

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-graduação em Saúde da Mulher

Eduardo Siqueira Fernandes

**EFICÁCIA DO USO DA *Cimicifuga racemosa* NA FUNÇÃO ENDOTELIAL DE
MULHERES PÓS-MENOPAUSADAS: ensaio clínico randomizado, duplo-cego, placebo
controlado**

Belo Horizonte

2019

Eduardo Siqueira Fernandes

**EFICÁCIA DO USO DA *Cimicifuga racemosa* NA FUNÇÃO ENDOTELIAL DE
MULHERES PÓS-MENOPAUSADAS: ensaio clínico randomizado, duplo-cego, placebo
controlado**

Versão final

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde da Mulher da Universidade Federal de Minas Gerais, área de concentração Reprodução Humana e Patologia Ginecológica, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Saúde da Mulher.

Orientador: Prof. Dr. Selmo Geber.

Belo Horizonte

2019

Fernandes, Eduardo Siqueira.
F363e Eficácia do uso da Cimicifuga racemosa na função Endotelial de mulheres pós-menopausadas [recursos eletrônicos]: ensaio clínico randomizado, duplo-cego, placebo controlado. / Eduardo Siqueira Fernandes. - - Belo Horizonte: 2019.

81f.: il.

Formato: PDF.

Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Selmo Geber.

Área de concentração: Reprodução Humana e Patologia Ginecológica.

Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Cimicifuga. 2. Pós-Menopausa. 3. Saponinas. 4. Artéria Braquial. 5. Endotélio. 6. Dissertação Acadêmica. I. Geber, Selmo. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM: QU 78

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA MULHER



FOLHA DE APROVAÇÃO

**EFICÁCIA DO USO DA CIMICIFUGA RACEMOSA NA FUNÇÃO
ENDOTELIAL DE MULHERES PÓS-MENOPAUSADAS: ENSAIO CLÍNICO
RANDOMIZADO, DUPLO-CEGO, PLACEBO CONTROLADO**

EDUARDO SIQUEIRA FERNANDES

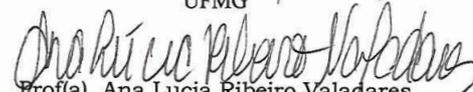
Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em SAÚDE DA MULHER, como requisito para obtenção do grau de Doutor em SAÚDE DA MULHER, área de concentração PATOLOGIA GINECOLÓGICA E REPRODUÇÃO.

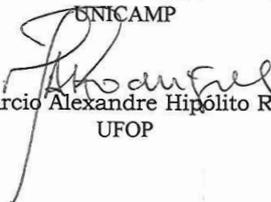
Aprovada em 13 de dezembro de 2019, pela banca constituída pelos


Prof(a). Selmo Geber - Orientador
UFMG


Prof(a). Ana Luiza Lunardi Rocha Baroni
UFMG


Prof(a). Marcia Cristina Franca Ferreira
UFMG


Prof(a). Ana Lucia Ribeiro Valadares
UNICAMP


Prof(a). Marcio Alexandre Hipólito Rodrigues
UFOP

Belo Horizonte, 13 de dezembro de 2019.

Ao Matheus,
por ter estado ao meu lado tanto quanto foi o
tempo de duração deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Com um pouco mais do que cinco minutos de atraso, finalizo esse trabalho. Ninguém merece maior agradecimento do que o Prof. Dr. Selmo Geber, que após duas rápidas trocas de *e-mail* me possibilitou, no já longínquo ano de 2014, entrar no doutorado. Outros muitos *e-mails*, “*whatsapps*” e algumas reuniões, possibilitaram-me hoje terminá-lo! O Dr Selmo honra o título de professor e ajudou-me em cada uma das etapas desse projeto. E em cada etapa, havia uma palavra de ajuda. Dizia palavras que me tranquilizavam; que cobravam meus prazos; que contornavam todos os percalços que surgiram ao longo da trajetória dessa tese. Não foram muitos, mas não foram poucos os obstáculos. Ele esteve o tempo todo a postos e só não me ajudou mais porque eu não pedi. Poderia, e deveria, ter pedido...

À Dra Myriam Celani, que, mesmo sem o cargo, me co-orientou durante toda a coleta dos dados. A professora Myriam foi uma conselheira maior durante essa importante etapa da minha vida. E estendeu a mim a mão ainda na época da residência, quando rapidamente, entre um parto e outro, tomávamos café e conversávamos sobre vida pessoal, carreira médica ou simplesmente sobre o biscoito ruim que era servido. Somos ajudados por poucos gestos, por simples atitudes. A professora Myriam me ajudou com muitos.

À Dra Marina Fistarol, por estar comigo nos cafés, na coleta dos dados, nas incertezas do ambulatório, nas dificuldades da caminhada. Dividiu comigo suas angústias quanto ao mestrado e eu, mais que espertamente, aproveitei para cobrar ouvidos para as minhas próprias! Fomos de bate-papo na sala de espera a áudio longos no *Whatsapp*. Muito obrigado, Marina. Essa tese teve seu dedo!

À Dra Mirtza Muhlert, minha amiga. Se houve alguém que me apoiou em cada segundo nesses últimos 10 anos, esse alguém foi a minha “Marisa Mulher”, como carinhosamente a chamo. “Marisa” de sotaque lindo, de família maravilhosa, de história sem igual. Amiga de muitos plantões juntos e muito mais vivências compartilhadas. Amor expresso em toalhas bordadas. Minha linda, eu te amo!

Aos muitos residentes e acadêmicos que rapidamente passaram pelo Ambulatório de Climatério, do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Muitos voltei a encontrar. Muitos me agradeceram por ensiná-los. Mas agradeço a cada um por terem me ajudado nos anos de coleta desses dados!

A todos os funcionários do Ambulatório de Climatério, do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, que me ajudaram, cada um dentro de suas funções.

À minha mãe e ao meu pai. Aos meus irmãos, minhas cunhadas e sobrinhos! Ter vocês ao meu lado é fundamental para que cada decisão seja corretamente tomada. Cada palavra de aconselhamento, de suporte, de confiança. Cada momento de alegrias e tristezas, dificuldades e superação. Brigas e abraços. Distâncias e aproximações. Cada milésimo de segundo da minha vida é construído por vocês e com vocês. Essa tese foi feita porque vocês estiveram ao meu lado. Meu muito obrigado.

Às Dras Inessa Beraldo Bonomi e Ana Christina de Lacerda Lobato que, desde o primeiro dia de residência, demonstraram confiança no meu trabalho. De lá para cá, foram 10 anos de ajudas mútuas, conselhos e risadas. Dras Inessa e Ana me ajudaram a “ser profissional” na Obstetrícia e Ginecologia. E ensinaram-me a ser alguém muito mais além dos muros do hospital.

A dois grandes mestres que me acolheram na residência médica: Dr Isaías V. Martins e Dr Alexandre Mariano. Pensar em alguém com carinho e admiração é direcionar o pensamento a esses dois. Não absorver conhecimentos de forma passiva, o cuidado com o outro e ética profissional foram, e ainda são, pontos preciosos que ambos me ajudaram a consolidar na minha vida profissional. Agradeço aos dois por ter tido a oportunidade de ser seu residente.

Às minhas amigas da residência e “do hospital”: Dras Daniele Martins, Fernanda Araújo, Ana Carolina Otoni e Bruna Amorim. Os dias foram mais divertidos ao lado de vocês.

Aos meus orientandos, que entenderam o porquê de eu, algumas vezes, precisar dar uma “sumida do mapa”.

Ao Programa de Pós-graduação em Saúde da Mulher, da Universidade Federal de Minas Gerais, na figura do Dr Selmo Geber, pela ajuda, disponibilidade e apoio.

Aos membros da Banca examinadora dessa tese, por terem disponibilizados seus contados minutos para avaliá-la. Só me cabe agradecer!

Aos meus grandes amigos Tiago Torrent e Lucia Piuma, pelas horas discutindo da política atual ao sexo dos anjos – assuntos tão formidavelmente “linkados” por nós! Companheiros de risadas e de aconselhamentos, de surtos de grandeza e de elaboração de projetos de poder monárquicos. Durante várias discussões, traçamos o melhor futuro para o

Brasil. Em especial, agradeço ao professor Dr Tiago Torrent, pelas diversas vezes que o demandei quanto às traduções para a língua inglesa e pela revisão gramatical desse texto.

Ao amigo e companheiro de “problematizações” Tássio Alonso, que também foi meu consultor linguístico, auxiliando-me nas traduções para o inglês sempre que necessitei.

Aos meus primos Georgia e Ricardo, pelos momentos felizes regados a vinho. Agradeço pela compreensão da distância e, principalmente, pela certeza que me passaram do apoio em todos os momentos que precisei.

Às minhas amigas Quetie Mariano e Camila Macedo. Torceram (e torcem sempre) pelo meu sucesso. De minhas guias nos estudos da sexualidade humana a amigas de encontros furtivos. Somos abraços, beijos, vinhos e muitos segredos! Obrigado a vocês duas!

Ao Dr Gerson Pereira Lopes, por ter me acolhido na Sexologia. Não seria o mesmo profissionalmente se ele não tivesse estendido a mão para mim.

Às minhas eternas professoras e amigas, Dras Vera Peters e Martha Guerra. Foram por muito tempo minhas mães, acolhendo-me e me ensinando. Ajudaram-me a traçar o meu caminho. Ajudaram-me nos meus momentos de dificuldade. E rimos muito juntos, compartilhando as alegrias. Passaram pela minha vida e me marcaram. Sempre serei agradecido a elas.

A todos que por algum momento torceram por mim.

"Tenho andado distraído
Impaciente e indeciso
E ainda estou confuso
Só que agora é diferente
Sou tão tranquilo e tão contente

Quantas chances desperdicei
Quando o que eu mais queria
Era provar pra todo o mundo
Que eu não precisava
provar nada pra ninguém

(...)

Sei que, às vezes, uso
Palavras repetidas
Mas quais são as palavras
Que nunca são ditas?"

(QUASE SEM QUERER [1986]. Dado Villa-Lobos; Renato Russo; Renato Rocha)

"Sabe que sou o homem o menos pontual que há neste mundo; entre os meus imensos defeitos e as minhas poucas qualidades, não conto a pontualidade, essa virtude dos reis, e esse mau costume dos ingleses. (...), não posso admitir de modo algum que um homem se escravize ao seu relógio e regule as suas ações pelo movimento de uma pequena agulha de aço ou pelas oscilações de uma pêndula."

(CINCO MINUTOS [1856]. José de Alencar)

RESUMO

Introdução: A transição menopausal é um estado de alterações endocrinológicas que se expressa por irregularidades menstruais, sintomas vasomotores, mudanças de humor e síndromes urogenitais. Complicações a longo prazo decorrentes do hipoestrogenismo típico do período da pós-menopausa – fragilidade óssea, alterações no metabolismo de glicídeos e lipídeos e doenças cardiovasculares – também são eventos que podem surgir e prejudicar o envelhecimento saudável. As doenças cardiovasculares são a principal causa de morbimortalidade entre as mulheres e, após o início da menopausa, o risco de desenvolver alterações cardiovasculares aumenta de duas a seis vezes quando comparado àquele de mulheres na pré-menopausa. As manifestações cardiovasculares são secundárias a uma disfunção endotelial, resultado da redução da atividade do óxido nítrico endotelial e a uma tendência a um estado vascular permanentemente inflamatório. **Objetivo:** Avaliar os efeitos do uso diário de *Cimicifuga racemosa* através da dilatação fluxomediada (FMD) da artéria braquial na função endotelial, quando utilizada por 28 dias por mulheres saudáveis na pós-menopausa. **Métodos:** Estudo duplo-cego, randomizado, controlado por placebo, com dois grupos de mulheres na pós-menopausa (n = 31, cada). Os indivíduos foram avaliados clinicamente e, antes e após 28 dias de tratamento, por medida da dilatação fluxomediada da artéria braquial. Os pacientes receberam 160mg de extrato seco de *Cimicifuga racemosa* (correspondente a 4 mg de glicosídeos triterpenos) ou placebo. **Resultados:** A média de idade, tempo de menopausa e IMC nos dois grupos foram semelhantes. As medidas da dilatação mediada por fluxo da artéria braquial, pré e pós-tratamento, respectivamente, mostraram um aumento significativo nos pacientes que usaram a *Cimicifuga racemosa* (p = 0,006), diferentemente dos pacientes que usaram o placebo, os quais não apresentaram alterações no resultado da dilatação mediada por fluxo da artéria braquial após 28 dias de uso (p ≥ 0,05). Ao comparar o número de mulheres nos dois grupos que apresentaram aumento da FMD, foi encontrada uma diferença significativa na medida do grupo tratado após o uso da medicação (p = 0,018). **Conclusão:** O uso diário de 160mg de extrato de *Cimicifuga racemosa* por mulheres na pós-menopausa por 28 dias influencia beneficemente a função endotelial, promovendo elasticidade da artéria braquial.

Palavras-chave: *Cimicifuga racemosa*. *Black cohosh*. Pós-menopausa. Dilatação fluxomediada. Artéria braquial. Função endotelial.

ABSTRACT

Introduction: Menopausal transition is a state of endocrinological changes that is expressed by menstrual irregularities, vasomotor symptoms, mood changes and urogenital syndromes. Long-term complications of postmenopausal hypoestrogenism – bone fragility, changes in glycid and lipid metabolism and cardiovascular disease – can also arise and impair healthy aging. Cardiovascular disease is the leading cause of morbidity and mortality among women and after the onset of menopause, the risk of developing cardiovascular changes increases two to six times compared to premenopausal women. Cardiovascular manifestations are secondary to endothelial dysfunction resulting from reduced endothelial nitric oxide activity and a tendency to a permanently inflammatory vascular state. **Objective:** Assess the effects of daily use of *Cimicifuga racemosa* through the flow-mediated dilation of the brachial artery on the endothelial function, when used for 28 days by healthy postmenopausal women. **Methods:** A double-blinded, randomized, placebo-controlled study with two groups of postmenopausal women (n = 31, each). The subjects were clinically assessed and the flow-mediated dilatation of the brachial artery was measured before and after 28 days of treatment. Patients received dry extract corresponding to 160 mg *Cimicifuga racemosa* (extract with 4mg of triterpene glycosides) or placebo. **Results:** Mean age, time since menopause and BMI in the two groups were similar. The measurements of the flow-mediated dilatation of the brachial artery, pre- and post-treatment, respectively, showed a significant increase in patients who used the *Cimicifuga racemosa* (p = 0.006), unlike patients who used the placebo, who did not present changes in the outcome of flow-mediated dilatation of the brachial artery after 28 days of use (p ≥ 0.05). When comparing the number of women in both groups who showed an increase in FMD, a significant difference was found in the measurement of the treated group after the use of the medication (p = 0.018). **Conclusion:** The daily use of 160mg daily of *Cimicifuga racemosa* extract by postmenopausal women for 28 days beneficially influences endothelial function by promoting elasticity of the brachial artery.

Key-words: *Cimicifuga racemosa*. Black cohosh. Postmenopausal. Flow-mediated dilation. Brachial artery. Endothelial function.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. Constituintes biologicamente ativos presentes na <i>Cimicifuga racemosa</i>	29
FIGURA 2. Biossíntese do óxido nítrico (NO) e seus alvos na musculatura lisa vascular	35
FIGURA 3. Diagrama de medida da FMD	45
FIGURA 4. Fluxograma demonstrativo do processo de análise das pacientes, do recrutamento até a análise final do estudo	48
FIGURA 5. Comparação intragrupo entre as medidas da dilatação fluxomediada da artéria direita (FMD) antes e após 28 dias de tratamento com 160mg extrato seco de <i>Cimicifuga racemosa</i> e Placebo	52

LISTAS DE TABELAS

- TABELA 1. Características clínicas das participantes do estudo submetidas à medida da dilatação fluxomediada da artéria direita após 28 dias de tratamento com Placebo e 160mg extrato seco de *Cimicifuga racemosa* 49
- TABELA 2. Verificação de teste de Normalidade das variáveis que avaliam a medida da dilatação fluxomediada da artéria direita após 28 dias de tratamento com Placebo e com 160mg extrato seco de *Cimicifuga racemosa* 50
- TABELA 3. Comparação entre as medidas da dilatação fluxomediada da artéria direita (FMD) antes e após 28 dias de tratamento com Placebo e com 160mg extrato seco de *Cimicifuga racemosa* 51
- TABELA 4. Comparação entre as médias considerando aumento ou não das medidas da dilatação fluxomediada da artéria direita (FMD) após 28 dias de tratamento com Placebo e com 160mg extrato seco de *Cimicifuga racemosa* 53

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	serotonina
5-HT ₁₋₇	receptores serotoninérgicos (tipos 1 a 7)
ACh	acetilcolina
ADMA	dimetilarginina assimétrica
ADP	difosfato de adenosina
AMPc	3',5'-monofosfato de adenosina cíclico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Ca ²⁺ ATPase	adenosinatriphosfatases cálcio-dependente
eNOS	óxido nítrico-sintetase constitutivas
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CR	<i>Cimicífuga racemosa</i>
DCV	doenças cardiovasculares
E2	estradiol
EC	estrogênio conjugado
EMA	<i>European Medicine Agency</i>
eNOS	óxido nítrico-sintetase endothelial
ER- α	receptor α de estrogênio
ERK	proteína quinase regulada por sinal extracelular
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FMD	dilatação fluxomediada arterial
FSH	hormônio folículo estimulante
G-GT	gamaglutamil transferase
GMPc	3',5'-monofosfato de guanosina cíclico
HC	Hospital das Clínicas
HDL-C	colesterol lipoproteína de alta densidade
IMC	índice de massa corpórea
iNOS	óxido nítrico-sintetase indutível
ISRS	inibidores seletivos da recaptação de serotonina
ISRSN	inibidores seletivos da recaptação de serotonina e noradrenalina

JNK	proteína quinase c-Jun-NH ₂ - terminal
L-NOARG	NG-nitro-L-arginina
LDL-C	colesterol lipoproteína de baixa densidade
LH	hormônio luteinizante
MCP-1	proteína quimiotática de monócitos
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
nNOS	óxido nítrico-sintetase neuronal
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico-sintetases
OMS	Organização Mundial da Saúde
P	grupo placebo
PA	pressão arterial
PGI ₂	prostaciclina
PR-A/B	receptores de progesterona A/B
ROS	espécie reativa de oxigênio
T ₄ L	tiroxina tetraiodotironina livre
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGO / AST	aspartato aminotransferase
TGP / ALT	alanina aminotransferase
TH	terapia hormonal
TNF α	fator α de necrose tumoral
TSH	hormônio estimulador da tireoide
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VEGFR1	receptor do fator 1 de crescimento endotelial vascular
WHI	Women's Health Initiative

SUMÁRIO¹

INTRODUÇÃO	18
REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 Doenças cardiovasculares e menopausa	21
2.2 Tratamento dos sintomas menopausais	22
2.3 Cimicifuga racemosa	24
2.3.1 Ações farmacológicas da Cimicifuga racemosa	27
2.4 Função endotelial	32
2.4.1 Avaliação da função endotelial	36
2.4.1.1 Dilatação fluxomediada da artéria braquial (FMD)	38
OBJETIVO	40
METODOLOGIA	41
4.1 Ensaio clínico	41
4.2 Grupo estudado	41
4.3 Critérios de inclusão	42
4.4 Critérios de exclusão	42
4.5 Avaliação e tratamento	42
4.6 Técnica aplicada da dilatação fluxomediada da artéria braquial	44
4.7 Análise estatística	45
RESULTADOS	47
CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS	59
APÊNDICES	72
Apêndice A – Termo de consentimento livre e esclarecido	73
Apêndice B – Ficha de anamnese, exame físico e exames complementares	74
ANEXOS	76
ANEXO A – Carta de Aprovação do COEP – UFMG	77
ANEXO B – Bula do medicamento utilizado no estudo	78

¹ Este trabalho foi revisado de acordo com as novas regras ortográficas aprovadas pelo Acordo Ortográfico assinado entre os países que integram a Comunidade de Países de Língua Portuguesa (CPLP), em vigor no Brasil desde 2009. E foi formatado de acordo com a ABNT NBR 14724 de 17.04.2011.

INTRODUÇÃO

A transição menopausal é caracterizada por um estado de profundas alterações endocrinológicas que se expressa clinicamente por irregularidades menstruais, sintomas vasomotores, síndromes urogenitais e mudanças de humor. Associam-se complicações como fragilidade óssea, alterações no metabolismo de glicídeos e lipídeos e doenças cardiovasculares que, a longo prazo, podem prejudicar o envelhecimento saudável (VIANA, MARTINS e GEBER, 2012; WENDER e ODERICH, 2016). Consiste em uma progressão endocrinológica gradual que faz com que mulheres em idade reprodutiva deixem de ter menstruações regulares, cíclicas e previsíveis, na grande maioria das vezes, para alcançarem o fim dos períodos menstruais, associado à senescência ovariana (BRADSHAW, 2014).

Apesar de comumente utilizado, o termo climatério², que segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) corresponderia ao período de vida da mulher entre os 40 e 65 anos de idade (FONSECA *et al.*, 2010), não expressa de forma consistente todas as alterações biológicas pelas quais uma mulher passa e, portanto, sua aplicação se restringiria atualmente à comunicação com as pacientes e com a imprensa leiga, sendo evitado em trabalhos científicos (BRADSHAW, 2014). Independente do termo utilizado – climatério ou de transição menopausal³ – é durante essa fase que ocorre a menopausa, marco temporal na vida das mulheres.

Não há consenso quanto a idade, início e duração da transição menopausal, existindo variações na faixa etária e no tempo de duração de cada fase de vida da mulher. Schoenaker *et al.* (2014) concluíram em metanálise que a ocorrência da menopausa se daria entre 48,3 e 49,2 anos, com considerável variação ao redor do mundo. No Brasil, a média de idade de surgimento da menopausa estaria em torno de 52,1 anos (PEDRO *et al.*, 2003).

Fisiologicamente, após a cessação da menstruação, ocorre perda da atividade cíclica ovariana (DAVIS *et al.*, 2015). Os ciclos menstruais prévios à menopausa são marcados por

² *Klimacter*, do grego, “degrau”, “escada”, foi um termo médico inglês, inicialmente usado para se referir ao amadurecimento do homem. Em 1812, o ginecologista francês C. P. L. Gardanne cunhou a palavra *ménépousie*, a partir da junção das palavras gregas *mens* (mês) e *pausis* (parada, interrupção). Em 1857, a expressão climatério foi relacionada à mulher.

³ Considerando a confusão de terminologias na literatura, na presente tese, as expressões climatério e transição menopausal foram usados como sinônimos; assim como sintomas climatéricos, sintomas menopausais e sintomas da transição menopausal.

diminuição dos níveis de inibinas, elevação dos níveis de hormônio folículo-estimulante (FSH) com níveis normais do hormônio luteinizante (LH). Os níveis de estradiol (E2) tendem a se manter normais ou levemente elevados (SANTORO *et al.*, 2003) até cerca de um ano antes da cessação completa do desenvolvimento folicular. A elevação dos níveis de FSH reflete a redução do *pool* folicular e sua conseqüente redução na secreção de inibinas pelas células da granulosa – que exerce importante influência no feedback negativo sobre a secreção de FSH pela hipófise. Tanto inibinas A quanto B estão envolvidas nesse mecanismo, uma vez que níveis de inibina A, na fase lútea, e níveis de inibina B, na fase folicular, diminuem com a idade e antecedem a elevação do FSH. À medida que os níveis de FSH se elevam e a fase folicular torna-se mais curta, níveis de E2 se elevam, sugerindo que, inicialmente, níveis mais elevados de FSH estimulam um desenvolvimento folicular mais intenso. O fato de o número de folículos ser finito, leva a um esgotamento total deles. Meses que se seguem com amenorreia e níveis associados de FSH superiores ou iguais a 40mUI/L revelam que a menopausa está próxima ou mesmo já tenha ocorrido (MCKINLAY; BRAMBILLA; POSNER, 1992). Os níveis circulantes de E2 na pós-menopausa giram em torno de 10-20pg/mL (FRITZ; SPEROFF, 2011).

Embora nem todas as mulheres expressem sintomas nessa fase, aqueles frequentemente observados durante a transição menopausal e na pós-menopausa estão relacionados aos baixos níveis de estrogênio circulantes. As modificações fisiológicas que ocorrem em todo o organismo durante o climatério e a pós-menopausa, secundárias ao hipoestrogenismo, abrangem o eixo neuroendócrino, com alterações serotoninérgicas e noradrenérgicas, principalmente (FRITZ; SPEROFF, 2011; BRADSHAW, 2014); o sistema tegumentar (pele e anexos); os aparelhos cardiovascular, geniturinário e reprodutor; o aparelho de sustentação (músculos e ossos); o metabolismo; a visão; a dentição, além de fadiga e alterações psíquicas e da sexualidade. Sucintamente, ocorrem (FRITZ; SPEROFF, 2011; DAVIS *et al.*, 2015):

- Alteração do padrão menstrual: diminuição ou aumento do fluxo menstrual, frequências irregulares dos ciclos ou amenorreia.
- Instabilidade vasomotora, sejam fogachos acompanhados ou não de sudorese.

- Condições atróficas: atrofia do epitélio vulvovaginal, com possibilidade de prolapso uretral, dispareunia e prurido; atrofia generalizada da pele; sinais e sintomas urinários, como cistites, uretrites não-infecciosas e urgência miccional.
- Problemas secundários de saúde por privação a longo prazo de estrogênio, como osteoporose e doenças cardiovasculares (DCV).

A instabilidade vasomotora, seguida de manifestações neurogênicas, afeta aproximadamente 75% das mulheres na perimenopausa (FREEDMAN; SUBRAMANIAN, 2005). Os mecanismos fisiológicos que explicam os sintomas vasomotores não são bem compreendidos. Possivelmente, um evento inicial levaria a uma instabilidade do centro termorregulador corporal, localizado no hipotálamo (FREEDMAN; KRELL, 1999), levando algumas mulheres a terem calafrios, palpitações, cefaleia, tonturas e parestesia. Este evento se daria por ativação de sistemas centrais noradrenérgicos, serotoninérgicos, opioides, adrenais e autonômicos, bem como ativação – ainda por mecanismos incertos – de processos vasculares (THURSTON; JOFFE, 2011).

Abstinência ou rápidas variações dos níveis de E2 parecem estar relacionadas à gênese das ondas de calor (SHIFREN; SCHIFF, 2012), promovendo alterações, ainda que sutis, na temperatura interna do corpo (FREEDMAN; KRELL, 1999) e disparando mecanismos de perda de calor. Alterações nos níveis de β -endorfinas (PINKERTON; STOVALL; KINGHTLINGER, 2009), elevação dos níveis de norepinefrina – principal neurotransmissor responsável por baixar o ponto de ajuste no centro termorregulador e pelo acionamento dos mecanismos de perda de calor associados aos fogachos (RAPKIN, 2007) – e a suprarregulação dos receptores 5-HT_{2A} no hipotálamo, com consequente redução dos níveis de serotonina no sangue (SLOPIEN; MECZEKALSKI; WARENIK-SZYMANKIEWICZ, 2003), também contribuiriam para a ocorrência dos sintomas vasomotores.

Como problema secundário, tempo dependente após a ocorrência da menopausa, as doenças cardiovasculares são a principal causa de morbimortalidade entre as mulheres. Após o início da menopausa, o risco de desenvolver alterações cardiovasculares aumenta de duas a seis vezes quando comparado àquele de mulheres na pré-menopausa. As manifestações cardiovasculares são secundárias a uma disfunção endotelial, resultado da redução de substâncias vasoativas e secundária a uma tendência a um estado vascular permanentemente inflamatório.

REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Doenças cardiovasculares e menopausa

As manifestações cardiovasculares englobam tanto a doença cardíaca quanto a cerebrovascular, sendo esta a maior causa de morbimortalidade na mulher durante a pós-menopausa. Embora a doença coronariana acometa ambos os sexos, existe clara diferença nessa incidência, sendo maior na população masculina que na feminina e aumentando em ambos, com a idade (DUBEY *et al.*, 2005). A maior parte das manifestações cardiovasculares evolui a partir de alterações ateroscleróticas nos vasos sanguíneos principais. Antes da menopausa, as mulheres têm risco bem menor de eventos cardiovasculares, em comparação com homens na mesma faixa etária. Níveis elevados de colesterol lipoproteína de alta densidade (HDL-C) em mulheres mais jovens, possivelmente sustentados por um efeito estrogênico, poderiam contribuir para essa proteção relativa à DCV em mulheres. Após a menopausa, esse benefício desaparece ao longo do tempo, de forma que mulheres na faixa dos 70 anos passam a ter risco idêntico ao de homens na mesma faixa etária. A relação entre menopausa e incidência de DCV foi investigada pela primeira vez na coorte de Framingham (KANNEL, 1987). Observou-se tendência de incidência de duas a seis vezes maior de DCV em mulheres pós-menopausadas, quando comparadas a mulheres na pré-menopausa de mesma faixa etária. O aumento nas DCV associado à transição menopausal é observado independentemente da idade em que a menopausa ocorre. Esses e outros dados indicam que a queda do estrogênio estaria associada a aumento no risco de DCV.

Estudos que tratam do efeito estrogênico sobre o sistema vascular datam do final da década de 1950. Moskowitz *et al.* (1956) demonstraram efeito antiarterioesclerótico na artéria coronariana e Malinow e Pellegrino (1958), na aorta de ratos, após tratamento com estrogênio. Em 1959, utilizando estradiol marcado por radioisótopos em seis coelhos de ambos os sexos, Malinow, Pellegrino e Lange (1959) detectaram material radioativo na aorta de todos os animais, com níveis mais elevados em placas ateromatosas. Posteriormente, foi verificada a ligação entre o estrogênio marcado radioativamente e as células vasculares humanas (MALINOW *et al.*, 1963). Diversos ensaios clínicos se seguiram sugerindo ser o estrogênio cardioprotetor e a terapia hormonal (TH) estrogênica benéfica na redução de DCV

em mulheres pós-menopausadas (HENDERSON; PAGANINI-HILL; ROSS, 1991; WOLF *et al.*, 1991; GRODSTEIN *et al.*, 1996; GRODSTEIN *et al.*, 2000). A ação dos estrogênios sobre o sistema cardiovascular ocorreria principalmente por ação direta na parede dos vasos, sendo ativo tanto no músculo liso vascular, onde foram identificados receptores para estrogênio, quanto no endotélio, onde se verificaram sítios específicos de ligação. O estrogênio atuaria promovendo vasodilatação por estímulo de síntese de prostaciclina (PGI₂) e óxido nítrico (NO) (FARHAT; LAVIGNE; RAMWELL, 1996).

Porém, apesar de evidências científicas de que a deficiência estrogênica aumenta o risco cardiovascular e de que o uso de estrogênios na pós-menopausa promova diminuição do colesterol lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) (USHIODA *et al.*, 2006) e ação vasodilatadora direta sobre a parede vascular (ORSHAL; KHALIL, 2004), ainda não se consegue relacionar a terapia hormonal estrogênica a um efeito cardioprotetor direto.

2.2 Tratamento dos sintomas menopausais

Durante muitos anos, a menopausa foi considerada como uma “doença de deficiência”, o que levou a terapia de reposição hormonal a ser usada, muitas vezes sem critério, por mais de 100 anos (BRADSHAW, 2014). Oficialmente, o tratamento hormonal dos sintomas associados à menopausa teve início a partir de 1941, quando o Canadá aprovou o uso de estrogênio extraído de urina de éguas (estrogênio conjugado – Premarin®) para alívio dos sintomas vasomotores. Em 1942, o Food and Drug Administration (FDA, Estados Unidos) acompanhou essa aprovação.

Esforços para tratar os sintomas menopausais iniciaram-se ao final do século XIX (FRITZ; SPEROFF, 2011). Em 1897, William Hubert Sale Fosbery reportou tratamento efetivo dos sintomas vasomotores ao administrar extratos ováricos em mulheres menopausadas (FOSBERY, 1897). Nos anos de 1930, hormônios sintéticos, como o estilbestrol e o etinilestradiol, passaram a ser usados em mulheres sintomáticas (FRITZ; SPEROFF, 2011). Com base em estudos observacionais e epidemiológicos disponíveis naquele momento, o tratamento hormonal passou a ser amplamente prescrito para mulheres menopausadas com o objetivo de obter diversos benefícios potenciais à saúde, além do controle dos fogachos. O consenso geral era o de que a TH, além de ter papel benéfico na

prevenção e no tratamento da osteoporose, poderia ter efeito protetivo contra DCV (STAMPFER *et al.*, 1985) e demência, mesmo que os estudos iniciais não tivessem considerado a natureza dos esquemas hormonais testados, a população estudada, a faixa etária e/ou os fatores de risco das participantes (BRADSHAW, 2014).

Revisado, o estudo Women's Health Initiative (WHI) confirmava redução significativa de fraturas de quadril em mulheres saudáveis que receberam TH estrogênica, com esse mesmo benefício não se estendendo ao sistema cardiovascular (ROSSOUW *et al.*, 2002). Fez-se, portanto, recomendação de que a indicação da TH não deveria estar vinculada à proteção cardiovascular e que mulheres candidatas à estrogênio terapia deveriam ter o risco de câncer mamário muito bem avaliado. Somado a outros estudos, como o realizado por Hulley *et al* (1998), conclui-se que o uso da TH não apenas não preveniria doenças cardíacas em mulheres saudáveis, como de fato aumentaria o risco de infarto, tromboembolismo venoso e câncer de mama. Devido aos riscos relatados, indicando que a TH poderia trazer mais riscos que benefícios quando utilizada para prevenir doenças crônicas do envelhecimento, o consenso passou a ser que a TH deveria ser usada na menor dose eficaz, durante o menor tempo possível para atingir seus objetivos e iniciada próximo à instalação da menopausa (SHIFREN; SCHIFF, 2012). Evitar-se-ia, assim, que o desenvolvimento silencioso da aterosclerose elevasse a incidência de acidentes cardiovasculares nos primeiros anos de terapia, através da ativação estrogênica de mecanismos endoteliais em um leito vascular já comprometido (RESLAN; KHALIL, 2012).

Apesar dos riscos conhecidos, a hormonioterapia é indiscutivelmente a escolha mais eficaz para o tratamento das manifestações clínicas durante a transição menopausal, principalmente dos sintomas vasomotores (BRASIL, 2008; SHIFREN; SCHIFF, 2010). Porém, mulheres que experimentaram efeitos adversos significativos, que não desejam o tratamento hormonal ou para as quais esta conduta está contraindicada, como nos casos de neoplasias hormônios-dependentes, porfirias, DCV, entre outras, alternativas medicamentosas não-hormonais e outras formas de terapia não medicamentosa, como reforço a orientações na mudança do estilo de vida, devem ser aventadas (BRASIL, 2008; PAIVA; BACAARO, 2016).

Como exemplos de terapias farmacológicas não hormonais, temos os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) e de serotonina e noradrenalina (ISRSN), gabapentinoides, antidepressivos, anti-hipertensivos e fitoterápicos, sejam fitoestrogênicos ou

não (ALMEIDA FILHO; NAHÁS, 2017). Apesar de alguns estudos questionarem a real eficácia dos fitoterápicos (FRANCO *et al.*, 2016) e classicamente não constarem no rol da terapêutica tradicional no combate aos sintomas vasomotores, revisões recentes avalizam sua eficácia (SARRI *et al.*, 2017).

Os fitoestrogênios são compostos vegetais não esteroides que apresentam estrutura similar ao estrogênio ou que são metabolizados em compostos com atividade estrogênica (FRITZ; SPEROFF, 2011; ALMEIDA FILHO; NAHÁS, 2017), podendo apresentar propriedades tanto estrogênicas quanto antiestrogênicas a depender da saturação dos receptores e do nível circulante de estrogênio. Têm ação predominante nos β -receptores e fraca ação sobre os receptores α -estrogênicos. Seus representantes mais expoentes são a genisteína e daidzeína – isoflavonas presentes em produtos derivados da soja e do *Trifolium pratense* (red clover) (CÉSAR *et al.*, 2007). Dentre os fitoterápicos potencialmente não-estrogênicos, destacam-se o Ginkgo biloba, o ginseng, a erva-de-são-joão e a *Cimicifuga racemosa* (L.) Nutt., esta última apresentando boa tolerabilidade nas doses convencionais e sendo bem conhecida e estudada para alívio de sintomas vasomotores (PAIVA; BACAARO, 2016; ALMEIDA FILHO; NAHÁS, 2017).

2.3 *Cimicifuga racemosa*

Da família das Ranunculáceas, a *Cimicifuga racemosa*⁴ é uma planta que cresce em regiões de clima temperado, originalmente do Canadá e da costa atlântica dos Estados Unidos da América. É uma planta herbácea perene, com altura entre um e três metros, com folhas grandes e um rizoma escuro e grosso, de onde o fitoterápico é produzido (ALONSO, 1998). A *C. racemosa* (L.) Nutt. também é conhecida por outros nomes: *black cohosh*, *Actaea racemosa*, *cimicífuga* *Serpentaria*, *Botrophys racemosa* e *black snakeroot* (CLAPAUCH *et al.*, 2003).

Tradicionalmente, a *C. racemosa* é usada no tratamento de artrite reumatoide, dores musculares, dor ciática, zumbidos e no controle de manifestações de doenças do sistema nervoso, como coreia. Na ginecologia, durante o século XIX, seu espectro de uso baseava-se no tratamento da endometriose, amenorreia, dismenorreia, esterilidade e na dor severa pós-

⁴ Do latim *Cimicis* e *fugio* (insetos em fuga), pois se acreditava que seu aroma repelia os insetos, foi descrita pela primeira vez por Plukenet em 1696 e, posteriormente, por Lineo.

parto (MAHADY, 2005). Hoje, o uso da *C. racemosa* é amplamente difundido para o tratamento dos sintomas neurovegetativos e psíquicos do período de transição menopausal e pós-menopausa (EUROPEAN MEDICINE AGENCY, 2018), a despeito de trabalhos que questionam a sua eficácia (VERHOEVEN *et al.*, 2005). O uso do fitoterápico é reconhecida por órgãos reguladores governamentais, como a German Commission E (BLUMENTHAL; BUSSE, 1998) e a ANVISA⁵, além de ter parâmetros de controle de qualidade, perfil químico, uso terapêutico, farmacologia experimental e clínica, toxicologia, dose e posologia registrados pela OMS (WHO, 2002).

A *C. racemosa* é indicada para o alívio dos sintomas do climatério, como rubor, ondas de calor, suor excessivo, palpitações e alterações depressivas de humor (ANEXO B). De fato, diversos estudos (WUTTKE; SEIDLOVA-WUTTKE; GORKOW, 2003; FREI-KLEINER *et al.*, 2005) comprovam eficácia da *C. racemosa* no controle dos sintomas vasomotores. Wuttke, Seilova-Wuttke e Gorkow (2003) em estudo duplo-cego, placebo-controlado, randomizado, multicêntrico, compararam durante três meses, efeitos terapêuticos de extrato padronizado de *C. racemosa* BNO 1055, com os do estrogênio conjugado. Os autores identificaram redução das queixas climatéricas em ambos os grupos investigados, com uma melhora ainda mais pronunciada nos sintomas psíquicos do grupo tratado com o fitoterápico. Ross (2012) realizou estudo randomizado, multicêntrico, duplo-cego, controlado por placebo, em que mulheres eram recrutadas de 24 clínicas ginecológicas privadas. Nesse estudo, 153 mulheres receberam por 12 semanas, duas vezes ao dia, comprimido contendo 2,5mg de extrato isopropanólico de *C. racemosa* e 151 mulheres receberam placebo. A autora verificou que o grupo que recebeu extrato isopropanólico padronizado da *C. racemosa* teve redução significativa dos sintomas menopausais, com diminuição importante do escore da *Menopause Rating Scale*. O subescore “fogachos” demonstrou ter sido o item mais efetivo para validar a eficácia da cimicifuga. Verificou-se ainda que o efeito foi mais pronunciado nas mulheres com menopausa recente. Com o objetivo de avaliar eficácia e segurança da cimicifuga, outro estudo multicêntrico, duplocego, randomizado, placebo-controlado, desta vez conduzido por Bai *et al.* (2007), comparou grupos de mulheres em uso por 12 semanas de extrato isopropanólico do fitoterápico com grupo de mulheres em uso de tibolona. Os resultados deste estudo demonstraram que o extrato de *C. racemosa* utilizado era seguro para uso e

⁵ Resolução RE nº 89. Lista de Registro Simplificado de Fitoterápicos, de 16 de março de 2004.

apresentava resultados positivos no alívio das queixas climatéricas moderadas a graves anunciadas previamente pelas mulheres. Ao ser comparado ao grupo que havia feito uso da tibolona, os autores evidenciaram redução semelhante da sintomatologia.

Ademais, existe tendência em se buscar alternativas não-hormonais para o tratamento de sintomas climatéricos, principalmente em mulheres que possuem contraindicações ao uso do estrogênio (EDEN, 2016). Pacientes com câncer de mama em terapias endócrinas (por exemplo, em uso de tamoxifeno), geralmente evoluem com sintomas vasomotores, distúrbios do sono e alterações do humor. O manejo desses sintomas após o diagnóstico e tratamento de câncer de mama é extremamente difícil e a terapia hormonal sistêmica está formalmente contraindicada (NAMS, 2017).

Diversos ensaios clínicos são pensados no sentido de encontrar terapias não estrogênicas eficazes para ajudar essas mulheres a controlar as queixas climatéricas. Com o intuito de determinar efeito inibitório de espécies de cimicifuga, Einbond *et al.*, (2008) expusera, durante 96 horas, células de câncer de mama humano MDA-MB-453 a concentrações crescentes do extrato (1%, 15% ou 27% de glicosídeos triterpênicos ou glicosídeos triterpênicos purificados). Os autores observaram efeito inibitório no crescimento dessas células e alterações das estruturas celulares neoplásicas pelo constituinte triterpênic acetéina. A eficácia da acetéina também foi demonstrada por Yue *et al* (2016) no controle angiogênico do crescimento de tumores de mama e de metástases mamárias, em modelo de camundongo imunocompetente. Nesse modelo, verificou-se que a acetéina atuava na migração e motilidade das células endoteliais, além de inibir a proliferação de células endoteliais microvasculares humanas, via envolvimento do gene angiogênico VEGFR1 e da ativação das vias de sinalização JNK e ERK, proteínas que ajudam a regular o processo de autodestruição celular. Segundo os autores, esses achados fornecem informações sobre o uso da acetéina, ou de plantas que contêm acetéina em sua constituição, como a *C. racemosa*, como terapia adjuvante do câncer ou no desenvolvimento de agentes antiangiogênicos.

Já Szmyd *et al.* (2018), para compreender o papel do extrato de cimicifuga na regulação dos receptores de estrogênio (ER- α) e de progesterona (PR-A/B) em células mamárias neoplásicas T-47D, examinaram os efeitos do extrato isolado a 8% e em combinação com hormônios e anti-hormônios. Os autores propuseram que o extrato de

cimicifuga agiria como modulador seletivo dose-dependente dos receptores avaliados, sugerindo que o fitoterápico preveniria o início e a progressão do câncer de mama.

Clinicamente, foi demonstrado não haver alteração da densidade mamária, em mulheres que fizeram uso do extrato isopropanólico de *C. racemosa*, por período de seis meses (HIRSCHBERG *et al.*, 2007).

Apesar das pesquisas serem ainda iniciais, fato é que produtos de alta qualidade à base de *C. racemosa* fornecem um importante ponto de partida para auxiliar o tratamento dos sintomas vasomotores em mulheres em tratamento ou pós-tratamento de câncer de mama (EDEN, 2016).

Parte da dificuldade em realizar metanálises com fitofármacos provém da heterogeneidade, não apenas em relação aos estudos em si, mas também da utilização de diferentes extratos (LEACH; MOORE, 2012). Onde e como a erva é cultivada, o processo de extração e muitos outros fatores podem influenciar a composição final do extrato (EDEN, 2016). Revisão da *Cochrane* (2012) objetivou identificar quão eficaz e segura é a *C. racemosa* na redução da frequência ou da intensidade dos sintomas menopausais quando usada por mulheres na perimenopausa e na pós-menopausa. Essa metanálise revisou 16 estudos envolvendo 2027 mulheres e, apesar de alegar não haver evidências suficientes para apoiar a indicação do fitofármaco no manejo dos sintomas menopausais, os autores afirmaram que, devido ao alto nível de heterogeneidade entre os estudos avaliados, não foi permitido tirar conclusões sobre a real eficácia da *C. racemosa* no manejo dos sintomas vasomotores, sendo, portanto, necessárias mais pesquisas para investigar sua eficácia no tratamento dos sintomas menopausais. Quanto à segurança, os autores identificaram que os efeitos colaterais do uso da *C. racemosa* são raros, tais quais os efeitos colaterais promovidos pelas substâncias placebo nos estudos avaliados, sendo ainda mais raros que os da terapia hormonal (LEACH; MOORE, 2012).

2.3.1 Ações farmacológicas da *Cimicifuga racemosa*

A obtenção dos extratos farmacêuticos da *Cimicifuga racemosa* se dá a partir da pulverização dos rizomas, seguida da extração com etanol ou isopropanol. A padronização é aplicada ao extrato etanólico e ao isopropanólico na proporção de correspondência em 40 a 60% em relação à matéria-prima (WHO, 2002).

Os principais constituintes característicos de *C. racemosa* são representados pelos cimiracemosídeos, triterpenos cicloanostâmicos e derivados do cicloartanol. As classes de substâncias biologicamente ativas encontradas em *C. racemosa* estão representadas na Figura 1: acteol, acetilacteol, cimigenol e derivados, acteína, cimicifugosídeo, cimiracemosídeo, desoxiacteínas, oacetil-shengmanol, actaeóxido, o-acetilcimigenol (WHO, 2002; TSUKAMOTO; ABURATANI; OHTA, 2005), além de 27-desoxiacteína, também conhecido como 23-epi-26-desoxiacteína, um dos maiores constituintes do extrato (HE *et al.*, 2000; CHEN *et al.*, 2002; LI *et al.*, 2002).

Outros constituintes presentes são os ácidos cimicifúgicos, como os ácidos 2fukínólico, cimicifúgico A, cimicifúgico B, cimicifúgico E e cimicifúgico F; os ácidos cafeicos, ferúlico e isoferúlico, e os fenilpropanóides (KRUSE *et al.*, 1999). Por fim, foi descrita entre os componentes a existência da N(ω)metilserotonina, com potente atividade sobre receptores 5HT 7 (POWELL *et al.*, 2008; GÖDECKE *et al.*, 2009; NIKOLI; LI; VAN BREEMEN, 2014).

Essa constituição diversa liga-se diretamente às suas ações farmacológicas. Ação antiestrogênica da *C. racemosa* foi identificada *in vitro* após extrato alcoólico antagonizar a estimulação induzida pelo estradiol na proliferação de células mamárias tumorais da linhagem MCF-7 (ZIERAU *et al.*, 2002; HOSTANSKA *et al.*, 2004; GARITA-HERNANDEZ *et al.*, 2006) e após demonstração de inibição da expressão gênica de receptores estrogênicos após extrato isopropanólico de *C. racemosa* ser administrado a ratos fêmeas DA/Han por um período de 17 dias (KRETZSCHMAR *et al.*, 2005).

Wuttke, Seidlova-Wuttke e Gorkow (2003) em estudo duplo-cego, randomizado, multicêntrico, compararam, durante três meses, os efeitos terapêuticos do extrato padronizado de *C. racemosa* (CR BNO 1055, 40mg/dia), com 0,6mg/dia de estrogênio conjugado. Nesse estudo, 62 mulheres de idade entre 40 a 60 anos, pós-menopausadas ou cuja última menstruação tivesse ocorrido no mínimo há seis meses, foram separadas em três grupos: tratado com *C. racemosa* (CR), tratado com estrogênio conjugado (EC) e tratado com placebo (P). Foram avaliados (i) resposta em relação ao alívio dos sintomas climatéricos apresentados e efeito dos medicamentos sobre o (ii) epitélio vaginal, (iii) metabolismo ósseo e (iv) trofismo

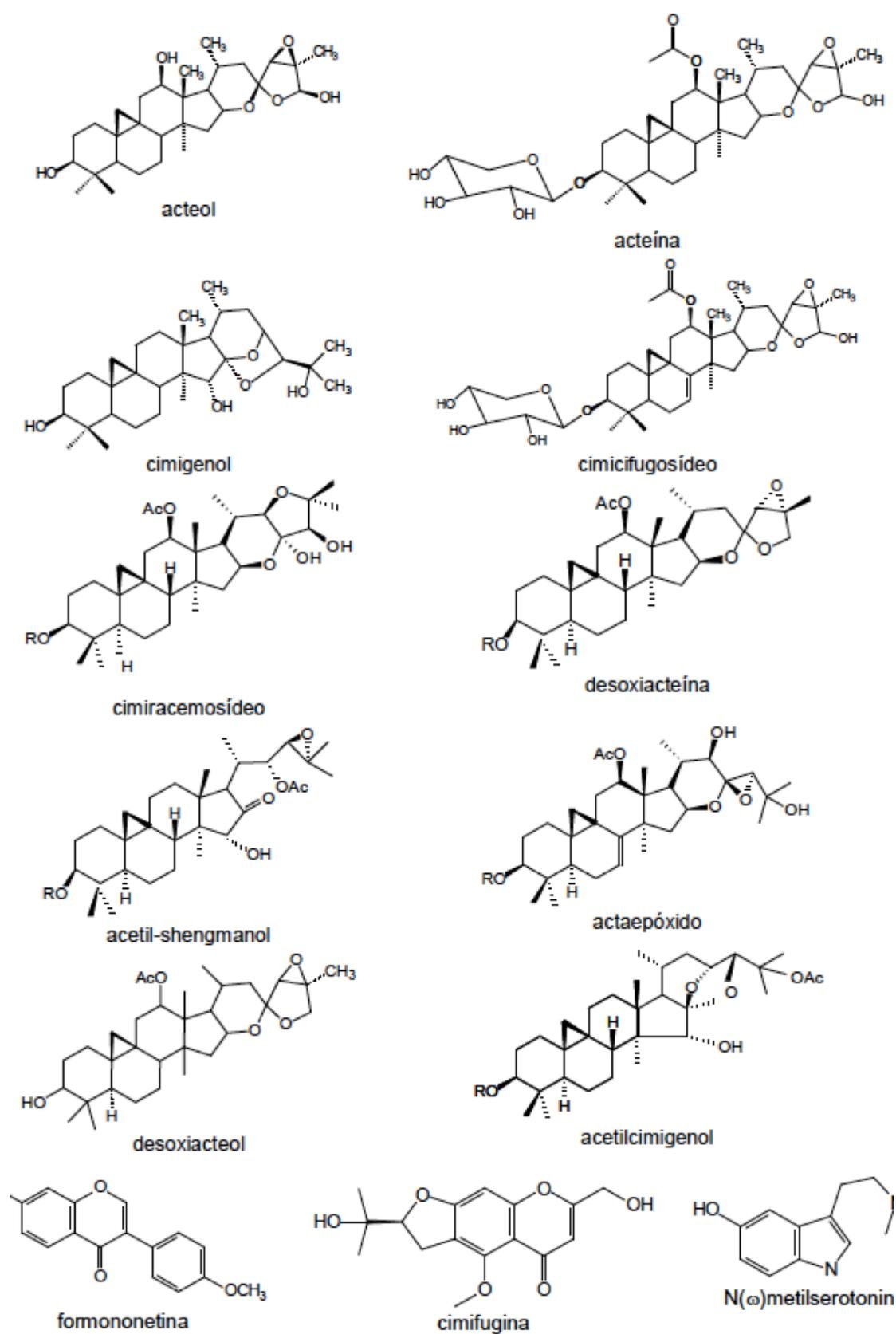


FIGURA 1. Constituintes biologicamente ativos presentes na *Cimicifuga racemosa*. Adaptado de SILVA *et al.*, 2009.

uterino. Quando comparados ao grupo P, os autores identificaram redução das queixas climatéricas nos grupos CR e EC, com melhora mais pronunciada no fator psiquê do grupo CR quando comparado ao grupo EC, aventando-se aqui um efeito central para o extrato. Os autores encontraram resultados positivos estatisticamente relevantes quanto ao estímulo do epitélio vaginal no grupo CR, sem encontrar, no entanto, ação uterotrófica. A análise do metabolismo ósseo realizada através de marcadores séricos também indicou efeitos benéficos tanto nos grupos CR e EC, quando comparados ao grupo P. Os resultados encontrados, também embasados por outros estudos, permitiram aos autores concluir que a ação da *C. racemosa* indicaria uma atividade SERM-like do extrato, baseado em efeitos centrais sobre o hipotálamo (SEIDLOVÁ-WUTTKE *et al.*, 2003) e efeitos moduladores seletivos sobre determinados sítios, como os tecidos ósseo e vaginal (WUTTKE; SEIDLOVA-WUTTKE; GORKOW, 2003) e adiposo (SEIDLOVÁ-WUTTKE *et al.*, 2003), sem agir sobre o tecido uterino (WUTTKE; SEIDLOVA-WUTTKE; GORKOW, 2003; KRETZSCHMAR *et al.*, 2005; ALVES *et al.*, 2008).

No entanto, mesmo havendo trabalhos que identificaram efeitos estrogênicos ou antiestrogênicos da *C. racemosa* (BOLLE *et al.*, 2007), outros não confirmaram esses efeitos (LIU *et al.*, 2001; MAHADY, 2003; BORRELLI; IZZO; ERNST, 2003; STROMEIER; PETEREIT; NAHRSTEDT, 2005).

Freudenstein, Dasenbrock e Nisslein (2002) ao administrarem extrato isopropanólico de *C. racemosa* em ratas ooforectomizadas, durante um período de sete semanas, não identificaram atividade agonista estrogênica aos níveis séricos hormonais de prolactina, FSH ou LH. E Beck *et al.* (2003), ao tentarem identificar ligação dos constituintes do extrato da *C. racemosa* a receptores estereoidais, sejam α - ou β -estrogênicos, androgênicos ou progestagênicos, constataram não haver interação desses constituintes com os receptores, sugerindo que as propriedades estrogênicas reportadas em experimentos que mostravam efeitos positivos no tratamento dos sintomas climatéricos se dariam após a ativação dos seus metabólitos.

Um outro mecanismo de ação da *Cimicifuga racemosa* para alívio dos sintomas menopausais foi proposto por Burdette *et al.* (2003). Primeiramente, esses autores descartaram efeitos estrogênicos da *C. racemosa* ao administrarem, em ratas ooforectomizadas, extrato alcoólico do fitoterápico em diferentes doses (4, 40 e 400mg/kg/

dia). Após compararem os resultados encontrados ao controle positivo (estradiol 50mcg/Kg/dia) e ao veículo, não identificaram manutenção do peso corporal, aumento do peso uterino ou maturação celular vaginal. Também descartaram propriedades antiestrogênicas ao não identificarem efeitos antagonistas da coadministração de estradiol e extrato de *C. racemosa* (estradiol 50mcg/Kg/dia + 4, 40 ou 400mg/kg/dia). Considerando achados prévios de que constituintes do extrato de *Cimicifuga foetida* ligavam-se aos receptores 5-HT_{1A} e inibiam, em camundongos, diarreia induzida por serotonina, os autores propuseram ser essa a via de ação que justificasse o alívio dos sintomas.

Prosseguiram, portanto, investigando se o extrato alcoólico da *C. racemosa* a 40% possuía algum constituinte que fosse potencialmente ligante a algum receptor serotoninérgico. Demonstrou-se que o extrato da *C. racemosa* apresentava forte afinidade para os receptores serotoninérgicos 5-HT_{1D}, além dos hipotalâmicos 5-HT_{1A}, 5-HT₇, e afinidade média para os receptores 5-HT_{1B}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}, 5-HT_{5A} e 5-HT₆. Evidenciaram também elevação nos níveis de AMP cíclico (AMPC) nos receptores 5-HT₇ de células renais de embrião humano, sugerindo que o extrato agiria como agonista parcial nesse receptor (BURDETTE *et al.*, 2003).

Inicialmente atribuída aos ácidos cimicifúgicos, a atividade serotoninérgica foi ligada à presença do alcaloide básico cimipronidina, N(ω)metilserotonina (POWELL *et al.*, 2008). Da mesma forma, os triterpenoides e os ácidos fenólicos não apresentaram tal atividade, diferentemente da N(ω)metilserotonina, que foi capaz de se ligar aos receptores 5-HT₇ e bloquear a recaptação da serotonina (GÖDECKE *et al.*, 2009). Esses achados sugeriram que a N(ω)metilserotonina seria a responsável pela atividade serotoninérgica da *C. racemosa* e que o alívio dos sintomas vasomotores se daria mais por uma ação central que estrogênica.

É fato que existem ainda diversos relatos conflitantes na literatura tanto sobre a eficácia quanto ao real mecanismo de ação da *C. racemosa* e, apesar de literatura consagrada taxar que Black cohosh is not estrogenic, and black cohosh has no effect on menopausal symptoms (FRITZ; SPEROFF, 2011), estudos diversos (STOLL, 1987; WUTTKE; SEIDLOVAWUTTKE; GORKOW, 2003; HERNANDEZ-MUNOZ; PLUCHINO, 2003; SARRI *et al.*, 2017) demonstram alívio significativo dos sintomas vasomotores quando comparados a placebo, ainda que inferiores ao uso de terapia estrogênica.

2.4 Função endotelial

O endotélio constitui o revestimento celular interno dos vasos sanguíneos (artérias, veias e capilares) e do sistema linfático. Foi considerado no passado como sendo unicamente um invólucro da árvore vascular, sem outras funções específicas que não a permeabilidade seletiva à água e aos eletrólitos (WILSON; LERMAN, 2001). Sabe-se atualmente, porém, que as células endoteliais detectam alterações no fluxo e na pressão sanguínea, além de agentes inflamatórios e hormonais na corrente sanguínea (FÉLÉTOU, 2011). Essas células liberam uma variedade de substâncias vasoativas, anti-inflamatórias e tromborreguladoras, que atuam em maior ou menor grau na prevenção da aterosclerose. Assim, o endotélio desempenha papel central na regulação do tônus vascular, fluxo sanguíneo, hemostasia e coagulação e fibrinólise local (DAHLÉN *et al.*, 1981; MOLINARI *et al.*, 1992; SEARLE; SAHAD, 1992; GILLIGAN *et al.*, 1994).

A importância do endotélio como um modulador do tônus vascular foi primeiramente reconhecida por Furchgott e Zawadzki (1980). Esses autores, ao observarem que anéis aórticos de coelho com o endotélio intacto relaxavam secundariamente a uma resposta a substâncias vasoconstritoras, postularam a existência de um “fator relaxante endotelial”. Demonstraram que o endotélio controlava o relaxamento da parede vascular através da mediação de substâncias vasodilatadoras endotélio-dependentes, como o óxido nítrico (NO). Além do NO, altos níveis de prostaciclina (PGI₂) e baixos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) contribuem para a capacidade reativa vasodilatadora de um epitélio saudável. Já o comportamento anticoagulante endotelial é mediado principalmente pela expressão de baixos níveis de inibidor do ativador de plasminogênio 1 e fator de von Willebrand (RAJENDRAN *et al.*, 2013).

O NO é o mais importante dos fatores de relaxamento derivados do endotélio (HALL, 2011), ocorrendo na vasculatura em diversos tipos celulares e tissulares, incluindo plaquetas, macrófagos e o próprio endotélio vascular (GIUSTARINI *et al.*, 2003). Não se restringe somente em ser um potente vasodilatador, como também atua em diversos mecanismos nos sistemas gastrointestinais, respiratórios e no sistema imune (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991; PACHER; BECKMAN; LIAUDET, 2007). Ao fluir pelas artérias e arteríolas, o sangue, viscoso, provoca estresse de cisalhamento nas células endoteliais. Esse estresse contra as

paredes vasculares distorce as células endoteliais, provocando liberação de NO que, então, relaxa os vasos sanguíneos (HALL, 2011).

O NO é sintetizado a partir da conversão da arginina e do oxigênio em L-citrulina, mediada pela redução de nitratos inorgânicos e por enzimas das células endoteliais conhecidas como óxido nítrico-sintetases (NOS). Possui uma molécula estruturalmente simples, com meia-vida muito curta, formando peroxinitrito (ONOO-) ou sendo inativado em metemoglobina e nitrato (GRYGLEWSKI; PALMER; MONCADA, 1986; RUBANYI; VANHOUTTE, 1986; RUBANYI; VANHOUTTE, 1986). Após sua síntese, o NO rapidamente invade o espaço subendotelial exercendo efeitos parácrinos por ativação da guanilil-ciclase solúvel (HOFMANN *et al.*, 2006; RAPOPORT; MURAD, 1983) e, assim, aumenta a síntese da 3',5'-monofosfato de guanosina cíclica (GMPc) e ativa a proteinoquinase dependente de GMP (WILSON; LERMAN, 2001). O GMPc, por sua vez, fosforila a cadeia leve de miosina fosfatase ocasionando desfosforilação da miosina e conseqüente relaxamento das fibras musculares lisas (SURKS, 2007). O NO ainda contribui para a redução da sensibilidade ao cálcio intracitoplasmático além de promover maior captação iônica pelo retículo sarcoplasmático (Ca²⁺ ATPase) (COHEN *et al.*, 1999) (Figura 2).

A reação de conversão de L-arginina em L-citrulina é catalisada pelas NOS. Diferentes observações levaram à conclusão de que tipos distintos de produção de NO estavam associados, de acordo com seu sítio predominante, a subtipos diferentes de NOS. Assim, as isoformas das NOS são divididas em óxido nítrico-sintetase I (ou neuronal, nNOS) (BREDT; SNYDER, 1990; BREDT *et al.*, 1991), NO-sintetase II (ou indutível, iNOS) (LYONS; ORLOFF; CUNNINGHAM, 1992) e NO-sintetase III (ou endotelial, eNOS) (POLLOCK *et al.*, 1991). nNOS e eNOS são categorizadas como sendo enzimas constitutivas (grupo cNOS), ou seja, a concentração intracelular é basicamente constante com ação dependente de elevadas concentrações de íons cálcio. As iNOS, por sua vez, se manifestam após exposição a citocinas, sendo, portanto, cálcio-independente (BATH; KRISHNAN; APPLETON, 2017).

Níveis baixos de NO liberados continuamente pelas células endoteliais são fundamentais para a manutenção do tônus vascular basal. A síntese de NO endotelial também é secundária a estímulos bioquímicos, incluindo estrogênio, trombina, difosfato de adenosina (ADP), acetilcolina (ACh), bradicinina e serotonina (WILSON; LERMAN, 2001).

O estrogênio parece regular positivamente a liberação de substâncias vasoativas em vasos periféricos. Liu *et al.* (2001) evidenciaram, em ratas Wistar, que a deficiência estrogênica, seja a curto prazo – durante o ciclo estral – ou a longo prazo – após ooforectomia –, alterava a resposta vasodilatadora endotélio-dependente de artérias mesentéricas. Para tal, anéis de artérias mesentéricas de três grupos experimentais (ratas Wistar [i] ooforectomizadas, [ii] submetidas a cirurgia placebo (“sham”) e [iii] ooforectomizadas após tratamento com 17βestradiol) foram banhados em meio contendo fenilefrina e, posteriormente, tiveram o efeito vasodilatador da ACh mensurado. A resposta relaxante da artéria à ACh foi determinada inicialmente sem qualquer tratamento, seguido de resposta relaxante à ACh testada na presença de NG -nitro-L-arginina (L-NOARG) e indometacina – com intuito de excluir o envolvimento de prostanoídes e de NO derivado do endotélio.

Assim, concluíram que, na circulação mesentérica, substâncias vasoativas seriam mais importantes em mulheres que em homens e que, em um estado de hipoestrogenismo, a liberação basal de NO havia sido prejudicada e a resposta relaxante dependente de endotélio à ACh suprimida. Já o tratamento, por uma semana, de anéis aórticos de ratos machos Sprague-Dawley com 17β-estradiol ou com o fitoestrogênio daidzeína promoveu relaxamento endotélio-dependente em resposta à ACh. Enquanto as respostas à ACh eram normalmente mediadas completamente pelo NO, a daidzeína e o 17βestradiol induziram um componente do relaxamento endotélio-dependente que era resistente à inibição da NOS (WOODMAN; BOUJAOUDE, 2004).

Long *et al.* (2010), objetivando avaliar se o treinamento físico provocaria efeitos benéficos diretos sobre parede vascular de artérias coronárias, avaliaram 19 porcos Yucatan machos, divididos em três grupos: animais submetidos a (i) dieta controle; (ii) dieta hipercolesterolêmica, e (iii) dieta hipercolesterolêmica e exercícios aeróbicos por três semanas. Os exercícios iniciaram-se após 36 semanas do início da dieta dos animais. Os resultados encontrados pelos autores evidenciaram que o treinamento físico de curta duração potencializaria a função microvascular coronariana endotélio-dependente por meio da ação da bradicinina, importante mediador na produção de NO. Respostas microvasculares das coronárias endotélio-independentes, via adenosina, também foram preservadas nos animais aerobicamente treinados, diminuindo significativamente a carga total de ateroma macrovascular no desenho experimental hiperlipidêmico apresentado.

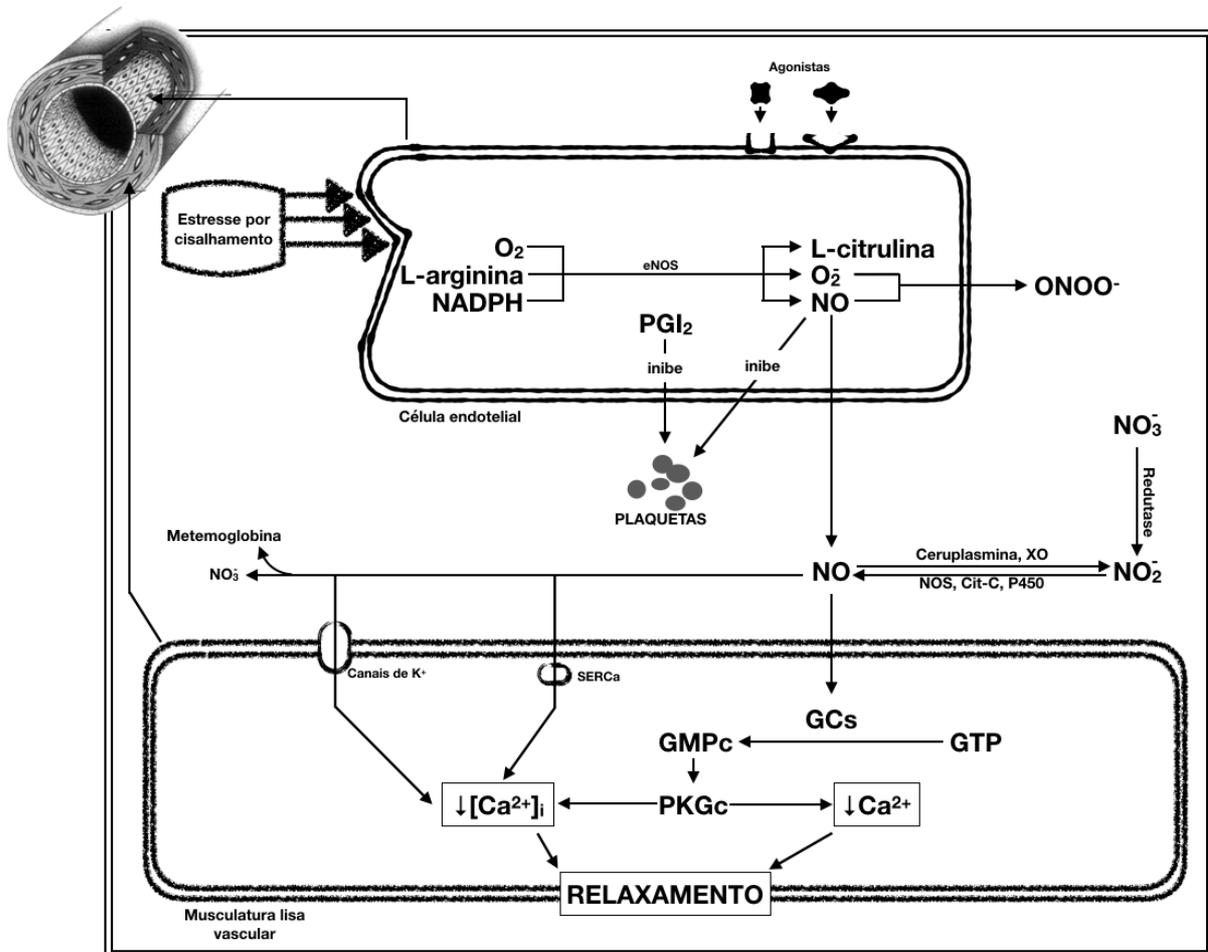


FIGURA 2. Biossíntese do óxido nítrico (NO) e seus alvos na musculatura lisa vascular. NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato; eNOS: L-arginina–endotelial óxido nítrico sintetase; PGI₂: prostaciclina; O₂⁻: ânion superóxido; ONOO⁻: peroxinitrito; NO₃⁻: íon nitrato; NO₂⁻: íon nitrito; XO: xantina oxidase; Cit-C: citocromo C; NOS: óxido nítrico sintetase; P450: citocromo P450 monooxigenase; [Ca²⁺]_i: concentração de cálcio intracelular; Ca₂⁺: cálcio sensível à proteínas contráteis; GTP: guanosina trifosfato; GCs: guanilil ciclase solúvel; GMPc: monofosfato de guanosina cíclica; PKGc: proteinocinase dependente de GMPc. Adaptado de Bryan, R. M. *et al.*, 2005 e Félétou, 2011.

Por fim, a serotonina (5-HT) é capaz tanto de causar efeitos constritores em artérias humanas, quando se liga aos receptores 5-HT 2A e 5-HT 1B (NILSSON *et al.*, 1999); quanto de promover vasodilatação arterial, através de mecanismos de liberação de NO endotélio-dependente; quando envolve outros receptores serotoninérgicos (AUCH-SCHWELK *et al.*, 2000). Em estudo recente, Seitz *et al.* (2017) evidenciaram efeito dilatador da veia cava abdominal e de vasos esplâncnicos, *in vitro* e *in vivo*, após infusão de agonistas serotoninérgicos em ratos Sprague-Dawley. Foi constatado que esse efeito ocorria após ligação do agonista aos receptores 5-HT₇. Os autores demonstraram ainda que a venodilatação foi acompanhada por uma queda expressiva da pressão arterial. Esses efeitos – venodilatação

e hipotensão induzidas por agonistas 5-HT – foram confirmados ao se verificar seus bloqueios devido ao uso de antagonistas do receptor 5-HT₇.

Para investigarem a ação vasodilatadora da 5-HT, Villalón *et al.* (1997) desenvolveram um estudo para analisar o fluxo sanguíneo da artéria carótida direita. Nesse trabalho, 36 cães, de raças e sexos diversos, foram anestesiados e vasosimpatectomizados. Os cães haviam sido tratados previamente com GR-127935, conhecido antagonista seletivo de ação vasoconstritora dos receptores serotoninérgicos (1B e 1D). Esse pré-tratamento garantiria que fossem excluídas possíveis estimulações pré e pós-juncionais de caráter inibitório dos receptores 5-HT_{1B} e 5HT_{1D}, o que levaria a uma vasodilatação reflexa da carótida externa. Após esses procedimentos, os cães foram novamente tratados com diversas drogas, entre elas a 5-HT. Os resultados demonstraram efeito vasodilatador da 5-HT, por ligação aos receptores 5-HT₇ presentes na musculatura lisa ou no endotélio vascular.

Stamler *et al.* (1994) demonstraram que a liberação basal de NO pelas células endoteliais está diretamente envolvida na determinação da resistência vascular sistêmica e, portanto, sua deficiência levaria à hipertensão ou acidente vascular encefálico, em parte, através de seus efeitos sobre o tônus vascular e sobre o potencial trombótico (LOSCALZO, 2001). Estágios iniciais da aterosclerose caracterizam-se por um vasorelaxamento anormal endotéliodependente, associados a um aumento da adesão endotelial e a uma migração transendotelial subsequente de monócitos circulatórios. O NO liberado pelo endotélio promove então relaxamento vascular, além de possuir função anti-inflamatória, inibindo a vasculite, a adesão de monócitos e a agregação plaquetária – ações que, no conjunto, evitam a progressão da placa arteriosclerótica (VANE; ANGGÄRD; BOTTING, 1990).

2.4.1 Avaliação da função endotelial

A capacidade de resposta vasodilatadora endotelial pode ser medida para se estratificar o risco cardiovascular e determinar prognóstico em diversos quadros clínicos específicos. Ainda não se estabeleceu um método ideal de avaliação da função endotelial. O melhor método, no entanto, deve ser seguro, não invasivo, reprodutível, de baixo custo e de fácil padronização (DUBEY *et al.*, 2005). Métodos invasivos que envolvam a administração intra-arterial de substâncias, como a ACh ou adenosina, para promover aumento de liberação de NO (LUDMER *et al.*, 1986; COX *et al.*, 1989) foram substituídos por testes menos invasivos

ou por testes biofísicos, como a dopplerfluxometria e a dilatação mediada por fluxo de artérias (CELERMAJER *et al.*, 1992; JOANNIDES *et al.*, 1995). Assim, testes variados são necessários para se definir risco e prognóstico das doenças cardiovasculares (DEANFIELD; HALCOX; RABELINK, 2007; STORCH *et al.*, 2017). Resumem-se abaixo alguns desses:

Cultura de células endoteliais: cara e de difícil padronização, a cultura permite avaliar *in vitro* estresse oxidativo e processos inflamatórios sobre os mecanismos de mobilização e proliferação endotelial (LE BROCCQ *et al.*, 2008).

Marcadores inflamatórios da função endotelial: dosagem de marcadores bioquímicos inflamatórios (proteína C-reativa, interleucina-6, TNF α – fator α de necrose tumoral, interleucina-18, ligante de CD40, fibrinogênio e MCP-1 – proteína quimiotática de monócitos) (STRAFACE *et al.*, 2010). São marcadores inflamatórios de fase aguda e de prognóstico do risco cardiovascular (VIRDIS *et al.*, 2007), porém de baixa especificidade, pois não se associam a entidade patológica específica (ROSS, 1999; LIBBY; RIDKER; MASERI, 2002).

Marcadores celulares da função endotelial: ainda não aplicáveis na prática clínica (DEANFIELD; HALCOX; RABELINK, 2007), compreende detectar células ou micropartículas endoteliais circulantes liberadas pela membrana celular após perda de integridade do endotélio vascular circulantes no sangue periférico (SZMITKO *et al.*, 2003; GOON; BOOS; LIP, 2005).

Marcadores moleculares e/ou genéticos da função endotelial: os diversos métodos propostos que avaliam marcadores moleculares e/ou genéticos possuem erros metodológicos que tentam conferir associações positivas entre eles e a disfunção endotelial (DEANFIELD *et al.*, 2005). Há necessidade de melhorias contínuas na análise de genotipagem para que possam fornecer resultados bem-sucedidos (DEANFIELD *et al.*, 2005).

Dosagem sérica de dimetilarginina assimétrica (ADMA): elevação dos níveis de ADMA, análogo da L-arginina e antagonista da eNOS, tem se mostrado forte preditor de risco para

eventos cardiovasculares e mortalidade por doença arterial coronariana (KORANDJI *et al.*, 2007; GRUBER *et al.*, 2008; LANDIM; CASELLA FILHO; CHAGAS, 2009; SIBAL *et al.*, 2010).

Constricção mediada por baixo fluxo (L-FMC): método relativamente recente que tem por objetivo fornecer informação sobre a reatividade do endotélio em repouso (GORI *et al.*, 2010; GORI *et al.*, 2012; GORI *et al.*, 2016).

Tonometria arterial periférica hiperemia-reativa: avalia a microcirculação periférica através da plestimografia das pontas dos dedos. (HAMBURG; BENJAMIN, 2009), correspondendo à comparação da amplitude de pulso de repouso com a amplitude observada durante a hiperemia reacional que segue o período de isquemia. Seu uso traz uma evidência a condição vascular e a eficácia do tratamento proposto. É uma avaliação automática, não-invasiva. Tem a vantagem de detectar lesões na microcirculação (LEE *et al.*, 2012).

Laser-Doppler imaging: permite uma mensuração não-invasiva da microcirculação cutânea, sem requerer contato direto com a superfície avaliada. Possui valor limitado já que a reprodutibilidade da técnica não é totalmente satisfatória (TURNER; BELCH; KHAN, 2008).

2.4.1.1 Dilatação fluxomediada da artéria braquial (FMD)

De todos os métodos desenvolvidos para avaliar a função endotelial *in vivo*, o mais comumente empregado é a dilatação fluxomediada arterial (FMD). Descrita em humanos pela primeira vez por Anderson e Mark (1989), a FMD é definida como uma resposta vasodilatadora induzida após súbito estresse de cisalhamento. Quantifica a capacidade do endotélio de promover o relaxamento da musculatura lisa de forma responsiva a um estressor específico (RAITAKARI; CELERMAJER, 2000). A medida FMD se baseia no fato de o endotélio responder a uma isquemia transitória, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, a um estímulo à atividade da eNOS, que, por sua vez, promove aumento de substâncias vasodilatadores, como o NO (Figura 2). Entende-se que um comprometimento vascular prejudicaria o aumento do lúmen do vaso (BRANDÃO *et al.*, 2010).

O diâmetro da artéria-alvo é mensurado por ultrassonografia de alta resolução, após resposta a um aumento no fluxo sanguíneo vascular devido a uma isquemia induzida por insuflação e desinsuflação do manguito – ato que leva a uma dilatação endotélio-dependente. A imagem é congelada e o diâmetro da artéria é medido. O resultado pós-isquemia é comparado ao diâmetro basal pré-isquemia, tendo o grau de vasodilatação calculado. O tempo necessário para obter uma resposta responsiva ao estresse varia entre um a 10 minutos, a depender do protocolo utilizado (CORRETTI; PLOTNICK; VOGEL, 1995). Bots *et al.* (2005) salientam ainda que os valores de FMD são menores quando a compressão é feita no antebraço em relação àquela feita no braço e que não há diferença no resultado final se a pressão for superior a 250mmHg.

Apesar de ser um exame operador-dependente, baseado na necessidade de se ter um aparelho de ultrassonografia e de haver a necessidade do controle adequado das variáveis ambientais, esse método é seguro, não-invasivo, reprodutível e de fácil padronização, podendo ser utilizado em adultos e crianças (HOPKINS *et al.*, 2015). Pode-se, inclusive, ser utilizado em pesquisas clínicas e pré-clínicas, tanto em crianças quanto em adultos, permitindo grande avanço no conhecimento a respeito da evolução das doenças crônicas que cursam com lesão endotelial (CORRETTI *et al.*, 2002).

OBJETIVO

Avaliar, através da técnica de dilatação fluxomediada da artéria braquial direita, os possíveis efeitos da terapia com *Cimicifuga racemosa* sobre a função endotelial em mulheres climatéricas, quando utilizada por curto período de tempo.

METODOLOGIA

4.1 Ensaio clínico

Trata-se de um ensaio clínico randomizado, duplo-cego, placebo controlado, para avaliação da interferência da *Cimicifuga racemosa* sobre a função endotelial de mulheres após instalação da menopausa, a partir da medida da dilatação fluxomediada da artéria (FMD) braquial direita antes e após o uso do extrato seco do fitoterápico.

O extrato seco da *Cimicifuga racemosa* foi gentilmente cedido pelos laboratórios Herbarium (LOTE 160314; fabricação em março de 2016 e validade até março de 2018) e esse estudo foi aprovado previamente pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP-UFMG) sob o número ETIC – 0417.0.203.000-09 (ANEXO A), sendo registrado no banco de dados do National Institutes of Health (NIH) para ensaios clínicos Clinicaltrials.gov, sob o número NCT03786809.

4.2 Grupo estudado

A população estudada foi proveniente do Ambulatório de Climatério do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG). No período de junho de 2016 a agosto de 2017, foram atendidas por demanda espontânea 168 mulheres no ambulatório de Climatério do serviço de Ginecologia e Obstetrícia do HC-UFMG, sendo que 96 pacientes atendiam aos critérios de inclusão do estudo. Dessas, nove não consentiram em participar do estudo, sendo ao final um total de 87 participantes no estudo.

As mulheres incluídas assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE; APÊNDICE A), aprovado pelo COEP/UFMG, após terem recebido individualmente informação sobre o conteúdo, a relevância científica e os riscos inerentes aos procedimentos propostos, bem como a garantia de não interferência nos cuidados médicos oferecidos pelo serviço de Climatério do HC-UFMG, caso se recusassem a participar do estudo.

4.3 Critérios de inclusão

- Pacientes apresentando amenorreia ≥ 12 meses após idade ≥ 40 anos.
- Pacientes relatando sintomas vasomotores, associados ou não a outros sinais e sintomas: insônia, diminuição da libido, ganho de peso, astenia, etc.
- Pacientes com dosagem sérica de FSH > 30 mUI/mL e estradiol < 40 pg/mL.
- Pacientes sem uso de medicamento com potencial efeito vascular nos últimos 12 meses.
- Pacientes sem uso prévio ou atual de terapia de reposição hormonal.
- Autorização e conscientização prévia da paciente sobre o presente estudo.

4.4 Critérios de exclusão

- Paciente tabagista.
- Paciente obesa (IMC ≥ 30 Kg/m²).
- Paciente com pressão arterial (PA) $\geq 160/90$ mmHg.
- Paciente com diagnóstico ou histórico de carcinoma de mama ou endométrio.
- Paciente com diagnóstico de doença reumática.
- Paciente com história de infarto agudo do miocárdio ou outra cardiomiopatia.
- Paciente com diabetes *mellitus*.
- Paciente com lesão hepática e/ou comprometimento da função hepática.
- Paciente com tromboflebite ativa e/ou história de fenômenos tromboembólicos.

4.5 Avaliação e tratamento

Durante o primeiro atendimento, foi realizado, de forma sistemática, pelo mesmo examinador, uma avaliação clínica e ginecológica inicial, composta de anamnese e exame físico, aferição de pressão arterial (PA), frequência cardíaca, peso e estatura. Os dados individuais de cada paciente foram registrados em documento próprio (APÊNDICE B). O aparelho de aferição da PA, calibrado previamente, foi o mesmo durante todo o experimento e

reservado tão somente para tal função. Da mesma forma, a balança usada para medida do peso e altura também foi calibrada previamente, tendo sido mantida fixa no mesmo local durante todo o período do experimento.

Por ocasião dessa primeira avaliação, eram solicitados exames complementares, de acordo com o protocolo de rotinas do serviço para pacientes na transição menopausal, o que incluía:

- Dosagens laboratoriais de FSH, estradiol, ureia, creatinina, tirocina tetraiodotironina livre (T4L), hormônio estimulador da tireoide (TSH), colesterol total e fracionado, triglicérides, glicemia de jejum, hemograma completo, aspartato aminotransferase (TGO / AST), alanina aminotransferase (TGP / ALT), gamaglutamil transferase (G-GT), fosfatase alcalina, urinálise.
- Citologia oncótica.
- Mamografia digital bilateral.
- Ultrassonografia endovaginal.

Após a avaliação inicial e análise dos exames complementares, procedeu-se à identificação das potenciais participantes. As pacientes recrutadas foram separadas aleatoriamente em dois grupos a serem estudados comparativamente: um grupo em terapia com extrato seco de *Cimicifuga racemosa* e um grupo com placebo. Tal randomização foi realizada de acordo com uma sequência aleatória gerada por computador. Essa sequência foi colocada em envelopes selados organizados pelo número de sequência com o medicamento testado (*C. racemosa*) ou com o placebo. Nem o paciente nem o examinador sabiam quem estava no grupo estudado ou no grupo placebo.

Após alocação em grupos e realização do primeiro exame da medida FMD, as participantes foram orientadas a ingerir, diariamente e por 28 dias consecutivos, sempre no mesmo horário, um comprimido. Após os 28 dias de tratamento, a paciente retornou para um segundo exame de medida da FMD. Um dos grupos recebeu, por via oral, 160mg/dia do extrato seco de *Cimicifuga racemosa*, padronizado em 2,5% de triterpenos glicosídeos (Clifemin®; Herbarium, Brasil – lote 160314). Essa dosagem equivale a 4mg de glicosídeos triterpênicos expressos em 23-epi-26-desoxiaeteína. O outro grupo recebeu, pela mesma via de tratamento, comprimidos de celulose liofilizada 0,3mg.

A dose utilizada no estudo (160mg/dia) é a preconizada por agências regulatórias de saúde – agências sanitárias brasileira (ANVISA) e europeia (EMA – European Medicine Agency). Essas agências estabelecem que a dose diária da *C. racemosa* deva conter de 2 a 7mg de glicosídeos triterpênicos expressos em 23-epi-26-desoxiacteína. A dose utilizada no estudo, conforme consta em bula, é intermediária à sugerida pela ANVISA (4mg de 23-epi-26desoxiacteína).

Os comprimidos eram entregues às pacientes em recipiente opaco também padronizado. Todas as avaliações da medida FMD foram realizadas, antes e ao final do início do uso da medicação, por um segundo profissional médico, cujo contato com a paciente se restringia à realização do exame ultrassonográfico.

Por fim, durante o estudo, as participantes foram instruídas a relatar quaisquer sinais e sintomas que pudessem ter – mesmo que acreditassem não estarem relacionados à medicação.

4.6 Técnica aplicada da dilatação fluxomediada da artéria braquial

As medidas da FMD foram realizadas sempre pelo mesmo operador, usando um transdutor linear de 4-8 MHz do mesmo aparelho de ultrassom (Sonoace 9900, L5-12 IM; Medison, Coréia). O exame foi realizado antes e ao final do uso do medicamento, sendo esses os únicos contatos entre o avaliador e as participantes. Para evitar variações entre dispositivos e quaisquer possíveis alterações causadas pelo ciclo circadiano, os testes foram realizados com as participantes em jejum, sempre na mesma hora do dia (entre 8 e 10 horas) (HARRIS *et al.*, 2010). Todas as mulheres repousaram por 15 minutos em decúbito dorsal antes do exame, que foi realizado em sala à meia-luz, sob controle constante de temperatura (20° C).

Para realização do exame, inicialmente procedeu-se aferição da pressão arterial e identificação da artéria braquial direita medialmente na fossa antecubital do membro superior direito. Obteve-se a melhor imagem ultrassonográfica do vaso, a aproximadamente 5cm do cotovelo do membro superior, com corte longitudinal (modo B), ao final da diástole cardíaca momento em que o vaso apresenta menor distensão (Figura 3). A imagem foi obtida por recuperação do sistema Cine Loop do equipamento e congelada para obter a média das medidas do calibre do vaso (D1) – os medidores (cáliper) foram posicionados na face interna da parede do vaso, em três pontos distintos com 1,0 centímetro de distância entre eles. O valor

final considerado para a medida foi a média das três medidas realizadas. Após a medida inicial, realizou-se a insuflação de manguito do esfigmomanômetro sobre o antebraço até 250mmHg de pressão por cinco minutos, seguida de esvaziamento do manguito vagorosamente. Aguardou-se então intervalo de um minuto para realização da segunda medida em três pontos da artéria braquial direita (D2), utilizando-se a mesma técnica descrita anteriormente.

O valor da FMD foi obtido com base no cálculo da seguinte fórmula:

$$\text{FMD (\%)} = [(D2 - D1) / D1] \times 100,$$

sendo D1 = diâmetro basal e D2 = diâmetro pós-occlusão.

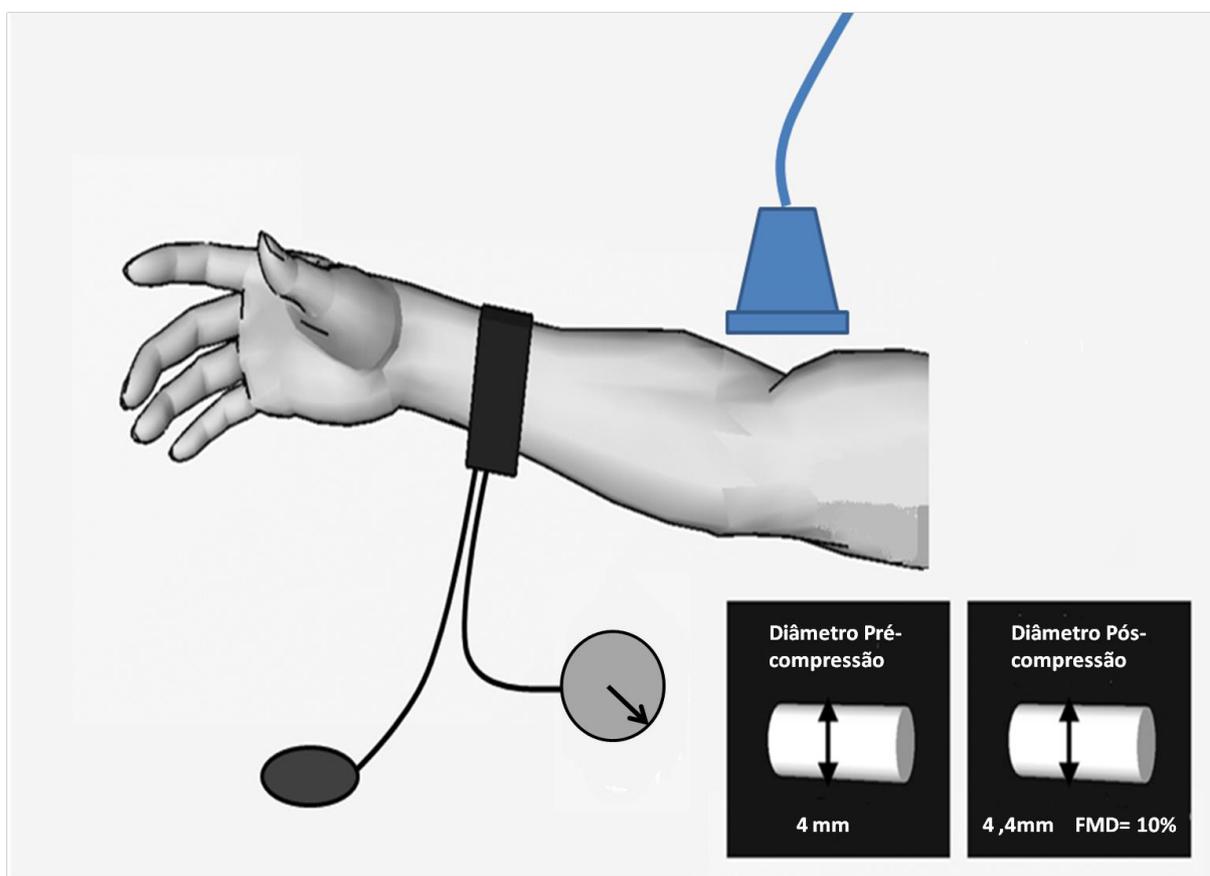


FIGURA 3. Diagrama de medida da FMD (Fonte: BRANDÃO, 2012)

4.7 Análise estatística

Para o cálculo do tamanho da amostra, foi utilizado o programa STACALC; Epi Info CDC Atlanta, versão 3.5.3 (26 de janeiro de 2011). Considerou-se como variável dependente

principal a medida do diâmetro da artéria braquial direita, tendo como base o valor médio obtido no estudo de McCrohon *et al.* (1996). Estimando erro-alfa de 5% e poder do teste de 0,80, inferiu-se que seriam necessárias 30 pacientes em cada grupo.

Variáveis descritivas foram apresentadas a partir das medidas mínimo, máximo, média (intervalo de 95% de confiança), desvio-padrão (d.p.), mediana e quartis (Q1 : 1 o quartil e Q3 : 3 o quartil), além de percentuais como medidas para descrever os resultados para as variáveis estudadas.

Para comparação dos grupos Placebo versus Tratado, foi utilizado o teste paramétrico t de *Student* para amostras independentes, ou seja, se existe ou não diferença significativa entre os dois grupos quanto às médias de uma determinada variável quantitativa de interesse. O teste de Levene foi utilizado com o objetivo de averiguar a homogeneidade das variâncias de cada variável estudada, por grupo. Decidiu-se por assumir a heterogeneidade das variâncias, com isso, optou-se por utilizar os valores do teste t de *Student* assumindo a não igualdade de variâncias, o que contribuiu com resultados mais robustos.

O teste de Kolmogorov-Smirnov corrigido pelo teste de Lilliefors verificou distribuição Normal de todas as variáveis numéricas contínuas, com valor da probabilidade de significância (p) maior do que 0,05 (5% - $p \geq 0,05$) para todas as variáveis.

Por fim, para avaliar se a variável FMD pós tratamento do grupo tratado evidenciava ou não melhores resultados quando comparada à variável FMD pós tratamento do grupo placebo, utilizou-se também o Tamanho de Efeito d (de Cohen). O d de Cohen é calculado como sendo a diferença padronizada entre duas medidas médias observadas em duas variáveis de interesse e fornece uma grandeza da relação entre elas. O esquema de avaliação utilizado foi o mesmo arbitrariamente definido por Cohen, na qual $d = 0,20$ significa um efeito pequeno, $d = 0,50$, um efeito intermediário e $d = 0,80$ um efeito grande (COHEN, 1992; CONBOY, 2003).

Os resultados foram considerados significativos para uma probabilidade de significância inferior a 5% ($p < 0,05$), tendo, portanto, pelo menos 95% de confiança nas conclusões apresentadas. A análise estatística foi feita no software *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) for Windows versão 17.0 (Chicago, IL, Estados Unidos da América EUA).

RESULTADOS

De um número total de 168 mulheres que foram inicialmente avaliadas, 96 atenderam aos critérios de inclusão e, dessas, nove não quiseram participar do estudo. Das 87 pacientes que consentiram em participar do estudo, 18 foram excluídas da análise final por não terem tomado a medicação ou por terem tomado de forma equivocada (*C. racemosa*: 6; Placebo: 12 participantes) e sete não retornaram para realização da segunda medida da FMD (*C. racemosa*: 5; Placebo: 2 participantes). As 62 mulheres restantes concluíram o estudo, sendo que o número final de participantes foi de 31 mulheres para o grupo Tratado (*C. racemosa*) e 31, para o grupo Placebo. A Figura 4 sistematiza o fluxograma de seleção das pacientes. Todas as pacientes apresentaram perfis metabólicos dentro do padrão da normalidade antes de iniciarem o uso das medicações, tanto no grupo tratado com extrato de *C. racemosa* quanto naquele com Placebo (dados não apresentados). Nenhuma participante reportou efeitos adversos durante o estudo.

A idade das pacientes variou de 42,0 a 58,0 anos para o grupo Placebo e 43,0 a 59,0 para o grupo tratado com extrato seco de *C. racemosa*. As médias do índice de massa corpórea (IMC) foi $28,6 \pm 4,7$ e $27,0 \pm 3,3 \text{Kg/m}^2$, para os grupos Placebo e tratado com *C. racemosa*, respectivamente. Sobre o intervalo de tempo de menopausa apresentado pelas pacientes, os intervalos de tempo do mínimo ao máximo foram de 1,0 a 25,0 anos para o grupo placebo e 1,0 a 19,0 anos para o grupo tratado com *C. racemosa*. Não se verificou diferença estatisticamente significativa entre as pacientes tratadas com extrato seco de *C. racemosa* e com placebo ($p \geq 0,05$) para nenhuma das características demográficas de interesse pesquisadas. Para avaliação do tempo de menopausa, a comparação foi realizada com um $n = 30$, devido ao não registro de um dado na ficha de coleta de informações. Para demais informações, o $n = 31$ para ambos os grupos (Tabela 1).

Os resultados do teste de normalidade das variáveis (Kolmogorov-Smirnov corrigido pelo teste de Lilliefors), que avaliam a medida da FMD em relação aos grupos tratados com Placebo e com extrato de *C. racemosa* não rejeitou a hipótese de Normalidade, isto é, o valor da probabilidade de significância foi maior ou igual a 0,05 ($p \geq 0,05$) (Tabela 2), razão pela qual utilizaram-se testes paramétricos de comparação de médias.

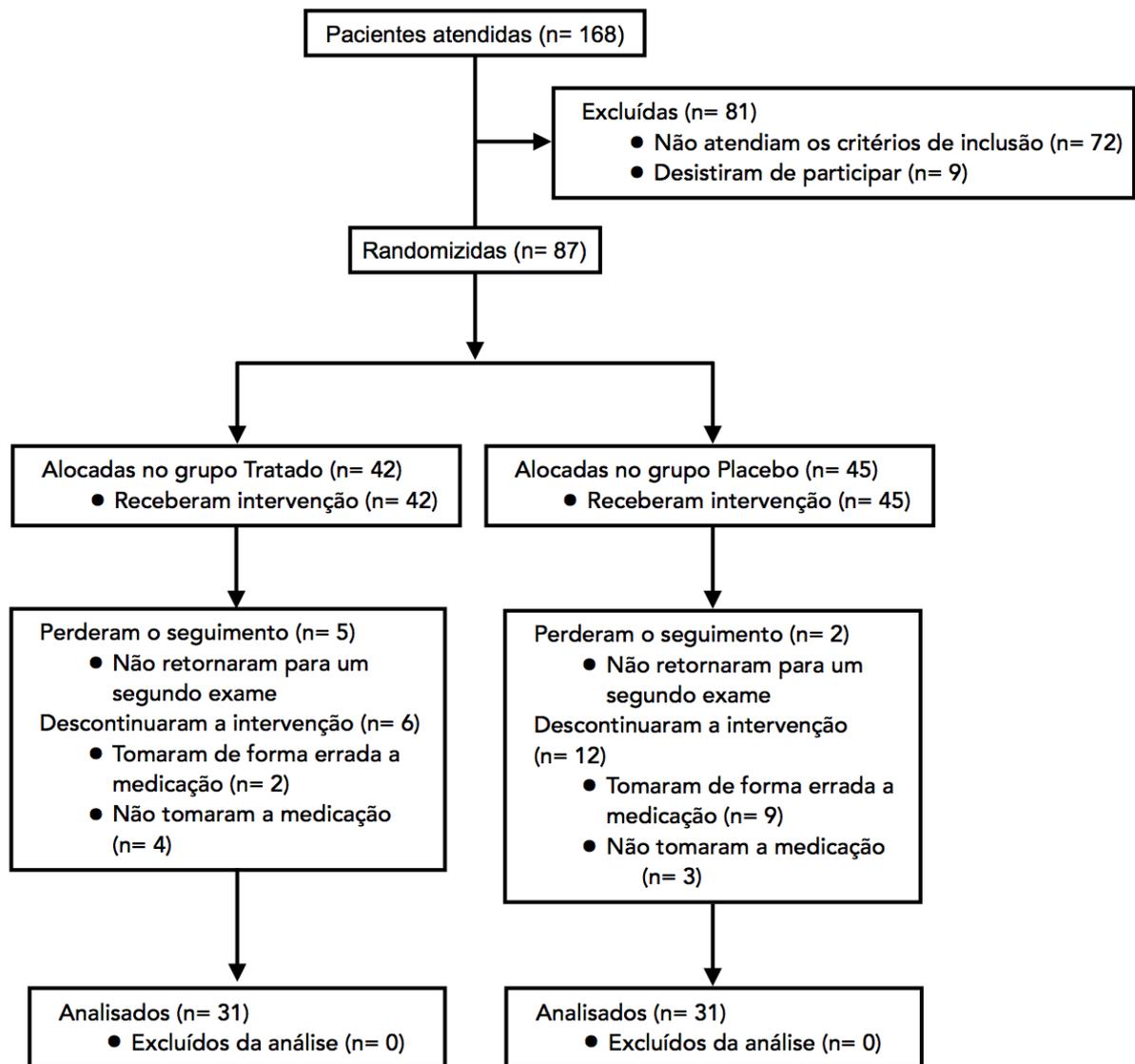


FIGURA 4. Fluxograma demonstrativo do processo de análise das pacientes, do recrutamento até a análise final do estudo.

TABELA 1. Características clínicas das participantes do estudo submetidas à medida da dilatação fluxomediada da artéria direita após 28 dias de tratamento com Placebo e 160mg extrato seco de *Cimicifuga racemosa*.

	Placebo (n = 31)	<i>C. racemosa</i> (n = 31)	p
	51,3 ± 4,4	51,8 ± 4,5	
Idade (anos)	52,0 (49,0; 54,0)	52,0 (48,0; 55,0)	0,629
	42,0 – 59,0	43,0 – 61,0	
	4,7 ± 5,4	4,3 ± 4,5*	
Tempo de menopausa (anos)	2,0 (1,0; 7,0)	2,0 (1,8; 5,0)	0,807
	1,0 – 25,0	1,0 – 19,0	
	28,6 ± 4,7	27,0 ± 3,3	
IMC (Kg/m ²)	27,8 (26,2; 31,6)	27,2 (24,1; 29,0)	0,135
	19,1 – 39,2	20,6 – 34,3	

Dados expressos em média ± desvio-padrão; mediana (Q1; Q3); mínimo e máximo. IMC = índice de massa corporal. *n = 30. p ≥ 0,05

A média da medida FMD pré-tratamento do grupo placebo ($0,031 \pm 0,085$) não foi significativamente diferente da média da medida FMD pré-tratamento do grupo tratado com *C. racemosa* ($-0,006 \pm 0,069$). Da mesma forma, a comparação entre os dados dos dois grupos de pacientes quanto à média da medida da FMD após o tratamento, seja com placebo ($0,028 \pm 0,102$) seja com *C. racemosa* ($0,048 \pm 0,073$), não revelou diferença estatisticamente significativa. Para ambas as comparações, pré e pós-tratamento entre os grupos, não houve diferença significativa ($p \geq 0,05$). Na Tabela 3 também são evidenciados os valores do Tamanho de Efeito d de Cohen da comparação entre as pacientes dos grupos Placebo e tratado com *C. racemosa* para cada variável de interesse. Os dados não evidenciam diferença significativa entre a média da FMD pré-tratamento ($0,031 \pm 0,085$) e a média da FMD pós-tratamento ($0,028 \pm 0,102$) no grupo placebo. Já na comparação entre a média da FMD pré-tratamento ($-0,006 \pm 0,069$) com a média da FMD pós-tratamento do grupo tratado com *C. racemosa* ($0,048 \pm 0,073$), os dados revelaram haver diferença significativa ($p < 0,05$).

TABELA 2. Verificação de teste de Normalidade das variáveis que avaliam a medida da dilatação fluxomediada da artéria direita após 28 dias de tratamento com Placebo e com 160mg extrato seco de *Cimicifuga racemosa*.

Variável	Grupo	Teste de <i>Kolmogorov-Smirnov</i>	
		Estatística	p
Média 1 pré (D1)	Pacebo	0,136	0,148
	<i>C. racemosa</i>	0,111	0,200*
Média 2 pré (D2)	Pacebo	0,129	0,200*
	<i>C. racemosa</i>	0,104	0,200*
Δ_1 (D2 - D1)	Pacebo	0,082	0,200*
	<i>C. racemosa</i>	0,117	0,200*
Média 1 pós (D1p)	Pacebo	0,108	0,200*
	<i>C. racemosa</i>	0,129	0,200*
Média 2 pós (D2p)	Pacebo	0,109	0,200*
	<i>C. racemosa</i>	0,126	0,118
Δ_2 (D2p - D1p)	Pacebo	0,105	0,200*
	<i>C. racemosa</i>	0,106	0,200*
FMD pré-tratamento	Pacebo	0,084	0,200*
	<i>C. racemosa</i>	0,134	0,165
FMD pós-tratamento	Pacebo	0,089	0,200*
	<i>C. racemosa</i>	0,137	0,148

Base de dados: 62 pacientes (Grupo *Cimicifuga racemosa* = 31; grupo Placebo = 31). p = probabilidade de significância do teste Teste de *Kolmogorov-Smirnov* corrigido por *Lilliefors*. * Limite inferior do verdadeiro valor de p.

Resumindo, houve efeito do tratamento quanto à medida da variável FMD somente para as pacientes do grupo tratado com *C. racemosa*, pois nas pacientes do grupo que usou placebo não houve diferença estatisticamente significativa ($p \geq 0,05$) entre as médias obtidas no pré e pós-tratamento (Figura 5).

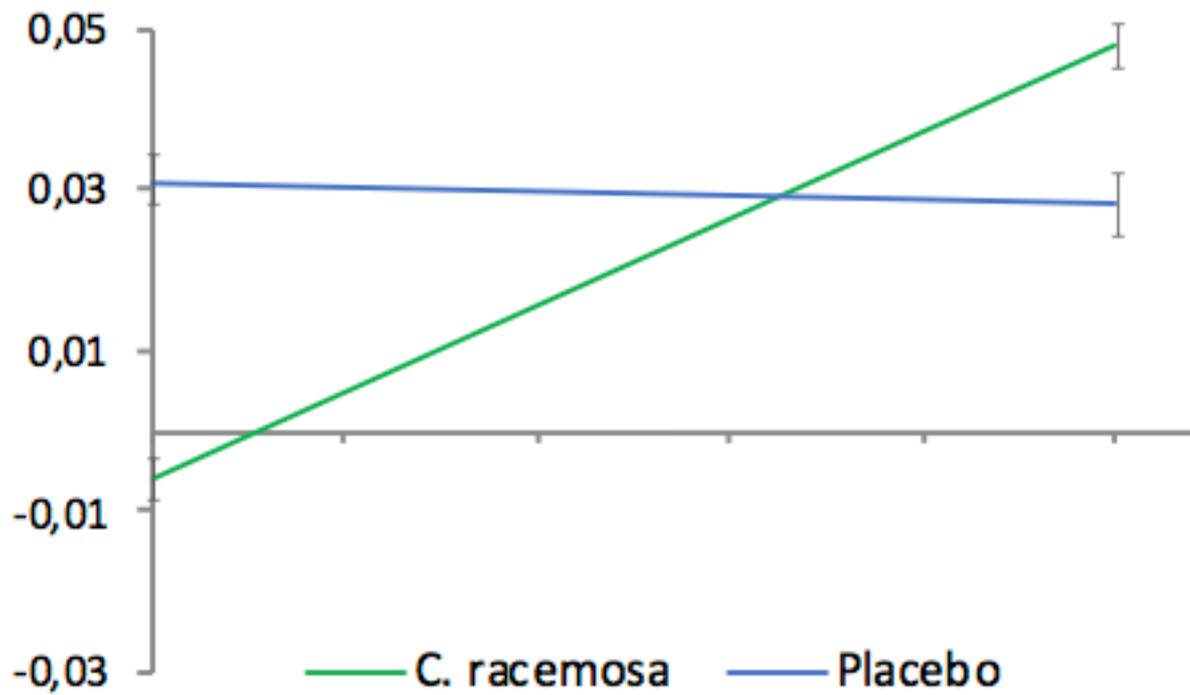
As medidas da FMD pré e pós-tratamento com extrato seco de *Cimicifuga racemosa* e da FMD pré e pós-tratamento com placebo foram analisadas quanto a “presença de aumento”

ou “ausência de aumento”, quando, respectivamente, houve aumento dos valores da medida da FMD pós-tratamento em relação ao pré-tratamento e quando não houve aumento dos valores. Encontrou-se associação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o grupo de pacientes e a variável FMD após o tratamento das pacientes do grupo tratado com *C. racemosa*; houve nessas pacientes uma proporção de crescimento da medida da FMD no pós-tratamento significativamente maior quando comparado às pacientes do grupo tratado com placebo, respectivamente 77,4% versus 48,4% (Tabela 4). Pode-se dizer que, no modelo proposto, após 28 dias de tratamento, uma paciente do grupo tratado com 160mg extrato seco de *Cimicifuga racemosa* (equivalente a 4mg de 23-epi-26-desoxiacteína) tem 3,7 vezes mais chance (O.R. = 3,7) de apresentar crescimento da medida da FMD no pós-tratamento do que uma paciente do grupo tratado com placebo.

TABELA 3. Comparação entre as medidas da dilatação fluxomediada da artéria direita (FMD) antes e após 28 dias de tratamento com Placebo e com 160mg extrato seco de *Cimicifuga racemosa*.

	Placebo (n = 31)	<i>C. racemosa</i> (n = 31)	d	p
FMD pré-tratamento	0,031±0,085 0,023 (-0,025; 0,092)	-0,006 ± 0,069 -0,018 (-0,054; 0,023)	0,48	0,062
FMD pós-tratamento	0,028 ± 0,102 0,015 (-0,042; 0,124)	0,048 ± 0,073 0,052 (0,004; 0,075)	0,22	0,382

Dados expressos em média ± desvio-padrão; mediana (Q1; Q3). p = probabilidade de significância do teste *t* de Student para amostras independentes. d = Tamanho de Efeito baseado no *d* de Cohen (IC: 95%)



	FMD pré-tratamento	FMD pós-tratamento	d	p
Placebo	0,031±0,085	0,028±0,102	0,04	0,842
<i>C. racemosa</i>	-0,006±0,069	0,048±0,073	0,76	0,006*

FIGURA 5. Comparação intragrupo entre as medidas da dilatação fluxomediada da artéria direita (FMD) antes e após 28 dias de tratamento com 160mg extrato seco de *Cimicifuga racemosa* e Placebo. Dados expressos em média \pm desvio-padrão; mediana (Q1; Q3). p = probabilidade de significância do teste t de *Student* para amostras independentes. d = Tamanho de Efeito baseado no d de *Cohen* (IC: 95%). *p < 0,05

TABELA 4. Comparação entre as médias considerando aumento ou não das medidas da dilatação fluxomediada da artéria direita (FMD) após 28 dias de tratamento com Placebo e com 160mg extrato seco de *Cimicifuga racemosa*.

	FMD			O.R.	p
	Presença de aumento	Ausência de aumento	Total		
Placebo	15 (48,4%)	16 (51,6%)	31 (100%)	3,7 (1,2; 11,0)	0,018*
<i>C. racemosa</i>	24 (77,4%)	7 (22,6%)	31 (100%)		
Total	39 (62,9%)	23 (37,1%)	62 (100%)		

p = probabilidade de significância do teste Qui-quadrado (χ^2) de Pearson. O.R. *Odds Ratio* (IC: 95%). *p < 0,05.

DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que o uso do extrato seco da *Cimicifuga racemosa* por mulheres pós-menopausadas promove aumento do potencial elástico da artéria braquial. Entendemos ser este o primeiro estudo duplo-cego, randomizado, controlado por placebo em que se avaliou a integridade endotelial de mulheres pós-menopausadas saudáveis após uso diário, durante 28 dias de tratamento, de 160mg de extrato de seco *Cimicifuga racemosa* (equivalente a 4mg de triterpenos glicosídeos).

Formulações medicinais de alta qualidade de *Cimicifuga racemosa* são usadas para aliviar queixas climatéricas (EUROPEAN MEDICINE AGENCY, 2018), com nível de evidência (nível 1a) satisfatório (BEER *et al.*, 2013; BEER; NEFF, 2013). Além dessa indicação principal, outros efeitos benéficos foram encontrados em ensaios clínicos, como aumento da sobrevida livre de recidivas após câncer de mama (HENNEICKE-VON ZEPELIN *et al.*, 2007), ação na saúde óssea (GARCÍA-PÉREZ *et al.*, 2009; BEBENEK *et al.*, 2010) e na redução de leiomiomas uterinos (XI *et al.*, 2014). Previamente, Hurtado, Celani e Geber (2016) demonstraram, através da medida da dilatação fluxomediada (FMD) da artéria braquial, vasodilatação arterial em mulheres pós-menopausadas saudáveis, após 28 dias de uso de estrogênio equino conjugado. Outro estudo, também se valendo da técnica de medida da FMD da artéria braquial, demonstrou que o uso da tibolona pelo mesmo período de tempo não foi capaz de alterar a resistência vascular (CELANI *et al.*, 2016).

O presente experimento utilizou a mesma metodologia dos dois estudos citados anteriormente. O efeito vascular da *C. racemosa* foi avaliado através de estudo randomizado, duplo-cego e placebo-controlado, em dois grupos de mulheres sem qualquer histórico de doenças e/ou comportamento que afetasse a função endotelial. As mulheres comparadas nos dois grupos – tratadas com extrato seco de *C. racemosa* e tratadas com placebo – apresentavam, ao final da análise, características muito semelhantes com relação à idade, índice de massa corpórea e tempo de menopausa, confirmando a homogeneidade da amostra e evidenciando ausência de vieses metodológicos de recrutamento. O fato de todas as participantes estarem no período pós-menopausa, confirmado via exames ($E2 < 40$ pg/ml e $FSH > 30$ mUI/mL), evitou também viés decorrente de possíveis efeitos endógenos do estrogênio. Apesar de repetir a metodologia de outros dois estudos, tempo de tratamento (28

dias), número limitado de participantes, mesmo considerando N compatível com o cálculo amostral, e uso de uma substância-teste ainda com efeitos farmacológicos a serem mais bem elucidados, trazem a esse estudo certas limitações.

O estrogênio é um importante ativador da síntese do NO, com importante ação vasodilatadora. Portanto, a resposta endotelial poderia variar se os estrogênios estivessem sendo liberados em ciclos fisiológicos (HASHIMOTO *et al.*, 1995; VIANA; MARTINS; GEBER, 2012). Também, como o desenvolvimento da aterosclerose e o aumento do risco cardiovascular são mais evidentes dentro do período inicial de deficiência de estrogênio (BECHLIOULIS *et al.*, 2010; RESLAN; KHALIL, 2012), somente mulheres com tempo de menopausa ou mulheres com início dos sintomas menopausais com menos de 10 anos foram incluídas no estudo. Vale ressaltar que duas mulheres com tempo de menopausa maior de menopausa foram incluídas no estudo (uma em cada grupo avaliado). Ambas foram submetidas a histerectomia antes dos 40 anos, elevando seu período de amenorreia. Porém, o surgimento dos sintomas característicos se deu após os 40 anos e a dosagem dos níveis de FSH confirmou o status menopausal de ambas. A presença de dois observadores independentes em cada etapa do estudo – avaliação clínica e operador ultrassonográfico – e de todos os exames de medida da dilatação fluxomediada da artéria braquial terem sido realizados, no mesmo equipamento, no mesmo horário e observando-se os mesmos critérios de controle ambiental, afastou possíveis vieses metodológicos de variação interobservador e de ciclo circadiano. Por fim, o número de mulheres aleatoriamente alocadas em cada grupo, tratadas com extrato seco de *Cimicifuga racemosa* e tratadas com placebo, respeitou o cálculo para amostra adequada (n mínimo/grupo = 30) para detectar o efeito da terapia de interesse sobre a função endotelial.

Antes de iniciar o uso das medicações (placebo ou extrato de *Cimicifuga racemosa*), as participantes foram avaliadas quanto à possibilidade de alguma disfunção hepática: nenhuma participante apresentou alterações de enzimas hepáticas. Relato de caso publicado em 2014 (ENBOM *et al.*, 2014) sugeriria risco de hepatotoxicidade após o uso de *Cimicifuga racemosa*; outros estudos, porém mostraram que, quando o extrato isopropanólico de cimicifuga era usado em doses de 40-128mg por três ou seis meses, não havia lesão hepática, com controle realizado via dosagem das enzimas hepáticas ALT e AST (NASER *et al.*, 2011; SHOU; LI; LIU, 2011). Além disso, nos casos de hepatotoxicidade relacionados ao uso da *C.*

racemosa, observou-se que as preparações utilizadas na dieta continham não apenas *C. racemosa*, mas também outras espécies de *Cimicifuga*, estas, sim, conhecidas por causarem potencial dano hepático (NIH, 2014). Devido ao curto período de uso da *C. racemosa* neste estudo (apenas 28 dias), tempo esse suficiente para avaliar as alterações vasculares investigadas (HURTADO; CELANI; GEBER, 2016; CELANI *et al.*, 2016), o monitoramento de enzimas hepáticas não foi realizado após término de tratamento.

Últimos estudos acerca do mecanismo de ação da *C. racemosa* têm creditado sua atuação no controle dos sintomas vasomotores a uma ação central sobre receptores dopaminérgicos, opioides e, principalmente, serotoninérgicos (BURDETTE *et al.*, 2003; JARRY *et al.*, 2003; RHYU *et al.*, 2006; POWELL *et al.*, 2008). Não localizados somente no SNC, esses receptores de serotonina (5-HT) se espalham pelo intestino e pelo sistema cardiovascular, exercendo, a depender do tipo e subtipo do receptor envolvido (5-HT1-7), respostas complexas e variadas, desde bradicardia ou taquicardia, hipotensão ou hipertensão, vasoconstrição ou vasodilatação (SAXENA; VILLALÓN, 1990; KITSON, 2007).

Os efeitos de *Cimicifuga racemosa* e seus constituintes no sistema cardiovascular foram demonstrados ao longo do tempo. Mercier e Balansard (1935) propuseram que a fração glicosídica do rizoma da cimicifuga causaria hipotensão, diminuição das contrações cardíacas e bradicardia. Também foi relatado que *C. racemosa* causa vasodilatação periférica e um aumento no fluxo sanguíneo periférico em pacientes que sofrem de doença arterial periférica, mas não em pacientes normotensos (GENAZZANI; SORRENTINO, 1962). Kim, Lee e Rhyu (2011) demonstraram efeito vasodilatador *in vitro* da *C. racemosa* em anéis de aorta de ratos Sprague-Dawley. O envolvimento do sistema NO / cGMP e a inibição do influxo extracelular de cálcio no músculo liso vascular através da abertura dos canais de potássio seriam os responsáveis por esse efeito, por meio de mecanismos dependentes e independentes do endotélio vascular. Foi proposto inicialmente que o efeito do ácido cimicifúgico D e constituintes do ácido fucinólico presentes nas espécies de *Cimicifuga* promoveriam relaxamento vascular sustentado, reduzindo o influxo de cálcio extracelular (NOGUCHI *et al.*, 1998). No entanto, efeitos serotoninérgicos independentes da recaptação seletiva de serotonina foram demonstrados com diferentes preparações de *C. racemosa* (POWELL *et al.*, 2008; BURDETTE *et al.*, 2003). Powell *et al.* (2008) demonstraram que a ligação do constituinte N(ω)metilserotonina, responsável pela atividade serotonérgica da cimicifuga, aos

receptores 5-HT₇ reduziria a pressão arterial, sendo uma consequência do efeito vasodilatador da *C. racemosa* (CAMPOS *et al.*, 2012). Também exibe ligação competitiva aos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{1D} (BURDETTE *et al.*, 2003; TSUKAMOTO; ABURATANI; OHTA, 2005), além de ser um agonista parcial dos receptores de serotonina (GÖDECKE *et al.*, 2009).

Os resultados encontrados no estudo atual demonstraram clinicamente, através da técnica da medida da FMD, que mulheres que fizeram uso do extrato de *C. racemosa*, durante 28 dias, apresentavam 3,7 vezes mais chance de aumentar o lúmen do vaso arterial, exibindo, assim, maior elasticidade vascular, quando comparado a um grupo controle em uso de placebo, no mesmo intervalo de tempo.

Dado ao grande número de informações sobre riscos e benefícios da terapia hormonal para manejo dos sintomas climatéricos, desde os primeiros resultados divulgados pelo estudo WHI, mulheres e profissionais de saúde buscam alternativas não-hormonais eficazes para trataros sintomas relacionados à menopausa. As ações farmacológicas centrais do extrato de *C. racemosa*, aliadas à possível ausência de efeitos estrogênicos, colocam o fármaco como alternativa no controle dos sintomas climatéricos em mulheres que ou não desejam fazer uso da terapia hormonal, ou mesmo possuem contraindicação ao uso de hormônios, como mulheres com histórico de neoplasias mamárias (HERNANDEZ MUNOZ; PLUCHINO, 2003; ROSTOCK *et al.*, 2011). Além da indicação principal, o presente estudo adiciona à lista de benefícios de *C. racemosa* influência positiva na função endotelial ao possibilitar promoção da elasticidade da artéria braquial. A ação vasodilatadora confere ainda potencial efeito cardioprotetor nas mulheres, especialmente em uma fase de vida em que os eventos vasculares tendem a ter prognóstico mais reservado (LISABETH; BUSHNELL, 2012; LOBO *et al.*, 2014).

O resultado desta pesquisa pode contribuir para prover maiores esclarecimentos a respeito das ações vasculares da *C. racemosa* e oferecer novas perspectivas sobre esse campo de pesquisa, que é a ação endotelial dos fármacos não hormonais usados na prática médica. Esperamos ter contribuído para que novas propostas de estudos, que definam com mais clareza o real papel do extrato de *Cimicifuga racemosa* na capacidade vasodilatadora endotélio-dependente, possam ser elaboradas.

CONCLUSÃO

Conclui-se que o uso por 28 dias de extrato de *C. racemosa* em uma dose diária de 160mg (equivalente a 4mg de 23-epi-26-desoxiacteína por comprimido) altera a função endotelial de mulheres na pós-menopausa, promovendo vasodilatação conforme o parâmetro da medida do diâmetro da artéria braquial direita.

REFERÊNCIAS

- ABRAMSON, B. L.; MELVIN, R. G. Cardiovascular risk in women: focus on hypertension. **Canadian journal of cardiology**, Oakville, v. 30, n. 5, p. 553-559, May 2014.
- ALMEIDA FILHO, B. S.; NAHÁS, E. A. P. **Guia essencial de abordagem do climatério**. Botucatu: KWL, v. 65p., 2017.
- ALONSO, J. R. **Tratado de fitomedicina – bases clínicas e farmacológicas**. Buenos Aires: Ísis, 1998.
- ALVES, D. L. *et al.* Effects of *Trifolium pratense* and *Cimicifuga racemosa* on the endometrium of wistar rats. **Maturitas**, Limerick, v. 61, n. 4, p. 364–370, Dec 2008.
- ANDERSON, E. A.; MARK, A. L. Flow-mediated and reflex changes in large peripheral artery tone in humans. **Circulation**, Dallas, v. 79, n. 1, p. 93-100, Jan 1989.
- AUCH-SCHWELK, W. *et al.* Modulation of contractions to ergonovine and methylergonovine by nitric oxide and thromboxane A2 in the human coronary artery. **Journal of cardiovascular pharmacology**, New York, v. 36, n. 5, p. 631-639, Nov 2000.
- BAI, W. *et al.* Efficacy and tolerability of a medicinal product containing an isopropanolic black cohosh extract in Chinese women with menopausal symptoms: a randomized, double blind, parallel-controlled study versus tibolone. **Maturitas**, Limerick, v. 58, n. 1, p. 31-41, Sept 2007.
- BANCSI, L. F. J. M. M. *et al.* Predictors of poor ovarian response in in vitro fertilization: a prospective study comparing basal markers of ovarian reserve. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 77, n. 2, p. 328–336, February 2002.
- BATH, P. M.; KRISHNAN, K.; APPLETON, J. P. Nitric oxide donors (nitrates), L-arginine, or nitric oxide synthase inhibitors for acute stroke. **Cochrane database systematic review**, v. 4, n. CD000398, p. 1-34, Apr 2017.
- BEBENEK, M. *et al.* Effect of exercise and *Cimicifuga racemosa* (CR BNO 1055) on bone mineral density, 10-year coronary heart disease risk, and menopausal complaints: the randomized controlled Training and *Cimicifuga racemosa* Erlangen (TRACE) study. **Menopause**, New York, v. 17, n. 4, p. 791-800, Jul 2010.
- BECHLIOULIS, A. *et al.* Endothelial function, but not carotid intima-media thickness, is affected early in menopause and is associated with severity of hot flashes. **Journal of clinical endocrinology and metabolism**, Philadelphia, v. 95, n. 3, p. 1199-1206, Mar 2010.
- BECK, V. *et al.* Comparison of hormonal activity (estrogen, androgen and progestin) of standardized plant extracts for large scale use in hormone replacement therapy. **Journal of steroid biochemistry & molecular biology**, Oxford, v. 84, n. 2-3, p. 259–268, Feb 2003.
- BEER, A. M. *et al.* Efficacy of black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) medicines for treatment of menopausal symptoms - comments on major statements of the Cochrane Collaboration report 2012 "black cohosh (*Cimicifuga* spp.) for menopausal symptoms (review)". **Gynecological endocrinology**, Carnforth, v. 29, n. 12, p. 1022-1025, Dec 2013.
- BEER, A. M.; NEFF, A. Differentiated evaluation of extract-specific evidence on *Cimicifuga racemosa*'s efficacy and safety for climacteric complaints. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 2013, n. 860602, p. 1-21, Aug 2013.
- BLUMENTHAL, M.; BUSSE, W. R. **The German Commission E Monographs: Therapeutic Guide to Herbal Medicines**. Austin: American Botanical Council, 1998.

- BOLLE, P. *et al.* Estrogen like effect of a *Cimicifuga racemosa* extract sub-fraction as assessed by in vivo, ex vivo and in vitro assays. **Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, Oxford, v. 107, n. 3-5, p. 262–269, Nov-Dec 2007.
- BORRELLI, F.; IZZO, A. A.; ERNST, E. Pharmacological effects of *Cimicifuga racemosa*. *Life sciences*, Oxford, v. 73, n. 10, p. 1215–1229, July 2003.
- BOTS, M. L. *et al.* Assessment of flow-mediated vasodilatation (FMD) of the brachial artery: effects of technical aspects of the FMD measurement on the FMD response. **European heart journal**, London, v. 26, n. 4, p. 363–368, Feb 2005.
- BRADSHAW, K. D. A mulher madura. In: HOFFMAN, B. L., *et al.* **Ginecologia de Williams**. 2a. ed. Porto Alegre: AMGH, 2014. p. 581-604.
- BRADSHAW, K. D. Transição menopausal. In: HOFFMAN, B. L., *et al.* **Ginecologia de Williams**. 2a. ed. Porto Alegre: AMGH, 2014. p. 554-580.
- BRANDÃO, A. H. F. *et al.* Aplicação prática da dilatação fluxo-mediada da artéria braquial em Ginecologia e Obstetrícia. **FEMINA**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 5, p. 239-243, Maio 2010.
- BRASIL. **Manual de atenção à mulher no climatério/menopausa**. Ministério da Saúde. Brasília, p. 192. 2008.
- BREDT, D. S. *et al.* Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. **Nature**, London, v. 351, n. 6329, p. 714-718, June 1991.
- BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. **Proceedings of the national academy of sciences of the USA**, Washington, v. 87, n. 2, p. 682-685, Jan 1990.
- BURDETTE, J. E. *et al.* Black cohosh acts as a mixed competitive ligand and partial agonist of the serotonin receptor. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 19, p. 5661-5670, Sept 2003.
- CÉSAR, I. C. *et al.* Determinação de daidzeína, genisteína e gliciteína em cápsulas de isoflavonas por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). **Revista brasileira de farmacognosia**, São Paulo, v. 17, n. 4, p. 616-625, out-dez 2007.
- CAMPOS, L. B. *et al.* *Cimicifuga racemosa* impairs fatty acid β -oxidation and induces oxidative stress in livers of ovariectomized rats with renovascular hypertension. **Free radical biology and medicine**, New York, v. 53, n. 4, p. 680-689, Aug 2012.
- CELANI, M. F. *et al.* Short-term tibolone does not interfere with endothelial function: a doubleblinded, randomized, controlled trial. **Climacteric**, London, v. 19, n. 3, p. 299-302, June 2016.
- CELERMAJER, D. S. *et al.* Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. **Lancet**, London, v. 340, n. 8828, p. 1111-1115, Nov 1992.
- CHEN, S. N. *et al.* Isolation, structure elucidation, and absolute configuration of 26deoxyactein from *Cimicifuga racemosa* and clarification of nomenclature associated with 27deoxyactein. **Journal of natural products, Cincinnati**, v. 65, n. 4, p. 601-605, Apr 2002.
- CLAPAUCH, R. *et al.* *Cimicifuga racemosa*: monograph. **Alternative medicine review**, Saindpoint, v. 8, n. 2, p. 186-189, May 2003.
- CLARKE, S. C. *et al.* A study of hormone replacement therapy in postmenopausal women with ischaemic heart disease: the Papworth HRT atherosclerosis study. **BJOG**, Oxford, v. 109, n. 9, p. 1056-1062, Sep 2002.
- COHEN, J. A power primer. **Psychological bulletin**, Washington, v. 112, n. 1, p. 155-159, July 1992.

- COHEN, R. A. *et al.* Mechanism of nitric oxide-induced vasodilatation: refilling of intracellular stores by sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase and inhibition of store-operated Ca²⁺ influx. **Circulation research**, Dallas, v. 84, n. 2, p. 210-219, Feb 1999.
- CONBOY, J. E. Algumas medidas típicas univariadas da magnitude do efeito. **Análise Psicológica**, Lisboa, v. 21, n. 2, p. 145-158, 2003.
- CORRETTI, M. C. *et al.* Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. **Journal of the American college of cardiology**, New York, v. 39, n. 2, p. 257-265, Jan 2002. 65
- CORRETTI, M. C.; PLOTNICK, G. D.; VOGEL, R. A. Technical aspects of evaluating brachial artery vasodilatation using high-frequency ultrasound. **American journal of physiology**, Bethesda, v. 268, n. 4 Pt 2, p. H1397-404, Apr 1995.
- COX, D. A. *et al.* Atherosclerosis impairs flow-mediated dilation of coronary arteries in humans. **Circulation**, Dallas, v. 80, n. 3, p. 458-465, Sept 1989.
- DAHLÉN, S. E. *et al.* Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary venules: in vivo effects with relevance to the acute inflammatory response. **Proceedings of the national academy of sciences of the USA**, Washington, v. 78, n. 6, p. 3887-3891, June 1981.
- DAVIS, S. R. *et al.* Menopause. **Nature reviews disease primers**, Basingstoke, v. 1, n. 15004, p. 1-19, April 2015.
- DEANFIELD, J. E.; HALCOX, J. P.; RABELINK, T. J. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. **Circulation**, Dallas, v. 115, n. 10, p. 1285-1295, Mar 2007.
- DEANFIELD, J. *et al.* Endothelial function and dysfunction. Part I: Methodological issues for assessment in the different vascular beds: a statement by the Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. **Journal of hypertension**, London, v. 23, n. 1, p. 7-17, Jan 2005.
- DUBEY, R. K. *et al.* Vascular consequences of menopause and hormone therapy: importance of timing of treatment and type of estrogen. **Cardiovascular research**, London, v. 66, n. 2, p. 295-306, May 2005.
- DUMESIC, D. A. *et al.* Ovarian morphology and serum hormone markers as predictors of ovarian follicle recruitment by gonadotropins for in vitro fertilization. **The journal of clinical endocrinology & metabolism**, Oxford, v. 86, n. 6, p. 2538-2543, June 2001.
- EDEN, J. Managing menopausal symptoms after breast cancer. **European journal of endocrinology**, Oslo, v. 174, n. 3, p. R71-R77, Mar 2016.
- EINBOND, L. S. *et al.* Growth inhibitory activity of extracts and compounds from *Cimicifuga* species on human breast cancer cells. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 15, n. 6-7, p. 504-511, June 2008.
- EL KHOUDARY, S. R. *et al.* Progression rates of carotid intima-media thickness and adventitial diameter during the menopausal transition. **Menopause**, New York, v. 20, n. 1, p. 8-14, Jan 2013.
- ENBOM, E. T. *et al.* Mechanism of hepatotoxicity due to black cohosh (*Cimicifuga racemosa*): histological, immunohistochemical and electron microscopy analysis of two liver biopsies with clinical correlation. **Experimental and molecular pathology**, New York, v. 96, n. 3, p. 279-283, Jun 2014.
- EUROPEAN MEDICINE AGENCY. Science Medicines Health. European Union herbal monograph on *Cimicifuga racemosa* (L.). Nutt., Rhizoma [Internet], 2018. Disponível em:

<https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-monograph/draft-european-union-herbalmonograph-cimicifuga-racemosa-l-nutt-rhizome-revision-1_en.pdf>. Acesso em: Outubro 2019.

FÉLÉTOU, M. Introduction. In: FÉLÉTOU, M. **The endothelium: multiple functions of the endothelial cells - Focus on endothelium-derived vasoactive mediators**. San Rafael: Morgan & Claypool Life Sciences Publishers, v. I, 2011. p. 1-2.

FADDY, M. J. *et al.* Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. **Human Reproduction**, Oxford, v. 7, n. 10, p. 1342-1346, novembro 1992.

FARHAT, M. Y.; LAVIGNE, M. C.; RAMWELL, P. W. The vascular protective effects of estrogen. **The FASEB Journal**, Bethesda, v. 10, n. 5, p. 615-624, May 1996.

FONSECA, A. M. D. *et al.* **Dados demográficos, epidemiológicos e clínicos de mulheres brasileiras climatéricas**. 1a. ed. São Paulo: Casa Leitura Médica, 2010.

FOSBERY, W. H. S. Severe climacteric flushings successfully treated by ovarian extract. **BMJ**, London, p. 1039, 1897.

FRANCO, O. H. *et al.* Use of plant-based therapies and menopausal symptoms: a systematic review and meta-analysis. **JAMA**, Chicago, v. 315, n. 23, p. 2554-2563, June 2016.

FREEDMAN, R. R.; KRELL, W. Reduced thermoregulatory null zone in postmenopausal women with hot flashes. **American journal of obstetrics and gynecology**, Saint Louis, v. 181, n. 1, p. 66-70, Jul 1999.

FREEDMAN, R. R.; SUBRAMANIAN, M. Effects of symptomatic status and the menstrual cycle on hot flash-related thermoregulatory parameters. **Menopause: The Journal of The North American Menopause Society**, Pepper Pike, v. 12, n. 2, p. 156-159, Mar 2005. FREI-KLEINER, S. *et al.* *Cimicifuga racemosa* dried ethanolic extract in menopausal disorders: a double-blind placebo-controlled clinical trial. **Maturitas**, Limerick, v. 51, n. 4, p. 397-404, Aug 2005.

FREUDENSTEIN, J.; DASENBROCK, C.; NISSLEIN, T. Lack of promotion of estrogen-dependent mammary gland tumors in vivo by an isopropanolic *Cimicifuga racemosa* extract. **Cancer research**, Baltimore, v. 62, n. 12, p. 3448-3452, June 2002. 67

FRITZ, M. A.; SPEROFF, L. Menopause and the perimenopausal transition. In: FRITZ, M. A.; SPEROFF, L. **Clinical gynecologic endocrinology and infertility**. 8th. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Williams, 2011. p. 673-748.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, London, v. 288, n. 5789, p. 373376, Nov 1980.

GÖDECKE, T. *et al.* Phytochemistry of cimicifugic acids and associated bases in *Cimicifuga racemosa* root extracts. **Phytochemical analysis**, Chichester, v. 20, n. 2, p. 120-133., Mar 2009.

GARCÍA-PÉREZ, M. A. *et al.* Isopropanolic *Cimicifuga racemosa* is favorable on bone markers but neutral on an osteoblastic cell line. **Fertility and sterility**, New York, v. 91, n. 4, p. 1347-1350, Apr 2009.

GARITA-HERNANDEZ, M. *et al.* The growth inhibitory activity of the *Cimicifuga racemosa* extract Ze 450 is mediated through estrogen and progesterone receptors-independent pathways. **Planta medica**, Stuttgart, v. 72, n. 4, p. 317-23, Mar 2006.

GENAZZANI, E.; SORRENTINO, L. Vascular action of acteina: active constituent of *Actaea racemosa* L. **Nature**, London, v. 194, p. 544-545, May 1962.

- GILLIGAN, D. M. *et al.* Contribution of endothelium-derived nitric oxide to exercise-induced vasodilation. **Circulation**, Dallas, v. 90, n. 6, p. 2853-2858, Dec 1994.
- GIUSTARINI, D. *et al.* Nitric oxide and S-nitrosothiols in human blood. **Clinica chimica acta: International journal of clinical chemistry and medical biochemistry**, Amsterdam, v. 330, n. 1-2, p. 85-98, Apr 2003.
- GOON, P. K.; BOOS, C. J.; LIP, G. Y. Circulating endothelial cells: markers of vascular dysfunction. **Clinical laboratory**, Heidelberg, v. 51, n. 9-10, p. 531-538, 2005.
- GORI, T. *et al.* Assessment of vascular function: flow-mediated constriction complements the information of flow-mediated dilatation. **Heart**, London, v. 96, n. 2, p. 141-147, Jan 2010.
- GORI, T. *et al.* Endothelial function assessment: flow-mediated dilation and constriction provide different and complementary information on the presence of coronary artery disease. **European heart journal**, London, v. 33, n. 3, p. 363-371, Feb 2012.
- GORI, T. *et al.* Both flow-mediated dilation and constriction are associated with changes in blood flow and shear stress: two complementary perspectives on endothelial function. **Clinical hemorheology and microcirculation**, Amsterdam, v. 64, n. 3, p. 255-266, Nov 2016.
- GRODSTEIN, F. *et al.* Postmenopausal estrogen and progestin use and the risk of cardiovascular disease. **New England journal of medicine**, Boston, v. 335, p. 453-461, Aug 1996.
- GRODSTEIN, F. *et al.* A prospective, observational study of postmenopausal hormone therapy and primary prevention of cardiovascular disease. **Annals of internal medicine**, Philadelphia, v. 133, n. 12, p. 933-941, Dec 2000.
- GRUBER, H. J. *et al.* Asymmetric dimethylarginine (ADMA) is tightly correlated with growth in juveniles without correlations to obesity related disorders. **Experimental and clinical endocrinology and diabetes**, Heidelberg, v. 116, n. 9, p. 520-524, Oct 2008.
- GRYGLEWSKI, R. J.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. **Nature**, London, v. 320, n. 6061, p. 454-456, Apr 1986.
- HALL, J. E. Controle local e humoral do fluxo sanguíneo dos tecidos. In: HALL, J. E. **GUYTON & HALL Tratado de fisiologia médica**. 12a. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, v. 201211, 2011.
- HAMBURG, N. M.; BENJAMIN, E. J. Assessment of endothelial function using digital pulse amplitude tonometry. **Trends in cardiovascular medicine**, New York, v. 19, n. 1, p. 6-11, Jan 2009.
- HARLOW, S. D. *et al.* Executive summary of the Stages of Reproductive Aging Workshop + 10: addressing the unfinished agenda of staging reproductive aging. **Menopause: The Journal of The North American Menopause Society**, Pepper Pike, v. 19, n. 4, p. 387/395, April 2012.
- HARRIS, R. A. *et al.* Ultrasound assessment of flow-mediated dilatation: a tutorial. **Hypertension**, Dallas, v. 55, n. 5, p. 1075-1085, May 2010.
- HASHIMOTO, M. *et al.* Modulation of endothelium-dependent flow-mediated dilatation of the brachial artery by sex and menstrual cycle. **Circulation**, Dallas, v. 92, n. 12, p. 3431-3435, Dec 1995.
- HE, K. *et al.* Direct analysis and identification of triterpene glycosides by LC/MS in black cohosh, *Cimicifuga racemosa*, and in several commercially available black cohosh products. **Planta medica**, Stuttgart, v. 66, n. 7, p. 635-640, Oct 2000.

- HEALTH, N. I. O. Clinical and Research Information on Drug- Induced Liver Injury (Livertoxic Database). LiverTox, 2014. Disponível em: <<https://livertox.nlm.nih.gov/BlackCohosh.htm>>. Acesso em: 16 Jun 2019.
- HENDERSON, B. E.; PAGANINI-HILL, A.; ROSS, R. K. Decreased mortality in users of estrogen replacement therapy. **Archives of internal medicine**, Chicago, v. 151, n. 1, p. 75-78., Jan 1991.
- HENNEICKE-VON ZEPELIN, H. H. *et al.* Isopropanolic black cohosh extract and recurrencefree survival after breast cancer. **International journal of clinical pharmacology and therapeutics**, Munchen, v. 45, n. 3, p. 143-154, Mar 2007.
- HERNANDEZ MUNOZ, G.; PLUCHINO, S. *Cimicifuga racemosa* for the treatment of hot flushes in women surviving breast cancer. **Maturitas**, Limerick, v. 44, n. Suppl. 1, p. S59-65, Mar 2003.
- HERRINGTON, D. M. *et al.* Effects of estrogen replacement on the progression of coronaryartery atherosclerosis. **New England journal of medicine**, Boston, v. 343, n. 8, p. 522-529., Aug 2000.
- HIRSCHBERG, A. L. *et al.* An isopropanolic extract of black cohosh does not increase mammographic breast density or breast cell proliferation in postmenopausal women. **Menopause**, New York, v. 14, n. 1, p. 89-96, Jan-Feb 2007.
- HOFMANN, F. *et al.* Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion. **Physiological reviews**, Bethesda, v. 86, n. 1, p. 1-23, Jan 2006.
- HOPKINS, N. D. *et al.* Age and sex relationship with flow-mediated dilation in healthy children and adolescents. **Journal of applied physiology**, Bethesda, v. 119, n. 8, p. 926-933, Oct 2015.
- HOSTANSKA, K. *et al.* *Cimicifuga racemosa* extract inhibits proliferation of estrogen receptor-positive and negative human breast carcinoma cell lines by induction of apoptosis. **Breast cancer research and treatment**, Dordrecht, v. 84, n. 2, p. 151-160, Mar 2004.
- HULLEY, S. *et al.* Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. **JAMA**, Chicago, v. 280, n. 7, p. 605-613, Aug 1998.
- HURTADO, R.; CELANI, M.; GEBER, S. Effect of short-term estrogen therapy on endothelial function: a double-blinded, randomized, controlled trial. **Climacteric**, London, v. 19, n. 5, p. 448-451, Oct 2016.
- JARRY, H. *et al.* In vitro effects of the *Cimicifuga racemosa* extract BNO 1055. **Maturitas**, Limerick, v. 44, n. Suppl 1, p. S31-38, Mar 2003.
- JOANNIDES, R. *et al.* Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. **Circulation**, Dallas, v. 91, n. 5, p. 1314-1319, Mar 1995.
- KANNEL, W. B. Metabolic risk factors for coronary heart disease in women: perspective from the Framingham Study. **American heart journal**, Saint Louis, v. 114, n. 2, p. 413-419, Aug 1987.
- KIM, E.-Y.; LEE, Y. J.; RHYU, M.-R. Black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) relaxes the isolated rat thoracic aorta through endothelium-dependent and -independent mechanisms. **Journal of ethnopharmacology**, Limerick, v. 138, n. 2, p. 537-542, Nov 2011.
- KITSON, S. L. 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptor ligands. **Current pharmaceutical design, Schiphol**, v. 13, n. 25, p. 2621-2637, Feb 2007.

- KORANDJI, C. *et al.* Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and hyperhomocysteinemia in patients with acute myocardial infarction. **Clinical biochemistry**, Toronto, v. 40, n. 1-2, p. 6672, Jan 2007.
- KRETZSCHMAR, G. *et al.* No estrogen-like effects of an isopropanolic extract of *Rhizoma Cimicifugae racemosae* on uterus and vena cava of rats after 17 day treatment. **Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, Oxford, v. 97, n. 3, p. 271-277, Nov 2005.
- KRUSE, S. O. *et al.* Fukiic and piscidic acid esters from the rhizome of *Cimicifuga racemosa* and the in vitro estrogenic activity of fukinolic acid. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 65, n. 8, p. 763-764, Dec 1999.
- KUPESIC, S. *et al.* Three-dimensional ultrasonographic ovarian measurements and in vitro fertilization outcome are related to age. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 79, n. 1, p. 1907, January 2003.
- LANDIM, M. B. P.; CASELLA FILHO, A.; CHAGAS, A. C. P. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and endothelial dysfunction: implications for atherogenesis. **Clinics**, São Paulo, v. 64, n. 471-478, May 2009.
- LE BROCCQ, M. *et al.* Endothelial dysfunction: from molecular mechanisms to measurement, clinical implications, and therapeutic opportunities. **Antioxidants and redox signalling**, Larchmont, v. 10, n. 9, p. 1631-1674, Sept 2008.
- LEACH, M. J.; MOORE, V. Black cohosh (*Cimicifuga* spp.) for menopausal symptoms. **Cochrane database of systematic reviews**, Oxford, v. 9, n. CD007244, Sept 2012.
- LEE, C. R. *et al.* Relation between digital peripheral arterial tonometry and brachial artery ultrasound measures of vascular function in patients with coronary artery disease and in healthy volunteers. **American journal of cardiology**, New York, v. 109, n. 5, p. 651-657, Mar 2012.
- LI, W. *et al.* High-performance liquid chromatographic analysis of Black Cohosh (*Cimicifuga racemosa*) constituents with in-line evaporative light scattering and photodiode array detection. **Analytica chimica acta**, Amsterdam, v. 471, n. 1, p. 61-75, Oct 2002. 71
- LIBBY, P.; RIDKER, P. M.; MASERI, A. Inflammation and atherosclerosis. **Circulation**, Dallas, v. 105, n. 9, p. 1135-1143, Mar 2002.
- LISABETH, L.; BUSHNELL, C. Stroke risk in women: the role of menopause and hormone therapy. **Lancet neurology**, London, v. 11, n. 1, p. 82-91, Jan 2012.
- LIU, J. *et al.* Evaluation of estrogenic activity of plant extracts for the potential treatment of menopausal symptoms. **Journal of agricultural and food chemistry**, Washington, v. 49, n. 5, p. 2472-2479, May 2001.
- LIU, M. Y. *et al.* Alterations in EDHF-mediated hyperpolarization and relaxation in mesenteric arteries of female rats in long-term deficiency of oestrogen and during oestrus cycle. **British journal of pharmacology**, London, v. 132, n. 5, p. 1035-1046, Mar 2001.
- LOBO, R. A. *et al.* Prevention of diseases after menopause. **Climacteric**, London, v. 17, n. 5, p. 540-556, Oct 2014.
- LONG, X. *et al.* Short-term exercise training prevents micro- and macrovascular disease following coronary stenting. **Journal of applied physiology**, Washington, v. 108, n. 6, p. 1766-1774, June 2010.
- LOSCALZO, J. Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. **Circulation research**, Dallas, v. 88, n. 8, p. 756-762, Apr 2001.

- LUDMER, P. L. *et al.* Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. **New English journal of medicine**, Boston, v. 315, n. 17, p. 1046-1051, Oct 1986.
- LYONS, C. R.; ORLOFF, G. J.; CUNNINGHAM, J. M. Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. **Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 267, n. 9, p. 6370–6374, Mar 1992.
- MAHADY, G. B. Is black cohosh estrogenic? **Nutrition reviews**, New York, v. 61, n. 5 (Pt 1), p. 183-186, May 2003.
- MAHADY, G. B. Black cohosh (*Actaea/Cimicifuga racemosa*) review of the clinical data for safety and efficacy in menopausal symptoms. **Treatments in Endocrinology**, Auckland, v. 4, n. 3, p. 177-184, Feb 2005.
- MALINOW, M. R. *et al.* Vascular and extravascular radioactivity after the injection of estradiol 6, 7H in the human being. **Journal of clinical endocrinology and metabolism**, Philadelphia, v. 23, p. 306-310, Mar 1963.
- MALINOW, M. R.; PELLEGRINO, A. A. The effect of alpha-estradiol benzoate on spontaneous and experimental atherosclerosis in the rat. **A.M.A. Archives of pathology**, Chicago, v. 65, n. 1, p. 47-55, Jan 1958. 72
- MALINOW, M. R.; PELLEGRINO, A. A.; LANGE, G. Distribution of oestradiol-6,7-H3 in the arteries of normal and cholesterol fed rabbits. **Acta endocrinology**, Copenhagen, v. 31, p. 500-504, Aug 1959.
- MCCROHON, J. A. *et al.* Hormone replacement therapy is associated with improved arterial physiology in healthy post-menopausal women. **Clinical endocrinology**, Oxford, v. 45, n. 4, p. 435-441, Oct 1996.
- MCKINLAY, S. M.; BRAMBILLA, D. J.; POSNER, J. G. The normal menopause transition. **Maturitas**, Limerick, v. 14, n. 2, p. 103-15, January 1992.
- MERCIER, F.; BALANSARD, J. Sur les constituants du rhizome de *Cimicifuga racemosa*. **Société de biologie de Marseille**, Marseille, v. 138, p. 166-168, 1935.
- MOLINARI, A. *et al.* Thrombomodulin is a cofactor for thrombin degradation of recombinant single-chain urokinase plasminogen activator "in vitro" and in a perfused rabbit heart model. **Thrombosis and haemostasis**, Stuttgart, v. 67, n. 2, p. 226-232, Feb 1992.
- MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological reviews**, Baltimore, v. 43, n. 2, p. 109-142, June 1991.
- MOREAU, K. L. *et al.* Endothelial function is impaired across the stages of the menopause transition in healthy women. **Journal of clinical endocrinology and metabolism**, Philadelphia, v. 97, n. 12, p. 4692-4700, Dec 2012.
- MOSKOWITZ, M. *et al.* Changes in serum lipids and coronary arteries of the rat in response to estrogens. **A.M.A. Archives of Pathology**, Chicago, v. 61, n. 3, p. 245-63, Mar 1956.
- NAMS. The 2017 hormone therapy position statement of The North American Menopause Society. **Menopause**, New York, v. 24, n. 7, p. 728-753, 24(7):728-753. Jul 2017.
- NASER, B. *et al.* Suspected black cohosh hepatotoxicity: no evidence by meta-analysis of randomized controlled clinical trials for isopropanolic black cohosh extract. **Menopause**, New York, v. 18, n. 4, p. 366-375, Apr 2011.
- NEJATA, E. J.; CHERVENAKB, J. L. The continuum of ovarian aging and clinicopathologies associated with the menopausal transition. **Maturitas**, Limerick, v. 66, p. 187-190, junho 2010.

- NIKOLI, D.; LI, J.; VAN BREEMEN, R. B. Metabolism of N ω -methylserotonin, a serotonergic constituent of black cohosh (*Cimicifuga racemosa*, L.Nutt.), by human liver microsomes. **Biomedical chromatography**, London, v. 28, n. 12, p. 1647–1651, Dec 2014.
- NILSSON, T. *et al.* Characterisation of 5-HT receptors in human coronary arteries by molecular and pharmacological techniques. **European journal of pharmacology**, Amsterdam, v. 372, n. 1, p. 49-56, May 1999.
- NOGUCHI, M. *et al.* Vasoactive effects of cimicifugic acids C and D, and fukinolic acid in cimicifuga rhizome. **Biological and pharmaceutical bulletin**, Tokyo, v. 21, n. 11, p. 1163-1168, Nov 1998.
- ORSHAL, J. M.; KHALIL, R. A. Gender, sex hormones, and vascular tone. **American journal of physiology: regulatory, integrative and comparative physiology**, Bethesda, v. 286, n. 2, p. R233-249, Feb 2004.
- PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiological reviews**, Bethesda, v. 87, n. 1, p. 315-424, Jan 2007.
- PAIVA, L. H. S. C.; BACAARO, L. F. Tratamento não hormonal dos sintomas climatéricos. In: FERNANDES, C. E.; POMPEI, L. M. **Endocrinologia feminina**. Barueri: Manole, 2016. p. 892-905.
- PARK, H. J. *et al.* Human umbilical vein endothelial cells and human dermal microvascular endothelial cells offer new insights into the relationship between lipid metabolism and angiogenesis. **Stem cell reviews and reports**, v. 2, n. 2, p. 93-102, June 2006.
- PEDRO, A. O. *et al.* Idade de ocorrência da menopausa natural em mulheres brasileiras: resultados de um inquérito populacional domiciliar. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 1, p. 17-25, Jan-Fev 2003.
- PINKERTON, J. V.; STOVALL, D. W.; KINGHTLINGER, R. S. Advances in the treatment of menopausal symptoms. **Women's health**, London, v. 5, n. 4, p. 361-384, Jul 2009.
- POLLOCK, J. S. *et al.* Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. **Proceedings of the national academy of sciences of the USA**, Washington, v. 88, n. 23, p. 10480–10484, Dec 1991.
- POWELL, S. L. *et al.* In vitro serotonergic activity of black cohosh and identification of N ω -methylserotonin as a potential active constituent. **Journal of agricultural and food chemistry**, Washington, v. 56, n. 24, p. 11718-11726, Dec 2008.
- PRETORIUS, M.; BROWN, N. J. Endogenous nitric oxide contributes to bradykinin-stimulated glucose uptake but attenuates vascular tissue-type plasminogen activator release. **Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, Baltimore, v. 332, n. 1, p. 291-297, Jan 2010.
- RAITAKARI, O. T.; CELERMAJER, D. S. Flow-mediated dilatation. **British journal of clinical pharmacology**, London, v. 50, n. 5, p. 397–404, Nov 2000. 74
- RAJENDRAN, P. *et al.* The vascular endothelium and human diseases. **International journal of biological sciences**, Sydney, v. 9, n. 10, p. 1057-1069, Nov 2013.
- RAPKIN, A. J. Vasomotor symptoms in menopause: physiologic condition and central nervous system approaches to treatment. **American journal of obstetrics and gynecology**, Saint Louis, v. 196, n. 2, p. 97-106, Feb 2007.
- RAPOPORT, R. M.; MURAD, F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. **Circulation research**, Dallas, v. 52, n. 3, p. 352-357, Mar 1983.

- RELOU, I. A. *et al.* Effect of culture conditions on endothelial cell growth and responsiveness. **Tissue and cell**, Edinburgh, v. 30, n. 5, p. 525-530, Oct 1998.
- RESLAN, O. M.; KHALIL, R. A. Vascular effects of estrogenic menopausal hormone therapy. **Reviews on recent clinical trials**, Sharjah, v. 7, n. 1, p. 47-70, Feb 2012.
- RHYU, M. R. *et al.* Black cohosh (*Actaea racemosa*, *Cimicifuga racemosa*) behaves as a mixed competitive ligand and partial agonist at the human opiate receptor. **Journal of agricultural and food chemistry**, Washington, v. 54, n. 26, p. 9852–9857, Dec 2006.
- ROSS, R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. **New England journal of medicine**, Boston, v. 340, n. 340, p. 115-126, Jan 1999.
- ROSS, S. M. Menopause: a standardized isopropanolic black cohosh extract (remifemin) is found to be safe and effective for menopausal symptoms. **Holistic nursing practice**, Hagerstown, v. 26, n. 1, p. 58-61, Jan-Feb 2012.
- ROSSOUW, J. E. *et al.* Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. **JAMA**, Chicago, v. 288, n. 3, p. 321-333, Jul 2002.
- ROSTOCK, M. *et al.* Black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) in tamoxifen-treated breast cancer patients with climacteric complaints - a prospective observational study. **Gynecology Endocrinology**, Carnforth, v. 27, n. 10, p. 844-848, Oct 2011.
- RUBANYI, G. M.; VANHOUTTE, P. M. Oxygen-derived free radicals, endothelium, and responsiveness of vascular smooth muscle. **American journal of physiology**, Bethesda, v. 250, n. 5 Pt 2, p. H815-821, May 1986.
- RUBANYI, G. M.; VANHOUTTE, P. M. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. **American journal of physiology**, Bethesda, v. 250, n. 5 Pt 2, p. H822-827, May 1986. 75
- SALOMÃO, C. M. N. Correlação entre a dilatação fluxo mediada (FMD) da artéria braquial e os valores séricos maternos de PLGF e sFLT-1 em gestantes normais e complicadas por pré-eclâmpsia. **Tese de Mestrado**. Faculdade de Medicina da UFMG. Belo Horizonte, p. 104. 2012.
- SANTORO, N. *et al.* Impaired folliculogenesis and ovulation in older reproductive aged women. **The journal of clinical endocrinology & metabolism**, Oxford, v. 88, n. 11, p. 5502-5509, Nov 2003.
- SARRI, G. *et al.* Vasomotor symptoms resulting from natural menopause: a systematic review and network meta-analysis of treatment effects from the National Institute for Health and Care Excellence guideline on menopause. **BJOG**, Oxford, v. 124, n. 10, p. 1514-1523, Sept 2017.
- SAXENA, P. R.; VILLALÓN, C. M. Cardiovascular effects of serotonin agonists and antagonists. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 15, n. Suppl 7, p. S17-34, 1990.
- SCHOENAKER, D. A. J. M. *et al.* Socioeconomic position, lifestyle factors and age at natural menopause: a systematic review and meta-analyses of studies across six continents. **International journal of epidemiology**, Oxford, v. 43, n. 5, p. 1542–1562, Oct 2014.
- SEARLE, N.; SAHAD, P. Endothelial vasomotor regulation in health and disease. **Canadian journal of anaesthesia**, Ontario, v. 39, n. 8, p. 838-857, Oct 1992.
- SEIDLOVÁ-WUTTKE, D. *et al.* Evidence for selective estrogen receptor modulator activity in a black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) extract: comparison with estradiol-17 β . **European journal of endocrinology**, Oslo, v. 149, n. 4, p. 351-362, Oct 2003.

- SEITZ, B. M. *et al.* 5-HT causes splanchnic venodilation. **American journal of physiology: heart and circulatory physiology**, Bethesda, v. 313, n. 3, p. H676-H686, Sept 2017.
- SHIFREN, J. L.; SCHIFF, I. Role of hormone therapy in the management of menopause. **Obstetrics and gynecology**, Hagerstown, v. 115, n. 4, p. 839-855, Apr 2010.
- SHIFREN, J. L.; SCHIFF, I. Menopause. In: BEREK, J. S. **Berek & Novak's gynecology**. 15th. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2012. p. 974-986.
- SHOU, C.; LI, J.; LIU, Z. Complementary and alternative medicine in the treatment of menopausal symptoms. **Chinese journal of integrative medicine**, Beijing, v. 17, n. 12, p. 883888, Dec 2011.
- SIBAL, L. *et al.* The role of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in endothelial dysfunction and cardiovascular disease. **Current cardiology reviews**, Xarja, v. 6, n. 2, p. 82-90, May 2010.
- SILVA, A.G. *et al.* Avanços na elucidação dos mecanismos de ação de *Cimicifuga racemosa* (L.) Nutt. nos sintomas do climatério. **Revista brasileira de plantas medicinais**, Botucatu, v. 11, n. 4, p. 455-464, 2009. 76
- SLOPIEN, R.; MECZEKALSKI, B.; WARENIK-SZYMANKIEWICZ, A. Relationship between climacteric symptoms and serum serotonin levels in postmenopausal women. **Climateric**, Camborne, v. 6, n. 1, p. 53–57, Mar. 2003.
- STAMLER, J. S. *et al.* Nitric oxide regulates basal systemic and pulmonary vascular resistance in healthy humans. **Circulation**, Dallas, v. 89, n. 5, p. 2035-2040, May 1994.
- STAMPFER, M. J. *et al.* A prospective study of postmenopausal estrogen therapy and coronary heart disease. **New England journal of medicine**, Boston, v. 313, n. 17, p. 1044-1049, Oct 1985.
- STOLL, W. Phytopharmakon influences atrophic vaginal epithelium: double blind study: cimicifuga versus estrogenic substances. **Therapeutikum**, v. 1, p. 23–31, 1987.
- STORCH, A. S. *et al.* Métodos de investigação da função endotelial: descrição e suas aplicações. **International journal of cardiovascular sciences**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 3, p. 262-273, 30 2017.
- STRAFACE, E. *et al.* Gender-specific features of plasmatic and circulating cell alterations as risk factors in cardiovascular disease. **Fundamental and clinical pharmacology**, Paris, v. 24, n. 6, p. 665-674, Dec 2010.
- STROMEIER, S.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Phenolic esters from the rhizomes of *Cimicifuga racemosa* do not cause proliferation effects in MCF-7 cells. **Planta medica**, Stuttgart, v. 71, n. 6, p. 495-500, June 2005.
- SURKS, H. K. cGMP-dependent protein kinase I and smooth muscle relaxation: a tale of two isoforms. **Circulation research**, Dallas, v. 101, n. 11, p. 1078-1080, Nov 2007.
- SZMITKO, P. E. *et al.* New markers of inflammation and endothelial cell activation: Part I. **Circulation**, Dallas, v. 108, n. 16, p. 1917-1923, Oct 2003.
- SZMYD, M. *et al.* The effects of black cohosh on the regulation of estrogen receptor (ER α) and progesterone receptor (PR) in breast cancer cells. **Breast Cancer (Dove Med Press)**, London, v. 18, n. 10, p. 1-11, Jan 2018.
- THURSTON, R. C.; JOFFE, H. Vasomotor symptoms and menopause: findings from the study of women's health across the nation. **Obstetrics and gynecology clinics of North America**, Philadelphia, v. 38, n. 3, p. 489–501, Sept 2011.
- TRIAL, T. W. G. F. T. P. Effects of estrogen or estrogen/progestin regimens on heart disease risk factors in postmenopausal women. The postmenopausal estrogen/progestin interventions (PEPI) trial. **JAMA**, Chicago, v. 273, n. 3, p. 199-208, Jan 1995. 77

- TSUKAMOTO, S.; ABURATANI, M.; OHTA, T. Isolation of CYP3A4 inhibitors from the black cohosh (*Cimicifuga racemosa*). **Evidence-based complementary and alternative medicine**, Oxford, v. 2, n. 2, p. 223–226, Jun 2005.
- TURNER, J.; BELCH, J. J. F.; KHAN, F. Current concepts in assessment of microvascular endothelial function using Laser Doppler Imaging and iontophoresis. **Trends in cardiovascular medicine**, New York, v. 18, n. 4, p. 109-116, May 2008.
- USHIODA, M. *et al.* Serum lipoprotein(a) dynamics before/after menopause and long-term effects of hormone replacement therapy on lipoprotein(a) levels in middle-aged and older Japanese women. **Hormone and metabolic research**, Stuttgart, v. 38, n. 9, p. 581-586, Sept 2006.
- VANE, J. R.; ANGGÄRD, E. E.; BOTTING, R. M. Regulatory functions of the vascular endothelium. **New England journal of medicine**, Boston, v. 323, n. 1, p. 27-36, July 1990.
- VENUGOPAL, S. K. *et al.* Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression and bioactivity in human aortic endothelial cells. **Circulation**, Dallas, v. 106, n. 12, p. 1439-1441, Sept 2002.
- VERHOEVEN, M. O. *et al.* Effect of a combination of isoflavones and *Actaea racemosa* Linnaeus on climacteric symptoms in healthy symptomatic perimenopausal women: a 12-week randomized, placebo-controlled, double-blind study. **Menopause: The Journal of The North American Menopause Society**, New York, v. 12, n. 4, p. 412-420, July 2005.
- VIANA, L. C.; MARTINS, M.; GEBER, S. Climatério. In: VIANA, L. C.; GEBER, S. **Ginecologia**. 3a. ed. Rio de Janeiro: Medbook, 2012.
- VILLALÓN, C. M. *et al.* Mediation of 5-HT-induced external carotid vasodilatation in GR 127935-pretreated vagosympathectomized dogs by the putative 5-HT7 receptor. **British journal of pharmacology**, London, v. 120, n. 7, p. 1319 – 1327, Mar 1997.
- VIRDIS, A. *et al.* C-reactive protein and hypertension: is there a causal relationship? **Current pharmaceutical design**, Schiphol, v. 13, n. 16, p. 1693-1698, 2007.
- WENDER, M. C. O.; ODERICH, C. L. Fisiologia, fisiopatologia e abordagem diagnóstica do climatério - perimenopausa. In: FERNANDES, C. E.; POMPEI, L. D. M. **Endocrinologia feminina**. Barueri: Manole, 2016. p. 655-668.
- WILSON, S. H.; LERMAN, A. Function of vascular endothelium. In: SPERELAKIS, N. *et al.* **Heart physiology and pathophysiology**. 4th. ed. London: Academic Press, 2001. p. 473-480.
- WOLF, P. H. *et al.* Reduction of cardiovascular disease-related mortality among postmenopausal women who use hormones: evidence from a national cohort. **American journal of obstetrics and gynecology**, Saint Louis, v. 164, n. 2, p. 489-494, Feb 1991. 78
- WHO. World Health Organization. *Rhizoma cimicifugae racemosae*. In: WHO. **WHO monographs on selected medicinal plants**. Geneve: WHO, v. 2, 2002. p. 55-65.
- WOODMAN, O. L.; BOUJAOUDE, M. Chronic treatment of male rats with daidzein and 17 β oestradiol induces the contribution of EDHF to endothelium-dependent relaxation. **British journal of pharmacology**, London, v. 141, n. 2, p. 322–328, Jan 2004.
- WUTTKE, W.; SEIDLOVA-WUTTKE, D.; GORKOW, C. The *Cimicifuga* preparation BNO 1055 vs. conjugated estrogens in a doubleblind placebo-controlled study: effects on menopause symptoms and bone markers. **Maturitas**, Limerick, v. 44, n. Suppl 1, p. S67-77, Mar 2003.
- XI, S. *et al.* Effect of isopropanolic *Cimicifuga racemosa* extract on uterine fibroids in comparison with tibolone among patients of a recent randomized, double blind,

- parallelcontrolled study in Chinese women with menopausal symptoms. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, London, v. 2014, n. 717686, p. 1-7, Mar 2014.
- YONG, P. Y. *et al.* Prospective analysis of the relationships between the ovarian follicle cohort and basal FSH concentration, the inhibin response to exogenous FSH and ovarian follicle number at different stages of the normal menstrual cycle and after pituitary down-regulat. **Human reproduction**, Oxford, v. 18, n. 1, p. 35-44, Jan. 2003.
- YUE, G. G. *et al.* New potential beneficial effects of actein, a triterpene glycoside isolated from *Cimicifuga* species, in breast cancer treatment. **Scientific reports**, Sendai, v. 12, n. 6:35263, p. 1-11, Oct 2016.
- ZIERAU, O. *et al.* Antiestrogenic activities of *Cimicifuga racemosa* extracts. **Journal of steroid biochemistry**, Oxford, v. 80, n. 1, p. 125-130, Jan 2002.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido

Eu, _____, portadora do documento de identidade _____, declaro estar de acordo em participar do estudo “AVALIAÇÃO DA DILATAÇÃO FLUXOMEDIADA DA ARTÉRIA BRAQUIAL DIREITA EM MULHERES NO CLIMATÉRIO, COM DIFERENTES TIPOS DE TERAPIA DE REPOSIÇÃO HORMONAL”, tendo entendido que o mesmo tem o objetivo de avaliar as artérias do meu braço e que os conhecimentos obtidos poderão ajudar diversas pessoas, mesmo que não haja benefício direto para mim neste momento. Entendo que os exames que realizarei não me causarão riscos nem interferirão em meu bem-estar. Entendo que poderei fazer uso de medicamentos habituais para mulheres na menopausa ou placebo pelo período de 30 dias e que nenhum dos compostos me causará efeitos adversos, não me expondo a riscos. Após esse período poderei manter o uso da medicação se me for conveniente. Entendo que não serei obrigada a manter o uso dos medicamentos se não desejar, independentemente de qual seja o motivo. Entendo também que tenho o direito de desistir de participar do estudo a qualquer momento e por qualquer motivo, sem qualquer prejuízo para o meu tratamento ou para minha saúde, não existindo punição por deixar de participar do estudo. Compreendo que existem outras formas de uso da terapia de reposição hormonal e que esta não difere das demais. Entendo que estarei sob os cuidados do responsável pelo estudo durante todo esse período, podendo recorrer ao mesmo sempre que julgar necessário. Todos os detalhes sobre o exame a ser realizado me foram explicados e serão repetidos quando da realização do mesmo. Por fim, entendo que a minha participação no estudo é voluntária, não havendo algum tipo de remuneração ou indenização final. Permito ao pesquisador a utilização dos dados obtidos nos exames em mim realizados, para serem incluídos na pesquisa, sem que isso implique a minha identificação.

ASSINATURA:

MÉDICO COORDENADOR: Selmo Geber (TEL – xxxxxxxx)

CRM xxxxxx

DATA: ____/____/____ BELO HORIZONTE - MG

APÊNDICE B – Ficha de anamnese, exame físico e exames complementares

REG: _____ MAT: _____ DATA: ___/___/___ NOME: _____ DN: ___/___/___ CI: _____ RAÇA: _____ IDADE: _____ PROFISSÃO: _____ ESTADO CIVIL: SOLTEIRA <input type="checkbox"/> CASADA <input type="checkbox"/> ESTÁVEL <input type="checkbox"/> OUTRO <input type="checkbox"/>
CICLO: OLIGOMENORREIA <input type="checkbox"/> AMENORREIA <input type="checkbox"/> POLIMENORREIA <input type="checkbox"/> REGULAR <input type="checkbox"/> DUM: ___/___/___ MENARCA: _____ HGO G ___ P ___ A ___ DATA ÚLTIMO PARTO: ___/___/___
HP: <input type="checkbox"/> CIRURGIA PRÉVIA: _____ <input type="checkbox"/> USO DE MEDICAMENTOS: _____ <input type="checkbox"/> VARIZES DE MMII <input type="checkbox"/> DIABETES <input type="checkbox"/> HAS <input type="checkbox"/> AVC <input type="checkbox"/> CA de MAMA <input type="checkbox"/> DOENÇA CORONARIANA
QUEIXAS ESPECÍFICAS: SIM <input type="checkbox"/> NÃO <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> FOGACHOS <input type="checkbox"/> RESSECAMENTO VAGINAL <input type="checkbox"/> DOR ÓSSEA <input type="checkbox"/> ACUIDADE VISUAL
EXAME FÍSICO: PA: ___ X ___ mmHg PESO: ___ kg FREQ. CARD. : ___ bpm ALTURA: _____ m
EXAME FÍSICO GERAL: NORMAL <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO <input type="checkbox"/>

EXAME GINECOLÓGICO: NORMAL <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO
DOSAGENS LABORATORIAIS: (DATA ___/___/___) HEMOGRAMA Hb _____ Ht _____ Leuc _____ URINÁLISE: <input type="checkbox"/> NORMAL <input type="checkbox"/> ALTERADO _____ T4 livre _____ TSH _____ GLICEMIA JEJUM _____ COL. TOTAL _____ HDL _____ VLDL _____ LDL _____ TRIGLICÉRIDES _____ FSH _____ LH _____ E2 _____ TGO _____ TGP _____ GGT _____ FA _____
ULTRASSONOGRAFIA ENDOVAGINAL COM DOPLERFLUXOMETRIA (DATA: ___/___/___) ENDOMÉTRIO _____ mm OVÁRIOS: DIR _____ CC ESQ _____ CC
CITOLOGIA ONCÓTICA (DATA: ___/___/___) NORMAL: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO
DILATAÇÃO FLUXOMEDIADA DA ARTÉRIA BRAQUIAL DIREITA. REPOUSO: 1 _____ 2 _____ 3 _____ MÉDIA _____ PÓS-ISQUEMIA 1 _____ 2 _____ 3 _____ MÉDIA _____
RETORNO – DATA: ___/___/___
USO CORRETO MEDICAÇÃO: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO
EXAME FÍSICO: PA: _____ X _____ mmHg PESO: _____ kg FREQ. CARD. : _____ bpm
DILATAÇÃO FLUXO MEDIADA DA ARTÉRIA BRAQUIAL DIREITA. REPOUSO: 1 _____ 2 _____ 3 _____ MÉDIA _____ PÓS-ISQUEMIA 1 _____ 2 _____ 3 _____ MÉDIA _____

ANEXOS

ANEXO A – Carta de Aprovação do COEP – UFMG

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP**

Parecer nº. ETIC 0417.0.203.000-09

**Interessado(a): Prof. Selmo Geber
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia
Faculdade de Medicina - UFMG**

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 06 de abril de 2010, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação da dilatação fluxo-mediada da artéria braquial em mulheres no climatério, com diferentes tipos de terapia de reposição hormonal**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

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

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Maria Teresa Marques Amaral', is written over a faint circular stamp.

**Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG**

ANEXO B – Bula do medicamento utilizado no estudo



CLIFEMIN®
Actaea racemosa L., Ranunculaceae.

herbarium

MEDICAMENTO FITOTERÁPICO

PARTE UTILIZADA

Rizomas.

NOMENCLATURA POPULAR

Cimicífuga.

APRESENTAÇÕES

Comprimidos revestidos - Extrato seco dos rizomas de *Actaea racemosa*
160 mg - Embalagem com 15 ou 30 comprimidos cada.

VIA ORAL

USO ADULTO

COMPOSIÇÃO

Cada comprimido contém:

extrato seco de *Actaea racemosa* L. padronizado em 2,5%
de glicosídeos triterpênicos expressos em 23-epi-26-deso-
xiacteína..... 160 mg*;
excipientes q.s.p..... 1 comprimido.
(celulose microcristalina, talco, hipromelose e polietilenoglicol, dióxido
de titânio, croscarmelose sódica, estearato de magnésio, dióxido de silício,
etilcelulose, D&C amarelo quinoleína, macrogol e FD&C azul brilhante)
*equivalente a 4 mg de glicosídeos triterpênicos expressos em 23-epi-26-
-desoxiacteína por comprimido.

INFORMAÇÕES AO PACIENTE

PARA QUE ESTE MEDICAMENTO É INDICADO?

Clifemin® é indicado para aliviar os sintomas da pré e pós-menopausa, como rubor, ondas de calor, suor excessivo, palpitações e alterações depressivas de humor e do sono.

COMO ESTE MEDICAMENTO FUNCIONA?

Clifemin® atua amenizando os sintomas da pré e pós-menopausa. O efeito terapêutico geralmente é mais nítido após duas semanas de uso do medicamento, apresentando o efeito máximo dentro de oito semanas.

QUANDO NÃO DEVO USAR ESTE MEDICAMENTO?

- Pacientes com histórico de hipersensibilidade e alergia a qualquer um dos componentes da fórmula não devem fazer uso do produto.

Este medicamento é contraindicado durante a gravidez por promover o fluxo menstrual e ter efeito estimulante uterino.

O QUE DEVO SABER ANTES DE USAR ESTE MEDICAMENTO?

Precauções e advertências

- Há um relato de hepatite necrosante ocorrido após a tomada de um produto à base de cimicífuga por uma semana, portanto este medicamento deve ser administrado com cuidado a pacientes com insuficiência hepática grave.
- Pessoas alérgicas a salicilatos devem utilizar este medicamento com cuidado, pois produtos à base de cimicífuga contêm pequenas quantidades de ácido salicílico.
- Em caso de hipersensibilidade ao produto, recomenda-se descontinuar o uso e consultar o médico.
- Em casos de distúrbio na intensidade e frequência da menstruação e persistência ou surgimento de novos sintomas, procurar orientação médica, uma vez que podem estar envolvidos distúrbios que precisam ser diagnosticados.
- Este medicamento deve ser evitado por menores de 12 anos de idade e durante a lactação devido à falta de estudos disponíveis.

Interações medicamentosas

- Este medicamento pode potencializar o efeito de medicamentos anti-hipertensivos.
- Uma vez que extratos de cimicífuga (*Actaea racemosa*) podem intensificar alguns efeitos estrogênicos, este medicamento só deve ser usado junto com suplementos hormonais (estrogênio) sob estrita supervisão médica.

Informe ao seu médico ou cirurgião-dentista se você está fazendo uso de algum outro medicamento.

Não use medicamento sem o conhecimento do seu médico. Pode ser perigoso para a sua saúde.

Informe ao profissional de saúde todas as plantas medicinais, fitoterápicos e outros medicamentos que estiver tomando. Interações podem ocorrer entre medicamentos e plantas medicinais e mesmo entre duas plantas medicinais administradas ao mesmo tempo.

ONDE, COMO E POR QUANTO TEMPO POSSO GUARDAR ESTE MEDICAMENTO?

Cuidados de conservação

Clifemin® deve ser conservado em temperatura ambiente (entre 15 e 30°C) em sua embalagem original.

Proteger da luz e da umidade.

Prazo de validade

24 meses após a data de fabricação impressa no cartucho.

Número de lote e datas de fabricação e validade: vide embalagem.

Não use medicamento com o prazo de validade vencido. Guarde-o em sua embalagem original.



**Características físicas**

Comprimidos de cor verde clara.

Características organolépticas

Cheiro (odor) característico e praticamente não apresenta sabor.

Antes de usar, observe o aspecto do medicamento. Caso ele esteja no prazo de validade e você observe alguma mudança no aspecto, consulte o farmacêutico para saber se poderá utilizá-lo.

Todo medicamento deve ser mantido fora do alcance das crianças.

COMO DEVO USAR ESTE MEDICAMENTO?

USO ORAL / USO INTERNO

Modo de usar

Os comprimidos devem ser ingeridos inteiros e com uma quantidade suficiente de água para que possam ser deglutidos.

Posologia

Ingerir um comprimido, via oral, uma vez ao dia.

A dose diária não deve ultrapassar a um comprimido ao dia.

Assim como para tratamentos de reposição hormonal, a paciente deve procurar seu médico a cada seis meses antes de continuar o tratamento.

Utilizar apenas a via oral. O uso deste medicamento por outra via, que não a oral, pode causar a perda do efeito esperado ou mesmo promover danos ao seu usuário.

Siga a orientação de seu médico, respeitando sempre os horários, as doses e a duração do tratamento. Não interrompa o tratamento sem o conhecimento do seu médico.

Este medicamento não deve ser partido, aberto ou mastigado.

O QUE DEVO FAZER QUANDO EU ME ESQUECER DE USAR ESTE MEDICAMENTO?

Caso haja esquecimento da ingestão de uma dose deste medicamento, retomar a posologia prescrita sem a necessidade de suplementação.

Em caso de dúvidas, procure orientação do farmacêutico ou de seu médico, ou cirurgião-dentista.

QUAIS OS MALES QUE ESTE MEDICAMENTO PODE ME CAUSAR?**Reações adversas**

Este medicamento pode causar distúrbios gastrointestinais, dor de cabeça, peso nas pernas e tontura.

O paciente que utiliza extrato de cimicífuga deve estar atento ao desenvolvimento de sinais e sintomas sugestivos de deficiência do fígado, tais como cansaço, perda de apetite, amarelamento da pele e dos olhos ou dor severa na parte superior do estômago com náusea e vômito ou urina escurecida. Neste

caso, deve-se procurar imediatamente assistência médica e, até que isso não aconteça, suspender o uso do produto.

Assim como para tratamentos de reposição hormonal, deve-se manter avaliação médica a cada seis meses.

Informe ao seu médico, cirurgião-dentista ou farmacêutico o aparecimento de reações indesejáveis pelo uso do medicamento. Informe também à empresa através do seu serviço de atendimento.

O QUE FAZER SE ALGUÉM USAR UMA QUANTIDADE MAIOR DO QUE A INDICADA DESTE MEDICAMENTO?

Não há relatos de intoxicações por superdosagem na literatura. Pode causar vertigens, dor de cabeça, náusea, vômito, desajuste na visão e hipotensão.

Em caso de superdosagem, suspender o uso e procurar orientação médica de imediato.

Em caso de uso de grande quantidade deste medicamento, procure rapidamente socorro médico e leve a embalagem ou bula do medicamento, se possível. Ligue para 0800 722 6001, se você precisar de mais orientações.

Venda sob prescrição médica.

MS: 1.1860.0007

Farmacêutica resp.:
Gislaine B. Gutierrez
CRF-PR nº 12423

Fabricado e Distribuído por:
HERBARIUM LABORATÓRIO BOTÂNICO S.A.
Av. Santos Dumont, 1100 • CEP 83403-500
Colombo - PR • CNPJ 78.950.011/0001-20

Indústria Brasileira.

Esta bula foi atualizada conforme Bula Padrão aprovada pela Anvisa em 24/09/2014.

