aumentados na fase secretora tardia nas mulheres com sangramento uterino disfuncional ovulatório (Gleeson *et al.*, 1993), e esses podem ser os responsáveis pelos efeitos do aumento de estrogênio. Entretanto, outros estudos não foram capazes de demonstrar diferenças de expressão destes receptores em mulheres com menorragia (Critchley *et al.*, 1994).

Os mecanismos hemostáticos são muito importantes para limitar o volume de perda menstrual. O aumento da PGI₂ previne a agregação plaquetária, e pode ser um importante fator que contribui para a fisiopatologia do sangramento ovulatório (Smith *et al.*, 1981 b). Os altos níveis de PGI₂ também aumentam o ativador de plasminogênio tecidual, e assim eleva a atividade fibrinolítica local (Gleeson *et al.*, 1993) assim como a atividade heparínica endometrial. A combinação de fibrinólise e atividade heparínica aumentada limita a formação de trombos prejudicando a hemostasia. A degranulação de mastócitos durante a menstruação libera muitas substâncias incluindo heparina, que reduz a formação de fibrina e histamina, provocando contrações e espaços entre as células do endotélio vascular, que juntos levam à transudação e perda de hemácias. Em mulheres com sangramento uterino ovulatório observa-se aumento da atividade enzimática de lisossomos (Wang *et al.*, 2000). Esses fenômenos podem contribuir para anormalidades do processo ruptura e remodelagem endometrial.

1.4.2.Sangramento uterino anovulatório

É reconhecido como sangramento irregular, prolongado e freqüentemente excesso causado por um distúrbio da função do eixo hipotálamo-hipófise-ovário.

O quadro mais comum é visto na síndrome dos ovários policísticos e nos extremos da vida reprodutiva, isto é, nos anos perimenarca e perimenopausa. Nesses estágios da vida, os ciclos anovulatórios são freqüentes, levando a grande irregularidade menstrual e variabilidade da intensidade da perda menstrual.

Os mecanismos exatos que provocam o sangramento anovulatório são incertos. Entretanto, o hiperestímulo estrogênico pode levar à excessiva proliferação e hiperplasia endometrial com dilatação das veias e supressão das arteríolas espiraladas. Os vasos, freqüentemente demonstrados na superfície do endométrio hiperplásico estão tortuosos, largos e com parede fina. Esses vasos têm fragilidade vascular aumentada podendo contribuir para o aumento da perda de sangue. Portanto, o sangramento uterino disfuncional anovulatório pode estar associado com distúrbio da angiogênese, fragilidade dos vasos e alteração no processo hemostático (Ferency, 2003). A não oposição estrogênica tem efeito direto no suprimento sangüíneo uterino pela redução do tônus vascular e efeito indireto por meio da inibição de liberação das vasopressinas (Akerlund *et al.*, 1975) levando à vasodilatação e aumento do sangramento uterino. O hiperestímulo estrogênico aumenta a expressão de VEGF contribuindo para distúrbio da angiogênese (Smith, 1998). Além disso, a exposição prolongada do endoméio estrogênio sintetiza menos PG e mais alta proporção de PGE do que PGF (Smith *et al.*, 1982).

A não oposição estrogênica também estimula a expressão estromal do VEGF, que pode contribuir para distúrbio da angiogênese (Smith *et al.*, 1998).

Além disso, o endométrio exposto à prolongada ação estrogênica sintetiza menos prostaglandinas com maior proporção de prostaglandina E₂, e menor de prostaglandina F (Smith *et al.*, 1982). Outro mecanismo que tem sido postulado para o sangramento uterino anovulatório seria o aumento da produção de óxido nítrico, um fator relaxante derivado do endotélio, em resposta à não oposição estrogênica (Chwalisz & Garfield, 2000).

Um novo membro da superfamília TGF β chamado de fator associado ao sangramento endometrial (*ebaf*) ou TGF β ₄, é expresso transitoriamente no endométrio de menstruação normal, e muito mais quando há sangramento anormal (Kothapalli *et al.*, 2000).

1.5. Ativina A e folistatina no sangramento uterino disfuncional

A ativina A e a folistatina estão co-localizadas nas células do endotélio dos vasos endometriais, que são fontes de ativina A (Jones *et al.*, 2000; Jones *et al.* 2002). A ativina A inibe, enquanto a folistatina estimula a resposta angiogênica ambos *in vivo* (McCarthy & Bicknell, 1993; Kozian *et al.*, 1997) e em cultura de células do endotélio (Kozian *et al.*, 1997). Ao contrário, Maeshima *et al.* (2004) mostraram que *in vitro* ativina A estimula e a folistatina inibe a tubulogênese. Portanto, a ativina A e a folistatina participam do processo de angiogênese, e o desequilíbrio deste sistema pode levar ao sangramento uterino disfuncional. Assim, alterações nos níveis destas glicoproteínas poderiam estar presentes no sangue menstrual de mulheres com sangramento uterino disfuncional associado com anovulação.

2. Objetivos

Os objetivos do presente estudo foram:

1. Avaliar se a ativina A e a folistatina são mensuráveis no soro do sangue menstrual.
2. Determinar se as concentrações de ativina A e folistatina no sangue menstrual estão alteradas em mulheres com sangramento uterino disfuncional.

3. Metodologia

3.1 Sujeitos da Pesquisa

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (protocolo 466/04) e todas as pacientes deram seu consentimento informado por escrito. As pacientes foram recrutadas na Unidade de Atendimento Básico I do Floramar da Prefeitura de Belo Horizonte (PBH), com permissão do Comitê de Ética em Pesquisa da PBH. Foram incluídos dois grupos de participantes, como especificado na tabela 1.

Tabela 1 – Características dos grupos de estudo

	Controle (n = 15)	Sangramento Uterino Disfuncional (n = 12)
Idade (anos)	32,9 ± 2,2	41,1 ± 2,1*
IMC (kg/m ²)	25,8 ± 1,0	24,0 ± 1,1
Duração da menstruação (dias)	4,0 ± 0,3	9,5 ± 0,6*
Volume uterino (cm ³)	99,6 ± 10,6	101,8 ± 9,2

Os dados são expressos como média ± erro padrão. * p<0,05 (teste t de Student)

O grupo controle, composto de 17 mulheres com ciclos menstruais regulares, que solicitaram a inserção de dispositivo intrauterino com finalidade de anticoncepção. As idades variaram de 19 a 44 anos (média de 33 anos). Todas as mulheres deste grupo relataram ciclos menstruais com intervalo (26 a 31 dias) e duração (2 a 5 dias) dentro dos limites da normalidade. Exame

ginecológico, Papanicolau e ultra-sonografia endovaginal foram feitos antes da inclusão no estudo, e todos os foram normais. Nenhuma das mulheres havia usado medicamentos hormonais nos últimos três meses.

O segundo grupo incluiu 12 mulheres com sangramento irregular, volumoso e/ou com coágulos que, após a exclusão de outras causas que pudessem levar ao sangramento uterino anormal, foram diagnosticadas como sangramento uterino de causa disfuncional. A avaliação do volume de sangue foi baseada na escala analógica de perda sanguínea (Higham *et al.*, 1990). O padrão de sangramento observado em todas as pacientes foi compatível com sangramento uterino disfuncional anovulatório, embora não tenha sido possível comprovar a anovulação por métodos objetivos.

As integrantes desse grupo tinham idades variando entre 31 e 49 anos (média de 41 anos) e foram recrutadas contemporaneamente ao grupo controle, na mesma unidade de cuidados primários. Estas pacientes não estavam grávidas e não apresentavam qualquer evidência clínica ou ultrasonográfica de doença pélvica ou uterina, e tinham o colo uterino normal ao exame especular e Papanicolau. A contagem de plaquetas, TSH e prolactina estavam dentro dos valores de referência. Os índices hematimétricos foram avaliados e constatou-se anemia microcítica hipocrômica em 6 das 12 pacientes (50%). Mulheres com doenças hepáticas ou renais não foram incluídas. Além disso, nenhuma das pacientes havia usado medicamento hormonal nos últimos três meses.

Os critérios de inclusão e exclusão do estudo estão resumidos no quadro que se segue.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO**GRUPO I OU CONTROLE:**

- Mulheres entre 18 e 50 anos de idade
- Ciclos menstruais regulares
- Candidatas à inserção de DIU com finalidade de contracepção
- Não estar em uso nem haver usado medicamento hormonal nos três meses que antecederam à pesquisa

GRUPO II OU GRUPO COM SANGRAMENTO UTERINO DISFUNCIONAL:

- Idade entre 18 e 50 anos de idade
- Mulheres com sangramento uterino volumoso, confirmado pela escala analógica de perda sangüínea;
- Não estar em uso nem haver usado medicamento hormonal nos três meses que antecederam à pesquisa

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO:

- Miomas uterinos
- Endometriose
- Adenomiose
- Cistos ovarianos
- Tumor de Ovário
- Usuária de contracepção hormonal ou em uso de hormônios
- Hipotireoidismo ou hipertireoidismo
- Hiperprolactinemias
- Hepatopatias
- Nefropatias
- Coagulopatias

3.2 Coleta de amostras

As amostras de sangue menstrual foram coletadas na região externa da cérvix uterina por aspiração delicada com seringa de 1 ml, sem agulha. Ao mesmo tempo, amostras de sangue periférico foram coletadas da veia da região antecubital à direita. O soro foi separado por centrifugação a 3.000 rpm durante 10 minutos e estocado a -20°C até o momento das dosagens hormonais.

3.3. Dosagem de Ativina A

As concentrações de ativina A foram medidas por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA) de duplo anticorpo, adquirido do Diagnostic System Laboratories –DSL (Webster, TX), conforme descrito por Knight *et al.* (1996), com pequenas modificações (Figura 3).

Inicialmente, as amostras de soro foram pré-tratadas com aquecimento a 100°C na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS). Cem microlitros das amostras pré-tratadas e igual volume dos padrões de ativina A foram pipetados na placa de ELISA revestida com o anticorpo primário (IgG anti-ativina A). Em seguida, um outro anticorpo monoclonal anti-ativina A conjugado com enzima (25 µl) foi adicionado e incubado por duas horas à temperatura ambiente em agitação orbital a 600 rpm.

A placa de ensaio foi rigorosamente aspirada, lavada por 5 vezes com detergente não-iônico diluído em salina tamponada (solução de lavagem, integrante do kit) e invertida sobre material absorvente até a secagem completa. O cromógeno tetrametilbenzidina (TMD) (100 µl) foi adicionado e incubado à temperatura durante 10-15 min sob agitação constante a 600 rpm. A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 0,2 M (100 µl) assim que o poço de referência (padrão zero) começou a apresentar cor visível. A placa foi submetida a leitura de absorbância a 450 nm em um leitor de ELISA modelo EL-340 (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA).

Todas as medidas foram feitas em um único ensaio, em duplicata, sem que o examinador pudesse reconhecer a que grupo pertenciam as amostras. Este ensaio não tem nenhuma reação cruzada com outras ativinas, inibinas ou

folistatina. O limite de detecção para ativina A é 0,1 ng/ml e o coeficiente de variação intra-ensaio é de aproximadamente 5%.

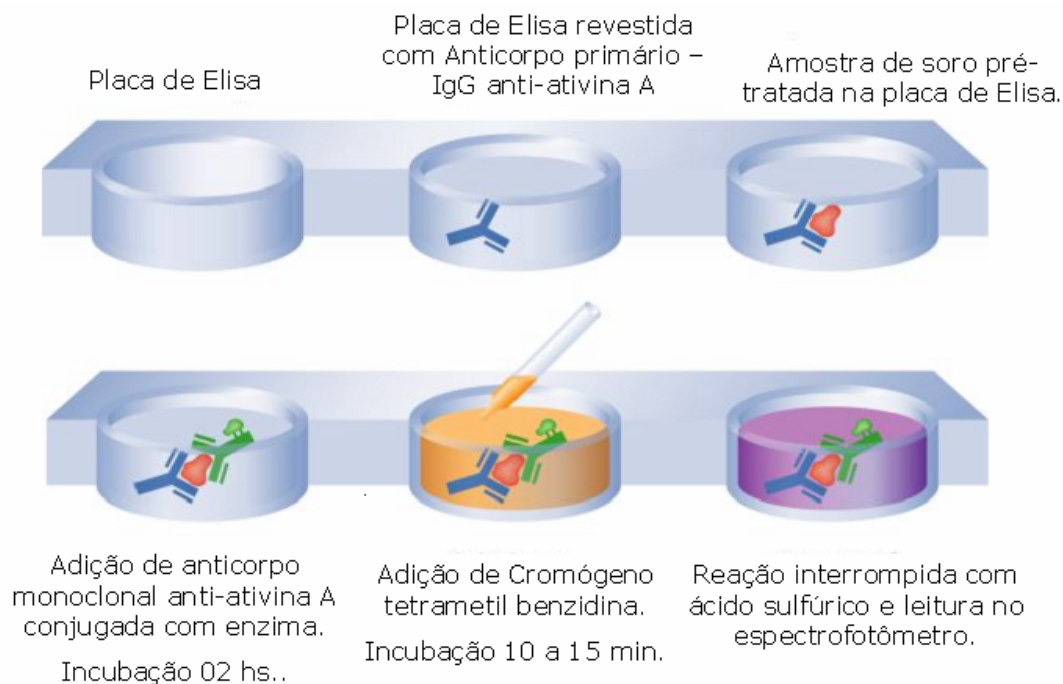


Figura 3 – Dosagem de Ativina A pelo método ELISA

3.4 Dosagem de Folistatina

As concentrações de folistatina foram medidas por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA) de duplo anticorpo, adquirido do Diagnostic System Laboratories –DSL (Webster, TX), como descrito previamente (Evans *et al.*, 1998; D'Antona *et al.*, 2000), com pequenas modificações.

Inicialmente, as amostras de soro foram aquecidas a 100°C na presença de SDS. Cinquenta microlitros das amostras pré-tratadas e igual volume dos padrões de folistatina humana recombinante foram pipetados na placa de ELISA revestida com o anticorpo primário (IgG anti-folistatina). Após o acréscimo do tampão do ensaio, a placa foi pré-incubada à temperatura

ambiente por 1 hora sob agitação constante. A placa de ensaio foi rigorosamente aspirada, lavada com detergente não-iônico diluído em salina tamponada (solução de lavagem, integrante do kit) e invertida sobre material absorvente para secagem. O segundo anticorpo monoclonal anti-folistatina, conjugado com enzima (25 μ l), foi adicionado e incubado por 30 minutos à temperatura ambiente em agitação orbital a 600 rpm, seguido por nova lavagem e secagem da placa.

A reação com TMB e a leitura da absorbância foram feitas como descrito para o ensaio da ativina A. Todas as medidas foram feitas em um único ensaio, em duplicata, sem que o examinador pudesse reconhecer a que grupo pertenciam as amostras. O ensaio tem um limite de detecção de 20 pg/ml e o coeficiente de variação intra-ensaio é de aproximadamente 9%.

3.5 Análise estatística

Depois da confirmação da distribuição normal, dados foram expressos como média \pm do erro padrão e testado por não pareado (entre grupos) ou pareado (entre as pacientes) teste *t*.

O coeficiente de Person foi calculado para testar a correlação linear entre concentrações do mesmo hormônio em diferentes sítios (sangue periférico e menstrual) e entre ativina A ou folistatina. A significância estatística foi $p < 0.05$.

Resultados

4.1. Identificação de ativina A e folistatina no sangue menstrual de mulheres com ciclos regulares (grupo controle)

As amostras de sangue menstrual do grupo controle apresentaram concentrações mensuráveis de ativina A (amplitude = 3,13 ng/ml a 5,00 ng/ml) e de folistatina (1,99 ng/ml a 6,51 ng/ml).

Como mostra a Figura 4, as concentrações de ativina A foram quatro vezes mais altas no soro do sangue menstrual (média \pm erro padrão = $4,24 \pm 0,19$ ng/ml) do que no soro do sangue periférico ($1,00 \pm 0,16$ ng/ml, $p < 0,001$, teste t pareado). As concentrações de folistatina foram cerca de oito vezes maiores no sangue menstrual ($3,94 \pm 0,49$ ng/ml) do que no sangue periférico ($0,49 \pm 0,05$ ng/ml, $p < 0,001$, teste t pareado) (Figura 5).

4.2. Alterações associadas ao sangramento uterino disfuncional

A concentração média de ativina A foi significamente mais baixa em mulheres com sangramento uterino disfuncional comparadas ao grupo controle, seja no sangue menstrual ($2,70 \pm 0,42$ ng/ml, $p < 0,01$ vs. controle, teste t), seja no sangue periférico ($0,23 \pm 0,03$ ng/ml, $p < 0,001$ vs. controle, teste t, Figura 4).

Os níveis de folistatina foram significamente mais baixos no soro do sangue menstrual de mulheres com sangramento uterino disfuncional ($1,24 \pm 0,22$ ng/ml) comparado com os controles ($p < 0,01$). No soro periférico, todavia, as concentrações de folistatina no grupo com sangramento uterino disfuncional ($0,62 \pm 0,09$ ng/ml) foram semelhantes às do grupo controle (Figura 5).

No soro periférico, a razão ativina A / folistatina foi significamente mais baixa no grupo de mulheres com sangramento uterino disfuncional comparado com o grupo controle ($p < 0,01$, Figura 6). Contudo, no soro

menstrual de pacientes com sangramento uterino disfuncional, a folistatina foi muito mais reduzida do que a ativina A, comparado com o grupo controle. Conseqüentemente, a razão ativina A / folistatina foi mais alta ($p < 0.05$) em pacientes com sangramento uterino disfuncional (Figura 6).

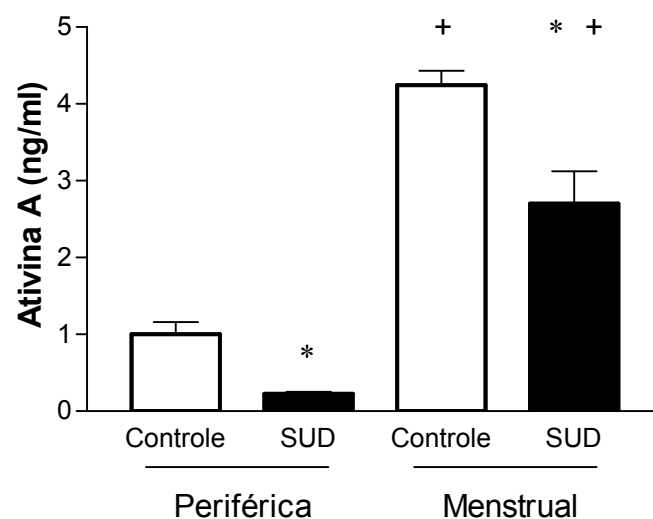


Figura 4: Concentrações de ativina A no soro menstrual e periférico dos grupos controle e com sangramento uterino disfuncional (SUD). Os dados são expressos como média \pm erro padrão.

* $p < 0.01$ vs. controle (teste t não-pareado); + $p < 0.01$ vs. periférica (teste t pareado).

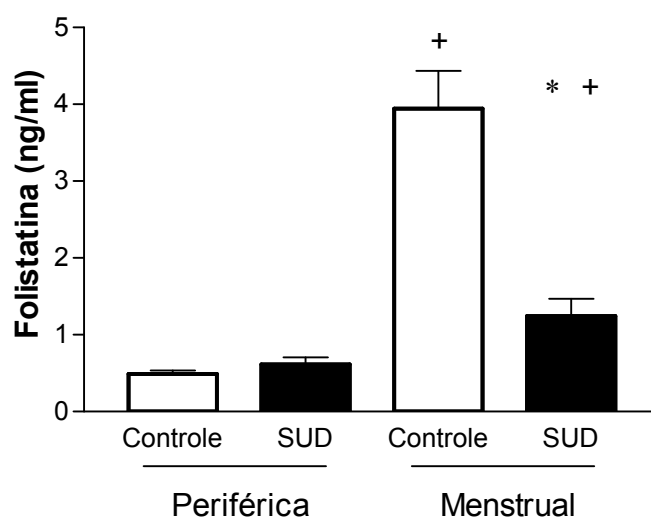


Figura 5: Concentrações de folistatina no soro menstrual e periférico dos grupos controle e com sangramento uterino disfuncional (SUD). Os dados são expressos como média \pm erro padrão.

* $p < 0.01$ vs. controle (teste t não-pareado); + $p < 0.01$ vs. periférica (teste t pareado).

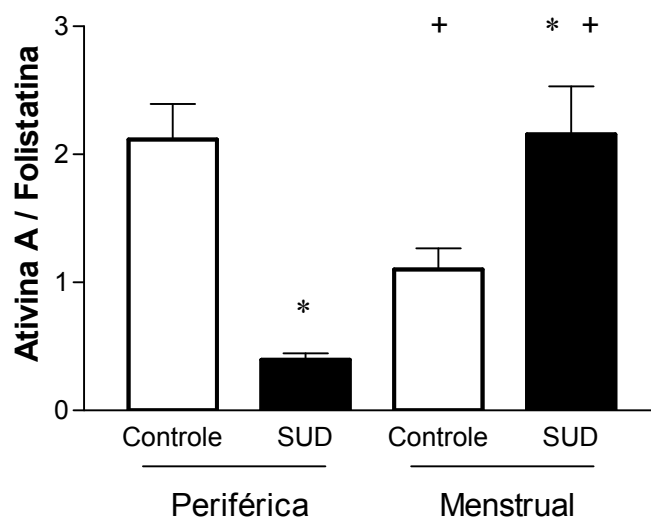


Figura 6: Razão entre as concentrações de ativina A e folistatina no soro menstrual e periférico dos grupos controle e com sangramento uterino disfuncional (SUD). Os dados são expressos como média \pm erro padrão.

* $p < 0.01$ vs. controle (teste t não-pareado); + $p < 0.01$ vs. periférica (teste t pareado).

4.3. Análises de correlação

Não houve correlação entre as concentrações de ativina A menstrual e suas respectivas concentrações no soro periférico, como ilustra a Figura 7. Também não se observou qualquer correlação entre as concentrações de folistatina no soro menstrual e periférico (Figura 8).

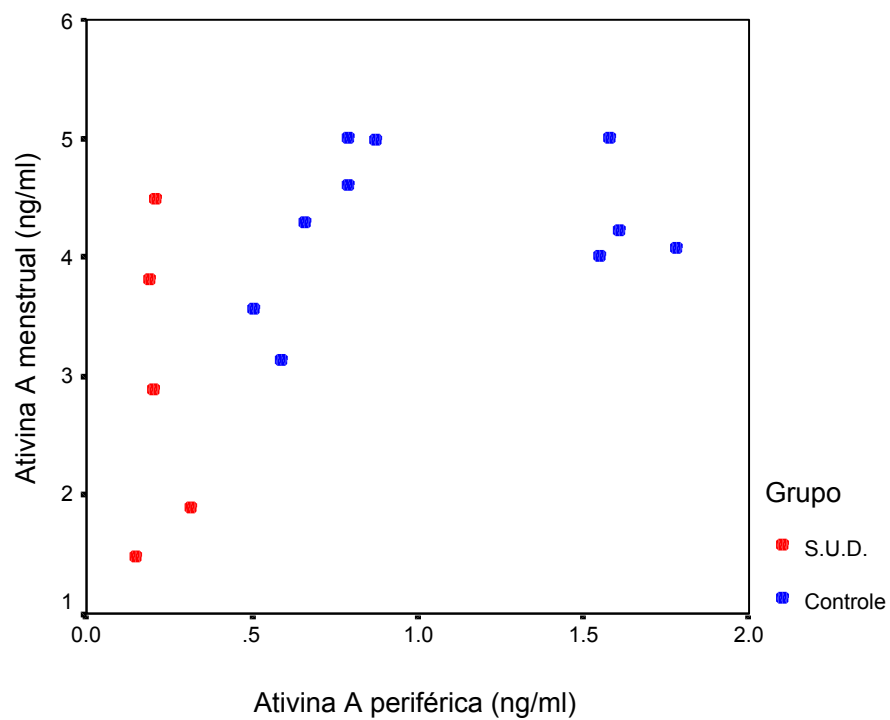


Figura 7 – Ausência de correlação entre as concentrações de ativina A no sangue menstrual e periférico.

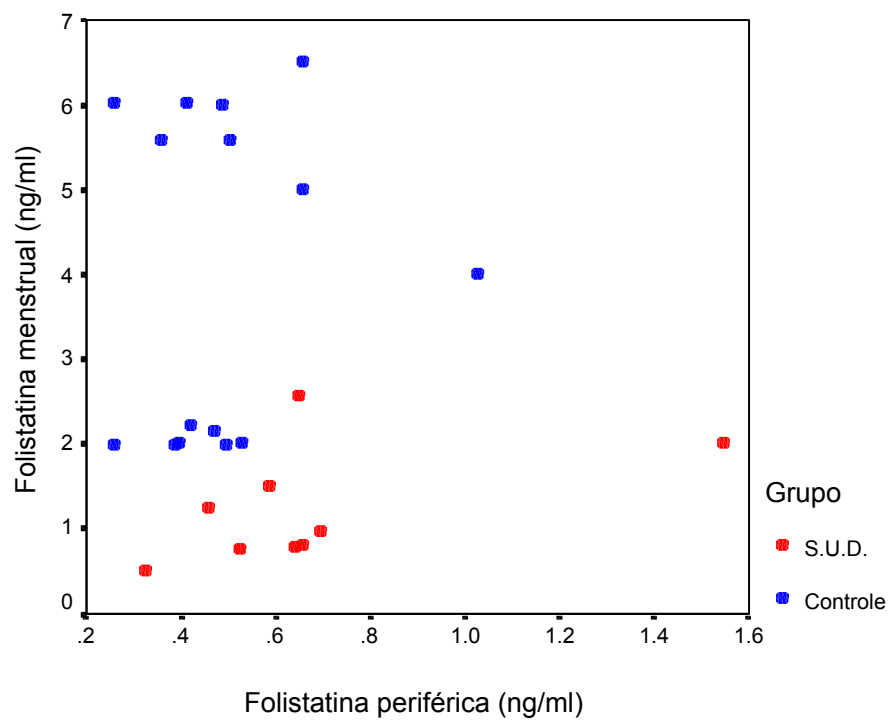


Figura 8 – Ausência de correlação entre as concentrações de folistatina no sangue menstrual e periférico.

5. Discussão

O primeiro achado deste estudo foi que o sangue menstrual humano contém altas concentrações de ativina A e folistatina. Enquanto o pool de ativina A e folistatina no sangue periférico provém de muitas fontes, tais como ovário, cérebro, hipófise, tireóide, córtex adrenal, pâncreas, fígado, baço e medula óssea (Luisi *et al* 2001), as altas concentrações dessas proteínas no sangue menstrual sugerem uma importante contribuição do endométrio. De fato, o fluido de lavado endometrial contém altas concentrações de ativina A (Petraglia *et al* 1998). Estudos anteriores demonstraram a presença de folistatina em vesículas de secreção ao longo da superfície apical de células do epitélio glandular, sugerindo que a folistatina pode ser liberada pelas glândulas endometriais para dentro do lúmen uterino (Jones *et al* 2002 b).

O segundo aspecto que nós observamos no presente estudo foi que o grupo com sangramento uterino disfuncional têm concentrações mais baixas de ativina A e folistatina no sangue menstrual comparado com o grupo controle. Essa característica no grupo com sangramento uterino disfuncional poderia ser um reflexo da ausência ou incompleta decidualização endometrial, desorganização da angiogênese, ou mesmo uma diminuição da capacidade secretora glandular, entre outros mecanismos em potencial.

A decidualização endometrial é uma seqüência complexa de alterações morfológicas e funcionais que se inicia nas células estromais imediatamente sob as arteríolas espiraladas e espalha-se progressivamente através do endométrio se a gravidez é alcançada (Bell.,1991), caso contrário ocorre a menstruação. As células estromais antes da decidualização são fusiformes e com o processo tornam-se arredondas e muito eosinófilas. Funcionalmente, as células estromais decidualizadas são distintas das células estromais não

decidualizadas, pois produzem e secretam diversas citocinas, fatores de crescimento e proteases, que contribuem para a adequada invasão do trofoblasto ou fluxo menstrual normal. Esse processo, comandado pela progesterona, é facilitado por fatores autócrinos e parácrinos, incluindo a prolactina (Maslar *et al.*, 1979), hormônio liberador de corticotrofina, PGE2 e interleucina-11 (Frank *et al.*, 1994; Zoumakis *et al.*, 2000; Dimitriadis *et al.*, 2002).

A ativina A estimula a decidualização endometrial *in vitro* (Jones *et al.*, 2002), ao passo que as células estromais decidualizadas produzem dímeros de ativina A em grande quantidade (Jones *et al.*, 2000, Petraglia *et al.*, 1998., Leung *et al.*, 1998). As várias ações parácrinas da ativina A na regulação da diferenciação celular, remodelagem tecidual e processo inflamatório são consistentes com os eventos da decidualização (Jones *et al.* 2006).

A relação entre progesterona e ativina A é reforçada pelo fato que ativina A é secretada para dentro do fluido uterino em quantidades crescentes da fase proliferativa para a fase secretora, e pela correlação positiva entre os níveis de ativina A no fluido uterino e a espessura endometrial, morfologia endometrial e o dia do ciclo menstrual (Florio *et al.*, 2003). Embora nós não tenhamos medido os níveis de progesterona nos dias anteriores à amostragem de sangue feita no presente estudo, a falta de estimulação da progesterona na fase lútea parece ser um mecanismo plausível para explicar os baixos níveis de ativina A no soro menstrual de mulheres com sangramento uterino disfuncional, pois o padrão de ciclos sugere que elas seriam oligo/anovulatórias.

O processo de diferenciação endometrial, menstruação e placentação envolve remodelagem da vasculatura endometrial. A angiogênese ocorre no endométrio durante a menstruação, para o reparo do leito vascular; durante a

fase proliferativa, para rápido crescimento do endométrio; e na fase secretora, para desenvolvimento das arteríolas espiraladas e crescimento do plexo capilar subepitelial (Gargett & Rogers, 2001). No sangramento uterino disfuncional anovulatório, as arteríolas espiraladas estão freqüentemente diminuídas e o número de capilares venosos está aumentado (Ferenczy, 2003).

A angiogênese endometrial é regulada pelo balanço dos inibidores e promotores da angiogênese. Durante o episódio de crescimento dos vasos, o balanço está a favor dos promotores, mas quando há cessação da angiogênese o balanço está a favor dos inibidores (Hanahan & Folkman, 1996). A ativina A inibe, enquanto a folistatina estimula a resposta angiogênica em modelos animais *in vivo* (McCarthy & Bicknell, 1993; Kozian *et al.*, 1997). O contrário, todavia, foi observado em cultura de células endoteliais da aorta de bovino, nas quais a ativina A estimulou a formação de capilares (Maeshima *et al.*, 2004).

Nós demonstramos que a folistatina está diminuída mais intensamente do que ativina A no sangue menstrual de mulheres com sangramento uterino disfuncional. Sendo assim, a razão ativina A / folistatina é mais alta neste grupo, o que poderia tanto agravar como atenuar os distúrbios da angiogênese endometrial nessas mulheres. Os desequilíbrios da angiogênese endometrial podem gerar microvasculatura alterada, que provavelmente contribui para maior perda sangüínea. Contudo, não se pode inferir de nossos dados se as alterações locais da ativina A e folistatina estão diretamente relacionadas com a angiogênese em mulheres com sangramento uterino disfuncional.

A população de leucócitos no endométrio varia durante o ciclo menstrual, e há maior influxo de leucócitos na fase secretora tardia. Os

macrófagos e monócitos produzem ativina A em resposta a citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-1, fator de necrose tumoral α , γ interferon, e lipopolissacáride (Yu *et al.*,1997; Shao *et al.*,1998). Outras ações anti-inflamatórias têm sido propostas para ativina A, uma vez que foi demonstrada sua capacidade de inibir as ações biológicas de interleucina-6, abolindo a indução da resposta inflamatória da fase aguda (Jones *et al.*,2000). Assim, é possível que o acúmulo de ativina A no sangue menstrual reflita não apenas a atividade das células epiteliais e estromais do endométrio, mas também a infiltração leucocitária e a resposta inflamatória local.

Os macrófagos também expressam MMPs, que estão aumentadas com a queda da progesterona (Salamonsen *et al.*, 1997). As MMPs estão envolvidas com a ruptura e angiogênese endometrial (Salamonsen *et al.*, 1999; Stetler-Stevenson.,1999). A angiogênese é facilitada por essas proteases, pois as células do endotélio necessitam de atividade proteolítica para degradar suas membranas basais, para migrarem e invadir a matriz extracelular. Além disso, os macrófagos são fonte de VEGF (Smith, 1998). A produção de VEGF e o aumento pré-menstrual do número de macrófagos levariam a uma adequada revascularização endometrial. A ativina A estimula a produção endometrial de pro-MMP-2, -3, -7, -9 e MMP-2 ativa (Jones *et al.* 2006). A secreção de MMPs é inibida pela folistatina, mas de maneira mais importante pela inibina A, que age juntamente com a progesterona para suprimir a produção das MMPs e manter a integridade endometrial até que inicie a menstruação (Jones *et al.*, 2006). Os baixos níveis de ativina A endometrial no grupo com sangramento uterino disfuncional comparado com o grupo controle poderiam ser outro mecanismo para explicar a anormalidade menstrual. A produção deficiente

destas MMPs pode contribuir para ruptura anormal do endométrio e anormalidades no sangramento menstrual (Salamonsen *et al.*, 2000).

Também no soro periférico, observamos concentração mais baixa de ativina A em mulheres com sangramento uterino disfuncional. É improvável que a idade mais avançada explique tal diferença, pois esse hormônio não se altera significativamente com a idade (Loria *et al* 1998). O ovário tem sido apontado como o lugar primário de síntese de ativina A e folistatina. O fato de que as mulheres com sangramento uterino disfuncional são predominantemente anovulatórias (Cameron, 1989; Fraser, 1989) levanta a questão se a anovulação crônica poderia resultar em concentrações mais baixas de ativina A em circulação. As concentrações periféricas de ativina A e a razão entre a ativina A /folistatina estão reduzidas em mulheres com síndrome dos ovários policísticos, uma condição caracterizada por anovulação crônica (Muttukrishna *et al* 2000; Norman *et al.*, 2001), similarmente ao que nós encontramos no grupo das mulheres com sangramento uterino disfuncional. Entretanto, os níveis de ativina A se mantêm praticamente constantes através do ciclo menstrual (Muttukrishna *et al.*, 1996b), e mesmo depois da menopausa (Burger *et al.*, 1998), o que argumenta contra um impacto significativo da anovulação sobre o pool circulante de ativina A. A variação sérica de ativina A durante o ciclo menstrual é muito menor do que a observada para as inibinas (Knight *et al.*, 1996; Muttukrishna *et al.*, 1996b). Essas evidências apontam para fontes extragonadais de ativina A; logo, é possível que a baixa concentração periférica de ativina A que encontramos nas pacientes com sangramento uterino disfuncional, durante a fase menstrual, se deva à baixa produção endometrial do hormônio.

As concentrações periféricas de folistatina não se alteraram no grupo com sangramento uterino disfuncional comparado com o grupo controle. Este fato, combinado com a grande diferença observada entre os grupos quanto à concentração de folistatina no sangue menstrual, sugere que o endométrio não contribui significativamente para o pool de folistatina circulante. A concentração de folistatina no fluido folicular excede a concentração periférica em aproximadamente 100 a 200 vezes (Erickson *et al.*, 1995; Khoury *et al.*, 1995; Muttukrishna *et al.*, 1996; Evans *et al.*, 1998), mas os níveis séricos são similares em mulheres eugonadais, mulheres com amenorréia hipotalâmica e mulheres ooforectomizadas (Khoury *et al.*, 1995) ou submetidas a supressão ovariana com a administração de análogo de hormônio liberador de gonadodrofinas (Kettel *et al.*, 1996).

O desenvolvimento de imunoenaios para a folistatina tem sido complicado devido a certas características da molécula, tais como a existência de diferentes isoformas. A folistatina 288 é predominante no fluido folicular humano, enquanto a principal forma sérica é a folistatina 315 (Schneyer *et al.*, 1996), que parece funcionar como um reservatório de ativinas, por impedir a sua proteólise e garantir a distribuição regular da ativina em vários tecidos (Delbaere *et al.*, 1999). Os achados deste estudo restringem-se à isoforma 315 e não podem ser extrapolados para a folistatina 288, cuja expressão também já foi demonstrada no endométrio humano.

6. Conclusão

Em conclusão, ativina A e folistatina são altamente concentradas no sangue menstrual e são relativamente mais baixas em mulheres com sangramento uterino anormal disfuncional.

A análise quantitativa de ativina A e folistatina no soro menstrual pode ser um importante marcador clínico da função endometrial.

7. Referências

Akerlund, M.Bengtsson, L.P and Carter, A.M.A technique for monitoring endometrial or decidual blood flow with an intrauterine thermistor probe. *Acta Obstet. Gynecol. Scand* 1975; 54:467-477

Arici, A., Seli, E., Semturk, L. M. et al. Interleukin-8 in human endometrium. *J. clin. Endocrinol. Metab* 1998; 83:1783-517870.

Attisano L, Silvestri C, Izzi L, Labbé E. The transcriptional role of Smads and FAST (FoxHi) in TGF β and activin signaling. *Mol cell Endocr* 2001; 180:3-11

Baird, D.T., Cameron, S.T., Critchley, H.O.D. et al. Prostaglandins and menstruation. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol* 1996; 70:15-17

Ballinger, CV., Browning, N.C. and Smith, A.H.W. Hormonal profiles and psychological symptoms in perimenopausal women. *Maturitas*. 1987; 9: 235-251

Bell Sc. The insulin-like growth factor binding proteins-the endometrium and decidua. *Am NY Acad Sci* 1991; 6222:120-137

Bernard D.J, Chapman S.C, Woodruff T.K. An emerging role for co-receptors in inhibin signal transduction. *Mol.Cel. Endocrinol.*2001;180:55-62

Bilezikjian L.M, Blount A:L, Leal A.M.O, Donaldson, Fischer W.H, Vale W.W. Autocrine/paracrine regulation of pituitary function by activin, inhibin and follistatin.2004;225:29-36

Burger HG, Cachir N, Robertson DM, Groome NP, Dudley E, Green A and Dennerstein L. Serum inhibins A and B fall differentially as FSH rises in permenopausal women. *Clin Endocrinol* 1998; 48:809-813

Cameron, I.T. Dysfunctional uterine bleeding .In Drife, J.O (ed) Dysfunctional uterine bleeding and menorrhagia. *Baillière's Clin:obstet. Gynaecol* 1989; 3:315-328

D'Antona D, Reis FM, Benedetto C, et al. Increased maternal serum activin A but not follistatin levels in pregnant women with hypertensive disorders. *J Endocrinol* 2000; 165:157-62

Chwalisz, k. AND Gargield, R.E. Role of nitric oxide in implantation and menstruation. *Hum.Reprod.*2000; 15(suppl.3): 96-111

Critchley, H.O.D., Abberton, K.M., Taylor, N.H. et al. Endometrial sex steroid receptor expression in women with menorrhagia. *Br. J. Obstet. Gynaecol* 1994; 101:428-434

de Kretser, D.M. and Robertson, D.M. The isolation and physiology of inhibin and related proteins. *Biol.Reprod.* 1989; 40:33-47

de Kretser DM, Hedger MP and Philips DJ. Activin A and follistatin. their role in the acute phase reaction and inflammation. *Journal of endocrinology* 1999;161:195-198

de Kretser DM, Hedger MP, Loveland vKL., Philips DJ. Inhibins, activins and follistatin in reproduction. *Human Reprod Update*. 2002; 8:529-541

de Winter JP, Ten Dijke P, de Vries CJ, van Achterberg TA, Sugino H, de Waele P, et al. Follistatins neutralize activin bioactivity by inhibition of activin binding to its type II receptors. *Mol cell Endocrinol* 1996; 116:105-14

Dimitriadis E, Robb L, Salamonsen LA. Interleukin 11 advances progesterone-induced decidualization of human endometrial cells. *Mol Hum Reprod* 2002; 8:636-643

Erickson, G.F., Chung, D.G., Sit A. et al. Follistatin concentrations in follicular fluid of normal and polycystic ovaries. *Hum Reprod* 1995; 10:2120-2124

Evans, L.W., Muttkrishna, S., Groome, N.P. Development, validation and application of an ultra-sensitive two-site enzyme immunoassay for total human follistatin in biological fluids. *J. Endocrinol* 1998; 156:275-283

Eweinstein BM. The pathophysiology of bleeding disorders presenting as abnormal uterine bleeding. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 175:770-7

Eldred, J.M and Thomas, E.J. Pituitary and ovarian hormone levels in unexplained menorrhagia. *Obstet. Gynecol.* 1994; 84: 775-778

Fang J., Yin W., Smiley E., Wang S.Q., Bonadio J. Molecular cloning of the mouse activin beta E subunit gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 228:669-674

Fazleabas, A.T., Strakova, Z., 2002. Endometrial function: cell specific changes in the uterine environment. *Mol. Cell. Endocrinol* 186, 143-147 (Review) ok

Ferenczy A. Pathophysiology of endometrial bleeding. *Maturitas* 2003;45:1-14

Ferrara N 2001 Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am. J Physiol*; 280:C1358-C1366

Ferrari A, Petraglia F, Gursipide E. Corticotropin-releasing factor decidualizes human endometrial stromal cells in vitro. Interaction with progestin. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995; 54:5-6

Findlay, J.K. Angiogenesis in reproductive tissues. *J. Endocrinology* 1986; 111:357-366

Findlay, J.K. An update on the roles of inhibin, activin, and follistatin as local regulators of folliculogenesis. *Biol. Reprod.* 1993; 48:15-23

Finn, C.A. Implantation, menstruation and inflammation. *Biol.Rev.*, 1986; 61:313-328

Florio P, Luisi S, Viganò P, Busacca M, Fadalti M, Genazzani AR and Petraglia F. Healthy women and patients with endometriosis show high concentrations of inhibin A, inhibin B and activin A in peritoneal fluid throughout menstrual cycle. *Hum Reprod* 1998; 13:2606-2611

Florio P, Rossi M, Sigurdardotti M, Ciarmela P, Luisi S, Viganò P, Grasso D, Fiore G, Cobellis L, Di Blasio A.M, Petraglia Felice. Paracrine regulation of endometrial function: interaction between progesterone and corticotropin-releasing factor(CRF) and activin A. *Steroids* 2003;68:801-807

Florio, P., Severini, F.M., Luisi, S., Ciarmela, P., Calonaci, G., Petraglia, F. Endometrial expression and secretion of Activin-A, but not follistatin, increased in the secretory phase of the menstrual cycle. *J. Soc. Gynecol. Invest.* 2003, 10:237-243

Folkman, J. Tumor angiogenesis. *Adv.Cancer Res* 1995; 43:175-203

Foster C.M., Philips ,D.J., Wyman T et al .Changes in serum inhibin ,activin and follistatin concentrations during puberty in girls. *Hum Reprod* 2000; 15:1052-1057

Frank GR, Brar AK, cedars MI, Handwerger S. Prostaglandin E2 enhances human endometrial stromal cell differentiation. *Endocrinology* 1994; 134:258-263

Fraser,I.S., McCarron ,G. and Markham, R.A preliminary study of factors influencing perception of menstrual blood loss volume. *Am.J.Obstet.Gynecol.*1984; 149:788-793

Fraser, I.S. McCarron, G., Markham, R *et al.* Endometrial blood flow measured by xenon-133 clearance in women with normal menstrual cycles and dysfunctional uterine bleeding. *Am.J.Obstet.Gynecol* 1987:156:158-166

Fraser I.S. Treatment of menorrhagia In Drife, J.O(ed) Dysfunctional uterine bleeding. *Baillière' Clin.Obstet.Gynaecol* 1989; 3:391-402

Gannon BJ, carati CJ, Verco CJ. Endometrial perfusion across the normal human menstrual cycle assessed by laser Doppler fluxmetry. *Human Reprod* 1997; 12: 132

Gargett CE,Lederman F,Lau TM,Taylor NH and Rogers PAW. Lack of correlation between vascular endothelial growth factor production and endothelial cell proliferation in the human endometrium. *Human Reproduction* 1999; 14:2080-2088

Gargett C.E and Rogers P A.W. *Human endometrial angiogenesis* 2001; 121:181-186

Gleeson, N., Devitt, M Sheppard, B.L. et al. Endometrial fibrinolytic enzymes in women with normal menstruation and dysfunctional uterine bleeding. *Br. J. Obstet Gynaecol.* 1993; 100:768-771

Gordon, J.D., Shifren, J.L., Foulk, R.A. et al. Angiogenesis in the human female reproductive tract. *Obst.gynecol.Surv* 1995; 50:688-697

Gray P.C, Bilezikjian L.M, Vale W. Antagonism of activin by inhibin and inhibin receptors: a functional role for betaglycan-glycan. *Mol.Cell.Endocrinol* 2001;180:47-53

Greenberg, M. The meaning of menorrhagia: an investigation into the association between the complaint of menorrhagia and depression. *J. Psychosom. Res.* 1983; 27:209-214

Halberg, L., and Nilsson, L. Determination of menstrual blood loss. *Scand.J.Clin. Lab.invest* 1964;16:244

Hanahan D and Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996;86: 353-364

Harada K, Shintani Y, Sakamoto Y, Wakatsuki M, Shitsukawa K, Sait S. Serum immunoreactive activin A levels in normal subjects and patients with various diseases. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996; 81:2125-2130

Haynes, P.J., Anderson, A.B.M. and Turmbull, A.C. Patterns of menstrual blood loss in menorrhagia. *Res.Clin.Forums* 1979; 1:73-78

He, Z., Liu, H., Mele, CA. et al. Expression of inhibin /activin subunits and their receptors and binding proteins in human preimplantation embryos. *J.Assist.Reprod.Genet.* 1999; 16:73-80

Hickey, M., Fraser, I.S., Dewart, D. et al. Endometrial vasculature in Norplant users: preliminary results from a hysteroscopic study. *Human Reprod.* 1996;118(suppl2):35-44

Hickey, M., Dewart, D. and Fraser, I.S. Precise measurements of intrauterine vascular structures at hysteroscopy in menorrhagia and during Norplant use. *Human Reprod.* 1998; 13:3190-3196

Hickey, M., Dewart, D. AND Fraser, I.S. Superficial endometrial vascular fragility in Norplant users and in women with ovulatory dysfunctional uterine bleeding. *Human Reprod.* 2000a; 15:1509-1514

Higham JM, O'Brien PMS, Shaw RW. Assessment of menstrual blood loss using a pictorial chart. *Br J Obstet Gynaecol* 1990; 97:734-9.

Hötten G, Neidhardt H, Schneider C, Pohl J. Cloning of a new member of the TGF-beta family: a putative new activin beta C chain. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 206:608-613

Hübner ,G.,Alzheimer ,C. and Werner,S.Activin A : a novel player in tissue repair process.*Histol.Histopathol.*1999;14:295-304

Jones, RL., Salamonsen, L.A., Critchley,H.O., Rogers, P.A., Affandi,B.,Findlay,K.K..Inhibin and activin subunits are differentially expressed in endometrial cells and leukocytes during the menstrual cycle, in early pregnancy and in women using progestin –only contraception. *Mol.Hum.Reprod* 2000; 6:1107-1117.

Jones,R.L., Salamonsen ,L.A.,Findlay,J.K.Activin A promotes human endometrial stromal cell decidualization *in vitro*.*J.Clin.Endocrinol.Metab.*2002 a;87:4001-4004

Jones,R.L.,Salamonsen,L.A.,Zhao,Y.C.,ethier,J.F.,Drumond,A.E.,Findlay,J.K. Expression of activin receptors, follistatin and betaglycan by human endometrial stromal cells consist with a role for activins during decidualization. *Mol.Hum.Reprod* .2002b; 8:363-374

Jones R.L, Findlay J.K, Farnworth P.G, Robertson D.M, Wallace E, and Salamonsen L.A Activina A e inhibin A Differentially regulate Human uterine Matrix metalloproteinases: Potential interactions during Decidualization and Trophoblast Invasion . *Endocrinology* 2006;147(2):724-732

Jones R.L, Findlay J.K and Salamonsen L.A. The role of activins during decidualisation of human endometrium. *Australian and New Zealand Journal of Obstetric and Gynaecology* 2006;46:245-249

Kalkohoven E,Roelen BA,de Winter JP, Mummery CL, van den Eijnden-van Raaij AJ, van der Saag PT,van der Burg B. Resistance to transforming growth factor beta and activin due to reduced receptor expression in human breast tumor cell lines. *Cell Growph Differ.*1995; 6:1151-1161

Kettel, L.M.,de Paolo, L.V.,Morales et al.1996. Circulating levels of follistatin from puberty to menopause. *Fertil Steril* 1996; 65:472-476

Khoury ,R.H.,Wang,Q.F.,Crowley J.r.,W.F.,Hall,J.E. *et al.* Serum follistatin levels in women :evidence against an endocrine function of ovarian follistatin . *J.Clin. Endocrinol. Metabol.*1995; 80:1361-1368

Knight, P.G., Muttkrishna, S., Groome, N.P. Development and application of a two-site enzyme immunoassay for the determination of "total" activin –A concentration in serum and follicular fluid. *J. Endocrinol* 1996; 148:267-276

Kothapalli,R.,Buyuksal,I.,Wu,S.Q.et al.Detection of ebaf,a novel human gene of the transforming growth factor-beta superfamily.*J.Clin.Invet* 2000;99:2342-2350

Kucuk M and Okman T.K.Intrauterine instillation acid is effective for the treatment of dysfunctional uterine bleeding. *Fertil and Steril.*2005; 83(1): 189-194

Lathbury, L.J and Salamonsen, L.A. Identification of a role for neutrophils in the process of menstruation. *Mol.Hum.Reprod* 1999; 6:899-906

Leung, P.H.Y., Salamonsen, L.A. and Findlay, J.K. Immunolocalisation of inhibin and activin subunits in human endometrium across the menstrual cycle. *Human Reprod* 1998; 13:3469-3477

Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N, Vassalli JD. Vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am. J. Physiol* 1999; 280:C1358-C1366

Lin S.Y., Morrison J.R., Phillips D.J and de Kretser D.M. Regulation of ovarian function by the TGF- β superfamily and follistatin. *Reproduction* 2003; 126:133-158

Livingstone M and Fraser I.S. Mechanisms of abnormal uterine bleeding. *Human Reproduction update* 2002; 8(1): 60-67

Lockwood, G.M., Muttukrisna, S.S., Groome, N.P *et al* . Circulating inhibins and activin-A during GnRH analogue down-regulation and ovarian hyperstimulation with recombinant FSH for *in vitro* fertilization embryo transfer. *Clin.Endocrinol* 1996; 45:741-748

Lockwood, C.J., Runic, R., Wan, L. *et al* . The role of tissue factor in regulating endometrial haemostasis implications for progestin only contraception. *Human Reprod* 2000; 15(suppl.3): 144-151

Loria P, Petraglia F, Concari M, Bertolotti M, Martella P, Luisi S. Influence of age and sex on serum concentrations of total dimeric activin A. *Eur J Endocrinol* 1998; 139:487-492

Luisi, S., Florio, P., Reis, F.M., Petraglia, F. Expression and secretion of Activin -A: possible physiological and clinical implications. *Eur.J.Endocrinol.* 2001; 145:225-236

Norman R.J., Milner C.R., Groome N.P., Robertson D.M. Circulating follistatin concentrations are higher and activin A concentrations are lower in polycystic ovarian syndrome. *Human Reprod* 2001; 16:668-672

Maeshima K, Maeshima A., Hayashi Y., Kishi S and Kojima I. Crucial Role of Activin A in tubulogenesis of endothelial Cells Induced by vascular Endothelial Growth Factor. *Endocrinology* 2004; 145(8): 3739-3745

Marsh, M.M. Findlay, J.K. and Salamonsen, L.A. Endothelin and menstruation. *Human Reprod.* 1995; 11:83-89

Maslar IA, Riddick DH. Prolactin production by human endometrium during the normal menstrual cycle. *Am. J. Obstet Gynecol.* 1979; 135:751

Mather J.P., Woodruff, T.K. and Krummen, L.A. Paracrine regulation of reproductive function by inhibin and activin. *P.S.E.B.M.* 1992; 201:1-15

McCarthy SA, Bicknell R. Inhibition of vascular endothelial cell growth by activin-A. *J Biol Chem.* 1993; 268:23066-23071

Mottram JC, CraMER w. On the general effects of exposure to radium on metabolism and tumor growth in the rat and the special effects on the testis and the pituitary. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci.* 1923; 13:209-229

Munz B, Hubner G, Trtter Y, Alzheimer C, Werner S. A novel role of activin in inflammation and repair. *J Endocrinol.* 1999; 161:187-193

Muttukrishna, S., Fowler, P.A., George, L., Groome, N-P., Knight, P.G. Changes in peripheral serum levels of total activin-A during the human menstrual cycle and pregnancy. *J. Endocrinol. Metabol.* 1996; 81:3328-3334

Muttukrisna S, Child T, Lockwood GM, Groome NP, Barlow DH and Ledger WL. Serum concentrations of dimeric inhibins, activin A, gonadotrophins and ovarian steroids during the menstrual cycle in older women. *Human Reprod* 2000; 12:1089-1093

Muttukrisna S., Tannetta D., Groome N., Sargent I. Activin and follistatin in female reproduction. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2004; 225:45-56

Mylomas I, Jeschke U, Wiest I, Hoeng A, Vogl J, ShaBANI n, Kuhn C, Schulze S, Kupka M.S, Friese K. Inhibin/activin subunits alpha, beta -A and beta-b are differentially expressed in normal human endometrium through the menstrual cycle. *Histochem Cell Biol* 2004; 122:461-471

Ni, X., Luo, S., Minegishi, T. et al. Activin A in JEG-3 Cells: potential role as an autocrine regulator of steroidogenesis in humans. *Biol Reprod.* 2000; 62:1224-1230

Norman R.J., Milner C.R., Groome N.P. and Robertson D.M. Circulating follistatin concentrations are higher and activin concentrations are lower in polycystic ovarian syndrome. *Hum. Reprod.* 2001; 16 (4):668-672

Oda S, Nishimatsu S, Murakami K, Ueno N. Molecular cloning and functional analysis of a new activin beta subunit: a dorsal mesoderm-inducing activity in *Xenopus*. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 210:581-588

Otani, T., Minami, S., Kokawa, K., Shikone, T., Yamoto, and Nakano, R. Immunohistochemical localization of activin A in human endometrial tissues during the menstrual cycle and in early pregnancy. *Obstet. Gynecol* 1998; 91:685-692

Otani T, Minami S, Yamoto M, Umesaki N. Production of Activin A in hyperplasia and Adenocarcinoma of the Human Endometrium. *Gynecology Oncology* 2001; 83:31-38

Petraglia, F., Florio, P., Luisi, S., Gallo, R., Gadducci, A., Vigano, P. Expression and secretion of inhibin and activin in normal and neoplastic uterine tissues. High levels of serum activin-A in women with endometrial and cervical carcinoma. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 1998;83:1194-1200

Philips DJ, de Krestser DM. Follistatin: a multifunctional regulatory protein. *Front Neuroendocrinol* 1998; 19:287-3222

Phillips, K.P., Leveile, M.C., Claman, P. *et al.* Changes in serum inhibin, activin and follistatin concentrations during puberty in girls. *Human Reprod* 2000b;15:1052-1057

Plaisier M., Koolwikk P., Hanemaaijer R., Verwey R.A., Van der Weiden R.M.F., Risse E.K.J. Jungerius C., Helmerhorst F.M. and van Hinsbergh V.W.M. Membrane-type matrix metalloproteinases and vascularization in human endometrium during the menstrual cycle. *Mol.Hum.Reprod* 2006;12:11-18

Reis, F.M., Di Blasio, A.M., Florio, P., Ambrosini, G., Di Loreto, C., Petraglia, F. Evidence for local production of inhibin A and activin A in patients with ovarian endometriosis. *Fertil.Steril.* 2001; 75:367-373

Rodriguez-Manzaneque J.C., Graubert, M and Iruela-Arispe, M.L. Endothelial cell dysfunction following prolonged activation of progesterone receptor. *Hum.Reprod* 2000; 15(suppl.3):39-47

Salamonsen L.A, Woolley D.E. Matrix metalloproteinases in normal menstrual. *Hum Reprod* 1996; 11(suppl.2): 124-133

Salamonsen L.A., Butt, A.R., Hammond, F.R. *et al.* Induction of endometrial matrix metalloproteinases, but not their tissue inhibitors, is modulated by progesterone withdrawal in an in vitro model for menstruation. *J.Clin. Endocrinol. Metab* 1997; 82:1409-1415

Salamonsen, L.A. and Wooley, D.E (1999) Menstruation : induction by matrix metalloproteinases and inflammatory cells, *J.Reprod.Immunol* 1999;44:1-27)

Salamonsen, L.A., Zhang, J., Hampton, A and Lathbury, L. Regulation of matrix metalloproteinases in human endometrium. *Hum.Reprod.* 2000;15(suppl.3):112-119

Salamonsen LA. Tissue injury and repair in the female human reproductive tract. *Reproduction* 2003; 125:301

Schneyer, A.L., Rzucillo, D.A., Sluss, P.M., Crowley, W.F.Jr. Characterization of unique binding kinetics of follistatin and activin or inhibin in serum. *Endocrinology* .1994; 135:667-674

Schneyer, A.L., Fujiwara T., Fox J. *et al* Dynamic changes in the intrafollicular inhibin/activin/follistatin axis during human follicular development: relationship to circulating hormone concentrations. *J.Clin.Endocrinol.Metabol* 2000; 85:3319-3330.

Schneyer A, Schoen A, Quigg A, Sidis Y. Differential binding and neutralization of activins A and B by follistatin and follistatin like-3 (FSTL-3/FSRP/FLRG). *Endocrinology* 2003; 144:1671-1674.

Shao LE, Frignon NL, Yu A *et al.* Contrasting effects of inflammatory cytokines and glucocorticoids on the production of activin A in human marrow stromal cells and their implications. *Cytokine* 1998; 10:227-35

Shimonaka, M., Inouye, S., Shimasaki, S. and Ling, N. Follistatin binds to the both activin and inhibin through the common subunit. *Endocrinology* 1991; 128:3313-3315

Smith, S.K., Abel M.H., Kelly, R.W. *et al.* Prostaglandin synthesis in the endometrium of women with ovular dysfunctional uterine bleeding. *Br.J.Obstet.Gynaecol.*1981a; 88:434-442

Smith,S.K.,Abel ,M.H.,Kelly R.W.*et al.*A role for prostacyclin (PGI₂) in excessive menstrual bleeding. *Lancet* 1981b; I: 522-524

Smith, S.K., Abel, M.h., Kelly R.W. *et al.* The synthesis of prostaglandins from persistent proliferative endometrium. *J.Clin.Endocrinol.Metab.*1982; 55:284-289

Smith, S.K., and Kelly, R.W. The effect of anti progestins RU486 and ZK on the synthesis of PGF₂ alpha and PGE₂ in separated cells from early human decidua. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 1987; 63:527-537

Smith JC, Price BM, Van Nimmen K.Huylebroeck D. Identification of a potent *Xenopus* mesoderm-inducing factor as a homologue of activin A. *Nature* .1990; 345:729-731

Smith S, K. Angiogenesis, vascular endothelial growth factor and the endometrium. *Hum .Reprod.Update.*1998; 4:509-519

Song J.Y., Markham, R., Russell, P. *et al.* The effect of high-dose medium – dose and long-term progestogen exposure on endometrial vessels. *Human Reprod* 1995; 10:797-8000

Stetler-Stevenson W. Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J.Clin. Invest* 1999;103:1237-1241

Tabibzadeh,S.(1996) The signals and molecular pathways involved in human menstruation, a unique process of tissue destruction and remodelling. *Mol. Human Reprod.*, 1996; 2:77-92

Tierney E.P and Linda C. Giudice. Role of activin A as a mediator of in vitro endometrial stromal cell decidualization via the cyclic adenosine monophosphate pathway. *Fertil and Steril* 2004;81:899-903

Tsuchida K, Matsuzaki T, Yamakawa N, Liu ZH, Sugino H. Intracellular and extracellular control of activin function by novel regulatory molecules. *Mol Cell Endocr* 2001; 180:25-31

Vale W, Rivier J, Vaughan J, et al. Purification and characterization of an FSH releasing protein from porcine ovarian follicular fluid. *Nature* 1986; 321:776-9

Wahab M, Thompson J, Al-Azzawi. Effect of different cyclical sequential progestins on endometrial vascularity in postmenopausal women compared with the natural cycle: a morphometric analysis. *Human Reprod* 2000; 15:2075-81

Wang, I.Y.S., Fraser, I.S., Barsamian, S.P. et al. Endometrial lysosomal enzyme activity in ovulatory dysfunctional uterine bleeding, IUCD users and postpartum women. *Mol. Hum. Reprod.* 2000; 6:258-263

Wang HQ, Takebayashi K, Nishimura M, Noda Y. Follistatin-Related Gene (FLRG) Expression in Human Endometrium: Sex Steroid Hormones Regulated The expression of FLRG in cultured Human Endometrial Stromal Cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 86(9): 3443-9

Warner P.E, Critchley H.O.D, Lumsden M.A, Campbell-Brown, Douglas A, Murray G.D. Menorrhagia I: measured blood loss, clinical features, and outcome in women with heavy periods: a survey with follow-up data. *Am.J. Obstetrics gynecology* 2004; 190:1216-23

Welt C., Sidis Y., Keutmann H., and Schneyer A. Activins, inhibins, and follistatins: From Endocrinology to signaling. A Paradigm for the New Millennium. *The Society for Experimental Biology and Medicine.* 2002; 724-752

Woodruff, T.K. Regulation of cellular and system by function by activin. *Biochem. Pharmacol.* 1998; 55:953-963

Wonodirekso, S., Affandi, B., Siregar, B. et al. Endometrial epithelial integrity and subepithelial reticular fibre expression in progestin contraceptive users. *Human Reprod* 2000; 15(suppl.3):189-196

Yu J, Dolter KE. Production of activin A and its roles in inflammation and hematopoiesis. *Cytok Cell Mol Therapy* 1997; 3:169-177

Zoumakis E, Margioris AN, Stournaras C et al. Corticotrophin-releasing hormone (CRH) interacts with inflammatory prostaglandins and interleukins and affects the decidualization of human endometrial stroma. *Mol Hum Reprod* 2000; 6:344-351.

Anexos

SISTEMA VISUAL DE AVALIAÇÃO DA PERDA SANGÜÍNEA (SVPS)

Como usar o SVPS:

Durante o período de sangramento uterino anormal registrar o uso dos tampões e/ou absorventes colocando uma marca do registro sob o dia ao lado da caixa que representa como manchado seus absorventes cada vez você trocá-los.

Anotar os tamanhos dos coágulos indicando se são do tamanho de uma moeda de 1centavo ou 50 centavos naqueles dias que inundam todo o absorvente. Por exemplo, sob o dia 1 você pode dizer 1 de 50 centavos e 3 de 1 centavo.

Anotar todos os vazamentos fazendo o registro dos coágulos que inundam o absorvente sob o dia crítico.

Contagens:







Um absorvente levemente manchado marcará 1 ponto, um absorvente moderadamente manchado 5 pontos, um absorvente inteiramente manchado marcará 20 pontos.

Um tampão levemente manchado marcará 1 ponto, um tampão moderadamente manchado 5 pontos e um tampão inteiramente manchado marcará 10 pontos.

Um coágulo do tamanho de uma moeda de 1centavo marca 1 ponto; um coágulo do tamanho de uma moeda de 50 centavos marca 5 pontos; e vazamentos, também marcam 5 pontos.

Resultados:

Uma vez que você terminou o período acima de suas contagens, uma contagem de 100 ou mais pode indicar que você tem sangramento uterino anormal, e você deve ser avaliada pelo ginecologista. Entretanto, se sua contagem for menos de 100 e você tem preocupações sobre a quantidade do seu fluxo menstrual você deve sempre consultar seu ginecologista.

Absorventes	1	2	3	4	5	6	7	8
								
								
								
COÁGULOS/ VASAMENTOS								
Tampões	1	2	3	4	5	6	7	8
								
								
								
COÁGULOS/ VASAMENTOS								

Higham et al, (1990), Assessment of menstrual blood loss using a pictorial chart, British Journal of Obstetrics & Gynaecology, 97, pp734-739.

UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP

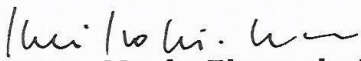
Parecer nº. ETIC 466/04

Interessado: Prof. Dr. Fernando Marcos dos Reis
Departamento de Ginecologia e Obstetícia
Faculdade de Medicina - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP, aprovou no dia 16 de fevereiro de 2005, o projeto de pesquisa intitulado « **Identificação de Inibinas, Ativinas e Folistatina no Soro do Fluxo Menstrual: Correlação com a Hemorragia Uterina Disfuncional** » bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do referido projeto.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


p/ **Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia**
Presidente do COEP/UFMG