

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina

RODRIGO HURTADO

**EFEITO DA TERAPIA ESTROGÊNICA DE CURTA DURAÇÃO
SOBRE A FUNÇÃO ENDOTELIAL DE MULHERES
CLIMATÉRICAS: Ensaio Clínico Duplo-Cego,
Randomizado e Controlado com Placebo**

Belo Horizonte

2015

RODRIGO HURTADO

**EFEITO DA TERAPIA ESTROGÊNICA DE CURTA DURAÇÃO
SOBRE A FUNÇÃO ENDOTELIAL DE MULHERES CLIMATÉRICAS:
Ensaio Clínico Duplo-Cego,
Randomizado e Controlado com Placebo**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde da Mulher da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Área de Concentração: Patologia Ginecológica e Reprodução.

Orientador: Prof. Dr. Selmo Geber.

**Belo Horizonte
Faculdade de Medicina - UFMG
2015**

Aos meus pais,
pela incansável postura de cuidado e amparo,
também pelas oportunidades pessoais e acadêmicas,
que me proporcionaram chegar até aqui.

À Fernanda,
pelo amor, companheirismo e confiança
durante os últimos 20 anos,
essenciais ao meu crescimento humano.

Aos meus queridos filhos, Rodrigo e Roberto,
por valorizarem tanto a minha presença
e perdoarem tanto a minha ausência.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Selmo Geber, por ter me proporcionado exemplo pessoal e profissional desde o primeiro contato, pela convivência amigável, pelos conselhos e pela orientação de mais este estudo.

Ao Dr. Marcos Aurélio Coelho Sampaio, fonte inigualável de crescimento acadêmico e pessoal, pela amizade verdadeira em todos os momentos, pela edificação e por todo o reconhecimento profissional demonstrado durante todos estes anos.

À Dr^a. Myrian de Fátima Siqueira Celani, por ter despertado em mim, ainda na graduação, o amor pela Ginecologia e Obstetrícia, pelo cuidado e pela colaboração na realização dos exames de Dilatação Fluxo Mediada.

Ao Dr. Augusto Henriques Fulgêncio Brandão, pela disponibilidade incondicional em tantas etapas decisivas para este estudo e pela colaboração na realização dos testes estatísticos.

Aos colegas Dr. Ricardo Leão Parreiras, Dr. Matheus Teixeira Roque, Dr. Jorge Abel Nepomuceno e Dr^a. Ana Paula Caldeira Brant, pela consideração, pelo convívio empreendedor e pela solidariedade profissional.

Aos amigos e colegas que dividiram comigo os seis anos de graduação e os 14 anos de pós-graduação, contribuindo para minha formação pessoal e profissional com exemplos, palavras, ajuda, perdão e torcida. Em especial, aos Drs. Marcelo Fernandes Denaro, Roberto Zambelli de Almeida Pinto, Guilherme Zanini Rocha, Teon Augusto Noronha de Oliveira e Flavio Amaro Oliveira Bitar Silva.

Aos amigos do Laboratório de Fertilização da Clínica Origen: Renata Bossi, Danúbia Braga, Maristela Capanema, Patrícia França, Felipe Davite e Marcelo Cabral, pelo trabalho cuidadoso, coleguismo e busca contínua pela excelência.

Aos funcionários da Clínica Origen e do Centro de Medicina Reprodutiva Santafértil, pela tolerância, pelo esmero e pela cooperação que permitem minha atuação profissional.

Aos funcionários do Hospital das Clínicas da UFMG, em todos os seus setores, pela colaboração. Em especial, aos residentes de Ginecologia e Obstetrícia do Ambulatório de Climatério e aos funcionários do Ambulatório Jenny Faria.

A todos os meus alunos da graduação em Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), da Faculdade de Saúde e Ecologia Humana (FASEH) e do Centro Universitário de Belo Horizonte (UniBH), a quem tive oportunidade de contribuir com a formação médica, mesmo que minimamente. Em especial, à Bruna Coimbra.

A Sra. Magda Roquette pela correção ortográfica e formatação segundo as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas de 17.04.2011.

Este trabalho não recebeu fomento financeiro para sua realização excetuando-se a bolsa de Doutorado oferecida ao aluno pelo Ministério da Educação (MEC) através da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Ao Prof. João Lúcio dos Santos Jr. e ao Prof. Henrique Vitor Leite, pelas oportunidades e pela confiança.

A Deus, por ter me presenteado com a saúde, determinação e atenção necessários para enxergar e cumprir com meu desígnio nesta existência.

Ao Conclave Médico Desportivo, em todas as suas gerações, pelo orgulho e pela oportunidade de fazer parte de uma página da história da maior Faculdade de Medicina do Brasil.

*“O homem sensato se adapta ao mundo.
O insensato insiste em tentar adaptar o mundo a ele.
Todo o progresso cabe, portanto, ao homem insensato”.*
George Bernard Shaw (1856-1950).

“A Medicina é a ciência das verdades que não se comprovam com o tempo”.
François Marie Arouet - “Voltaire” (1694-1777).

RESUMO

INTRODUÇÃO: com o aumento da qualidade e da expectativa de vida, significativa proporção da população feminina viverá pelo menos um terço de suas vidas no período de pós-menopausa. Esse período é caracterizado pelas mudanças fisiológicas determinadas pela privação estrogênica, entre elas a deterioração do perfil lipídico e a piora da função endotelial, resultando em elevação do risco de episódios cardiovasculares agudos. O uso de terapia hormonal estrogênica já se demonstrou eficaz na melhora laboratorial e clínica destes parâmetros em estudos animais e humanos, porém não há consenso sobre a dose, o tipo de terapia, a via de administração e o período de uso adequados para garantir diminuição de risco cardiovascular e segurança do tratamento. **OBJETIVO:** detectar se a terapia hormonal estrogênica de curta duração é capaz de promover vasodilatação endotélio dependente em pacientes climatéricas saudáveis com base na dilatação fluxomediada da artéria braquial (FMD). **METODOLOGIA:** ensaio clínico randomizado, duplo-cego e controlado com placebo sobre o uso de terapia estrogênica de curta duração (28 dias) sobre a função endotelial de mulheres climatéricas, avaliada a partir da FMD. Foram aleatorizadas 64 pacientes em dois grupos para uso de estrogênios equinos conjugados (EEC) 0,625 mg e placebo, após avaliação clínica e inclusão ou exclusão segundo critérios relativos a doenças endoteliais. A variação da FMD foi registrada antes e após o uso da terapia hormonal e comparada aos valores obtidos do grupo que utilizou placebo. **RESULTADOS:** o uso de EEC por apenas 28 dias foi suficiente para promover vasodilatação endotélio dependente nas pacientes tratadas (FMD = 1,1%) quando comparada àquela observada nas pacientes que usaram placebo (FMD = -8,2%). Esses valores observados apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p=0,025$) quando submetidos ao teste de Mann-Whitney. Os grupos foram também avaliados quanto à distribuição das variáveis que interferem na função endotelial, como idade, tempo de menopausa, índice de massa corporal (IMC), doenças vasculares crônicas e hábitos como tabagismo. Tal avaliação demonstrou grupos homogêneos e comparáveis. **CONCLUSÃO:** o uso de EEC na dose de 0,625 mg ao dia, por apenas 28 dias, é capaz de causar vasodilatação endotélio dependente em pacientes climatéricas avaliadas por meio da FMD.

Palavras-chave: Terapia hormonal estrogênica. Menopausa. Dilatação fluxomediada da artéria braquial. Função endotelial.

ABSTRACT

BACKGROUND: The population's life expectancy has increased considerably over the last decades resulting in a significant share of women which will experience at least a third of their lifespan after menopause. This particular period of life is characterized by metabolic changes secondary to estrogen deprivation, such as a poor lipid profile and loss of vascular endothelial dilation with a resulting increase of cardiovascular risk. Estrogen therapy was proven efficient in reversing these estrogen deprivation features in both laboratory and animal studies but there is still no consensus to which hormone therapy, dosage, administration path and time of onset would be optimal for reducing cardiovascular risk and also safe for clinical use. **OBJECTIVE:** To detect through Flow Mediated Dilation (FMD) whether or not short term estrogen therapy is able to promote endothelial dependent vasodilation in menopausal women. **METHODS:** In this double-blinded, placebo controlled RCT, 64 menopausal women were assigned into two groups: short term treatment using 0,625mg of Conjugated Estrogens in the study group and placebo in the control group. FMD was measured before and after 28 days of medication and the results were compared to determine any significant difference between the groups. **RESULTS:** FMD results showed endothelial dependent dilation in the estrogen therapy group (FMD = 1.1%) as opposed to the placebo group (FMD = -8.2%). A statistically significant difference was demonstrated by Mann-Whitney's statistical test ($p=0,025$). The two groups were also evaluated for homogeneity in respect to variables that could interfere with endothelial function such as age, Body Mass Index (BMI), time since menopause, chronic vascular conditions, and personal habits (smoking, exercise). There was no statistical difference between the groups for any of these variables. **CONCLUSION:** The use of 0,625mg of conjugated estrogens for only 28 days is effective in promoting endothelial dependent vascular dilation, assessed by FMD in menopausal women.

Key words: Estrogen hormone therapy. Menopause. Flow Mediated Dilation. Endothelial function.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Microgramas
AF	<i>Activation Function</i>
AFC	Contagem de folículos antrais
c-GMP	Guanidina Monofosfato Cíclica
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DHEA	Di-hidroepiandrosterona
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio-padrão
E2	Estradiol
EDRF	Fator de relaxamento derivado do endotélio
EEC	Estrogênios Eqüinos Conjugados
EPAT	<i>Estrogen in the Prevention of Atherosclerosis Trial</i>
ER	Receptor de estrogênio
FC	Frequência cardíaca
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
FMD	Dilatação mediada por fluxo
FMD-c	Dilatação mediada por fluxo calculada
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
G	Gramas
GMP	Guanidina monofosfato cíclica
HC	Hospital das Clínicas
HDL-C	Colesterol lipoproteína de alta densidade
HERS	<i>Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study</i>
IGF	<i>Insulin-like Growth Factor</i>
IMC	Índice de Massa Corporal
IP	Índice de Pulsatilidade
Kg	Quilogramas

L	Litros
LDL-C	Colesterol lipoproteína de baixa densidade
LH	Hormônio luteinizante
m ²	Metro quadrado
mg	Miligramas
mHz	Megahertz
mL	Mililitros
mm	Milímetro
mmHg	Milímetros de mercúrio
ng	Nanogramas
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NO ₂	Nitrito
NO ₃	Nitrato
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintetase
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Pressão arterial
PAT	Tonometria Arterial Periférica
Pg	Picogramas
PG1	Prostaciclina
PGE2	Prostaglandina E2
RCTs	Ensaio clínico randomizado controlado
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
T4	Tiroxina tetraiodotironina
TH	Terapia hormonal
TRH	Terapia de reposição hormonal
TSH	Hormônio estimulante da tireoide
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UI	Unidades Internacionais
V _{max}	Velocidade máxima de fluxo sistólico
WHI	<i>Women's Health Initiative</i>

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Dados epidemiológicos das pacientes submetidas a dilatação mediada por fluxo (FMD) em terapia com estrogênio conjugados ou placebo.....	57
TABELA 2 – Valores obtidos da dilatação mediada por fluxo (FMD) comparação entre as pacientes submetidas a terapia com estrogênios conjugados (EEC) e placebo pelo teste de Mann-Whitney.....	58
TABELA 3 – Análise estatística após categorização dos resultados de dilatação mediada por fluxo (FMD) em pacientes submetidas a terapia com estrogênios conjugados (EEC) e placebo.....	59

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figuras

FIGURA 1 - Síntese dos hormônios esteroides a partir da molécula de colesterol.....	24
FIGURA 2 - Esquema ilustrativo das ações hormonais nas células foliculares ovarianas.....	25
FIGURA 3 - Esquema ilustrativo dos mecanismos de ativação endotelial vascular modulados pelos estrogênios.....	29
FIGURA 4 - Diagrama de medida da FMD.....	54

Quadro

QUADRO 1 – Ensaio clínico sobre ação estrogênica <i>versus</i> risco cardiovascular.....	46
--	----

SUMÁRIO¹

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Climatério e menopausa.....	15
1.1.1 Epidemiologia.....	16
1.1.2 Quadro clínico.....	17
1.1.2.1 Manifestações neurogênicas.....	17
1.1.2.2 Manifestações psicogênicas.....	18
1.1.2.3 Manifestações metabólicas.....	18
1.1.2.4 Manifestações epidérmicas.....	20
1.1.2.5 Manifestações mamárias.....	20
1.1.2.6 Manifestações genitais.....	20
1.1.2.7 Manifestações cerebrais.....	21
1.2 Terapia de reposição hormonal.....	22
1.3 Estrogênios.....	23
1.4 Função endotelial.....	27
1.5 Avaliação da função endotelial.....	29
1.5.1 Testes de liberação de Óxido Nítrico.....	30
1.5.2 Marcadores séricos de NO.....	30
1.5.3 Dosagem sérica de dimetilarginina assimétrica.....	30
1.5.4 Detecção sérica de células endoteliais.....	31
1.5.5 Constricção mediada por baixo fluxo (L-FMC).....	31
1.5.6 Tonometria arterial periférica (PAT).....	31
1.5.7 Dilatação fluxomediada da artéria braquial (FMD).....	32
1.6 Ação estrogênica sobre a função endotelial.....	32
2 OBJETIVO.....	49
3 METODOLOGIA.....	50
3.1 Desenho do estudo.....	50

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.

3.2 Pacientes.....	50
3.2.1 Critérios de inclusão.....	51
3.2.2 Critérios de exclusão.....	51
3.3 Métodos.....	51
3.3.1 Terapia hormonal.....	51
3.3.2 Dilatação fluxomediada da artéria braquial.....	53
3.4 Análise estatística.....	54
4 RESULTADOS.....	56
5 DISCUSSÃO.....	59
6 CONCLUSÃO.....	64
REFERÊNCIAS.....	65
APÊNDICES E ANEXO.....	77

1 INTRODUÇÃO

1.1 Climatério e menopausa

O climatério é a fase de transição da evolução biológica da mulher em que ocorre a perda da sua capacidade reprodutiva. Os fenômenos mais marcantes desse período são as manifestações vasomotoras representadas pelos fogachos, ondas de calor e sudorese, e pela irregularidade menstrual (VIANA; MARTINS; GEBER, 2012). Ambos são consequentes à queda da produção de estradiol (E2) pelos ovários, determinada pela depleção de folículos.

Viana refere que o climatério compreende o período que vai dos 35 aos 65 anos de idade, podendo ser dividido em fase inicial, intermediária e tardia. É um espaço de tempo muito amplo e, por isso, variável nas diversas pacientes, variando na maioria dos estudos de 45 a 55 anos, com média de 49 anos. A Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO), assim com a Organização Mundial de Saúde (OMS), recomendam aguardar um ano de amenorreia antes de firmar o diagnóstico de menopausa, em virtude das irregularidades menstruais comuns nessa fase (FONSECA; HALBE, 1994).

Já foi demonstrado que a depleção folicular ovariana é contínua e começa a acelerar de forma significativa quando a contagem total atinge em torno de 25.000 folículos, o que ocorre aproximadamente aos 37-38 anos de vida da mulher (FADDY *et al.*, 1992). Essa aceleração da curva de perda folicular reflete-se laboratorialmente como aumento dos níveis séricos do hormônio folículo estimulante (FSH) e diminuição das inibinas, especialmente da inibina B, como tentativa de correção da fisiologia da foliculogênese ovariana e consequente elevação discreta dos níveis de E2, que por sua vez determinam ciclos mais longos e, eventualmente, anovulatórios.

A diminuição da inibina circulante demonstra tanto diminuição do número de folículos restantes nos ovários como diminuição da sua competência funcional (SEIFER *et al.*, 1996). Klein *et al.* (1996) sugerem que a diminuição do número de folículos residuais seja o fator mais importante, uma vez que ficou demonstrado

neste estudo que a concentração de inibina no líquido folicular de mulheres jovens e climatéricas é similar.

À medida que o nível de FSH continua a se elevar, em um determinado ponto do climatério os ciclos menstruais começam a se encurtar, uma vez que o desenvolvimento folicular passa a ocorrer de forma acelerada por estímulo do FSH elevado (>20 UI/L). O recrutamento e o crescimento inicial dos folículos passam a ocorrer mais precocemente, resultando em um pico também precoce de E2 (KLEIN *et al.*, 2002; VAN ZONNEVELD *et al.*, 2003) e consequente diminuição da duração da fase folicular e aumento da frequência de ciclos anovulatórios (VOLLMAN, 1977).

Esse processo de alteração do padrão menstrual acompanhado de flutuações nos níveis séricos de gonadotrofinas e hormônios sexuais ovarianos antecede a menopausa em 7-10 anos e pode ser ilustrado pela diminuição do volume ovariano e da contagem de folículos antrais (AFC) à ultrassonografia endovaginal (BANCSI *et al.*, 2002; DUMESIC *et al.*, 2001; FRATTARELLI *et al.*, 2000; KUPESIC *et al.*, 2003; LASS *et al.*, 1997; YOUNG *et al.*, 2003). É importante salientar que durante esse período de transição pode ocorrer gestação não planejada devido à variabilidade do ciclo. O médico só deve deixar de se preocupar com essa possibilidade quando tanto o FSH quanto o hormônio luteinizante (LH) estiverem acima de 30 UI/L. (METCALF; LIVESAY, 1985).

1.1.1 Epidemiologia

Com a elevação da expectativa de vida da população, o período de pós-menopausa ganha importância de modo crescente, já que boa parte das mulheres vai viver pelo menos um terço de suas vidas nessa situação. Hoje, um indivíduo que chega aos 65 anos de idade pode esperar alcançar 81,4 anos se for do sexo masculino e 84,4 anos se for uma mulher (OLSHANSKY; CARNES; CASSEL, 1990). Aproximadamente 95% da população ultrapassará a idade de 65 anos e 66% chegarão a 85 anos (OLSHANSKY; CARNES; CASSEL, 1993). Apesar da definição de terceira idade usar o marco de 65 anos de idade, os problemas de saúde que poderão comprometer a qualidade de vida de um indivíduo não começam a se manifestar na maioria das pessoas antes dos 75 anos (US

CENSUS BUREAU, 2003). É esperado que a população de idosos dobre mundialmente até o ano de 2030, quando então o envelhecimento da sociedade passará a ser o principal causador de problemas de saúde no lugar do atual crescimento numérico das populações (McDEVITT, 1999).

1.1.2 Quadro clínico

No climatério, e principalmente na pós-menopausa, ocorrem modificações fisiológicas em todo o organismo secundárias à deficiência de E2, abrangendo o eixo neuroendócrino reprodutor, sistema tegumentar (pele e anexos), aparelhos cardiovascular e geniturinário, ossos e estado geral (visão, dentes, mamas e alterações metabólicas, com mais tendência a fadiga e obesidade) (FONSECA; HALBE, 1994). Modificações psíquicas e da sexualidade também podem estar presentes nessa faixa etária. Assim, esse período de vida da mulher necessita de especial atenção para que se possam diminuir os efeitos adversos inerentes a essa fase e melhorar a qualidade de vida dessa população de mulheres (VIANA; MARTINS; GEBER, 2012).

O início do climatério ocorre, em média, aos 47,5 anos de idade e dura por volta de quatro anos, variando de dois a oito anos. Apenas 10% das mulheres não apresentam período de transição clínica, evoluindo abruptamente para a menopausa (McKINLAY; BIGANO; McKINLAY, 1985; TRELOAR, 1981; TRELOAR *et al.*, 1967).

O marco principal do climatério é a menopausa, a última menstruação, refletindo o esgotamento folicular, na verdade, uma contagem total de folículos ovarianos abaixo de 1.000, independentemente da idade (SHERMAN; WEST; KORENMAN, 1976). O termo menopausa provém do grego *men* (mês) e *pausis* (interrupção ou parada).

As principais manifestações clínicas do climatério são:

1.1.2.1 Manifestações neurogênicas

São os sintomas mais comuns, ocorrendo em aproximadamente 75% das mulheres climatéricas, como fogachos, episódios súbitos e transitórios de calor e

sudorese, que em via de regra duram alguns minutos. Tais manifestações podem estar presentes por algumas semanas ou continuar por anos, e podem ainda acompanhar-se de palpitações ou episódios de taquicardia paroxística (FONSECA; HALBE, 1994).

1.1.2.2 Manifestações psicogênicas

O desejo e a aptidão sexual se mantêm durante o climatério, assim como a emoção e o prazer dos anos anteriores, às vezes até com mais intensidade e satisfação. Se a mulher permanece interessante e interessada, nenhuma repercussão de monta ocorre. Nessa etapa da vida, principalmente, é muito importante o autoconceito representado pela segurança, dignidade e prestígio. Porém, muitas vezes, a mulher se depara com sentimentos de frustração de sonhos perdidos, medo da velhice e sensação de inutilidade (FONSECA; HALBE, 1994).

1.1.2.3 Manifestações metabólicas

Doença coronariana: atualmente sabe-se que, embora a doença coronariana acometa ambos os sexos, existe uma clara diferença nessa incidência, sendo os estrogênios os responsáveis pela proteção da mulher antes da menopausa (FARHAT *et al.*, 1996). As mulheres têm os mesmos fatores de risco para doenças coronarianas que os homens, e atualmente estão bem estabelecidos: hiperlipidemia, colesterol lipoproteína de alta densidade (HDL-C) diminuído, história familiar para coronariopatias, diabetes *mellitus* e tabagismo (BARRET-CONNOR & BUSH, 1990; CLARCKSON, 2007) .

Citam-se os seguintes mecanismos para explicar a complexa proteção exercida pelos estrogênios: eles têm impacto favorável sobre o perfil lipídico, reduzindo o colesterol lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) e aumentando o HDL-C, exercem efeito protetor diretamente na parede arterial, independentemente de seus efeitos sobre as lipoproteínas circulantes (USHIODA, 2006). Sob sua ação, ocorre aumento da vasodilatação e dos fatores de

antiagregação plaquetária, principalmente Óxido Nítrico e prostaciclina (mecanismos endotélio-dependentes).

Observa-se, ainda, aumento do fluxo sanguíneo e diminuição da resistência periférica logo em seguida à sua administração. Sabe-se também que os estrogênios causam relaxamento das artérias coronárias sem endotélio, mesmo diante de inibidores da sintetase de Óxido Nítrico e prostaglandinas, além de apresentarem ação inotrópica positiva direta sobre o coração, aumentando o enchimento diastólico ventricular esquerdo e a fração de ejeção. Além do mais, promovem melhora no metabolismo periférico da glicose, diminuindo, assim, os níveis circulantes de insulina.

Osteoporose: entre as doenças crônicas que afligem a mulher climatérica, a osteoporose aparece como uma das doenças de maior incidência, podendo ser conceituada como uma doença esquelética sistêmica caracterizada pela perda de massa óssea e deteriorização da microarquitetura do tecido ósseo, determinando fragilidade e, conseqüentemente, aumento do risco de fraturas (VIANA; MARTINS; GEBER, 2012).

A osteoporose resultante da deficiência estrogênica, no período pós-menopausa, é responsável por 95% de todos os casos. Como há receptores para estrogênio nos ossos, ele pode atuar diretamente no tecido ósseo ou pode diminuir a sensibilidade óssea ao paratormônio, sem alterar níveis circulantes do hormônio da paratireóide. O estrogênio pode aumentar os níveis de calcitonina e a absorção intestinal do cálcio (FERNANDES, 1994).

A redução da densidade mineral óssea a níveis críticos predispõe a uma elevada incidência de fraturas. As fraturas por compressão e esmagamento das vértebras dorsais provocam diminuição da estatura de 6,4 cm ou mais, podendo chegar a um extremo, onde as últimas costelas se encontram com as cristas ilíacas. Esse fenômeno determina achatamento do tórax, com diminuição da capacidade respiratória, protrusão do abdômen por compressão e, como consequência, pressão sobre a bexiga e o diafragma pélvico. A cifose dorsal é progressiva e determina a formação da “corcunda de viúva”. As fraturas do terço distal do rádio (fratura de Colles) nas mulheres aumentam em frequência até a idade de 65 anos e, a seguir, estabilizam-se. As fraturas da bacia e do colo de fêmur (ossos com predominância de tecido ósseo cortical) surgem principalmente após os 65 anos. São mais graves e apresentam 20% de mortalidade no primeiro

ano e a sua ocorrência é seguida de complicações circulatórias, respiratórias e tromboembólicas. Aproximadamente metade das mulheres que sofrem uma dessas fraturas não consegue voltar às suas atividades normais devido às sequelas adquiridas, apesar dos tratamentos fisioterápicos disponíveis. O risco de fraturas osteoporóticas depende da massa óssea obtida durante a maturidade e da taxa de perda óssea após esse estágio (VIANA; MARTINS; GEBER, 2012).

1.1.2.4 Manifestações epidérmicas

A pele se torna mais fina e friável, mais desprotegida sem o seu acolchoamento adiposo, favorecendo o enrugamento. O colágeno da pele declina 2,1% ao ano pós-menopausal. Todos os anexos cutâneos mostram diminuição da função. Os pelos diminuem em número e embranquecem (HENRY, 2000a; 2000b).

1.1.2.5 Manifestações mamárias

O aspecto das mamas torna-se atrófico, com flacidez e diminuição do volume. Há progressiva involução de todos os tecidos componentes da glândula, exceto do adiposo. Os ligamentos que fazem parte do sistema de suspensão das glândulas perdem sua elasticidade, os mamilos diminuem de tamanho e perdem suas propriedades eréteis e o tecido glandular atrofia (HENRY, 2000a; 2000b).

1.1.2.6 Manifestações genitais

A dispareunia e o prurido vulvar são muito frequentes e resultam da atrofia vulvovaginal muitas vezes complicada pelo líquen escleroatrófico, sem relação alguma com infecção por germes específicos. Os pelos pubianos tornam-se mais finos e rarefeitos; os grandes lábios apresentam menos conteúdo de tecido elástico e gordura subcutânea, favorecendo o enrugamento da pele; os pequenos lábios tornam-se proeminentes; as glândulas de Bartholin atrofiam-se e o clitóris

torna-se pouco proeminente. A vagina perde sua rugosidade. Há diminuição dos bacilos de Doederlein, que são substituídos por flora inespecífica, favorecendo a alcalinidade do meio vaginal.

O quadro de hemorragia uterina disfuncional pode ocorrer como consequência da insuficiência lútea ou anovulação (déficit progestacional que precede o estrogênico), podendo levar o endométrio à hiperplasia nas fases iniciais. Há possibilidade de o sangramento anormal estar associado a mioma, adenomiose ou câncer genital. O útero sofre atrofia, sendo que o corpo, mais do que o colo, por ser mais sensível aos estrogênios. O colo diminui de tamanho, há estreitamento do cérvix, podendo chegar à estenose. O teste de Schiller revela coloração amarelo pálido, atrofiam-se as glândulas endocervicais e há diminuição do muco, com aumento da viscosidade.

As trompas envolvem, com redução do lúmen tubário, ausência de secreção e diminuição de motilidade (FONSECA; HALBE, 1994). A atrofia uretral e a incontinência urinária de esforço são secundárias às alterações atróficas tanto da mucosa do trato urinário quanto da estática vesical, causando irritabilidade vesical, disúria, resíduo urinário e cistites frequentes. O trato urinário distal, particularmente a uretra e a entrada da bexiga, são estrogênio-dependentes. A parede uretral contém receptores estrogênicos e a bexiga também tem demonstrado sensibilidade aos esteroides sexuais (HENRY, 2000a; 2000b). O assoalho pélvico sofre as consequências da progressiva atrofia musculoponeurótica e se houver outros fatores etiológicos, tais como lesões traumáticas e obstétricas associadas, surgem o prolapso genital e a incontinência urinária de esforço.

1.1.2.7 Manifestações cerebrais

Além dos problemas de ordem psicológica nessa fase da vida, existem os de fundo orgânico, que levam à diminuição do número de neurônios, receptores e neurotransmissores. Walsh e Ginsburg (1999) ressaltam o efeito positivo do estrogênio sobre a função cognitiva de pacientes menopausadas, como, por exemplo, melhora da memória visual e verbal. Os autores acreditam ser

prematura a possibilidade de tratamento ou prevenção da doença de Alzheimer pela terapia de reposição estrogênica.

1.2 Terapia de reposição hormonal

Não há dúvidas na literatura em relação aos benefícios da terapia hormonal estrogênica para a saúde da mulher relacionados aos sintomas vasomotores, à atrofia genital e à osteoporose (SPEROFF; FRITZ, 2005). Há também muitos trabalhos sugestivos de que possa haver benefício no perfil cognitivo e proteção cardiovascular para as pacientes climatéricas e menopausadas, apesar de toda a polêmica gerada com a publicação dos ensaios clínicos no que diz respeito à falta de segurança na ocorrência de câncer de mama e à falha de se alcançar proteção cardiovascular (ROSSOUW *et al.*, 2002).

A grande tendência, baseada no conhecimento disponível até o momento, é à individualização do tratamento levando-se em conta riscos pessoais e familiares. Outra questão que resta é a definição do modo de tratamento: curto e limitado ao controle dos sintomas ou longo e dirigido para a prevenção de problemas de saúde prevalentes na senectude.

Historicamente, a terapia hormonal iniciou-se em 1897 com Fosbery, pela infusão de extratos ovarianos em mulheres menopausadas com melhora evidente dos sintomas climatéricos. Novos avanços surgiram, segundo O'Dowd e Philipp (1994), com Servinghaus e Evans (1929) administrando concentrados de líquido amniótico bovino em mulheres menopausadas. Durante a década de 30, a primeira molécula de estrogênio ativo foi isolada em porcas (ALLEN; DOISY, 1923) e a partir de então foi possível a síntese química de compostos estrogênicos ativos designados genericamente como estrina, hormônio capaz de induzir o estro animal. Os primeiros desses compostos sintéticos a ganharem popularidade foram o estilbestrol e o etinilestradiol.

No ano de 1939, Grant sugeriu que os estrogênios fossem extraídos de urina equina, uma vez que a extração de urina humana, praticada até então, acarretava problemas como instabilidade da disponibilidade comercial e alta variação da resposta biológica no organismo, além de odor e sabor desagradáveis. Em 1942, o uso comercial de estrogênios equinos conjugados foi

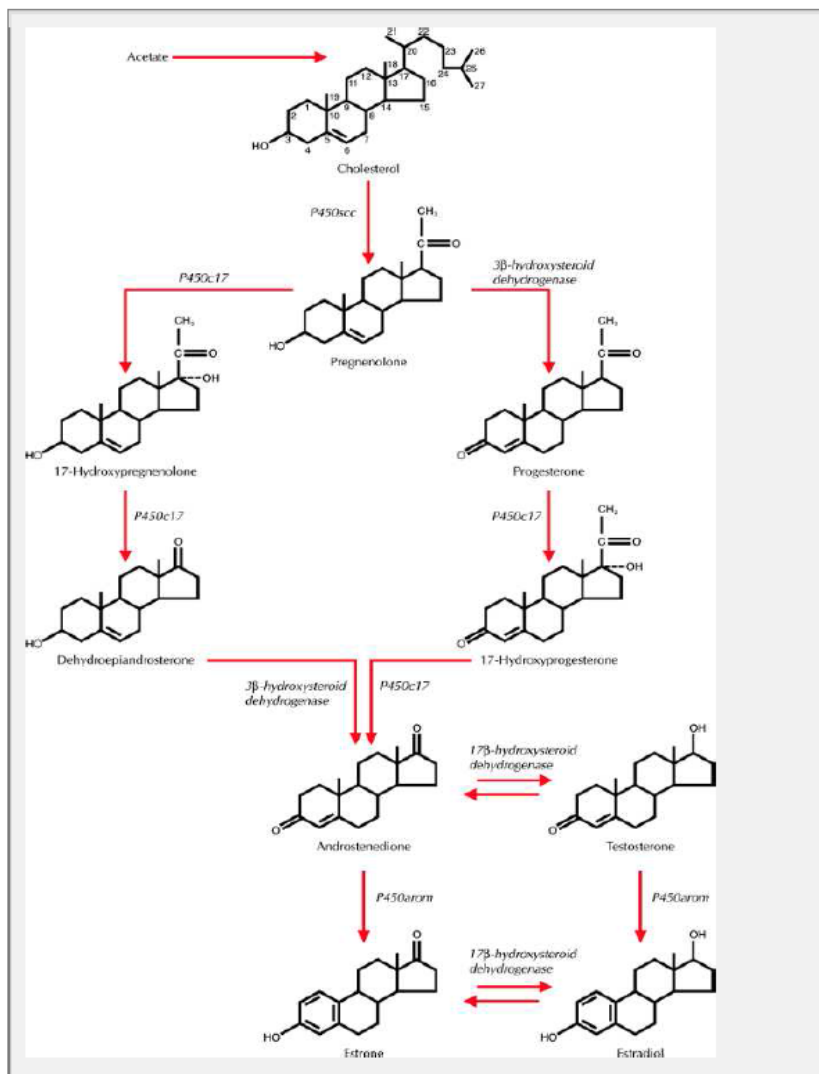
aprovado para o tratamento de sintomas climatéricos nos Estados Unidos (HARDING, 1944). Esse composto continha aproximadamente 40% de estrona e o restante era uma combinação de outras formas ativas de estrogênios, androgênios e progestágenos.

Os estrogênios equinos conjugados (EEC) são utilizados tradicionalmente na dose de 0,625 mg ao dia e, mais recentemente, 0,3 mg ao dia. Esses compostos demonstram vantagem farmacológica sobre os estrogênios não conjugados, pelo fato de sofrerem menos interferência do metabolismo de primeira passagem hepática, uma vez que sua formulação compreende 10 estrogênios naturais diferentes: estriol, Δ^8 -estriol, 17β -estradiol, 17α -estradiol, equilina, 17β -di-hidroequilina, 17α -di-hidroequilina, equilenina, 17β -equilenina e 17α -equilenina. Durante o processo de primeira passagem, os estrióis e seus derivados são conjugados e circulam como moléculas-reservatório inertes até serem ativadas pelas 17β -hidroxiesteroides desidrogenases presentes nos tecidos (ARAÚJO *et al.*, 2006).

1.3 Estrogênios

A cadeia de reações químicas que sintetiza os hormônios esteroides começou a ser desvendada em 1959 por Ryan *et al.* Os ovários são capazes de sintetizar todas as três classes de esteroides: androgênios, estrogênios e progestagênios a partir de uma sequência de reações em que o número total de átomos de carbono presentes na molécula de colesterol pode ser reduzido, mas nunca elevado. Tais reações ocorrem de forma ordenada, podendo ser de cinco tipos: a) quebra da cadeia lateral (reação da desmolase); b) conversão dos grupos hidroxil em cetonas (reações da desidrogenase); c) adição de grupos hidroxila (reações de hidroxilação); d) criação de ligações duplas (reações de retirada de hidrogênio); e) saturação das ligações duplas (reações de redução por adição de hidrogênio). Todas as enzimas envolvidas nesse processo são desidrogenases ou membros do grupo oxidante da citocromo oxidase p450 (MILLER, 1995; STOCCO; CLARK, 1996).

FIGURA 1 - Síntese dos hormônios esteroides a partir da molécula de colesterol



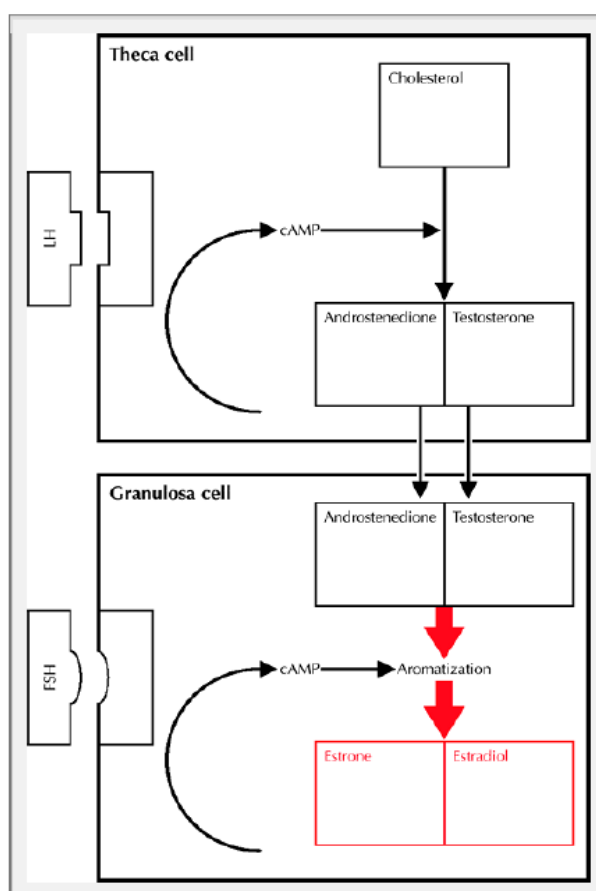
Fonte: Speroff e Fritz (2005).

A conversão de colesterol em pregnenolona realizada pela enzima citocromo oxidase p450 de clivagem da cadeia lateral (p450scc) consta da hidroxilação dos carbonos nas posições 20 e 22 com clivagem da cadeia lateral subsequente. Uma vez disponível, a pregnenolona pode ser transformada em 17-hidroxipregnenolona e, então, em di-hidroepiandrosterona (DHEA), pela enzima citocromo oxidase de hidroxilação da posição 17 (p450 c17) ou então seguir outra via e ser transformada em progesterona e posteriormente em 17-hidroxiprogesterona pela enzima 3β-hidroxiesteroide-desidrogenase. A DHEA e a 17-hidroxiprogesterona são precursores da androstenediona que, por sua vez, é o precursor da testosterona e da estrona. A testosterona e a estrona podem ambas ser convertidas em E2 pelas enzimas 17β-hidroxiesteroide-desidrogenase, no

primeiro caso, ou p450arom no segundo (SEBASTIAN; BULUN, 2001; SIMPSON *et al.*, 1994).

Todas essas transformações bioquímicas ocorrem dentro do folículo ovariano, conforme o sistema proposto por Falck, em 1959, conhecido como “duas células, duas gonadotrofinas”, segundo o qual existem receptores para FSH nas células da granulosa com regulação parácrina e autócrina e existem também receptores de LH nas células da teca. O LH atua sobre as células da teca induzindo a aromatização de colesterol em androgênios e permitindo, então, à granulosa realizar a transformação dos androgênios em estrogênios sob ação do FSH. Tais etapas da esteroidogênese são mediadas em paralelo por outros fatores, como os "*insulin-like growth factors*" I e II (IGF-I e IGF-II), as ativinas e as inibinas, também de forma parácrina a partir da alteração da expressão de enzimas como a p450 c17 (SAWETAWAN *et al.*, 1996).

FIGURA 2 - Esquema ilustrativo das ações hormonais nas células foliculares ovarianas



Fonte: Speroff e Fritz (2005).

A ação biológica dos estrogênios se dá pela ativação de receptores intracelulares específicos após uma série de passos fundamentais: a) difusão do hormônio esteroide através da membrana celular; b) ligação do hormônio ao seu receptor nuclear; c) interação do complexo hormônio-receptor com o ácido desoxirribonucleico (DNA) nuclear; d) síntese de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm); e) transporte do RNAm aos ribossomos; f) síntese proteica resultando em atividade biológica (BEATO; SANCHEZ-PACHECO, 1996).

Quando ocorre a ligação estrogênio-receptor, este último sofre transformação em sua conformação espacial, expondo um sítio de ligação com o DNA, que até então estava bloqueado mantendo a molécula em estado inativo. Após essa ligação com o DNA, inicia-se a transcrição do gene específico e esse processo se mantém enquanto a molécula estiver acoplada ao sítio de ativação da cadeia de DNA; ou seja, a duração da ação hormonal depende da quantidade de hormônio disponível e da velocidade de dissociação do complexo hormônio-receptor do sítio de ligação do DNA. Quanto maior sua afinidade pela cromatina, maior o tempo de ação (WEBB *et al.*, 1992).

Dois receptores de estrogênios são conhecidos até o momento, com algumas variações menos estudadas. A expressão de um deles, do outro ou de ambos é variável em cada tecido do organismo, resultando em diferentes respostas locais ao uso dos estrogênios (DAHLMAN-WHRIGHT; CAVAILLES; FUQUA, 2006). Tais receptores foram nomeados de alfa (α -ER), inicialmente descrito por Jensen e Jacobson em 1962 e sequenciado por Greene *et al.* em 1986 e beta (β -ER), descoberto bem mais recentemente por Enmark *et al.*, em 1997. Ambos formam ligações com os estrogênios em dímeros, ou seja, dois receptores se ligam a cada molécula de estrogênio e podem ser homodímeros (dois receptores do mesmo tipo) ou heterodímeros (um receptor de cada tipo).

Essa variação na forma de ligação ajuda no processo de regulação da resposta biológica, assim como a associação de cofatores de ligação do complexo hormônio-receptor ao DNA que é necessária em alguns casos. A síntese desses cofatores parece ser o principal determinante na velocidade de aparecimento da ação biológica após a administração de estrogênios (HALACHMI *et al.*, 1994).

Outra variável que parece influenciar diretamente o tipo de resposta estrogênica é a conformação molecular do receptor. Os receptores alfa e beta

diferem entre si em relação a domínios estruturais conhecidos como *activation function-1* (AF-1) e *hormone dependent transcriptional activation function-2* (AF-2). A capacidade de ativação gênica desses domínios é diferente e pode ocorrer em sinergismo, promovendo respostas altamente variáveis em cada tecido humano (SMILEY; KHALIL, 2009).

1.4 Função endotelial

O endotélio vascular responde aos estímulos hemodinâmicos e/ou metabólicos no organismo a partir de uma intrincada rede de reações bioquímicas celulares que resultam na expressão de citocinas e moléculas de adesão capazes de interagir com leucócitos e plaquetas, desencadeando mecanismos inflamatórios específicos (HANSSON, 2005).

Durante muito tempo o endotélio foi considerado apenas uma barreira mecânica do sistema vascular, sem qualquer função específica, até que Furchgott e Zawadski (1980) demonstraram seu controle sob o tônus vascular arterial sob ação da acetilcolina. Esse estudo demonstrou não só que o endotélio é essencial para o controle de relaxamento da musculatura lisa da parede dos vasos, como também que essas funções são mediadas por substâncias vasodilatadoras. Tais substâncias passaram a ser denominadas vasodilatadores endotélio-dependentes. A partir daí, outros estudos evidenciaram a atuação do endotélio vascular em processos como controle do tônus vascular (SEARLE; SAHAB, 1992), o controle da coagulação (DAHLEN *et al.*, 1981), fibrinólise local (MOLINARI *et al.*, 1992) e interações com adesividade leucocitária e plaquetária (PALOMBA; DITTMAN, 1994).

As primeiras substâncias produzidas no endotélio que tiveram sua participação na contratilidade vascular comprovadas foram o fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF), que mais tarde descobriu-se tratar do Óxido Nítrico (HIGGS *et al.*, 1996; SEARLE; SAHAB, 1992), as prostaglandinas PG1 2 e PGE 2 (MESSINA *et al.*, 1992) e a endotelina (FUJIMOTO; DOI; SAKAMOTO, 1994; SERAFIN *et al.*, 1994).

O Óxido Nítrico (NO) é sintetizado por um conjunto de enzimas conhecidas como Óxido Nítrico Sintetases (NOS). O processo inicia pela conversão de L-

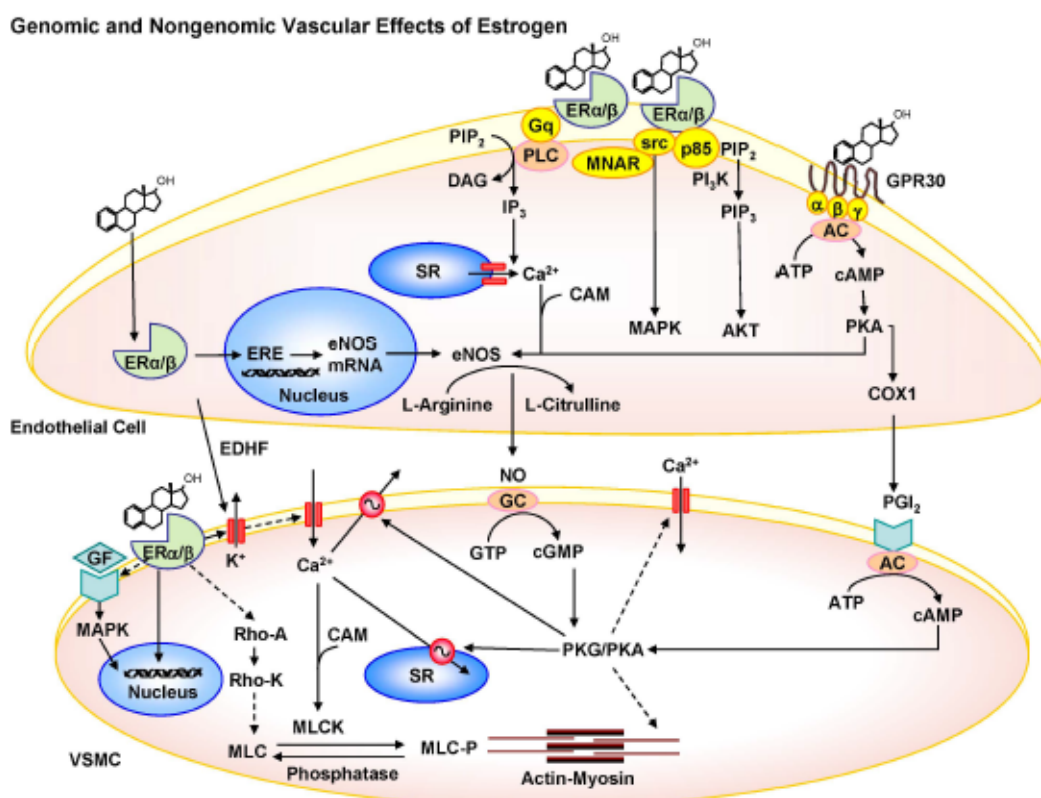
arginina em L-citrulina em uma reação catalisada pelas NOS em presença de NADPH e oxigênio. As isoformas das NOS são subdivididas didaticamente em categorias de acordo com suas propriedades: cNOS compreendem as enzimas constitutivas cuja concentração intracelular é basicamente constante e cuja ação é cálcio-dependente. Já as iNOS são enzimas induzíveis cuja expressão só ocorre após exposição do tecido a citocinas, sendo sua ação independente do íon Ca^{++} (BUTTERWORTH; BATH, 2002; BOUCHER; MOALI; TENU, 1999). As cNOS apresentam duas formas, sendo a nNOS neuronal e a eNOS endotelial, e ambas dependem de concentrações elevadas de Ca^{++} e da ativação da calmodulina para produção de NO em curtos períodos de tempo.

A ação bioquímica do NO se dá por ativação da guanilato ciclase solúvel intracelular e formação de guanidina monofosfato cíclica (c-GMP) que, por sua vez, ativa a proteína quinase G, causando fosforilação da cadeia leve de miosina fosfatase e resultando, em última instância, em desfosforilação da cadeia leve de miosina e consequente relaxamento das fibras musculares lisas (SURKS, 2007; URUKAMI-HARASAWA *et al.*, 1997).

O processo químico de ativação da síntese de NO é o chamado desacoplamento da eNOS, enzima responsável pela estabilidade do fenótipo endotelial. A eNOS é capaz de formar, na presença da enzima superóxido dismutase, espécies reativas de oxigênio (ROS) que, por sua vez, reagem no meio intracelular com os grupos cisteína das proteínas presentes, alterando sua função (RHEE, 2006). A eNOS forma superóxido em estado de homeostase do organismo, mantendo o fenótipo endotelial em estado quiescente. Nos estados de sobrecarga metabólica, caracterizados pela hiperglicemia e pelo aumento de ácidos graxos circulantes, como se verifica no exercício físico, na hipóxia, no diabetes *mellitus* tipo II e na obesidade, o cofator-chave tetra-hidrobiopterina determina que a eNOS desvie a síntese de ROS de superóxido para peróxido de hidrogênio, fenômeno conhecido como desacoplamento e, em vez de estabilização endotelial, há ativação do endotélio e vasodilatação (CELERMAJER *et al.*, 1994; FOSTERMANN; MUNZEL, 2005). A sinalização para ativação endotelial por ROS pode ser desencadeada também pela exposição a citocinas inflamatórias e fatores de crescimento, como acontece, por exemplo, em pacientes tabagistas, diabéticos, renais crônicos ou com histórico familiar para doença coronariana. O mesmo processo acontece quando há diminuição do

substrato L-Arginina disponível (GRIENDLING; SORESCU; USHIO-FUKAI, 2000; WOYWODT *et al.*, 2002).

FIGURA 3 – Esquema ilustrativo dos mecanismos de ativação endotelial vascular modulados pelos estrogênios



Fonte: Reslan e Khalil (2012).

1.5 Avaliação da função endotelial

A capacidade de resposta vasodilatadora endotelial pode ser medida a fim de se estratificar o risco cardiovascular, em especial o coronariano, e determinar prognóstico em diversos quadros clínicos específicos. O método ideal de avaliação deve ser seguro, não invasivo, reprodutível, de baixo custo e fácil padronização (DEANFIELD *et al.*, 2005). Até o momento nenhum dos métodos disponíveis atende a todos esses quesitos, sendo necessários, portanto, vários testes diagnósticos na avaliação desses pacientes, a fim de se definir risco e prognóstico (DEANFIELD; HALCOX; RABELINK, 2007).

1.5.1 Testes de liberação de Óxido Nítrico

Trata-se de testes que visam a avaliar a liberação de NO pelas células endoteliais íntegras por meio de infusão de fármacos vasoativos, como a acetilcolina, e consequente vasodilatação que pode ser detectada por arteriografia quantitativa ou ecocardiografia pela avaliação do diâmetro arterial e/ou comparação com a resposta a vasodilatadores endotélio-independentes como a nitroglicerina (COX *et al.*, 1989; LUDMER *et al.*, 1986). Como esses testes necessitam obrigatoriamente de canulação venosa para infusão dos fármacos, eles foram rapidamente substituídos por testes biofísicos não invasivos, como a dopplerfluxometria e a dilatação mediada por fluxo (FMD) de artérias de condutância proximais (CELERMAJER *et al.*, 1992; JOHANNIDES *et al.*, 1995).

1.5.2 Marcadores séricos de NO

Dosagens séricas de produtos do metabolismo do NO como nitritos e proteínas nitrosiladas, muito utilizados na década de 1990, não são mais consideradas seguras como marcadores específicos da função endotelial, uma vez que podem facilmente se mascarar por outras espécies químicas que contêm nitrogênio ou se alterar por fontes de NO como a dieta (SMITH JR. *et al.*, 2004; RASSAF; FEELISCH; KELM, 2004).

1.5.3 Dosagem sérica de dimetilarginina assimétrica

É provável que a dosagem de dimetilarginina assimétrica, antagonista competitivo endógeno da eNOS, seja um método promissor para marcação de risco cardiovascular. Sua elevação sérica está diretamente relacionada à redução da biodisponibilidade de NO em estudos animais e humanos (VALLANCE; LEIPER, 2004).

1.5.4 Detecção sérica de células endoteliais

Métodos de detecção de células endoteliais circulantes por citometria de fluxo ou microscopia fluorescente têm sido estudados com base na premissa de que a ativação endotelial é o resultado do balanço entre a injúria e o reparo endoteliais causados pelos estímulos inflamatórios, mas tais testes estão ainda longe de serem implementados na prática clínica (DEANFIELD; HALCOX; RABELINK, 2007; GOON; BOOS; LIP, 2005).

1.5.5 Constrição mediada por baixo fluxo (L-FMC)

Como a FMD apresenta unicamente a capacidade de medida da resposta endotelial (aumento da biodisponibilidade de NO) a estímulos metabólicos como isquemia ou exercício, foi desenvolvida essa nova técnica de avaliação fluxomediada, que é capaz de fornecer informação sobre a reatividade endotelial em repouso. A interpretação dos resultados desse método como marcador de risco coronariano depende da sua realização combinada com a FMD, podendo, portanto, ser considerada um método complementar à FMD.

A medida da L-FMC independe da ação do NO, sugerindo que os mecanismos de controle do tônus vascular arterial em repouso não envolvem a síntese de NO, mas provavelmente prostaglandinas e endotelina-1 (GORI *et al.*, 2008).

1.5.6 Tonometria arterial periférica (PAT)

Consiste na medida da amplitude de pulso arterial na microcirculação dos dedos das mãos com base na pletismografia. Sensores de pletimografia são instalados nas polpas digitais de todos os dedos das mãos previamente para se submeter os membros superiores ao período de isquemia de cinco minutos por manguito inflável. O resultado corresponde a uma comparação da amplitude de pulso de repouso com a amplitude observada durante a hiperemia reacional, que segue o período de isquemia. Os autores que avaliaram clinicamente esse

método salientam que sua única vantagem sobre a FMD seria a capacidade de detecção de lesões na microcirculação, já que a FMD só avalia vasos conduítes de grande calibre (LEE *et al.*, 2011).

1.5.7 Dilatação fluxomediada da artéria braquial (FMD)

Apesar de tecnicamente trabalhoso, esse método atende a muitos quesitos por ser seguro, não invasivo, reprodutível e de fácil padronização, tendo se tornado o padrão-ouro para avaliação da função endotelial a partir da década de 1990. O método consiste na indução de isquemia no membro superior a partir do garroteamento por manguito de esfigmomanômetro por cinco minutos, seguido de avaliação ultrassonográfica do diâmetro médio da artéria braquial distalmente ao garroteamento, comparação com diâmetro basal pré-isquemia e cálculo do grau de vasodilatação observado. Até os dias atuais, esse teste biofísico vem sendo amplamente utilizado, já que pode, inclusive, ser utilizado em pesquisas clínicas com crianças ou adultos na fase pré-clínica, permitindo grande avanço no conhecimento a respeito da evolução das doenças crônicas que cursam com lesão endotelial (CORRETI *et al.*, 2002).

Os desafios que restam ser superados para se incluir esse método diagnóstico na prática clínica cotidiana são: o custo, pois necessita de um aparelho de ultrassonografia disponível e um profissional treinado para operá-lo; e o controle adequado das variáveis ambientais que podem interferir no resultado, como exercício físico e consumo de cafeína no dia do exame, além das variações de temperatura ambiente.

1.6 Ação estrogênica sobre a função endotelial

A primeira constatação da interferência dos estrogênios sobre o sistema vascular foi feita por Malinow, Pellegrino e Lange (1959), utilizando estradiol marcado por radioisótopos em seis coelhos de ambos os sexos. O material radioativo foi detectado na aorta de todos os animais, havendo níveis mais elevados em placas ateromatosas. Posteriormente, Malinow *et al.* (1963)

verificaram a ligação entre o estrogênio marcado radioativamente e as células vasculares humanas.

Em 1978, Colburn e Buonassisi avaliaram a resposta de células endoteliais e subendoteliais da camada íntima da artéria aorta de coelhos machos à ação dos estrogênios. Os autores demonstraram a existência de receptores de estrogênios nas culturas de células endoteliais, entretanto, não os identificaram em outras linhagens de células da camada íntima da artéria aorta. Propuseram, assim, que as células endoteliais desempenham papel primordial no controle da circulação regional, indicando a forma como o estrogênio regula as variações cíclicas das funções reprodutivas. No ano seguinte, Harder e Coulson (1979) demonstraram, em culturas de células de músculo liso de coronárias de cães, que o estrogênio tem sítios de ligação de alta e baixa afinidade. Chang *et al.* (1980), investigando células de músculo liso de artérias coronárias de ratos, verificaram que o estrogênio estimula a atividade da ciclo-oxigenase e da prostaciclina, podendo agir como vasodilatador.

O reconhecimento dos receptores para estrogênio em parede vascular deu apoio à hipótese de que o estrogênio pudesse atuar no crescimento celular dos vasos e tem ajudado a compreender melhor as atividades dos esteroides, inclusive no sistema nervoso central.

A partir da década de 80, diversas pesquisas comprovaram essa correlação, mostrando que as oscilações nos níveis séricos de estrogênios estavam diretamente relacionadas aos níveis de receptores no tecido vascular. As pesquisas iniciais usaram métodos de cultura de células marcadas ou injeção de esteroides marcados por radioisótopos em animais, seguidos pelo isolamento de segmentos vasculares e radiografias para possibilitar a localização do estrogênio e outros esteroides na parede vascular. Desta forma, registraram-se sítios específicos para estradiol em células humanas endoteliais e de músculo liso da parede vascular, e em vasos de cobaias e cães (KARAS; PATTERSON; MENDELSON, 1994). Receptores foram localizados no núcleo das células do músculo liso, endotélio, camada íntima, média e adventícia, além de serem encontrados nos canais vasculares que atravessam a placa ateromatosa (LOSORDO *et al.*, 1994).

Karas, Patterson e Mendelsohn, 1994 identificaram a expressão do RNAm para receptores estrogênicos em cultura de células da artéria mamária humana e da veia safena.

O endotélio regula o tônus vascular a partir da liberação de substâncias vasoconstritoras e vasodilatadoras que atuam no músculo liso subjacente. Vasodilatadores endotélio-dependentes, tal como a acetilcolina, estimulam o endotélio a produzir fatores de relaxamento, principalmente o Óxido Nítrico (GILLIGAN *et al.*, 1994a).

A ação dos estrogênios sobre o sistema cardiovascular ocorre 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 promove vasodilatação, em parte por estímulo de síntese de prostaciclina (PG_{1₂}) e Óxido Nítrico (NO) (FARHAT; LAVIGNE; RAMWELL, 1996; KARAS; PATTERSON; MENDELSON, 1994).

O NO caracteriza-se por ser uma molécula lábil degradada em metabólitos estáveis - nitrito (NO₂) e nitrato (NO₃) - e sua presença induz o aumento do fluxo sanguíneo, inibe o crescimento das células do músculo liso e a agregação plaquetária e sua aderência ao endotélio, sendo também importante fator de relaxamento do músculo liso (VANE; ÄNGGARD; BOTTING, 1990).

Hayashi *et al.* (1992) evidenciaram níveis mais elevados de Óxido Nítrico no endotélio das artérias aorta de coelhas normais quando comparadas a fêmeas ooforectomizadas ou machos. Esse aumento da liberação de Óxido Nítrico basal correlacionou-se com níveis plasmáticos mais elevados de estrogênio nas fêmeas normais, independentemente das mudanças nos lípides séricos.

O principal efeito do Óxido Nítrico seria reverter a ação da endotelina I nas células do músculo liso vascular, por ela representar o principal fator de contração vascular, com ação hipertensiva de longa duração. Quando a endotelina I foi injetada via intravenosa em ratos, seu efeito vasopressor foi fortemente limitado pela liberação de prostaciclina e óxido nítrico (VANE; ÄNGGARD; BOTTING, 1990).

A diminuição da endotelina I foi identificada por Ylikorkala *et al.* (1995) após uso de terapia de reposição hormonal. Contudo, a redução dos níveis plasmáticos

de endotelina I foi mais evidente em adolescentes com amenorreia primária tratadas com estradiol (CREATSAS *et al.*, 1996).

Outro potente vasodilatador estimulado pelo estrogênio é a prostaciclina (PG₁₂) produzida pelas células endoteliais (VANE; ÄNGGARD; BOTTING, 1990). Acredita-se que sua síntese esteja acoplada à liberação de Óxido Nítrico e que cause vasodilatação e inibição da atividade plaquetária (COLLINS *et al.*, 1995).

Williams, Adams e Klopfenstein (1990) avaliaram, *in vivo*, a resposta vasomotora de artérias coronárias ateroscleróticas de macacas ooforectomizadas. Um grupo de animais recebeu placebo e outro, terapia de reposição hormonal (TRH) durante três meses. A administração de acetilcolina causou vasoconstrição no grupo placebo (hipoestrogênico) e resposta vasodilatadora normal foi observada no grupo tratado com estrogênio. Os dois grupos apresentaram diferença significativa nos níveis de colesterol plasmático, o que pode contribuir para os efeitos vasomotores observados. Se esse efeito foi mediado por mecanismos diretos ou indiretos, não foi possível concluir.

Em estudo subsequente, Williams *et al.* (1992) mostraram os efeitos a curto prazo do estrogênio no tônus vascular. Realizaram infusões de acetilcolina antes e 20 minutos após injeção de etinilestradiol em macacas ooforectomizadas submetidas à dieta aterogênica. Avaliaram a resposta vascular por meio de angiografia coronária quantitativa, encontrando 17% de resposta vasoconstritora à acetilcolina antes do tratamento com estrogênio e rápida vasodilatação após injeção de estradiol. Concluíram que o efeito vasodilatador dos estrogênios é direto e rápido sobre os vasos coronários intactos e pode aumentar a quantidade da enzima sintetizadora de Óxido Nítrico nas células vasculares. Como consequência, pode ainda aumentar a secreção do EDRF ou NO.

Arora *et al.* (1998) analisaram o efeito das flutuações do estrogênio ovariano normal na microcirculação cutânea durante o ciclo menstrual e em estrogênio-terapia de reposição. Testaram três grupos de mulheres saudáveis: grupo 1- pré-menopáusicas (n=20) testado em duas ocasiões do ciclo menstrual: durante o período menstrual e no meio do ciclo (10 a 14 dias após a menstruação, níveis estrogênicos elevados); grupo 2- pós-menopáusicas (n=9); grupo 3- pós-menopáusicas recebendo estrogênio-terapia de reposição há pelo menos um ano (n=11). As avaliações de resistência vascular foram realizadas no antebraço por ultrassonografia com doppler para medir a vasodilatação, em resposta à

iontoforese de acetilcolina 1% e nitroprussiato de sódio 1%. Esses autores observaram que na microcirculação a resposta vasodilatadora tanto endotélio-dependente quanto independente foi significativamente maior no meio do ciclo do que na fase menstrual da pré-menopausa. Tais achados indicaram que a capacidade vasodilatadora poderia ser positivamente modulada pelos hormônios ovarianos endógenos, especialmente o estrogênio. Entre as menopáusicas (grupos 2 e 3), ficou clara a diferença na vasodilatação, tanto endotélio-dependente quanto independente. As mulheres em uso de terapia de reposição hormonal apresentaram níveis significativamente mais elevados de estradiol sérico e muito mais resposta tanto à acetilcolina quanto ao nitroprussiato de sódio. Esses achados sugerem que o estrogênio afeta positivamente a vasodilatação na microcirculação nas duas vias (dependente e independente).

A ação direta dos estrogênios sobre os vasos sanguíneos começou a ser demonstrada mais facilmente a partir do advento da dopplerfluxometria, devido à sua facilidade e ao seu caráter não invasivo (DeZIEGLER; BESSIS; FRYDMAN, 1991; HATA; HATA, 1997; SHAMMA *et al.*, 1992).

Belfort *et al.* (1995) consideraram vasos cerebrais de pequeno calibre aqueles com diâmetro de aproximadamente 100 μm e de grande calibre os com valores acima de 1 mm. Observaram que a resistência cerebrovascular é amplamente controlada pelas arteríolas cerebrais que ficam distais aos vasos de maior calibre (por exemplo: artéria cerebral média, artéria cerebral anterior e oftálmica, que têm diâmetro de ± 2 mm). Esses vasos maiores (≥ 2 mm) têm pequena capacidade de alterar ativamente seu diâmetro interno. Os vasos menores distais à artéria oftálmica (artéria central da retina) são, porém, mais suscetíveis a mudanças no diâmetro de suas paredes vasculares, o que altera significativamente os valores da velocidade sanguínea.

Os primeiros estudos dopplerfluxométricos foram realizados em vasos de grande calibre, principalmente pela facilidade de acesso. Somente após o aprimoramento dessa técnica, vasos de difícil acesso puderam ser estudados. As artérias uterinas e ovarianas foram as primeiras a serem avaliadas com o objetivo de estudarem-se os efeitos hormonais sobre a resistência vascular (GOSWAMY; STEPTOE, 1988).

Taylor *et al.* (1985) analisaram o efeito da variação hormonal do ciclo menstrual sobre a resistência vascular das artérias ovarianas. Avaliaram 14

mulheres em idade reprodutiva e obtiveram menos resistência na artéria correspondente ao ovário que continha o folículo dominante.

Os efeitos dos estrogênios exógenos nas artérias uterinas de 10 mulheres saudáveis, menopausadas, antes e após uso de estradiol transdérmico contínuo foram analisados por Bourne *et al.* (1990) por meio do ultrassom transvaginal com doppler pulsátil para avaliar os índices de pulsatilidade antes e após seis semanas de TRH. Os resultados obtidos mostraram redução de 50% no índice de pulsatilidade.

Gangar *et al.* (1991) investigaram a influência do estrogênio no tônus vascular da artéria carótida interna, utilizando ultrassom com doppler. Avaliaram 12 pacientes menopausadas abaixo de 60 anos de idade antes e após 22 semanas de reposição estrogênica diária (estradiol transdérmico 50 µg/dia). O tempo de menopausa variou de cinco a oito anos, sendo que quanto maior o tempo transcorrido em menopausa, maior era a queda no índice de pulsatilidade da artéria carótida interna após estrogênio terapia. Tal fato indica que o índice de pulsatilidade começa a elevar-se quando a produção de estrogênio cai abaixo do necessário para estímulo endometrial. Observações prévias de queda no índice de pulsatilidade da artéria uterina sob influência do estradiol sugerem que o estrogênio tem efeito sistêmico no compartimento arterial.

Ao selecionar seis mulheres jovens (idade de 27 a 36 anos) com diagnóstico de falência ovariana precoce, DeZiegler, Bessis e Frydman (1991) avaliaram a relevância dos esteroides ovarianos na resistência vascular das artérias uterinas. Administraram de forma crescente o estrogênio de 0,1 até 0,4 mg/dia e, posteriormente, de forma decrescente até a dose de 0,1 mg. Elas foram submetidas ao doppler das artérias uterinas antes do uso dos hormônios e durante o ciclo menstrual. Constatou-se que, na ausência de estrogênio, as artérias uterinas apresentam alto grau de resistência vascular expressa ao doppler por valores elevados do índice de pulsatilidade. A administração de estradiol diminuiu a resistência vascular nas artérias uterinas, com queda acentuada no período de dose máxima de estrogênio.

Pines *et al.* (1991) analisaram, à dopplerfluxometria, o fluxo sanguíneo aórtico de 43 mulheres menopausadas, sendo que 24 receberam TRH e 19 formaram o grupo-controle. Os exames foram realizados antes e dois meses e meio após início da reposição hormonal. Os resultados revelaram que os

estrógenos aumentaram tanto o volume de ejeção quanto a velocidade do fluxo, sendo que esta última provavelmente refletiu efeito inotrópico positivo do estrógeno e vasodilatação.

Em outro estudo, os mesmos autores (PINES *et al.*, 1992) avaliaram por mais tempo o fluxo aórtico de 18 mulheres menopausadas, utilizando o método de ecocardiografia com doppler. As avaliações foram realizadas em três momentos: antes de receber TRH, após dois meses e meio e após um ano de terapia de reposição. Os resultados obtidos indicaram que os efeitos hemodinâmicos periféricos da TRH, tais como vasodilatação e diminuição da resistência vascular sistêmica, seriam até certo ponto transitórios, enquanto o efeito central (aumento da aceleração média) seria prolongado.

Shamma *et al.* (1992) utilizaram ultrassonografia com doppler para medir as velocidades dos fluxos sanguíneos e os índices de pulsatilidade (IP) na artéria cerebral média de nove mulheres submetidas à supressão pituitária a partir do uso de acetato de leuprolide e, posteriormente, à indução de ovulação com gonadotrofinas. As medidas pelo doppler transcranial foram realizadas no dia da supressão pituitária e uma semana após o início da indução. Os resultados demonstraram aumento significativo da resistência vascular medida pelo cálculo do IP na presença dos níveis mais baixos de estradiol, quando comparados ao momento de valores de estradiol máximo ($p < 0,002$).

Os efeitos a longo prazo da TRH no útero e circulação uterina foram avaliados por Pirhonen *et al.* (1993) em grupo de 432 pacientes menopausadas. Utilizaram ultrassonografia endovaginal com doppler colorido para medir o IP das artérias uterinas. As pacientes foram divididas em três grupos, sendo: a) controle; b) pacientes que iniciaram TRH antes da menopausa; c) pacientes que haviam interrompido TRH dois ou três anos antes do estudo ser realizado. Os autores observaram que mulheres em uso há longo tempo de TRH exibiram diminuição na resistência vascular uterina, que aumentou após a interrupção da TRH, mas, quando comparada ao grupo-controle, ainda se manteve mais baixa, por vários anos.

O estudo de Penotti *et al.* (1993) verificou o efeito da TRH sobre os vasos sanguíneos periféricos, analisando as características do fluxo nas artérias carótida interna e cerebral média por meio de ultrassonografia com doppler. Selecionaram 25 mulheres saudáveis, menopausadas, normotensas e sem TRH

prévia. O esquema terapêutico incluía estradiol transdérmico contínuo na dose de 50 µg/dia. Nos primeiros 12 dias do segundo mês de uso, adicionava-se ciclo de acetato de medroxiprogesterona – 10 mg/dia. As pacientes foram avaliadas em três momentos: antes do início da terapêutica, 40 dias após o término do ciclo com estrógenos e 40 dias após a administração do progestágeno. Os resultados evidenciaram significativa redução do IP em ambas as artérias ($p=0,0001$) após seis semanas de TRH, indicando aumento do fluxo sanguíneo nas artérias cerebrais.

Tan *et al.* (1996) estudaram as alterações hemodinâmicas nas artérias uterinas e intraovarianas durante o ciclo menstrual normal e correlacionaram-nas aos níveis hormonais no mesmo período. Analisaram seis mulheres saudáveis durante o ciclo menstrual, com idade entre 29 e 37 anos, ovulatórias, pela ultrassonografia endovaginal com doppler. O IP da artéria uterina diminuiu significativamente no lado em que ocorreu o desenvolvimento folicular quando comparado ao observado na artéria uterina contralateral.

A velocidade de fluxo na artéria oftálmica de pacientes unioforectomizadas (sem TRH) foi comparada por Hata e Hata (1997) com os valores apresentados por oforectomizadas bilateralmente que receberam TRH. O esquema de reposição foi iniciado no oitavo dia após as cirurgias e os índices de pulsatilidade obtidos no primeiro dia antes das intervenções e nos dias sete e 28 pós-operatórios. Utilizaram-se estrógenos conjugados equinos (0,625 mg/dia) e acetato de medroxiprogesterona (2,5 mg/dia). Não foi acusada diferença significativa entre os índices nos dois grupos em cada período analisado. Houve decréscimo acentuado do IP da artéria oftálmica no 28º dia comparado aos valores do sétimo dia, em ambos os grupos. Os autores consideraram o exame de doppler da artéria oftálmica método pertinente e não invasivo para avaliação da hemodinâmica intracraniana.

Lau *et al.* (1998) investigaram os efeitos em leitos vasculares periféricos de diferentes formulações e vias de absorção de terapia de reposição hormonal (via oral e percutânea). Foram avaliados os IPs das artérias braquial, dorsal dos pés, poplítea e radial de 68 mulheres em menopausa cirúrgica por meio do ultrassom com doppler, antes e após dois e seis meses de TRH. O estudo foi randomizado e as pacientes separadas em quatro grupos: controle; estradiol 2 mg - via oral; estradiol 2 mg+acetato de noretisterona 1 mg-via oral; e estradiol percutâneo 2,5

g/L. Os exames foram feitos em condições homogêneas quanto ao horário, ambiente, luminosidade e pelo mesmo examinador, que não tinha conhecimento dos medicamentos usados pelas participantes. Houve significativa redução dos índices de pulsatilidade em pelo menos um dos leitos vasculares após dois meses de TRH em todas as pacientes tratadas, comparadas ao grupo-controle, cujos efeitos foram persistentes durante todo o estudo. Os autores concluíram que a redução nos IPs e o aumento no fluxo sanguíneo das artérias periféricas estudadas estavam diretamente relacionados aos níveis de estradiol.

Em estudo prospectivo, duplo-cego, randomizado, Jackson e Vyas (1998) pesquisaram o IP da artéria carótida interna de mulheres menopausadas em uso de estrogênioterapia de reposição. Na análise, foram examinadas 28 que não utilizaram estrogênio exógeno nos 12 últimos meses. Dessas, 16 receberam valerato de estradiol e 12 placebo. Todas foram submetidas a ultrassom cervical com doppler em intervalos de quatro a seis semanas, sendo a medida final após 20 a 24 semanas. O tratamento com estrogênios durante 20-24 semanas causou acentuada queda no IP da artéria carótida interna; no grupo-placebo houve aumento do índice de pulsatilidade daquela artéria.

Darj *et al.* (1999) investigaram o fluxo sanguíneo das grandes artérias cerebrais em mulheres menopausadas com e sem TRH. O estudo foi realizado com 50 mulheres saudáveis com queixas climatéricas e amenorreicas há pelo menos seis meses. Foram distribuídas em dois grupos aleatoriamente. Um grupo recebeu 2 mg de estradiol por 12 dias, seguido de 2 mg de estradiol + 1 mg de acetato de noretisterona por 10 dias, seguido por 1 mg de estradiol por seis dias, ciclicamente, durante seis meses. O outro grupo recebeu placebo durante os primeiros três meses e o mesmo esquema de TRH do primeiro grupo nos últimos três meses. O fluxo sanguíneo foi medido na região cervical pelo ultrassom com doppler pulsátil colorido, insonando-se as artérias carótida comum, carótida interna e externa antes do início do estudo e após três e seis meses de terapia. Os IPs não diminuíram de forma significativa ($p > 0,05$) nos grandes vasos durante os seis meses de TRH e não houve diferença no fluxo sanguíneo do grupo tratado com TRH e placebo.

Perregaux *et al.* (1999) desenvolveram estudo no qual compararam um grupo de 14 homens jovens com outro de 14 mulheres jovens (idade entre 20 e 31 anos) em relação à vasodilatação após compressão da artéria braquial. Todas

estavam na fase folicular do ciclo menstrual. Analisaram também o mesmo efeito em 19 mulheres saudáveis pós-menopausa (idade entre 49 e 75 anos), estando 11 em terapia de reposição hormonal. Utilizaram ultrassom de alta frequência com doppler associado para medir o diâmetro da artéria braquial antes e após compressão com manguito. Depois de cinco minutos de compressão com 40 mmHg acima da pressão sanguínea sistólica (o que garante oclusão do suprimento sanguíneo arterial para o antebraço), o manguito era rapidamente desinflado e as medidas do fluxo e do diâmetro pós-isquêmicos registradas nos tempos de 15, 45 e 60 segundos. Os resultados revelaram resposta vasodilatadora pós-isquêmica mais elevada em mulheres jovens comparadas aos homens de mesma idade. No grupo das menopausadas, as que estavam em terapia de reposição tiveram resposta vasodilatadora significativamente maior que as menopausadas sem reposição. A resposta vasodilatadora endotélio-dependente da artéria braquial foi muito mais evidente no grupo que provavelmente apresentava níveis mais elevados de estrogênio (mulheres jovens e pós-menopáusicas em TRH). As que não estavam em terapia de reposição tinham níveis de reatividade vascular muito mais baixos, semelhantes ao padrão verificado no grupo de homens jovens.

Os efeitos da terapia de reposição hormonal nos parâmetros dopplerfluxométricos da artéria oftálmica de pós-menopausadas foram analisados por Battaglia *et al.* (1999) e comparados com os registrados nas artérias carótida interna e uterinas. O grupo formado por 57 mulheres pós-menopausadas recebeu esquema de TRH com estradiol transdérmico contínuo + acetato de medroxiprogesterona. O fluxo das artérias uterinas, carótida interna e oftálmica foi avaliado por doppler colorido. O IP diminuiu de forma significativa em todas elas após o primeiro mês de tratamento, comparando-se aos valores basais, e permaneceram estáveis até o final do estudo (seis meses). Importante aumento na velocidade máxima do fluxo sistólico (V_{max}) foi observado na carótida interna e artérias oftálmicas durante o período de seis meses de TRH. Essa pesquisa confirmou os efeitos positivos da TRH nas artérias uterina e carótida interna, sendo também avaliadas as repercussões nas artérias oftálmicas. Não houve diferença entre as mulheres que começaram terapia de reposição vários anos após a menopausa e aquelas que o fizeram nos primeiros 12 meses após esse evento.

Van Baal *et al.* (1999) investigaram os efeitos da terapia de reposição hormonal combinada sequencial nos IPs de diferentes leitos vasculares por meio do doppler colorido - artéria uterina, central da retina e artéria oftálmica. As pacientes selecionadas (n=30) eram saudáveis, não histerectomizadas, estando em menopausa (idade média - 52±3 anos). Foram aleatoriamente separadas em dois grupos: um recebeu terapia de reposição hormonal combinada sequencial durante 12 meses e o outro não recebeu medicação (grupo-controle) durante o mesmo período. O IP foi determinado pelo doppler duas vezes, isoladamente, à esquerda e à direita, para cada artéria. Não houve diferença estatística nas medidas dos dois lados, portanto, foi utilizada para as análises a média dos IPs. As análises durante 12 meses revelaram decréscimo significativo do IP nas artérias uterina (39%) e central da retina (29%) no grupo que recebeu terapia de reposição hormonal, comparado ao grupo-controle. Não foram observadas mudanças significativas nos IPs das artérias oftálmicas.

Ao investigar os efeitos das variações fisiológicas induzidas pelo estradiol sérico na hemodinâmica cerebral, Diomedi *et al.* (2001) pesquisaram a reatividade cerebrovascular em estado de hipercapnia induzida por meio da ultrassonografia com doppler da artéria cerebral média direita de 20 mulheres jovens durante o período menstrual e ovulatório. Os dados foram comparados aos de 20 homens na mesma faixa etária. A vasoatividade arterial foi significativamente mais elevada nas mulheres no período ovulatório do que no menstrual. Nos homens, os valores foram semelhantes aos das mulheres no período menstrual. Os autores sugeriram que o estrogênio talvez interfira na capacidade de adaptação do sistema cerebrovascular.

Krejza *et al.* (2004) acompanharam 14 mulheres (idade 23-25 anos) durante todo o ciclo menstrual, medindo o IP e correlacionando-o com as concentrações plasmáticas de estradiol. A concentração de estradiol aumentou na fase folicular do ciclo e alcançou o pico de 140-300 pg/mL nos dias 13-14, enquanto a concentração de progesterona permaneceu baixa (<1 ng/mL). Simultaneamente à elevação da concentração de estradiol, o IP da artéria carótida interna diminuiu aproximadamente 11% no 13º dia do ciclo e no 14º diminuiu 7% do nível inicial ($r=-0,41$, $p<0,05$). De forma contrária, o IP da artéria carótida externa tendeu a elevar-se durante o pico de concentração do 17β estradiol. Não houve mudança significativa no IP da artéria carótida comum.

Concluíram que a resistência vascular cerebral em mulheres jovens é modulada pelas concentrações de 17β estradiol durante o ciclo menstrual.

Um grupo de 43 mulheres menopausadas foi cirurgicamente estudado por Zegura *et al.* (2003) antes e após 28 semanas de estrogênio-terapia, aleatorizadas em dois grupos de administração (transdérmica e oral). Perceberam, a partir da FMD, que ambos os grupos tiveram a dilatação endotélio-dependente melhorada ($p < 0,001$), demonstrando que os estrogênios têm boa ação sobre a função endotelial tanto por via oral quanto transdérmica.

Já Gilligan *et al.*, em 1994b, avaliaram a função endotelial em 20 mulheres menopausadas com histórico de doença cardiovascular em comparação com 20 mulheres menopausadas saudáveis. Após a administração de acetilcolina venosa buscando vasodilatação da artéria braquial avaliada pela ultrassonografia (FMD), apuraram que nas pacientes portadoras de doenças (hipertensão, hipercolesterolemia, diabetes e doença coronariana) não houve resposta vasodilatadora, porém, após a administração de 17β -estradiol por via venosa até se alcançar níveis séricos compatíveis com mulheres no menacme ($\pm 300\text{pg/mL}$), a resposta vasodilatadora foi significativamente melhor quando ocorreu administração de acetilcolina e também de nitroprussiato ($p < 0,001$).

Em 1996, McCrohon *et al.* realizaram estudo bem mais expressivo com 135 mulheres, sendo que 40 delas eram climatéricas pré-menopausa, 40 eram menopausadas e nunca haviam usado terapia hormonal (TH) e 55 eram menopausadas com pelo menos dois anos de TH, Destas, 40 estavam usando estrogênios puros e 15 usavam estrogênios em combinação com progesterona. Os resultados de FMD do grupo 2 eram significativamente menores que do grupo 1 ($p < 0,001$); e o grupo 3 apresentou resultados também melhores que o grupo 2 ($p = 0,01$), sem diferença estatística entre o grupo de estrogênio-terapia e o de terapia combinada.

Em ensaio duplo-cego e randomizado, Koh *et al.* (2001) analisaram a resposta vasodilatadora induzida por isquemia em 20 mulheres menopausadas que não tinham qualquer fator de risco para doença vascular, tratadas com estrogênios conjugados 0,625 mg associados a 10 mg de acetato de medroxiprogesterona em um grupo e estrogênios conjugados associados a 200 mg de progesterona natural micronizada em outro, pelo período de dois meses, a fim de determinar se progestágenos sintéticos comprometeriam a função

vasodilatadora dos estrogênios, obtendo melhora da porcentagem de vasodilatação em ambos os grupos ($p=0,004$), sem diferença entre eles ($p=0,863$).

Na tentativa de demonstrar que os fatores inflamatórios, vasoconstritores e aderentes plaquetários tinham importância central na proteção vascular dos estrogênios, Ylikorkala *et al.* (1998) dosaram os níveis de endotelina-1, nitrato (como marcador do NO), prostaciclina e tromboxano A₂ em 42 pacientes menopausadas, não fumantes, em terapia hormonal oral combinada, em comparação com 10 fumantes, em terapia estrogênica transdérmica, pelo período de um ano. As pacientes fumantes tinham níveis significativamente mais elevados dos marcadores de risco estudados, que sofreram diminuição após seis meses de terapia hormonal, porém não houve redução dos marcadores para as pacientes saudáveis, concluindo-se que os marcadores não participam de forma importante no mecanismo de proteção cardiovascular promovido pela terapia hormonal estrogênica.

Recentemente, Akman *et al.* (2013) estudaram ação estrogênica por meio da FMD em 62 mulheres menopausadas saudáveis, após seis meses de terapia hormonal em cinco diferentes grupos de tratamento (estrogênios conjugados, estrogênios conjugados + acetato de medroxiprogesterona, raloxifeno, tibolona e placebo). Constataram significativa elevação da vasodilatação nos grupos de estrogênios e de raloxifeno em comparação aos demais grupos ($p=0,001$), demonstrando que a FMD também é capaz de evidenciar clinicamente a melhora da função vasodilatadora endotelial dos estrogênios.

A incidência de doenças cardiovasculares é maior em homens que em mulheres e aumenta com a idade em ambos os sexos. O período de diferença médio entre o início das manifestações de problemas coronarianos observadas em mulheres pré-menopausadas e homens da mesma idade é de 10 anos (DUBEY *et al.*, 2005). A mesma diferença também é detectada quando se comparam mulheres menopausadas e aquele no menacme (CLARKSON, 2007). Estrogênios circulantes durante a fase reprodutiva foram indicados como o fator mais provável para determinar essa diferença marcante, às vezes chegando a ser cogitada como fator de proteção cardiovascular (ISLES *et al.*, 1992).

Diversos ensaios clínicos foram realizados no início dos anos 1990, com conclusões sugerindo que a terapia hormonal estrogênica funciona com efeito

protetor contra o risco cardiovascular (BARRET-CONNOR; BUSH, 1991; GRODSTEIN *et al.*, 1996; 2000; HENDERSON; PAGANINI-HILL; ROSS, 1991; WOLF *et al.*, 1991). Essa convicção sugerida pelos estudos iniciais começou a ser questionada somente no final da mesma década pelo estudo *Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study* (HERS), primeiro ensaio clínico randomizado e placebo-controlado desenhado com o objetivo específico de testar a proteção cardiovascular (HULLEY *et al.*, 1998). Os quatro ensaios seguintes acabaram de arrasar com a impressão de que a terapia estrogênica traria benefícios cardiovasculares cardíacos e/ou cerebrais (CLARKE *et al.*, 2002; HERRINGTON; REBOUSSIN; BROSNIHAN, 2000; ROSSOUW; ANDERSON; PRENTICE, 2002; VISCOLI *et al.*, 2001) e ainda evidenciaram elevação do risco de câncer de mama (YAGER; DAVIDSON, 2006).

Depois disso, outros estudos demonstraram que a transição menopáusicas e os primeiros anos de pós-menopausa interferem de forma independente sobre alguns fatores de risco cardiovascular, como: alterações do perfil lipídico (elevação do colesterol-LDL e dos triglicérides), ganho de peso, mudança na distribuição da gordura corporal com concentração central e elevação dos níveis séricos de insulina e glicose (CHO *et al.*, 2008; KOLOVOU; BILIANOU, 2008; WING *et al.*, 1991).

A grande questão que continua a intrigar os pesquisadores é: se existem evidências científicas de que a deficiência estrogênica aumenta o risco cardiovascular e se existem evidências de que o uso de estrogênios na pós-menopausa promove diminuição do colesterol-LDL (USHIODA *et al.*, 2006), diminuição da resistência à insulina (SUMINO; ICHIKAWA; ITOH, 2003) e ação vasodilatadora direta sobre a parede vascular (ORSHAL; KHALIL, 2004), por que os ensaios clínicos falharam em comprovar o efeito protetor cardiovascular?

O QUADRO 1 lista um resumo dos resultados de Reslan e Khalil (2012), que compararam todos os ensaios clínicos randomizados controlados (RCTs) realizados a respeito do risco cardiovascular em pacientes menopausadas em uso de TH. Segundo a conclusão desses autores, a resposta para a divergência entre os resultados dos estudos sobre parâmetros cardiovasculares isolados e os ensaios clínicos que se realizaram posteriormente pode estar nas diferenças metodológicas que esses ensaios tiveram entre si. São elas: a) idade no início da TRH; b) tempo de menopausa prévio ao início da TRH; c) tipo de TRH; d)

dosagem e via de administração; e) interação dos estrogênios com outros hormônios esteroides.

QUADRO 1 - Ensaio clínico sobre ação estrogênica *versus* risco cardiovascular
- continua

Ensaio	Tipo	Pacientes (n)	média de follow-up	TRH	Via	Conclusão	Autor
PEPI	R DC PC MC	875	3anos	EEC ou EEC + P4	oral	E2 combinado ou não melhora lipoproteínas e níveis de fibrinogênio em menopausadas	Stefanick <i>et al.</i> , 1995
HERS	R DC	2.763	4,1anos	EEC + P4	oral	Não houve redução na incidência de episódios de CVD em pacientes com diagnósticos prévio de doença coronariana	Hulley <i>et al.</i> , 1998
HERS II	R DC PC	2.321	6,8anos	EEC + P4	oral	TRH não diminuiu o risco de CVD	Grady <i>et al.</i> , 1992
HERS-UA	R DC PC	2.763	4,1anos	EEC + P4	oral	Os níveis de ácido úrico diminuíram, mas não a incidência de CVD	Simon <i>et al.</i> , 2006
WHI	R DC	16.608	5,2anos	EEC + P4	oral	Risco geral de saúde excedeu os benefícios para CVD em mulheres menopausadas	Rossouw, Anderson e Prentice, 2002
WEST	R DC PC	664	2,8anos	E2	oral	Em pacientes menopausadas com histórico de AVC, uso de E2 não diminuiu a recorrência	Viscoli <i>et al.</i> , 2001
PHOREA	R DC PC	321	48semanas	E2, E2 + P4 (gestodeno)	oral	Não houve benefício para mulheres acima de 55 anos com diagnóstico de aterosclerose	Angerer <i>et al.</i> , 2001
ERA	R DC PC	309	3,2anos	EEC ou EEC + P4	oral	Angiografia não evidenciou diferença na progressão da doença	Herrington, Reboussin e Brosnihan, 2000

QUADRO 1 - Ensaios clínicos sobre ação estrogênica *versus* risco cardiovascular
- concluí

Ensaio	Tipo	Pacientes (n)	Média de <i>follow-up</i>	TRH	Via	Conclusão	Autor
WISDOM	R DC PC MC	5692	10anos	EEC ou EEC + AMP	oral	TRH aumenta a incidência de CVD e TVP quando iniciada após muitos anos de menopausa	Vickers <i>et al.</i> , 2007
WAVE	R DC PC	423	2,8anos	EEC ou EEC + MPA Vit. C e E	oral	Não houve benefício da TRH nem das vit. C e E quando estenose coronária 15-75%	Waters <i>et al.</i> , 2002
ESTHER	caso-controle MC	881 271/ 610	6anos	E2 + P4	oral vs. trans d	E2 oral eleva risco de TVP, mas transdérmico não altera. Progestágenos não alteram o risco	Canonico <i>et al.</i> , 2007
RUTH	R DC PC MC	10.101	5,6anos	Raloxifeno	oral	Raloxifeno não altera o risco	Barret-Connor e Bush, 2006
EPAT	R DC PC	222	2anos	E2	oral	A média de velocidade de progressão da aterosclerose foi menor no grupo de TRH	Hwang <i>et al.</i> , 2005

Fonte: Reslan e Khalil (2012).

A lição mais relevante demonstrada pela revisão integrativa de Reslan e Khalil (2012) foi a de que o período de início para TH deve ser o mais precoce possível, próximo da menopausa. Se é permitido intervalo entre a menopausa e o início da reposição, a aterosclerose que se desenvolve silenciosamente durante esse intervalo elevará a incidência de acidentes cardiovasculares nos primeiros dois anos de terapia, uma vez que os estrogênios ativarão os mecanismos endoteliais em um leito vascular já acometido por doença cardiovascular. Acredita-se que o início imediato possa promover resultados clínicos positivos no que se refere à prevenção de morbidade e mortalidade cardiovascular na menopausa.

Apenas três questões restam, portanto, serem esclarecidas com ensaios clínicos. Primeiramente, se o início precoce da TH, previamente à instalação de doença aterosclerótica arterial, será capaz de prevenir a evolução dessa doença, trazendo benefício vascular real. Segundo, se as terapias hormonais

administradas por via oral e por via transdérmica terão a mesma eficácia na prevenção de tais doenças. Finalmente, qual o tempo mínimo necessário de uso de estrogênios para demonstrar variação na função endotelial.

2 OBJETIVO

Detectar o efeito da terapia hormonal estrogênica de curta duração sobre a função endotelial de pacientes climatéricas saudáveis por meio da dilatação fluxomediada da artéria braquial (FMD).

3 METODOLOGIA

3.1 Desenho do estudo

Trata-se de um ensaio clínico randomizado duplo-cego prospectivo de avaliação da interferência dos estrogênios conjugados sobre a função endotelial de mulheres menopausadas a partir da medida da FMD da artéria braquial antes e após o uso de terapia hormonal estrogênica.

Este estudo foi aprovado 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) e registrado no banco de dados do *National Institutes of Health* (NIH) para ensaios clínicos: *Clinicaltrials.gov* sob o número NCT01482416.

3.2 Pacientes

A população estudada foi proveniente do ambulatório de Climatério do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG) durante o período de fevereiro de 2011 a julho de 2014.

Todas as pacientes acompanhadas concordaram em participar de forma voluntária deste estudo, a partir da assinatura no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (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 da aceitação sobre os cuidados médicos oferecidos pelo serviço de climatério do HC-UFMG. Somente após o devido aceite aquelas pacientes que assim optaram foram recrutadas e aleatorizadas para comporem um dos grupos de estudo

3.2.1 Critérios de inclusão

- a) Pacientes com sintomas de climatério (fogachos, insônia, oligomenorreia ou amenorreia há no mínimo seis meses, astenia, dor óssea, diminuição da libido, ganho de peso).
- b) Pacientes com dosagem sérica de FSH > 30 mUI/mL e estradiol < 40 pg/mL.
- c) Pacientes sem uso de medicamento com potencial efeito vascular.
- d) Pacientes sem uso prévio ou atual de terapia de reposição hormonal.
- e) Autorização e conscientização prévia da paciente sobre o presente estudo.

3.2.2 Critérios de exclusão

- a) Paciente tabagista (mais de 10 cigarros ao dia).
- b) Paciente com pressão arterial (PA) > 160/90 mmHg.
- c) Paciente com diagnóstico ou histórico de carcinoma de mama ou endométrio.
- d) Paciente com diagnóstico de doença reumatológica.
- e) Paciente com história de infarto agudo do miocárdio.
- f) Paciente com diabetes *mellitus*.
- g) Paciente com lesão hepática e/ou comprometimento da função hepática.
- h) Paciente com tromboflebite ativa e/ou história de fenômenos tromboembólicos.

3.3 Métodos

3.3.1 Terapia hormonal

Durante a primeira consulta, foi realizada de forma sistemática, pelo mesmo examinador, a avaliação inicial, compreendida como anamnese e exame físico, incluídas a medida da pressão arterial, frequência cardíaca (FC), peso e estatura.

Por ocasião dessa primeira avaliação eram solicitados exames complementares, de acordo com o protocolo de rotinas para pacientes em climatério que inclui:

- a) Dosagens laboratoriais de FSH, estradiol, ureia, creatinina, tiroxina tetraiodotironina (T4) livre, hormônio estimulante da tireoide (TSH), colesterol total e fracionado, triglicérides, glicemia de jejum, hemograma completo, urinálise.
- b) Citologia oncológica.
- c) Mamografia digital bilateral
- d) Ultrassonografia endovaginal

Após a avaliação inicial e análise dos exames complementares, procedeu-se à identificação das potenciais participantes de acordo com os critérios de inclusão e exclusão previamente estabelecidos e a orientação quanto à participação ou não no estudo. A aleatorização subsequente das pacientes recrutadas separou-as em dois grupos a serem estudados comparativamente: um grupo em uso de terapia estrogênica e um grupo recebendo placebo. Tal randomização foi feita com base no método de envelope, gerado por computador, e os dados individuais de cada paciente foram registrados em documento próprio (APÊNDICE B): ficha de anamnese, exame físico e exames complementares.

As pacientes, após alocação em grupos e realização do primeiro exame de FMD, foram orientadas a ingerir uma unidade de medicação diariamente por 28 dias consecutivos e retornar para uma segunda avaliação de FMD. No primeiro grupo, as drágeas continham 0,625 mg de estrogênios equinos conjugados, e no segundo grupo, as cápsulas eram preenchidas com 0,3 mg de celulose liofilizada. As medicações eram entregues às pacientes em recipientes opacos externamente idênticos não rotulados a fim de garantir que os pacientes não tivessem conhecimento sobre que substância estariam ingerindo.

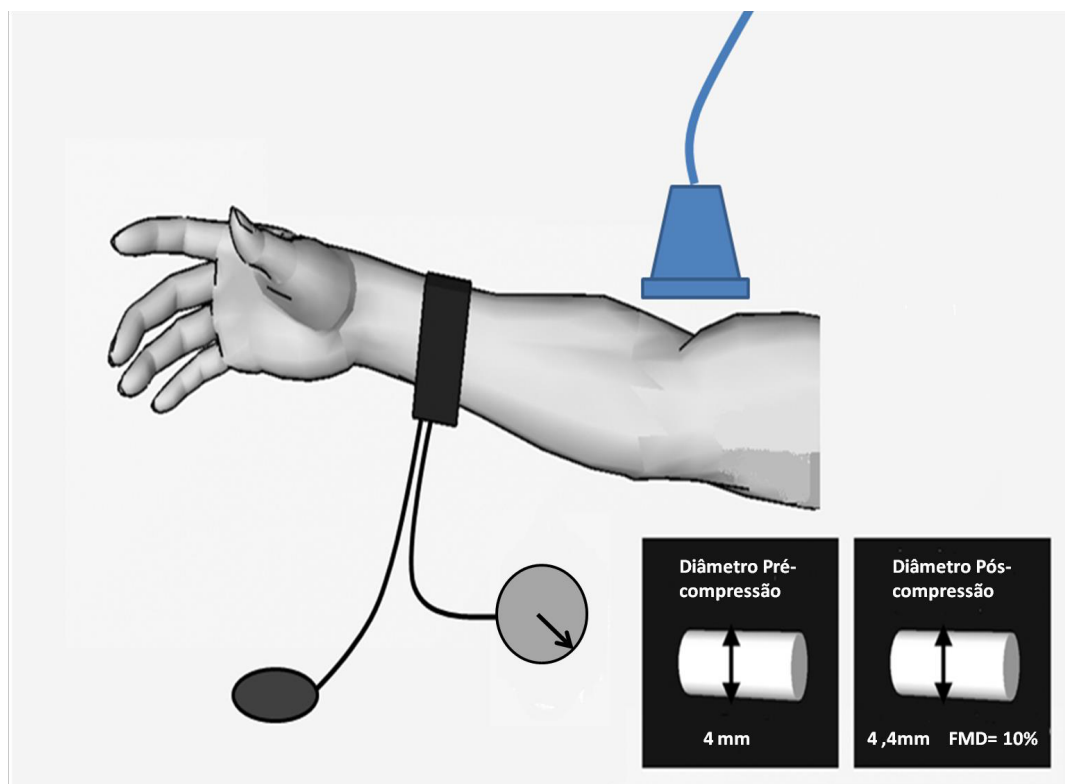
3.3.2 Dilatação fluxomediada da artéria braquial (FMD)

A medida da FMD da artéria braquial foi feita por um segundo profissional médico, o qual não tinha acesso à informação sobre o tipo de medicação em uso pelas pacientes, conforme as recomendações da *American Heart Association* (RYAN *et al.*, 2010): com a paciente em decúbito dorsal, após repouso de 10 minutos, toma-se a FC e verifica-se a temperatura ambiente. Inicialmente procedeu-se à identificação da artéria braquial medialmente na fossa antecubital do membro superior direito e seguiu-se com a detecção ultrassonográfica da mesma. Buscou-se a melhor imagem ultrassonográfica longitudinal da artéria braquial ao final da diástole, com transdutor linear de 7,5 MHz. Foi medido o diâmetro da artéria a partir do posicionamento do calíper na face interna da parede do vaso, em três pontos distintos com 1,0 centímetro de distância entre eles, sendo que 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 250 mmHg de pressão por cinco minutos a fim de promover isquemia, seguida de esvaziamento do manguito vagarosamente. Observou-se intervalo de um minuto para a realização de nova medida em três pontos da artéria braquial.

O valor da FMD foi obtido com base no cálculo da seguinte fórmula: FMD (%) = $[(D2 - D1)/D1] \times 100$, onde D1 = diâmetro basal e D2 = diâmetro pós-oclusão.

FIGURA 4 – Diagrama de medida da FMD



Fonte: Brandão (2012).

3.4 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 uma diferença absoluta de 2% na FMD medida conforme sugerido pelo estudo de Bechlioulis *et al.*, 2010. Estimando erro alfa de 5% e poder do teste de 0,80, ficou estimado que seriam necessárias 30 pacientes em cada grupo (BRANDÃO *et al.*, 2010; SALOMÃO, 2012; TAKASE *et al.*, 2003).

A análise estatística foi feita no *software Statistical Package for Social Sciences version 20.0* (SPSS; Chicago, IL, EUA).

O teste para normalidade de Shapiro-Wilk verificou a normalidade de todas as variáveis numéricas contínuas. Como elas não obedeciam à distribuição normal, para comparação entre grupos distintos utilizou-se o teste de Mann-Whitney para variáveis não paramétricas. Para a análise descritiva de variáveis sem distribuição normal, os resultados foram expressos na forma de mediana e

limites.

A categorização da variável FMD calculada (FMDc) foi realizada de acordo com a seguinte regra: denominado “aumento” quando valores encontrados eram superiores a 0,01 e “ausência de aumento” quando os valores se mostraram inferiores a esse corte. A variável categórica foi então avaliada de acordo com as suas frequências absoluta e relativa. Para tal, utilizou-se o teste qui-quadrado de Pearson.

4 RESULTADOS

Durante o período de fevereiro de 2011 e julho de 2014, foram atendidas 542 mulheres no ambulatório de climatério do Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da UFMG. Apenas 69 dessas mulheres atendiam aos critérios de inclusão e exclusão estabelecidos para realização deste estudo. Dessas, 64 aceitaram participar assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. As 64 pacientes foram separadas aleatoriamente em dois grupos. No primeiro, elas mulheres tiveram o FMD medido antes e após tratamento com estrogênios conjugados (n=32); e no segundo, as mulheres tiveram o FMD medido antes e após tratamento com placebo (n=32).

A idade média das pacientes do grupo de estudo foi de $52,48 \pm 4,39$ anos, e do grupo-controle $51,31 \pm 4,57$ anos ($p=0,808$). O teste de normalidade de Shapiro-Wilk realizado para a idade confirma que a distribuição foi normal, com valor de $p=0,729$. O índice de massa corporal (IMC) das pacientes dos dois grupos também foi comparável, com medianas de $27,79 \text{ kg/m}^2$, variando de 19,54 a 37,53 no grupo de estrogênios e $28,73 \text{ kg/m}^2$, variando de 19,05 a 43,85 ($p=0,891$), no grupo-controle (TAB. 1). Da mesma forma, a média de tempo de menopausa foi semelhante entre os grupos, sendo de $4,84 \pm 4,81$ anos no grupo de estudo e $5,06 \pm 5,75$ anos no grupo-placebo ($p=0,724$).

TABELA 1 – Dados epidemiológicos das pacientes submetidas a dilatação mediada por fluxo (FMD) em terapia com estrogênio conjugados ou placebo

Grupos	Estrogênios Conjugados	Placebo
n	32	32
Idade (anos) ^a	$52,48 \pm 4,39$	$51,31 \pm 4,57$
IMC (Kg/m²) ^b	$27,79$ (19,54 – 37,53)	$28,73$ (19,05 – 43,85)
Tempo de Menopausa (anos) ^a	$4,84 \pm 4,81$	$5,06 \pm 5,75$

a (média \pm desvio-padrão - DP) b (mediana e limites).

No grupo de pacientes que fez uso de estrogênios conjugados, apenas uma paciente era nuligesta, sendo que a maioria tinha histórico de duas ou três gestações anteriores. O grupo de pacientes que fez uso de placebo também se

concentrou na faixa entre duas e três gestações prévias, com a diferença de que nesse grupo havia sete pacientes nuligestas.

Os valores obtidos de FMD apresentaram aumento significativo no grupo de pacientes que fez uso de estrogênios quando comparados os resultados antes e após o uso de medicação, ao contrário do observado no grupo-placebo (TAB. 2). O teste de Mann-Whitney para variáveis não paramétricas demonstrou que o FMD calculado foi significativamente mais elevado no grupo dos estrogênios ($p=0,025$).

TABELA 2 – Valores obtidos da dilatação mediada por fluxo (FMD) e comparação entre as pacientes submetidas a terapia com estrogênios conjugados (EEC) e placebo pelo teste de Mann-Whitney

	EEC (n=32)	Placebo (n=32)	<i>p</i>
FMD pré-tratamento	0,064 ± 0,09	0,13 ± 0,19	0,079
FMD pós-tratamento	0,083 ± 0,09	0,05 ± 0,07	0,053
FMD calculado	0,011	- 0,082	0,025

(média ± desvio-padrão - DP)

Após a categorização dos valores de FMD calculado em duas variáveis denominadas “aumento” e “ausência de aumento” para ambos os grupos, foi realizado o teste de qui-quadrado de Pearson para variáveis categóricas, que confirmou diferença estatisticamente significativa, com $p=0,023$ (TAB. 3).

TABELA 3 – Análise estatística após categorização dos resultados de dilatação mediada por fluxo (FMD) em pacientes submetidas a terapia com estrogênios conjugados (EEC) e placebo

		EEC	Placebo	Total	<i>p</i>
FMD calculado	Aumento	18	9	27	0,023
	Ausência de aumento	14	23	37	
Total		32	32	64	

5 DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou, provavelmente pela primeira vez, que o uso de estrogênios conjugados por via oral, pelo período de apenas 28 dias, em mulheres no climatério determina melhora na função endotelial detectada através de vasodilatação endotélio dependente.

O número de pacientes alocado em cada grupo respeitou o mínimo calculado para uma amostra adequada (30), a fim de se testar a hipótese de que os estrogênios determinariam mudança na função endotelial, representada por aumento do valor calculado de FMD, ao contrário de estudos anteriores, como os de Perregaux *et al.* (1999) e Koh *et al.* (2001).

A idade das pacientes do grupo de estudo foi de 52,48 +/- 4,39 anos e do grupo-controle foi de 51,31 +/- 4,57 anos. Apesar de ser difícil separar o que seriam alterações vasculares determinadas pela menopausa daquelas determinadas pela idade, estudos comparativos entre homens e mulheres menopausadas, pareados por idade, sugerem que o estrogênio é capaz de adiar as alterações endoteliais que aumentam o risco cardiovascular (DUBEY *et al.*, 2005). Supõe-se que essas alterações estrogênio-dependentes relacionadas à idade sejam devidas à metilação de uma região promotora do gene de receptor estrogênico alfa (α -ER), rica em citosina e guanina, denominada "ilha CpG". Tal metilação desempenha o mais importante mecanismo de *down regulation* para expressão desse gene e tem relação direta com a idade, segundo Post, Goldschmidt-Clermont e Wilhide (1999), Kim, Kim e Song (2007) e Meyer, Haas e Barton (2008).

O envelhecimento estrutural da parede vascular, causado pela diminuição de elastina e aumento de colágeno na composição da matriz, determina enrijecimento e diminuição da capacidade de contração da musculatura lisa vascular, sendo, portanto, mais um fator relacionado à idade de piora da vasodilatação, inclusive daquela mediada por NO (McGRATH *et al.*, 1998; SEROCK; WELLS; KHALIL, 2008). Além disso, sabe-se que a maioria dos agentes hipertensivos endógenos tem sua síntese aumentada com o avanço da

idade, assim como os agentes anti-hipertensivos tem seus níveis plasmáticos diminuídos com o passar dos anos. Como a hipertensão arterial é o principal promotor da aceleração do desenvolvimento de aterosclerose, fenômenos cardiovasculares de alta morbimortalidade tendem a se desenvolver também nessa faixa etária (RECKELHOFF; FORTEPIANI, 2004).

Optou-se pela inclusão somente de pacientes menopausadas há menos de 10 anos, porque é justamente nesse período inicial de deficiência estrogênica que ocorrem as alterações de função endotelial que promovem o desenvolvimento da aterosclerose e, conseqüentemente elevam o risco cardiovascular, conforme observaram Sutton-Tyrrel *et al.* (1998), Christian *et al.* (2006) e Serock, Wells e Khalil (2008). Sabe-se também que esse período inicial é crítico para qualquer tipo de menopausa, natural ou cirúrgica (MACK *et al.*, 2004).

Estudos anteriores, como o *Nurse's Health Study*, no qual 80% das pacientes tinham período pós-menopausa superior a dois anos, e outros ensaios clínicos, como o HERS, no qual a média de período pós-menopausa foi de 23 anos, e o *Estrogen in the Prevention of Atherosclerosis Trial* (EPAT), com média de 13 anos de menopausa, não demonstraram proteção cardiovascular. Pelo contrário, evidenciaram aumento do risco de episódios agudos com alta morbidade e mortalidade. Já o *Women's Health Initiative* (WHI), que supostamente devia ter selecionado pacientes saudáveis, tinha mais de 2/3 de suas pacientes obesas, sendo que 36% eram hipertensas, 13% estavam sendo tratadas para hipercolesterolemia, 4,4% eram diabéticas e 10,5% eram fumantes. Apesar de considerável número de pacientes no WHI estar dentro de um período pós-menopausa mais próximo do que se considera adequado (10% tinham entre 50 e 54 anos e 20% entre 54 e 59 anos), não se pode reconhecer os resultados como conclusivos para risco cardiovascular, uma vez que havia muitas variáveis interferindo na função vascular endotelial (MANSON; HSIA; JOHNSON, 2003). Em nosso ensaio, como a idade das pacientes dos dois grupos foi semelhante, não houve interferência dessa variável sobre os resultados obtidos.

Estudos anteriores já haviam comprovado a ação dos EECs sobre a função endotelial, tanto por via oral como transdérmica (SEROCK; WELLS; KHALIL, 2008), o que impulsionou à escolha desse tipo de estrogênio em vez de outras formas sintéticas como o etinilestradiol, o valerato de estradiol e o estradiol

esterificado que, em teoria, também seriam benéficos na diminuição do risco cardiovascular (LEMAITRE *et al.*, 2006).

O método de avaliação da função vascular utilizado neste estudo, a dilatação mediada por fluxo (FMD), é considerado padrão-ouro para esse fim desde a década de 1990, por ser não invasivo, reprodutível e seguro, conforme relataram Correti *et al.* (2002). Esse método permite avaliar a ação de substâncias vasodilatadoras sobre a parede vascular determinada pelo NO (função endotelial), diferenciando-se, portanto, da dopplerfluxometria, que é capaz de evidenciar somente a presença ou não de vasodilatação, sem distinção entre dilatação endotélio-dependente e não endotélio-dependente.

Os ensaios clínicos que avaliaram a interferência dos estrogênios diretamente na vasodilatação de mulheres menopausadas foram iniciados por Bourne (1990), seguidos por Gangar *et al.* (1991) e aprimorados por Arora *et al.* (1998), utilizando a dopplerfluxometria. Já o primeiro estudo realizado com o intuito de testar especificamente a resposta vasodilatadora endotélio-dependente em mulheres menopausadas em comparação com mulheres menopausadas tratadas com estrogênios foi realizado por Perregaux (1999). As limitações de sua pesquisa foram a falta de padronização do método de medida da dilatação vascular pós-isquemia (FMD) e o reduzido número de pacientes estudadas (19, sendo 11 em uso de estrogênios de reposição). Em 1996, McCrohon fez estudo comparativo de FMD em mulheres menopausadas com e sem uso de estrogênio-terapia, com número de pacientes bem mais expressivo (135). Nesse estudo, no entanto, as pacientes do grupo de estudo já faziam uso de TH há pelo menos dois anos e infelizmente não havia informação sobre o período pós-menopausa transcorrido para as mulheres sem uso de estrogênios.

Mais tarde, Koh *et al.* (2001) investigaram a resposta vasodilatadora por FMD em dois grupos de 20 mulheres menopausadas, sendo que no primeiro os estrogênios conjugados eram associados a acetato de medroxiprogesterona e no segundo eles foram associados à progesterona natural micronizada. O objetivo deste estudo foi determinar se os progestágenos sintéticos trariam interferência ao benefício trazido pelos estrogênios. O tempo de uso de medicação em ambos os grupos foi de dois meses.

Recentemente, Akman *et al.* (2013) demonstraram, em estudo prospectivo e controlado, que após seis meses de terapia estrogênica, assim como no uso de

raloxifeno, a função endotelial apresentou significativa melhora ($p=0,001$) também utilizando a medida de FMD.

Nenhum ensaio clínico até o momento havia testado a ação dos estrogênios conjugados sobre a função endotelial por período de tempo reduzido. Faria, De Souza e Geber (2011) estudaram a ação estrogênica sobre a vasodilatação, mas não especificamente aquela relacionada à função endotelial. Aquele estudo usou a dopplerfluxometria da artéria central da retina, com resultados demonstrando melhora do grau de dilatação nas pacientes tratadas com estrogênios em comparação às tratadas com placebo. É importante destacar como fator que confere força metodológica ao presente estudo, assim como no estudo de Faria, De Souza e Geber (2011), o fato de terem sido realizados de forma prospectiva, randomizada, duplo-cega e controlada com placebo, sobre dois grupos comparáveis de pacientes sem qualquer histórico ou evidência laboratorial de doenças que afetam a função endotelial.

As pacientes no grupo de estudo e no grupo-controle foram comparadas em relação às variáveis que poderiam interferir na sua função endotelial, como idade ($p=0,808$), tempo de menopausa ($p=0,724$), raça ($p=0,617$) e IMC ($p=0,891$). E nenhuma dessas características revelou diferença estatística, o que demonstra alto grau de homogeneidade entre os grupos. Além disso, de forma inédita as pacientes foram selecionadas para inclusão no estudo de modo a não apresentarem qualquer doença crônica ou comportamento de risco, como o tabagismo, que pudesse influenciar a função endotelial.

Os resultados da comparação pelo teste de Mann-Whitney dos valores de FMD previamente ($0,011$) e após o uso de estrogênios ($-0,081$) evidenciaram de maneira significativa ($p=0,025$) que a terapia estrogênica acentua a vasodilatação endotélio-dependente. A categorização dos resultados em presença ou ausência de melhora da vasodilatação, testada pelo teste de qui-quadrado de Pearson, reforçou tal evidência estatística ($p=0,023$). Esses resultados são concordantes com estudos similares realizados anteriormente por McCrohon (1996), Koh *et al.* (2001) e Akman *et al.* (2013), que utilizaram também a FMD, porém com mais tempo de utilização do estrogênio. Também estão de acordo com outros que utilizaram dopplerfluxometria, como Perregaux (1999), Battaglia *et al.* (1999), Van Baal *et al.* (1999) e Faria, De Souza e Geber (2011).

Para o nosso conhecimento, este é o primeiro ensaio clínico realizado com período de tratamento de apenas 28 dias que conseguiu comprovar a efetividade da terapia estrogênica sobre a função endotelial de vasos conduítes. O aumento da vasodilatação observado com esse curto período de terapia estrogênica assegura que os mecanismos estrogênio-dependentes de produção de NO podem ser rapidamente ativados a fim de reverter os efeitos deletérios da privação estrogênica sobre a função endotelial determinada pela menopausa, como sugeriram Smiley e Khalil, 2009.

Resta esclarecer se o uso de estrogênios na menopausa pode ser indicado de forma segura para diminuição do risco cardiovascular, reduzindo a incidência dos episódios agudos cardiovasculares e a morbimortalidade aos níveis observados durante o menacme.

Baseados em nossos resultados, pode-se sugerir que os próximos ensaios clínicos que venham a ser realizados com o propósito de definir a interferência da estrogenerioterapia sobre o risco cardiovascular sigam critérios metodológicos estritos, como: tempo de menopausa reduzido (idealmente inferior a cinco anos) e pareamento dos grupos de estudo e controle para variáveis que influenciam na resposta endotelial, como idade, IMC, comorbidades e tabagismo. Acima de tudo, pode-se inferir que os parâmetros endoteliais a serem avaliados nesses estudos futuros poderão ser medidos após apenas 28 dias de estrogenerioterapia, período definido neste trabalho como suficiente para alterar positivamente a capacidade vasodilatadora endotélio-dependente.

6 CONCLUSÃO

O uso de estrogênios conjugados na dose de 0,625 mg ao dia por apenas 28 dias é capaz de causar vasodilatação endotélio mediada em pacientes climatéricas, detectável através da dilatação mediada por fluxo (FMD).

REFERÊNCIAS

- AKMAN, L. *et al.* The effects of different hormone treatment on endothelial function in healthy postmenopausal women. **Gynecol Endocrinol**, v. 29, n. 9, p. 867-72, 2013.
- ALLEN E, DOISY EA. An ovarian hormone. Preliminary report on its localization, extraction and partial purification, and action in test animals. **JAMA**, V. 250, n. 19, p. 2681-3, 1983. Landmark article Sept 8, 1923.
- ARAÚJO, L.F. *et al.* Effect of conjugated equine estrogens and tamoxifen administration on thyroid gland histomorphology of the rat. São Paulo: **Clinics**, v. 61, p. 321-6, 2006.
- ARORA, S. *et al.* Estrogen improves endothelial function. **J Vasc Surg**, V. 27, n. 6, p. 1141-6; 1147, 1998.
- BANCSI, L.F. *et al.* Predictors of poor ovarian response in in vitro fertilization: a prospective study comparing basal markers of ovarian reserve. **Fertil Steril**, v. 77, p. 328, 2002.
- BARRETT-CONNOR, E.; BUSH, T.L. Estrogen and coronary heart disease in women. **JAMA**, v. 265, p. 1861-7, 1991.
- BATH, F.J.; BUTTERWORTH, R.J.; BATH, P.M. Nitric Oxide donors (nitrates), L-arginine, or nitric oxide synthase inhibitors for acute stroke. **Cochrane Database Syst Rev**. 4: CD000398, 2002.
- BATTAGLIA, C. *et al.* Uterine and cerebral vascularization in postmenopausal women treated with hormone-replacement therapy. **Gynecol Endocrinol**, v. 13, p. 223-9, 1999.
- BEATO, M.; SANCHEZ-PACHECO, A. Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex. **Endocr Rev**, v. 17, p. 587, 1996.
- BECHLIOULIS, A. *et al.* Endothelial function, but not carotid intima thickness, is affected early in menopause and is associated with severity of hot flashes. **J Clin Endocrinol Metab**, vol. 95, p. 1199-206, 2010.
- BELFORT, M.A. *et al.* Hormonal status affects the reactivity of the cerebral vasculature. **Am J Obstet Gynecol**, v. 4, n. 1, p. 1273-8, 1995.
- BOUCHER, J.L.; MOALI, C.; TENU, J.P. Nitric Oxide Biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. **Cell Mol Life Sci**, v. 55, p. 1015-28, 1999.

BOURNE T, HILLARD TC, WHITEHEAD MI, CROOK D, CAMPBELL S. Oestrogens, arterial status, and postmenopausal women. **Lancet**, V. 16, n. 335, p. 1470-1, 1990.

BRANDÃO, A.H.F. *et al.* Aplicação prática da dilatação fluxo-mediada da artéria braquial em Ginecologia e Obstetrícia. **Femina**, v. 38, n. 5, maio 2010.

BRANDÃO, A.H.F. Avaliação da função endotelial e da perfusão uterina em gestantes com fatores de risco para pré-eclâmpsia. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina da UFMG, 2012.

CELERMAJER, D.S. *et al.* Endothelium dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction. **J AM Coll Cardiol**, v. 24, p. 1468-74, 1994.

CELERMAJER, D.S. *et al.* Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. **Lancet**, v. 340, p. 1111-5, 1992.

CHANG, W.C. *et al.* Stimulation of prostaglandin cyclooxygenase and prostacyclin synthetase activities by estradiol in rat aortic smooth muscle cells. **Biochim Biophys Acta**, v. 620, n. 3, p. 472-82, 1980.

CHO, G.J. *et al.* Postmenopausal status according to years since menopause as an independent risk factor for the metabolic syndrome. **Menopause**, v. 15, p. 524-9, 2008.

CHRISTIAN, R.C. *et al.* Intimal estrogen receptor (ER) beta, but not ER alpha expression, is correlated with coronary calcification and atherosclerosis in pre- and postmenopausal women. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 91, p. 2713-20, 2006.

CLARKE, S.C. *et al.* A study of hormone replacement therapy in postmenopausal women with ischaemic heart disease: the Papworth HRT atherosclerosis study. **BJOG**, v. 109, p. 1056-62, 2002.

CLARKSON, T.B. Estrogen effects on arteries vary with stage of reproductive life and extent of subclinical atherosclerosis progression. **Menopause**, v. 14, p. 373-84, 2007.

CREATSAS, G.C. *et al.* Endothelin plasma levels in primary amenorrheic adolescents before and after estrogen treatment. **J Soc Gynecol Investig**, v. 3, n. 6, p. 350-3, 1996.

COLBURN, P.; BUONASSISI, V. Estrogen-binding sites in endothelial cell cultures. **Science**, v. 201, n. 4358, p. 817-9, 1978.

COLLINS, P. *et al.* 17 beta-Estradiol attenuates acetylcholine-induced coronary arterial constriction in women but not men with coronary heart disease. **Circulation**, V. 92, p. 24-30, 1995.

CORRETI, M.C. *et al.* International brachial artery reactivity Task Force. 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. **J Am Coll Cardiol**, v. 39, p. 257-65, 2002.

COX, D.A. *et al.* Atherosclerosis impairs flow-mediated dilation of coronary arteries in humans. **Circulation**, v. 80, p. 458-65, 1989.

DAHLÉN, S.E. *et al.* Leukotrienes promotes plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary venules: in vivo effects with relevance to the acute inflammatory response. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 78, p. 3887-91, 1981.

DAHLMAN-WRIGHT, K.; CAVAILLES, V.; FUQUA, S.A. International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. **Pharmacol Rev**, v. 58, p. 773-81, 2006.

DARJ, E. *et al.* Ultrasonographic blood flow measurement in the Carotid Arteries in Postmenopausal Women. **Gynecol Obstet Invest**, v. 47, p. 20-5, 1999.

DEANFIELD, J.E. *et al.* Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. Endothelial function and dysfunction. Part I. Methodological issues for assessment in the different vascular beds: a statement of the Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. **J Hypertens**, v. 23, p. 7-17, 2005.

DEANFIELD, J.E.; HALCOX, J.P.; RABELINK, T.J. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. **Circulation**, v. 115, p. 1285-95, 2007.

DeZIEGLER, D.; BESSIS, R.; FRYDMAN, R. Vascular resistance of uterine arteries: physiological effects of estradiol and progesterone. **Fertil Steril**, v. 55, n. 4, p. 775-9, 1991.

DIOMEDI, M. *et al.* Influence of physiologic oscillation of estrogens on cerebral hemodynamics. **J Neurol Sci**, v. 185, n. 1, p. 49-53, 2001.

DUBEY, R.K. *et al.* Vascular consequences of menopause and hormone therapy: importance of timing of treatment and type of estrogen. **Cardiovasc Res**, v. 66, p. 295-306, 2005.

DUMESIC, D.A. *et al.* Ovarian morphology and serum hormone markers as predictors of ovarian follicle recruitment by gonadotropins for in vitro fertilization. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 86, p. 2538, 2001.

FADDY, M.J. *et al.* Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. **Hum Reprod**, v. 7, p. 1342, 1992.

FALCK, B. Site of production of oestrogen in the rat ovary as studied in Microtransplants. **Acta Physiol Scand**, v. 163, p. 1, 1959.

FARHAT, M.Y.; LAVIGNE, M.C.; RAMWELL, P.W. The vascular protective effects of estrogen. **FASEB J**, v. 10, n. 5, p. 615-24, 1996.

FARIA, A.F.; DE SOUZA, M.A.; GEBER, S. Vascular resistance of central retinal artery is reduced in postmenopausal women after use of estrogen. **Menopause**, v. 18, n. 8, p. 869-72, Aug. 2011.

FERNANDES, C.E. Osteoporose. *In*: HALBE, H.W. **Tratado de Ginecologia**. São Paulo: Rocca, v. 123, p. 1259-73, 1994.

FONSECA, A.M.; HALBE, H.W. Fisiologia do climatério. *In*: HALBE, H.W. **Tratado de Ginecologia**, São Paulo: Rocca, v. 121, p. 1236-42, 1994

FOSBERY, W.H.S. Severe climacteric flushings successfully treated by ovarian extract. **Br Med J**, p. 1039, 1897.

FOSTERMANN, U.; MUNZEL, T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. **Circulation**, v. 113, p. 1708-14, 2005.

FRATTARELLI, J.L. *et al.* Basal antral follicle number and mean ovarian diameter predict cycle cancellation and ovarian responsiveness in assisted reproductive technology cycles. **Fertil Steril**, v. 74, p. 512, 2000.

FUJIMOTO, S.; DOI, Y.; SAKAMOTO, Y. Immunoelectron microscopy of Big endothelin-I and endothelin-I in endothelial cells of human umbilical veins. **Int J Microcirc Clin Exp**, v. 14(Suppl 1), p. 105, 1994.

FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373-6, Nov. 27, 1980.

GANGAR, K.F. *et al.* Pulsatility index in internal carotid artery in relation to transdermal oestradiol and time since menopause. **Lancet**, v. 338, n. 8771, p. 839-42, 1991.

GILLIGAN, D.M. *et al.* Contribution of endothelium-derived nitric oxide to exercise-induced vasodilation. **Circulation**, v. 90, n. 6, p. 2853-8, 1994a.

GILLIGAN, D.M. *et al.* Acute vascular effects of estrogen in postmenopausal women. **Circulation**, v. 90, p. 786, 1994b.

GOON, P.K.; BOOS, C.J.; LIP, G.Y. Circulating endothelial cells: markers of vascular dysfunction. **Clin Lab**, v. 51, p. 531-8, 2005.

GORI, T. *et al.* Endothelial function assessment: flow-mediated dilation and constriction provide different and complementary information on the presence of coronary artery disease. **Eur Heart J**, v. 33, p. 363-71, 2012.

GOSWAMY, R.K.; STEPTOE, P.C. Doppler ultrasound studies of the uterine artery in spontaneous ovarian cycles. **Hum Reprod**, v. 3, n. 6, p. 721-6, 1988.

GRODSTEIN, F. *et al.* A prospective, observational study of postmenopausal hormone therapy and primary prevention of cardiovascular disease. **Ann Intern Med**, v. 133, p. 933-41, 2000.

GREENE, G.L. *et al.* Sequence and expression of human estrogen receptor cDNA. **Science**, v. 231, p. 1150, 1986.

GRIENDLING, K.K.; SORESCU, D.; USHIO-FUKAI, M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. **Circ Res**, v. 86, p. 494-501, 2000.

GRODSTEIN, F. *et al.* Postmenopausal estrogen and progestin use and the risk of cardiovascular disease. **N Engl J Med**, v. 335, p. 453-61, 1996.

HALACHMI, S. *et al.* Estrogen receptor-associated proteins: possible mediators of hormone-induced transcription. **Science**, v. 264, p. 1455, 1994.

HANSSON, G.K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. **N Engl J Med**, v. 352, p. 1685-95, 2005.

HARDER, D.R.; COULSON, P.B. Estrogen receptors and effects of estrogen on membrane electrical properties of coronary vascular smooth muscle. **J Cell Physiol**, v. 100, n. 2, p. 375-82, 1979.

HARDING, F.E. The oral treatment of ovarian deficiency with conjugated estrogens-Equine. **West J Surg Obstet Gynecol**, v. 52, p. 31, 1944

HATA, K.; HATA, T. Effects of oophorectomy and hormone replacement therapy on ophthalmic artery blood flow velocity waveforms. **J Ultrasound Med**, v. 16, n. 11, p. 737-41, 1997.

HAYASHI, T. *et al.* Basal release of nitric oxide from aortic rings is greater in female rabbits than in male rabbits: implications for atherosclerosis. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 89, n. 23, p. 11259-63, 1992.

HENDERSON, B.E.; PAGANINI-HILL, A.; ROSS, R.K. Decreased mortality in users of estrogen replacement therapy. **Arch Intern Med**, v. 151, p. 75-8, 1991.

HENRY, R.A. The climacteric: a period of transition. **Hormone Replacement Therapy and Menopause**, Berlin: Schering AG, v. 2, p. 27-84, 2000a.

HENRY, R.A. Hormone replacement therapy. **Hormone Replacement Therapy and Menopause**, Berlin: Schering AG., v. 3, p. 85-158, 2000b.

HERRINGTON, D.M.; REBOUSSIN, D.M.; BROSNIHAN, K.B. Effects of estrogen replacement on the progression of coronary-artery atherosclerosis. **N Engl J Med**, v. 343, p. 522-9, 2000.

HIGGS, E.A. *et al.* The L-arginine nitric oxide pathway. **Cardiovasc Pharmacol**, v. 17(Suppl3), p. S 1-9, 1991.

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**, v. 280, p. 605-13, 1998.

ISLES, C.G. *et al.* Relation between coronary risk and coronary mortality in women of the Renfrew and Paisley survey: comparison with men. **Lancet**, v. 339, p. 702-6, 1992.

JACKSON, S.; VYAS, S. A double-blind, placebo controlled study of postmenopausal oestrogen replacement therapy and carotid artery pulsatility index. **Br J Obstet Gynaecol**, v. 105, n. 4, p. 408-12, 1998.

JENSEN, E.V.; JACOBSON, H.I. Basic guides to the mechanism of estrogen action. **Recent Prog Horm Res**, v. 18, p. 387, 1962.

JOHANNIDES, R. *et al.* Nitric Oxide is responsible for flow-dependent dilation of human peripheral conduit arteries in vivo. **Circulation**, v. 91, p. 1314-9, 1995.

KARAS, R.H.; PATTERSON, B.L.; MENDELSON, M.E. Human vascular smooth muscle cells contain functional estrogen receptor. **Circulation**, v. 89, n. 5, p. 1943-50, 1994.

KIM, J.; KIM, J.Y.; SONG, K.S. Epigenetic changes in estrogen receptor beta gene in atherosclerotic cardiovascular tissues and in vitro vascular senescence. **Biochim Biophys Acta**, v. 1772, p. 72-80, 2007.

KLEIN, N.A. *et al.* Is the short follicular phase in older women secondary to advanced or accelerated dominant follicle development? **J Clin Endocrinol Metab**, v. 87, p. 5746, 2002.

KLEIN, N.A. *et al.* Ovarian follicular development and the follicular fluid hormones and growth factors in normal women of advanced reproductive age. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 81, p. 1946, 1996.

KOH, K.K. *et al.* Vascular effects of synthetic or natural progestagen combined with conjugated equine estrogen in healthy postmenopausal women. **Circulation**, v. 103, p. 1961, 2001.

KOLOVOU, G.D.; BILIANOU, H.G. Influence of aging and menopause on lipids and lipoproteins in women. **Angiology**, v. 59, p. 54S-7S, 2008.

KREJZA, J. *et al.* Influence of 17-beta-estradiol on cerebrovascular impedance during menstrual cycle in women. **J Neurol Sci**, v. 221, n. 1-2, p. 61-7, 2004.

KUPESIC, S. *et al.* Three-dimensional ultrasonographic ovarian measurements and in vitro fertilization outcome are related to age. **Fertil Steril**, v. 79, p. 190, 2003.

LASS, A. *et al.* Follicular density in ovarian biopsy of infertile women: a novel method to assess ovarian reserve. **Hum Reprod**, v. 12, p. 1028, 1997.

LAU, T.K. *et al.* Prospective, randomized, controlled study of the effect of hormone replacement therapy on peripheral blood flow velocity in postmenopausal women. **Fertil Steril**, v. 70, n. 2, p. 284-8, 1998.

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 healthy volunteers. **Am J Cardiol**, v. 109, p. 651-7, 2011.

LEMAITRE, R.N. *et al.* Esterified estrogen and conjugated equine estrogen and the risk of incident myocardial infarction and stroke. **Arch Intern Med**, v. 166, p. 399-404, 2006.

LOSORDO, D.W. *et al.* Variable expression of the estrogen receptor in normal and atherosclerotic coronary arteries of premenopausal women. **Circulation**, v. 89, n. 4, p. 1501-10, 1994.

LUDMER, P.L. *et al.* Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. **N Engl J Med**, v. 315, p. 1046-51, 1986.

MACK, W.J., *et al.* Elevated subclinical atherosclerosis associated with oophorectomy is related to time since menopause rather than type of menopause. **Fertil Steril**, v. 82, p. 391-7, 2004.

MALINOW, M.R.; PELLEGRINO, A.A.; LANGE, G. Distribution of oestradiol-6,7-H₃ in the arteries of normal and cholesterol fed rabbits. **Acta Endocrinol**, Copenh, v. 31, p. 500-4, 1959.

MALINOW, M.R. *et al.* Vascular and extravascular radioactivity after the injection of estradiol 6,7H in the human being. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 23, p. 306-10, 1963.

MANSON, J.E.; HSIA, J.; JOHNSON, K.C. Estrogen plus progestin and the risk of coronary heart disease. **N Engl J Med**, v. 349, p. 523-34, 2003.

McCrohon, J.A. *et al.* Hormone replacement therapy is associated with improved arterial physiology in healthy post-menopausal women. **Clin Endocrinol**, V. 45, n. 4, p. 435-41, 1996.

McDEVITT, T.M. **Report WP/98**. World Population Profile: 1998, U.S. Bureau of the Census, U.S. Government Printing Office, Washington, D.C., 1999.

McGRATH, B.P. *et al.* Age-related deterioration in arterial structure and function in postmenopausal women: impact of hormone replacement therapy. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 18, p. 1149-56, 1998.

McKINLAY, S.M.; BIGANO, N.L.; MCKINLAY, J.B. Smoking and age at menopause. **Ann Intern Med**, v. 103, p. 350, 1985.

MELO, N.R. *et al.* Diagnóstico e manejo da terapêutica de reposição hormonal. **Hormonioterapia e Psicofarmacologia na Saúde da Mulher**. São Paulo: SOBRAC, v. 23-36, 1998.

MESSINA, E.J. *et al.* Role of endothelium derived prostaglandins in hypoxia¹elicited arteriolar dilatation in rat skeletal muscle. **Cir Res**, v. 71, n. 4, p. 790-6, 1992.

METCALF, M.G.; LIVESAY, J.H. Gonadotropin excretion in fertile women: effect of age and the onset of the menopausal transition. **J Endocrinol**, v. 105, p. 357, 1985.

MEYER, M.R.; HAAS, E.; BARTON, M. Need for research on estrogen receptor function: importance for postmenopausal hormone therapy and atherosclerosis. **Gend Med**, v. 5, Suppl A, p. S19-33, 2008.

MILLER, W.L. Mitochondrial specificity of the early steps in steroidogenesis. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 55, p. 607, 1995.

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. **Thromb Haemost**, v. 67, n. 2, p. 226-232, 1992.

O'DOWD, M.J.; PHILIPP, E.E. **The history of Obstetrics and Gynaecology**. The Parthenon Publishing Group, New York, 1994.

OLSHANSKY, S.J.; CARNES, B.A.; CASSEL, C. In search of Methuselah: estimating the upper limits to human longevity. **Science**, v. 250, p. 634, 1990.

OLSHANSKY, S.J.; CARNES, B.A.; CASSEL, C. The aging of the human species. **Scientific American**, v. 46, April, 1993.

ORSHAL, J.M.; KHALIL, R.A. Gender, sex hormones, and vascular tone. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 286, p. R233-49, 2004.

PALOMBA, M.L.; DITTMAN, W.A. Thrombomodulin: receptor with anticoagulant function. **I Microcirc Clin Exp**, v. 14 (Suppl), p. 167, 1994.

PENOTTI, M. *et al.* Blood flow variations in internal carotid and middle cerebral arteries induced by postmenopausal hormone replacement therapy. **Am J Obstet Gynecol**, v. 169, n. 5, p. 1226-32, 1993.

PERREGAUX, D. *et al.* Effect of gender differences and estrogen replacement therapy on vascular reactivity. **Metabolism**, v. 48, n. 2, p. 227-32, 1999.

PINES, A. *et al.* Long-term effects of hormone replacement therapy on Doppler-derived parameters of aortic flow in postmenopausal women. **Chest**, v. 102, n. 5, p. 1496-8, 1992.

PINES, A. *et al.* The effects of hormone replacement therapy in normal postmenopausal women: measurements of Doppler-derived parameters of aortic flow. **Am J Obstet Gynecol**, v. 164, n. 3, p. 806-12, 1991.

PIRHONEN, J.P. *et al.* Long-term effects of hormone replacement therapy on the uterus and on uterine circulation. **Am J Obstet Gynecol**, v. 168, n. 2, p. 620-30, 1993.

POST, W.S.; GOLDSCHMIDT-CLERMONT, P.J.; WILHIDE, C.C. Methylation of the estrogen receptor gene is associated with aging and atherosclerosis in the cardiovascular system. **Cardiovasc Res**, v. 43, p. 985-91, 1999.

RASSAF, T.; FEELISCH, M.; KELM, M. Circulating NO pool: assessment of nitrate and nitroso species in blood and tissues. **Free Radic Biol Med**, v. 36, p. 413-22, 2004.

RECKELHOFF, J.F.; FORTEPIANI, L.A. Novel mechanisms responsible for postmenopausal hypertension. **Hypertension**, v. 43, p. 918-23, 2004.

RESLAN, O.M.; KHALIL, R.A. Vascular effects of estrogenic menopausal hormone therapy. **Rev Rec Clin Trials**, v. 7, n. 1, p. 47-70, 2012.

RHEE, S.G. Cell signaling: H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. **Science**, V. 312, p. 1882-3, 2006.

ROSSOUW, J.E.; ANDERSON, G.L.; PRENTICE, R.L. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. **JAMA**, V. 288, p. 321-33, 2002.

RYAN, K.J. Biological aromatization of steroids. **J Biol Chem**, v. 234, p. 268, 1959.

RYAN, A. *et al.* Ultrasound assessment of flow-mediated dilation. **Hypertension**, v. 55, p. 1075-1085, 2010.

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, 2012.

SAWETAWAN, C. *et al.* Inhibin and activin differentially regulate androgen production and 17 α -hydroxylase expression in human ovarian thecal-like cells. **J Endocrinol**, v. 148, p. 213, 1996.

SEARLE, N.R.; SAHAB, P. Endothelial vasomotor regulation in health and disease. **I Anaesth**, v. 39, n. 8, p. 838-57, 1992.

SEBASTIAN, S.; BULUN, S.E. A highly complex organization of the regulatory region of the human CYP19 (aromatase) gene revealed by the human genome project. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 86, p. 4600, 2001.

SEIFER, D.B. *et al.* Apoptosis as a function of ovarian reserve in women undergoing in vitro fertilization. **Fertil Steril**, v. 66, p. 593, 1996.

SERAFIN, S. *et al.* Cultured bovine lymphatic and vascular endothelial cells: comparative immunolocalization of fibronectin, von Willebrand and P-selectin. **I Microcirc Clin Exp**, v. 14 (Suppl), p. 169, 1994.

SEROCK, M.R.; WELLS, A.K.; KHALIL, R.A. Modulators of vascular sex hormone receptors and their effects in estrogen-deficiency states associated with menopause. **Recent Pat Cardiovasc Drug Discov**, v. 3, p. 165-86, 2008.

SERVINGHAUS, E.L.; EVANS, J. Clinical observations on the use of an ovarian hormone: amniotin. **Am J Sci**, v. 178, p. 638, 1929.

SHAMMA, F.N. *et al.* Middle cerebral artery blood velocity during controlled ovarian hyperstimulation. **Fertil Steril**, v. 57, n. 5, p. 1022-5, 1992.

SHERMAN, B.M.; WEST, J.H.; KORENMAN, S.G. The menopausal transition: analysis of LH, FSH, estradiol, and progesterone concentrations during menstrual cycles of older women. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 42, p. 629, 1976.

SIMPSON, E.R. *et al.* Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. **Endocr Rev**, v. 15, p. 342, 1994.

SMILEY, D.A.; KHALIL, R.A. Estrogenic compounds, estrogen receptors and vascular cell signaling in the aging blood vessels. **Curr Med Chem**, v. 16, p. 1863-87, 2009.

SMITH JR., S.R. *et al.* CDC/AHA workshop on markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: report from the clinical practice discussion group. **Circulation**, v. 110, p. e550-3, 2004.

SPEROFF, L.; FRITZ, MA. **Hormone biosynthesis, metabolism, and mechanism of action in clinical gynecologic endocrinology & infertility**. 7. ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

STOCCO, D.M.; CLARK, B.J. Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. **Endocr Rev**, v. 17, p. 221, 1996.

SUMINO, H.; ICHIKAWA, S.; ITOH, H. Hormone replacement therapy decreases insulin resistance and lipid metabolism in Japanese postmenopausal women with impaired and normal glucose tolerance. **Horm Res**, v. 60, p. 134-42, 2003.

SURKS, H.K. CGMP-dependent protein kinase I and smooth muscle relaxation: a tale of two isoforms. **Circulation Res**, v. 101, p. 1078-80, 2007.

SUTTON-TYRRELL, K. *et al.* Carotid atherosclerosis in premenopausal and postmenopausal women and its association with risk factors measured after menopause. **Stroke**, v. 29, p. 1116-21, 1998.

TAKASE, B. *et al.* Flow-mediated dilation in brachial artery in the second half of pregnancy and prediction of pre-eclampsia. **J Hum Hypertension**, v. 17, n. 10, p. 697-704, 2003.

TAN, S.L. *et al.* Blood flow changes in the ovarian and uterine arteries during the normal menstrual cycle. **Am J Obstet Gynecol**, v. 175, n. 3 Pt 1, p. 625-31, 1996.

TAYLOR, K.J. *et al.* Ultrasound Doppler flow studies of the ovarian and uterine arteries. **Br J Obstet Gynaecol**, v. 92, n. 3, p. 240-6, 1985.

TRELOAR, A.E. *et al.* Variation of the human menstrual cycle through reproductive life. **Int J Fertil**, v. 12, p. 77, 1967.

TRELOAR, A.E. Menstrual cyclicity and the pre-menopause. **Maturitas**, v. 3, p. 249, 1981.

URUKAMI-HARASAWA, L. *et al.* Importance of the endothelial derived hyperpolarizing factor in human arteries. **J Clin Invest**, v. 100, p. 2793-9, 1997.

US CENSUS BUREAU. **The 65 years and over population: 2000**. Disponível em: www.census.gov/prod/2001/pubs/c2kbr01-10.pdf, 2003. Acesso em: outubro de 2014.

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. **Horm Metab Res**, v. 38, p. 581-6, 2006.

VALLANCE, P.; LEIPER J. Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine: dimethylarginine – dimethylaminohydrolase pathway. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 24, p. 1023-30, 2004.

VAN BAAL, W.M. *et al.* Sequentially combined hormone replacement therapy reduces impedance to flow within the uterine and central retinal arteries in healthy postmenopausal women. **Am J Obstet Gynecol**, v. 181, n. 6, p. 1365-73, 1999.

VAN ZONNEVELD, P. *et al.* Do cycle disturbances explain the age-related decline of female fertility? Cycle characteristics of women aged over 40 years compared with a reference population of young women. **Hum Reprod**, v. 18, p. 495, 2003.

VANE, J.R.; ANGGÅRD, E.E.; BOTTING, R.M. Regulatory functions of the vascular endothelium. **N Engl J Med**, v. 323, n. 1, p. 27-36, 1990.

VIANA, L.C.; MARTINS, M.; GEBER, S. Climatério. *In*: VIANA, L.C.; GEBER, S. **Ginecologia**. 3. ed., Rio de Janeiro: Medbook, 2012.

VISCOLI, C.M. *et al.* A clinical trial of estrogen-replacement therapy after ischemic stroke. **N Engl J Med**, v. 345, p. 1243-9, 2001.

VOLLMAN, R.F. The menstrual cycle. *In*: FRIEDMAN, E. (ed.). **Major problems in Obstetrics and Gynecology**. W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1977.

WALSH, B.W.; GINSBURG, E.S. Menopause: Kistner's Gynecology and Women's Health. St. Louis: Mosby, v. 21, p. 540-69, 1999.

WEBB, P. *et al.* The limits of the cellular capacity to mediate an estrogen response. **Mol Endocrinol**, v. 6, p. 157, 1992.

WILLIAMS, J.K.; ADAMS, M.R.; KLOPFENSTEIN, H.S. Estrogen modulates responses of atherosclerotic coronary arteries. **Circulation**, v. 81, n. 5, p. 1680-7, 1990.

WILLIAMS, J.K. *et al.* Short-term administration of estrogen and vascular responses of atherosclerotic coronary arteries. **J Am Coll Cardiol**, v. 20, n. 2, p. 452-7, 1992.

WING, R.R. *et al.* Weight gain at the time of menopause. **Arch Intern Med**, v. 151, p. 97-102, 1991.

WOLF, P.H. *et al.* Reduction of cardiovascular disease-related mortality among postmenopausal women who use hormones: evidence from a national cohort. **Am J Obstet Gynecol**, v. 164, p. 489-94, 1991.

WOYWODT, A. *et al.* Circulation endothelial cells: life, death, detachment, and repair of the endothelial cell layer. **Nephrol Dial Transpl**, v. 17, p. 1728-30, 2002.

YAGER, J.D.; DAVIDSON, N.E. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. **N Engl J Med**, v. 354, p. 270-82, 2006.

YOUNG, 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-regulation. **Hum Reprod**, v. 18, p. 35, 2003.

YLIKORKALA, O. *et al.* Postmenopausal hormonal replacement decreases plasma levels of endothelin-1. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 80, n. 11, p. 3384-7, 1995.

YLIKORKALA, O. *et al.* The long-term effects of oral and transdermal postmenopausal hormone replacement therapy on nitric oxide, endothelin-1, prostacyclin, and thromboxane. **Fertil Steril**, v. 69, p. 883, 1998.

ZEGURA, B. *et al.* Orally and transdermally replaced estradiol improves endothelial function in middle-aged women after surgical menopause. **Am J Obstet Gynecol**, v. 188, p. 1291, 2003.

APÊNDICES E ANEXOS

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 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 prejuízo ao meu tratamento ou à minha saúde, não existindo punição por deixar de participar do estudo.

Entendo 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 qualquer 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 – XXXX)
CRM XXXX

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
HF: <input type="checkbox"/> DIABETES
<input type="checkbox"/> HAS
<input type="checkbox"/> AVC
<input type="checkbox"/> DOENÇA CORONARIANA
<input type="checkbox"/> CA de MAMA
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 <input type="checkbox"/>

DOSAGENS LABORATORIAS: (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 _____	
ULTRASSONOGRRAFIA ENDOVAGINAL COM DOPLERFLUXOMETRIA (DATA: ___/___/___)	
ENDOMÉTRIO _____ mm	
OVÁRIOS: DIR _____ CC ESQ _____ CC	

MAMOGRAFIA (DATA: ___/___/___)
CITOLOGIA ONCÓTICA (DATA: ___/___/___)
NORMAL: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO
ATENAÇÃO FLUXOMEDIADA DA ARTÉRIA BRAQUIAL
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 FLUXOMEDIADA DA ARTÉRIA BRAQUIAL
REPOUSO: 1 _____ 2 _____ 3 _____ MÉDIA _____
PÓS-ISQUEMIA 1 _____ 2 _____ 3 _____ MÉDIA _____

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 'M. T. Marques Amaral', is written over a faint circular stamp.

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