

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA

**RELAÇÃO DO *STATUS* ESTROGÊNICO COM A DISTRIBUIÇÃO E EXPRESSÃO
DO PEPTÍDEO INTESTINAL VASOATIVO NA PAREDE VAGINAL**

Lucia Alves da Silva Lara

RIBEIRÃO PRETO

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

LUCIA ALVES DA SILVA LARA

**RELAÇÃO DO *STATUS* ESTROGÊNICO COM A DISTRIBUIÇÃO E EXPRESSÃO
DO PEPTÍDEO INTESTINAL VASOATIVO NA PAREDE VAGINAL**

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto para obtenção de
título de Doutor em Ginecologia e Obstetrícia.
Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia.

Orientador (a): Professora Doutora Ana
Carolina Japur de Sá Rosa e Silva

RIBEIRÃO PRETO

2010

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa desde que seja citada a fonte.

Lara, Lucia Alves da Silva

Relação do *status* estrogênico com a distribuição e expressão do peptídeo intestinal vasoativo na parede vaginal/ Lucia Alves da Silva Lara; Orientadora: Profa. Dra. Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva. Ribeirão Preto, 2010

90p. il.; 30cm

Dissertação para título de Doutor apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia.

Orientadora: Prof. Dra. Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva

Título em inglês. Relation between the estrogen status with the distribution and the expression of vasoactive intestinal peptide in the vaginal wall

Descritores: 1-neurotransmissores, 2-hipoestrogenismo, 3-vagina, 4-disfunção sexual, 5-dispareunia.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Lúcia Alves da Silva Lara

Relação do *status* estrogênico com a distribuição e expressão do peptídeo intestinal vasoativo na parede vaginal.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção de título de Doutor em Ginecologia e Obstetrícia.
Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia.

Aprovada em ____ / ____ / ____

Banca examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho as minhas filhas Sara e Laís, meu bem maior.

Ao Lara que compreendeu a importância desta realização e compartilhou com paciência todos os momentos desta jornada.

Aos meus irmãos que sempre me apoiaram e ajudaram-me a superar minhas limitações

Aos cunhados e cunhadas e aos queridos sobrinhos pelo grande carinho

e por reconhecerem meu trabalho

À minha querida orientadora Prof. Dra. Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva, a quem admiro tanto. Você transmite segurança e tem a habilidade de promover o convívio saudável no ambiente em que atua. Por isto nós, seus pupilos, lhe amamos.

Agradeço-lhe profundamente por todo este tempo que pude usufruir de sua presença. Sinto-me honrada em tê-la como orientadora, e grata pelos conhecimentos que compartilhou comigo e por ter favorecido minhas publicações científicas com sua incrível capacidade para fazer de minhas idéias simples, uma grande obra. Agradeço-lhe especialmente pela sua confiança e por esta, que considero minha mais preciosa realização.

AGRADEÇO.....

A Deisy Mara da Silva, minha querida amiga. Sua preciosa ajuda foi fundamental para a execução deste trabalho. Muito lhe agradeço. Um beijo

A Maria Albina Bortolheiro pela imensa contribuição com as dosagens hormonais que realizou, mas também pelo carinho e pela amizade, pelo sorriso constante e pela disposição e presteza com que ajuda a todos.

Ao Engenheiro Antonio Renato Meireles e Silva meu querido amigo e grande colaborador, pelas longas horas investidas neste trabalho. Admira-me sua organização e esmero na construção das ferramentas que desvendam os mistérios das figuras.

A Suelen Soares secretária da pós-graduação pela presteza com que providenciou todas as minhas solicitações de ajuda. Su, querida, sem sua mãozinha não dá para seguir todas as normas da pós-graduação. Um beijão mesmo e obrigada!

Aos meus queridos amigos Ilza Mazzocato, Ricardo Perussi, Reinaldo e Rosana pelo carinho e amizade e pela presteza em ajudar-me durante todos estes anos. Vocês facilitam minha vida. Um beijo de coração

As minhas colegas de trabalho do Ambulatório de Estudos em Sexualidade Humana (AESH) Adriana Peterson Mariano Salata Romão, Flávia Raquel Rosa Junqueira, Alessandra Ricci Manganaro, Sany Rose Ferraresi, Mary Lourdes Montenegro, pelo apoio, amizade e carinho e pela compreensão nos momentos em que estive ausente. Juntas, nós formamos uma bela equipe e realizamos um belo trabalho.

As amigas do Laboratório: Sandra, Auxiliadora, Cris, Maria Cristina, Marisa, Roberta, Marilda e Cidinha pelo carinho e pela convivência saudável.

As minhas amigas pós-graduandas Sany, Jaci, Ju, Gabí, Daya, Carol, Vivi (da Onco) com as quais tive o prazer de compartilhar momentos deliciosos, de muito riso e cruciais para quebrar as tensões. Amo vocês, um beijão a todas.

AGRADEÇO.....

Ao Chefe do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Prof. Dr. Rui Alberto Ferriani, a quem muito admiro. Sou-lhe muito grata por apoiar-me sempre, pela confiança que deposita em mim e pelo incentivo.

Ao Prof. Dr. Marcos Felipe Silva de Sá, pela inestimável contribuição neste estudo e por tornar possível a realização deste meu sonho. Você tem o dom das boas ações.

Ao Prof. Dr. Jurandyr Moreira de Andrade com quem convivo prazerosamente há anos e a quem devo muito do que sei e do que sou.

A Prof. Dra. Rosana Maria Reis, minha querida amiga por quem tenho muito carinho e apreço. Sou-lhe muito grata pelo seu reconhecimento e atenção e por incentivar-me sempre.

Ao Dr. Julio César Rosa e Silva pela contribuição na compilação dos dados deste trabalho e pelas suas palavras de incentivo em momentos de crise.

A Prof. Dra. Carolina Sales Vieira por ler atentamente este trabalho e pelos comentários valiosos que fizeram a diferença no resultado final. Sou-lhe muito grata de coração

A Prof. Dra. Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro, a quem muito admiro por se esmerar nos pequenos detalhes. Agradeço sua contribuição na minha formação acadêmica.

Ao Prof. Dr. Alejandro Duarte. Agradeço pelo incentivo e pelas aulas de estatística que foram cruciais para que eu pudesse interpretar e discutir os resultados deste estudo. De coração, obrigada com muito carinho!

Ao Prof. Dr. Alfredo Ribeiro Silva pela leitura da imunohistoquímica e pela sua grande contribuição na realização deste trabalho.

A todos os Professores do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia que tem contribuído com a minha formação acadêmica, eu agradeço!

Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar
a vida com paixão, perder
com classe e vencer com ousadia,
pois o triunfo pertence a quem se atreve...
A vida é muita para ser insignificante.

Charles Chaplin

Vale a pena executar tarefas para as quais somos designados com habilidade adquirida à custa de poderosa disciplina, mas é preciso encarar e ultrapassar os precipícios que nos separam dos nossos sonhos. Só assim ficaremos mais próximos da plenitude e, assim, entenderemos a finalidade da vida.

RESUMO

LARA, L.A.S. Relação do *status* estrogênico com a distribuição e expressão do peptídeo intestinal vasoativo na parede vaginal. 2010. Tese (Doutorado)-Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Introdução: O Peptídeo Intestinal Vasoativo (VIP) está envolvido no mecanismo da lubrificação vaginal e no relaxamento da musculatura lisa vaginal. O estrogênio modula a expressão do VIP em vários órgãos, mas ainda existem controvérsias quanto a relação destas duas substâncias na parede vaginal. Não se sabe se o hipoestrogenismo prejudica a lubrificação por interferir na expressão do VIP ou por provocar a desvascularização da parede vaginal. **Objetivos:** Avaliar a relação do *status* estrogênico com a distribuição e expressão do VIP na parede vaginal, correlacionar a função sexual com a expressão do VIP em mulheres normo e hipoestrogênicas e verificar o impacto do hipoestrogenismo na parede vaginal após a menopausa. **Métodos:** Espécimes cirúrgicos da vagina de 30 mulheres, sendo 18 normoestrogênicas (GP) e 12 na pós-menopausa (GM), submetidas a colpoperineoplastia por prolapso genital I e II. Aferidos: FSH e estradiol, prolactina e TSH. Realizou-se: HE, imunohistoquímica para receptores estrogênicos α , VIP e CD34 para morfometria vascular. A dor coital foi acessada pelo GRISS. **Resultados:** Houve diferença significativa no escore do receptor estrogênico alfa (RE) entre as camadas epitelial (E), lâmina própria (LP) e muscular (M) das paredes anterior e posterior da vagina entre GP e GM (parede anterior respectivamente, $5,39 \pm 2,57^*$ e $2,17 \pm 2,47^*$, $4,11 \pm 2,32^*$ e $1,83 \pm 2,12^*$, $3,61 \pm 2,25$ e $0,83 \pm 1,64^*$, $p < 0,0001$. Parede posterior respectivamente, $,53 \pm 2,62^*$ e $2,25 \pm 2,53^*$, $4,12 \pm 2,45$ e $4,12 \pm 2,45$, $3,65 \pm 2,34$ e $1,42 \pm 1,83^*$, $p=0,0002$). A expressão do VIP na parede vaginal posterior foi significativamente maior no GP quando comparado ao GM (respectivamente, $2,22 \pm 0,81$ e $1,50 \pm 0,80$, $p=0,02$), não houve diferença na parede vaginal anterior (respectivamente, $2,00 \pm 0,86$ e $1,50 \pm 0,79$, $p=0,1$). O GP apresenta concentração vascular

significativamente maior do que o GM (parede anterior GP 1.055±145,8 e GM 346,6±209,9, $p<0,0001$ e posterior GP 1064±303,3 e GM 348,6±167,3, $p=0,0005$). Houve correlação negativa entre a idade e o escore do VIP; IC 95% -0.67 a -0.04, $r=-0,40$, $p=0,02$ e entre a idade e o escore de receptor estrogênico alfa; IC 95% -0.65 a -0.00, $r=-0,37$, $p=0,04$. Houve correlação positiva entre o escore do receptor estrogênico alfa e a concentração de vasos da lamina própria na parede vaginal anterior (IC 95% 0.24 a 0.91, $r=0,71$, $p<0,009$) e posterior (IC 95% 0.22 a 0.91, $r=0,71$, $p<0,0097$) e correlação negativa com a idade (parede vaginal anterior IC 95% -0.972 a -0.68, $r=-0,90$, $p<0,0001$) e posterior IC 95% -0.92 a -0.29, $r=-0,74$, $p=0,0055$). Não houve correlação entre dor coital, escore do VIP e concentrações do estradiol. E não houve correlação entre concentração de vasos e escore do VIP. **Conclusão:** A expressão do VIP na parede vaginal posterior se reduz com o advento da menopausa, sem entretanto haver uma correlação entre com os valores séricos do estrogênio e a expressão dos seus receptores. Parece que a idade é o fator que influencia negativamente a expressão deste neuropeptídeo na parede vaginal. Ocorre desvascularização da parede vaginal após a menopausa sendo o hipoestrogenismo e o avançar da idade os fatores que respondem por esta alteração. A falta de correlação entre a condição estrogênica e o escore do VIP com a dor coital sugere que outro mecanismo deva influenciar no mecanismo da dor coital em mulheres menopausadas.

Descritores: Neurotransmissores. Hipoestrogenismo. Vagina. Disfunção sexual. Dispareunia.

ABSTRACT

LARA, L.A.S. Relation between the estrogen status with the distribution and the expression of vasoactive intestinal peptide in the vaginal wall. 2010. Tese (Doutorado)-Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Introduction: Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) is involved in the mechanism of vaginal lubrication and relaxing vaginal smooth muscle. Estrogen modulates the expression of VIP in various organs, but there is still controversy about the relationship of these two substances in the vaginal wall. It is still unknown whether hypoestrogenism affect the lubrication from interfere with VIP expression or because vaginal wall devascularization. Aims: To evaluate the relationship between estrogen status with the distribution and expression of VIP in the vaginal wall, and to correlate sexual function with VIP expression in pre and postmenopause women, and to investigate the impact of estrogen deprivation in the vaginal wall after menopause. Methods: Surgical specimens from the vagina of 30 women, with 18 normoestrogênicas (GP) and 12 postmenopausal (GM), subjected to genital prolapse by colpoperineoplasty I and II. Outcome Measures: FSH, estradiol, prolactin and TSH. Held: HE for tissue analyzes, immunohistochemistry for estrogen receptor α , VIP and CD34. The coital pain was accessed by GRISS. Results: There were differences of the estrogen receptor alpha (ER-alpha) scores between the epithelial layer (E), lamina propria (LP) and muscle (M) of the anterior and posterior vaginal walls between GP and GM (anterior wall, respectively, $5,39 \pm 2.57 *$ and $2.17 \pm 2.47 *$, $4.11 \pm 2.32 *$ and $1.83 \pm 2.12 *$, 3.61 ± 2.25 and $0.83 \pm 1.64 *$, $p < 0.0001$. Posterior wall respectively, $53 \pm 2.62 *$ and $2.25 \pm 2.53 *$, 4.12 ± 2.45 and 4.12 ± 2.45 , $3.65 \pm 2,34$ and $1.42 \pm 1.83 *$, $p = 0.0002$). VIP expression in the posterior vaginal wall was significantly higher in GP compared to GM (respectively, 2.22 ± 0.81 and 1.50 ± 0.80 , $p = 0.02$), no difference was observed in the anterior vaginal wall (respectively, 2.00 ± 0.86 and 1.50 ± 0.79 , $p = 0.1$). The vascular concentration was significantly higher in the GP than in

the GM (anterior wall GP 1055 ± 145.8 and GM 346.6 ± 209.9 , $p < 0.0001$, posterior GP 1064 ± 303.3 and $348.6 \pm GM 167.3$, $p = 0.0005$). Age was reversely correlated with VIP scores, 95% CI -0.67 to -0.042, $r = -0.40$, $p = 0.02$ and also, age was negatively correlated with ER-alpha scores, 95% CI -0.65 to -- 0.00, $r = -0.37$, $p = 0.04$. There was positive correlations between ER-alpha and vessels concentration in the lamina propria of the anterior (95% CI 0.24 to 0.91, $r = 0.71$, $p < 0.009$) and posterior (95% CI 0.22 to 0.91, $r = 0.71$, $p < 0.0097$). Age was reversely correlated with vessels concentration within the lamina propria of the anterior (95% CI -0.97 to -0.68, $r = -0.90$, $p < 0.0001$) and posterior vaginal wall 95% CI -0.92 to -0.29, $r = -0.74$, $p = 0.0055$. There was no correlation between coital pain, scores of VIP and estradiol concentrations, and thus, between vessels concentrations and VIP score. Conclusion: The expression of VIP on the posterior vaginal wall is reduced with the advent of menopause, but without having a correlation between the serum levels of estrogen and its ER-alpha expression. It seems that age is the factor that negatively influences the expression of this neuropeptide in the vaginal wall. The devascularization of the vaginal wall occurs after menopause, and this alteration increases as the woman becomes older. The lack of correlation between estrogen and VIP core with coital pain suggests that another mechanism should influence the mechanism of coital pain in women menopausal.

Keywords: Neurotransmitters. Hypoestrogenism. Vagina. Sexual Dysfunction. Dyspareunia.

FIGURAS

- Figura 1: Estrutura do gene do VIP (extraído de Delgado M, 2004) **Página 26**
- Figura 2: Fluxograma da coleta de dados **Página 35**
- Figura 3: Esquema dos fragmentos cirúrgicos. (A) Fragmento da parede vaginal anterior, (P) Fragmento da parede posterior **Página 37**
- Figura 4: Sequencia da macro para a contagem dos vasos: (A) marcação da área a ser analisada em preto. (B) Marcação manual dos vasos e contagem automática em vermelho **Página 43**
- Figura 5: Aspecto morfológico da lâmina própria da parede vaginal de mulher na pré (A) e pós-menopausa (B). A barra de escala = 50 μ m **Página 46**
- Figura 6: Imunohistoquímica para o VIP mostrando marcação na fibra muscular lisa da parede de um vaso em marrom (seta) **Página 47**
- Figura 7: Comparação entre os 3 segmentos da parede anterior com os três segmentos da parede posterior da vagina quanto a expressão do VIP nos grupos pré-menopausa (A) e pós-menopausa (B). Segmento anterior distal (aa), anterior médio (am) e anterior proximal (ap) e, segmento posterior distal (pa), posterior médio (pm) e posterior proximal (pp). Kruskal-Wallis H test **Página 48**
- Figura 8: Comparação do escore do VIP na parede vaginal entre os grupos pré (GP) e pós-menopausa (GM) na parede vaginal anterior (A) e posterior (B). Mann-Whitney U test **Página 49**
- Figura 9: Imunohistoquímica para o receptor estrogênico alfa evidencia marcação nuclear de em marrom (seta) **Página 49**
- Figura 10: Comparação da expressão do escore do receptor estrogênico alfa nas camadas epitélio, lamina própria e muscular do grupo pré-menopausa (GP) com as camadas da parede vaginal correspondentes do grupo menopausa (GM). (A) parede anterior e (B) parede vaginal posterior. Kruskal-Wallis H test. Sendo \neq^{**} , $p < 0,0001$ e $p = 0,0002$ respectivamente **Página 51**
- Figura 11: Comparação do escore de dor (GRISS) entre o grupo pré (GP) e pós-menopausa (GM). Mann-Whitney U test **Página 51**
- Figura 12: Microfotografia evidenciando o aspecto da rede vascular da lâmina própria da parede vaginal de mulheres na pré-menopausa (A) e pós- menopausa (B). Imunohistoquímica para vasos marcados em marrom pelo CD34 **Página 52**
- Figura 13: Comparação entre os grupos pré-menopausa (GP) e pós-menopausa (GM) da concentração de vasos na lâmina própria da parede anterior (A) e posterior (B). Lâmina própria (LP). Student's t test **Página 53**

Figura 14: Correlações entre: o escore do VIP e o escore do receptor estrogênio (A), o escore do VIP e as concentrações de estradiol (B) e o escore do VIP com o escore de dor (C). (RE) receptor estrogênio alfa. Spearman's test..... **Página 55**

Figura 15: Correlações entre o escore do receptor estrogênio alfa e o escore de dor (A) e entre o estradiol e o escore do receptor estrogênico alfa (B). (RE) receptor estrogênio alfa. Spearman's test..... **Página 56**

Figura 16: Correlação entre o escore do VIP e a idade (A) e entre o escore do receptor estrogênico alfa e a idade (B). (VIP) peptídeo intestinal vasoativo, (RE) receptor estrogênico alfa. Spearman's test..... **Página 56**

Figura 17: Correlação entre a expressão do receptor alfa e a concentração de vasos na parede vaginal anterior (A) e posterior (B), e entre a idade e a concentração de vasos na parede vaginal anterior (C) e posterior (D). (RE) receptor estrogênico (LP) lâmina própria. Spearman e Pearson's test **Página 57**

Figura 18: Correlação entre a concentração de vasos da parede vaginal anterior (A) e da posterior (B) com o escore do VIP. (LP) lâmina própria. Spearman teste **Página 58**

QUADROS E TABELAS

Quadro 1: H-score para receptor estrogênico.....	Página 41
Tabela 1: Características da amostra	Página 45
Tabela 2: Características morfológicas da parede vaginal na pré e pós-menopausa...	Página 46
Tabela 3: Comparação da expressão do receptor estrogênico alfa entre as 3 camadas (epitélio, lâmina própria e muscular) da parede vaginal anterior e posterior em cada grupo.....	Página 50
Tabela 4: Comparação da parede vaginal anterior com a posterior no mesmo grupo quanto a expressão do receptor estrogênico	Página 50

ABREVIACÕES

- aa (seguimento distal anterior)
- AE/AT (área do epitélio/ área total)
- ALP/AT (área da lâmina própria sobre área total)
- AM/AT (área da muscular sobre área total)
- am (segmento médio)
- ap (segmento proximal)
- CGRP (*calcitonin gene-related peptide*)
- DP (desvio padrão)
- EE (espessura do epitélio)
- ELP (espessura da lâmina própria)
- ET (espessura total)
- HE (hematoxilina-eosina)
- IMC (índice de massa corporal)
- LBD (*ligand-binding domain*)
- MERMs (*moesin-ezrin-radixin-Merlin*)
- ON (Oxido Nítrico)
- pa (segmento distal da parede posterior)
- pm (segmento médio da parede posterior)
- pp (segmento proximal da parede posterior)
- RE (receptor estrogênico)
- R_{LIS} (resistência do espaço intercelular)
- RM (ressonância magnética)
- R_{TJ} (resistência da ligação intercelular apical)
- HIV (*Human immunodeficiency virus*)
- SNA (sistema nervoso autônomo)
- TH (terapia hormonal)
- VIP (peptídeo intestinal vasoativo)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1 Influência do estrogênio na estrutura da parede vaginal	23
1.2 Características do VIP	25
1.3 A relação do VIP com os estrogênios.....	28
2. JUSTIFICATIVA DA PROPOSIÇÃO.....	30
3. OBJETIVOS	31
3.1 Primário	31
3.2 Secundário	31
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS	32
4.1 Desenho do estudo e aspectos éticos	32
4.2 Características da amostra	32
4.2.1 Critérios de inclusão	33
4.2.1.1 Grupo pré-menopausa.....	33
4.2.1.2 Grupo menopausa.....	33
4.2.2 Critérios de exclusão	34
4.3 Métodos	36
4.3.1 Avaliação no momento da inclusão no estudo	36
4.3.2. Intra-operatório.....	37
4.3.2.1. Técnica	37
4.3.2.2 Processamento da amostra.....	38
4.3.2.3. Análise morfológica	38
4.3.2.4. Análise Imunohistoquímica.....	39
4.3.2.4.1. Análise da expressão do VIP	39
4.3.2.4.2. Análise da expressão do receptor estrogênico.....	39
4.3.2.4.3. Imunohistoquímica para marcação dos vasos pelo CD34.....	41
4.4 Análise estatística	44
5. RESULTADOS	45
5.1. Caracterização da amostra	45
5.2. Descrição morfológica.....	45
5.3. Expressão do VIP na parede vaginal	47

5.4. Imunohistoquímica para o receptor estrogênico alfa.....	49
5.5. Análise do GRISS.....	51
5.6. Morfometria Vascular	52
5.7. Correlações	53
6. DISCUSSÃO	59
7. CONCLUSÕES.....	69
8. REFERÊNCIAS	70
ANEXOS	84
Anexo 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	84
Anexo 2 - Golombok-Rust Inventory Sexual Satisfaction (GRISS)	86
Anexo 3 - Bula Receptor estrogênico alfa.....	89
Anexo 4 - Recursos necessários e fonte de orientação	90

ARTIGOS PREPARADOS

1. INTRODUÇÃO

A resposta sexual humana compreende a interação física e psíquica e é dependente da integridade anatômica e funcional destes dois componentes. É modulada pela ação dos esteróides sexuais, por neurotransmissores e neuropeptídeos (WEIG, 2005; VERIT et al., 2006), é complexa e específica para cada gênero e sofre influencia da condição cultural e sócio econômica do indivíduo. Atenção maior tem sido dispensada à fisiologia da resposta sexual feminina ainda pouco conhecida porque só recentemente, importantes aspectos do ciclo da resposta sexual da mulher foram definidos. O conceito atual é de que existem muitas motivações para que a mulher se engaje na relação sexual, podendo ser a excitação a primeira fase da resposta sexual (BASSON, 2002a; b; BASSON et al., 2003; 2004). Deste então, o mecanismo da excitação tem recebido especial atenção. Ele depende, também, do entendimento da anatomia genital (MIN et al., 2001; MUNARRIZ et al., 2002) principalmente, no que se refere aos vários mecanismos envolvidos na modulação do tônus da musculatura vaginal e do tecido erétil (BREDKJOER et al., 1997) e da dinâmica vascular. A excitação sexual é uma fase que se expressa de forma objetiva através da lubrificação vaginal (LEVIN, 2002) e por isto, é mais estudada.

O mecanismo da lubrificação vaginal tem estreita ligação com a densidade de vasos na parede vaginal, a qual sofre alterações decorrentes da dramática redução estrogênica com a instalação da menopausa (LONG et al., 2006b; WEN et al., 2008). De fato, é conhecido que o hipoestrogenismo cursa com alterações importantes na parede vaginal, dentre elas: a diminuição da expressão de genes que controlam a síntese do colágeno (MOALLI et al., 2004; WEN et al., 2006), a diminuição de fatores de crescimento, em especial do fator de crescimento endotelial (VEGF) que interfere com a angiogênese (LONG et al., 2001; SADOUN e REED, 2003) e o aumento da apoptose de vasos e nervos. O hipoestrogenismo

está, também, associado a maior incidência de infecções na parede vaginal que, associadas à perda de estruturas pela aceleração da apoptose poderá resultar em espessamento, possivelmente por fibrose (DA SILVA LARA et al., 2009).

O efeito da idade parece somar-se ao hipoestrogenismo acentuando as modificações sobre a parede vaginal (LOTOCKI, 1999), implicando em alterações estruturais mais severas (BOREHAM et al., 2002b; a; FU et al., 2003; GIRALDI et al., 2004; WHITESIDE et al., 2005; LARA et al., 2009). Inclui-se aí o prejuízo na expressão de genes que controlam a síntese de receptores e a ação de hormônios e de neuropeptídeos envolvidos no mecanismo da lubrificação vaginal (MENDELSON, 2002). Tais eventos podem resultar em perda da elasticidade e redução da vascularização da parede vaginal e menor lubrificação da vagina durante a relação sexual.

Em resposta a um estímulo sexual ocorre a vasodilatação na lâmina própria, com aumento do fluxo sanguíneo que resulta em aumento da pressão intracapilar (GIRALDI et al., 2004; KIM et al., 2004; LEVIN e WYLIE, 2008; LARA et al., 2009). Como resultado ocorrerá a formação de gotículas de transudato na superfície da luz vaginal que coalescem para formar a secreção que lubrifica a vagina (TANG et al., 2007). Todo este processo é mediado pela ação de neurotransmissores e neuropeptídeos, em especial o Óxido Nítrico e o Peptídeo Intestinal Vasoativo (VIP) (OTTESEN et al., 1980; OTTESEN, 1983; OTTESEN et al., 1983; OTTESEN e FAHRENKRUG, 1995).

O neuropeptídeo VIP, objeto deste estudo, tem sido alvo de importantes investigações. Ele se expressa nas terminações nervosas que inervam a musculatura lisa vascular e não vascular de vários órgãos, no sistema nervoso central e periférico (SAID e ROSENBERG, 1976; NAJIMI et al., 2006), já tendo sido identificada sua maior expressão nas regiões lombar e sacral da medula espinhal, que são regiões que exercem o controle sobre as funções urogenitais (ANAND et al., 1983; BASBAUM e GLAZER, 1983). Sabe-se que o VIP

também é encontrado em terminações nervosas motoras, e também sensitivas dos órgãos pélvicos (GIBSON et al., 1988; KAWATANI e DE GROAT, 1991). No sistema reprodutivo, este neuropeptídeo tem sido implicado em importantes modificações morfofuncionais que são cruciais no mecanismo do parto e para uma função sexual prazerosa (UCKERT et al., 2005).

Embora sejam reconhecidas as várias ações do VIP no corpo humano desde a sua participação nos mecanismos imunológicos, antiinflamatórios, hemodinâmicos e reprodutivos (FAHRENKRUG, 2001; TOSCANO et al., 2010), estudos experimentais têm buscado elucidar melhor o seu papel no mecanismo da excitação sexual.

Considerando-se a importância das propriedades vasodilatadoras desta substância, vale o desenho de estudos que visem controlar variáveis que, sabidamente, interferem na expressão deste neuropeptídeo no organismo humano. Neste sentido, não está claro se a condição estrogênica da vagina tem influência na expressão do VIP neste órgão. Paralelamente a isso, a necessidade de identificar fatores diretamente envolvidos no processo da lubrificação vaginal norteou esta pesquisa para a busca por dados objetivos sobre a concentração de vasos na lâmina própria, já que esta é a camada da parede vaginal mais vascularizada que tem estreita relação com o epitélio, camada por onde escoam o transudato que lubrifica a vagina.

1.1 Influência do estrogênio na estrutura da parede vaginal

A parede vaginal é composta por quatro camadas sendo: 1. o epitélio do tipo escamoso estratificado; 2. a lâmina própria ricamente vascularizada e inervada; 3. a camada muscular, que é formada por fibras musculares lisas dispostas em camadas circulares e longitudinais entrelaçadas, e que dão suporte estrutural a vagina e 4. a adventícia, composta por tecido conjuntivo, vasos e nervos (HSU et al., 2005). Ao longo da vida, a vagina sofre variações morfofuncionais devidas ao avançar da idade e em resposta ao estado estrogênico, podendo-se

observar uma estreita relação entre o trofismo vaginal e as concentrações sanguíneas e teciduais deste esteróide (FOSTER et al., 1999).

A deficiência estrogênica cursa com importantes modificações na parede vaginal secundárias ao prejuízo na expressão de moléculas como o Oxido Nítrico (ON), retinóides, colágeno, fator de crescimento epidérmico (EGF) e endotelial e outros que interagem no processo de manutenção do trofismo e umidade da vagina (The role of local vaginal estrogen for treatment of vaginal atrophy in postmenopausal women: 2007 position statement of The North American Menopause Society, 2007; GASS, 2008; UTIAN et al., 2008). Até recentemente, acreditava-se que o hipoestrogenismo levava, incondicionalmente, ao afinamento da parede vaginal. No entanto, foi demonstrado que mulheres na pós-menopausa portadoras de prolapso genital apresentam espessamento da parede, provavelmente por substituição fibrótica (DA SILVA LARA et al., 2009). Além disto, na ausência do estrogênio o fluxo sanguíneo na parede vaginal fica comprometido (VEILLE et al., 1996). Também a sensibilidade prazerosa da genitália fica reduzida devido ao incremento da apoptose dos nervos e de vasos (BERMAN et al., 1998). Todas estas alterações resultam em prejuízo da lubrificação e do relaxamento vaginal no momento do coito.

O comprometimento da lubrificação vaginal, uma condição que cursa com 40% das queixas de dor coital, pode gerar disfunção sexual de caráter orgânico com perda, principalmente, da qualidade da reposta sexual excitatória (NAMS, 2007). Isto foi ilustrado em um estudo europeu multicêntrico que demonstrou que 30 a 40% das mulheres na pós-menopausa queixam-se de sintomas relacionados a atrofia genital (BARLOW et al., 1997; KAO et al., 2008).

O efeito do estrogênio na parede vaginal é mediado pela ativação principalmente de α receptores que se expressam de forma decrescente do epitélio para a camada muscular sendo minimamente expressos na adventícia (BLAKEMAN et al., 2000; CUNHA et al., 2004).

Apesar da presença destes receptores na camada epitelial, sua função é dependente da ativação dos α -receptores localizados na lamina própria, para que ocorra a proliferação da célula epitelial (CUNHA et al., 2004). Por outro lado, na ausência dos α -receptores do epitélio, não ocorrerá a diferenciação celular da camada epitelial (CUNHA et al., 2004). Polimorfismos nestes receptores, gerados por mutações, induzem ao aparecimento de outros fenótipos com ação modificada e específica (DAHLMAN-WRIGHT et al., 2006), o que em parte, poderia explicar a resposta clínica individualizada à reposição hormonal nos diferentes tecidos (GEBHART et al., 2001).

O diagnóstico do hipoestrogenismo vaginal é facilmente identificado através da história clínica pelas queixas de ressecamento e desconforto nas relações sexuais, e pelo exame ginecológico, que evidencia aplanamento e palidez da superfície da vagina. No entanto, a citologia vaginal já é capaz de identificar o hipoestrogenismo antes que este quadro se instale (BACHMANN, 1999). Cronicamente, o hipoestrogenismo acaba por produzir alterações histológicas como diminuição da concentração dos vasos sanguíneos, dos feixes musculares lisos e dos nervos que se tornam mais esparsos e delgados e redução do colágeno (PARK et al., 2001). Todas estas alterações são passíveis de serem revertidas através da suplementação estrogênica (PARK et al., 2001).

A redução vascular que acompanha estas alterações estruturais relacionadas ao hipoestrogenismo promove piora da lubrificação vaginal, o que pode estar relacionado às modificações na expressão do VIP.

1.2 Características do VIP

O VIP é um neuropeptídeo não adrenérgico não colinérgico composto por 28 aminoácidos com uma seqüência similar àquela dos hormônios gastrointestinais como o

glucagom, a secretina, a gastrina e o polipeptídeo ativador da adenilato-ciclase pituitária (PACAP) (TSUKADA et al., 1985). No ser humano, o gene envolvido na sua estrutura encontra-se no cromossoma 6 (6q24), constituído por 8837 pares de base (pb), contendo 7 exons e 5 introns, cada um codificando um sítio distinto (YUNG et al., 2003) (Figura 1).

O VIP tem estrutura molecular frágil e é facilmente degranulado e eliminado das fibras nervosas. Sofre a ação de enzimas proteolíticas e de substâncias químicas o que torna difícil o seu manuseio para estudo (VIRGOLINI et al., 1994; TEUCHNER et al., 2010) e apresenta interação do tipo reação cruzada com células de vários tipos de tumores malignos (VIRGOLINI et al., 1994; LI et al., 2001) em especial os tumores do colo uterino e do endométrio.

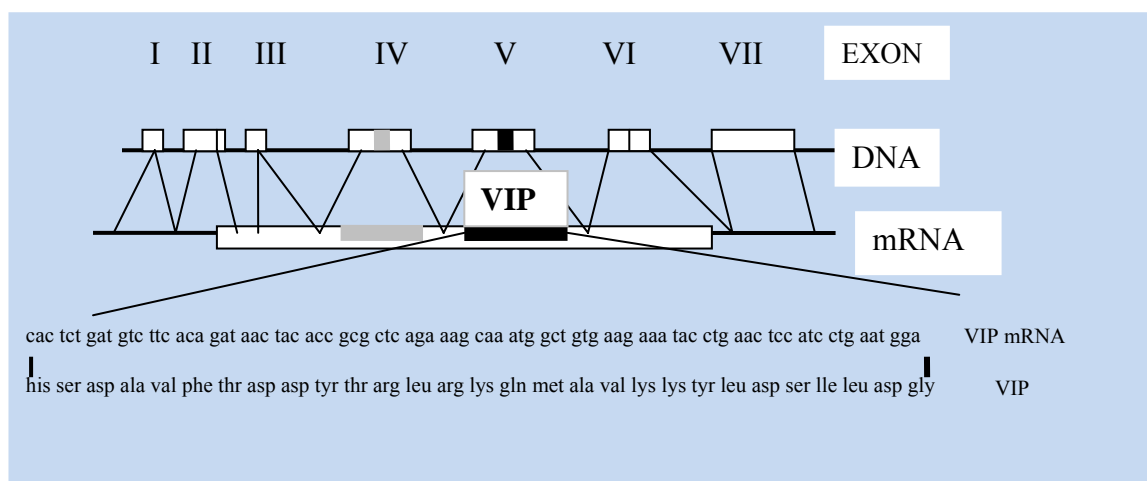


Figura 1: Estrutura do gene do VIP (extraído de Delgado M, 2004)

Este neuropeptídeo foi descoberto em 1970 através da purificação de extratos da mucosa intestinal de suínos (SAID e MUTT, 1970; BODANSZKY et al., 1973) e, posteriormente, sua presença foi identificada no sistema nervoso central e periférico (SAID e ROSENBERG, 1976) e hoje, já é conhecida a sua larga distribuição no corpo celular dos neurônios e nas fibras nervosas em uma grande variedade de tecidos no corpo humano, incluindo a genitália (HELM et al., 1981).

Em estudos realizados em medula espinhal de mulheres normais “postmorten”, foi observada maior expressão do VIP nas regiões lombar e sacral, sítios de mediação das funções urogenitais (ANAND et al., 1983). Este estudo foi reproduzido em animais com resultados similares (BASBAUM e GLAZER, 1983). O VIP é encontrado também nas terminações nervosas sensitivas dos órgãos pélvicos (GIBSON et al., 1988; KAWATANI e DE GROAT, 1991). No sistema reprodutivo feminino, foi identificado em nervos da parede uterina originários do gânglio paracervical e também em nervos da parede vaginal, da cervix e do clitóris (BLANK et al., 1986; OTTESEN e FAHRENKRUG, 1995). Parece que os gânglios paracervicais são a origem das terminações nervosas marcadas pelo VIP, uma vez que a ressecção destas estruturas culmina com importante redução na expressão deste neuropeptídeo em regiões a montante (ALM et al., 1980b).

Na região genital, a expressão do VIP varia de acordo com a região estudada. É menos expressivo no ovário e, no corpo uterino, predomina em fibras que inervam células epiteliais, vasos sanguíneos e células musculares lisas (ALM et al., 1980a; BLANK et al., 1986; OTTESEN e FAHRENKRUG, 1995; SMET et al., 1997). Também parece haver uma distribuição heterogênea deste neuropeptídeo na parede vaginal. Alguns autores demonstraram sua maior presença na superfície da lamina própria (LYNCH et al., 1980; SMET et al., 1997). Já outros observaram maior concentração em camadas mais profundas, sendo que a menor concentração identificada ocorreu nas veias da lamina própria (HOYLE et al., 1996). Também o calibre vascular parece influenciar a expressão deste neuropeptídeo sendo que, os vasos com calibre entre 50 e 200 μ m expressam menos o VIP na parede quando comparados aos vasos com diâmetro de 400 μ m (HOYLE et al., 1996).

Dentre as funções do VIP estão o controle da progressão do óvulo através da trompa, a efetivação da fase da excitação sexual feminina central e periférica e a ereção do pênis (FAHRENKRUG, 2001). Para explicar este mecanismo, estudos experimentais utilizando

animais de laboratório têm buscado elucidar melhor o papel do VIP na fisiologia da excitação sexual, uma vez que os estudos em humanos são limitados devido aos efeitos colaterais desta substância relacionados com sintomas cardiovasculares como taquicardia e hipotensão graves. Autores observaram que a infusão intravenosa deste neuropeptídeo em coelhas culmina com o relaxamento da vagina (BERMAN et al., 1999) e, este mesmo efeito foi registrado em vagina de ratas (AUGHTON et al., 2008). Tanto o relaxamento da musculatura lisa vaginal quanto a vasodilatação promovidas pelo VIP (WEIG, 2005), são eventos cruciais para as funções genitais envolvidas na reprodução e na relação sexual.

O VIP exerce suas ações biológicas através da sua ligação com duas classes de receptores chamados polipeptídios ativadores da adenil-ciclase do VIP (*VIP/pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*) (VPAC) 1 e 2 (ANDRADE et al., 2004; CHU et al., 2010), assim chamados por terem afinidade para o VIP e pelo PACAP (HARMAR et al., 1998).

1.3 A relação do VIP com os estrogênios

Parece haver um papel modulador dos esteróides sexuais sobre o VIP, podendo estimular ou reprimir a sua expressão. Este efeito já foi demonstrado em diversos órgãos do corpo humano e em animais de experimentação. Na hipófise de ratas tratadas com estradiol observou-se um incremento da concentração deste peptídeo (PRYSOR-JONES et al., 1988), sugerindo uma ação estimuladora do estradiol sobre a expressão tanto do gene, quanto do RNA mensageiro do VIP (mRNA VIP) (KASPER et al., 1992). Em compensação identificou-se uma diminuição das concentrações do VIP no hipotálamo de ratas uma semana após o implante subcutâneo de pellets de estrogênios (MALETTI et al., 1982). Estes achados sugerem que a influência dos estrogênios na expressão deste neuropeptídeo é específica para

cada tecido, podendo ainda, ocorrer a inibição deste estímulo na vigência de exposição prolongada a este hormônio (KASPER et al., 1992). Em mulheres na pós-menopausa, a terapia estrogênica associada a administração do VIP culmina com o aumento da lubrificação vaginal (OTTESEN et al., 1987) o que sugere um efeito modulador deste esteróide sobre esta substância na parede vaginal. Mas em condições fisiológicas, não se sabe se o estrogênio tem efeito modulador na expressão do VIP.

2. JUSTIFICATIVA DA PROPOSIÇÃO

O VIP é um neuropeptídeo que faz parte do mecanismo da vasodilatação e da lubrificação, condições de grande importância para uma relação sexual confortável e prazerosa. O estrogênio tem ação trófica na parede vaginal e modula a expressão e a ação do fator de crescimento vascular envolvido na fisiologia da angiogênese (COUVINEAU et al., 2003), bem como as ações endócrinas do VIP em vários órgãos.

A modulação do VIP pelos estrogênios no Sistema Nervoso Central e no Intestino e seu efeito dependente do tecido alvo já estão bem estabelecidos. No entanto, existem controvérsias sobre a expressão desse neuropeptídeo na parede vaginal e, ainda não existem dados sobre a relação entre a condição estrogênica e a expressão do VIP na vagina.

Estas informações poderão dar continuidade ao entendimento da fisiologia sexual feminina especialmente nas fases da excitação e do orgasmo. Além disto, a ulterior evolução destes conhecimentos poderá contribuir com o desenvolvimento da temática e apontar novos caminhos na investigação e no tratamento das disfunções sexuais femininas.

3. OBJETIVOS

3.1 Primário

Avaliar a relação do *status* estrogênico e a distribuição e expressão do VIP na parede vaginal.

3.2 Secundário

3.2.1. Correlacionar a função sexual com a expressão do VIP em mulheres normo e hipoestrogênicas.

3.2.2. Correlacionar a expressão do VIP na parede vaginal com:

3.2.2.1. as concentrações do estradiol plasmático

3.2.2.2. o escore dos receptores estrogênicos na parede vaginal

3.2.2.3. a idade

3.2.2.4. com o número de vasos da parede vaginal

3.2.3. Verificar se há correlação entre o número de vasos na lamina própria da parede vaginal e o estado estrogênico da paciente.

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo e aspectos éticos

Trata-se de um estudo de corte transversal onde foram incluídas pacientes normo e hipoestrogênicas, submetidas a colpoperineoplastia anterior e posterior por defeitos do compartimento anterior e posterior da parede vaginal. Após avaliação clínica e laboratorial, foi aplicado um questionário que avalia a função sexual individualmente e colhida amostra de sangue para dosagem de estradiol, glicemia, prolactina, TSH, FSH. Durante a cirurgia, foi colhido o tecido da parede vaginal que foi analisado quanto à expressão de receptores estrogênicos e VIP e também, quanto à morfometria de vasos. Para a realização da morfometria, utilizou-se um marcador de endotélio já consagrado na literatura, sendo este o CD34+.

O presente estudo teve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina-USP de Ribeirão Preto (435/2007) e pelo Comitê de ética da Santa Casa de Misericórdia de Piumhi, MG. As pacientes incluídas no estudo assinaram o termo de consentimento livre e informado (Anexo 1).

4.2 Características da amostra

As mulheres eleitas para participar deste estudo foram aquelas submetidas à cirurgia de colpoperineoplastia anterior e posterior pela técnica de plicatura, no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP) e na Santa Casa de Misericórdia de Piumhi, MG (SCMPMG), no período de 07 de julho a 30 de setembro de 2007. Todas eram portadoras de defeitos anatômicos do compartimento anterior e posterior da parede vaginal.

4.2.1 Critérios de inclusão

As pacientes foram divididas em 2 grupos: grupo pré-menopausa (GP) e grupo menopausa (GM). Os critérios de elegibilidade foram diferentes para cada grupo.

4.2.1.1 Grupo pré-menopausa

Composto por mulheres com as seguintes características:

- idade entre 20 e 40 anos
- FSH menor ou igual a 12 mIU/ml colhido entre o segundo e quarto dias do ciclo para definir reserva ovariana.
- ciclos menstruais presentes e regulares
- Indicação de colpoperineoplastia anterior e posterior por prolapso no máximo de grau II

4.2.1.2 Grupo menopausa

Composto por mulheres com as seguintes características:

- idade menor do que 65 anos
- mulheres com menopausa fisiológica e instalada há pelo menos um ano
- FSH maior ou igual a 40mIU/ml e indicação de colpoperineoplastia anterior e posterior devido a defeito do compartimento anterior e posterior da vagina (prolapso genital de grau II no máximo)

4.2.2 Critérios de exclusão

Foram excluídas as pacientes:

- em uso de terapia hormonal independente da via, atual ou prévio até há um ano
- último parto a menos de um ano
- em uso de antidepressivos
- portadoras de algia pélvica crônica
- de doença psiquiátrica
- com sintomas de neuropatia
- portadoras de Diabetes Mellitus
- com menopausa precoce
- portadoras de hiperprolactinemia e tireoidopatias.
- com hiperandrogenismo clínico
- com neoplasias ginecológicas
- portadoras de quaisquer patologias que pudessem, potencialmente, interferir na integridade da genitália.

Trinta e cinco pacientes elegíveis para o estudo se submeteram a cirurgia durante o período proposto. Destas, 5 foram excluídas: 1 desistiu de participar do estudo, 1 era portadora do vírus HIV, 1 estava em uso de anticoncepcional hormonal, 2 amostras foram excluídas por fixação inadequada do material (Figura 2).

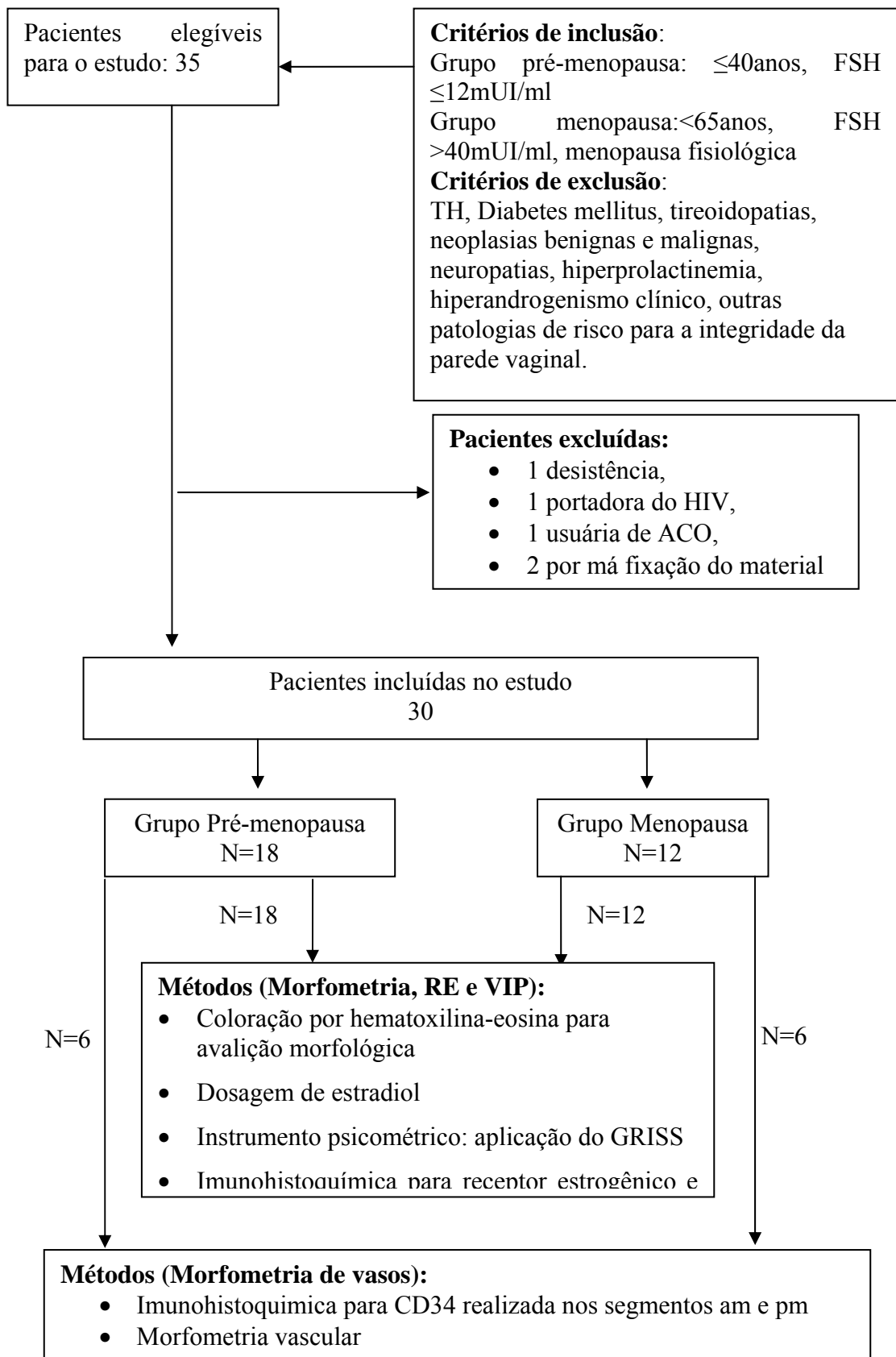


Figura 2: Diagrama amostral

4.3 Métodos

4.3.1 Avaliação no momento da inclusão no estudo

Todas as pacientes foram submetidas à consulta ginecológica de rotina durante a qual se realizou a coleta de citologia cervico-vaginal. O prolapso genital foi classificado segundo o *Baden-Walker halfway scoring system* (BADEN e WALKER, 1972) sendo considerado grau I quando o ponto mais distal do prolapso está 1 cm acima do hímen (-1cm) e grau II quando a porção mais distal do prolapso esta situada entre 1 cm acima e 1 cm abaixo do hímen (-1cm a +1cm). As pacientes cujos esfregaços apresentaram infecção foram tratadas previamente à cirurgia. Foi realizada a coleta de sangue para dosagem do FSH para definir reserva ovariana, do estradiol, do TSH, da prolactina e da glicemia e exames de rotina pré-operatória: hemograma e urina rotina, além de eletrocardiograma e radiografia de tórax para pacientes com mais de 60 anos. A amostra sanguínea foi coletada após jejum de 12h. No período pré-operatório, a função sexual de todas as pacientes foi acessada através do questionário GRISS (*Golombok Rust inventory of sexual satisfaction*) (GOLOMBOK S., 1983), um instrumento validado para o português (DIELH A, 2004) composto por 28 questões que avalia seis domínios da função sexual: a infrequência de relações sexuais, não comunicação sexual, insatisfação sexual feminina, evitação sexual feminina, falta de expressão da sensualidade feminina, vaginismo/dispareunia (TER KUILE et al., 2010) e anorgasmia. Todas as pacientes responderam somente ao domínio 6 que foi utilizado para avaliar a presença de dor coital. Este domínio consta das questões 6, 11, 17 e 24 (Anexo 3) que, em conjunto, dão um escore de até 9 com um *cut-off* de 5, acima do qual fica caracterizada a presença de dor no coito. De todas as pacientes foram enviadas amostras de sangue ao laboratório de endocrinologia e amostras de material tecidual para o laboratório de patologia do HC/FMRP.

4.3.2 Intra-operatório

4.3.2.1 Técnica

O procedimento cirúrgico foi realizado sem intercorrências por um mesmo cirurgião e o pós-operatório evoluiu sem complicações para todas as pacientes. Foi empregada a técnica cirúrgica da plicatura que envolve: abertura da mucosa vaginal posterior em T invertido até o colo uterino, dissecação roma e cortante da fásia retovaginal, plicatura com pontos separados na fásia retovaginal com categut 1-0 cromado, retirada do excesso de mucosa vaginal e sutura até transição cutâneo-mucosa, sutura da pele. Abertura em T invertido na mucosa vaginal anterior desde o colo uterino, dissecação roma e cortante da fásia vesicovaginal, plicatura com pontos em U na fásia vesicovaginal com categut 1-0 cromado, retirada do excesso da mucosa vaginal e sutura com categut 2-0 cromado. A coleta das amostras foi padronizada usando como referencia a linha média da parede anterior estendendo-se do limite adjacente a cérvix uterina até 5 mm do orifício uretral e o espécime posterior foi colhido, também, na linha média desde a carúncula himenal até 5 mm da ectocervix. O vértice do espécime anterior foi marcado por um ponto com fio absorvível categut cromado 1-0. As amostras obtidas apresentaram forma triangular conforme o esquema mostrado na Figura 3.

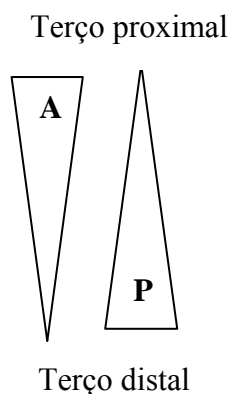


Figura 3. Esquema dos fragmentos cirúrgicos da parede vaginal. (A) Fragmento da parede vaginal anterior, (P) Fragmento da parede posterior.

4.3.2.2 Processamento da amostra

Os espécimes foram lavados em soro fisiológico, divididos, transversalmente, em três fragmentos correspondentes aos segmentos anterior distal (aa), anterior médio (am) e anterior proximal (ap) para a parede anterior e os fragmentos da parede posterior, em posterior distal (pa), posterior médio (pm) e posterior proximal (pp). Em seguida foram imersos em solução de formaldeído a 10% em frascos separados por um tempo mínimo de 24 horas até o início do processamento. Depois de submetidos à rotina histológica foram incluídos em parafina e confeccionados os blocos. Destes, foram realizados cortes consecutivos de 4 µm de espessura, seccionados em um microtomo rotativo que foram montados em lâminas identificadas com o número da paciente e as letras aa, am, ap para os cortes da parede anterior e com as letras pa, pm e pp para os cortes da parede posterior. Em seguida foram submetidos à técnica apropriada para a coloração em hematoxilina-eosina (HE) para análise morfológica e para imunohistoquímica para o receptor estrogênico alfa, para o VIP e para o CD34. Este último, como marcador de endotélio para fins de morfometria vascular. Por ser este um procedimento laborioso que requer o trabalho de equipe multidisciplinar, a morfometria foi realizada em um grupo de 12 pacientes sendo 6, do grupo pré-menopausa e 6, do grupo menopausa.

4.3.2.3 Análise morfológica

Foram analisados seis cortes de tecido da parede vaginal de cada paciente, sendo três correspondentes a parede anterior e três a parede posterior. Estes cortes foram corados pela técnica de HE para avaliação da morfologia da parede vaginal em ambos os grupos, com finalidade exclusiva de identificação das camadas da parede vaginal e de seus componentes (epitélio, lâmina própria e camada muscular).

4.3.2.4 Análise Imunohistoquímica

4.3.2.4.1 Análise da expressão do VIP

Foi realizada por técnica de imunohistoquímica (IHQ) utilizando o kit anticorpo *rabbit polyclonal antibody NCL-VIPp* do Novocastra Labs UK, em uma diluição de 1:200 (recomendado: entre 1:100-1:200), armazenado a uma temperatura de 4°C. A parede do intestino delgado foi utilizada como controle positivo. A técnica utilizada foi realizada de acordo com as instruções do fornecedor. O padrão de marcação é citoplasmático em células da musculatura lisa vascular e não vascular que se coram em marrom claro, marrom intermediário e marrom intenso. O escore de marcação vascular foi obtido através do método semi-quantitativo no qual o escore 0, significa ausência de marcação; +, esparsos vasos marcados em marrom claro; ++, concentração intermediária de vasos marcados por marrom intermediário; +++, grande concentração (rede) de vasos marcados por marrom escuro (ZHU et al., 2009). A análise do VIP foi realizada em amostras da parede vaginal correspondentes ao terço distal, médio e proximal. A presença do VIP foi identificada ao percorrer integralmente cada corte de cada segmento da parede vaginal com a objetiva de um microscópio ótico em aumento de 20x. As áreas marcadas foram identificadas e analisadas com aumento de 40x.

4.3.2.4.2 Análise da expressão do receptor estrogênico

Para a imunohistoquímica do receptor estrogênico utilizou-se o kit método ABC Universal Novocastra Labs UK com técnica padronizada pelo Laboratório de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, descrita a seguir:

aquecimento em 10 minutos em xilol, desparafinização das lâminas que são então mergulhadas durante 10 minutos em xilol, 10 minutos em álcool absoluto e 30 minutos nos outros álcoois. Depois as amostras foram submetidas a lavagem em H₂O corrente, lavagem em H₂O destilada e recuperação antigênica em tampão Tris EDTA pH9 durante vinte minutos de fervura em forno de microondas. Deixou-se esfriar 10 minutos em temperatura ambiente, e depois em H₂O corrente. Lavou-se em H₂O destilada e em PBS pH 7,4. As Lâminas foram então circuladas com caneta hidrofóbica e a peroxidase endógena bloqueada por 10 minutos. A seguir procedeu-se a lavagem em PBS pH 7,4 por 2 vezes durante 5 minutos e depois em TBST por 5 minutos. Incubou-se as lâminas com o anticorpo primário por 2 horas, seguido de lavagem em TBST 3 vezes por 3 minutos. Incubou-se no Post primário (kit Novolink Polymer-Novocastra) 30 minutos, com lavagem em TBST 3 vezes por 3 minutos. Incubou-se no polímero (kit Novolink Polymer-Novocastra) por 30 minutos, depois lavou-se em TBST 3 vezes por 3 minutos, tris-Hcl pH 7,6 duas vezes por 3 minutos e DAB por 5 a 12 minutos (~ 6 minutos). Também foi realizada a lavagem em Tris-Hcl pH 7,6 duas vezes por 3 minutos e em H₂O destilada. Finalmente o material foi contracorado com Hematoxilina por 10 a 20 (~ 15 minutos) minutos, lavado em H₂O corrente, azulado em H₂O amoniacal, lavado em H₂O destilada, desidratado e diafanizado.

Dois observadores (A.R.S. e L.A.S.L.) realizaram a leitura cega da imunohistoquímica para RE, utilizando uma objetiva de 40x. A intensidade e distribuição do receptor estrogênico α na parede vaginal foram avaliadas semi-quantitativamente adotando o H-escore com pontuação máxima de 8 conforme dados evidenciados no quadro 2 (HARVEY et al., 1999). Cada segmento foi avaliado integralmente e, em cada região marcada, 100 células foram contadas e estabeleceu-se a porcentagem de células com marcação nuclear para o receptor estrogênico (Quadro 1).

Quadro 1: H-score para receptor estrogênico (HARVEY et al., 1999)

	Score/100 células	RE/positivo
Receptor Estrogênico	0	Nenhuma
	1	1/100
	2	1/100 a 1/10
	3	1/10 a 1/3
	4	1/3 a 2/3
	5	> 2/3
	Score	RE/intensidade
Marcação Imunohistoquímica	0	Nenhuma
	1	Fraco
	2	Intermediário
	3	Forte

4.3.2.4.3 Imunohistoquímica para marcação dos vasos pelo CD34

Doze mulheres foram eleitas para a morfometria vascular sendo que 6 formaram o GP e 6 formaram o GM. Para identificação dos vasos sanguíneos utilizou-se a técnica de imunohistoquímica para CD34 descrita a seguir: desparafinização das lâminas contendo os segmentos e imersão dos mesmos durante 10 minutos em xilol. Imersão em álcool absoluto 1 minuto e 30 minutos nos outros alcoóis. Lavar em água corrente e a seguir em água destilada. Recuperação antigênica em tampão tris EDTA tampão ph 9, 20 minutos de fervura em forno de microondas, deixar esfriar 10 minutos em temperatura ambiente e depois em água corrente. Lavar em água destilada. Lavar em PBS ph 7,4 e circular as lâminas com a caneta hidrofóbica (Pan Pen). Bloquear a peroxidase endógena por 10 minutos. Lavar em PBS ph 7,4, 2 vezes durante 5 minutos. Lavar em TBST por 5 minutos. Bloqueio da proteína 5 a 10 minutos (BSA 2% em PBS ph 7,4 com turin 20 a 0,05%). Lavar com TBST por 3 minutos. Incubar no anticorpo primário por 2 horas, lavar em TBST, 3 vezes durante 3 minutos. Incubar no Post primary (Kit Novalink) por 30 minutos. Lavar em TBST 3 vezes por 3 minutos. Incubar no polímero (Kit Novalink) por 30 minutos. Lavar em TBST 3 vezes por 3 minutos. Lavar em

tris HCL ph 7,6 por duas vezes durante 3 minutos. Lavar em água destilada. Contracorar com Hematoxilina 20 a 30 segundos. Lavar em água corrente e azular em água amoniacal e lavar em água destilada.

A marcação pelo CD34 foi identificada pela coloração endotelial na cor marrom e a contagem vascular foi realizada na lâmina própria. Os vasos marcados foram contados utilizando o sistema para morfometria do fragmento (OBERHOLZER et al., 1996) constituído de uma câmera análogo-digital modelo JVC TK1270, acoplada a um microscópio de luz Axiophot. As imagens são captadas através de uma placa de captura de vídeo FG1 da Karl Zeiss acoplada a um computador padrão IBM-PC. Utilizando o software de processamento de imagens Kontron, construiu-se uma macro (série de comandos) que, utilizando uma objetiva de 2,5X em conjunto com optovar de 1,6X permite uma visualização ampla do fragmento, facilitando a identificação da área de interesse (Figura 4, A). Sobre esta área o usuário, utilizando uma máscara retangular, marca a área de interesse e a posiciona dentro do fragmento. Com esta área demarcada, o software desloca a lâmina do fragmento de forma que a objetiva fique sobre o canto superior esquerdo desta marcação e a partir deste ponto passa a captar campos sequenciais com objetiva de 20X e optovar de 1,6X que serão armazenados para posterior processamento. Estes campos, mais ampliados, proporcionam uma melhor visualização dos vasos existentes. O processamento dos campos de cada fragmento é realizado por outra macro que permite que o usuário marque manualmente os vasos (Figura 4, B). Como a área de cada campo é fixa e seu valor é de 112802 μm^2 , calcula-se a densidade de vasos através da fórmula: $D = (\text{n}^\circ \text{ vasos} / (\text{n}^\circ \text{ campos} \times 112802) - \text{área eliminada}) * 1000000$. A área eliminada é obtida pelo usuário durante o processamento de cada campo, caso exista a necessidade de eliminar alguma área que não faça parte do fragmento analisado.

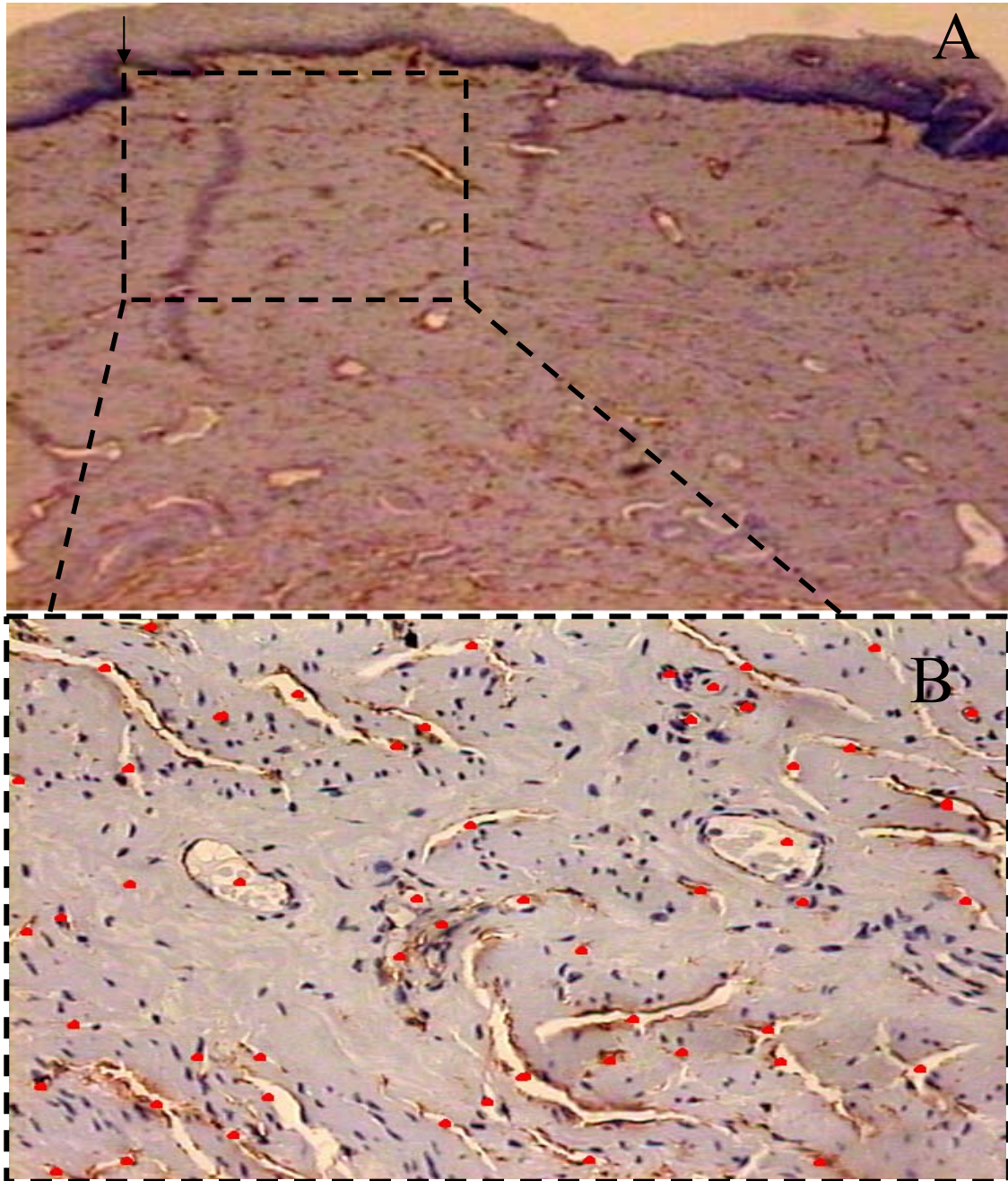


Figura 4: Sequência da macro para a contagem dos vasos: (A) marcação da área a ser analisada em preto. (B) Marcação manual dos vasos e contagem automática em vermelho

4.4 Análise estatística

Todos os dados foram armazenados em um banco de dados do Microsoft Excel 2003 (Microsoft, Redmond, WA) e, subseqüentemente, utilizou-se o GraphPad Prisma 5.00 (Software de GraphPad, San Diego, CA) para análise estatística e representação gráfica. Os dados foram demonstrados em médias e desvio padrão. Quando tiveram distribuição normal (determinado pelo Kolmogorov-Smirnov test), as comparações entre grupos, para as variáveis: antropométricas, valores de estradiol, FSH e numero de vasos, com distribuição normal, foram realizadas utilizando-se o teste bicaudal t de Student. Os testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney U test foram aplicados para os dados não paramétricos. Para as correlações utilizou-se Pearson's e Spearman's test. O nível de significância foi estabelecido em menor do que 0.05 ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização da amostra

Na análise objetiva dos dados evidenciou-se diferença estatística significativa entre os dois grupos em relação a idade, as concentrações séricas do FSH e do estradiol. Não houve diferença significativa entre os grupos na comparação do índice de massa corporal (IMC) (tabela 1).

Tabela 1: Características da amostra

	GP N=18	GM N=12	<i>p</i>
Idade (anos)	35,67± 4,29	53,54 ± 5,36	<0,0001
IMC (kg/m ²)	20,04± 3,65	21,32± 2,36	0,32
Paridade	2,8± 0,81	4,4± 1,66	0,0001
FSH (mUI/ml)	6,69± 3,30	75,57± 30,71	<0,0001
Estradiol (pg/ml)	57,21± 42,66	31,28± 12,01	0,008

Legenda: (GP) grupo pré-menopausa, (GM) grupo menopausa, (IMC) índice de massa corporal, (FSH) hormônio folículo estimulante. Student's t test e Mann-Whitney test.

5.2 Descrição morfológica

Foram observadas diferenças histológicas marcantes na parede vaginal das mulheres do GP quando comparado ao GM (Tabela 2).

Tabela 2: Características morfológicas da parede vaginal na pré e pós-menopausa

Características morfológicas da parede vaginal	GP	GM
Número de camadas epiteliais	23-28	19-25
Características do epitélio	Estratificado, com células vacuolizadas, com maior eixo horizontal	Estratificado, ausência de células vacuolizadas, maior eixo verticalizado.
Papilas epiteliais	Frequentes	Rarefeitas
Tecido conjuntivo	Coloração rósea pelo HE Aparenta ser frouxo. Não apresenta áreas de descolamentos de estruturas ao corte.	Coloração vermelha pelo HE. Aparenta rigidez. Apresenta áreas de descolamentos de estruturas ao corte
Vasos na lamina própria	Numerosos	Numero muito reduzido
Nervos	Vários núcleos, superfície regular	Poucos núcleos, superfície rugosa
Camada muscular	Feixes celulares densos e camada aparentemente mais espessa	Feixes celulares menos densos e camada muscular aparentemente mais delgada

Legenda: (GP) grupo pré-menopausa e (GM) grupo menopausa.

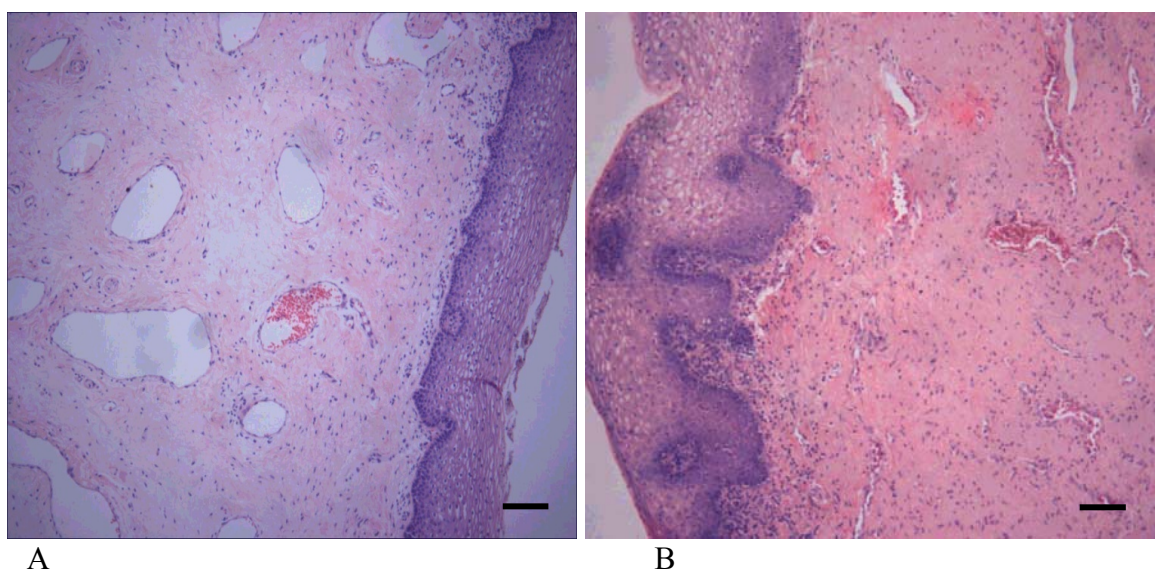


Figura 5: Aspecto morfológico da lâmina própria da parede vaginal de mulher na pré (A) e pós-menopausa (B). A barra de escala = 50µm

Nas figuras 5A e 5B nota-se a diferença na densidade vascular entre os dois tecidos.

5.3 Expressão do VIP na parede vaginal

A marcação para o VIP foi analisada em toda a extensão do corte, sendo nas fibras musculares lisas da parede vascular de vasos arteriais e da camada muscular, cuja intensidade variou de fraca e esparsa até marcação forte e acentuada (Figura 6).

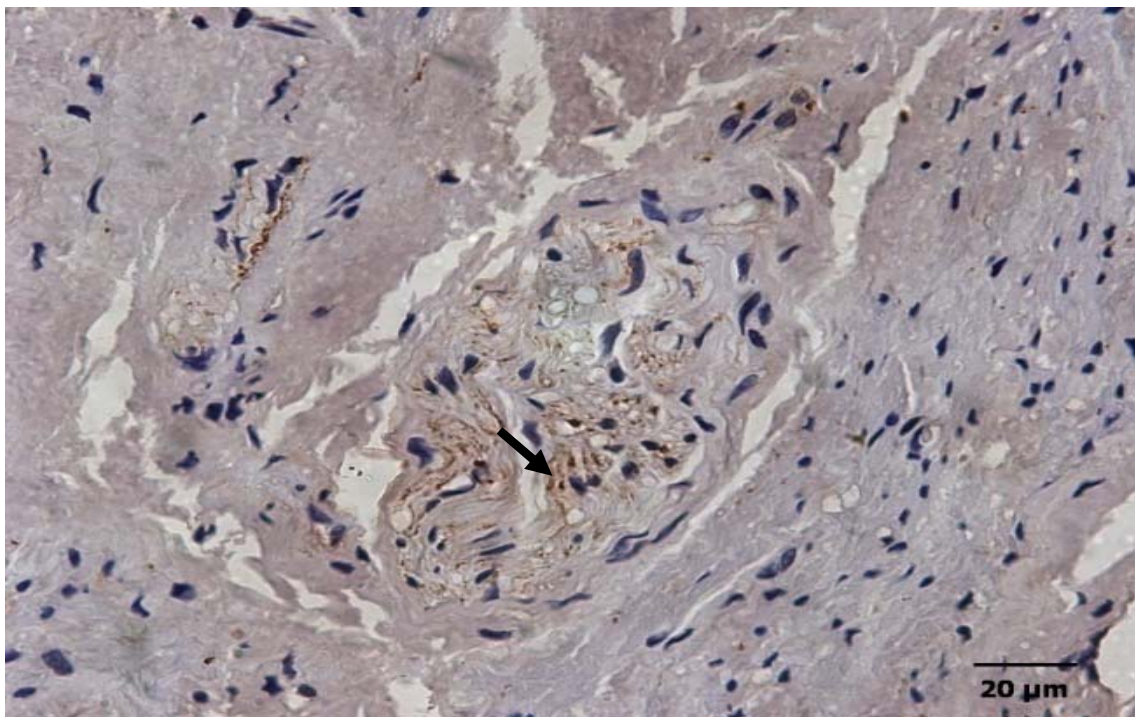


Figura 6: Imunohistoquímica para o VIP mostrando marcação na fibra muscular lisa da parede de um vaso em marrom (seta)

Quando comparada a expressão do VIP nos três segmentos (aa, am, ap) da parede vaginal anterior com os três segmentos (pa, pm, pp) da parede vaginal posterior do mesmo grupo, não houve diferença significativa. Parede anterior; aa: $2,0 \pm 0,87$, am: $2,0 \pm 0,87$ e ap: $2,0 \pm 0,87$, $p=0,85$. Parede posterior; pa: $2,2 \pm 0,81$, pm: $2,2 \pm 0,81$ e pp: $2,2 \pm 0,81$, $P=0,99$, (Figura 7).

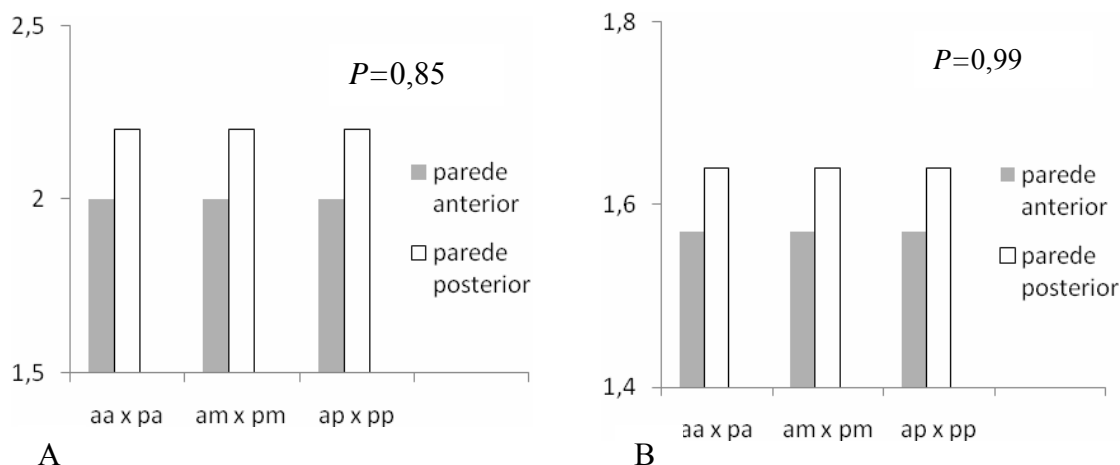


Figura 7: Comparação entre os 3 segmentos da parede anterior com os três segmentos da parede posterior da vagina quanto a expressão do VIP nos grupos pré-menopausa (A) e pós-menopausa (B). Segmento anterior distal (aa), anterior médio (am) e anterior proximal (ap) e, segmento posterior distal (pa), posterior médio (pm) e posterior proximal (pp). Kruskal-Wallis H test

Uma vez que não houve diferença entre os 3 segmentos da parede vaginal analisados quanto a expressão do VIP, optamos por analisar o segmento médio (am e pm) para as comparações e correlações.

Na comparação intergrupo, a expressão do VIP na parede vaginal posterior foi significativamente maior no GP quando comparado ao GM (GP $2,22 \pm 0,81$ e GM $1,50 \pm 0,80$, $p=0,02$), enquanto que esta diferença não foi encontrada na parede vaginal anterior (GP $2,00 \pm 0,86$ e GM $1,50 \pm 0,79$, $p=0,1$) (Figura 8).

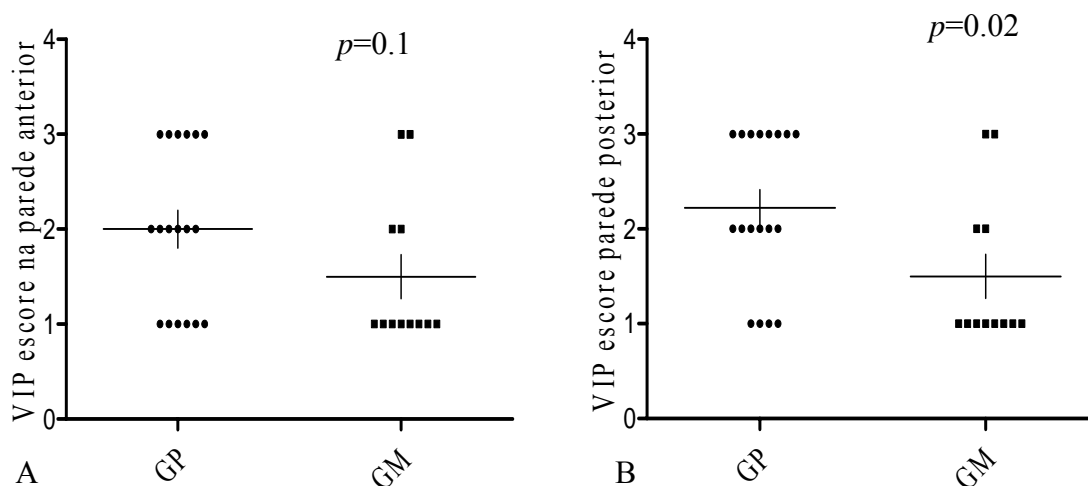


Figura 8: Comparação do escore do VIP na parede vaginal entre os grupos pré (GP) e pós-menopausa (GM) na parede vaginal anterior (A) e posterior (B). Mann-Whitney U test

5.4 Imunohistoquímica para o receptor estrogênico alfa.

A marcação para o receptor estrogênico alfa foi aferida ao percorrer integralmente todo o corte histológico sendo que, sua presença foi identificada no núcleo das células epiteliais e dos fibroblastos das demais camadas que foram corados em cor marrom com intensidade variável (Figura 9).

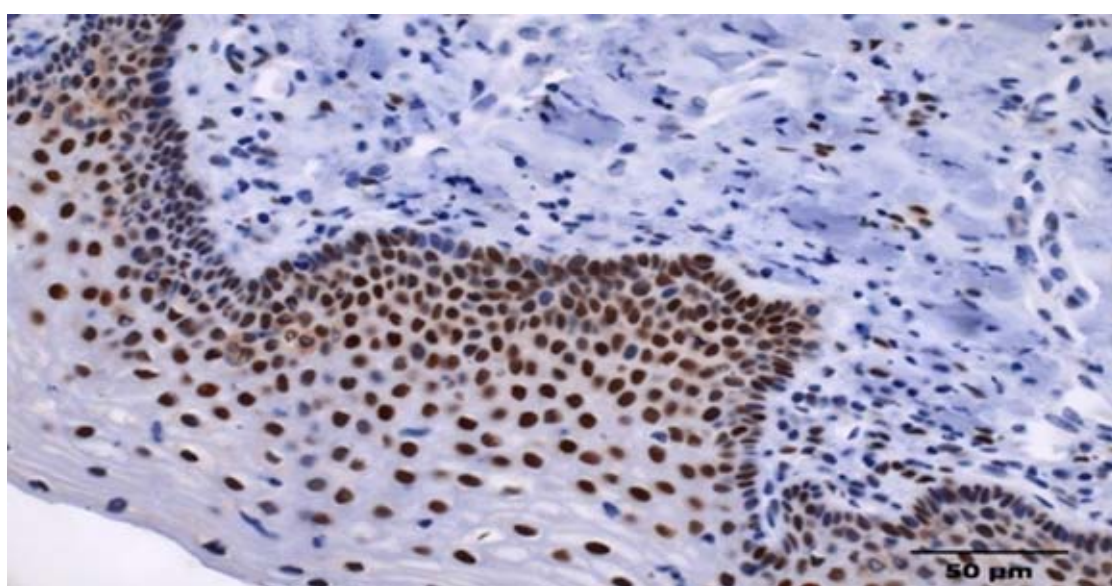


Figura 9: Imunohistoquímica para o receptor estrogênico alfa evidencia marcação nuclear de em marrom (seta)

Quanto a expressão do receptor estrogênico alfa nas comparações intra-grupo, não houve diferença na expressão deste receptor entre as camadas da mesma parede (epitélio, lâmina própria e muscular) (Tabela 3) e nem entre as paredes anterior e posterior (Tabela 4), em ambos os grupos.

Tabela 3: Comparação da expressão do receptor estrogênico alfa entre as 3 camadas (epitélio, lâmina própria e muscular) da parede vaginal anterior e posterior em cada grupo

RE alfa escore	Parede anterior (média±DP)			<i>p</i>	Parede posterior (média±DP)			<i>p</i>
	E	LP	M		E	LP	M	
GP	5,4±2,5	4,1±2,3	3,6±2,2	0,06	5,5±2,6	4,1±2,4	3,6±2,3	0,07
GM	2,2±2,5	1,8±2,1	0,8±1,6	0,30	2,2±2,5	1,8±2,3	1,4±1,8	0,70

Legenda: (RE) receptor estrogênico, (GP) grupo pré-menopausa, (GM) grupo menopausa, (E) epitélio, (LP) lamina propria, (M) camada muscular. Kruskal-Wallis test.

Tabela 4: Comparação da parede vaginal anterior com a posterior no mesmo grupo quanto a expressão do receptor estrogênico

RE alfa escore	GP N(18)		<i>p</i>	GM N(12)		<i>p</i>
	Parede anterior (média±DP)	Parede posterior (média±DP)		Parede anterior (média±DP)	Parede posterior (média±DP)	
E	5,4±2,5	5,5±2,6	1,00	2,2±2,5	2,3±2,5	0,93
LP	4,1±2,3	4,0±2,4	0,87	1,8±2,1	1,8±2,3	1,00
M	3,6±2,2	3,4±2,3	0,92	0,8±1,6	1,4±1,8	0,47

Legenda: (RE) receptor estrogênico, (GP) grupo menarca, (GM) grupo menopausa, (E) epitélio, (LP) lamina propria, (M) camada muscular. Mann-Whitney test.

Já na comparação entre os grupos foi detectada uma diferença significativa no escore do receptor estrogênico quando comparadas as três camadas da parede vaginal tanto na parede anterior quanto na posterior (Figura 10).

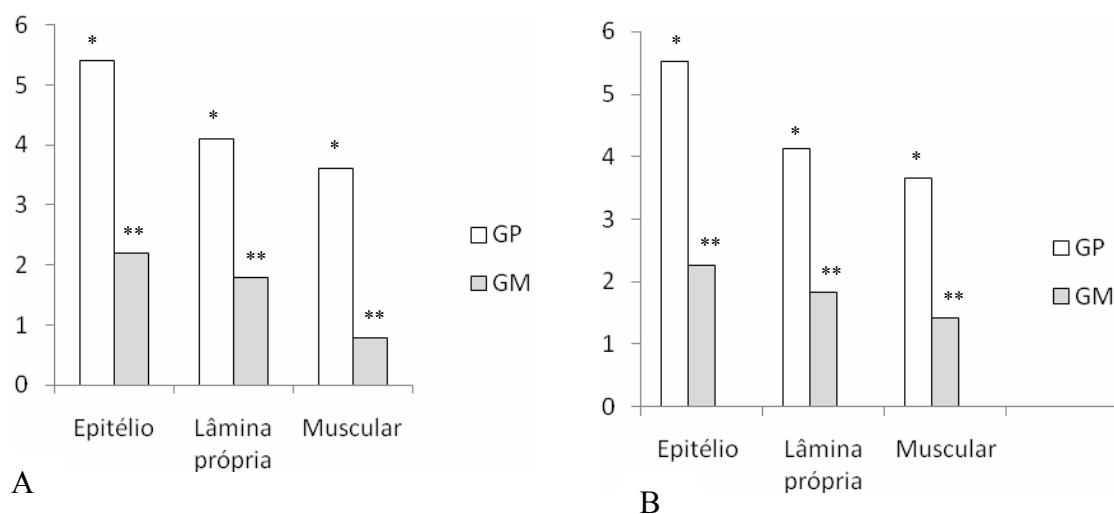


Figura 10: Compara o da expressão do escore do receptor estrogênico alfa nas camadas epitélio, lamina própria e muscular do grupo pré-menopausa (GP) com as camadas da parede vaginal correspondentes do grupo menopausa (GM). (A) parede anterior e (B) parede vaginal posterior. Kruskal-Wallis H test. Sendo * \neq ** \neq , $p < 0,0001$ e $p = 0,0002$ respectivamente

5.5 Análise do GRISS

As pacientes com atividade sexual (23 ao todo), não evidenciaram diferença significativa no escore de dor do GRISS quando comparados os dois grupos (GP $3,69 \pm 1,95$ e GM $3,14 \pm 1,77$, $p = 0,53$), (Figura 11).

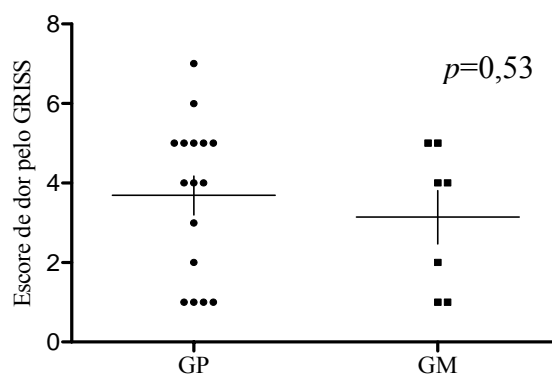
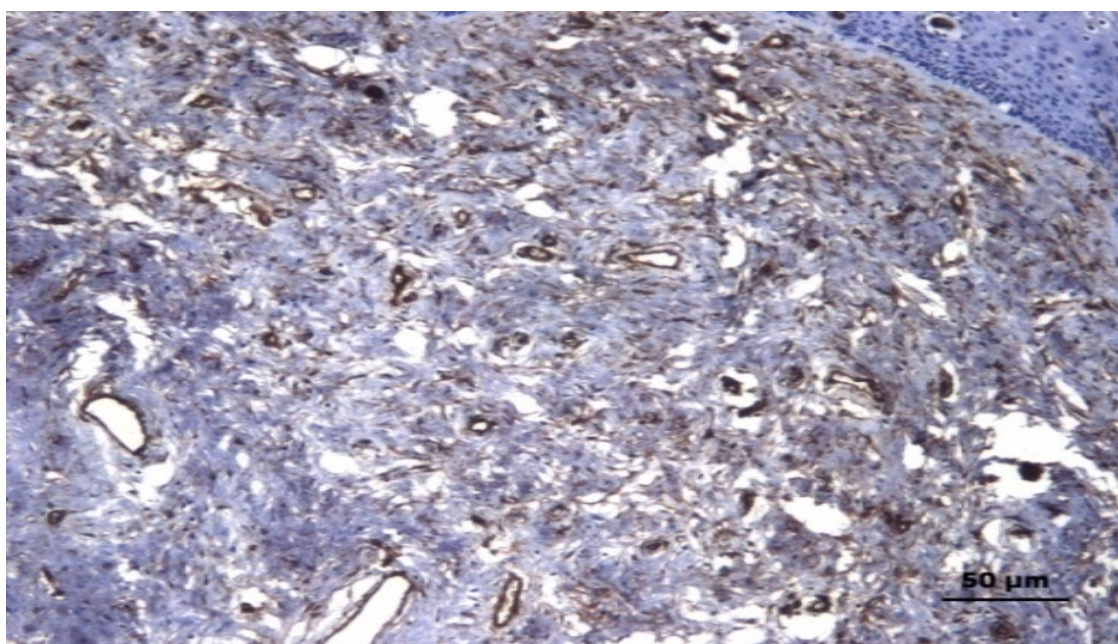


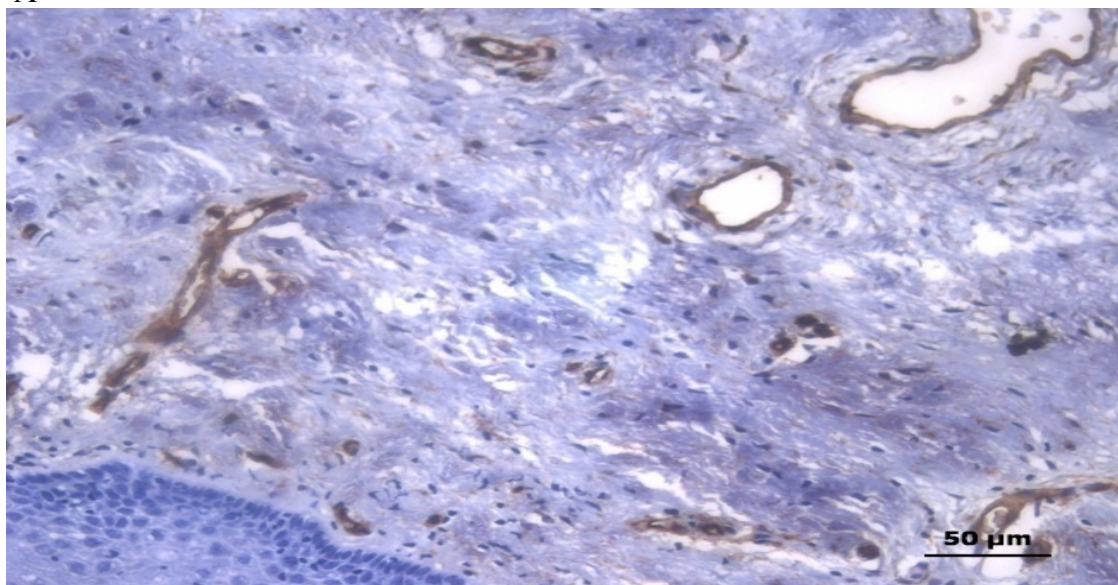
Figura 11: Compara o do escore de dor (GRISS) entre o grupo pré (GP) e pós-menopausa (GM). Mann-Whitney U test

5.6 Morfometria Vascular

A análise imunohistoquímica para o CD34 evidenciou marcação dos vasos da lâmina própria nos dois grupos. De forma qualitativa, observou-se que esta camada é ricamente vascularizada nas mulheres na pré menopausa (Figura 12, A) enquanto que no grupo menopausa, a rede vascular é esparsa (Figura 12, B).



A



B

Figura 12: Microfotografia evidenciando o aspecto da rede vascular da lâmina própria da parede vaginal de mulheres na pré-menopausa (A) e pós- menopausa (B). Imunohistoquímica para vasos marcados em marrom pelo CD34

Na comparação entre as concentrações dos vasos da lâmina própria entre os dois grupos, observou-se diferença significativa, sendo que o GP apresentou concentração vascular significativamente maior do que o GM (parede anterior GP: $1.055 \pm 145,8$ vasos/ μm^2 e GM: $346,6 \pm 209,9$ vasos/ μm^2 , $p < 0,0001$; parede posterior GP: $1064 \pm 303,3$ vasos/ μm^2 e GM: $348,6 \pm 167,3$ vasos/ μm^2 , $p = 0,0005$), (Figura 13 A e B).

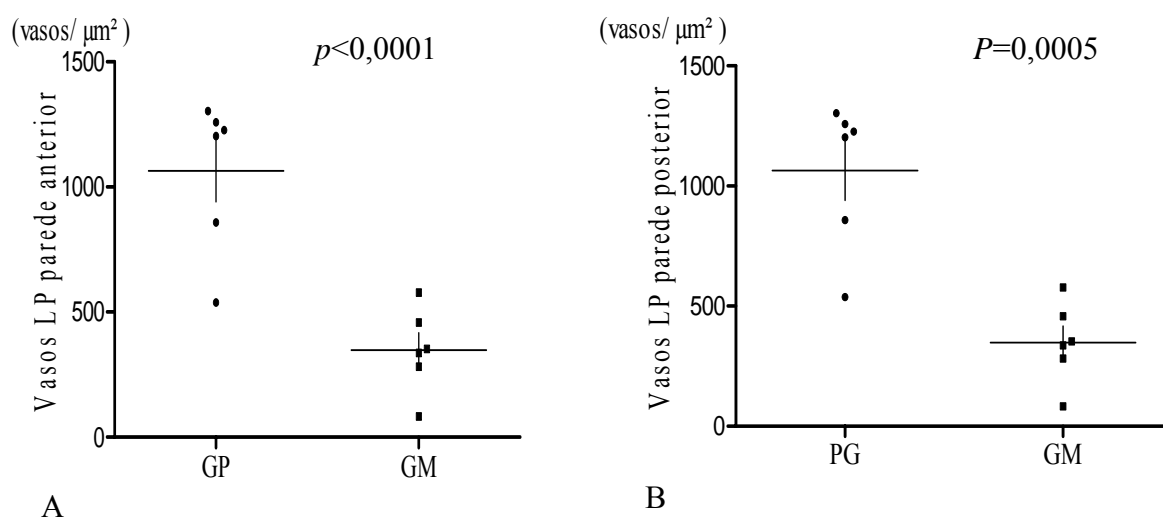


Figura 13: Comparação entre os grupos pré-menopausa (GP) e pós-menopausa (GM) da concentração de vasos na lâmina própria da parede anterior (A) e posterior (B). Lâmina própria (LP). Student's t test

5.7 Correlações

Não houve correlação entre o escore do VIP e as dosagens de estradiol (IC 95% -0.24 a 0.51, $r = 0,16$, $p = 0,42$), (Figura 14 A), nem com o escore do receptor estrogênico alfa no epitélio (IC 95%, -0.13 a 0.56, $r = 0,24$, $p = 0,18$), na lâmina própria (IC 95%, -0.22 a 0.50, $r = 0,16$, $p = 0,39$) e na muscular (IC 95%, -0.25 a 0.47, $r = 0,12$, $p = 0,51$) (Figura 14 B). Também não houve correlação do VIP com o escore de dor (IC 95%, -0.65 a 0.11, $r = -0,31$, $p = 0,13$), (Figura 14 C).

Não houve correlação entre o escore do receptor estrogênico alfa com o escore de dor (IC 95%, -0.49 a 0.34, $r=-0,09$, $p=0,68$), (Figura 15 A). Não houve correlação entre as concentrações estrogênicas e o escore do receptor estrogênico alfa (IC 95%, -0.36 a 0.41, $r=0,02$, $p=0,89$) (Figura 15 B).

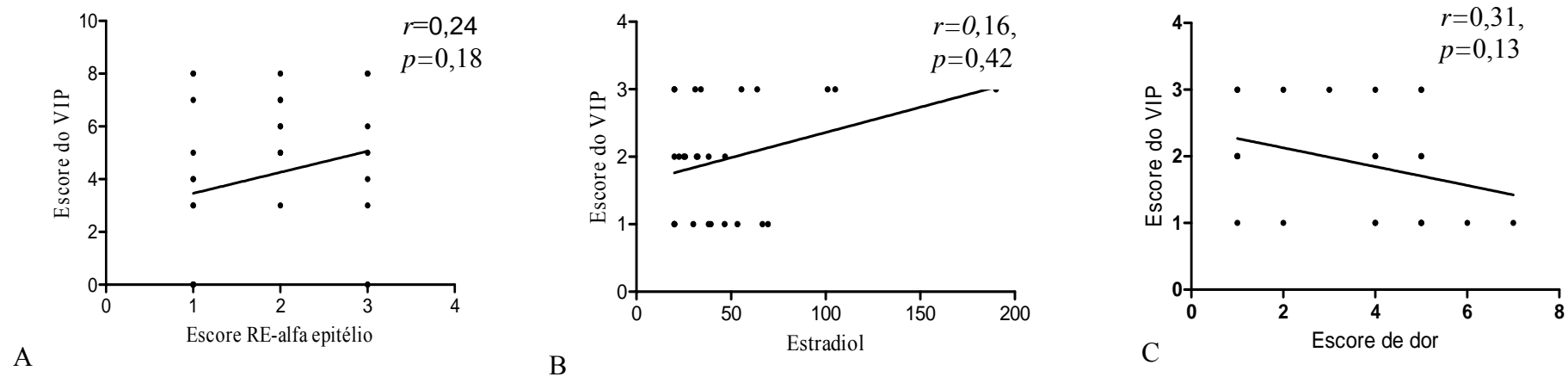


Figura 14: Correlações entre: o escore do VIP e o escore do receptor estrogênio (A), o escore do VIP e as concentrações de estradiol (B) e o escore do VIP com o escore de dor (C). (RE) receptor estrogênio alfa. Spearman's test

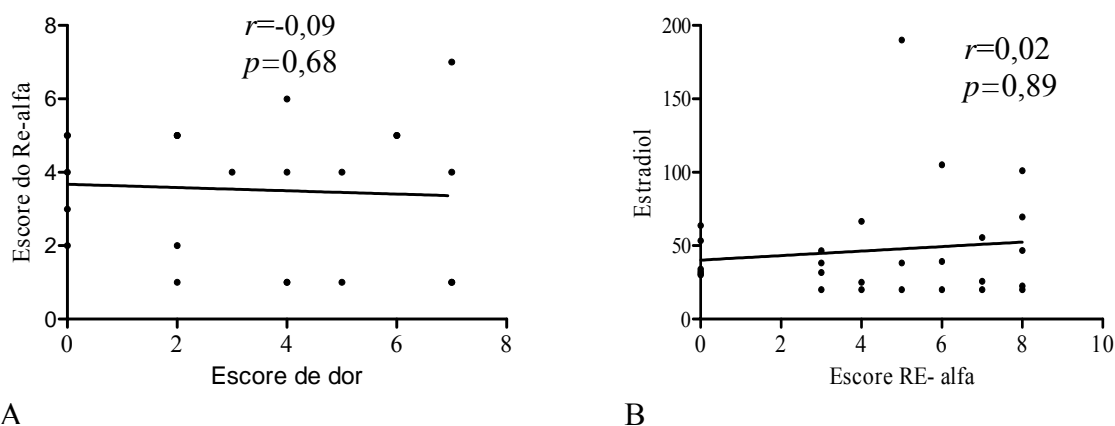


Figura 15: Correlações entre o escore do receptor estrogênio alfa e o escore de dor (A) e entre o estradiol e o escore do receptor estrogênico alfa (B). (RE) receptor estrogênio alfa. Spearman's test

Entretanto, tanto o VIP quanto os receptores estrogênicos se correlacionaram negativamente com a idade (escore do VIP: IC 95% -0.67 a -0.042, $r = -0,41$, $p = 0,02$; receptores estrogênicos: IC 95% -0.65 a -0.00, $r = -0.37$, $p = 0,04$) (Figuras 16 A e 16 B).

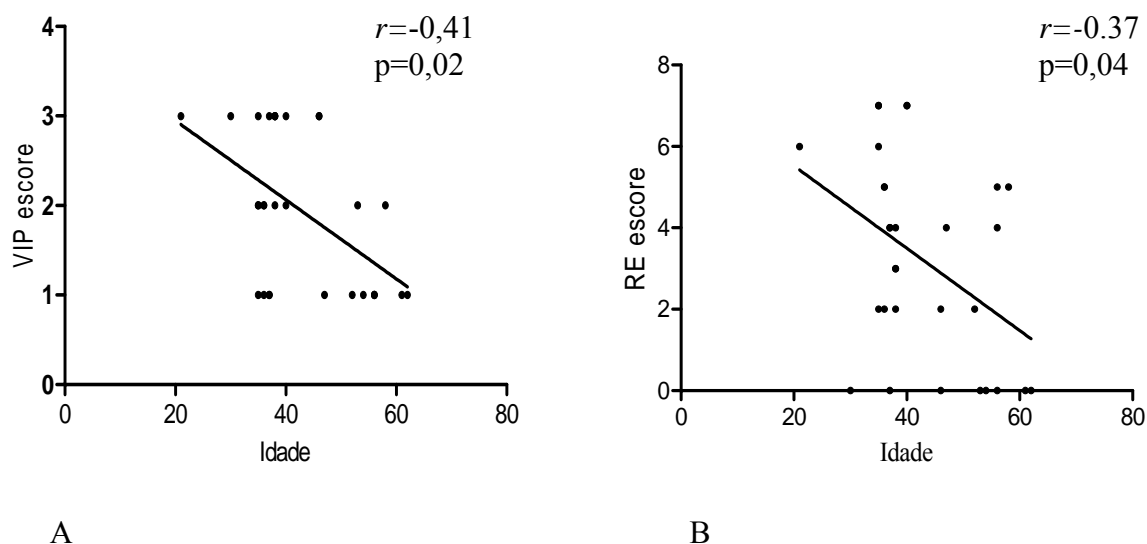


Figura 16: Correlação entre o escore do VIP e a idade (A) e entre o escore do receptor estrogênico alfa e a idade (B). (VIP) peptídeo intestinal vasoativo, (RE) receptor estrogênico alfa. Spearman's test

Na análise de correlação dos vasos se verificou que houve correlação positiva entre estes e o escore do receptor estrogênico alfa na lamina própria na parede vaginal anterior (IC 95% 0.12 a 0.90, $r=0,66$, $p=0,01$) e posterior (IC 95% 0.14 a 0.90, $r=0,67$, $p=0,01$) (Figura 17 A, 17 B). Ao contrário, os vasos da lamina própria na parede vaginal estiveram negativamente correlacionados com a idade, tanto na parede anterior como na posterior (IC 95% -0.97 a -0.68, $r=-0,90$, $p<0,0001$; IC 95% -0.92 a -0.29, $r=-0,74$, $p=0,005$, respectivamente) (Figura 17 C, 17 D).

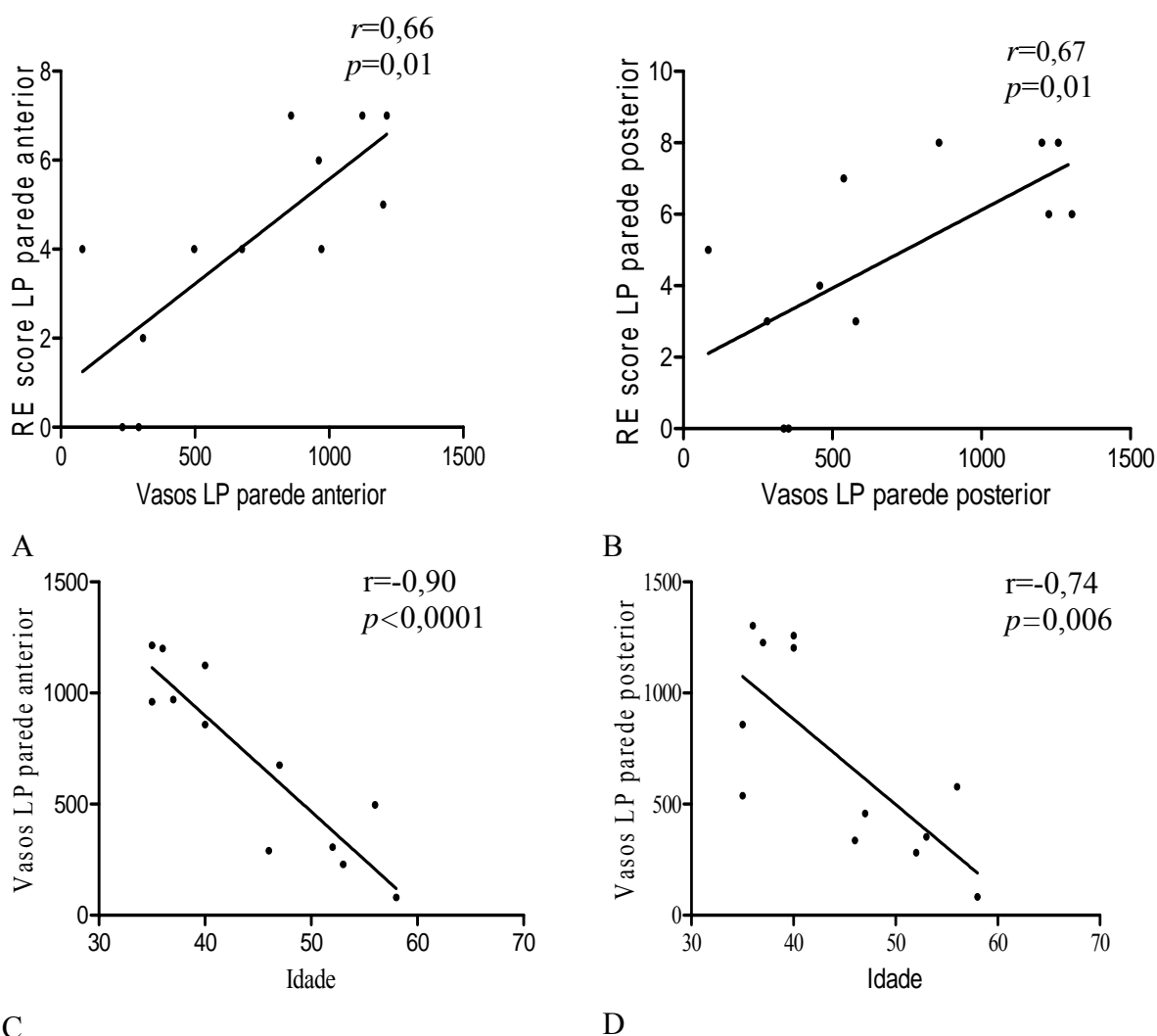


Figura 17: Correlação entre a expressão do receptor alfa e a concentração de vasos na parede vaginal anterior (A) e posterior (B), e entre a idade e a concentração de vasos na parede vaginal anterior (C) e posterior (D). (RE) receptor estrogênico (LP) lâmina própria. Spearman e Pearson's test

Já com relação ao VIP não houve correlação entre a concentração de vasos da lâmina própria e seu escore na parede anterior (IC 95% -0.4679 a 0.6848, $r=0,1639$, $p=0,61$) (Figura 18 A) e nem na parede vaginal posterior (IC 95% -0.6013 to 0.5720, $r=-0,02235$, $p=0,94$) (Figura 18, B).

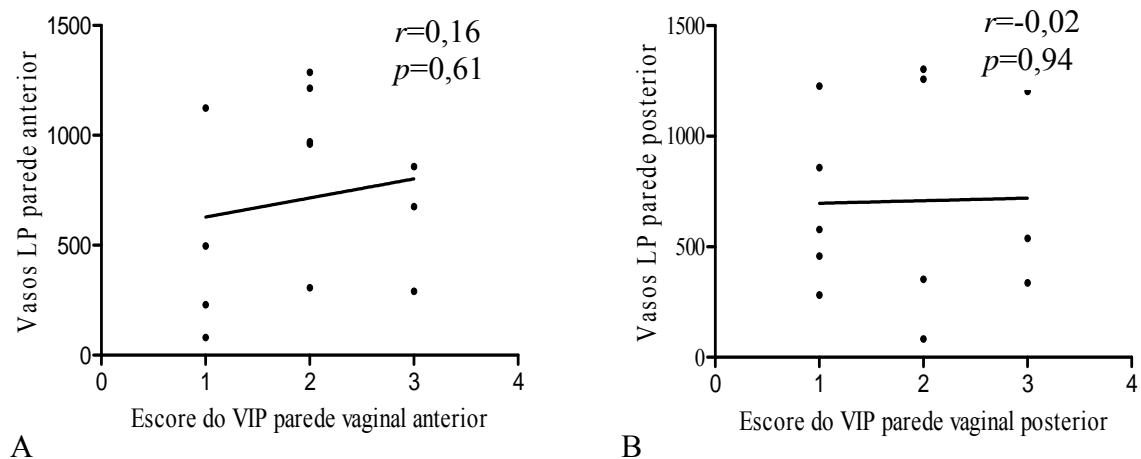


Figura 18: Correlação entre a concentração de vasos da parede vaginal anterior (A) e da posterior (B) com o escore do VIP. (LP) lâmina própria. Spearman teste

6. DISCUSSÃO

Ao analisarmos a caracterização da amostra verificamos que a mesma ocorreu adequadamente para os grupos pré e pós-menopausa de acordo com o *status* estrogênico e a idade, visto que há diferença entre os grupos quanto aos valores de FSH, do estradiol e da idade das pacientes. Houve semelhança entre os grupos com relação ao índice de massa corporal (IMC), um aspecto relevante para a consistência dos nossos achados, pois, a obesidade pode interferir nas concentrações séricas do estradiol (KARIM et al., 2009) e na expressão dos receptores estrogênicos (NILSSON et al., 2007). Vale ressaltar, que apesar da caracterização adequada dos grupos, a dosagem de estradiol isoladamente não é um bom marcador das condições estrogênicas do organismo visto que a secreção deste hormônio é pulsátil e uma dosagem única aleatória pode ser realizada num momento de nadir da curva de secreção estrogênica. Para isso, de maneira indireta, o escore do receptor estrogênico pode refletir o estado estrogênico do tecido vaginal, uma vez que a expressão deste receptor é modulada pelo estrogênio circulante (PESSINA et al., 2006; BRYS et al., 2009), embora alterações estruturais dos receptores devido a idade e a polimorfismos (BREITHERICK et al., 2008; MASSART et al., 2009; PALADINI et al., 2009) possam alterar a resposta tecidual tanto ao VIP quanto ao estrogênio. Neste estudo, não encontramos correlação ente os valores de estrogênio circulante e a expressão de receptores de estradiol, como seria esperado. No entanto, independente do *status* estrogênico da paciente não houve diferença na distribuição do VIP ao longo da parede vaginal, ou seja, sua distribuição é bastante homogênea como já demonstrado por outros autores (LYNCH et al., 1980; HELM et al., 1981; ZHU et al., 2009). Sua presença foi identificada na parede de vasos de maior calibre e na camada muscular. Na comparação da expressão do VIP entre pacientes pré e pós-menopausa verificamos que estas últimas apresentaram uma menor expressão deste neuropeptídeo somente na parede vaginal

posterior sugerindo um possível efeito regulador do estrogênio sobre a expressão do VIP. No entanto, não foi encontrada a correlação entre o escore deste neuropeptídeo e as concentrações do estradiol circulante e nem com a expressão do receptor estrogênico alfa na parede vaginal, o que faz pensar que outros fatores que não o estrogênio também associados à menopausa estejam relacionados com estas alterações.

Entretanto, na parede vaginal anterior não houve diferença na expressão do VIP quando comparados os grupos pré e pós-menopausa. Isto poderia ser um artefato estatístico mas também poderia ser justificado pela presença de estruturas nobres nesta região, como a uretra, a bexiga e o plexo vasculo-nervoso ligado ao clitóris, que manteriam a vascularização para suprir a maior demanda do influxo de sangue para esta região por outros mecanismos independentes da ação estrogênica. Esta teoria encontra respaldo nos resultados de outros estudos que demonstraram as diferenças morfológicas existentes entre a parede vaginal anterior e a posterior principalmente em relação ao conteúdo neuromuscular (SODERBERG et al., 2007). No entanto é preciso considerar a ampliação da amostra para definir melhor este resultado.

É necessário pontuar que achados discordantes dos aqui apresentados foram recentemente descritos para mulheres na pós-menopausa submetidas a correção cirúrgica para incontinência urinária e histerectomia total por patologias diversas, onde foi constatada a maior expressão do VIP na parede vaginal anterior (ZHU et al., 2009).

Algumas variáveis conhecidamente podem interferir na expressão do VIP tais como a paridade elevada, a idade avançada, a presença de patologias malignas e do prolapso genital de alto grau (VIRGOLINI et al., 1994; LI et al., 2001). De fato, já foi detectada a menor expressão do VIP na parede vaginal de mulheres portadoras de prolapso genital III e IV graus (BUSACCHI et al., 1999; ZHU et al., 2009) e em nulíparas (TENG et al., 2008), além de uma

maior expressão deste neuropeptídeo na presença de carcinoma de colo uterino (INOUE et al., 1984; ORTNER et al., 2010).

Quanto à paridade foi verificado que mulheres que já tiveram partos apresentam uma maior concentração de fibras que expressam o VIP na parede vaginal anterior (TENG et al., 2008). Ao contrário, outros autores demonstraram menor expressão desta substância na parede vaginal anterior independente do *status* estrogênico em mulheres portadoras de incontinência urinária, quando comparadas a controles assintomáticas (HONG et al., 2008). Portanto, pode se constatar que existem importantes variáveis que necessitam ser controladas para dar consistências aos resultados de estudos que visam demonstrar a expressão do VIP na vagina.

No presente estudo, as pacientes incluídas são portadoras de prolapso graus I e II e não apresentam outras patologias tais como diabetes, tireoidopatias, hiperprolactinemia, que são condições passíveis de interferir na expressão do VIP (SEGERSON et al., 1989; BALSAL et al., 1996). Além disto, houve homogeneização das amostras que foram obtidas por um mesmo cirurgião com técnica padronizado de coleta, o que fortalece os resultados deste estudo.

Mas a influência dos estrogênios sobre a expressão do VIP vem sendo demonstrada por diversos autores. Vários estudos experimentais têm demonstrado haver uma flutuação na expressão deste neuropeptídeo no trato genital superior sob estímulo estrogênico induzido pela gravidez, pelo ciclo estral ou por injeções de estradiol (HELM et al., 1985; STJERNQUIST et al., 1985; MENGHI et al., 1990). Além disso, mulheres na pós-menopausa em terapia hormonal apresentam resposta vasodilatadora ao VIP idêntica as mulheres no menacme, sendo que, nas não tratadas a infusão do VIP não provoca aumento do fluxo sanguíneo vaginal (PALLE et al., 1990). Existem também evidências de que nas artérias uterinas de mulheres na pós-menopausa a menor expressão do receptor estrogênico alfa está associada a menor expressão do VIP (DI CARLO et al., 2007), bem como na mucosa nasal de

mulheres na pós- menopausa em terapia hormonal que apresentam um aumento na expressão do VIP paralelamente a expressão dos receptores estrogênicos alfa (NAPPI et al., 2004).

Apesar de todas as evidências sugerindo um papel do estrogênio na expressão do VIP, neste estudo não encontramos correlação do VIP com os níveis de estradiol circulante e nem mesmo com os receptores estrogênicos. A controvérsia acerca deste tema é ainda grande. Estudos experimentais com ratas evidenciaram que a infusão de estrogênios por tempo prolongado aumenta a expressão do VIP na hipófise, mas não em outros tecidos (KASPER et al., 1992) sugerindo uma expressão preferencial desta substância de acordo com o órgão estudado. Embora a lubrificação vaginal após a infusão do VIP tenha sido documentada em pacientes menopausadas usuárias de terapia hormonal, isto pode ter ocorrido de maneira indireta, pois, é sabido que o estrogênio favorece a síntese e ação do Óxido Nítrico (MCCURNIN et al., 2009) e este por sua vez incrementa a ação do VIP (VAN GELDRE e LEFEBVRE, 2004; COSGRAVE et al., 2010). A inexistência de correlação entre estrogênio circulante e o escore do VIP pode ser também justificável porque, como anteriormente mencionado, uma única dosagem sérica de estradiol não reflete, de fato, o verdadeiro estado hormonal da mulher. Este dado reafirma a baixa sensibilidade do estradiol em identificar o estado estrogênico da mulher, uma vez que ocorrem grandes flutuações deste hormônio ao longo do dia e do ciclo menstrual e que a fase folicular inicial (período em que foi colhida a amostra), normalmente se correlaciona com níveis mais baixos deste hormônio (SELGRADE, 2010). Outros aspectos importantes devem ser considerados ao se tentar correlacionar a expressão do VIP com a expressão dos receptores do estrogênio e com as suas concentrações séricas. A seqüência de aminoácidos do mRNA do VIP indica que, além deste neuropeptídeo, existem outros peptídeos ativos derivados do *prepro VIP* (TATEMOTO e MUTT, 1981; TATEMOTO et al., 1984) cuja síntese é dependente do tecido onde ocorre a degradação. Em alguns tecidos, o *prepro VIP* é degradado em peptídeo histidina-metionina (PHM) (ITOH et

al., 1983) e, em outros tecidos, para o peptídeo de 42 aminoácidos conhecido como peptídeo valina-histidina (PHV) (YIANGOU et al., 1987; FAHRENKRUG et al., 1989). Ambos são, também, expressos nos elementos neuronais ao longo do trato genital, intimamente relacionados com a camada epitelial, com o tecido perivascular e com a musculatura lisa (BREDKJOER et al., 1997). Estes peptídeos podem fazer reação cruzada com o VIP, do qual são coadjuvantes em várias ações biológicas (PALLE et al., 1989) embora com potência mais discreta (BATAILLE et al., 1980; ROBBERECHT et al., 1982; LUNDBERG et al., 1984). Na avaliação por imunohistoquímica, a expressão dos três neuropeptídeos pode ser detectada sem diferenciação e, não se sabe qual a proporção destes na parede vaginal; além disto, possíveis polimorfismos podem alterar a marcação pela imunohistoquímica. Todos estes aspectos precisam ser considerados e, potencialmente, podem ter interferido nos resultados deste e dos demais estudos.

A ausência de correlação entre o escore do VIP e do receptor estrogênio é um indicador de que existem outros mecanismos além da deficiência estrogênica que alteram a expressão do VIP na parede vaginal.

De forma qualitativa, observamos que mulheres na pós-menopausa com menos de 50 anos apresentam o escore do VIP maior do que as mais idosas. Isto é reforçado pela correlação negativa encontrada entre a expressão do VIP e a idade da paciente. Estes dados também são corroborados por outros autores que recentemente demonstraram que a idade, e não o status estrogênico interfere na expressão do VIP na parede vaginal (Hong, Huang et al. 2008; Zhu, Lang et al. 2009)

A existência de correlação negativa entre o VIP e a idade sugere que as alterações moleculares relativas ao progredir da idade sejam mais importantes do que a concentração estrogênica na expressão do VIP na parede vaginal (ZHU et al., 2009). Segundo Smits e Lefebvre, a idade avançada é um fator que reduz inclusive a ação do VIP (SMITS e

LEFEBVRE, 1995). Sendo assim, além de todas as modificações vaginais devido ao hipoestrogenismo, o avançar da idade deve ser incluído como um co-fator na fisiopatologia do mecanismo da lubrificação passíveis de desfavorecer a realização do coito confortável e indolor. No entanto, vale destacar aqui que, neste estudo, assim como o VIP, a expressão de receptores estrogênicos também teve correlação negativa com a idade das pacientes, mais uma vez mesclando o fator idade e o status estrogênico, ambos associados com a menopausa.

A relação sexual confortável está intimamente ligada ao trofismo da parede vaginal relacionado com as concentrações estrogênicas circulantes. A ação estrogênica na parede vaginal se faz principalmente, através da ativação de seus receptores alfa (FRASOR et al., 2003) amplamente distribuídos no epitélio, na lâmina própria e na camada muscular (FU et al., 2003; PESSINA et al., 2006; JIN et al., 2007). Parece que a expressão destes receptores na vagina está associada ao status estrogênicos, mas isto ainda gera controvérsias. Alguns autores comparando a expressão vaginal destes receptores em mulheres em idade reprodutiva com mulheres na pós-menopausa, não encontraram diferença significativa entre os grupos (JIN et al., 2007), no entanto, tal qual os achados do presente estudo, ensaios mais controlados evidenciaram maior expressão destes receptores em mulheres normoestrogênicas (GEBHART et al., 2001; CAVALLINI et al., 2008). Estes dados sugerem um papel positivo do estrogênio como estimulador da expressão do receptor alfa na parede vaginal (FU et al., 2003). É possível que as concentrações estrogênicas que atingem níveis críticos após a menopausa sejam insuficientes para estimular adequadamente a expressão destes receptores (CAVALLINI et al., 2008).

O estrogênio modula a expressão de inúmeras moléculas e genes que participam de importantes mecanismos ligados a proteção e ao trofismo da genitália (QUARMBY et al., 1982; SHEIKH et al., 1994; KRAMER et al., 2004; CIGNARELLA et al., 2009; MURPHY et al., 2009) que são essenciais para a função da vagina no mecanismo do parto e do coito

confortável, prazeroso e sem dor (LARA et al., 2009). Além do trofismo genital adequado do qual o estrogênio parece participar ativamente, outro componente tem crucial importância no coito confortável e indolor: os vasos.

O mecanismo de lubrificação vaginal depende diretamente da produção de transudato pela parede vaginal o qual é secundário à vasodilatação local que ocorre como parte da resposta sexual. Neste estudo, ficou demonstrado, de maneira objetiva e inédita, que há redução do número de vasos na lamina própria da parede vaginal de mulheres na pós menopausa. Também demonstramos que a menopausa esta associada à diminuição das concentrações dos receptores estrogênicos e ao avançar da idade, o que reforça a hipótese de que ambos os fatores coexistem e, também isoladamente, são responsáveis pelas alterações vasculares encontradas. Porém, não houve correlação entre a densidade vascular e o escore do VIP na parede vaginal. Uma vez que o VIP está em estreita relação com o conteúdo vascular da parede vaginal (OTTESEN et al., 1987; LEVIN, 1991; COSTAGLIOLA et al., 2004; HONG et al., 2008; ZHU et al., 2009) era de se esperar que houvesse uma correlação positiva entre estas duas variáveis, no entanto, a expressão do VIP em cada unidade vascular independe da concentração dos vasos no tecido, ou seja, apesar da densidade vascular da lâmina própria das pacientes menopausadas encontrar-se reduzida em comparação ao grupo menacme, os vasos presentes parecem manter sua característica com relação ao VIP. Este achado sugere que, de fato, outras substâncias do meio extracelular possam controlar a expressão deste neuropeptídeo na parede vaginal independente das alterações morfológicas sofridas pelo tecido com o advento da menopausa. Apesar da menopausa instalada a influência do hipoestrogenismo parece ser a menos significativa, já os receptores estrogênicos sim estiveram correlacionados com a densidade de vasos, o que reforça nossa teoria de que o fator principal seja o envelhecimento do tecido e não o status estrogênico em si a influenciar a expressão do VIP.

A diminuição da vascularização da parede vaginal após a menopausa tem sido postulada, embora com evidências insuficientes e controvertidas. Alguns autores não encontraram correlação entre número de vasos e a menopausa (SEMMELINK et al., 1990), no entanto, foi demonstrado que a hormonioterapia tem efeito restaurador tanto sobre o número quanto sobre a dinâmica vascular em humanos e em animais (PARK et al., 2001; LONG et al., 2006a; LONG et al., 2006b) e parece influenciar também a distribuição destes vasos na parede vaginal (CICINELLI et al., 2003). Também já existem evidências de que o estrogênio modula diretamente a angiogênese via efeito estimulador na célula endotelial (DOBRZYCKA et al., 2009) o que sugere que o hipoestrogenismo somado ao avançar da idade (VAN LUNSEN e LAAN, 2004; LARA et al., 2009), possa resultar em prejuízo para a angiogênese.

O processo do envelhecimento é uma condição que transcorre com alterações bioquímicas e moleculares importantes (GOH, 2003) que afetam a genitália produzindo também a denervação e desvascularização da parede vaginal (TINELLI et al., 2009), condições relacionadas com a genese do prolapso genital (RICHTER et al., 2007). Neste período crítico da vida ocorrem também, alterações do tecido conjuntivo, retardamento da síntese do colágeno e da angiogênese, principalmente devido a diminuição do FGF-2 (*angiogenic mediators fibroblast growth factor-2*) e VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (SADOON e REED, 2003). A diminuição destas substâncias implica em alteração do mecanismo da neoformação vascular que envolve a ativação celular, a degradação da membrana basal, a migração celular e a proliferação celular (SADOON e REED, 2003). Todas estas fases são também reguladas pela ação de fatores de crescimento e de proteínas existentes na matriz celular como o colágeno tipo I, a fibronectina, a laminina (ASHCROFT et al., 1997; ECHTERMAYER et al., 2001; HORNEBECK et al., 2002) e fatores de crescimento (b-FGF, VEGF, IGF-1) (FERRARA e GERBER, 2001; SARTIPPOUR et al.,

2002; SIMMONS et al., 2002). Todas estas substancias estão comprometidos pelas alterações bioquímicas relativas a idade. Adicionalmente, em pessoas idosas, os macrófagos, que são uma fonte rica de fatores angiogênicos, passam a produzir menos VEGF o que também compromete a angiogenese (SWIFT et al., 1999). Além disto é conhecido que a relação dos vasos sanguíneos com a saúde tecidual não está ligada somente ao aporte de nutrientes para os tecidos, mas também à capacidade das células da parede vascular em sintetizar substâncias essenciais para a função do órgão alvo (YANAGISAWA et al., 2009), e isto pode ficar comprometido pelo avançar da idade.

Todas estas alterações justificam a importante redução da rede vascular na parede vaginal em mulheres em idade avançada. Portanto, além do menor número de vasos, a genitália sofre pela deficiência de síntese de várias substancias entre elas os neurotransmissores e os fatores de crescimento, essenciais a saúde dos tecidos e a plasticidade do conteúdo vascular cujo mecanismo depende da ação destas substâncias que co-atuam na vasodilatação (LEVIN, 1991; MARTHOL e HILZ, 2004), fundamental para a efetivação da fase da excitação sexual, conseqüentemente da lubrificação vaginal e do coito confortável e indolor.

A dor durante a relação sexual está, muitas vezes, associada à lubrificação insuficiente e ao relaxamento inadequado da musculatura lisa da parede vaginal, eventos cruciais para a formação da plataforma excitatória (LEVIN, 1991). Embora seja a dispareunia uma condição altamente prevalente após a menopausa (BARLOW et al., 1997), no presente estudo as mulheres na pós-menopausa com atividade sexual, não apresentaram o escore de dor maior do que as mulheres do grupo pré-menopausa quando avaliadas pelo GRISS. Também não houve correlação entre o estado estrogênico e nem o escore do VIP com o escore de dor. Estes dados corroboram os achados de outros autores que também não encontraram correlação entre disfunção da genitália e nível de comprometimento sexual (YANG et al., 2008).

Recentemente, um estudo demonstrou que a capacidade dos instrumentos psicométricos para avaliar a função sexual é restrita por não acessar os aspectos individuais da resposta sexual tais como a influência dos fatores ambientais, culturais e relacionais que comumente, exercem influência na expressão sexual da mulher (SRIKRISHNA et al., 2008). Em especial, as dificuldades relacionais (TER KUILE et al., 1999) e o relacionamento de longa duração (CARVALHEIRA et al., 2010) podem afetar o envolvimento e a entrega durante o ato sexual e resultar em disfunção de desejo sexual com comprometimento da excitação (JIANN et al., 2009), que pode cursar com ausência de lubrificação e dor coital. Mas também os níveis séricos adequados dos estrogênios são fundamentais para o trofismo da parede vaginal (LARA et al., 2009), pois, as alterações acima descritas devidas ao hipostrogenismo, podem comprometer a resiliência, a sensibilidade da vagina, a lubrificação vaginal e, conseqüentemente, a resposta sexual.

Vale ressaltar que a qualidade do relacionamento diádico pode ser mais importante do que a condição hormonal na gênese da dor durante o coito (DENNERSTEIN et al., 2005; FISHER et al., 2005). Isto dimensiona a complexidade da interpretação das pesquisas que objetivam relacionar a função sexual com fatores dependentes das concentrações dos esteróides sexuais (BASSON, 2007). Portanto, pode-se considerar que, embora o GRISS seja um instrumento reconhecidamente efetivo para avaliar a função sexual, é necessário que, paralelamente, seja realizada a avaliação qualitativa da expressão sexual das pacientes. Neste estudo o instrumento utilizado não nos permitiu concluir a real importância do VIP na disfunção de excitação e na gênese da dispareunia.

7. CONCLUSÕES

- A distribuição do VIP na parede vaginal ocorre de forma homogênea.
- Na parede vaginal posterior, a expressão do VIP se reduz com o advento da menopausa sem, entretanto haver uma correlação direta entre os valores séricos de estrogênio e a expressão deste neuropeptídeo.
- Parece que a idade é o fator real que influencia negativamente a expressão deste neuropeptídeo na parede vaginal.
- Não há diferença na expressão do RE-alfa nos diferentes segmentos da parede vaginal
- Há diferença na expressão do RE-alfa entre os grupos pré-menopausa e pós-menopausa independente do segmento estudado
- A condição estrogênica e o escore do VIP não apresentaram correlação com o escore do GRISS no domínio dor coital nas pacientes deste estudo, sugerindo que outro mecanismo deva influenciar no aumento da incidência de dor coital em mulheres na pós-menopausa. Vale ressaltar que o GRISS, embora reconhecidamente eficiente para a avaliação por domínios da função sexual, se mostra limitado por não acessar, de forma qualitativa, as particularidades da resposta sexual individual.
- Após a menopausa, ocorre uma drástica redução na concentração de vasos na parede vaginal sendo o hipoestrogenismo e o avançar da idade os fatores que isoladamente, respondem por esta alteração.

8. REFERÊNCIAS

- ALM, P. et al. Vasoactive intestinal polypeptide nerves in the human female genital tract. *Am J Obstet Gynecol*, v.136, n.3, Feb 1, p.349-51. 1980a.
- ALM, P. et al. Origin and distribution of VIP (vasoactive intestinal polypeptide)-nerves in the genito-urinary tract. *Cell Tissue Res*, v.205, n.3, p.337-47. 1980b.
- ANAND, P. et al. A VIP-containing system concentrated in the lumbosacral region of human spinal cord. *Nature*, v.305, n.5930, p.143-5. 1983.
- ANDRADE, J.P. et al. Timed hypocaloric food restriction alters the synthesis and expression of vasopressin and vasoactive intestinal peptide in the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res*, v.1022, n.1-2, p.226-33. 2004.
- ASHCROFT, G.S. et al. Aging is associated with reduced deposition of specific extracellular matrix components, an upregulation of angiogenesis, and an altered inflammatory response in a murine incisional wound healing model. *J Invest Dermatol*, v.108, n.4, Apr, p.430-7. 1997.
- AUGHTON, K.L. et al. Pharmacological profiling of neuropeptides on rabbit vaginal wall and vaginal artery smooth muscle in vitro. *Br J Pharmacol*, v.155, n.2, p.236-43. 2008.
- BACHMANN, G.A. Vasomotor flushes in menopausal women. *Am J Obstet Gynecol*, v.180, n.3 Pt 2, Mar, p.S312-6. 1999.
- BADEN, W.F.; WALKER, T.A. Physical diagnosis in the evaluation of vaginal relaxation. *Clin Obstet Gynecol*, v.15, n.4, p.1055-69. 1972.
- BALSA, J.A. et al. Autocrine and/or paracrine action of vasoactive intestinal peptide on thyrotropin-releasing hormone induced prolactin release. *Endocrinology*, v.137, n.1, Jan, p.144-50. 1996.
- BARLOW, D.H. et al. A study of European womens' experience of the problems of urogenital ageing and its management. *Maturitas*, v.27, n.3, Jul, p.239-47. 1997.
- BASBAUM, A.I.; GLAZER, E.J. Immunoreactive vasoactive intestinal polypeptide is concentrated in the sacral spinal cord: a possible marker for pelvic visceral afferent fibers. *Somatosens Res*, v.1, n.1, p.69-82. 1983.

- BASSON, R. The complexities of female sexual arousal disorder: potential role of pharmacotherapy. *World J Urol*, v.20, n.2, Jun, p.119-26. 2002a.
- BASSON, R. A model of women's sexual arousal. *J Sex Marital Ther*, v.28, n.1, Jan-Feb, p.1-10. 2002b.
- BASSON, R. Hormones and sexuality: current complexities and future directions. *Maturitas*, v.57, n.1, May 20, p.66-70. 2007.
- BASSON, R. et al. Definitions of women's sexual dysfunction reconsidered: advocating expansion and revision. *J Psychosom Obstet Gynaecol*, v.24, n.4, Dec, p.221-9. 2003.
- BASSON, R. et al. Revised definitions of women's sexual dysfunction. *J Sex Med*, v.1, n.1, Jul, p.40-8. 2004.
- BATAILLE, D. et al. Porcine peptide having N-terminal histidine and C-terminal isoleucine amide (PHI): vasoactive intestinal peptide (VIP) and secretin-like effects in different tissues from the rat. *FEBS Lett*, v.114, n.2, p.240-2. 1980.
- BERMAN, J.R. et al. Clinical evaluation of female sexual function: effects of age and estrogen status on subjective and physiologic sexual responses. *Int J Impot Res*, v.11 Suppl 1, p.S31-8. 1999.
- BERMAN, J.R. et al. Effect of estrogen withdrawal on nitric oxide synthase expression and apoptosis in the rat vagina. *Urology*, v.51, n.4, Apr, p.650-6. 1998.
- BLAKEMAN, P.J. et al. Oestrogen and progesterone receptor expression in the female lower urinary tract, with reference to oestrogen status. *BJU Int*, v.86, n.1, Jul, p.32-8. 2000.
- BLANK, M.A. et al. The regional distribution of NPY-, PHM-, and VIP-containing nerves in the human female genital tract. *Int J Fertil*, v.31, n.3, p.218-22. 1986.
- BODANSZKY, M. et al. Biological activities of synthetic peptides corresponding to fragments of and to the entire sequence of the vasoactive intestinal peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.70, n.2, Feb, p.382-4. 1973.
- BOREHAM, M.K. et al. Morphometric analysis of smooth muscle in the anterior vaginal wall of women with pelvic organ prolapse. *Am J Obstet Gynecol*, v.187, n.1, p.56-63. 2002a.

BOREHAM, M.K. et al. Morphometric properties of the posterior vaginal wall in women with pelvic organ prolapse. *Am J Obstet Gynecol*, v.187, n.6, p.1501-8; discussion 1508-9. 2002b.

BREDKJOER, H.E. et al. PreproVIP-derived peptides in the human female genital tract: expression and biological function. *Neuropeptides*, v.31, n.3, Jun, p.209-15. 1997.

BREThERICK, K.L. et al. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms are associated with idiopathic premature ovarian failure. *Fertil Steril*, v.89, n.2, Feb, p.318-24. 2008.

BRYS, M. et al. Expression of estrogen and progesterone receptor genes in endometrium, myometrium and vagina of postmenopausal women treated with estriol. *Sao Paulo Med J*, v.127, n.3, p.128-33. 2009.

BUSACCHI, P. et al. A histological and immunohistochemical study of neuropeptide containing somatic nerves in the levator ani muscle of women with genitourinary prolapse. *Acta Obstet Gynecol Scand*, v.78, n.1, Jan, p.2-5. 1999.

CARVALHEIRA, A.A. et al. Women's Motivations for Sex: Exploring the Diagnostic and Statistical Manual, Fourth Edition, Text Revision Criteria for Hypoactive Sexual Desire and Female Sexual Arousal Disorders. *J Sex Med*, Feb 5. 2010.

CAVALLINI, A. et al. Estrogen receptor (ER) and ER-related receptor expression in normal and atrophic human vagina. *Maturitas*, v.59, n.3, Mar 20, p.219-25. 2008.

CHU, A. et al. Identification and characterization of a small molecule antagonist of human VPAC(2) receptor. *Mol Pharmacol*, v.77, n.1, Jan, p.95-101. 2010.

CICINELLI, E. et al. Placement of the vaginal 17beta-estradiol tablets in the inner or outer one third of the vagina affects the preferential delivery of 17beta-estradiol toward the uterus or periurethral areas, thereby modifying efficacy and endometrial safety. *Am J Obstet Gynecol*, v.189, n.1, Jul, p.55-8. 2003.

CIGNARELLA, A. et al. Distinct roles of estrogen receptor-alpha and beta in the modulation of vascular inducible nitric-oxide synthase in diabetes. *J Pharmacol Exp Ther*, v.328, n.1, Jan, p.174-82. 2009.

COSGRAVE, A.S. et al. Differential Regulation of Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) in the Dentate Gyrus and Hippocampus via the NO-cGMP Pathway Following Kainic Acid-Induced Seizure in the Rat. *J Mol Neurosci*, Apr 6. 2010.

COSTAGLIOLA, A. et al. Coexistence of non-adrenergic non-cholinergic inhibitory and excitatory neurotransmitters in a large neuronal subpopulation in the vaginal segment of the chicken oviduct. *Auton Neurosci*, v.112, n.1-2, May 31, p.37-48. 2004.

COUVINEAU, A. et al. Identification of cytoplasmic domains of hVPAC1 receptor required for activation of adenylyl cyclase. Crucial role of two charged amino acids strictly conserved in class II G protein-coupled receptors. *J Biol Chem*, v.278, n.27, p.24759-66. 2003.

CUNHA, G.R. et al. Role of stromal-epithelial interactions in hormonal responses. *Arch Histol Cytol*, v.67, n.5, Dec, p.417-34. 2004.

DA SILVA LARA, L.A. et al. Menopause leading to increased vaginal wall thickness in women with genital prolapse: impact on sexual response. *J Sex Med*, v.6, n.11, Nov, p.3097-110. 2009.

DAHLMAN-WRIGHT, K. et al. International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacol Rev*, v.58, n.4, Dec, p.773-81. 2006.

DENNERSTEIN, L. et al. The relative effects of hormones and relationship factors on sexual function of women through the natural menopausal transition. *Fertil Steril*, v.84, n.1, Jul, p.174-80. 2005.

DI CARLO, C. et al. Postmenopausal hypoestrogenism increases vasoconstrictor neuropeptides and decreases vasodilator neuropeptides content in arterial-wall autonomic terminations. *Fertil Steril*, v.88, n.1, Jul, p.95-9. 2007.

DIELH A, F.D., WAGNER A. . A qualidade do funcionamento sexual de Homens e Mulheres. . *Rev Bras Sexualidade Humana* v.15, n.1, p.39-57. 2004

DOBZYCKA, B. et al. [The role of estrogens in angiogenesis in the female reproductive system]. *Endokrynol Pol*, v.60, n.3, May-Jun, p.210-4. 2009.

ECHTERMEYER, F. et al. Delayed wound repair and impaired angiogenesis in mice lacking syndecan-4. *J Clin Invest*, v.107, n.2, Jan, p.R9-R14. 2001.

FAHRENKRUG, J. Gut/brain peptides in the genital tract: VIP and PACAP. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, v.234, p.35-9. 2001.

FAHRENKRUG, J. et al. Non-amidated forms of VIP (glycine-extended VIP and VIP-free acid) have full bioactivity on smooth muscle. *Regul Pept*, v.26, n.3, Dec, p.235-9. 1989.

FERRARA, N.; GERBER, H.P. The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Haematol*, v.106, n.4, p.148-56. 2001.

FISHER, H. et al. Romantic love: an fMRI study of a neural mechanism for mate choice. *J Comp Neurol*, v.493, n.1, p.58-62. 2005.

FOSTER, D.C. et al. Effect of vulvovaginal estrogen on sensorimotor response of the lower genital tract: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol*, v.94, n.2, Aug, p.232-7. 1999.

FRASOR, J. et al. Response-specific and ligand dose-dependent modulation of estrogen receptor (ER) alpha activity by ERbeta in the uterus. *Endocrinology*, v.144, n.7, Jul, p.3159-66. 2003.

FU, X. et al. Expression of estrogen receptor-alpha and -beta in anterior vaginal walls of genuine stress incontinent women. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*, v.14, n.4, Oct, p.276-81; discussion 281. 2003.

GASS, M. Highlights from the latest WHI publications and the latest North American Menopause Society position statement on use of menopausal hormone therapy. *Cleve Clin J Med*, v.75 Suppl 4, May, p.S13-6. 2008.

GEBHART, J.B. et al. Expression of estrogen receptor isoforms alpha and beta messenger RNA in vaginal tissue of premenopausal and postmenopausal women. *Am J Obstet Gynecol*, v.185, n.6, Dec, p.1325-30; discussion 1330-1. 2001.

GIBSON, S.J. et al. A comparison of the distributions of eight peptides in spinal cord from normal controls and cases of motor neurone disease with special reference to Onuf's nucleus. *Brain Res*, v.474, n.2, p.255-78. 1988.

GIRALDI, A. et al. Physiology of female sexual function: animal models. *J Sex Med*, v.1, n.3, Nov, p.237-53. 2004.

GOH, J.T. Biomechanical and biochemical assessments for pelvic organ prolapse. *Curr Opin Obstet Gynecol*, v.15, n.5, Oct, p.391-4. 2003.

GOLOMBOK S., R.J. The Handbook of Golombok-Rust Inventory of Sexual Satisfaction. 1983

HARMAR, A.J. et al. International Union of Pharmacology. XVIII. Nomenclature of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Pharmacol Rev*, v.50, n.2, p.265-70. 1998.

HARVEY, J.M. et al. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol*, v.17, n.5, p.1474-81. 1999.

HELM, G. et al. Changes in oviductal VIP content induced by sex steroids and inhibitory effect of VIP on spontaneous oviductal contractility. *Acta Physiol Scand*, v.125, n.2, Oct, p.219-24. 1985.

HELM, G. et al. Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in the human female reproductive tract: distribution and motor effects. *Biol Reprod*, v.25, n.1, Aug, p.227-34. 1981.

HONG, X. et al. Role of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in the vaginal wall of women with stress urinary incontinence and pelvic organ prolapse. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*, v.19, n.8, Aug, p.1151-7. 2008.

HORNEBECK, W. et al. Matrix-directed regulation of pericellular proteolysis and tumor progression. *Semin Cancer Biol*, v.12, n.3, Jun, p.231-41. 2002.

HOYLE, C.H. et al. Innervation of vasculature and microvasculature of the human vagina by NOS and neuropeptide-containing nerves. *J Anat*, v.188 (Pt 3), Jun, p.633-44. 1996.

HSU, Y. et al. Vaginal thickness, cross-sectional area, and perimeter in women with and those without prolapse. *Obstet Gynecol*, v.105, n.5 Pt 1, May, p.1012-7. 2005.

INOUE, T. et al. Production of immunoreactive-polypeptide hormones in cervical carcinoma. *Cancer*, v.53, n.7, Apr 1, p.1509-14. 1984.

ITOH, N. et al. Human preprovasoactive intestinal polypeptide contains a novel PHI-27-like peptide, PHM-27. *Nature*, v.304, n.5926, Aug 11-17, p.547-9. 1983.

JIANN, B.P. et al. Risk Factors for Individual Domains of Female Sexual Function. *J Sex Med*, Sep 15. 2009.

JIN, L. et al. [Expression of estrogen receptor alpha and beta subtypes in the vaginal wall of women with anterior vaginal prolapse]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*, v.42, n.1, Jan, p.18-21. 2007.

KAO, A. et al. Dyspareunia in postmenopausal women: a critical review. *Pain Res Manag*, v.13, n.3, May-Jun, p.243-54. 2008.

KARIM, A.Y. et al. A novel matrix metalloprotease-like enzyme (karilysin) of the periodontal pathogen *Tannerella forsythia* ATCC 43037. *Biol Chem*, Nov 17. 2009.

KASPER, S. et al. Tissue-specific regulation of vasoactive intestinal peptide messenger ribonucleic acid levels by estrogen in the rat. *Endocrinology*, v.130, n.4, p.1796-801. 1992.

KAWATANI, M.; DE GROAT, W.C. A large proportion of afferent neurons innervating the uterine cervix of the cat contain VIP and other neuropeptides. *Cell Tissue Res*, v.266, n.1, p.191-6. 1991.

KIM, N.N. et al. Effects of ovariectomy and steroid hormones on vaginal smooth muscle contractility. *Int J Impot Res*, v.16, n.1, Feb, p.43-50. 2004.

KRAMER, P.R. et al. 17 beta-estradiol regulates cytokine release through modulation of CD16 expression in monocytes and monocyte-derived macrophages. *Arthritis Rheum*, v.50, n.6, Jun, p.1967-75. 2004.

LARA, L.A. et al. The effects of hypoestrogenism on the vaginal wall: interference with the normal sexual response. *J Sex Med*, v.6, n.1, p.30-9. 2009.

LEVIN, R.J. VIP, vagina, clitoral and periurethral glans--an update on human female genital arousal. *Exp Clin Endocrinol*, v.98, n.2, p.61-9. 1991.

LEVIN, R.J. The physiology of sexual arousal in the human female: a recreational and procreational synthesis. *Arch Sex Behav*, v.31, n.5, p.405-11. 2002.

LEVIN, R.J.; WYLIE, K. Vaginal vasomotion--its appearance, measurement, and usefulness in assessing the mechanisms of vasodilatation. *J Sex Med*, v.5, n.2, p.377-86. 2008.

LI, S.R. et al. Effects of vasoactive intestinal peptide (VIP) and somatostatin (SST) on lipoprotein receptor expression by A431 tumor cells. *Life Sci*, v.68, n.11, p.1243-57. 2001.

LONG, C.-Y. et al. A randomized comparative study of the effects of oral and topical estrogen therapy on the vaginal vascularization and sexual function in hysterectomized postmenopausal women. *Menopause*, v.13, n.5, p.737-743 10.1097/01.gme.0000227401.98933.0b. 2006a.

LONG, C.Y. et al. A randomized comparative study of the effects of oral and topical estrogen therapy on the vaginal vascularization and sexual function in hysterectomized postmenopausal women. *Menopause*, v.13, n.5, p.737-43. 2006b.

- LONG, X. et al. Effects of the xenoestrogen bisphenol A on expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the rat. *Exp Biol Med (Maywood)*, v.226, n.5, May, p.477-83. 2001.
- LOTOCKI, W. [Neurotrophic basis of atrophic changes in the vagina and vulva]. *Przegl Lek*, v.56, n.1, p.81-5. 1999.
- LUNDBERG, J.M. et al. Corelease of vasoactive intestinal polypeptide and peptide histidine isoleucine in relation to atropine-resistant vasodilation in cat submandibular salivary gland. *Neurosci Lett*, v.52, n.1-2, p.37-42. 1984.
- LYNCH, E.M. et al. The differential distribution of vasoactive intestinal polypeptide in the normal human female genital tract. *Histochemistry*, v.67, n.2, p.169-77. 1980.
- MALETTI, M. et al. Interaction between estradiol and prolactin on vasoactive intestinal peptide concentrations in the hypothalamus and in the anterior pituitary of the female rat. *Neurosci Lett*, v.32, n.3, p.307-13. 1982.
- MARTHOL, H.; HILZ, M.J. [Female sexual dysfunction: a systematic overview of classification, pathophysiology, diagnosis and treatment]. *Fortschr Neurol Psychiatr*, v.72, n.3, p.121-35. 2004.
- MASSART, F. et al. Age-specific effects of estrogen receptors' polymorphisms on the bone traits in healthy fertile women: the BONTURNO study. *Reprod Biol Endocrinol*, v.7, p.32. 2009.
- MCCURNIN, D.C. et al. Postnatal estradiol up-regulates lung nitric oxide synthases and improves lung function in bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med*, v.179, n.6, Mar 15, p.492-500. 2009.
- MENDELSON, M.E. Genomic and nongenomic effects of estrogen in the vasculature. *Am J Cardiol*, v.90, n.1A, Jul 3, p.3F-6F. 2002.
- MENGHI, G. et al. Changes in vasoactive intestinal polypeptide (VIP) levels in the rabbit oviduct at different hormonal stages. An immunohistochemical study. *J Anat*, v.171, Aug, p.139-46. 1990.
- MIN, K. et al. Experimental models for the investigation of female sexual function and dysfunction. *Int J Impot Res*, v.13, n.3, Jun, p.151-6. 2001.
- MOALLI, P.A. et al. Impact of menopause on collagen subtypes in the arcus tendineus fasciae pelvis. *Am J Obstet Gynecol*, v.190, n.3, Mar, p.620-7. 2004.

MUNARRIZ, R. et al. Biology of female sexual function. *Urol Clin North Am*, v.29, n.3, Aug, p.685-93. 2002.

MURPHY, A.J. et al. Estradiol regulates expression of estrogen receptor ERalpha46 in human macrophages. *PLoS One*, v.4, n.5, p.e5539. 2009.

NAJIMI, M. et al. Developmental pattern of VIP binding sites in the human hypothalamus. *Ann N Y Acad Sci*, v.1070, p.462-7. 2006.

NAPPI, C. et al. Comparison of intranasal and transdermal estradiol on nasal mucosa in postmenopausal women. *Menopause*, v.11, n.4, Jul-Aug, p.447-55. 2004.

NILSSON, M. et al. Oestrogen receptor alpha gene expression levels are reduced in obese compared to normal weight females. *Int J Obes (Lond)*, v.31, n.6, Jun, p.900-7. 2007.

OBERHOLZER, M. et al. Methods in quantitative image analysis. *Histochem Cell Biol*, v.105, n.5, May, p.333-55. 1996.

ORTNER, A. et al. VPAC receptor mediated tumor cell targeting by protamine based nanoparticles. *J Drug Target*, Jan 6. 2010.

OTTESEN, B. Vasoactive intestinal polypeptide as a neurotransmitter in the female genital tract. *Am J Obstet Gynecol*, v.147, n.2, p.208-24. 1983.

OTTESEN, B.; FAHRENKRUG, J. Vasoactive intestinal polypeptide and other preprovasoactive intestinal polypeptide-derived peptides in the female and male genital tract: localization, biosynthesis, and functional and clinical significance. *Am J Obstet Gynecol*, v.172, n.5, p.1615-31. 1995.

OTTESEN, B. et al. Effects of VIP in the female genital tract. *Endocrinol Jpn*, v.27 Suppl 1, p.71-8. 1980.

OTTESEN, B. et al. Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) provokes vaginal lubrication in normal women. *Peptides*, v.8, n.5, Sep-Oct, p.797-800. 1987.

OTTESEN, B. et al. Neuropeptides in the regulation of female genital smooth muscle contractility. *Acta Obstet Gynecol Scand*, v.62, n.6, p.591-2. 1983.

PALADINI, F. et al. Age-dependent association of idiopathic achalasia with vasoactive intestinal peptide receptor 1 gene. *Neurogastroenterol Motil*, v.21, n.6, Jun, p.597-602. 2009.

PALLE, C. et al. Vasoactive intestinal polypeptide and human vaginal blood flow: comparison between transvaginal and intravenous administration. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, v.17, n.1, Jan, p.61-8. 1990.

PALLE, C. et al. Peptide histidine methionine and vasoactive intestinal peptide: occurrence and relaxant effect in the human female reproductive tract. *Biol Reprod*, v.41, n.6, p.1103-11. 1989.

PARK, K. et al. Decreased circulating levels of estrogen alter vaginal and clitoral blood flow and structure in the rabbit. *Int J Impot Res*, v.13, n.2, Apr, p.116-24. 2001.

PESSINA, M.A. et al. Differential regulation of the expression of estrogen, progesterone, and androgen receptors by sex steroid hormones in the vagina: immunohistochemical studies. *J Sex Med*, v.3, n.5, Sep, p.804-14. 2006.

PRYSOR-JONES, R.A. et al. Vasoactive intestinal peptide and the stimulation of lactotroph growth by oestradiol in rats. *J Endocrinol*, v.116, n.2, p.259-65. 1988.

QUARMBY, V.E. et al. Estrogen action in the mouse uterus: adrenal modulation of receptor levels. *Endocrinology*, v.110, n.4, Apr, p.1208-16. 1982.

RICHTER, H.E. et al. The effect of age on short-term outcomes after abdominal surgery for pelvic organ prolapse. *J Am Geriatr Soc*, v.55, n.6, Jun, p.857-63. 2007.

ROBBERECHT, P. et al. Effects of PHI on vasoactive intestinal peptide receptors and adenylate cyclase activity in lung membranes. A comparison in man, rat, mouse and guinea pig. *Regul Pept*, v.4, n.5, p.241-50. 1982.

The role of local vaginal estrogen for treatment of vaginal atrophy in postmenopausal women: 2007 position statement of The North American Menopause Society. *Menopause*, v.14, n.3 Pt 1, May-Jun, p.355-69; quiz 370-1. 2007.

SADOUN, E.; REED, M.J. Impaired angiogenesis in aging is associated with alterations in vessel density, matrix composition, inflammatory response, and growth factor expression. *J Histochem Cytochem*, v.51, n.9, Sep, p.1119-30. 2003.

SAID, S.I.; MUTT, V. Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine. *Science*, v.169, n.951, Sep 18, p.1217-8. 1970.

SAID, S.I.; ROSENBERG, R.N. Vasoactive intestinal polypeptide: abundant immunoreactivity in neural cell lines and normal nervous tissue. *Science*, v.192, n.4242, p.907-8. 1976.

SARTIPPOUR, M.R. et al. Inhibition of fibroblast growth factors by green tea. *Int J Oncol*, v.21, n.3, Sep, p.487-91. 2002.

SEGERSON, T.P. et al. Thyroid hormone regulates vasoactive intestinal peptide (VIP) mRNA levels in the rat anterior pituitary gland. *Endocrinology*, v.125, n.4, Oct, p.2221-3. 1989.

SELGRADE, J.F. Bifurcation analysis of a model for hormonal regulation of the menstrual cycle. *Math Biosci*, Feb 26. 2010.

SEMMELINK, H.J. et al. Histomorphometric study of the lower urogenital tract in pre- and post-menopausal women. *Cytometry*, v.11, n.6, p.700-7. 1990.

SHEIKH, M.S. et al. Expression of estrogen receptors in estrogen receptor-negative human breast carcinoma cells: modulation of epidermal growth factor-receptor (EGF-R) and transforming growth factor alpha (TGF alpha) gene expression. *J Cell Biochem*, v.54, n.3, Mar, p.289-98. 1994.

SIMMONS, J.G. et al. IGF-I and TGF-beta1 have distinct effects on phenotype and proliferation of intestinal fibroblasts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, v.283, n.3, Sep, p.G809-18. 2002.

SMET, P.J. et al. Distribution and colocalization of calcitonin gene-related peptide, tachykinins, and vasoactive intestinal peptide in normal and idiopathic unstable human urinary bladder. *Lab Invest*, v.77, n.1, Jul, p.37-49. 1997.

SMITS, G.J.; LEFEBVRE, R.A. Influence of age on the signal transduction pathway of non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitters in the rat gastric fundus. *Br J Pharmacol*, v.114, n.3, Feb, p.640-7. 1995.

SODERBERG, M.W. et al. Pelvic floor sex steroid hormone receptors, distribution and expression in pre- and postmenopausal stress urinary incontinent women. *Acta Obstet Gynecol Scand*, v.86, n.11, p.1377-84. 2007.

SRIKRISHNA, S. et al. Experiences and expectations of women with urogenital prolapse: a quantitative and qualitative exploration. *Bjog*, v.18, p.18. 2008.

STJERNQUIST, M. et al. Levels of neural vasoactive intestinal polypeptide in rat uterus are markedly changed in association with pregnancy as shown by immunocytochemistry and radioimmunoassay. *Biol Reprod*, v.33, n.1, Aug, p.157-63. 1985.

SWIFT, M.E. et al. Impaired wound repair and delayed angiogenesis in aged mice. *Lab Invest*, v.79, n.12, Dec, p.1479-87. 1999.

TANG, L.J. et al. Proteomic analysis of human cervical-vaginal fluids. *J Proteome Res*, v.6, n.7, p.2874-83. 2007.

TATEMOTO, K. et al. Isolation and primary structure of human PHI (peptide HI). *FEBS Lett*, v.174, n.2, Sep 3, p.258-61. 1984.

TATEMOTO, K.; MUTT, V. Isolation and characterization of the intestinal peptide porcine PHI (PHI-27), a new member of the glucagon--secretin family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.78, n.11, Nov, p.6603-7. 1981.

TENG, L.R. et al. [Effect of pregnancy and spontaneous delivery on the morphology of levator ani muscle and expression of vaginal nerve fibers]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*, v.43, n.8, Aug, p.597-601. 2008.

TER KUILE, M.M. et al. The Golombok Rust Inventory of Sexual Satisfaction (GRISS): psychometric properties within a Dutch population. *J Sex Marital Ther*, v.25, n.1, p.59-71. 1999.

TER KUILE, M.M. et al. Sexual functioning in women with chronic pelvic pain: the role of anxiety and depression. *J Sex Med*, v.7, n.5, May, p.1901-10. 2010.

TEUCHNER, B. et al. VIP, PACAP-38, BDNF and ADNP in NMDA-induced excitotoxicity in the rat retina. *Acta Ophthalmol*, Jan 8. 2010.

TINELLI, A. et al. Age-related pelvic floor modifications and prolapse risk factors in postmenopausal women. *Menopause*, Jul 21. 2009.

TOSCANO, M.G. et al. Dendritic Cells Transduced With Lentiviral Vectors Expressing VIP Differentiate Into VIP-secreting Tolerogenic-like DCs. *Mol Ther*, Jan 12. 2010.

TSUKADA, T. et al. Structure of the human vasoactive intestinal polypeptide gene. *DNA*, v.4, n.4, p.293-300. 1985.

UCKERT, S. et al. In vitro functional responses of isolated human vaginal tissue to selective phosphodiesterase inhibitors. *World J Urol*, v.23, n.6, p.398-404. 2005.

UTIAN, W.H. et al. Estrogen and progestogen use in postmenopausal women: July 2008 position statement of The North American Menopause Society. *Menopause*, v.15, n.4 Pt 1, Jul-Aug, p.584-602. 2008.

VAN GELDRE, L.A.; LEFEBVRE, R.A. Interaction of NO and VIP in gastrointestinal smooth muscle relaxation. *Curr Pharm Des*, v.10, n.20, p.2483-97. 2004.

VAN LUNSEN, R.H.; LAAN, E. Genital vascular responsiveness and sexual feelings in midlife women: psychophysiologic, brain, and genital imaging studies. *Menopause*, v.11, n.6 Pt 2, Nov-Dec, p.741-8. 2004.

VEILLE, J.C. et al. Effects of estrogen on nitric oxide biosynthesis and vasorelaxant activity in sheep uterine and renal arteries in vitro. *Am J Obstet Gynecol*, v.174, n.3, Mar, p.1043-9. 1996.

VERIT, F.F. et al. Progress in female sexual dysfunction. *Urol Int*, v.76, n.1, p.1-10. 2006.

VIRGOLINI, I. et al. Cross-competition between vasoactive intestinal peptide and somatostatin for binding to tumor cell membrane receptors. *Cancer Res*, v.54, n.3, p.690-700. 1994.

WEIG, W. [Re: female sexual function disorders: classification, diagnosis and treatment]. *Fortschr Neurol Psychiatr*, v.73, n.4, Apr, p.235; author reply 235-6. 2005.

WEN, Y. et al. Do extracellular matrix protein expressions change with cyclic reproductive hormones in pelvic connective tissue from women with stress urinary incontinence? *Hum Reprod*, v.21, n.5, May, p.1266-73. 2006.

WEN, Y. et al. Effect of relaxin on TGF-beta1 expression in cultured vaginal fibroblasts from women with stress urinary incontinence. *Reprod Sci*, v.15, n.3, Apr, p.312-20. 2008.

WHITESIDE, J.L. et al. Vaginal rugae: measurement and significance. *Climacteric*, v.8, n.1, p.71-5. 2005.

YANAGISAWA, H. et al. Fibulin-5, an integrin-binding matricellular protein: its function in development and disease. *J Cell Commun Signal*, Oct 2. 2009.

YANG, S.H. et al. Biologic Correlates of Sexual Function in Women with Stress Urinary Incontinence. *J Sex Med*, v.5, p.5. 2008.

YIANGOU, Y. et al. Isolation, characterization, and pharmacological actions of peptide histidine valine 42, a novel prepro-vasoactive intestinal peptide-derived peptide. *J Biol Chem*, v.262, n.29, Oct 15, p.14010-3. 1987.

YUNG, S.L. et al. Generation of highly selective VPAC2 receptor agonists by high throughput mutagenesis of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating peptide. *J Biol Chem*, v.278, n.12, p.10273-81. 2003.

ZHU, L. et al. Vasoactive intestinal peptide in vaginal epithelium of patients with pelvic organ prolapse and stress urinary incontinence. *Int J Gynaecol Obstet*, v.105, n.3, p.223-5. 2009.

ANEXOS

Anexo 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome da pesquisa: RELAÇÃO DO STATUS ESTROGENICO NA DISTRIBUIÇÃO E EXPRESSÃO DO PEPTIDEO INTESTINAL VASOATIVO NA MUCOSA VAGINAL

Pesquisadores envolvidos: Lúcia Alves da Silva Lara, Ana Carolina Sá Rosa e Silva.

Este texto é direcionado às mulheres que serão submetidas a procedimento eletivo de colpoperineoplastia anterior e posterior para correção de rotura de períneo e queda de bexiga.

Esta é uma pesquisa que vai estudar a presença de uma substância nos nervos dos vasos sanguíneos da vagina e sua relação com o hormônio da mulher. Esta substancia relaxa os vasos e permite que a vagina fique úmida no momento da relação sexual. Conhecer a distribuição desta substancia na vagina irá possibilitar a descoberta de problemas (doenças, cirurgias ou substâncias químicas) que levam ao ressecamento vaginal durante a relação sexual.

Para este estudo, serão utilizados os pedaços de tecido vaginal que sobram depois da cirurgia e que normalmente não são utilizados. Não será retirado um pedaço maior que o normal por causa deste estudo.

Para participar desta pesquisa você terá que responder a um questionário sobre sua função sexual e será colhido sangue para exames.

Tendo lido todo o texto e recebido as informações acima, e ciente dos meus direitos, abaixo relacionados, eu, -----
-----, RG-----, registro no HCFMRP-----, concordo e desejo participar como voluntária da pesquisa em questão.

São meus direitos:

1. A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados com a pesquisa para a qual sou voluntária;
2. A liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo em qualquer fase dele sem penalização alguma e sem que isso traga prejuízo ao meu cuidado;

3. A segurança de que não serei identificada e que será mantida o caráter confidencial da informação relacionada com a minha privacidade;
4. O compromisso de me ser proporcionada informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar minha vontade de continuar participando.

Ribeirão Preto (SP), -----de -----de 2006

Voluntária

Dra. Lúcia Alves da Silva Lara

Pesquisadora Responsável

Anexo 2 - Golombok-Rust Inventory Sexual Satisfaction (GRISS)

QUESTIONÁRIO FEMININO

1. Idade:.....
2. Escolaridade:

<input type="checkbox"/> Primeiro grau incompleto	<input type="checkbox"/> Primeiro grau completo
<input type="checkbox"/> Segundo grau incompleto	<input type="checkbox"/> Segundo grau completo
<input type="checkbox"/> Ensino superior incompleto	<input type="checkbox"/> Ensino superior completo
3. Situação conjugal:
 - União estável (morar junto)
 - Casada oficialmente
 - Solteira
 - Viúva
 - Separada
 - recasada
4. Tem filhos? Sim () Não ()
5. Religião:.....
6. Praticante: Sim () Não ()
7. Trabalha? Sim () Não ()
8. Renda pessoal mensal: R\$.....

RESPONDA ÀS QUESTÕES 9 A 17, PENSANDO NO SEU RELACIONAMENTO SEXUAL:

9. Você já teve relação sexual? Sim () Não ()

Se sua resposta foi “Não”, você não precisa continuar respondendo o questionário. Mesmo assim, por favor, coloque-o no envelope selado e deposite-o em uma caixa de Correio. Caso sua resposta tenha sido “Sim”:

10. Você tem parceiro sexual, no momento? Sim () Não ()

11. Em caso negativo, há quanto tempo você está sem um parceiro sexual? Descreva em números:

Ano (s)..... Mês(es)..... Semana(s)..... Dia(s).....

12. Em caso afirmativo, quem é esse parceiro? Se você tem mais de um, marque aquele com o qual você tem o maior número de relações sexuais:

Esposo () Noivo () Namorado () Amigo () Amante ()

Outro:.....

13. Qual o tempo de relacionamento com esse parceiro? Descreva em números:
Ano(s)..... Mês(es)..... Semana(s)..... Dia(s).....
14. Atualmente, você tem mais de um parceiro sexual? Sim () Não ()
15. Em caso afirmativo, indique o número:.....
16. Você tem relações sexuais:
() Somente com homens
() Somente com mulheres
() Tanto com homens como com mulheres
17. Nos últimos três meses, com que frequência, em média, você manteve relações sexuais?
() Nenhuma vez
() Uma a três vezes por mês
() Uma a duas vezes por semana
() Três ou mais vezes por semana
18. Na atualidade, você está tomando medicamentos para:
Diabetes Sim () Não ()
Depressão Sim () Não ()
Hipertensão Sim () Não ()
19. Marque o(s) produto(s) e/ou item (itens) relacionado(s) abaixo, caso você esteja fazendo uso de algum deles:
() pílula anticoncepcional
() Reposição hormonal
() Viagra
20. Você está grávida? Sim () Não ()
21. Em caso afirmativo, há quanto tempo? Indique em dias ou meses:.....


QUESTIONÁRIO GRISS – FEMININO

INSTRUÇÕES:

Leia estas perguntas com calma e decida pela resposta que melhor descreve como tem sido sua vida sexual. Faça um X no espaço correspondente. Responda todas as questões. Se você não tiver certeza absoluta de qualquer pergunta, marque a resposta que você achar mais apropriada. **Responda este questionário sem discutir qualquer pergunta com o seu parceiro.** É importante que cada pergunta seja respondida com honestidade e precisão.

	Nunca	Quase nunca	Às vezes	Freqüentemente	Sempre
1. Você sente desinteresse por sexo.					
2. Você pergunta ao seu parceiro o que ele gosta ou não na relação sexual de vocês.					
3. Existem semanas que você não tem relações sexuais.					
4. Você fica excitada sexualmente com facilidade.					
5. Você está satisfeita com a quantidade de tempo que vocês gastam nas preliminares.					
6. Você acha que sua vagina é tão apertada que o pênis de seu parceiro não pode entrar.					
7. Você tenta evitar ter relações sexuais com o seu parceiro.					
8. Você é capaz de ter orgasmo com o seu parceiro.					
9. Você gosta de abraçar e acariciar o corpo do seu parceiro.					
10. Você acha a relação sexual com o seu parceiro satisfatória.					
11. Você consegue introduzir o dedo em sua vagina sem desconforto.					
12. Você gosta de pegar e acariciar o pênis de seu parceiro.					
13. Você fica tensa e ansiosa quando seu parceiro quer ter relações sexuais.					
14. Você acha impossível ter um orgasmo.					
15. Você tem relações sexuais mais de duas vezes por semana.					
16. Você acha difícil falar para o seu parceiro o que você gosta ou não na relação sexual.					
17. É possível o pênis do seu parceiro entrar em sua vagina sem desconforto.					
18. Você sente falta de amor e afeição no relacionamento sexual com seu parceiro.					
19. Você gosta de ter os seus genitais tocados e acariciados pelo seu parceiro.					
20. Você nega-se a ter relações sexuais com o seu parceiro.					
21. Você consegue alcançar o orgasmo quando o seu parceiro estimula o seu clitóris durante as preliminares.					
22. Você se sente insatisfeita com a quantidade de tempo que o seu parceiro gasta durante a relação sexual com você.					
23. Você tem se sentido insatisfeita com o que você faz durante a relação sexual.					
24. Você acha que sua vagina é tão apertada que o pênis de seu parceiro não pode penetrar muito.					
25. Você gosta de ser tocada e acariciada pelo seu parceiro.					
26. A sua vagina se torna molhada durante o jogo sexual (preliminares).					
27. Você tem gostado das relações sexuais mantidas com o seu parceiro.					
28. Você fracassa em alcançar o orgasmo durante a relação sexual.					

Anexo 3 - Bula Receptor estrogênico alfa

 1.100 <div style="text-align: right; border: 1px solid black; border-radius: 50%; padding: 5px; display: inline-block;">RE</div>	
Data Sheet Estrogen Receptor mouse monoclonal antibody NCL-ER-6F11	
Specificity	Human estrogen receptor.
Clone	6F11
Ig Class	IgG1
Antigen used for immunisations	Prokaryotic recombinant protein corresponding to the full-length alpha form of the estrogen receptor molecule.
Hybridoma partner	Mouse myeloma (p3-NS1-Ag4-1)
Preparation	Lyophilised tissue culture supernatant containing 15mM sodium azide. Reconstitute with 1ml, 0.5ml or 0.1ml of sterile distilled water as indicated on vial label
Effective on frozen tissue	Yes. Optimum fixative Zamboni's, 10 minutes at 25°C (see Stefanini <i>et al.</i> , 1967).
Effective on paraffin wax embedded tissue	Yes (using the high temperature antigen unmasking technique: see coverleaf).
Recommendations on use	Immunohistochemistry Typical working dilution 1:40 - 1:80 High temperature antigen unmasking technique 60 minutes primary antibody incubation at 25°C Standard ABC technique Western blotting Typical working dilution 1:50 - 1:100 Also effective in indirect flow cytometry
Positive controls	Lobular and tubular breast carcinomas tend to express estrogen receptor.
Staining pattern	Nuclear
Storage and stability	Store unopened lyophilised antibody at 4°C. Under these conditions, there is no significant loss in product performance up to the expiry date indicated on the vial label. The reconstituted antibody is stable for at least two months when stored at 4°C. For long term storage, it is recommended that aliquots of the antibody are frozen at -20°C (frost-free freezers are not recommended). Repeated freezing and thawing must be avoided. Prepare working dilutions on the day of use.
Legal consideration	NCL-ER-6F11 is recommended FOR RESEARCH USE ONLY .
Application	Estrogen receptor (ER) content of breast cancer tissue is an important parameter in the prediction of prognosis and response to endocrine therapy. Traditionally, ER status has been determined using the dextran coated charcoal (DCC) method, carried out only in specialised centres. The introduction of monoclonal antibodies to ER has allowed the determination of receptor status of breast tumours to be carried out in routine histopathology laboratories. Initially, monoclonal antibodies recognising ER were only effective on frozen material. NCL-ER-6F11, effective on formalin-fixed, paraffin-embedded material, allows the determination of ER in routinely processed and archived material.
References	Braidman I P, Barnes C, Selby P L, <i>et al.</i> , Preliminary report of impaired oestrogen receptor- α expression in bone, but no involvement of androgen receptor, in male idiopathic osteoporosis. <i>Journal of Pathology</i> 192 : 90-96 (2000). Im S, Lee E S, Kim W, <i>et al.</i> , Expression of progesterone receptor in human keratinocytes. <i>Journal of Korean Medical Science</i> . 15 : 647-654 (2000). Leake R, Barnes D, Pinder S, <i>et al.</i> , Immunohistochemical detection of steroid receptors in breast cancer: a working protocol. <i>Journal of Clinical Pathology</i> 53 (8): 634-635 (2000). Kawabata K, Watanabe K, Ozaki S, <i>et al.</i> , Utility of the paraffin-embedded section method on the detection of estrogen receptor from breast cancer tissues - comparison of the paraffin-embedded section method (6F11 and 1D5) with frozen section (H222) and dextran-coated charcoal (DCC) ones. <i>Rinsho Byon</i> 47 (8): 767-773 (1999). Bevit D J, Milton I D, Piggot N, <i>et al.</i> , New monoclonal antibodies to oestrogen and progesterone receptors effective for paraffin section immunohistochemistry. <i>Journal of Pathology</i> 181 : 228-232 (1997). Hurlimann J, Gebhard S and Gomez F, Oestrogen receptor, progesterone receptor, pS2, ERD5, HSP27 and Cathepsin D in invasive ductal breast carcinomas. <i>Histopathology</i> 23 : 239-248 (1993). Sneed D R J, Bell J A, Dixon A R, <i>et al.</i> , Methodology of immunohistological detection of estrogen receptor in human breast carcinoma in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue: a comparison with frozen section methodology. <i>Histopathology</i> 23 : 233-238 (1993). Clark G M and McGuire W L, The clinical usefulness of oestrogen-receptor and other markers of hormone dependence. <i>Proceedings of the Royal Society of Edinburgh</i> 95B : 145-150 (1989). Henry J A, Angus B and Horne C H W, Oestrogen receptor and oestrogen regulated proteins in human breast cancer: a review. <i>KEIO Journal of Medicine</i> 38 : 241-261 (1989). Shintaku P and Said J W, Detection of estrogen receptors with monoclonal antibodies in routinely processed formalin-fixed paraffin sections of breast carcinoma. <i>American Journal of Clinical Pathology</i> 87 : 161-167 (1987). Mason B H, Holdaway I M, Mullins P R, <i>et al.</i> , Progesterone and oestrogen receptors as prognostic variables in breast cancer. <i>Cancer Research</i> 43 : 2985-2990 (1983). Stefanini M, De Manino C and Zamboni L, Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. <i>Nature</i> 216 : 173-174 (1967).
Novocastra Laboratories Ltd Balliol Business Park West, Benton Lane, Newcastle upon Tyne NE12 8EW, United Kingdom Telephone: +44 (0) 191 215 0567 Facsimile: +44 (0) 191 215 1152 <small>Registered Office: Balliol Business Park West, Benton Lane, Newcastle upon Tyne NE12 8EW, UK. Registered No. 215300 (England and Wales)</small>	
ER-6F11-02/02	

Anexo 4 - Recursos necessários e fonte de orientação

Toda a aparelhagem e equipamentos (bens permanentes) necessários para a execução do projeto estão disponíveis no laboratório de anatomia patológica do departamento de patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e do Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia da mesma instituição.

Para o orçamento destinado à compra de bens de consumo (kit para estudo imunohistoquímica, kit para receptor estrogênico, Kit para as dosagens de FSH, Prolactina, TSH e glicemia) será pleiteada a verba junto à fundação de apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do HCFMRP/USP (FAEPA). Os materiais a serem adquiridos com esta verba e o respectivo orçamento encontram-se relacionados no anexo (Anexo 2)

ARTIGOS PREPARADOS

**The relation of estrogen status on vasoactive intestinal peptide
expression and distribution in vaginal wall.**

The relation of estrogen status on vasoactive intestinal peptide expression and distribution in vaginal wall.

Introduction

The human sexual response comprises a physical and mental interaction and is dependent on the anatomical and functional integrity of both of these components. This response is complex and specific to each gender and is influenced by the cultural and socioeconomic conditions of an individual. It is modulated by hormones, neurotransmitters and neuropeptides¹⁻². Recently, greater attention has been paid to the physiology of the female sexual response, which is still poorly understood. In particular, studies have focused on the process of arousal, which depends on an understanding of genital anatomy. Such an understanding principally includes the various processes involved in altering the tone of the erectile tissue, vaginal musculature³ and vascular dynamics. These mechanisms are part of the events responsible for the evolution of arousal to the orgasmic phase. The state of sexual arousal is objectively expressed through vaginal lubrication⁴.

The process by which vaginal lubrication occurs in response to a sexual stimulus can be described as the relaxation of the dense vascular network of the lamina propria, which results in increased blood flow and vascular engorgement and a pressure increase on the vaginal and intracavernous walls⁵⁻⁸. As a result, transudate droplets form and coalesce to form the secretion that lubricate the vagina⁹. This entire process is mediated by the actions of neurotransmitters and neuropeptides, especially nitric oxide and Vasoactive Intestinal Polypeptide (VIP)¹⁰

VIP, the object of this study, has a broad spectrum of action that includes modulation of cerebral metabolism, control of blood flow, effects on motility and gastrointestinal secretion, cardiac and respiratory function, neuroendocrine secretion, modulation of the immune response, the central and genital perception of sexual excitation and reproductive function¹¹. It is a neuropeptide produced in the neuron and released by the synapses, which are in direct contact with vascular as well as non-vascular smooth muscle cells in the vaginal wall¹², and thus it is expressed in nerve fibers of various organs innervated by the central and peripheral nervous system¹³. VIP has been shown to have elevated expression in the lumbar and sacral spinal cord regions, which exert control on urogenital functions, and is also found in motor nerve endings as well as sensitive pelvic organs¹⁴. Additionally, nerve fibers containing VIP are more abundant in the vagina, cervix and clitoris, and less numerous in the uterine body and ovary. These fibers innervate epithelial cells, blood vessels, and smooth muscle cells¹⁵, considering that the fibers are located on the surface of the lamina propria in the vaginal wall¹⁶. In the reproductive system, VIP is involved in important morphofunctional modifications that are crucial for a pleasurable sexual experience¹⁷; however, its principal function is related to relaxing the vascular and non-vascular smooth muscle in the vaginal wall, which leads to local vasodilatation. This is the principal event in the process of arousal and results in vaginal lubrication¹⁸⁻¹⁹.

The effects of age²⁰, in conjunction with hypoestrogenism, in promoting changes in the vaginal wall are already well-recognized²¹ and known to result in diverse structural changes^{5, 7, 22-25} and alterations in the expression of genes that control the synthesis and action of hormone receptors and neuropeptides involved in the vaginal lubrication mechanism²⁶.

Sex steroids appears to have a modulatory role on VIP and its expression, an effect that has previously been demonstrated in various organs of the human body and in experimental animals. For instance, an increase in the concentration of VIP has been observed in the pituitary of rats treated with estradiol ²⁷, suggesting that the steroid stimulated expression of VIP gene²⁸. In contrast, a decrease in expression of VIP gene in the hypothalamus was observed one week after the subcutaneous implant of estrogen pellets²⁹. These findings suggested that estrogen exerts a tissue-specific influence on VIP expression and that an inhibition of this effect occurs during prolonged estradiol exposure ²⁸.

Although various actions of VIP have been recognized in the human body, including its participation in immunological, anti-inflammatory, hemodynamic and reproductive processes³⁰, experimental studies have sought to better elucidate the role of this neuropeptide in the process of sexual arousal. To this end, recent studies in rabbits³¹ and rats³² have demonstrated that there was vaginal relaxation after intravenous infusion of VIP. Recently the concept that genital dystopia is related to decreased expression of this substance in the vaginal wall has also been introduced ³³.

The present study proposes to evaluate the relation of estrogen status on VIP expression in vaginal wall and to correlate the VIP score with estrogen receptor alpha score in normal and hypoestrogenic women. This information may contribute to the continued understanding of the female sexual physiology and point out new paths in the investigation and treatment of female sexual dysfunction.

1. Patients and Methods

This study was approved by the Research Ethics Committee of the XXX); all patients gave written informed consent to participate. Thirty-five women that submitted

to anterior and posterior colpoperineoplasty due to posterior vaginal wall laxity and anterior vaginal wall prolapse up to grade II were selected for this cross-sectional study. A gynecological exam was performed before surgery, and the Baden-Walker halfway scoring system was used to grade patients' pelvic organ prolapse³⁴. The patients were divided into two groups: the premenopausal group (PG) consisted of women aged 20 to 40 years with FSH \leq 12 mIU/ml and regular menstrual cycles, whereas the menopausal group (MG) consisted of women aged $<$ 65 years with amenorrhea for more than one year and FSH \geq 40 mIU/ml. Patients who had been on hormonal treatment up to one year before the study and patients with diabetes mellitus, pelvic pain, neuropathy, hyperprolactinemia, clinical hyperandrogenism, and chronic medical illnesses could alter genital anatomy such as genital cancer and vulval dysplasia that were excluded. Five of the 35 patients were excluded; two patients withdrew, one was infected with HIV, and samples from two patients were discarded due to inadequate material fixation.

The same surgeon operated on all patients. Sample collection was standardized and was always performed on the midline of the anterior vaginal wall between 5 mm from the outer orifice and the limit adjacent to the ectocervix; on the posterior wall, surgery was performed from the hymeneal ring up to 1 cm from the uterine cervix. Each surgical specimen was sectioned into proximal, middle, and distal fragments, fixed in formaldehyde 10%, embedded in paraffin, and cut into 4- μ m sections. Slides were then immunostained for ER-alpha and VIP. A rabbit polyclonal antibody to VIP (NCL-VIPp, Novocastra Labs UK) and a mouse monoclonal antibody ER-alpha (NCL-ER-6F11, Novocastra Labs UK) were used as immunohistochemical markers. The immunohistochemical assays for VIP and ER-alpha were performed in accordance with the manufacturers' instructions. The pattern of VIP antibody staining is cytoplasmic of

smooth muscle cells and extracellular-associated staining, and ER-alpha pattern is nuclear staining.

ER –alpha immunohistochemistry technique.

The staining pattern of ER 6F11/2 is nuclear which allows the qualitative identification by light microscopy of antigens in sections of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue, via sequential steps as follow: Deparaffinization of slides, which are then dipped in xylol for 10 minutes, 10 minutes in absolute alcohol. Wash slides with distilled water for 5 minutes. Wash in distilled H₂O and antigen retrieval in Tris EDTA PH9 twenty minutes of boiling in a microwave oven. Cool at room temperature for 10 minutes. Wash with water. Wash with distilled water and Tris-Buffered Saline (TBS) pH 7.4. Circulated the blade with pen and hydrophobic peroxidase endogenous blocked for 10 minutes. Wash in TBS pH 7.4 for 2 times for 5 minutes and then wash with TBST for 5 minutes. Incubate slides with the primary antibody for 2 hours, followed by washing in TBST 3 times for 3 minutes. Incubate in the Post Primary (kit Novolink Polymer-Novocastra) for 30 minutes. Wash with TBST 3 times for 3 minutes. Incubate in the polymer (Polymer-kit Novolink Novocastra) for 30 minutes. Wash in TBST 3 times for 3 minutes, Tris-Hcl pH 7.6 twice for 3 minutes and DAB for 5 to 12 minutes. Wash with Tris-Hcl pH 7.6 twice 3 minutes and distilled H₂O. Counterstain with Haematoxylin. mountant for 10 to 20 minutes, wash in water, blued with ammonia water. Dehydrate, clear and mount sections with DPX

VIP immunohistochemistry technique.

Preheat the following to 37°C using a water bath:(i) 200ml of TBS,(ii) 200ml of distilled water. Dissolve 0.2g Trypsin 250 and 0.2g Calcium Chloride in the 200ml of TBS. Once the trypsin solution is at 37°C, pH to 7.8 with 1M sodium hydroxide. Place rehydrated paraffin sections in the distilled water to preheat the sections to 37°C for a

minimum of 5 minutes. Incubate sections in trypsin solution at 37°C for 30 minutes. Rinse sections in running tap water. Place sections in 0.5% v/v hydrogen peroxide/methanol for 10 minutes. Pretreat slides for antigen retrieval using trypsin. Wash slides with distilled water for 5 minutes. Wash slides in 50mM Tris-Buffered Saline (TBS) pH 7.6 for 5 minutes. Cover sections with blocking reagent eg 10% v/v normal swine serum in TBS for 10 minutes. Remove excess blocking reagent and replace with primary antiserum diluted in blocking reagent (1:100 - 1:200), for 60 minutes at 25°C or overnight at 4°C. Wash in TBS buffer for 2 x 5 minutes. Remove excess TBS buffer and incubate sections with biotinylated swine anti-rabbit secondary diluted in blocking reagent for 30 minutes at 25°C. Wash in TBS buffer for 2 x 5 minutes. Remove excess TBS buffer and incubate sections with ABCComplex/HRP for 30 minutes at 25°C. Wash in TBS buffer for 2 x 5 minutes. Develop with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB). Rinse slides in water. Counterstain with Haematoxylin. Dehydrate, clear and mount sections with DPX mountant.

Control sections were incubated with the secondary antiserum only for both ER-alpha and VIP. A pathologist (A.R.S.) conducted a blind reading of the immunohistochemistry for the estrogen-alpha receptor and VIP using a Carl Zeiss optical microscope with a 40x objective. The labeled areas were identified after scanning the entire length of the section at a 20x magnification. The ER-alpha and VIP scores were visually grading. Assessment of estrogen- α receptor labeling was performed semi-quantitatively adopting the H-score (Table 1) and using the formula: $H\text{-score} = \sum P_i \times (i + 1)$ where i is the marking intensity and P_i is the marking percentage³⁶. Each segment was assessed independently and each region immunostaining within each segment. One hundred cells were counted, and the percentage of cells with nuclear marking for the estrogen receptor was calculated, with a score that varied from 0 to 8.

For vascular VIP scoring, we opted for a semiquantitative scale: 0, no brown staining; +, weak brown staining with sparse distribution; ++, brown staining with concentrated distribution; +++, strong brown staining with netlike distribution. The VIP analysis was conducted on samples from the vaginal wall correspondent to 1/3 distal, middle and proximal.

ER-alpha Immunohistochemistry	Score/100 cells	ER/positive
	0	none
	1	1/100
Number of staining nucleon	2	1/100 a 1/10
	3	1/10 a 1/3
	4	1/3 a 2/3
	5	> 2/3
	Score	ER/intensity
Nuclear brown staining	0	none
	1	week
	2	intermediary
	3	strong

Table 1: ER-alpha H-score.

2. Statistical analysis

The data were stored in a Microsoft Office Excel 2003 spreadsheet. Data are reported as means \pm SD and were analyzed using GraphPad Prisma 5.00 software. The normal distribution was determined by the Kolmogorov-Smirnov test, and data presented normal distribution were analyzed by parametric test (two-tailed Student's t-test), and non parametric data with non Gaussian distribution were analyzed by the Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney U nonparametric test. For comparison, it was also show Spearman correlations. Level of significance was set at $p < 0,05$.

Results

There was a significant difference between groups with regard to age, FSH, and estradiol levels and there was not significant difference between groups with regard to

glycemic index, TSH and prolactina level (Table 2). These findings successfully defined the menacme and menopause groups. There was no significant difference with regard to BMI (Table 2).

Patients profile	PG N=18	MG N=12	<i>p</i>
Age (years)	35.67± 4.29	53.54 ± 5.36	<0.0001
BMI (kg/m ²)	20.04± 3.65	21.32± 2.36	0.32
FSH (mUI/ml)	6.69± 3.30	75.57± 30.71	<0.0001
Estradiol (pg/ml)	57.21± 42.66	31.28± 12.01	0.008
Glycemia (mg/ml)	87.06 ± 1.47	89.25 ± 2.14	0.39
TSH (uIU/mL)	1,68±1,05	2,23± 1,40	0,27
PRL (ng/ml)	9,53± 4,86	12,09± 6,30	0,25

Table 2. Characteristics of the patients. (PG) Pre-menopausal group, (MG) Menopause group. Student's t test, Mann Whitney test for non Gaussian distribution, significance level $p < 0.05$. (BMI) body mass index, (FSH) follicle stimulating hormone, (TSH) thyroxin stimulating hormone, (PRL) prolactin releasing hormone

ER-alpha expression was seen in the nucleus cells of epithelium, lamina propria and smooth muscular layer of vaginal wall and immunohistochemical analysis of VIP showed that its presence was specifically identified in the wall of larger vessels and smooth muscle layer along the entire vaginal wall.

There was a significant difference in the ER-alpha score of the three layers of the vaginal anterior and posterior wall between the two groups; the scores of the PG were significantly greater than those of the MG (Figure 1).

The VIP profiles of vaginal wall in pre and postmenopausal groups are shown in Table 3.

VIP Staining	PG N (18)		MG N (12)	
	AW	PW	AW	PW
0	0	0	0	0
+	6	4	8	8
++	6	6	2	2
+++	6	8	2	2

Table 3. Expression of vasoactive intestinal peptide (VIP) in the vaginal wall in premenopausal (PG) and menopausal (MG) patients with organ prolapse. (AW) anterior wall, (PW) posterior wall.

There was no significant difference in the VIP score when the three segments of both the anterior and posterior vaginal wall of the same group were compared; however, there was a significant difference in the intergroup comparison. On the posterior wall, the PG had a significantly greater score than the MG (PG VIP score 2.22 ± 0.81 and MG 1.50 ± 0.80 , $p=0.02$), while there was no significant difference on the anterior wall between the two groups (PG VIP score 2.00 ± 0.86 and MG 1.50 ± 0.79 , $p=0.17$) (Figure 1). There was no difference in the GRISS pain score between the two groups (PG, 3.69 ± 1.95 and MG, 3.14 ± 1.77 and $p=0.53$).

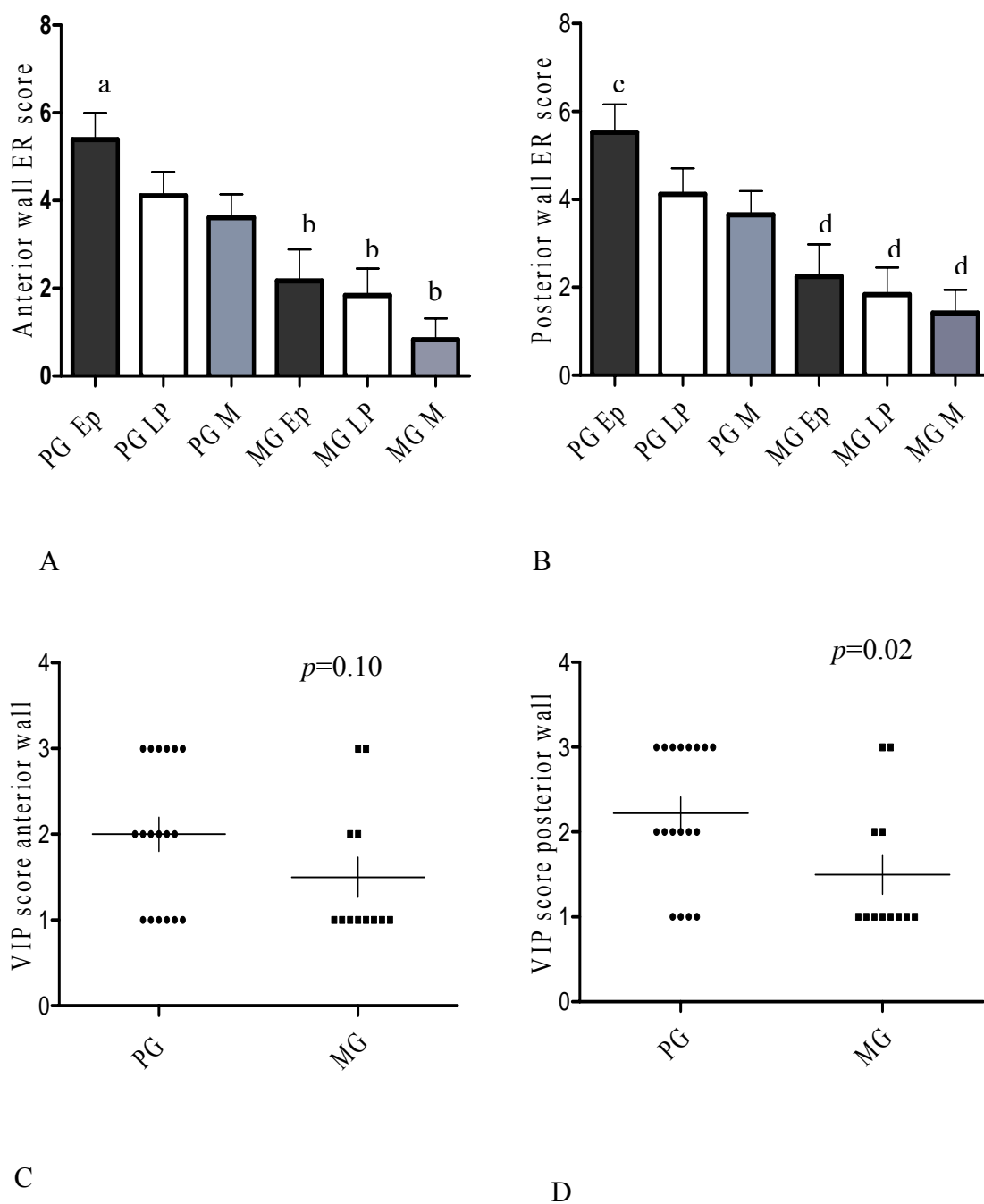


Figure 1. (A and B) comparison of the ER-alpha scores between premenopause and menopause groups (PG and MG), Ep (epithelial), LP (lamina propria) and M (muscular layer), ($a \neq b$, $p < 0.0001$ and $c \neq d$, $p = 0.0002$) difference. (C and D) comparison of the VIP scores of the anterior and posterior vaginal wall between the PG and MG. Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney test. Significance level was set at $p < 0.05$.

There was no correlation between the VIP and ER-alpha scores (CI 95%, -0.2828 to 0.4332, $r=0.0864$, $p=0.65$) or between the estrogen concentrations and the VIP score (CI 95%, -0.06581 to 0.6258, $r=0.3224$, $p=0.10$). There was no correlation between the estrogen concentrations and the ER-alpha score (CI 95%, -0.2718 to 0.4789, $r=0.1207$, $p=0.55$). There was a negative correlation between age and the ER-alpha score; CI 95% -0.6528 to -0.003215, $r=-0.3728$, $p=0.04$ (Figure 3, A). There was a negative correlation between age and the VIP score; CI 95% -0.6748 to -0.04251, $r=-0.4061$, $p=0.03$ (Figure 2, B).

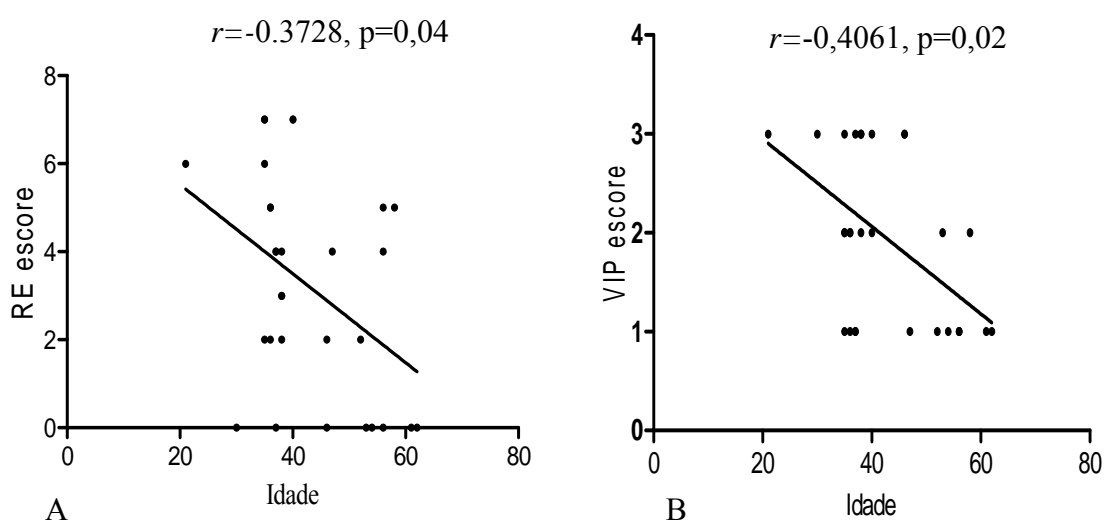


Figure 2: Correlation between the ER-alpha score and age (A) and between the VIP score and age (B). Spearman test for correlations. Significance level $p<0.05$.

3. Discussion

The results from this study indicate that the characterization of the two groups as premenopausal and menopausal according to the estrogen status and age was appropriate, as well as revealing a similarity between them with respect to the BMI. These are relevant factors for the consistency in our findings because obesity can reduce estradiol

serum concentrations³⁷. In addition, the vaginal wall composition varied according to the layer analyzed³⁸ and was subject to the effects of sex steroid fluctuations, especially estrogen, which is recognized as being responsible for maintaining the vagina in a trophic state⁵.

The action of estrogen in the vaginal wall is principally exerted through the activation of its amply distributed alpha-receptors in the epithelial, lamina propia and muscular layer^{23, 39-40}. It is recognized that structural alterations in these receptors are associated with genital dystopia⁴¹ and that other morphological changes in the organ that are potentially harmful to its function. The activity of estrogen in the genitalia can be measured through the activation of the alpha-receptor⁴², although the distribution of this receptor in the vaginal wall is still subject to controversy. A study comparing seven women of reproductive age with 33 women who were postmenopausal carriers of genital prolapse found no difference in ER-alpha expression in the vaginal wall between the groups³⁹; however, further controlled tests showed greater expression of this receptor in the vagina of women in the reproductive phase than in postmenopausal women⁴³, in accordance with the findings of this study. Reinforcing these findings, another work showed that postmenopausal women who received hormonal therapy had greater alpha-receptor expression in the vaginal wall²³. In this study, we verified that greater estrogen concentrations are associated with increased expression of estrogen-alpha receptors, suggesting that estrogen may modulate its receptors in the vaginal wall by acting as a positive feedback mechanism to increase the sensitivity of the target tissue (vagina) to estrogen. Estrogen also changes the expression of numerous genes that participate in important processes connected to the protection and tropism of the genitalia⁴⁴⁻⁴⁵. These genes are essential for the function of the vagina in the process of childbirth and in comfortable and pleasurable coitus without pain⁵. When pain occurs

during sexual relations, it is almost always a consequence of insufficient lubrication and inadequate relaxation of the smooth muscle of the vaginal wall ⁴⁶; these are crucial events for the formation of the arousal platform ¹⁹. The mechanism that controls vascular plasticity depends on the actions of neurotransmitters such as nitric oxide and neuropeptides, especially VIP, which act together through different mechanisms to promote vasodilatation ^{19,47}. The widespread distribution of VIP in the urogenital region suggests an important role for this peptide in genital function ⁴⁸. It is increasingly evident that the action of VIP in the process of sexual arousal is dependent on the dynamics of vaginal wall vascularization ^{32, 49}. In the present study, immunohistochemical analysis of VIP showed that its presence was identified specifically in greater caliber vessel walls of the lamina propria and smooth muscle layer. In the findings described here, there is no difference in VIP distribution throughout the anterior vaginal wall, regardless of the estrogen status of the patient, in contrast with results previously been demonstrated by other authors ^{16,33}. Although, VIP expression in the posterior wall is reduced after menopause, suggesting a possible regulatory effect of estrogen on VIP expression. The fact that this change in expression does not occur in the anterior wall could be explained by the presence of important anatomical structures in this region, such as the urethra, bladder and the vasculo-nervous plexus connected to the clitoris, which would meet the blood influx demand for these locations, independent of the activity of estrogen. Because VIP is specifically found in nerves endings in close relation to the vascular and non-vascular smooth muscle of the vaginal wall ^{19,33,50}, its expression is maintained in the anterior wall. This theory is supported by the results of other studies that demonstrated the morphological difference between the anterior and posterior vaginal wall with respect to neuromuscular content ⁵¹.

Recently, it has been shown that biopsies from the vaginas of normo-estrogenic women undergoing total vaginal hysterectomy (TVH), laparoscopic assistant hysterectomy (LAVH) and tension-free vaginal tape (TVT) procedures for diverse pathologies show greater VIP expression in the anterior vaginal wall when compared to postmenopausal women³³. However, the women in that study presented with some factors that are known to interfere with VIP expression, such as parity, age, presence of malignant pathologies and genital prolapse⁵²⁻⁵³. In fact, evidence exists that lower VIP expression occurs in the vaginal wall of female carriers of genital prolapse³³ and in nulliparous women⁵⁴, and that greater expression of this neuropeptide is associated with carcinoma of the cervix⁵⁵. A recent study showed that women who had previously given birth presented a greater concentration of nervous fibers labeled for VIP in their anterior vaginal wall in comparison with their posterior vaginal wall⁵⁴. Other authors have demonstrated that VIP expression is lower in the anterior vaginal wall of pre- and postmenopausal women with urinary incontinence when compared to asymptomatic women⁵⁰. In this study, the patients included are carriers of grade I and II prolapse and did not present other passive pathologies that interfere with VIP expression; additionally, there was homogenization of the sample collection as they were obtained by the same surgeon at a standardized collection site. Such characteristics were important for obtaining the results of this study. However, measurement of vaginal blood flow in each group should be done as well as the inclusion of a younger control group with surgical menopause to provide additional information with regard to the estrogen changes in vaginal wall would greatly enriched this study.

The functions of the urogenital system that are related to urination and pleasurable coitus are dependent on the preservation of vascularization, appropriate vascular dynamics and vaginal smooth muscle, which is additionally important for the

protection of the urinary tract from potential injuries during coitus⁵⁶⁻⁵⁷. These phenomena are closely associated with properties of VIP⁵⁴. It is possible for postmenopausal women to continue to have appropriate VIP concentrations in the anterior vaginal wall for a longer time. Qualitatively, it was possible to observe that postmenopausal women less than fifty years old presented VIP scores greater than those of older women, highlighting the fact that other factors related to aging are more important than estrogen status in VIP expression. This also reinforced the findings from other authors that demonstrated that age, and not estrogen status, interferes with VIP expression in the vaginal wall^{33, 50}. In the present study, a correlation between 17- β estradiol or estrogen receptor scores with the VIP score was not found. Paradoxically, various experimental studies have demonstrated that there is fluctuation in expression of this neuropeptide in the upper genital tract under the estrogen stimulus induced by pregnancy, the estrous cycle or estradiol injections⁵⁸. It has also been found that postmenopausal women undergoing hormonal therapy presented an identical vasodilator response to VIP as women in menacme; that is, as in untreated women, the VIP infusion did not provoke an increase of vaginal blood flow⁵⁹. There is also evidence that lower estrogen-alpha receptor expression is associated with lower VIP expression in the uterine arteries of postmenopausal women⁶⁰. Additionally, the nasal mucus of menopausal women in hormonal therapy had increased VIP expression compared to estrogen-alpha receptor expression⁶¹. However, experimental studies with rats have shown that estrogen infusion over a prolonged period increases VIP expression in the pituitary, but not in other tissues²⁸. In this study, the absence of a correlation between estrogen status and the VIP score could be explained by the fact that a single serum dosage of estradiol does not wholly reflect a woman's true hormonal state. Nevertheless, the estrogen receptor score can indirectly reflect the estrogen state

of the vaginal tissue because the expression of this receptor is altered by circulating estrogen⁴⁰ even though structural alterations in the receptors due to age and polymorphism⁶²⁻⁶⁴ can alter the tissue response to VIP and estrogen. Other important factors should be considered when attempting to correlate VIP expression with estrogen receptor expression and VIP serum concentrations. The amino acid sequence of VIP mRNA indicates that there are other active peptides derived from *prepro VIP*⁶⁵⁻⁶⁶ whose synthesis is dependent on the tissue in which transformation occurs. In some tissues, *prepro VIP* is transformed in peptide histidine-methionine (PHM)⁶⁷, and in other tissues, the 42-amino acid peptide is known as peptide histidine valine (PHV)⁶⁸⁻⁶⁹. Both are expressed in the neuronal elements throughout the genital tract, which are intimately related with the epithelial layer, the perivascular tissue and the smooth muscle³. They present a cross-reaction with VIP in which they are supportive in various biological actions⁷⁰. The different VIP isoforms are known to have both overlapping and discrete functions⁷¹⁻⁷³. The labeling that results from VIP immunohistochemistry is actually the sum distribution of VIP and the two other ones and their individual proportions in the vaginal wall is unknown. Additionally, it is possible that the polymorphisms may alter the immunohistochemical labeling. All of these aspects need to be considered when interpreting the results of this study. Notwithstanding, it is worth stressing that, although there exists strong evidence pointing to a positive correlation between VIP and serum estrogen levels in other tissues, these data has not been replicated in the vaginal wall. The ideal comparison would be to correlate the serum concentrations of VIP with those of estrogen and to associate the findings with the expression of the respective receptors in the vaginal wall, evaluating at the same time the clinical state of the patient. However, the structural fragility of VIP, as well as its susceptibility to proteolytic enzyme action and chemical substances⁵², makes it difficult

to handle using the current technology. Although all factors could not be considered in this study, the absence of correlation between the VIP and estrogen receptor scores in recent studies ^{33, 50} suggests that there are processes besides estrogen deficiency that alter VIP expression in the vaginal wall. It may be that in the vagina, molecular alterations relative to aging are, in fact, more important than estrogen concentration on VIP expression ⁴¹. Such changes would thus act as co-factors in the pathophysiology of the vaginal changes related to the process of lubrication.

Additionally, appropriate estrogen serum levels are fundamental for trophism of the vaginal wall ⁵ because, in hypoestrogenic conditions, a decrease occurs in the number of blood vessels, nerve, and type 1 collagen and the bundles of vascular and non-vascular smooth muscle in the vaginal wall. These are conditions that potentially can compromise the resilience and sensitivity of the vagina ²⁰. In addition, in another study, we discussed that increased pressure occurs on the vaginal wall after menopause in women with prolapse at the expense of the muscle layer. We postulate that a compromise occurs as a result of the increased apoptotic indices due to prolapse, hypoestrogenism and aging ²⁰, which lead to the formation of local fibrosis. All of these changes can compromise vaginal lubrication and, consequently, the sexual response.

Conclusion

VIP expression in the posterior vaginal wall decreases with the advent of menopause while in the anterior wall this event was not observed suggesting the lack of a direct correlation between VIP expression and estrogen status. It is possible that other factors such as increased vascularization connected to the important structure such as the urethra, which would meet the blood influx demand for these locations, are responsible to maintain VIP concentrations in this site independent of the activity of estrogen. It is also possible that age is the primary factor that negatively influences the

expression of this neuropeptide in the vaginal wall, although more study will be necessary in order to define the true role of hypoestrogenism and age in VIP expression in the vaginal wall.

Greater estrogen concentrations are associated with increased expression of estrogen-alpha receptors, indicating an autoregulatory mechanism of estrogen on its own receptors in the vaginal wall.

4. References

1. Verit FF, Yeni E, Kafali H. Progress in female sexual dysfunction. *Urologia internationalis*. 2006;76(1):1-10.
2. Weig W. [Re: female sexual function disorders: classification, diagnosis and treatment]. *Fortschritte der Neurologie-Psychiatrie*. 2005 Apr;73(4):235; author reply - 6.
3. Bredkjoer HE, Palle C, Ekblad E, Fahrenkrug J, Ottesen B. PreproVIP-derived peptides in the human female genital tract: expression and biological function. *Neuropeptides*. 1997 Jun;31(3):209-15.
4. Levin RJ. The physiology of sexual arousal in the human female: a recreational and procreational synthesis. *Arch Sex Behav*. 2002;31(5):405-11.
5. Lara LA, Useche B, Ferriani RA, Reis RM, de Sa MF, de Freitas MM, et al. The effects of hypoestrogenism on the vaginal wall: interference with the normal sexual response. *The journal of sexual medicine*. 2009 Jan;6(1):30-9.
6. Kim NN, Min K, Pessina MA, Munarriz R, Goldstein I, Traish AM. Effects of ovariectomy and steroid hormones on vaginal smooth muscle contractility. *International journal of impotence research*. 2004 Feb;16(1):43-50.
7. Giraldi A, Marson L, Nappi R, Pfaus J, Traish AM, Vardi Y, et al. Physiology of female sexual function: animal models. *The journal of sexual medicine*. 2004 Nov;1(3):237-53.
8. Kim SO, Lee HS, Ahn K, Park K. Effect of estrogen deprivation on the expression of aquaporins and nitric oxide synthases in rat vagina. *The journal of sexual medicine*. 2009 Jun;6(6):1579-86.
9. Tang LJ, De Seta F, Odreman F, Venge P, Piva C, Guaschino S, et al. Proteomic analysis of human cervical-vaginal fluids. *J Proteome Res*. 2007;6(7):2874-83.
10. Ottesen B, Fahrenkrug J. Vasoactive intestinal polypeptide and other preprovasoactive intestinal polypeptide-derived peptides in the female and male genital tract: localization, biosynthesis, and functional and clinical significance. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1995;172(5):1615-31.
11. Said SI, Mutt V. Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine. *Science (New York, NY)*. 1970 Sep 18;169(951):1217-8.
12. Rodriguez-Martinez H. Nerves immunoreactive to vasoactive intestinal polypeptide in the porcine female genital tract. *Acta anatomica*. 1990;139(3):287-91.
13. Najimi M, Rachidi F, Afif A, Chigr F. Developmental pattern of VIP binding sites in the human hypothalamus. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1070:462-7.

14. Kawatani M, de Groat WC. A large proportion of afferent neurons innervating the uterine cervix of the cat contain VIP and other neuropeptides. *Cell Tissue Res.* 1991;266(1):191-6.
15. Blank MA, Gu J, Allen JM, Huang WM, Yiangou Y, Ch'ng J, et al. The regional distribution of NPY-, PHM-, and VIP-containing nerves in the human female genital tract. *Int J Fertil.* 1986;31(3):218-22.
16. Lynch EM, Wharton J, Bryant MG, Bloom SR, Polak JM, Elder MG. The differential distribution of vasoactive intestinal polypeptide in the normal human female genital tract. *Histochemistry.* 1980;67(2):169-77.
17. Uckert S, Ehlers V, Nuser V, Oelke M, Kauffels W, Scheller F, et al. In vitro functional responses of isolated human vaginal tissue to selective phosphodiesterase inhibitors. *World J Urol.* 2005;23(6):398-404.
18. Giuliano F, Allard J, Compagnie S, Alexandre L, Droupy S, Bernabe J. Vaginal physiological changes in a model of sexual arousal in anesthetized rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001;281(1):R140-9.
19. Levin RJ. VIP, vagina, clitoral and periurethral glans--an update on human female genital arousal. *Experimental and clinical endocrinology.* 1991;98(2):61-9.
20. da Silva Lara LA, da Silva AR, Rosa ESJC, Chaud F, Silva-de-Sa MF, Meireles ESAR, et al. Menopause Leading to Increased Vaginal Wall Thickness in Women with Genital Prolapse: Impact on Sexual Response. *The journal of sexual medicine.* 2009;28:28.
21. Lotocki W. [Neurotrophic basis of atrophic changes in the vagina and vulva]. *Przegl Lek.* 1999;56(1):81-5.
22. Burger H. The menopausal transition--endocrinology. *The journal of sexual medicine.* 2008 Oct;5(10):2266-73.
23. Fu X, Rezapour M, Wu X, Li L, Sjogren C, Ulmsten U. Expression of estrogen receptor-alpha and -beta in anterior vaginal walls of genuine stress incontinent women. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct.* 2003 Oct;14(4):276-81; discussion 81.
24. Whiteside JL, Barber MD, Paraiso MF, Walters MD. Vaginal rugae: measurement and significance. *Climacteric.* 2005;8(1):71-5.
25. da Silva Lara LA, da Silva AR, Rosa ESJC, Chaud F, Silva-de-Sa MF, Meireles ESAR, et al. Menopause leading to increased vaginal wall thickness in women with genital prolapse: impact on sexual response. *The journal of sexual medicine.* 2009 Nov;6(11):3097-110.
26. Mendelsohn ME. Genomic and nongenomic effects of estrogen in the vasculature. *The American journal of cardiology.* 2002 Jul 3;90(1A):3F-6F.
27. Pryor-Jones RA, Silverlight JJ, Kennedy SJ, Jenkins JS. Vasoactive intestinal peptide and the stimulation of lactotroph growth by oestradiol in rats. *J Endocrinol.* 1988;116(2):259-65.
28. Kasper S, Popescu RA, Torsello A, Vrontakis ME, Ikejiani C, Friesen HG. Tissue-specific regulation of vasoactive intestinal peptide messenger ribonucleic acid levels by estrogen in the rat. *Endocrinology.* 1992;130(4):1796-801.
29. Maletti M, Rostene WH, Carr L, Scherrer H, Rotten D, Kordon C, et al. Interaction between estradiol and prolactin on vasoactive intestinal peptide concentrations in the hypothalamus and in the anterior pituitary of the female rat. *Neurosci Lett.* 1982;32(3):307-13.
30. Fahrenkrug J. Gut/brain peptides in the genital tract: VIP and PACAP. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 2001;234:35-9.
31. Berman JR, Berman LA, Werbin TJ, Flaherty EE, Leahy NM, Goldstein I. Clinical evaluation of female sexual function: effects of age and estrogen status on

subjective and physiologic sexual responses. *International journal of impotence research*. 1999;11 Suppl 1:S31-8.

32. Aughton KL, Hamilton-Smith K, Gupta J, Morton JS, Wayman CP, Jackson VM. Pharmacological profiling of neuropeptides on rabbit vaginal wall and vaginal artery smooth muscle in vitro. *Br J Pharmacol*. 2008 Sep;155(2):236-43.

33. Zhu L, Lang J, Jiang F, Jiang X, Chen J. Vasoactive intestinal peptide in vaginal epithelium of patients with pelvic organ prolapse and stress urinary incontinence. *Int J Gynaecol Obstet*. 2009;105(3):223-5.

34. Baden WF, Walker TA. Physical diagnosis in the evaluation of vaginal relaxation. *Clin Obstet Gynecol*. 1972;15(4):1055-69.

35. Golombok S. RJ. *The Handbook of Golombok-Rust Inventory of Sexual Satisfaction*. 1983.

36. Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol*. 1999;17(5):1474-81.

37. Karim AY, Kulczycka M, Kantyka T, Dubin G, Jabaiah A, Daugherty PS, et al. A novel matrix metalloprotease-like enzyme (karilysin) of the periodontal pathogen *Tannerella forsythia* ATCC 43037. *Biol Chem*. 2009 Nov 17.

38. Boreham MK, Wai CY, Miller RT, Schaffer JI, Word RA. Morphometric analysis of smooth muscle in the anterior vaginal wall of women with pelvic organ prolapse. *Am J Obstet Gynecol*. 2002;187(1):56-63.

39. Jin L, Zhang XH, Wang JL, Yu YZ. [Expression of estrogen receptor alpha and beta subtypes in the vaginal wall of women with anterior vaginal prolapse]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 2007 Jan;42(1):18-21.

40. Pessina MA, Hoyt RF, Jr., Goldstein I, Traish AM. Differential regulation of the expression of estrogen, progesterone, and androgen receptors by sex steroid hormones in the vagina: immunohistochemical studies. *The journal of sexual medicine*. 2006 Sep;3(5):804-14.

41. Xie Z, Shi H, Zhou C, Dong M, Hong L, Jin H. Alterations of estrogen receptor-alpha and -beta in the anterior vaginal wall of women with urinary incontinence. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 2007 Oct;134(2):254-8.

42. Frasor J, Barnett DH, Danes JM, Hess R, Parlow AF, Katzenellenbogen BS. Response-specific and ligand dose-dependent modulation of estrogen receptor (ER) alpha activity by ERbeta in the uterus. *Endocrinology*. 2003 Jul;144(7):3159-66.

43. Gebhart JB, Rickard DJ, Barrett TJ, Lesnick TG, Webb MJ, Podratz KC, et al. Expression of estrogen receptor isoforms alpha and beta messenger RNA in vaginal tissue of premenopausal and postmenopausal women. *Am J Obstet Gynecol*. 2001 Dec;185(6):1325-30; discussion 30-1.

44. Murphy AJ, Guyre PM, Wira CR, Pioli PA. Estradiol regulates expression of estrogen receptor ERalpha46 in human macrophages. *PLoS One*. 2009;4(5):e5539.

45. Cignarella A, Bolego C, Pelosi V, Meda C, Krust A, Pinna C, et al. Distinct roles of estrogen receptor-alpha and beta in the modulation of vascular inducible nitric-oxide synthase in diabetes. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009 Jan;328(1):174-82.

46. Nappi RE, Polatti F. The use of estrogen therapy in women's sexual functioning (CME). *The journal of sexual medicine*. 2009 Mar;6(3):603-16; quiz 18-9.

47. Marthol H, Hilz MJ. [Female sexual dysfunction: a systematic overview of classification, pathophysiology, diagnosis and treatment]. *Fortschritte der Neurologie-Psychiatrie*. 2004;72(3):121-35.

48. Skobowiat C, Gonkowski S, Janiuk I, Calka J, Majewski M. The relationship and co-localization of vasoactive intestinal peptide (VIP)- and Leu5-enkephalin (LENK)-immunoreactivity in the female genital tract of the pig. *Pol J Vet Sci.* 2009;12(3):347-53.
49. Ottesen B, Pedersen B, Nielsen J, Dalgaard D, Wagner G, Fahrenkrug J. Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) provokes vaginal lubrication in normal women. *Peptides.* 1987 Sep-Oct;8(5):797-800.
50. Hong X, Huang L, Song Y. Role of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in the vaginal wall of women with stress urinary incontinence and pelvic organ prolapse. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct.* 2008 Aug;19(8):1151-7.
51. Soderberg MW, Johansson B, Masironi B, Bystrom B, Falconer C, Sahlin L, et al. Pelvic floor sex steroid hormone receptors, distribution and expression in pre- and postmenopausal stress urinary incontinent women. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica.* 2007;86(11):1377-84.
52. Virgolini I, Yang Q, Li S, Angelberger P, Neuhold N, Niederle B, et al. Cross-competition between vasoactive intestinal peptide and somatostatin for binding to tumor cell membrane receptors. *Cancer Res.* 1994;54(3):690-700.
53. Li SR, Koller E, Valent P, Gludovacz D, Yang Q, Patri P, et al. Effects of vasoactive intestinal peptide (VIP) and somatostatin (SST) on lipoprotein receptor expression by A431 tumor cells. *Life Sci.* 2001;68(11):1243-57.
54. Teng LR, Bian XM, Zhu L, Lang JH, Liu JT, Yang JQ, et al. [Effect of pregnancy and spontaneous delivery on the morphology of levator ani muscle and expression of vaginal nerve fibers]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 2008 Aug;43(8):597-601.
55. Inoue T, Yamaguchi K, Suzuki H, Abe K, Chihara T. Production of immunoreactive-polypeptide hormones in cervical carcinoma. *Cancer.* 1984 Apr 1;53(7):1509-14.
56. Gravina GL, Brandetti F, Martini P, Carosa E, Di Stasi SM, Morano S, et al. Measurement of the thickness of the urethrovaginal space in women with or without vaginal orgasm. *The journal of sexual medicine.* 2008;5(3):610-8.
57. da Silva Lara LA, Useche B, Rosa ESJC, Ferriani RA, Reis RM, de Sa MF, et al. Sexuality during the climacteric period. *Maturitas.* 2009;29:29.
58. Menghi G, Scocco P, Materazzi G. Changes in vasoactive intestinal polypeptide (VIP) levels in the rabbit oviduct at different hormonal stages. An immunohistochemical study. *J Anat.* 1990 Aug;171:139-46.
59. Palle C, Bredkjaer HE, Ottesen B, Fahrenkrug J. Vasoactive intestinal polypeptide and human vaginal blood flow: comparison between transvaginal and intravenous administration. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1990 Jan;17(1):61-8.
60. Di Carlo C, Di Spiezio Sardo A, Bifulco G, Tommaselli GA, Guerra G, Rippa E, et al. Postmenopausal hypoestrogenism increases vasoconstrictor neuropeptides and decreases vasodilator neuropeptides content in arterial-wall autonomic terminations. *Fertil Steril.* 2007 Jul;88(1):95-9.
61. Nappi C, Di Spiezio Sardo A, Guerra G, Di Carlo C, Bifulco G, Acunzo G, et al. Comparison of intranasal and transdermal estradiol on nasal mucosa in postmenopausal women. *Menopause.* 2004 Jul-Aug;11(4):447-55.
62. Bretherick KL, Hanna CW, Currie LM, Fluker MR, Hammond GL, Robinson WP. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms are associated with idiopathic premature ovarian failure. *Fertility and sterility.* 2008 Feb;89(2):318-24.

63. Massart F, Marini F, Bianchi G, Minisola S, Luisetto G, Pirazzoli A, et al. Age-specific effects of estrogen receptors' polymorphisms on the bone traits in healthy fertile women: the BONTURNO study. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009;7:32.
64. Paladini F, Cocco E, Cascino I, Belfiore F, Badiali D, Piretta L, et al. Age-dependent association of idiopathic achalasia with vasoactive intestinal peptide receptor 1 gene. *Neurogastroenterol Motil*. 2009 Jun;21(6):597-602.
65. Tatemoto K, Jornvall H, McDonald TJ, Carlquist M, Go VL, Johansson C, et al. Isolation and primary structure of human PHI (peptide HI). *FEBS letters*. 1984 Sep 3;174(2):258-61.
66. Tatemoto K, Mutt V. Isolation and characterization of the intestinal peptide porcine PHI (PHI-27), a new member of the glucagon--secretin family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1981 Nov;78(11):6603-7.
67. Itoh N, Obata K, Yanaihara N, Okamoto H. Human preprovasoactive intestinal polypeptide contains a novel PHI-27-like peptide, PHM-27. *Nature*. 1983 Aug 11-17;304(5926):547-9.
68. Yiangou Y, Di Marzo V, Spokes RA, Panico M, Morris HR, Bloom SR. Isolation, characterization, and pharmacological actions of peptide histidine valine 42, a novel prepro-vasoactive intestinal peptide-derived peptide. *J Biol Chem*. 1987 Oct 15;262(29):14010-3.
69. Fahrenkrug J, Ottesen B, Palle C. Non-amidated forms of VIP (glycine-extended VIP and VIP-free acid) have full bioactivity on smooth muscle. *Regulatory peptides*. 1989 Dec;26(3):235-9.
70. Palle C, Ottesen B, Jorgensen J, Fahrenkrug J. Peptide histidine methionine and vasoactive intestinal peptide: occurrence and relaxant effect in the human female reproductive tract. *Biol Reprod*. 1989;41(6):1103-11.
71. Bataille D, Gespach C, Laburthe M, Amiranoff B, Tatemoto K, Vauclin N, et al. Porcine peptide having N-terminal histidine and C-terminal isoleucine amide (PHI): vasoactive intestinal peptide (VIP) and secretin-like effects in different tissues from the rat. *FEBS letters*. 1980;114(2):240-2.
72. Robberecht P, Tatemoto K, Chatelain P, Waelbroeck M, Delhay M, Taton G, et al. Effects of PHI on vasoactive intestinal peptide receptors and adenylate cyclase activity in lung membranes. A comparison in man, rat, mouse and guinea pig. *Regulatory peptides*. 1982;4(5):241-50.
73. Lundberg JM, Fahrenkrug J, Larsson O, Anggard A. Corelease of vasoactive intestinal polypeptide and peptide histidine isoleucine in relation to atropine-resistant vasodilation in cat submandibular salivary gland. *Neurosci Lett*. 1984;52(1-2):37-42.
74. Barlow DH, Samsioe G, van Geelen JM. A study of European womens' experience of the problems of urogenital ageing and its management. *Maturitas*. 1997 Jul;27(3):239-47.
75. Yang SH, Yang JM, Wang KH, Huang WC. Biologic Correlates of Sexual Function in Women with Stress Urinary Incontinence. *The journal of sexual medicine*. 2008;5:5.
76. Rosen R, Brown C, Heiman J, Leiblum S, Meston C, Shabsigh R, et al. The Female Sexual Function Index (FSFI): a multidimensional self-report instrument for the assessment of female sexual function. *Journal of sex & marital therapy*. 2000 Apr-Jun;26(2):191-208.
77. Masheb RM, Lozano-Blanco C, Kohorn EI, Minkin MJ, Kerns RD. Assessing sexual function and dyspareunia with the Female Sexual Function Index (FSFI) in women with vulvodynia. *Journal of sex & marital therapy*. 2004 Oct-Dec;30(5):315-24.

78. Srikrishna S, Robinson D, Cardozo L, Cartwright R. Experiences and expectations of women with urogenital prolapse: a quantitative and qualitative exploration. *Bjog*. 2008;18:18.
79. ter Kuile MM, van Lankveld JJ, Kalkhoven P, van Egmond M. The Golombok Rust Inventory of Sexual Satisfaction (GRISS): psychometric properties within a Dutch population. *Journal of sex & marital therapy*. 1999;25(1):59-71.
80. Jiann BP, Su CC, Yu CC, Wu TT, Huang JK. Risk Factors for Individual Domains of Female Sexual Function. *The journal of sexual medicine*. 2009 Sep 15.
81. Fisher H, Aron A, Brown LL. Romantic love: an fMRI study of a neural mechanism for mate choice. *J Comp Neurol*. 2005;493(1):58-62.
82. Dennerstein L, Lehert P, Burger H. The relative effects of hormones and relationship factors on sexual function of women through the natural menopausal transition. *Fertility and sterility*. 2005 Jul;84(1):174-80.

**ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NA REDE VASCULAR
DA PAREDE VAGINAL ASSOCIADAS AO
HIPOESTROGENISMO E AO PROLAPSO GENITAL**

ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NA REDE VASCULAR DA PAREDE VAGINAL ASSOCIADAS AO HIPOESTROGENISMO E AO PROLAPSO GENITAL

Um dos desafios da ciência é a criação de estratégias que visem melhorar o estado de saúde da mulher não obstante as modificações corporais ligadas à instalação da menopausa e ao processo de envelhecimento. As inúmeras alterações biológicas associadas a diminuição das concentrações dos esteróides sexuais associadas as alterações moleculares inerentes ao avançar da idade, além de comprometer a estética corporal feminina (Bachmann and Leiblum 2004; Schwenkhagen 2007), promovem alterações estruturais em vários órgãos, em especial na genitália, que podem resultar em distopias, distúrbios urinários e dispareunia (Castelo-Branco, Cancelo et al. 2005; Goldstein and Alexander 2005). Em um estudo recente, ficou demonstrado que um terço das mulheres após a menopausa apresenta problemas genitais (Makabe, Motta et al. 1998). Estas queixas se exacerbam na medida em que a mulher avança na idade (Petros and Ulmsten 1990; Samsioe 1998) sugerindo que, independente das alterações genéticas que predis põem ao aparecimento do prolapso genital, mulheres idosas podem ter danificadas as estruturas de sustentação dos órgãos pélvicos (Kim, Jeon et al. 2007).

É conhecido que a vagina sofre a influência cíclica dos esteróides sexuais em especial do estrogênio cuja ação se faz principalmente, a partir da ativação de seus receptores alfa largamente distribuídos ao longo da parede vaginal especialmente no epitélio (Fu, Rezapour et al. 2003). Com o cessar da esteroidogênese, modificam o pH, a flora e a superfície da vagina que se torna aplanada (Bachmann 1998) e ocorrem várias outras alterações que se somam e comprometem a função do órgão. Recentemente ficou demonstrado que ocorre o aumento da espessura da parede vaginal após a menopausa em mulheres portadoras de prolapso genital (da Silva Lara, da Silva

et al. 2009) possivelmente pelo acúmulo de fibrose, um tecido pouco inervado e pouco vascularizado que, potencialmente, pode contribuir para elevar o grau do prolapso genital. Também já é conhecido que ocorrem alterações neuroendócrinas ligadas ao mecanismo de ação e síntese de neurotransmissores (Musicki, Liu et al. 2009) e de várias substâncias que controlam a expressão de genes responsáveis pela manutenção do colágeno e do tecido conjuntivo (Lin, Tee et al. 2007; Badiou, Granier et al. 2008) que são os principais componentes das estruturas de sustentação dos órgãos pélvicos. A denervação dos tecidos se correlaciona com a maior incidência de prolapso genital (Tinelli, Malvasi et al. 2009) assim como as alterações da rede vascular local.

Parece que o estrogênio tem influência sobre o número, distribuição e a dinâmica vascular da parede vaginal, embora alguns autores não tenham encontrado correlação entre número de vasos e status menopáusicos (Semmelink, de Wilde et al. 1990). No entanto, já foi demonstrado que as alterações genéticas e bioquímicas celulares devido ao hipoestrogenismo, além de promover o aumento dos índices de apoptose celular, reforçam as alterações morfofuncionais do componente vasculonervoso da vagina em mulheres portadoras de prolapso genital (Poncet, Meyer et al. 2005) e senis (Lotocki 1999). Desta forma, a irrigação insuficiente da parede vaginal é mais um fator a fazer parte da fisiologia do prolapso genital (Lin, Tee et al. 2007), mas não se sabe se é a somatória do hipoestrogenismo com o envelhecimento que determina esta condição ou se ambos atuam isoladamente para promover o dano na rede vascular da vagina.

Neste sentido, a cada dia, cresce o número de estudos direcionados para a melhor compreensão das alterações genitais relacionadas com as distopias e com as modificações sexuais após a instalação da menopausa. As alterações devidas ao hipoestrogenismo se mesclam as que ocorrem com o progredir da idade tornando difícil

estabelecer o real papel dos estrogênios e da idade na gênese desta condição patológica. Esclarecer esta questão permitirá nortear a busca por fármacos alternativos á reposição estrogênica para mulheres portadoras de condições patológicas que restringem a utilização da hormonioterapia como é o caso do câncer de mama e do endométrio. É possível que fármacos que controlam as alterações moleculares vinculadas ao processo de envelhecimento constituam um arsenal terapêutico importante para este fim. Assim, este estudo propõe verificar se ocorre alteração no numero de vasos da parede vaginal após a menopausa e correlacionar os achados à condição estrogênica e a idade da mulher.

Métodos

This study was approved by the Research Ethics Committee of the Hospital das Clínicas of Ribeirão Preto School of Medicine, São Paulo University, Ribeirão Preto (HCFMRP/USP), and all patients gave written informed consent to participate. Twelve women submitted to anterior and posterior colpoperineoplasty due to posterior vaginal wall laxity and anterior vaginal wall prolapse up to grade II were selected for this cross-sectional study. Gynecological exam was performed before surgery and the Baden-Walker halfway scoring system was used for grading patients' pelvic organ prolapse (Baden and Walker 1972). The patients were divided into two groups: the premenopausal group (PG) consisted of women aged 20 to 40 years with FSH \leq 12 mIU/ml and regular cycles, whereas the menopausal group (MG) consisted of women aged $<$ 70 years with amenorrhea for more than one year and FSH \geq 40 mIU/ml. Patients who had been on hormonal treatment up to one year before the study and patients with diabetes mellitus, pelvic pain, neuropathy, hyperprolactinemia, clinical hyperandrogenism, and chronic medical illnesses like genital cancer and vulval dysplasia that could alter genital anatomy were excluded. The same surgeon operated all

patients. Sample collection was standardized and was always performed on the midline of the anterior vaginal wall between 5 mm from the outer orifice and the limit adjacent to the ectocervix; on the posterior wall, surgery was performed from the hymenal ring up to 1 cm from the uterine cervix. Each surgical specimen was sectioned into proximal, middle, and distal fragments, and the middle segment foi utilizado para este estudo. It was fixed in formaldehyde 10%, embedded in paraffin, and cut into 4- μ m sections. A lamina propria foi a camada da parede vaginal escolhida para a morfometria vascular por ser uma região mais uniforme quanta a distribuição vascular que é considerada mais abundante no terço proximal e distal devido a estreita relação com estruturas mais nobres como a uretra. Slides were then stained for o receptor estrogênico alfa (ER-alpha) imunohistochemistry utilizando a mouse monoclonal antibody ER-alpha (NCL-ER-6F11, Novocastra Labs UK). Para a marcação dos vasos utilizou-se o CD34 um marcador do endotélio vascular. A imunohistochemistry para ambos foi performed in accordance with the manufacturer's instructions. Um patologista (A.R.S.) realizou a leitura cega da imunohistoquímica para o receptor estrogênico alfa utilizando uma objetiva de 40x de um microspópio óptico Karl Zeis. As áreas marcadas foram identificadas após varredura de toda a extensão do corte em aumento de 20x. O escore do receptor estrogênico α foi obtido semi-quantitativamente adotando o H-escore utilizando a fórmula $H\text{-score} = \sum P_i \times (i + 1)$ onde i é a intensidade da marcação e P_i é a porcentagem da marcação (quadro 1) (Harvey, Clark et al. 1999). Em cada região marcada, 100 células foram contadas e estabeleceu-se a porcentagem de células com marcação nuclear para o receptor estrogênico variando o escore de 0 a 8. A marcação pelo CD34 foi identificada pelo patologista que realizou a contagem dos vasos utilizando o sistema para morfometria do fragmento constituído de uma câmera análogo-digital modelo JVC TK1270, acoplada a um microscópio de luz Axiophot. As

imagens são captadas através de uma placa de captura de vídeo FG1 da Keiss Zeiss acoplada a um computador padrão IBM-PC. Utilizando o software de processamento de imagens Kontron, construiu-se uma macro (série de comandos) que, utilizando uma objetiva de 2,5X em conjunto com optovar de 1,6X permite uma visualização ampla do fragmento, facilitando a identificação da área de interesse (Figura 1 A). Sobre esta área o usuário, utilizando uma máscara retangular, marca a área de interesse e a posiciona dentro do fragmento. Com esta área demarcada, o software desloca a lâmina do fragmento de forma que a objetiva fique sobre o canto superior esquerdo desta marcação e a partir deste ponto passa a captar campos sequenciais com objetiva de 20X e optovar de 1,6X que serão armazenados para posterior processamento. Estes campos, mais ampliados, proporcionam uma melhor visualização dos vasos existentes. O processamento dos campos de cada fragmento é realizado por outra macro que permite que o usuário marque manualmente os vasos (Figura 1B). Como a área de cada campo é fixa e seu valor é de 112802 μm^2 , calcula-se a densidade de vasos através da fórmula: $D = (\text{n}^\circ \text{ vasos} / (\text{n}^\circ \text{ campos} \times 112802) - \text{área eliminada}) * 1000000$. A área eliminada é obtida pelo usuário durante o processamento de cada campo, caso exista a necessidade de eliminar alguma área que não faça parte do fragmento analisado (Figura 1).

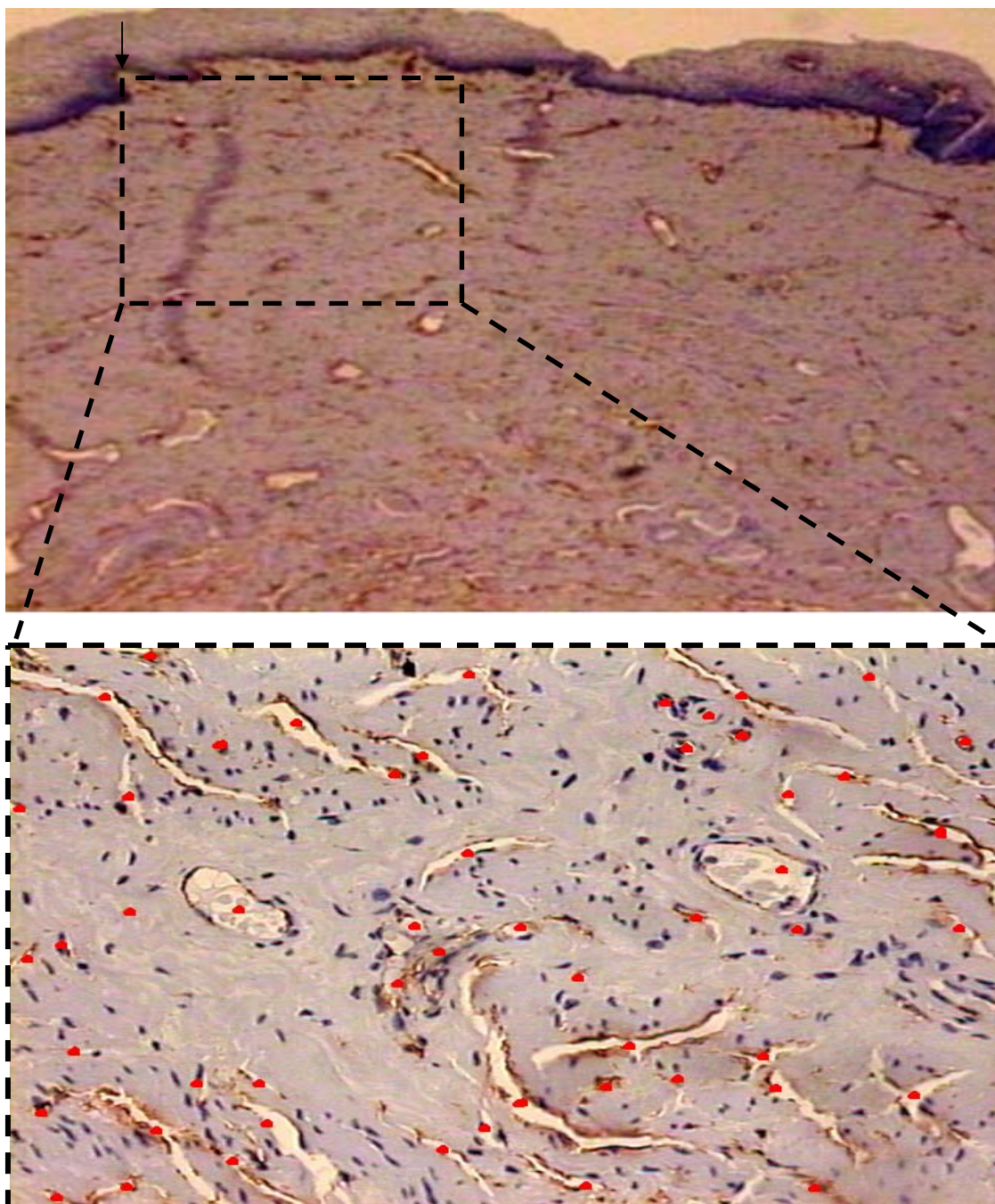


Figura 1: Sequencia da macro para a contagem dos vasos: (A) marcação da área a ser analisada em preto. (B) Marcação manual dos vasos e contagem automática em vermelho.

Resultados

Doze mulheres foram selecionadas para este estudo transversal sendo 6 pertencentes ao PG e 6 ao MG. A imunohistoquímica evidenciou marcação do endotélio

vascular pelo CD34 na lâmina própria da parede vaginal nos dois grupos. De forma qualitativa, observou-se que esta camada é ricamente vascularizada nas mulheres na pré menopausa enquanto que no grupo pós menopausa a vascularização encontra-se visivelmente diminuída (Figura 2).

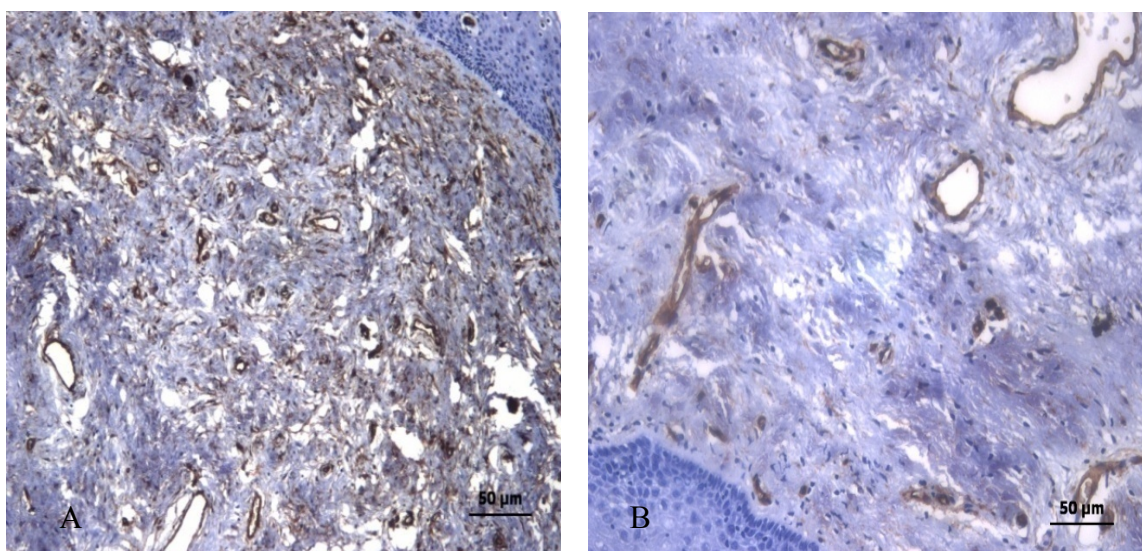


Figura 2: Microfotografia mostrando o aspecto da rede vascular da parede vaginal de mulheres na pré (A) e pos (B) menopausa à imunohistoquímica para o CD34 Marcação do endotélio vascular em marrom.

Houve diferença significativa entre os dois grupos quanto a idade e o FSH e não houve diferença significativa quanto ao IMC (Tabela 1).

Tabela 1. Características das pacientes.

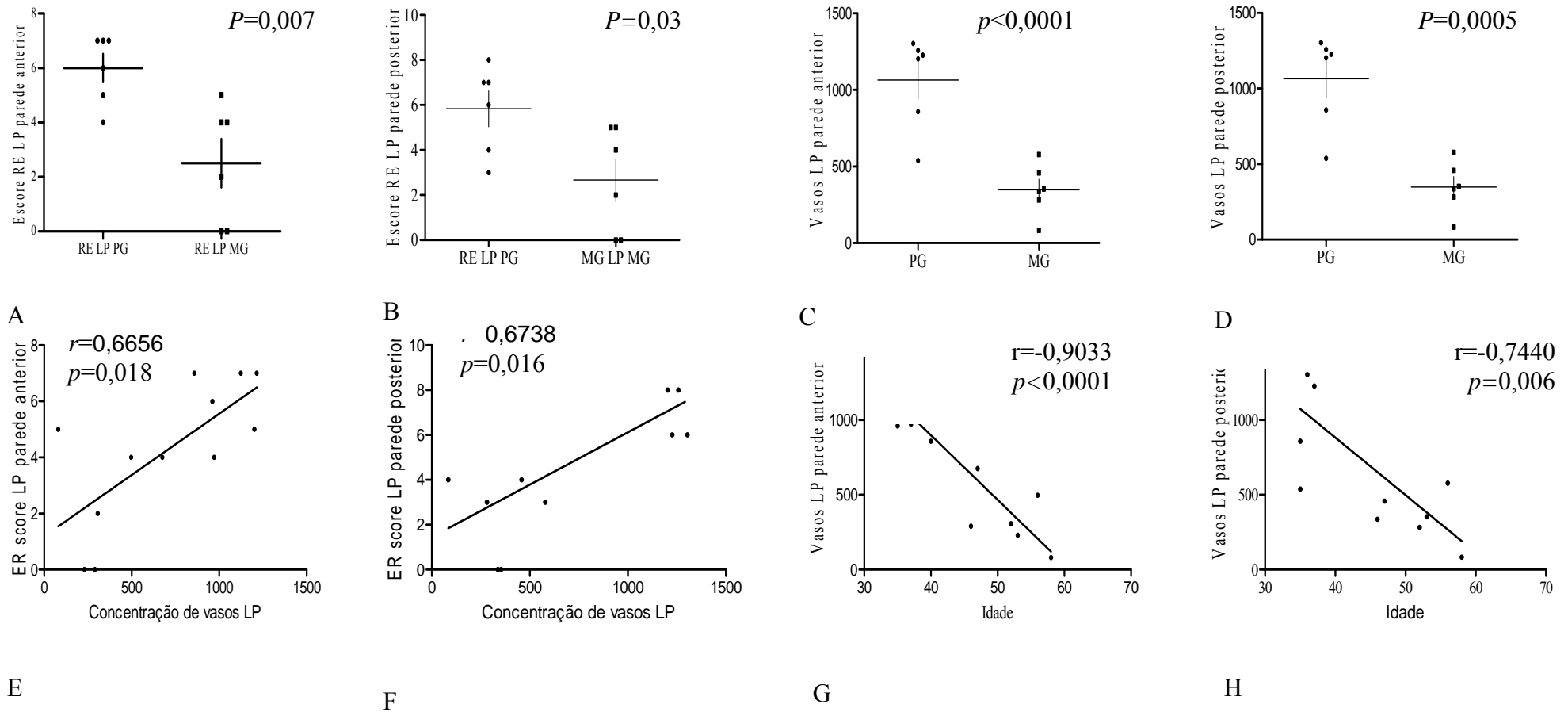
	Pre-menopausa N=6	Menopausa N=6	<i>p</i>
Idade (anos)	37,17±0,95	52,00 ±1,95	<0,0001
IMC (kg/m ²)	20,01± 1,95	22,17±1,07	0,21
FSH (mUI/ml)	6,19±1.22	57,92±14,38	0,002

Legenda: Student`s t test, "Mann Whitney test" Gaussian correction, nível de significância, $p < 0,05$.

O escore do ER- α na lamina propria foi significativamente maior no PG tanto na parede anterior quanto na posterior (respectivamente, PG 6.0 ± 0.52 e MG 2.5 ± 0.89 , $p=0,007$, PG 5.8 ± 0.79 e MG 2.7 ± 0.95 , $p=0,03$ (Figura 3 A e B). Na comparação entre as concentrações dos vasos na lamina própria entre os dois grupos, observou-se que o grupo menacme tem uma concentração de vasos significativamente maior do que o grupo menopausa: parede anterior PG $1.055 \pm 145,8$ e MG $346,6 \pm 209,9$, $p < 0,0001$ e parede posterior PG $1064 \pm 303,3$ e MG $348,6 \pm 167,3$, $p=0,0005$ (Figura 3 C e D).

Houve correlação positiva entre o escore do receptor estrogênico alfa e a concentração de vasos da lamina própria na parede anterior, CI 95% 0.1292 to 0.9006, $r=0,6656$, $p=0,018$ e na parede posterior, CI 95% 0.1439 to 0.9034, $r=0,6738$, $p=0,016$ (Figura 3 E e F). A idade apresentou correlação fortemente negativa com a concentração de vasos da lamina própria: parede anterior CI 95% -0.9729 to -0.6839, $r=-0,9033$, $p < 0,0001$ e parede posterior IC 95% -0.9236 to -0.2966, $r=-0,7440$, $p=0,0055$ (Figura 3 G e H).

Figura 3: Comparação entre os grupos pré- (PG) e pós-menopausa (MG) quanto a expressão do receptor alfa (ER) (A, B) e quanto a concentração vascular (C, D) na parede vaginal anterior e posterior. Correlações entre o ER e a concentração de vasos (E, F) e entre a concentração de vasos e a idade (G, H) na parede vaginal. (LP) lâmina própria. Mann-Whitney, Student's t test, Spearman e Pearson. Nível de significância $p < 5\%$.



Discussão

O presente estudo suporta as evidências de que, de fato, alterações vasculares que se acentuam após a menopausa, fazem parte do quadro histológico da distopia genital. De forma inédita, este trabalho forneceu dados objetivos sobre a ocorrência de redução do número de vasos na lamina própria da parede vaginal em mulheres na pós-menopausa portadoras de prolapso genital quando comparadas a controles normoestrogênicas com a mesma condição patológica. Também demonstramos que este evento, está associado à diminuição das concentrações dos receptores estrogênicos e ao avançar da idade, o que reforça a hipótese de que ambos os fatores coexistem e podem atuar isoladamente promovendo as alterações vasculares associadas as distopias genitais.

O prolapso genital é uma condição que, freqüentemente, coexiste com a incontinência urinária e a frouxidão vaginal, alterações que podem interferir com a expressão sexual e afetar o bem estar (Catti, Paccalin et al. 2006; Barber, Amundsen et al. 2007; David-Montefiore, Barranger et al. 2007) resultando em sofrimento para a mulher. Restaurar ou, ao menos melhorar este quadro, é uma condição fundamental para que a mulher tenha uma boa qualidade de vida. É uma entidade com etiologia multifatorial ainda não definida, mas sabe-se que está associado a várias alterações estruturais no assoalho pélvico vinculadas ao componente genético cuja expressão está associada a algumas condições fisiológicas como a paridade, o hipostrogenismo da pós-menopausa e o avançar da idade e a condições patológicas tais como a obesidade e o parto traumático entre outros (Kobak, Lu et al. 2005; Crepin, Cosson et al. 2007; Strinic, Bukovic et al. 2007; Tinelli, Malvasi et al. 2009).

O hipoestrogenismo devido a menopausa é uma condição que está associada a várias alterações da parede vaginal que predispõe ao aparecimento do prolapso. Com a queda das concentrações estrogênicas ocorre o aumento dos índices de apoptose celular e, paralelamente, varias alterações moleculares acontecem na parede vaginal tais como a diminuição da expressão de neurotransmissores e a diminuição da expressão de determinadas proteínas componentes dos miócitos, co-responsáveis pela manutenção da espessura dos feixes da camada muscular lisa (Boreham, Wai et al. 2002; Boreham, Wai et al. 2002). Ocorrem também alterações do tecido conjuntivo e do colágeno (Lin, Tee et al. 2007; Badiou, Granier et al. 2008) e aumento da espessura da parede vaginal provavelmente por fibrose (da Silva Lara, da Silva et al. 2009) que resultam em diminuição da capacidade elástica da vagina.

O real papel dos estrogênios na composição vascular da parede vaginal ainda gera controvérsias. Alguns autores não encontraram correlação entre numero de vasos e status menopáusico (Semmelink, de Wilde et al. 1990), no entanto, já foi demonstrado que a hormonioterapia tem efeito restaurador tanto sobre o número quanto sobre a dinâmica vascular da vagina, tanto em humanos quanto em animais (Park, Ahn et al. 2001; Long, Liu et al. 2006; Long, Liu et al. 2006), e já se sabe que o estrogênio tem influencia sobre a distribuição vascular na parede vaginal (Cicinelli, Di Naro et al. 2003). Também já existem evidencias de que o estrogênio modula diretamente a angiogênese via efeitos na célula endotelial (Dobrzycka, Kinalski et al. 2009).

A diminuição da vascularização da parede vaginal após a menopausa bem como a sua relação com o prolapso genital tem sido postulada embora com evidências insuficientes e controvertidas. Já foi demonstrado que as alterações do colágeno associadas ao prolapso genital se associam também as disfunções vasculares (Smol'nova, Savel'ev et al. 2004). De fato, um estudo recente evidenciou a associação

do prolapso genital com alterações no gene precursor da fibulina-5 uma glicoproteína envolvida na síntese de fibras elásticas, secretada por várias células inclusive a célula endotelial e a célula muscular lisa vascular (Yanagisawa, Schluterman et al. 2009). Alguns autores já encontraram a coexistência de dilatações patológicas de vênulas na lamina própria (Boreham, Wai et al. 2002) bem como um menor número de capilares por arteríola (Badiou, Granier et al. 2008) na parede vaginal de mulheres portadoras de prolapso.

Na parede vaginal, a ação estrogênica se faz através da ativação de seus receptores principalmente alfa que são distribuídos de maneira decrescente a partir da camada epitelial como já demonstrado por outros autores (Press, Nousek-Goebl et al. 1986). No grupo de mulheres do presente estudo ficou demonstrado que na lâmina própria, o PG apresenta um escore de ER-alfa significativamente maior do que o MG. Este dado já era esperado porque embora estudos em ratas tenham demonstrado que o estrogênio downregulate a expressão do receptor alfa (Pessina, Hoyt et al. 2006), diferentemente, em humanos, o estrogênio estimula a expressão deste receptor (Fu, Rezapour et al. 2003; Cavallini, Dinero et al. 2008). Desta forma, as concentrações estrogênicas que atingem níveis críticos após a menopausa são insuficientes para estimular adequadamente a expressão dos seus receptores (Cavallini, Dinero et al. 2008), o que justifica o menor escore no grupo menopausa. Também existem indícios de que a expressão dos receptores alfa está alterada em algumas condições patológicas da genitália, embora em relação ao prolapso, isto ainda não foi demonstrado (Jin, Zhang et al. 2007). Mas a literatura evidencia algumas situações que, indiretamente, pesam a favor de provável associação entre o prolapso e alterações de receptores estrogênicos alfa uma vez que, em mulheres portadoras de incontinência urinária, estes receptores encontram-se diminuídos (Xie, Shi et al. 2007), além disto, algumas drogas

moduladoras do estrogênio (SERMs) estão associadas a maior incidência de prolapso talvez por modularem os receptores de estrogênios também na genitália (Hendrix and McNeeley 2001; Albertazzi and Sharma 2005). Teoricamente, a alteração dos receptores nestes casos poderia predispor ainda mais à atrofia genital, uma condição que surge com a menopausa e progride de forma acelerada em paralelo com o avançar da idade (van Lunsen and Laan 2004; Lara, Useche et al. 2009).

O processo do envelhecimento é uma condição que transcorre com alterações bioquímicas e moleculares importantes (Goh 2003) que afetam a genitália produzindo também a denervação e desvascularização da parede vaginal (Tinelli, Malvasi et al. 2009), condições relacionadas com a genese do prolapso genital (Richter, Goode et al. 2007). Neste período crítico ocorrem também alterações do tecido conjuntivo e retardamento da síntese do colágeno, retardamento da angiogênese, principalmente devido a diminuição dos angiogenic mediators fibroblast growth factor-2 (FGF-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) (Sadoun and Reed 2003). O mecanismo da neoformação vascular implica a ativação celular, degradação da membrana basal, migração celular e proliferação celular (Sadoun and Reed 2003). Todas estas fases são reguladas pela ação de fatores de crescimento e de proteínas existentes na matriz celular como o colágeno tipo I, a fibronectin, laminin e outras (Ashcroft, Horan et al. 1997; Echtermeyer, Streit et al. 2001; Hornebeck, Emonard et al. 2002), fatores de crescimento (b-FGF, VEGF, IGF-1) (Ferrara and Gerber 2001; Sartippour, Heber et al. 2002; Simmons, Pucilowska et al. 2002) estando todas estas substâncias comprometidas pelas alterações bioquímicas relativas a idade. Também em pessoas idosas, os macrófagos que são uma fonte rica de fatores angiogênicos, passam a produzir menos VEGF o que compromete a angiogênese (Swift, Kleinman et al. 1999). Todas estas alterações falam a favor de importante comprometimento da rede vascular da parede

vaginal em mulheres em idade avançada. Além disto é conhecido que a relação dos vasos sanguíneos com a saúde tecidual não está ligada somente ao aporte de nutrientes para os tecidos, mas também a capacidade das células da parede vascular de sintetizar substâncias essenciais para a função do órgão alvo (Yanagisawa, Schluterman et al. 2009), e isto fica comprometido pelo avançar da idade. Portanto, além do menor número de vasos, a genitália sofre pela deficiência de síntese de substâncias essenciais a saúde e plasticidade dos tecidos e, supostamente, tais eventos fazem parte das causas do prolapso genital. Desta forma, as alterações no colágeno, nas fibras musculares e na rede vascular, levam a modificações anatômicas na vagina que a tornam vulnerável a força mecânica gerada pela pressão intraabdominal predispondo o órgão ao prolapso (Chen, Ashton-Miller et al. 2006).

Conclusão

Mulheres na pós-menopausa portadoras de prolapso genital têm menor número de vasos na parede vaginal quando comparadas a controles normoestrogênicas com a mesma condição patológica. O hipoestrogenismo e o avançar da idade são fatores que isoladamente ou em conjunto, respondem por esta alteração, porém, por mecanismos ainda não totalmente elucidados fazendo-se necessários mais estudos para estabelecer o real papel destes fatores na gênese deste estado patológico. A implicação clínica deste achado está na possibilidade de utilização de substâncias angiogênicas que não só a hormonioterapia como estratégia na prevenção e tratamento das mulheres predispostas ao prolapso genital.

Referências

- Albertazzi, P. and S. Sharma (2005). "Urogenital effects of selective estrogen receptor modulators: a systematic review." Climacteric **8**(3): 214-220.
- Ashcroft, G. S., M. A. Horan, et al. (1997). "Aging is associated with reduced deposition of specific extracellular matrix components, an upregulation of angiogenesis, and an altered inflammatory response in a murine incisional wound healing model." J Invest Dermatol **108**(4): 430-437.
- Bachmann, G. A. (1998). "The clinical platform for the 17beta-estradiol vaginal releasing ring." Am J Obstet Gynecol **178**(5): S257-260.
- Bachmann, G. A. and S. R. Leiblum (2004). "The impact of hormones on menopausal sexuality: a literature review." Menopause **11**(1): 120-130.
- Baden, W. F. and T. A. Walker (1972). "Physical diagnosis in the evaluation of vaginal relaxation." Clin Obstet Gynecol **15**(4): 1055-1069.
- Badiou, W., G. Granier, et al. (2008). "Comparative histological analysis of anterior vaginal wall in women with pelvic organ prolapse or control subjects. A pilot study." Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct **19**(5): 723-729.
- Barber, M. D., C. L. Amundsen, et al. (2007). "Quality of life after surgery for genital prolapse in elderly women: obliterative and reconstructive surgery." Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct **18**(7): 799-806.
- Boreham, M. K., C. Y. Wai, et al. (2002). "Morphometric analysis of smooth muscle in the anterior vaginal wall of women with pelvic organ prolapse." Am J Obstet Gynecol **187**(1): 56-63.
- Boreham, M. K., C. Y. Wai, et al. (2002). "Morphometric properties of the posterior vaginal wall in women with pelvic organ prolapse." Am J Obstet Gynecol **187**(6): 1501-1508; discussion 1508-1509.
- Castelo-Branco, C., M. J. Cancelo, et al. (2005). "Management of post-menopausal vaginal atrophy and atrophic vaginitis." Maturitas **52 Suppl 1**: S46-52.
- Catti, M., C. Paccalin, et al. (2006). "Quality of life for adult women born with bladder and cloacal exstrophy: a long-term follow up." J Pediatr Urol **2**(1): 16-22.
- Cavallini, A., E. Dinaro, et al. (2008). "Estrogen receptor (ER) and ER-related receptor expression in normal and atrophic human vagina." Maturitas **59**(3): 219-225.
- Chen, L., J. A. Ashton-Miller, et al. (2006). "Interaction among apical support, levator ani impairment, and anterior vaginal wall prolapse." Obstet Gynecol **108**(2): 324-332.
- Cicinelli, E., E. Di Naro, et al. (2003). "Placement of the vaginal 17beta-estradiol tablets in the inner or outer one third of the vagina affects the preferential delivery of 17beta-estradiol toward the uterus or periurethral areas, thereby modifying efficacy and endometrial safety." Am J Obstet Gynecol **189**(1): 55-58.
- Crepin, G., M. Cosson, et al. (2007). "[Genital prolapse in young women: a topical issue]." Bull Acad Natl Med **191**(4-5): 827-836; discussion 836.
- da Silva Lara, L. A., A. R. da Silva, et al. (2009). "Menopause Leading to Increased Vaginal Wall Thickness in Women with Genital Prolapse: Impact on Sexual Response." J Sex Med **28**: 28.
- da Silva Lara, L. A., A. R. da Silva, et al. (2009). "Menopause Leading to Increased Vaginal Wall Thickness in Women with Genital Prolapse: Impact on Sexual Response." J Sex Med.
- David-Montefiore, E., E. Barranger, et al. (2007). "Functional results and quality-of-life after bilateral sacrospinous ligament fixation for genital prolapse." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **132**(2): 209-213.
- Dobrzycka, B., M. Kinalski, et al. (2009). "[The role of estrogens in angiogenesis in the female reproductive system]." Endokrynol Pol **60**(3): 210-214.

- Echtermeyer, F., M. Streit, et al. (2001). "Delayed wound repair and impaired angiogenesis in mice lacking syndecan-4." J Clin Invest **107**(2): R9-R14.
- Ferrara, N. and H. P. Gerber (2001). "The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis." Acta Haematol **106**(4): 148-156.
- Fu, X., M. Rezapour, et al. (2003). "Expression of estrogen receptor-alpha and -beta in anterior vaginal walls of genuine stress incontinent women." Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct **14**(4): 276-281; discussion 281.
- Goh, J. T. (2003). "Biomechanical and biochemical assessments for pelvic organ prolapse." Curr Opin Obstet Gynecol **15**(5): 391-394.
- Goldstein, I. and J. L. Alexander (2005). "Practical aspects in the management of vaginal atrophy and sexual dysfunction in perimenopausal and postmenopausal women." J Sex Med **2 Suppl 3**: 154-165.
- Harvey, J. M., G. M. Clark, et al. (1999). "Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer." J Clin Oncol **17**(5): 1474-1481.
- Hendrix, S. L. and S. G. McNeeley (2001). "Effect of selective estrogen receptor modulators on reproductive tissues other than endometrium." Ann N Y Acad Sci **949**: 243-250.
- Hornebeck, W., H. Emonard, et al. (2002). "Matrix-directed regulation of pericellular proteolysis and tumor progression." Semin Cancer Biol **12**(3): 231-241.
- Jin, L., X. H. Zhang, et al. (2007). "[Expression of estrogen receptor alpha and beta subtypes in the vaginal wall of women with anterior vaginal prolapse]." Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi **42**(1): 18-21.
- Kim, C. M., M. J. Jeon, et al. (2007). "Risk factors for pelvic organ prolapse." Int J Gynaecol Obstet **98**(3): 248-251.
- Kobak, W., J. Lu, et al. (2005). "Expression of lysyl oxidase and transforming growth factor beta2 in women with severe pelvic organ prolapse." J Reprod Med **50**(11): 827-831.
- Lara, L. A., B. Useche, et al. (2009). "The effects of hypoestrogenism on the vaginal wall: interference with the normal sexual response." J Sex Med **6**(1): 30-39.
- Lin, S. Y., Y. T. Tee, et al. (2007). "Changes in the extracellular matrix in the anterior vagina of women with or without prolapse." Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct **18**(1): 43-48.
- Long, C.-Y., C.-M. Liu, et al. (2006). "A randomized comparative study of the effects of oral and topical estrogen therapy on the vaginal vascularization and sexual function in hysterectomized postmenopausal women." Menopause **13**(5): 737-743. 10.1097/1001.gme.0000227401.0000298933.0000227400b.
- Long, C. Y., C. M. Liu, et al. (2006). "A randomized comparative study of the effects of oral and topical estrogen therapy on the vaginal vascularization and sexual function in hysterectomized postmenopausal women." Menopause **13**(5): 737-743.
- Lotocki, W. (1999). "[Neurotrophic basis of atrophic changes in the vagina and vulva]." Przegl Lek **56**(1): 81-85.
- Makabe, S., P. M. Motta, et al. (1998). "Microanatomy of the female reproductive organs in postmenopause by scanning electron microscopy." Climacteric **1**(1): 63-71.
- Musicki, B., T. Liu, et al. (2009). "Endothelial nitric oxide synthase regulation in female genital tract structures." J Sex Med **6 Suppl 3**: 247-253.

- Park, K., K. Ahn, et al. (2001). "Decreased circulating levels of estrogen alter vaginal and clitoral blood flow and structure in the rabbit." Int J Impot Res **13**(2): 116-124.
- Pessina, M. A., R. F. Hoyt, Jr., et al. (2006). "Differential regulation of the expression of estrogen, progesterone, and androgen receptors by sex steroid hormones in the vagina: immunohistochemical studies." J Sex Med **3**(5): 804-814.
- Petros, P. E. and U. I. Ulmsten (1990). "Non stress non urge female urinary incontinence--diagnosis and cure: a preliminary report." Acta Obstet Gynecol Scand Suppl **153**: 69-70.
- Poncet, S., S. Meyer, et al. (2005). "The expression and function of the endothelin system in contractile properties of vaginal myofibroblasts of women with uterovaginal prolapse." Am J Obstet Gynecol **192**(2): 426-432.
- Press, M. F., N. A. Nousek-Goebel, et al. (1986). "Estrogen receptor localization in the female genital tract." Am J Pathol **123**(2): 280-292.
- Richter, H. E., P. S. Goode, et al. (2007). "The effect of age on short-term outcomes after abdominal surgery for pelvic organ prolapse." J Am Geriatr Soc **55**(6): 857-863.
- Sadoun, E. and M. J. Reed (2003). "Impaired angiogenesis in aging is associated with alterations in vessel density, matrix composition, inflammatory response, and growth factor expression." J Histochem Cytochem **51**(9): 1119-1130.
- Samsioe, G. (1998). "Urogenital aging--a hidden problem." Am J Obstet Gynecol **178**(5): S245-249.
- Sartippour, M. R., D. Heber, et al. (2002). "Inhibition of fibroblast growth factors by green tea." Int J Oncol **21**(3): 487-491.
- Schwenkhagen, A. (2007). "Hormonal changes in menopause and implications on sexual health." J Sex Med **4 Suppl 3**: 220-226.
- Semmelink, H. J., P. C. de Wilde, et al. (1990). "Histomorphometric study of the lower urogenital tract in pre- and post-menopausal women." Cytometry **11**(6): 700-707.
- Simmons, J. G., J. B. Pucilowska, et al. (2002). "IGF-I and TGF-beta1 have distinct effects on phenotype and proliferation of intestinal fibroblasts." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **283**(3): G809-818.
- Smol'nova, T., S. V. Savel'ev, et al. (2004). "[Genital prolapse in women and articular hypermobility syndrome in connective tissue dysplasia]." Ter Arkh **76**(11): 83-88.
- Strinic, T., D. Bukovic, et al. (2007). "Epidemiology of pelvic floor disorders between urban and rural female inhabitants." Coll Antropol **31**(2): 483-487.
- Swift, M. E., H. K. Kleinman, et al. (1999). "Impaired wound repair and delayed angiogenesis in aged mice." Lab Invest **79**(12): 1479-1487.
- Tinelli, A., A. Malvasi, et al. (2009). "Age-related pelvic floor modifications and prolapse risk factors in postmenopausal women." Menopause.
- van Lunsen, R. H. and E. Laan (2004). "Genital vascular responsiveness and sexual feelings in midlife women: psychophysiologic, brain, and genital imaging studies." Menopause **11**(6 Pt 2): 741-748.
- Xie, Z., H. Shi, et al. (2007). "Alterations of estrogen receptor-alpha and -beta in the anterior vaginal wall of women with urinary incontinence." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **134**(2): 254-258.
- Yanagisawa, H., M. K. Schluterman, et al. (2009). "Fibulin-5, an integrin-binding matricellular protein: its function in development and disease." J Cell Commun Signal.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)