

CÁSSIA RAQUEL TEATIN JULIATO

**ISOFORMAS DE FSH, INIBINAS B E PRÓ- α C EM USUÁRIAS DE
ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA DE DEPÓSITO COMO
CONTRACEPTIVO NA TRANSIÇÃO PARA A MENOPAUSA**

Dissertação de Mestrado

ORIENTADOR: Prof. Dr. LUIS BAHAMONDES

**UNICAMP
2005**

CÁSSIA RAQUEL TEATIN JULIATO

**ISOFORMAS DE FSH, INIBINAS B E PRÓ- α C EM USUÁRIAS DE
ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA DE DEPÓSITO COMO
CONTRACEPTIVO NA TRANSIÇÃO PARA A MENOPAUSA**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Pós-Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do Título de
Mestre em Tocoginecologia, área de
Tocoginecologia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. LUIS BAHAMONDES

**UNICAMP
2005**

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

J942i Juliato, Cássia Raquel Teatin
Isoformas de FSH, inibinas B e pró- α C em usuárias de
acetato de medroxiprogesterona de depósito como
contraceptivo na transmissão para menopausa / Cássia
Raquel Teatin Juliato. Campinas, SP : [s.n.], 2005.

Orientador: Luis Guilherme Bahamondes
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Menopausa. 2. Medroxiprogesterona. 3. Anticoncepção.
4. Hormônio Folículo Estimulante. I. Bahamondes, Luis
Guilherme. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

(slp/fcm)

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluna: CÁSSIA RAQUEL TEATIN JULIATO

Orientador: Prof. Dr. LUIS BAHAMONDES

Membros:

1.

2.

3.

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

Data: 15/06/2005

Dedico este trabalho...

*Aos meus queridos pais,
Ernesto e Marli, e especialmente,*

*À minha mãe, Marli, por ter-me incentivado em tantos momentos,
ter-me feito acreditar que era possível alcançar um sonho
e por ter se esforçado e se privado de tantas coisas para
que eu pudesse estar aqui.*

*Aos meus queridos irmãos, Fábio e Patrícia,
por estarem sempre ao meu lado,
acreditando sempre na minha vitória
e torcendo para que ela acontecesse.*

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Luis Guillermo Bahamondes, meu orientador, por toda atenção, carinho e por tornar cada simples conversa em um grande aprendizado para mim.

À Dra. Stella Campos, pela fundamental participação neste estudo e por estar sempre tão disponível para a discussão deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Petta por todas as sugestões para a realização desta tese.

À Profa. Dra. Sophie Françoise Mauricette Derchain, pela amizade e incentivo à pesquisa clínica.

Ao Dr. Marcos Perrotti, pelo apoio e ajuda para a realização desta tese.

À Profa. Dra. Arlete Maria dos Santos Fernandes por toda atenção disponibilizada para a correção desta tese e pelas valiosas contribuições durante a qualificação.

À Verônica Barros, um agradecimento muito especial pela disponibilidade e valiosa ajuda durante todas as fases deste estudo.

Às enfermeiras do CEMICAMP, Creuza Hidalgo Regina, Maria Cecília Monteiro Dantas, Maria Margarete Hidalgo, Marina Villaroel, Nádia Marchi, Sara Castro e Ximena Arce, pela amizade e colaboração na realização deste estudo.

À Adriana Barros e Lusía Helena E. A. de Oliveira pela ajuda durante a realização deste estudo.

Às biólogas Priscila Portugal e Eliane Brolazo pela ajuda com o processamento das amostras.

Às auxiliares de enfermagem Laís, Edite e Eliane pela contribuição durante a coleta das amostras.

À estatística Maria Helena, pela atenção com a análise dos dados.

A toda equipe da ASTEC, pela competência e disponibilidade durante a realização deste estudo.

À Margarete Amado de Souza Donadon, secretária da pós-graduação, pela simpatia e colaboração durante todos esses anos.

À minha amiga Dra. Cláudia Inhaia, pelo carinho e por toda contribuição dada a este estudo.

À minha amiga Dra. Amanda Gomes, pela amizade de tantos anos e por estar sempre torcendo pelo sucesso deste trabalho.

As minhas amigas de residência e mestrado, Dra. Adriana Salzani e Dra. Danielle Sá, por tantos momentos juntas.

Em Especial:

A minha tia Marlei, pela torcida desde os momentos do vestibular.

As minhas tias Márcia e Suzi, pelo carinho e apoio.

Aos meus avós, Leonor e Américo, por sempre torcerem tanto por mim.

Ao Breno, por ser um exemplo de companheirismo, por estar sempre ao meu lado, apoiando-me de maneira tão carinhosa.

Às mulheres que contribuíram para este estudo, sem as quais nada disso seria possível...

Sumário

Símbolos, Siglas e Abreviaturas	viii
Resumo	x
Summary	xii
1. Introdução	14
2. Objetivos	27
2.1. Objetivo geral	27
2.2. Objetivos específicos	27
3. Materiais e Métodos	28
3.1. Dosagens Hormonais	29
3.2. Determinação das isoformas de FSH	31
3.3. Determinação do Polimorfismo FSH	31
3.4. Cromatografia por Concanavalina A	33
4. Publicação	36
5. Conclusões	57
6. Referências Bibliográficas	58
7. Bibliografia de Normatizações	65
8. Anexos	66
8.1. Anexo 1 – Termo de Consentimento Livre e Informado	66
8.2. Anexo 2 – Ficha para Coleta de Dados	68

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

AMPD	Acetato de Medroxiprogesterona de Depósito
B-FSH	<i>Bioactive FSH</i>
CAISM	Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
CEDIE	Centro de Investigaciones Endocrinológicas
Côn A	Concanavalina A
CONICET	<i>Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas</i>
E2	Estradiol
EIA	<i>Enzyme immunoassay</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FB	<i>Firmly Bound</i>
Fuc	Fucose
FSH	Hormônio Folículo-Estimulante
Gal	Galactose
GICNAc	N-acetilglucosamida ácida
GICNAcSO₄	Sulfato de N-acetilglucosamida ácida
GnRH	<i>Gonadotropin releasing hormone</i>

hFSH	<i>Human FSH</i>
IEF	<i>Preparative isoelectric Focusing</i>
I-FSH	<i>Imune FSH</i>
LH	Hormônio Luteinizante
mRNA	RNA-mensageiro
PLACIRH	Programa Latinoamericano de Capacitación e Investigación en Reproducción Humana
RIA	Radioimunoensaio
UB	<i>Unbound</i>
WB	<i>Weakly bound</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

Resumo

Introdução: Este foi um estudo sobre a utilidade clínica da dosagem de FSH em mulheres que utilizavam o contraceptivo acetato de medroxiprogesterona de depósito (AMPD) no período da transição para menopausa. O objetivo deste estudo foi determinar o perfil sérico das isoformas do hormônio folículo-estimulante (FSH), das inibinas B e pró- α C em mulheres com idade igual ou superior a 45 anos, que estavam em amenorréia secundária ao uso de AMPD. **Materiais e Métodos:** Foram incluídas no estudo 11 usuárias de AMPD, com idade superior a 45 anos e que estavam em amenorréia há mais de 12 meses (grupo de estudo). Estas mulheres foram pareadas com 11 não usuárias por idade (± 1 ano) e peso (± 2 kg). No grupo de estudo, as amostras de sangue foram coletadas imediatamente antes da injeção de AMPD (90 ± 5 dias da última injeção) e no grupo das não usuárias no nono dia do ciclo (± 1 dia). Foram realizadas dosagens séricas de estradiol, FSH, de inibinas B e pró- α C e determinação das isoformas de FSH. **Resultados:** As usuárias de AMPD tiveram níveis significativamente maiores de FSH e menores de estradiol, inibinas B e pró- α C do que as não usuárias ($p < 0,01$). Não houve diferença na proporção de FSH isolada no pH abaixo de 4,1. A distribuição das isoformas de FSH mostrou similar proporção de UB (*unbound*),

WB (*weakly bound*) e FB (*firmly bound*). Foram observadas correlações inversa ($r = -0,48$, $p < 0,05$) e direta ($r = 0,52$, $p < 0,05$) entre idade e as isoformas de FSH UB e FB, respectivamente. **Conclusões:** As usuárias e não usuárias de AMPD na perimenopausa têm perfil de isoformas de FSH semelhante, apesar de as usuárias apresentarem menores níveis de estradiol. O ambiente hormonal provavelmente não foi determinante na regulação do polimorfismo do FSH e da sua atividade hormonal na transição para a menopausa. A dosagem de FSH por RIA em usuárias de AMPD para diagnóstico de pós-menopausa precisa ser reconsiderada.

Summary

Background: There is a controversy about the possible clinical utility of FSH levels in users of the injectable contraceptive depot medroxyprogesterone acetate (AMPD) who are in amenorrhoea and in the menopausal transition. The objective of this study was to evaluate serum FSH polymorphism and inhibin B levels in long-term users of AMPD who were over 45 years old and in amenorrhoea.

Materials and Methods: Eleven users of AMPD that were in amenorrhoea, matched with a group of 11 non-users by age (± 1 year) and weight (± 2 kg). All women were 45 years old or older. Blood samples were collected at the day in which a new ampoule was administered (90 ± 5 days from the last ampoule) in the group of users and on day 9th (± 1 day) of the menstrual cycle in the group of non-users. Oestradiol, FSH, Inhibin B, pro- α C levels and the serum profile of FSH isoforms were determined. **Results:** AMPD users showed significantly higher level of FSH and lower levels of estradiol, inhibin B and Pro- α C than non-users ($p < 0.01$). When the proportion of FSH isolated below pH 4.1 was analysed there were no differences between the two studied groups. The distribution of FSH isoforms showed similar proportion of unbound, weakly bound, and firmly bound FSH isoforms in women of both groups. A significant inverse ($r = -0.48$, $p < 0.05$)

and direct ($r = 0.52$, $p < 0.05$) correlation were observed between age and unbound and firmly bound FSH isoforms respectively. **Conclusion:** Women who were in the menopausal transition users and non-users of AMPD have a similar profile of FSH polymorphism even with the marked hypoestrogenism presented by users. The hormonal milieu probably is unable to regulate FSH polymorphism and hence hormonal activity in the menopausal transition. The determination of FSH by RIA in users of AMPD to determine if a women was or not in the post menopause should be reconsidered.

1. Introdução

Ao longo das últimas décadas houve um aumento da expectativa de vida das mulheres, tanto nos países desenvolvidos quanto nos em desenvolvimento. Conseqüentemente, houve um aumento do número de mulheres que necessitam de anticoncepção em idades mais avançadas. A transição para a menopausa inicia-se com as variações na duração do ciclo menstrual em mulheres cujos níveis plasmáticos do hormônio folículo-estimulante (FSH) encontram-se elevados (Soules et al., 2001). O termo perimenopausa é freqüentemente utilizado para descrever o intervalo entre o início da irregularidade menstrual e a última menstruação (Burger, 1994). Segundo a Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva, o período de transição para menopausa inicia-se a partir dos 40 anos e é caracterizado pelo aumento de pelo menos uma semana entre os ciclos menstruais ou pela ausência de menstruação no período correspondente a dois ciclos. Esta transição dura cerca de dois anos e tem início, em média, aos 47 anos (McKinlay et al., 1992; American Society for Reproductive Medicine, 2001).

Apesar de haver uma menor taxa de fecundidade na transição para a menopausa, as mulheres nesta fase ainda precisam utilizar métodos contraceptivos. O acetato de medroxiprogesterona de depósito (AMPD) é um método contraceptivo bastante utilizado por estas mulheres, pois apresenta alta eficácia, poucos efeitos colaterais e poucas restrições de uso, de acordo com os critérios de elegibilidade da Organização Mundial da Saúde (Westhoff, 2003; WHO, 2004).

O AMPD é um 17-acetato-6-metil progesterona, administrado por via intramuscular, na dose de 150mg a cada três meses. Este método contraceptivo injetável tem três mecanismos de ação, sendo que o principal é impedir a ovulação através da inibição do eixo hipotálamo-hipofisário, causando, conseqüentemente, hipoestrogenismo (Bahamondes et al., 2000; Fraser e Weisberg, 1981). Secundariamente, o AMPD provoca uma atrofia no endométrio e impede a secreção de glicogênio necessário para suportar o blastocisto, além de espessar o muco cervical, dificultando a ascensão dos espermatozóides (Mishell, 1996).

Um dos efeitos colaterais freqüentes do AMPD é a mudança do padrão menstrual. A maioria das usuárias de AMPD (70%) apresenta amenorréia após 12 meses de uso (Westhoff, 2003).

A menopausa nas mulheres é definida como sendo a data da última menstruação e o diagnóstico é feito retrospectivamente, após amenorréia de 12 meses (Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva, 2001). Nas usuárias de AMPD na transição para a menopausa é difícil distinguir se a amenorréia é decorrente do uso da medicação ou se é um indício da menopausa. Associa-se

a isto, o fato de as usuárias nesta faixa etária apresentarem menos fogachos, dificultando ainda mais o diagnóstico (Beksinska, et al., 2003).

O diagnóstico de pós-menopausa é importante para que a mulher seja orientada quanto aos cuidados preventivos e por permitir a suspensão do uso do método contraceptivo. Frequentemente as usuárias de AMPD questionam se já estão na pós-menopausa e se podem interromper o uso da medicação.

A dosagem de FSH é comumente utilizada para a confirmação da pós-menopausa. Porém, o padrão de produção do FSH e LH nestas mulheres é irregular e ainda não está completamente estabelecido.

Em mulheres usuárias de contraceptivos orais, no período de transição para a menopausa, tradicionalmente tem sido recomendada a dosagem sérica de FSH durante os sete dias de intervalo da pílula (Guilleband, 1993). Para usuárias de AMPD, as recomendações são menos claras. Aconselha-se a suspensão do método e o uso de um método não hormonal, para que não haja interferência nos sintomas decorrentes da menopausa e, então, recomenda-se a realização da dosagem de FSH (Guilleband, 1993).

O FSH em mulheres na pós-menopausa eleva-se de dez a 15 vezes sobre os valores encontrados na fase folicular de mulheres em idade reprodutiva, enquanto que o LH tem aumento de três a cinco vezes (Burger, 1994).

Normalmente o pico de FSH, que ocorre no meio do ciclo nas mulheres em idade fértil, é suprimido pela injeção de AMPD. Nestas mulheres, os valores

de FSH aproximam-se aos valores encontrados na fase lútea de mulheres em idade reprodutiva (Mishell, 1996). Alguns estudos mostraram que o uso de AMPD suprime também o aumento do FSH em mulheres após a menopausa (Franchimont et al., 1970; Fotherby et al., 1977), entretanto isto é controverso. Sabe-se que os menores níveis de FSH e LH ocorrem 14 a 30 dias após a injeção de AMPD, mas há pouca informação sobre a duração desse efeito (Franchimont et al., 1970; Fotherby et al., 1977).

Um estudo mostrou que progestogênios sintéticos, como a AMPD, têm uma ação antigonadotrófica no eixo hipotálamo-hipófise-ovariano. Estes autores sugeriram que a dosagem de FSH nas usuárias de AMPD talvez não fosse útil para determinação da pós-menopausa, pois poderia haver uma supressão do aumento do FSH (Perez-Palacios et al., 1981).

Alguns autores acreditam que o FSH pode ter elevação em mulheres usuárias de AMPD na transição para a menopausa, se a dosagem não for realizada logo após a aplicação da medicação. Esses autores observaram que o nível de FSH (em mulheres com idade entre 40 e 49 anos, usuárias de AMPD) teve elevação 40 a 80 dias após o uso do contraceptivo (Beksinska et al., 2003).

Dois estudos recentes (Beksinska et al., 2003; Smit et al., 2004) fizeram dosagens sucessivas de FSH imediatamente antes de uma nova injeção de AMPD em usuárias na transição para a menopausa. Estes autores mostraram que o FSH pode ser usado como marcador da menopausa, já que foi observado aumento destes valores nestas usuárias. Eles também observaram uma variação significativa

nos níveis séricos de AMPD, com tendência a níveis maiores quanto maior o tempo de uso do contraceptivo.

Existem duas opções para realizar o diagnóstico mais preciso de pós-menopausa nas usuárias de AMPD: a determinação das isoformas de FSH e a dosagem sérica de inibinas B e pró- α C. Entretanto, não se encontram estudos que fizeram ambas as dosagens em mulheres usuárias deste método contraceptivo na perimenopausa.

O FSH tem um importante papel na função reprodutiva das mulheres, pois estimula o crescimento e a seleção do folículo ovulatório. Há evidências da secreção de 15 diferentes isoformas de FSH pela adeno-hipófise, que são fisiológica e funcionalmente diferentes (Stanton et al., 1996; Timossi et al., 2000; Creus et al., 2001). Mudanças quantitativas e qualitativas na sua produção estão correlacionadas aos estados fisiológico e endocrinológico do organismo. Conseqüentemente, os tecidos-alvo, assim como as gônadas, estão expostos a um *pool* de diferentes isoformas de FSH. Diferenças no peso molecular, meia-vida plasmática, propriedades isoelétricas e bioatividade são decorrentes de variações na porção dos carboidratos na molécula do FSH. Estes carboidratos são necessários para a completa expressão da função das diferentes isoformas desta gonadotrofina, sendo que a retirada desta porção resulta em uma progressiva perda da atividade do FSH nas células-alvo (Ryan et al., 1988; Walton et al., 2001).

As diferentes isoformas do FSH podem ser separadas de acordo com a sua carga elétrica, que varia conforme a porção dos carboidratos. O ácido-

siálico, contido na porção terminal da cadeia dos hidratos de carbono, determina o ponto isoelétrico das isoformas de FSH, sua meia-vida plasmática e a capacidade de ligação aos receptores (Morrell, et al.1971; Chappel et al., 1984; Ulloa-Aguirre et al., 1984; Wide e Wide, 1984; Timossi et al., 2000; Walton et al., 2001).

O *status* endocrinológico do organismo é responsável pela determinação da estrutura dos carboidratos que será incorporada na estrutura molecular do FSH. Os carboidratos são necessários para a completa expressão da molécula, sendo que sua remoção implica uma menor ativação da adenilciclase nas células receptoras. Formas com estrutura incompleta de carboidratos possuem, então, menor bioatividade. Acredita-se que os hormônios esteroidais sexuais e o GnRH atuem conjuntamente na adeno-hipófise para modular a incorporação do ácido siálico nas moléculas de FSH (Kessel et al., 1988; Pandmanabhan et al., 1988).

As isoformas menos ácidas do FSH têm uma maior bioatividade *in vitro*, entretanto, possuem uma menor meia-vida plasmática. Sua produção é estimulada pelo estradiol (E2) e gonadotrofinas e, aparentemente, tem sua produção diminuída pela inibina e progesterona. Por outro lado, as isoformas ácidas do FSH têm menor bioatividade *in vitro*, com maior meia-vida plasmática, e, aparentemente, têm sua produção estimulada pelos androgênios (Wide e Hobson, 1983; Wide, 1989; Beitins e Padmanabhan, 1991; Phillips e Wide, 1994; Ulloa-Aguirre et al., 1995; Wide et al., 1995).

Dessa forma, espera-se encontrar maiores concentrações séricas de isoformas ácidas em mulheres na pós-menopausa do que nas fases lútea e

folicular do ciclo ovariano. Nos casos de mulheres que se encontram na pós-menopausa e receberam reposição hormonal com estrogênios sintéticos, seria esperado encontrar uma maior concentração sérica de isoformas básicas de FSH, assim como durante a puberdade e nas fases pré-ovulatórias do ciclo ovariano (Wide e Hobson, 1983; Wide, 1989; Beitins e Padmanabhan, 1991; Phillips e Wide, 1994; Ulloa-Aguirre et al., 1995; Wide et al., 1995).

Está claro, portanto, que a hipófise anterior possui a capacidade de modificar a quantidade, assim como a qualidade, das diferentes isoformas de FSH. Estas modificações dependem de uma inter-relação entre esta glândula, os ovários e o hipotálamo. O nível de controle mais atuante parece que ocorre em nível hipofisário e é possível que as diferentes formas de FSH possam propiciar um controle mais preciso da função ovariana.

Há estudos mostrando a importância do estrogênio na regulação da secreção das diferentes isoformas de FSH. Observou-se maior concentração sérica de isoformas ácidas de FSH em mulheres na pós-menopausa, com estrutura molecular das cadeias de hidratos de carbono mais simples (Wilson et al., 1990; Creus et al., 1996; Damián-Matsumura et al., 1999). Por outro lado, mudanças nas concentrações séricas para formas básicas das isoformas de FSH, com estrutura molecular dos hidratos de carbono mais complexa, têm sido observadas em mulheres na pós-menopausa, ou ooforectomizadas, que receberam tratamento com estrogênios sintéticos por longos períodos, assim como o observado em mulheres na idade reprodutiva (Phillips e Wide, 1994; Wide et al., 1995).

Na prática laboratorial, as várias isoformas de FSH podem ser separadas por várias técnicas. O FSH é um oligossacarídeo com uma estrutura de carboidratos muito variável. A maior parte desta estrutura possui duas cadeias de carboidratos carregadas negativamente (com GalNAcSO₄ ou ácido siálico) ou uma cadeia com terminação negativa e outra com manose (que não possui carga). Existem, ainda, oligossacarídeos com duas cadeias (que podem ser ramificadas ou não), com N-acetilglucosamida ácida comumente ligada a resíduos de manose. Além disso, pode-se encontrar oligossacarídeos com três cadeias de diferentes formas e, comumente, ligadas a resíduos de ácido siálico (Ulloa-Aguirre et al., 1995; Creus et al., 1996; 2001).

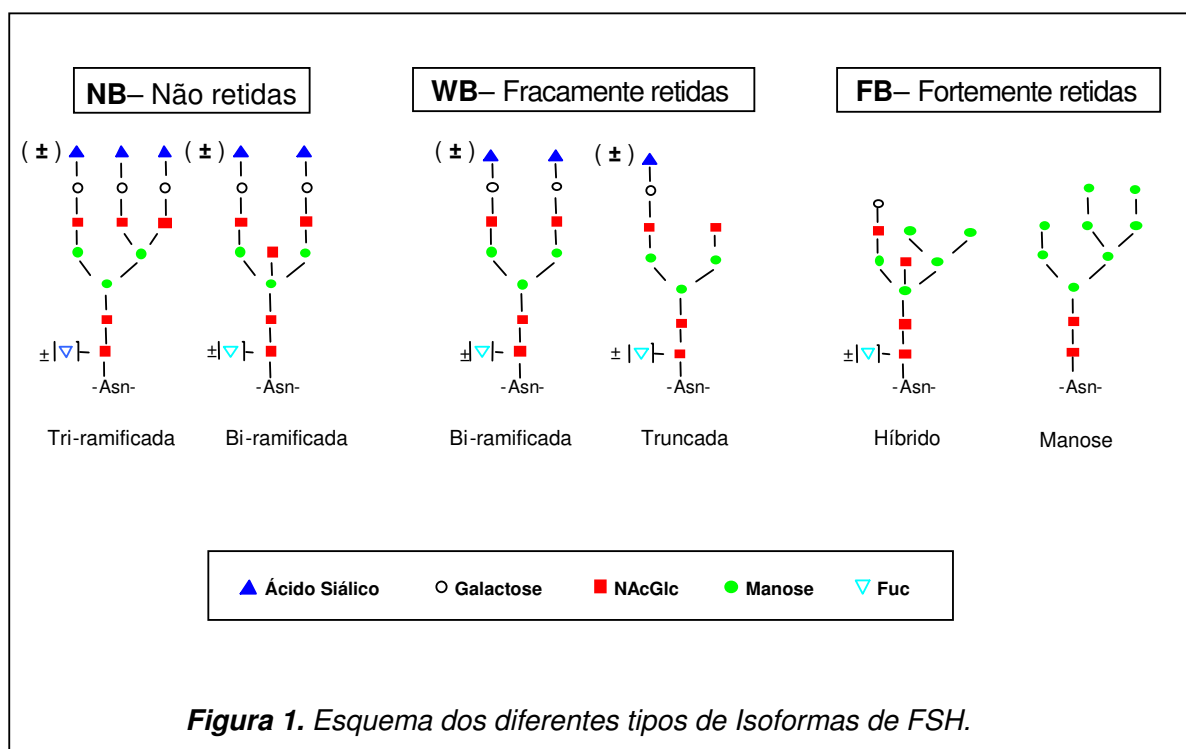
O isoeleto-enfoque preparativo (IEF) é uma das técnicas que separa as diferentes isoformas de FSH. A separação é feita através da migração da proteína por um gradiente de pH até que seja alcançado o ponto isoelétrico. O pH da isoforma depende da terminação dos hidratos de carbono, como ácido siálico (Ulloa-Aguirre et al., 1995; Creus et al., 1996; 2001).

A cromatografia de afinidade por concanavalina A é um método simples e com boa resolução na separação das isoformas. A concanavalina A é uma lecitina que possui grande afinidade por resíduos de manose, glicose terminal ou resíduos de manose ou glicose internos, substituídos unicamente na posição C-2 por outro açúcar. Dependendo da especificidade da união, separam-se três tipos de estruturas:

- **Isoformas UB (*Unbound*)** que são não retidas pela lecitina, com cadeias de carboidratos muito ramificadas e cadeias com duas ramificações

completas. Esse padrão normalmente é encontrado em mulheres com níveis de estrogênio normais.

- **Isoformas WB (*Weakly Bound*)** que são variantes glicosiladas pouco retidas. Possuem cadeias com duas ramificações e com resíduos de manose unidos a NAcGlc.
- **Isoformas FB (*Firmily Bound*)** que são fortemente retidas por meio de cadeias com alto conteúdo de manose ou cadeias híbridas. Estas isoformas não estão presentes no ciclo menstrual de mulheres em idade reprodutiva (Creus *et al.*, 1996).



Quanto à inibina, é um hormônio não esteroide, produzido pelas células da granulosa dos ovários, podendo ser observada, principalmente, sob duas formas: inibina-A e inibina-B (Burgon et al., 1993; Lanuza et al., 1999; Pezzani et al., 2000). As inibinas são dímeros compostos por uma subunidade comum α acoplada a uma ou duas subunidades β (βA ou βB), resultando na inibina A ($\alpha\beta A$) ou inibina B ($\alpha\beta B$). Tanto a inibina A quanto a B são detectadas na circulação sanguínea, assim como seu precursor pró- αC . A inibina pró- αC contém pró-região da subunidade α (que é biologicamente ativa) e um monômero biologicamente inativo da subunidade pró- α (Cobellis et al., 2002).

A primeira evidência das inibinas foi relatada por Sherman e Korenman em 1975, que descreveram um hormônio ovariano que tinha efeito inibitório no *feedback* do FSH, com conseqüente diminuição de folículos (Burger, 1994).

O nível circulante das inibinas varia durante os anos reprodutivos da mulher e durante as fases do ciclo menstrual. Em mulheres com ciclos ovulatórios normais, a inibina A tem níveis séricos mais elevados durante a fase folicular, com um pico após a ovulação, enquanto que a inibina B tem um aumento rápido no início da fase folicular, com pico após aumento do FSH e queda durante a fase lútea (Muttukrishna et al., 2000; Pezzani et al., 2000).

Em trabalho realizado em mulheres jovens com FSH normal e em mulheres na perimenopausa com FSH normal ou aumentado, foi observado que a concentração de inibina A aumenta durante a fase folicular, com pico pré-ovulatório, e diminui imediatamente após a ovulação em todas as mulheres, independentemente

da idade e do nível de FSH. A concentração de inibina B tem pico no início da fase folicular, ao redor do quinto dia do ciclo. Este aspecto cíclico foi observado em todas as mulheres, porém mulheres com FSH aumentado tiveram níveis significativamente inferiores de inibinas A e B (Muttukrishna et al., 2000).

A α C apresentou o mesmo aspecto cíclico da inibina A, com aumento na fase folicular e pico pré-ovulatório. Todas as mulheres tiveram ciclos com as mesmas características. Porém, em mulheres na perimenopausa com FSH normal foi observado pico maior do que em mulheres com FSH aumentado (Muttukrishna et al., 2000).

A inibina A é produzida pelo folículo dominante do ovário e pelo corpo lúteo, enquanto que a inibina B é um produto dos folículos pré-antral e antral que são recrutados, de forma que os níveis de inibina B marcam o tamanho do recrutamento folicular, ou seja, indicam a reserva ovariana (Burger et al., 1998; Cobellis et al., 2002). Baixos níveis de inibina B no terceiro dia após a ovulação em pacientes submetidas à estimulação ovariana indicam reserva ovariana diminuída, com menor chance de gravidez (Cobellis et al., 2002). Tanto os níveis de inibina A quanto os de inibina B diminuem após a menopausa. A maior queda da inibina A é observada 18 meses após a última menstruação e a da inibina B em um período um pouco maior. A queda da inibina A na perimenopausa parece ser decorrente do número progressivo de ciclos anovulatórios nesta fase, com falência do folículo dominante. Uma porcentagem maior de mulheres apresenta níveis indetectáveis de inibina B do que de A, provavelmente porque um grande número de mulheres tem poucos folículos remanescentes na perimenopausa (Burger et al., 1998).

Foi descrito que os níveis de pró- α C são detectáveis até anos após a menopausa, mas no grupo de mulheres ooforectomizadas estudadas por Cobellis et al. (2002) foi observado que estes níveis diminuíram poucos dias após a cirurgia (níveis mais baixos foram encontrados no quinto dia após a cirurgia), o que indica que os ovários seriam a fonte produtora de pró- α C.

Está descrito que há uma estreita correlação entre a secreção da inibina e os níveis séricos de estrogênios e de FSH. Portanto, após a menopausa, onde há baixos níveis de estrogênios e elevados níveis de FSH, ambas as formas de inibina têm seus níveis muito baixos. Este efeito é mais acentuado em relação à inibina-B. Sugeriu-se que a falência da reserva ovariana que ocorre na pós-menopausa, com a conseqüente elevação da secreção do FSH, seja o principal fator responsável pela redução marcada da inibina-B (Petraglia et al., 1999).

O fato de observar-se níveis baixos de inibina-B na falência ovariana prematura, natural ou cirúrgica, aliado à evidência de uma resposta pobre à indução de ovulação quando os níveis desta inibina estão baixos, sugere que a inibina-B seja um marcador precoce da diminuição da função ovariana (Seifer et al., 1996; Hofmann et al., 1998; Cobellis et al., 2002).

Freqüentemente, os profissionais de clínicas de planejamento familiar deparam-se com uma dúvida das usuárias de AMPD, com 45 anos ou mais, e que se encontram em amenorréia. Estas mulheres questionam sobre a possibilidade de estarem na transição para a menopausa, ou até mesmo na pós-menopausa, e desejam saber se há necessidade de continuarem usando este método

contraceptivo. Uma conduta possível seria a dosagem plasmática do FSH. Entretanto, esta gonadotrofina tem um padrão de secreção bastante diverso e, além disso, não há estudos mostrando qual o padrão de secreção das gonadotrofinas, nas usuárias de AMPD, durante a transição ou na pós-menopausa. Uma alternativa para esta questão seria a dosagem das diferentes isoformas de FSH e da inibina B e pró- α C nas usuárias deste método contraceptivo.

Devido aos diferentes padrões de secreção das isoformas de FSH, de inibinas B e pró- α C observados durante o período reprodutivo da mulher e na pós-menopausa, foi proposta a realização deste estudo-piloto para determinar se o padrão de secreção das isoformas de FSH, das inibinas B e pró- α C é diferente quando se comparam mulheres usuárias e não usuárias de AMPD na perimenopausa.

Até o momento, não há conhecimento de qualquer estudo que avalie os níveis das isoformas de FSH, de inibinas B e pró- α C em mulheres na perimenopausa usuárias de AMPD. Cabe aqui mencionar que o papel das isoformas do FSH não está completamente elucidado, independentemente da fase ovariana estudada.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Determinar o perfil plasmático das isoformas de FSH, das inibinas B e pró- α C em usuárias de AMPD que se encontravam na transição para a menopausa e compará-lo com o mesmo perfil em não usuárias deste método contraceptivo com a mesma faixa etária.

2.2. Objetivos específicos

- Comparar os valores de FSH, estradiol, inibinas B e pró- α C entre usuárias de AMPD e não usuárias (controles).
- Comparar os valores de isoformas de FSH entre usuárias de AMPD e não usuárias (controles).

3. Materiais e Métodos

Este estudo foi realizado na Unidade de Reprodução Humana do Departamento de Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas (FCM), Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). Foram incluídas 22 mulheres do Ambulatório de Planejamento Familiar e do Ambulatório de Ginecologia Geral do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) - Unicamp, que concordaram em participar voluntariamente do estudo e assinaram o termo de consentimento livre e informado (Anexo 1). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCM-Unicamp.

Todas as mulheres incluídas tinham idade acima de 45 anos, sendo que 11 eram usuárias de AMPD como método anticoncepcional há mais de um ano e estavam em amenorréia. A amenorréia foi definida como a ausência total de sangramento proveniente do útero por 90 dias ou mais.

As outras 11 mulheres constituíram o grupo de controle e não eram usuárias de métodos contraceptivos hormonais. Todas apresentavam ciclos menstruais regulares no último ano. Foram considerados ciclos regulares aqueles com

intervalo de 25 a 32 dias. As mulheres do grupo de estudo foram pareadas por idade em anos completos (± 1 ano) e peso em quilogramas (± 2 kg).

Os dados foram coletados em uma ficha elaborada para este estudo (Anexo 2). As amostras de sangue foram coletadas no nono dia do ciclo menstrual (± 1 dia) nas mulheres que estavam menstruando regularmente (grupo de controle) e nas mulheres que usavam AMPD (grupo de estudo) as amostras foram coletadas 90 dias (± 5 dias) após a última injeção de AMPD. Nestas mulheres, o sangue foi coletado imediatamente antes da aplicação de uma nova ampola de AMPD.

A coleta de sangue (40ml) foi feita através de punção de veia periférica, utilizando o sistema descartável para coleta de sangue Vacutainer[®] (Becton & Dickinson, Co, USA). Após cerca de 20 minutos a amostra foi centrifugada e o soro foi separado, dividido em quatro alíquotas e congelado a -20°C . Posteriormente, foi enviado para a análise laboratorial.

3.1. Dosagens Hormonais

Uma das alíquotas foi utilizada para dosagens de estradiol e de FSH. Estas dosagens foram feitas através de radioimunoensaio (RIA) utilizando sistema AxSYM[®] da Abbottsystem, com sensibilidade de 20pg/ml e 0,37mUI/ml, respectivamente. Todas as dosagens foram feitas em duplicata.

As amostras de FSH aplicadas às células de Rotofor, às frações enfoque e à cromatografia por afinidade de lecitina foram determinadas por duplo anticorpo através de RIA, utilizando-se reagentes provenientes do Instituto Nacional de Diabetes e Doenças Renais, Bethesda, MD, USA (NIDDK). A referência utilizada foi o LER-907 (1 mg LER-907 = 53 UI, 2nd *International Reference Preparation*, hMG), sendo utilizada para construção de uma curva-padrão. O anticorpo policlonal humano anti-hFSH-6 foi utilizado como anti-soro. O hFSH purificado (hFSH-I-SIAFP-1) foi iodado pelo método descrito por Greenwood et al. (1963). O hormônio iodado foi purificado por uma coluna de cromatografia “Sephadex G-25” (Disposable PD-10 columns, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK). Para minimizar os efeitos das variações interensaios todas as preparações de isoformas foram analisadas com várias dosagens em um mesmo ensaio. Os coeficientes de variação intra e interensaios foram menores que 9% e 12%, respectivamente. A sensibilidade da análise foi de 4,6ng/tubo (LER-907).

As inibinas B sérica e pró- α C foram medidas utilizando-se o ensaio imunoabsorvente de dois locais de união de enzima (ELISA) (Oxford Bio-Innovation Ltd, Oxon, UK), específico para cada peptídeo como previamente descrito (Groome et al., 1994; 1995; 1996). A inibina B recombinante (Genentech, San Francisco, CA, USA) e a pró- α C parcialmente purificada (>75% de pureza) foram utilizadas como padrão. A sensibilidade dos ensaios foram de 15pg/ml para inibina B e 2pg/ml para pró- α C. Coeficientes de variação intra e interensaios foram inferiores a 10% nas duas análises.

3.2. Determinação das isoformas de FSH

As diferentes variantes moleculares de FSH puderam ser isoladas utilizando-se cromato-enfoque, isoeleto-enfoque em gel ou isoeleto-enfoque preparativo (que permite processar um grande volume de soro). Todos estes métodos separam as variantes moleculares baseados em sua carga e em seu conteúdo de ácido siálico (que é o último componente incorporado à cadeia de hidratos de carbono na síntese da molécula de FSH). Uma caracterização posterior da isoforma de FSH, utilizando-se a técnica de cromatografia de afinidade em lecitinas (Concanavalina A), permitiu obter informação acerca do tipo de estrutura interna das cadeias de hidratos de carbono, as quais também estão associadas à determinação da potência biológica desta gonadotrofina (Stanton et al., 1996; Creus et al., 2001).

Dessa forma, a separação das isoformas de FSH, de acordo com sua carga elétrica, foi realizada por isoeleto-enfoque preparativo e o perfil das isoformas de FSH, de acordo com a composição interna das cadeias de hidratos de carbono, foi determinado por cromatografia de afinidade em Concanavalina-A, conforme descrição a seguir.

3.3. Determinação do Polimorfismo FSH

O polimorfismo de FSH foi determinado de acordo com a carga elétrica e característica interna das cadeias de carboidratos. A carga negativa depende da posição e do conteúdo de ácido siálico, que determina um ponto isoelétrico. As isoformas de FSH são separadas de acordo com os pontos isoelétricos

(Wide, 1989, Ulloa-Aguirre, 1984; 1992c). Das 22 amostras, uma foi danificada (usuárias de AMPD) e somente foram avaliadas 21, as quais foram analisadas separadamente. Cada análise foi separada utilizando-se um tubo de membrana de celulose (com ponto de corte para peso molecular de 12000; SIGMA, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) para 0,01mol/l NaCl a 4°C por duas horas.

O Isoeleto-enfoque preparativo (IEF) foi realizado utilizando-se um sistema Rotofor (Rotofor Preparative Cell, Bio Rad Laboratories Inc., CA, USA), conforme descrito previamente por Bedecarras *et al.*, (1998). Antes de aplicar a amostra, foi realizado um pré-enfoque para estabelecer o gradiente de pH e evitar que a amostra fosse submetida a gradientes extremos de pH. O pré-enfoque foi realizado com uma combinação de 35ml de água deionizada, anfolitos (pH 3-10, 3% e pH 2,5 - 5, 0,75%; Pharmalyte, SIGMA, USA) e 3-(3-cholamidopropyl) dimetil-amônio-1-propano sulfonado, CHAPS, 1% (SIGMA, USA). Após este procedimento, 4ml a 6ml de soro contendo 1500-2100ng de FSH imonoativo (I-FSH; LER-907) foram colocados dentro da célula (volume final de 50ml) e o enfoque foi realizado com uma corrente constante de 12W (Electrophoresis Constant Power Supply, ECPS 2000/300-Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweden) por quatro horas, mantendo-se a câmara refrigerada durante todo o processo (Circulador Refrigerado, FORMA Scientific Inc., OH, USA).

Vinte frações de 2ml foram obtidas ao final do enfoque e iniciou-se o processo de determinação do pH. Foram adicionados 500µl de NaCl a 5mol/l em cada tubo (concentração final foi de 1mol/l NaCl) para evitar a interação dos anfolitos e do detergente com as mesmas proteínas. Cada fração individual foi

exaustivamente dialisada até a eliminação completa do anfolito e do detergente. A diálise foi feita com NaCl a 1mol/l por 24 horas, a 4°C, com a relação de 1 fração por litro de NaCl a 1mol/l, trocando a solução por uma nova a cada oito horas. Nas 12 horas seguintes, a concentração da solução salina foi alterada para uma concentração semelhante à da solução fisiológica, que foi refrigerada a cada quatro horas. Este procedimento foi necessário para assegurar que nenhuma substância interferisse nas determinações hormonais. Depois da diálise, cada fração foi concentrada utilizando-se uma membrana Centriprep-10 (com ponto de corte 10000, Amicon, Beverly, MA, USA) e o conteúdo de FSH foi determinado por um RIA em duplicata. As frações de material remanescente no IEF foram concentradas e armazenadas a -20°C até a avaliação do FSH imunológico (B-FSH) e a cromatografia com Concanavalina A (Con A). A variação de recuperação do FSH foi entre 500ng e 1160ng LER907 (48% - 64%). A Figura 2 mostra um esquema dos métodos utilizados.

3.4. Cromatografia por Concanavalina A

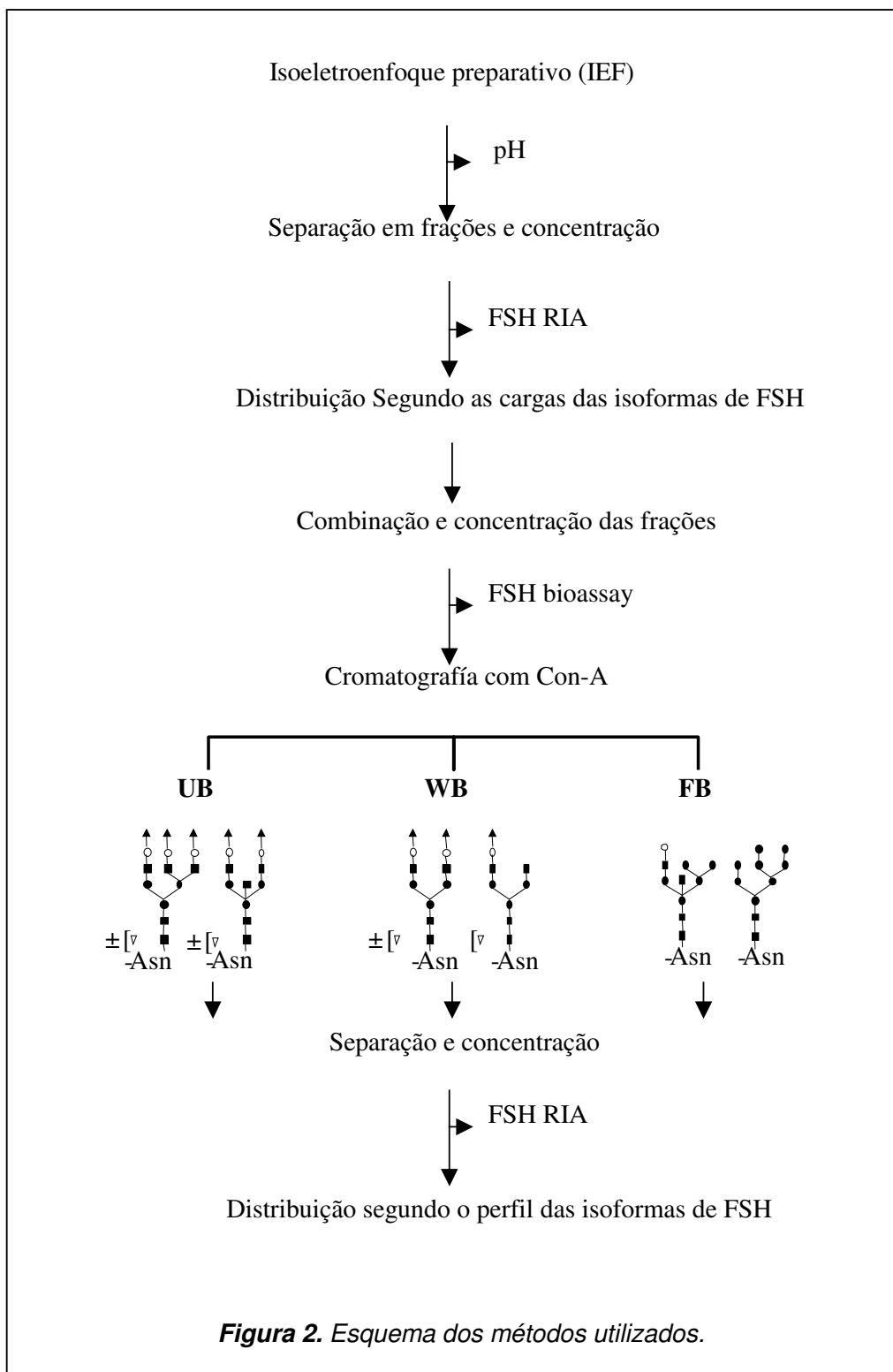
A técnica utilizada foi a descrita por Cheng et al. (1984) e modificada por Creus et al. (1996). Primeiramente, colunas de concanavalina A de 0,6cm x 15cm contendo 3ml de gel lecitina (concanavalina A conjugada com Sepharose 4B, Sigma Chemical Co) foram equilibradas com 50mM de tampão Tris-HCl, pH 7,4, 0,5M NaCl, 1mM MgCl₂, 0,001mol/l CaCl₂, 0,001mol/l MnCl₂. As alíquotas contendo 0,3µg a 10µg (300-600 ng) de I-FSH, obtidas depois do enfoque, foram adicionadas às colunas e deixadas por 30 minutos para interação com a

lecitina. Após este período de incubação, foram adicionados 7ml de tampão de equilíbrio e reconheceram-se as isoformas não retidas (unbound- UB)

Após, foi adicionado 0,5ml de tampão de equilíbrio contendo metil- α D glucopiranosídeo 10mm (glucosídeo) e interrompeu-se o fluxo por 30 minutos. Adicionaram-se 7ml do mesmo tampão e foram reconhecidas as isoformas pouco retidas (weekly bound WB).

Finalmente, adicionou-se 0,5ml de tampão de equilíbrio contendo metil α D manopiranosídeo 100mM (manosídeo) e deixou-se agregar por 30 minutos. Adicionaram-se 7ml de manosídeos e foram reconhecidas as isoformas fortemente retidas (firmly bound FR).

As alíquotas contendo as isoformas não retidas, fracamente retidas e fortemente retidas pela lecitina foram dialisadas em solução fisiológica, com a finalidade de diminuir a concentração de sais e açúcares na amostra. A separação foi processada durante 12 horas e após foi feita uma troca da solução salina e, durante três horas, 3 trocas de solução salina, com duração de uma hora cada, por solução fisiológica. As frações foram concentradas em volume inferior a 1ml, utilizando-se membranas Centriprep. Todo o procedimento foi realizado a 4°C. Os concentrados foram armazenados a -70°C para determinação do conteúdo de FSH. Os valores de recuperação do FSH foram 120-400 ng LER 907 (76%-87%). Os concentrados foram armazenados a -20°C e foi realizada a determinação do I-FSH.



4. Publicação

1 Serum FSH polymorphism, inhibin B and Pro- α C levels in users of depot
2 medroxyprogesterone acetate for contraception during the menopausal transition

3
4 ^aLuis Bahamondes, ^aCassia R.T. Juliato, ^bCecilia Machado, ^aCarlos A.Petta,
5 ^aMarcos Perrotti, and ^bStella Campo

6 ^aHuman Reproduction Unit, Department of Obstetrics and Gynaecology, School of
7 Medicine, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil and
8 ^bCentro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE), Hospital de Niños R.
9 Gutierrez, CONICET, Buenos Aires, Argentina

10
11 Address for correspondence:

12 Dr. Luis Bahamondes

13 Caixa Postal 6181

14 13084-971, Campinas, SP, Brazil

15 Telephone: + 55-19-3289-2856

16 Fax: + 55-19-3289-2440

17 E-mail: bahamond@caism.unicamp.br

19 **ABSTRACT**

20 **BACKGROUND:** The clinical utility of FSH levels for evaluating ovarian activity in depot
21 medroxyprogesterone acetate (DMPA) users who are in amenorrhoea and in the menopausal
22 transition is controversial. The aim of this study was to determine serum markers of pituitary
23 and ovarian activity in DMPA users who were over 45 years old and in amenorrhoea.
24 **MATERIALS AND METHODS:** Eleven DMPA users, 45 years of age or older and in
25 amenorrhoea, were matched to 11 non-users according to age (± 1 year) and weight (± 2 kg).
26 Blood samples were collected 90 ± 5 days after the last injection in DMPA users and on the
27 9th (± 1) day of the menstrual cycle in non-users. Oestradiol, FSH, Inhibin B, Pro- α C levels
28 and FSH polymorphism were determined. FSH isoforms were isolated according to
29 charge by preparative isoelectric focusing (IEF) and according to the inner structure of their
30 oligosaccharides by lectin affinity chromatography (Concanavalin A). **RESULTS:** DMPA
31 users showed significantly higher FSH and lower oestradiol, inhibin B and Pro- α C levels than
32 non-users ($p < 0.005$). The proportion of FSH isolated below pH 4.1 showed no difference
33 between the two study groups. Similar proportions of unbound, weakly bound, and firmly
34 bound FSH isoforms were observed in both groups. A significant inverse ($r = -0.48$, $p < 0.05$)
35 and direct ($r = 0.52$, $p < 0.05$) correlation was observed between age and unbound and firmly
36 bound FSH isoforms, respectively. **CONCLUSIONS:** During the menopausal transition serum
37 FSH polymorphism in DMPA users and non-users presented similar characteristics despite of
38 the marked hypoestrogenism observed in users. The hormonal milieu is probably unable to
39 regulate FSH polymorphism in the menopausal transition. The measurement of FSH levels by
40 RIA in DMPA users to determine whether a woman is postmenopausal, should be reconsidered.
41 **Keywords:** Medroxyprogesterone, isoforms, FSH, menopausal transition

42 **Introduction**

43 Depot medroxyprogesterone acetate (DMPA) is a contraceptive method used by
44 millions of women mainly due to its high efficacy, few adverse events, easy
45 administration and low-cost. Changes in menstrual patterns, especially amenorrhoea,
46 which occurs in almost 60% of women by the end of the first year of use, are among the
47 most frequent side effects of DMPA (Fraser and Wesberg, 1981). A frequent question
48 posed by DMPA users in the menopausal transition is if they are effectively
49 postmenopausal in order to cease contraceptive use. Common practice in many clinical
50 settings is to determine FSH levels; however, the clinical evaluation of hormone
51 concentration is controversial due to the variability of FSH levels observed in DMPA
52 users (Smit *et al.*, 2004). It has been suggested that DMPA users should interrupt the
53 use of the contraceptive, switch to a non-hormonal method, and have FSH levels
54 determined after a wash-out period.

55 In a previous study, Perez-Palacios *et al.* (1981) suggested that FSH
56 measurement in the post menopause might pose a challenge because synthetic progestins
57 such as DMPA could exert an antigonadotrophic action at the hypothalamic-pituitary
58 axis level. Moreover, these authors suggested that if FSH is measured in DMPA users,
59 this evaluation should be performed as late as possible following the previous injection.

60 Two recent studies have evaluated, in the menopausal transition, FSH and MPA
61 levels in new and repeat DMPA users immediately prior to DMPA injection (Beksinska
62 *et al.*, 2003; Smit *et al.*, 2004). They have detected a rise in FSH levels in DMPA users,
63 suggesting that this parameter may be a useful indicator of the postmenopausal status.
64 Moreover, there was a wide variability of MPA serum levels with a slight tendency to
65 increase in long-term users.

66 One option for evaluating amenorrhoeic DMPA users in the menopausal
67 transition is to determine serum inhibin B levels and/or FSH polymorphism.

68 FSH is a heterogeneous hormone and multiple molecular forms with varying
69 biological activity have been identified (Stanton *et al.*, 1996; Timossi *et al.*, 2000).
70 These glycosylation variants differ from each other in their carbohydrate structure,
71 including completion, degree of branching and sialic acid content. Differences in both
72 sialic acid content and in the inner structure of the glycans modulate the full biological
73 expression of the gonadotrophin signal at the level of the target cell (Creus *et al.*, 2001).

74 FSH polymorphism is regulated by the endocrine milieu. GnRH and
75 oestrogens are the main factors recognized as modulators of sialic acid content (Dahl *et*
76 *al.*, 1986; Wide and Albertsson-Wikland, 1990; Ulloa-Aguirre *et al.*, 1992a; Phillips and
77 Wide, 1994, Zambrano *et al.*, 1995; Wide *et al.*, 1996). Sialic acid determines the
78 metabolic clearance rate of FSH and therefore its *in vivo* biopotency (Wide & Wide,
79 1984; Wide, 1986). Moreover, sialic acid content has also been related to the *in vitro*
80 bioactivity of the hormone; highly sialylated FSH isoforms showed lower *in vitro*
81 biological activity than those less sialylated (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1992b).

82 A previous study carried out in normal women showed that the endocrine milieu
83 modulates not only the incorporation of the terminal sialic acid to the carbohydrate
84 chain, but also the processing of the inner structure of FSH oligosaccharides. The
85 distribution profile of FSH isoforms, determined according to the inner structure of their
86 oligosaccharide chain, is different in postmenopausal women when compared to that
87 observed in the late follicular phase of normal menstruating women (Creus *et al.*, 1996).

88 Due to the controversy regarding the best way to evaluate whether
89 amenorrhoeic DMPA users are postmenopausal, our objective in conducting this study

90 was to identify new serum markers of pituitary-ovarian axis activity in users of DMPA
91 as a contraceptive method, who were 45 years of age or older and in amenorrhoea.

92

93 **Material and methods**

94 The study was conducted at the Human Reproduction Unit, Department of
95 Obstetrics and Gynaecology, School of Medicine, Universidade Estadual de Campinas
96 (UNICAMP), Campinas, Brazil and at the Centro de Investigaciones Endocrinológicas
97 (CEDIE), Hospital de Niños R. Gutierrez, Buenos Aires, Argentina. The research
98 protocol was approved by the Ethical Committee of the institution and all women signed
99 an informed consent form before being enrolled in the study.

100 ***Volunteers***

101 The study group consisted of 11 DMPA users (U), who were 45 years of age or older
102 and who had been amenorrhoeic for at least one year. Control group included 11 non-users
103 (NU) who had not used any kind of hormonal drug for at least one year prior to enrolment,
104 who were in good health and who had had regular menstrual cycles for at least the previous 12
105 months. Users and non-users were paired according to age (± 1 year) and weight (± 2 kg). In
106 DMPA users, a blood sample (40 ml) was collected from a peripheral vein immediately
107 before the time of administration of a new DMPA injection (90 ± 5 days following the
108 previous injection). In non-users, the blood sample was collected on day 9 (± 1 day) of
109 the menstrual cycle. After separation, serum was stored at -20°C until assayed.

110 ***Hormone assays***

111 Oestradiol (E_2) and FSH were measured by enzyme immunoassay (EIA) using
112 an Abbott AxSYM® system with analytic sensitivity of 20 pg/ml and 0.37 mIU/ml,
113 respectively. All samples were measured in duplicate.

The FSH content of samples applied to the Rotofor cell, isoelectric focusing fractions and lectin affinity chromatography eluates was measured using double-antibody RIA with reagents provided by the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, USA (NIDDK). The reference preparation LER-907 (1 mg LER-907 = 53 IU 2nd International Reference Preparation, hMG) was used to construct the standard curve. The polyclonal human antibody, anti-hFSH-6, was used as antiserum. Purified hFSH (hFSH-I-SIAFP-1) was iodinated using the chloramine-T method as described by Greenwood *et al.* (1963). The iodinated hormone was purified using Sephadex G-25 column chromatography (Disposable PD-10 columns, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK). To minimise the effects of interassay variations, as well as to determine the degree of parallelism between the unknown samples and the FSH standards, all isoform preparations were analysed at multiple dose levels in the same assay run. The intra- and inter-assay coefficients of variation were less than 9% and 12%, respectively. The sensitivity of the assay was 4.6 ng/tube (LER-907).

Serum inhibin B and Pro- α C were measured using a two-site, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Oxford Bio-Innovation Ltd, Oxon, UK) specific for each peptide, as previously described (Groome *et al.*, 1994, 1995, 1996). Recombinant inhibin B (Genentech, San Francisco, CA, USA) and partially purified (>75% purity) Pro- α C preparations were used as standards. The assay sensitivity was 15 pg/ml for inhibin B and 2 pg/ml for Pro- α C. Intra- and inter-assay coefficients of variation were <10% for both assays.

135 *Serum FSH polymorphism*

136 The varying distribution and content of negatively charged sialic acid allows
137 FSH isoforms to be isolated on the basis of their isoelectric point (Wide, 1989, Ulloa-
138 Aguirre, 1984, 1992c). Serum samples (n=22) were individually analysed. Each sample
139 was dialysed in cellulose membrane tubing (molecular weight cut-off 12000; SIGMA,
140 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) against 0.01 mol/l NaCl at 4°C for 2 h.

141 Preparative isoelectric focusing (IEF) was carried out using a Rotofor system (Rotofor
142 Preparative Cell, Bio Rad Laboratories Inc., CA, USA) as previously described by Bedecarras
143 *et al.*, (1998). Before applying the sample, a pre-focusing step was included to establish the pH
144 gradient and to avoid protein exposure to extreme pH. This step was carried out by filling
145 the focusing chamber with 35 ml of deionized water, ampholytes (pH range 3-10, 3% and
146 pH range 2.5-5, 0.75%; Pharmalyte, SIGMA, USA) and 3-(3-cholamidopropyl) dimethyl-
147 ammonio-1-propane sulphonate, CHAPS, 1% (SIGMA, USA). After this procedure, 0.9 to
148 8.9 ml of serum containing 1500-2100 ng *immunoactive* FSH (I-FSH; LER-907) were
149 loaded into the cell (the final volume of the chamber always being 50 ml) and focusing was
150 carried out at 12W constant power (Electrophoresis Constant Power Supply, ECPS
151 2000/300-Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweden) for 4 h, maintaining the
152 chamber refrigerated (Refrigerated Circulator, FORMA Scientific Inc., OH, USA).

153 When focusing was complete, 20 fractions (2 ml each) were harvested and their pH
154 was measured. Next, 500 µl of 5 mol/l NaCl were added to each tube (final concentration
155 1mol/l NaCl) to avoid the interaction of ampholytes and detergent with sample proteins.
156 Each individual fraction was exhaustively dialysed to completely eliminate ampholytes
157 and detergent. Dialysis was carried out against 1 mol/l NaCl for 24 h. at 4°C and at a ratio of 1

fraction per litre, 1 mol/l NaCl. This solution was replaced with a fresh one every 8 h. During the following 12 h., the concentrated saline solution was changed to a physiologic solution and was refreshed every 3 h. This procedure guaranteed the complete absence of interfering substances in future hormone measurements and further characterisation steps. After dialysis, each fraction was concentrated using Centriprep-10 membrane (cut-off 10000, Amicon, Beverly, MA, USA) and the FSH content was measured using double-antibody RIA. Remaining material in IEF fractions containing FSH was recombined, concentrated and stored at -20°C until measurement of bioactive FSH (B-FSH) and Concanavalin A chromatography (Con A). The FSH recovery range was 48% to 64%.

Concanavalin A (Con A) chromatography

The technique used was that previously described by Cheng *et al.* (1984) and modified by Creus *et al.* (1996). Con A columns (0.6 x 15 cm) containing 3 ml of the immobilized lectin gel (Con A conjugated to Sepharose 4B, SIGMA, USA), were equilibrated with equilibrium buffer (0.050 mol/l Tris-HCl; pH 7.4, 0.5 mol/l NaCl, 0.001 mol/l MgCl₂, 0.001 mol/l CaCl₂, 0.001 mol/l MnCl₂). An aliquot of combined and concentrated FSH charge isoforms, obtained after IEF (containing 300-600 ng I-FSH, LER- 907), were individually applied to Con A columns.

All samples were loaded into the columns and allowed to interact with the lectin for 30 min. Unbound material was eluted with 7 ml of equilibrium buffer (unbound FSH isoforms, UB). Next, 0.5 ml of equilibrium buffer containing 0.010 mol/l methyl- α -D-glucopyranoside (glucoside) was added and left for 30 min. Seven ml of the same buffer were added and the weakly bound material was collected (weakly bound FSH isoforms, WB). Finally, 0.5 ml of equilibrium buffer containing 0.1 mol/l methyl- α -D-mannopyranoside

(mannoside) was added to the column and incubated for 30 min. An additional 7 ml were added and the firmly bound material was collected (firmly bound FSH isoforms, FB). Eluates containing UB, WB, and FB FSH isoforms were dialysed against 0.01 mol/l NaCl for 24 h and concentrated (Centriprep membranes, Amicon, USA). The whole procedure was carried out at 4°C. The range of recovered FSH was 120-400 ng LER 907 (76%-87%). Concentrates were stored at -20°C until I-FSH was measured.

Statistical analysis:

The Wilcoxon test for paired samples was used to compare the clinical characteristics of the women and their hormone levels. In addition, a simple regression analysis was conducted to evaluate the difference in the relationship between different parameters in both groups. All results are expressed as mean $\pm$ SEM.

Results

Table I shows the clinical characteristics and hormone levels determine in DMPA users and non-users. No significant difference was observed in age, weight, height and body mass index (BMI, kg/m²) between the two groups.

As for the hormone profile, DMPA users presented significantly higher mean levels of FSH compared to non-users; six out of 11 DMPA users presented FSH levels > 30 mIU/ml, whereas none of the non-users presented such high levels. Inhibin B levels in eight DMPA users were below the detection limit of the assay and the mean level was significantly lower than in the group of non-users ($p < 0.005$). Pro- α C and oestradiol levels were also significantly lower among users than among non-users ($p < 0.005$) (Table I). The mean duration of DMPA use was 82.0 ± 13.8 months and the mean duration of amenorrhoea was 68.4 ± 14.9 months.

204 *FSH polymorphism*

205 Figure I shows the distribution profile of FSH charge isoforms. FSH was
206 isolated in a pH range of 2.65 – 4.7 and 2.32 – 4.7 in non-users and DMPA users,
207 respectively. When the proportion of FSH isolated below pH 4.1 was analysed, no
208 statistically significant differences were observed between the two groups studied: 67.4
209 $\pm 3.5\%$ (U) vs $63.5 \pm 2.3\%$ (NU).

210 The distribution of FSH isoforms, isolated according to the inner structure of
211 their carbohydrate chain, is shown in Figure II. In all women, three groups of FSH
212 isoforms were isolated following lectin chromatography. A similar proportion of UB
213 (39.4 ± 3.3 vs $39.4 \pm 3.6\%$) and WB (47.5 ± 4.4 vs $49.1 \pm 1.9\%$) FSH isoforms was
214 observed in DMPA users and non-users, respectively. Firmly bound (FB) FSH isoforms
215 ranged from 7.08 to 29.0 and from zero to 21.3 in users and non-users, respectively.
216 There was no significant difference in the proportion of these FSH isoforms between the
217 two groups studied (13.1 ± 1.8 vs $17.4 \pm 2.2\%$ users and non-users, respectively).

218 When the relationship between the different parameters measured in both
219 groups was analysed, a significant inverse ($r = -0.48$, $p < 0.05$) and a significant direct ($r =$
220 0.52 , $p < 0.05$) correlation was observed between age and unbound and firmly bound
221 FSH isoforms, respectively. There was no correlation between the other determined
222 parameters (Data not shown).

223

224 **Discussion**

225 The main objective of this study was to assess some novel serum hormonal
226 parameters in users of DMPA as a contraceptive method, who were 45 years old or more
227 and in amenorrhoea, compared to a group of non-users paired according to age and

weight. To our knowledge, this is the first study to evaluate FSH polymorphism, inhibin B and Pro- α C levels in DMPA users in the menopausal transition. The results show that DMPA users had significantly lower levels of E₂ and higher values of FSH concomitantly with very low inhibin B levels when compared to non-users. Although DMPA non-users showed E₂ and FSH values similar to those observed in the follicular phase of the normal menstrual cycle, inhibin B levels were very variable, ranging from below the detection limit of the assay to levels found during the normal follicular phase. The monomeric form of inhibin (Pro- α C) followed a similar pattern.

There is controversy regarding how useful the measurement of immunoactive FSH is as a reliable peripheral marker of postmenopausal status in DMPA users. This study suggests that this parameter does not offer reliable information in clinical practice. However, a logical exception would be those users who presented clear circulating FSH levels in the postmenopausal range.

The fact that users and non-users of DMPA showed a similar proportion of the more acidic FSH isoforms in circulation suggests that the difference in oestrogen levels observed between these two groups was not affecting the activity of the enzyme responsible for the incorporation of the last sugar residue to the carbohydrate chain in the trans-cisternal elements of the Golgi apparatus of the gonadotrope (Weinstein *et al.*, 1982). This finding is difficult to explain because a previous study showed that oestrogens decreased mRNA expression of the enzyme responsible for the incorporation of sialic acid in the carbohydrate chains in female rats (Damian Matsumura *et al.*, 1999). According to this study, a more sialylated FSH should be found in the circulation of DMPA users in whom oestradiol production in the gonad is at postmenopausal level.

When FSH polymorphism was analysed according to the inner structure of the carbohydrate chains present in the FSH molecule, the presence of a similar proportion of FSH isoforms bearing incomplete carbohydrate chains was observed in both groups. DMPA users and non-users showed similar differences in serum FSH isoform profile when compared to young, ovulatory women in whom only FSH isoforms bearing a complex type of oligosaccharides are present in circulation (Creus *et al.*, 1996). Interestingly, the profile of FSH isoforms observed in both groups differed also from that observed in the post-menopause when no FSH isoforms bearing highly branched oligosaccharides are present in circulation (Creus *et al.*, 1996). This was also unexpected because it has been suggested that oestradiol is one of the most important regulator of FSH polymorphism (Padmanabhan *et al.*, 1988; Wide and Naessen, 1994).

Six out of 11 DMPA users and none of the non-users presented FSH levels close to postmenopausal values. However, these results clearly show that FSH microheterogeneity, which is closely related to hormone biopotency, was similar in both conditions. Therefore, the high immunoreactive FSH levels in serum observed under these conditions do not necessarily reflect the proximity of a DMPA user to the menopause.

In addition, inhibin B is one of the most important indicators of follicular development in normal premenopausal women and of postmenopausal status (Burger, 1994; Burger *et al.*, 1998; Muttukrishna *et al.*, 2000). In this study, we observed inhibin B to be a more reliable indicator of the decrease in gonadal activity in the menopausal transition. Even in the group of non-DMPA users, oestradiol levels compatible with the normal follicular phase were associated with inhibin B levels <20 pg/ml.

In conclusion, the present study showed that women who were in the menopausal transition, whether DMPA users or non-users, have a similar pattern of FSH

polymorphism although users presented a marked hypoestrogenism. These findings suggest that the hormonal milieu is unable to regulate FSH polymorphism and hence hormonal bioactivity in the menopausal transition. In addition, the measurement of FSH by RIA in users of DMPA as a contraceptive method to determine whether a woman is postmenopausal should be reconsidered.

Acknowledgments

This study was partially financed by the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) award # 03/00673-3 and the Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, (CONICET), Argentina. Cecília Machado was the recipient of a fellowship from the Programa Latinoamericano de Capacitación e Investigación en Reproducción Humana (PLACIRH) award # PLC-298/2003. S C is an established investigator at CONICET, Argentina.

References

Bedecarras P, Gryngarten M, Ayuso S, Escobar ME, Bergada C and Campo S (1998) Characterization of serum SHBG isoforms in prepubertal and pubertal girls. Clin Endocrinol 49,603-608.

Beksinska ME, Smit JA, Kleinschmidt I, Rees HV, Farley TM and Guidozzi F (2003)

Detection of raised FSH levels among older women using depomedroxyprogesterone acetate and norethisterone enanthate. Contraception 68,339-343.

Burger HG (1994) Diagnostic role of follicle-stimulating hormone (FSH) measurements during the menopausal transition- an analysis of FSH, oestradiol and inhibin. *Eur J Endocrinol* 130,38-42.

Burger HG, Cahir N, Robertson DM, Groome NP, Dudley E, Green A and Dennerstein L (1998) Serum inhibins A and B fall differentially as FSH rises in perimenopausal women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 48,809-13.

Cheng C, Frick J, Gunsalus G, Musto N and Bardin C (1984) Human testicular androgen-binding protein shares immunodeterminants with serum testosterone-estradiol-binding globulin. *Endocrinology* 114,1395-1401.

Creus S, Pellizzari E, Cigorrage S and Campo S (1996) FSH isoforms: bio and immuno-activities in post-menopausal and normal menstruating women. *Clin Endocrinol* 44,181-189.

Creus S, Chaia Z, Pellizzari EH, Cigorrage SB, Ulloa-Aguirre A and Campo S (2001) Human FSH isoforms: carbohydrate complexity as determinant of in-vitro bioactivity. *Mol Cell Endocrinol* 74,41-49.

Dahl KD, Pavlou SN, Kovacs WJ and Hsueh AJ (1986) The changing ratio of serum bioactive to immunoreactive follicle-stimulating hormone in normal men following treatment with a potent gonadotropin releasing hormone antagonist. *J Clin Endocrinol Metab* 63,792-794.

Damian-Matsumura P, Zaga V, Maldonado A, Sanchez-Hernandez C, Timossi C and Ulloa-Aguirre A (1999) Oestrogens regulate pituitary alpha2,3-sialyltransferase messenger ribonucleic acid levels in the female rat. *J Mol Endocrinol* 23,153-165.

Fraser IS and Weisberg E (1981) A comprehensive review of injectable contraception with special emphasis on depot medroxyprogesterone acetate. *Med J Aust* 1,1-20.

Greenwood FC, Hunter WM and Glover JS (1963) The preparation of ^{131}I -I labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem J* 89,114-123.

Groome NP, Illingworth PJ, O'Brien M, Cooke I, Ganesan TS, Baird DT and McNeilly AS (1994) Detection of dimeric inhibin throughout the human menstrual cycle by two-site enzyme immunoassay. *Clin Endocrinol* 40,717-723.

Groome NP, Illingworth PJ, O'Brien M, Priddle J, Weaver K and McNeilly AS (1995) Quantification of inhibin pro- α C-containing forms in human serum by a new ultrasensitive two-site enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Endocrinol Metab* 80,2926-2932.

Groome NP, Illingworth PJ, O'Brien M, Pai R, Rodger FE, Mather JP and McNeilly AS (1996) Measurement of dimeric inhibin B throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 81,1401-1405.

Muttukrishna S, Child T, Lockwood GM, Groome NP, Barlow DH and Ledger WL (2000) Serum concentrations of dimeric inhibins, activin A, gonadotrophins and ovarian steroids during the menstrual cycle in older women. *Hum Reprod* 15,549-556.

Padmanabhan V, Lang LIL, Sonstein J, Kelch RP and Beitins IZ (1988) Modulation of serum FSH bioactivity and isoforms distribution by estrogenic steroids in normal women and in gonadal dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 67, 465-473.

Perez-Palacios G, Chavez B, Escobar N, Vilchis F, Larrea F, Lince M and Perez AE (1981) Mechanism of action of contraceptive synthetic progestins. *J Steroid Biochem* 15,125-130.

Phillips DJ and Wide L (1994) Serum gonadotropin isoforms become more basic after an exogenous challenge of gonadotropin-releasing hormone in children undergoing pubertal development. *J Clin Endocrinol Metab* 79,814-819.

Smit J, Botha J, McFadyen L and Beksinska M (2004) Serum medroxyprogesterone acetate levels in new and repeat users of depot medroxyprogesterone acetate at the end of the dosing interval. *Contraception* 69,3-7.

Stanton PG, Burgon PG, Hearn MT and Robertson DM (1996) Structural and functional characterisation of hFSH and hLH isoforms. *Mol Cell Endocrinol* 125,133-141.

Timossi CM, Barrios-de-Tomasi J, Gonzalez-Suarez R, Arranz MC, Padmanabhan V, Conn PM and Ulloa-Aguirre A (2000) Differential effects of the charge variants of human follicle-stimulating hormone. *J Endocrinol* 165,193-205.

Ulloa-Aguirre A, Miller C, Hyland L and Chappel SC (1984) Production of all follicle-stimulating hormone isohormones from a purified preparation by neuramidase digestion. *Biol Reprod* 30,382-387.

Ulloa-Aguirre A, Schwall R, Cravioto A, Zambrano E and Damian-Matsumura P (1992a) Effects of gonadotrophin-releasing hormone, recombinant human activin-A and sex steroid hormones upon the follicle-stimulating isohormones secreted by rat anterior pituitary cells in culture. *J Endocrinol* 134,97-106.

Ulloa-Aguirre A, Cravioto A, Damian-Matsumura P, Jimenez M, Zambrano E and Diaz-Sanchez V (1992b) Biological characterization of the naturally occurring analogues of intrapituitary human follicle-stimulating hormone. *Hum Reprod* 7,23-30.

Ulloa-Aguirre A, Damian-Matsumura P, Jimenez M, Zambrano E and Diaz-Sanchez V (1992c) Biological characterization of the isoforms of urinary human follicle-stimulating hormone contained in a purified commercial preparation. *Hum Reprod* 7,1371-1378.

Weinstein J, de Souza-e-Silva U and Paulson JC (1982) Sialylation of glycoprotein oligosaccharides N-linked to asparagine. Enzymatic characterization of a Gal beta 1 to

3(4)GlcNAc alpha 2 to 3 sialyltransferase and a Gal beta 1 to 4GlcNAc alpha 2 to 6 sialyltransferase from rat liver. J Biol Chem 257,13845-13853.

Wide L (1986) The regulation of metabolic clearance rate of human FSH in mice by variation of the molecular structure of the hormone. Acta Endocrinol 112,336-344.

Wide L (1989) Follicle-stimulating hormones in anterior pituitary glands from children, and adults differ in relation to sex and age. J Endocrinol 123,519-529.

Wide L and Albertsson-Wikland K (1990) Change in electrophoretic mobility of human follicle stimulating hormone in serum after administration of gonadotropin-releasing hormone. J Clin Endocrinol Metab 70,271-276.

Wide L and Naessen T. (1994) 17 beta-oestradiol counteracts the formation of the more acidic isoforms of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone after menopause. Clin Endocrinol 40,783-789.

Wide L and Wide M. (1984) Higher plasma disappearance rate in the mouse for pituitary follicle-stimulating hormone of young women compared to that of men and elderly women. J Clin Endocrinol Metab 58,426-429.

Wide L, Albertsson-Wikland K and Phillips DJ (1996) More basic isoforms of serum gonadotropins during gonadotropin-releasing hormone agonist therapy in pubertal children. J Clin Endocrinol Metab 81,216-221.

Zambrano E, Olivares A, Mendez J, Guerrero L, Diaz-Cueto L, Veldhuis J and Ulloa-Aguirre A (1995) Dynamics of basal and gonadotropin-releasing hormone-releasable serum follicle-stimulating hormone charge isoform distribution throughout the human menstrual cycle. J Clin Endocrinol Metab 80,1647-1656.

Table I: Clinical characteristics and serum hormonal profile in both studied groups

Group	Age (years)	Weight (kg)	Height (cm)	BMI (kg/m ²)	Oestradiol (pmol/l)	FSH (mIU/l)	Inhibin B (pg/ml)	Pro-αC (pg/ml)
Users	47.5 ± 0.7	66.0 ± 3.4	1.53 ± 0.02	28.3 ± 5.4	35.4 ± 6.3	29.5 ± 6.1	10.6 ± 1.7 *	106.3 ± 23.5
Non-users	47.0 ± 0.7	67.0 ± 3.0	1.57 ± 0.02	27.1 ± 4.8	142.8 ± 26.9	8.2 ± 2.2	50.0 ± 17.7 §	214.0 ± 29.8

Data are expressed as mean ± SEM.

* These assay means have a slight positive bias as results below the detection limit of the assay were expressed as the assay detection limit. § P<0.05 when compared to DMPA users.

Figure I.

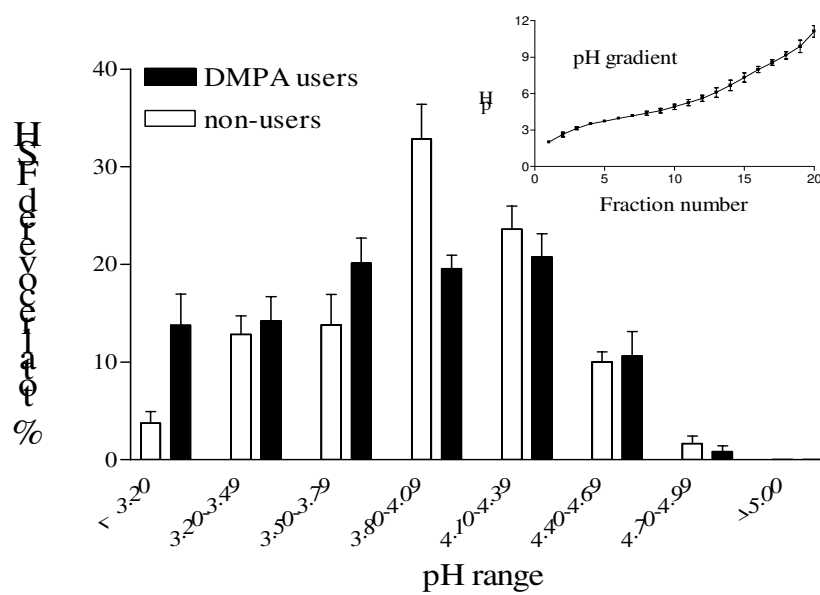


Figure II

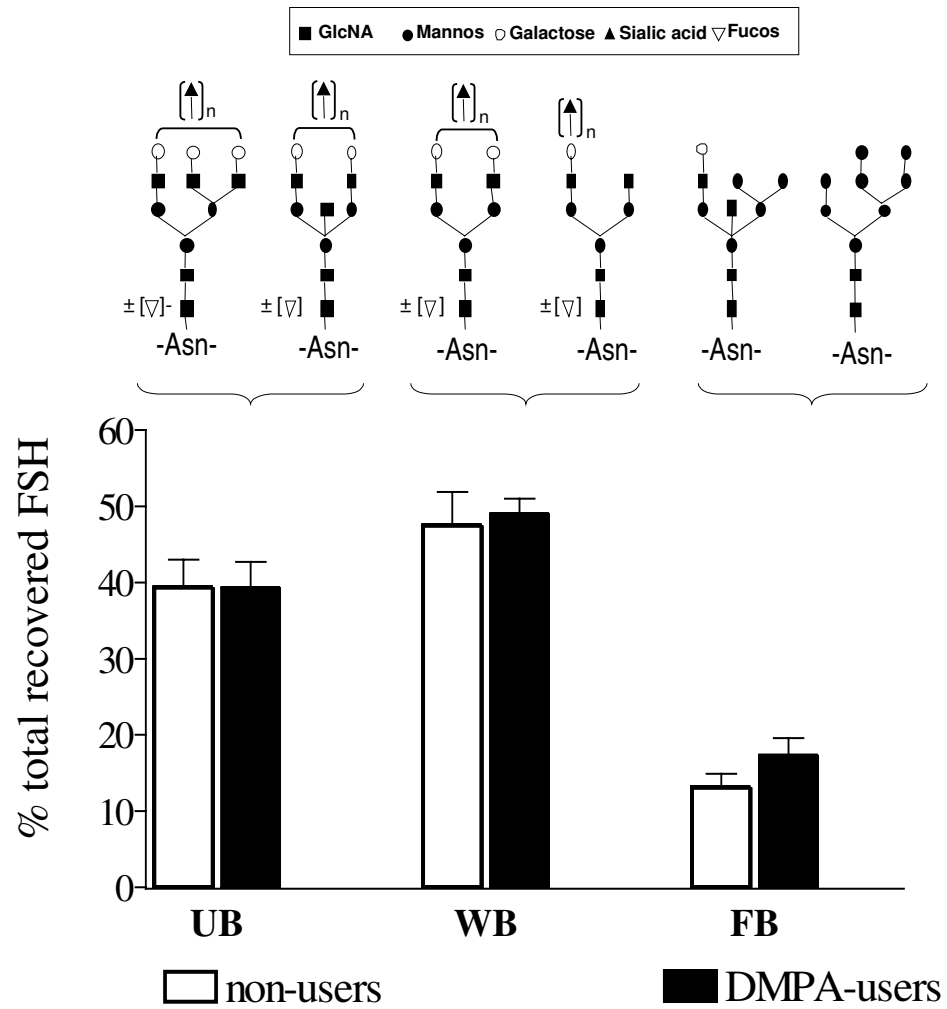


FIGURE I: Distribution profile of FSH charge isoforms after preparative IEF in users and non-users of the contraceptive depot-medroxyprogesterone acetate. Total recovered FSH within pH intervals of 0.3 units in a gradient of pH 3-5 is shown. Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

FIGURE II: Distribution profile of circulating FSH isoforms after Concanavalin A chromatography in users and non-users of the contraceptive depot-medroxyprogesterone acetate. Results are expressed as percentage of total recovered immunoactive FSH. UB (Unbound): triantennary and bisecting oligosaccharides; WB (Weakly Bound): biantennary and truncated oligosaccharides; FB (Firmly Bound): hybrid-type and high mannose oligosaccharides. Asn: Asparagine; ■ *N*-acetyl glucosamine; ● Mannose; ○ Galactose; ▲ Sialic Acid; ▽ Fucose.

5. Conclusões

- As usuárias de AMPD apresentaram níveis significativamente menores de estradiol, inibinas B e pró- α C e níveis maiores de FSH quando comparadas com o grupo de não usuárias.
- As usuárias de AMPD apresentaram padrão de isoformas de FSH similar às não usuárias, correspondendo a aproximadamente 40% de não aderidas (UB), 40% de fracamente aderidas (WB) e 20% de firmemente aderidas (FB).
- Apesar do ambiente hormonal das usuárias de AMPD ter sido diferente das não usuárias, os valores de isoformas foram similares, o que possibilita o questionamento do valor do FSH imunológico para estabelecer o diagnóstico de pós-menopausa em mulheres usuárias de AMPD em amenorréia.

6. Referências Bibliográficas

American Society for Reproductive Medicine. The stages of reproductive aging workshop (STRAW. Park City, Utah, USA. July 22-24. 2001.

Bahamondes L, Trevisan M, Andrade L, Marchi NM, Castro S, Diaz J. et al. The effect upon the human vaginal histology of the long-term use of the injectable contraceptive Depo-Provera. **Contraception** 2000; 62:23-7.

Bedecarrás P, Gryngarten M, Ayuso S, Escobar M, Bergadá C, Campo S. Characterization of serum SHBG isoforms in prepubertal and pubertal girls. **Clin Endocrinol** 1998; 49:603-8.

Beitins IZ, Padmanabhan V. Bioactivity of gonadotropins. In: **Endocrinology and metabolism clinics of North America**. Philadelphia: WB Saunders Co; 1991. p.85-120.

Beksinska ME, Smit JA, Kleinschmidt I, Rees HV, Farley TM, Guidozi F. Detection of raised FSH levels among older women using depomedroxyprogesterone acetate and norethisterone enanthate. **Contraception** 2003; 68:339-43.

Burger HG. Diagnostic role of follicle-stimulating hormone (FSH) measurements during the menopausal transition-an analysis of FSH, oestradiol and inhibin. **Eur J Endocrinol** 1994;130:38-42.

Burger HG, Groome NP, Robertson DM. Both inhibin A and B respond to exogenous follicle-stimulating hormone in the follicular phase of the human menstrual cycle. **J Clin Endocrinol Metab** 1998; 83:4167-9.

Burgon PG, Robertson DM, Stanton PG, Hearn MT. Immunological activities of highly purified isoforms of human FSH correlate with in vitro bioactivities. **J Endocrinol** 1993; 139:511-8.

Chappel SC, Bethea CL, Spies CL. Existence of multiple forms of follicle-stimulating hormones within the anterior pituitaries of cynomolgus monkeys. **Endocrinology** 1984; 115:452-61.

Cobellis L, Luisi S, Pezzani I, Reis FM, De Leo V, Petraglia F. Serum inhibin A, inhibin B, and pro- α C levels are altered after surgically or pharmacologically induced menopause. **Fertil Steril** 2002; 77:745-9.

Creus SF, Pellizzari E, Cigorrage SB, Campo S. FSH isoforms: bio and immunoactivities in post-menopausal and normal menstruating women. **Clin Endocrinol** 1996 44:181-9.

Creus SF, Chaia Z, Pellizzari EH, Cigorrage SB, Ulloa-Aguirre A, Campo S. Human FSH isoforms: carbohydrate complexity as a determinant of in-vitro bioactivity. **Mol Cell Endocrinol** 2001; 174:41-9.

Damian-Matsumura P, Zaga V, Maldonado A, Sanchez-Hernandez C, Timossi C. et al. Oestrogens regulate pituitary α 2,3-sialyltransferase messenger ribonucleic acid levels in the female rat. **J Mol Endocrinol** 1999; 23:153-65.

Fraser IS, Weisberg E. A comprehensive review of injectable contraception with special emphasis on Depot medroxyprogesterone acetate. **Long-acting steroid contraception**. New York: Raven Press;1983. p.1-30.

Franchimont P, Cession G, Ayalon D, Mutsers A, Legros JJ. Suppressive action of norethisterone enanthate and acetate on gonadotropin. (FSH and LH) levels. Radioimmunoassay in eugonadal and postmenopausal women. **Obstet Gynecol** 1970; 36:93-100.

Fotherby K, Howard G, Shrimanker K, Elder M, Bye PG. Effect of norethisterone oenanthate on serum gonadotrophin levels. **Contraception** 1977; 16:591-604.

Greenwood FC, Hunter WM, Glover JS. The preparation of ^{131}I labelled human growth hormone of high specific radioactivity. **Biochem J** 1963; 89:114-23.

Groome NP, Illingworth PJ, O'brien M, Cooke I, Ganesan TS, Baird DT. et al. Detection of dimeric inhibin throughout the human menstrual cycle by two-site enzyme immunoassay. **Clin Endocrinol** 1994; 40:717-23.

Groome NP, Illingworth PJ, O'brien M, Priddle J, Weaver K, Macneilly AS. Quantification of Inhibin Pro- α C-containing forms in the human serum by a new ultra sensitive two-site enzyme-linked immunoabsorbent assay. **J Clin Endocrinol Metab** 1995; 80:2926-32.

Groome NP, Illingworth PJ, O'brien M, Pai R, Rodger FE, Mather JP. et al. Measurement of dimeric inhibin B troghout the human menstrual cycle. **J Clin Endocrinol Metab** 1996; 81:1401-5.

Guilleband J. **Contraception: your questions answered**. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1993. 280p.

Hofmann GE, Danforth DR, Seifer DB. Inhibin-B: the physiologic basis of the clomiphene citrate challenge test for ovarian reserve screening. **Fertil Steril** 1998; 69:474-7.

Kessel B, Dahl KD, Kaser RR, Liu CH, Rivier J, Vale W. et al. The dependency of bioactive follicle stimulating hormone secretion on gonadotropin-releasing hormone in hypogonadal and cyclic women. **J Clin Endocrinol Metab** 1988; 66:361-6.

Lanuza GM, Groome NP, Baraño JL, Campo S. Dimeric inhibin A and B production are differentially regulated by hormones and local factors in rat granulosa cells. **Endocrinol** 1999; 140:2549-54.

Mackinley SM, Brambilla DJ, Posner JG. The normal menopause transition. **Maturitas** 1992; 2:103-15.

Mishell Jr. DR. Pharmacokinetics of depot medroxyprogesterone acetate contraception. **J Reprod Med** 1996; 41:381-90.

Morell M, Butt WR, Ayanz A Comparative study of the biological and immunological activity in preparations of follicle stimulating hormone. **Rev Esp Fisiol** 1971; 27:45-8.

Muttukrishna S, Child T, Lockwood GM, Groome NP, Barlow DW, Ledger WL. Serum concentrations of dimeric inhibins, activin A, gonadotrophins and ovarian steroids during the menstrual cycle in older women. **Hum Reprod** 2000; 15:549-56.

Padmanabhan V, Lang LL, Sonstein J, Kelch RP, Beitins IZ. Modulation of serum follicle-stimulating hormone bioactivity and isoform distribution by estrogenic steroids in normal women and in gonadal dysgenesis. **J Clin Endocrinol Metab** 1988; 67:465-73.

Perez-Palacios G, Chavez B, Escobar N, Vilchis F, Larrea F, Lince M. et al. Mechanism of action of contraceptive synthetic progestins. **J Steroid Biochem** 1981; 15:125-30.

Petraglia F, Zanin E, Faletti A, Reis FM. Inhibins: paracrine and endocrine effects in female reproductive function. **Curr Opin Obstet Gynecol** 1999; 11:241-7.

Pezzani I, Reis FM, Di Leonardo S, Luisi S, Santuz M, Driul L. et al. Influence of non-gonadotropic hormones on gonadal function. **Mol Cell Endocrinol** 2000; 161:37-42.

Phillips DJ, Wide L. Serum gonadotropin isoforms become more basic after an exogenous challenge of gonadotropin-releasing hormone in children undergoing pubertal development. **J Clin Endocrinol Metab** 1994; 79:814-9.

Ryan RJ, Charlesworth MC, McCormick DJ, Milius RP, Kentman HT. The glycoprotein hormones: recent studies of structure-function relationships. **FASEB J** 1988; 2:2661-9.

Seifer DB, Gardiner AC, Lambert-Messerlian G, Schneyer AL. Differential secretion of dimeric inhibin in cultured luteinized granulosa cells as a function of ovarian reserve. **J Clin Endocrinol Metab** 1996; 84:105-11.

Sherman BM; Korenman SG. Hormonal characteristics of the human menstrual cycle throughout reproductive life. **J Clin Invest** 1975; 55:699-706.

Smit J, Botha J, Mcfadyen L, Beksinska M. Serum medroxyprogesterone acetate levels in new and repeat users of depot medroxyprogesterone acetate at the end of the dosing interval. **Contraception** 2004; 69:3-7.

Soules MR, Sherman S, Parrott E, Rebar R, Santoro N, Utian W. et al. Executive summary: Stages of reproductive aging workshop (STRAW). **Fertil. Steril** 2001; 76:874-8.

Stanton PG, Burgon PG, Hearn MTW, Robertson DM. Structural and functional characterization of hFSH and hLH isoforms. **Mol Cell Endocrinol** 1996; 125:133-41.

Timossi CM, Barrios-De-Tomasi J, González-Suárez R, Arranz MC, Padmanabhan V, Conn PM. et al. Differential effects of the charge variants of human follicle-stimulating hormone. **J Endocrinol** 2000; 165:193-205.

Ulloa-Aguirre A, Miller C, Hyland L, Chappel SC. Production of all follicle-stimulating hormone isohormones from a purified preparation by neuramidase digestion. **Biol Reprod** 1984; 30:382-7.

Ulloa-Aguirre A, Schwall R, Cravioto A, Zambrano E, Damian-Matsumura P. Effects of gonadotrophin-releasing hormone, recombinant human activin-A and sex steroid hormones upon the follicle-stimulating isohormones secreted by rat anterior pituitary cells in culture. **J Endocrinol** 1992a; 134:97-106.

Ulloa-Aguirre A, Cravioto A, Damian-Matsumura P, Jimenez M, Zambrano E, Diaz-Sanchez V. Biological characterization of the naturally occurring analogues of intrapituitary human follicle-stimulating hormone. **Hum Reprod** 1992b; 7:23-30.

Ulloa-Aguirre A, Damian-Matsumura P, Jimenez M, Zambrano E, Diaz-Sanchez V. Biological characterization of the isoforms of urinary human follicle-stimulating hormone contained in a purified commercial preparation. **Hum Reprod** 1992c; 7:1371-8.

Ulloa-Aguirre A, Midgley AR, Beitins IZ, Padmanabhan V. Follicle-stimulating isohormones: characterization and physiological relevance. **End Rev** 1995; 16:765-87.

Walton JW, Nguyen VT, Butnev VY, Singh V, Moore WT, Bousfield GR. Characterization of human FSH isoforms reveals a nonglycosylated β -subunit in addition to the conventional glycosylated β -subunit. **J Clin Endocrinol Metab** 2001; 86:3675-85.

Westhoff C. Depot-medroxyprogesterone acetate injection (Depo-Provera): a highly effective contraceptive option with proven long-term safety. **Contraception** 2003; 68:75-87.

Wide L, Hobson BM. Qualitative difference in follicle-stimulating hormone activity in the pituitaries of young women compared to that of men and elderly women. **J Clin Endocrinol Metab** 1983; 56:371-5.

Wide L, Wide M. Higher plasma disappearance rate in the mouse for pituitary follicle-stimulating hormone of young women compared to that of men and elderly women. **J Clin Endocrinol Metab** 1984; 58:426-9.

Wide, L. Follicle-stimulating hormones in anterior pituitary glands from children and adults differ in relation to sex and age. **J Endocrinol** 1989; 123:519-29.

Wide L, Naessén T. 17 β -estradiol counteracts the formation of the more acid isoforms of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone after menopause. **Clin Endocrinol** 1994; 40:783-9.

Wide L, Naessén T, Phillips DJ. Effect of chronic oral administration of 17 β -oestradiol and norethisterone on the isoforms of serum gonadotrophins in post-menopausal women. **Clin Endocrinol** 1995; 42:59-64.

Wilson CA, Leigh AJ, Beitins IZ. Gonadotrophin glycosylation and function. **J Endocrinol** 1990; 125:3-14.

WHO. World Health Organization Medical eligibility criteria for contraceptive use – Third edition – **WHO Reproductive Health and Research**, 1-20, 2004.

7. Bibliografia de Normatizações

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

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

8. Anexos

8.1. Anexo 1 – Termo de Consentimento Livre e Informado

Avaliação das isoformas de FSH e das inibinas B pro- α C em usuárias de contraceptivo com acetato de medroxiprogesterona de depósito na transição para a menopausa

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E INFORMADO

Eu, _____, entendo que a finalidade do estudo que está sendo realizado no Ambulatório de Planejamento Familiar do CAISM/UNICAMP é o de se tentar diagnosticar o período do climatério ou da menopausa em mulheres que estão usando o anticoncepcional injetável acetato de medroxiprogesterona de depósito (Depoprovera® ou Tricilon®) e que estão sem menstruar.

Eu sei que deverei responder algumas perguntas sobre os meus ciclos menstruais, ou sobre o tempo total em que estou sem menstruar. Além disso deverá ser colhida uma amostra de sangue para dosagens hormonais.

Já fui informada de que o diagnóstico do climatério, ou da menopausa, em mulheres que estão sem menstruar e que estão usando Depoprovera® ou Tricilon®, ainda não está bem claro. Também fui informada de que o diagnóstico do climatério ou da menopausa

nestas ocasiões é importante para que se tenha os cuidados preventivos nesta fase da vida da mulher, além de se poder suspender o uso do anticoncepcional injetável que já não seria mais necessário nestas situações. Não terei nenhum benefício específico além do conhecimento de minha situação hormonal e, conseqüentemente, da minha função ovariana.

Entendo também que todas as informações colhidas serão completamente confidenciais. Meu nome não constará em nenhum relatório e não se tornará público em nenhuma circunstância. Também não receberei nenhum tipo de compensação monetária por minha participação. Caso eu não aceite participar do estudo, está garantido que não haverá nenhuma modificação de meu atendimento no Ambulatório de Planejamento Familiar e nas demais dependências do CAISM/UNICAMP.

Eu tenho o direito de perguntar qualquer dúvida sobre o estudo e sobre minha participação nele, que deverá ser respondida para meu esclarecimento. Para tanto tenho à minha disposição o responsável pela pesquisa, o Dra Cássia Raquel Teatin Juliato (fone: 3788-7176), ou qualquer enfermeira que faça parte do Ambulatório de Planejamento Familiar.

Finalmente deixo claro que estou participando desta pesquisa por livre e espontânea vontade.

Assinatura da voluntária

Data

Assinatura da pessoa que conduziu este termo

Data

Assinatura do pesquisador

Data

8.2. Anexo 2 – Ficha para Coleta de Dados

Data: ..

Número no estudo

INICIAIS

PF

IDADE: anos

DUM ..

PESO kg

ALTURA cm

IMC:

Uso de AMPD: ☐ Não ☐ Sim – Tempo de uso: meses

Amenorréia: ☐ Não ☐ Sim – Tempo amenorréia: meses

Dosagem

FSH (LER 907)

Isoforma NB

Estradiol (pg/ml)

Isoforma WB

Inibina B(pg/ml)

Isoforma FB

Pro α -C (pg/ml)