



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Diogo Guarnieri Panazzolo

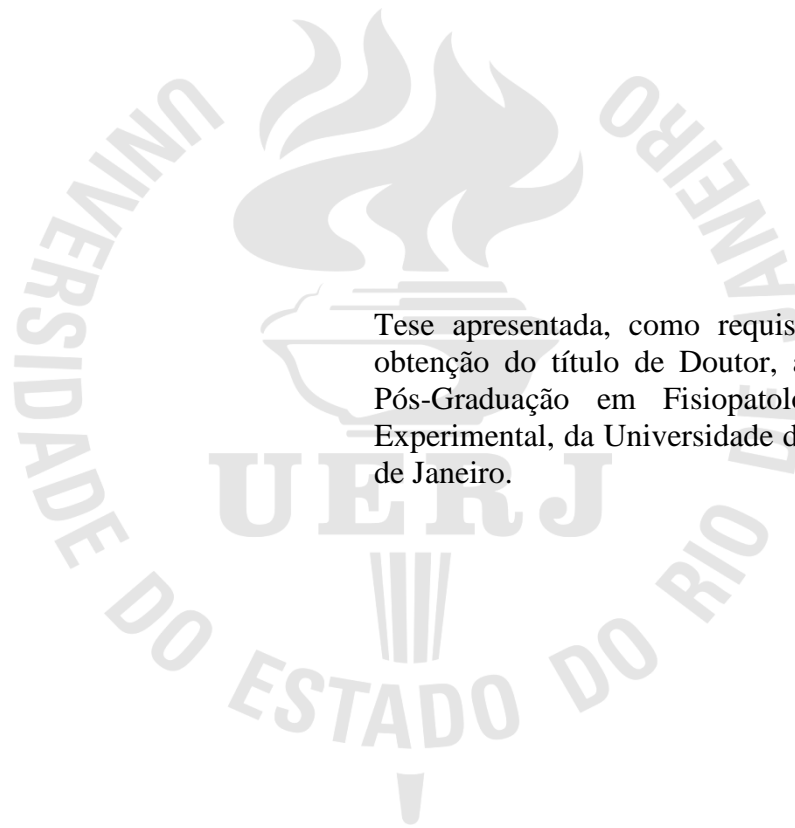
Efeitos do estradiol sobre a função endotelial, sensibilidade insulínica e viscosidade sanguínea em mulheres na pós-menopausa com excesso de peso

Rio de Janeiro

2013

Diogo Guarnieri Panazzolo

Efeitos do estradiol sobre a função endotelial, sensibilidade insulínica e viscosidade sanguínea em mulheres na pós-menopausa com excesso de peso



Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Guilherme Kraemer de Aguiar

Rio de Janeiro

2013

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

P187 Panazzolo, Diogo Guarnieri.
Efeitos do estradiol sobre a função endotelial, sensibilidade insulínica e viscosidade sanguínea em mulheres na pós-menopausa com excesso de peso / Diogo Guarnieri Panazzolo. – 2013.
141 f.

Orientador: Luiz Guilherme Kraemer de Aguiar.

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.

1. Hormônios – Terapia – Teses. 2. Menopausa – Teses. 3. Endotélio – Teses. 4. Obesidade – Teses. I. Aguiar, Luiz Guilherme Kraemer de. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III Título.

CDU 616.993.161

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Diogo Guarnieri Panazzolo

**Efeitos do estradiol sobre a função endotelial, sensibilidade insulínica e viscosidade
sanguínea em mulheres na pós-menopausa com excesso de peso**

Tese apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor, ao Programa de
Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e
Experimental, da Universidade do Estado do Rio
de Janeiro

Aprovada em 06 de dezembro de 2013.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Luiz Guilherme Kraemer de Aguiar (Orientador)
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dr. Eduardo Vera Tibiriçá
Fundação Oswaldo Cruz

Prof.^a Dra. Poli Mara Spritzer
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof.^a Dra. Ruth Clapauch
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dr. Nivaldo Ribeiro Villela
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Rio de Janeiro

2013

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, que em muitos momentos desta jornada doaram-se inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que eu pudesse realizar os meus.

À Roberta, minha esposa, por todo carinho e compreensão que tem comigo, mas acima de tudo por tudo que representa para mim.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e amigo, o Prof. Dr. Luiz Guilherme Kraemer de Aguiar, que soube valorizar minhas qualidades e amenizar meus defeitos, além de tornar-se um exemplo de vida para mim, tanto profissional quanto pessoal. Com certeza devido aos seus ensinamentos, sinto-me mais capaz de enfrentar as adversidades que encontrarei pela frente.

À Prof^ª. Dra. Eliete Bouskela, que sempre acreditou e me apoiou ao acolher-me no BioVasc, fornecendo todas condições necessárias para a realização deste trabalho, sem nunca ter me indagado sobre possíveis fracassos.

À Prof^ª. Dra. Lenora Maria Camarate Silveira Martins Leão, por todo suporte científico, clínico e ajuda que me ofereceu em todos os momentos que necessitei, além de ter sido uma grande incentivadora do projeto.

À Dra. Lucia Henriques Alves da Silva, que foi minha fiel escudeira para a realização deste trabalho, compartilhando responsabilidades e sempre me incentivando em momentos difíceis. Sem sua presença seria inviável a realização deste projeto.

Às minhas amigas Dra. Priscila Alves Maranhão, Maria Aparecida Faria de Oliveira e Dra. Maria das Graças Coelho de Souza por toda disponibilidade que sempre tiveram com o projeto, responsáveis respectivamente pelas realizações e leituras da videocapilaroscopia do leito periungueal, pela coleta de sangue das participantes e leitura dos exames laboratoriais realizados no BioVasc.

Ao Dr. Fernando Sicuro pela atenção e ensinamentos em estatística.

Ao Dr. Neil Lins Machado Júnior pelo suporte científico e clínico.

À equipe do Laboratório de Lípidos (Lablip/UERJ), principalmente ao Prof. Dr. José Firmino Nogueira Neto e a Vânia Penha, por toda atenção e disponibilidade.

À equipe do Laboratório de Hormônios do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE), principalmente ao Prof. Rogério Bosignoli, ao Marcos Borges e a Cristiane.

À Eliza Cândida pelo apoio e esclarecimentos prestados às participantes.

Aos meus companheiros de BioVasc pelos momentos agradáveis, Ronald Lima, Richard leite, Ingrid Dias, Alessandra Schiappacassa, Flávia Veiga, Edileuza e Waldício.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental pela oportunidade de aprendizado acadêmico.

Aos meus familiares que tornam minha vida mais feliz, Juliana, Anderson, Júlia, Gregório, Patrícia, Isadora, Dr. Roberto e Izolda Lemos.

Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.

Marthin Luther King

RESUMO

PANAZZOLO, Diogo Guarnieri. *Efeitos do estradiol sobre a função endotelial, sensibilidade insulínica e viscosidade sanguínea em mulheres na pós-menopausa com excesso de peso*. 2013. 141f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

A ação que o estrogênio desempenha sobre o endotélio depende da integridade deste e consequentemente das características clínicas de cada indivíduo. O uso da terapia hormonal da menopausa (THM) em mulheres com baixo risco cardiovascular geralmente resulta em efeitos benéficos, desde que iniciado em um período próximo da menopausa. Em contrapartida, o seu uso em mulheres com alto risco cardiovascular, como diabéticas ou portadoras de lesões ateroscleróticas já estabelecidas, e ainda naquelas com início da THM em um período superior a dez anos da menopausa geralmente resulta em efeitos maléficos. Nosso objetivo é avaliar os efeitos do estrogênio sobre a função endotelial em mulheres com sobrepeso ou obesidade, ou seja, indivíduos com risco cardiovascular intermediário. Para isso, 44 mulheres na pós-menopausa com idade entre 47 a 55 anos e índice de massa corporal (IMC) de 27,5 a 34,9kg/m², foram randomizadas nos grupos placebo (P) e estrogênio transdérmico (ET). A intervenção consistiu no uso transdérmico de estradiol, 1mg por dia, por um período de três meses. As participantes realizaram avaliação da reatividade endotelial em repouso e após isquemia [pletismografia por oclusão venosa (POV), com medidas do fluxo sanguíneo do antebraço (FSA) e videocapilaroscopia dinâmica do leito periungueal (VCPLP), com medidas da velocidade de deslocamento das hemácias (VDH)], dosagens de moléculas de adesão [E-selectina, molécula de adesão intercelular (ICAM-1) e molécula de adesão vascular (VCAM-1)], aferição da sensibilidade insulínica [através do *homeostatic model assessment of insulin resistance (HOMA-IR)* e área sob a curva (AUC) da insulina durante o teste oral de tolerância à glicose (TOTG)] e mensurações das viscosidades sanguínea e plasmática. As participantes apresentaram idade de 51,77 ± 2,3 anos, IMC de 31,52 ± 2,54 kg/m² e tempo de menopausa de 3 [2-5] anos. O grupo P não apresentou nenhuma mudança significativa em qualquer variável. Após a intervenção, o grupo ET comparado ao basal apresentou menor tempo para atingir a VDH máxima durante a hiperemia reativa pós-oclusiva (HRPO) após 1 min de isquemia (4,0 [3,25-5,0] vs. 5,0 [4,0-6,0] s, P<0,05) e maior VDH tanto em repouso (0,316 [0,309-0,326] vs. 0,303 [0,285-0,310] mm/s; P<0,001) quanto na HRPO (0,374 [0,353-0,376] vs. 0,341 [0,334-0,373] mm/s; P<0,001), assim como observamos maior FSA em repouso (2,46 [1,81-3,28] vs. 1,89 [1,46-2,44] ml/min.100ml tecido⁻¹; P<0,01) e durante a HRPO após 3 min de isquemia (6,39 [5,37-9,39] vs. 5,23 [4,62-7,47] ml/min.100ml tecido⁻¹; P<0,001). O grupo ET também apresentou diminuição nos níveis solúveis de E-Selectina (68,95 [50,18-102,8] vs. 58,4 [44,53-94,03] ng/ml; P<0,05), de ICAM-1 (188 [145-212] vs. 175 [130-200] ng/ml; P<0,01), do *HOMA-IR* (3,35 ± 1,67 vs. 2,85 ± 1,60; P<0,05) e da AUC da insulina durante o TOTG (152 [117-186] vs. 115 [85-178]; P<0,01), além de diminuição das viscosidades sanguínea com hematócrito nativo (3,72 ± 0,21 vs. 3,57 ± 0,12 mPa.s; P<0,01) e plasmática (1,49 ± 0,10 vs. 1,45 ± 0,08 mPa.s; P<0,05), comparado ao seu basal. Em conclusão o uso de estradiol transdérmico em mulheres com excesso de peso e menopausa recente, promove melhora da função endotelial, além de oferecer proteção a outros fatores de risco cardiovascular.

Palavras-chave: Terapia hormonal da menopausa. Endotélio. Microcirculação. Obesidade.

ABSTRACT

PANAZZOLO, Diogo Guarnieri. *Effects of estradiol on endothelial function, insulin sensitivity and blood viscosity in overweight postmenopausal women*. 2013. 141f. (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

The action that estrogen plays on the endothelium depends on its integrity and consequently on the clinical characteristics of each individual. The use of menopausal hormone therapy (MHT) in women with low cardiovascular risk usually results in beneficial effects, since it is started in a period close to menopause. In contrast, its use often results in harmful effects in women at high cardiovascular risk, such as diabetic ones or those with established atherosclerotic lesions, and even in those that the beginning of MHT exceeds ten years from menopause. Our goal is to evaluate the effects of estrogen on endothelial function in overweight women, ie, individuals at intermediate cardiovascular risk. For this purpose, 44 postmenopausal women, aged 47-55 years with body mass index (BMI) from 27.5 to 34.9 kg / m², were randomized into placebo (P) and transdermal estrogen (TE) groups. The intervention consisted of using transdermal estradiol 1mg per day for a period of three months. Participants underwent endothelial reactivity assessment at rest and after ischemia [by venous occlusion plethysmography (VOP), with assessment of forearm blood flow (FBF) and dynamic nailfold videocapillaroscopy (DNV), with assessment of red blood cell velocity (RBCV)], measurements of soluble adhesion molecules [E-selectin, intercellular adhesion molecule (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule (VCAM-1)], measurement of insulin sensitivity [by homeostatic model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) and area under the curve (AUC) of insulin during the oral glucose tolerance test (OGTT)] and measurements of blood and plasma viscosities. The participants aged 51.77 ± 2.3 years, BMI 31.52 ± 2.54 kg/m² and had a time since menopause of 3 [2-5] years. P group showed no significant change in any variable. After intervention, the TE group compared to the baseline presented in DNV lower time taken to reach RBCV during post-occlusive reactive hyperemia (PORH) (4,0 [3,25-5,0] vs. 5,0 [4,0-6,0] s, P<0.05) and also higher RBCV at rest (0.316 [0.309 to 0.326] vs. 0.303 [0.285-0.310] mm/s, P<0.001) and during PORH (0.374 [0.353 to 0.376] vs. 0.341 [0.334 to 0.373] mm/s, P<0.001), at POV we also noticed a higher FBF at rest (2.46 [1.81-3.28] vs. 1.89 [1.46 to 2.44] ml/min.100mltecido⁻¹, P<0.01) and during PORH (6.39 [5.37 to 9.39] vs. 5.23 [4.62 to 7.47] ml/min.100mltecido⁻¹, P<0.001). The TE group also showed a decrease in the levels of soluble E-selectin (68.95 [50.18 to 102.8] vs. 58.4 [44.53 to 94.03] ng/ml, P<0.05) and ICAM-1 (188 [145-212] vs. 175 [130-200] ng/ml, P<0.01). Compared to baseline, the ET group had a decrease in HOMA-IR (3.35 ± 1.67 vs. 2.85 ± 1.60, P<0.05) and insulin AUC during OGTT (152 [117-186] vs. 115 [85-178], P<0.01), and decreased blood viscosity with native hematocrit (3.72 ± 0.21 vs. 3.57 ± 0.12 mPa.s; P<0.01) and in plasma (1.49 ± 0.10 vs. 1.45 ± 0.08 mPa.s, P<0.05). In conclusion the use of transdermal estradiol in overweight and recently menopausal women improves endothelial function and protection to other cardiovascular risk factors.

Keywords: Menopausal hormonal therapy. Endothelium. Microcirculation. Obesity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Efeitos genômico e mitocondrial do estrogênio nas células endoteliais.....	30
Figura 2 - Efeito não-genômico do estrogênio sobre a célula endotelial e a célula muscular lisa vascular	31
Figura 3 - Etapas da seleção da amostra do estudo	53
Figura 4 - Modelo esquemático temporal das avaliações do estudo	56
Figura 5 - Índice menopausal de Kupperman e Blatt	57
Figura 6 - Posicionamento dos artefatos técnicos para a realização da pletismografia por oclusão venosa	60
Figura 7 - Videocapilaroscopia dinâmica do leito periungueal	61
Figura 8 - Modelo esquemático da mensuração da viscosidade através do viscosímetro rotacional	62
Figura 9 - Seleção da amostra do estudo	66
Figura 10 - Seguimento do estudo	67
Figura 11 - Comparações da PAS e PAD no basal e após 3 meses.....	69
Figura 12 - Comparações do IMC e CA no basal e após 3 meses.....	70
Figura 13 - Comparações da SHBG, Testosterona Livre, estradiol e FSH no basal e após 3 meses.....	72
Figura 14 - Comparações do FSA_{b1} , FSA_{c1} , FSA_{c234} e FSA_{NTG} no basal e após 3 meses.....	74
Figura 15 - Comparações do RV_{b1} , RV_{c1} , RV_{c234} e RV_{NTG} no basal e após 3 meses.....	75
Figura 16 - Comparações da VDH, VDH_{max} e $TVDH_{max}$ no basal e após 3 meses	76
Figura 17 - Comparações da E-Selectina e I-CAM no basal e após 3 meses.....	77
Figura 18 - Comparações da AUC da glicose e insulina, do HOMA-IR e do ISI Belfiore no basal e após 3 meses	79
Figura 19 - Comparações das viscosidades sanguínea e plasmática no basal e após 3 meses .	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais estudos demonstrando as ações de diversos tipos de THM sobre a função microvascular.....	34
Tabela 2 - Principais estudos demonstrando as ações dos diversos tipos de THM sobre o metabolismo glicêmico, mensurado através do clampeamento euglicêmico hiperinsulinêmico	42
Tabela 3 - Características das participantes no início do estudo, conforme diagnóstico de comorbidades e uso de medicamentos.....	68
Tabela 4 - Efeito do tratamento e comparações entre os grupos nas características clínicas, antropométricas, de composição corporal e da pressão arterial na amostra estudada.....	69
Tabela 5 - Efeito do tratamento e comparações entre os grupos nos exames de bioquímica e de sangue total na amostra estudada	71
Tabela 6 - Efeito do tratamento e comparações entre os grupos nos hormônios sexuais na amostra estudada.....	72
Tabela 7 - Efeito do tratamento e comparações entre os grupos na reatividade microvascular em tecido muscular do antebraço na amostra estudada	73
Tabela 8 - Efeito do tratamento e comparações entre os grupos na reatividade microvascular nutritiva no leito periungueal na amostra estudada	76
Tabela 9 - Efeito do tratamento e comparações entre os grupos nas moléculas de adesão e PAI-1 na amostra estudada	77
Tabela 10 - Efeito do tratamento e comparações entre os grupos na homeostase glicêmica e em índices de sensibilidade insulínica na amostra estudada	78
Tabela 11 - Efeito do tratamento e comparações entre os grupos nas viscosidades sanguínea, plasmática e relativa na amostra estudada.....	80
Tabela 12 - Correlações das variáveis microvasculares com os hormônios sexuais, níveis pressóricos, índices de sensibilidade insulínica e moléculas de adesão celular..	82
Tabela 13 - Correlações dos hormônios sexuais, dos níveis pressóricos, dos índices de sensibilidade insulínica, das viscosidades plasmática e sanguínea e das moléculas de adesão celular.....	84
Tabela 14 - Principais eventos adversos durante o seguimento do estudo	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
AGL	Ácidos graxos livres
AUC	Área sob a curva
AVE	Acidente vascular encefálico
CEH	Clampeamento euglicêmico hiperinsulinêmico
CT	Colesterol total
DM2	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 2
EDHF	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
EEC	Estrogênios equinos conjugados
eNOS	Óxido nítrico-sintase endotelial
EP	Embolia pulmonar
ERF	Escore de risco de Framingham
ET	Grupo estradiol transdérmico
ET-1	Endotelina-1
FMD	Dilatação mediada pelo fluxo
FSA	Fluxo sanguíneo do antebraço
FSH	Hormônio folículo estimulante
GJ	Glicemia de jejum
GLUT4	Proteína transportadora de insulina tipo 4
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HERS	<i>Heart and estrogen-progestin replacement study</i>
HOMA-IR	<i>Homeostatic model assessment – insulin resistance</i>
HRPO	Hiperemia reativa pós-oclusiva
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular
IMC	Índice de massa corporal
IMKB	Índice menopausal de Kupperman e Blatt
ISI	Índice de sensibilidade insulínica
LDF	Laser Doppler fluxometria
LDL	Lipoproteína de baixa densidade

MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MPA	Acetato de medroxiprogesterona
NETA	Acetato de noretisterona
NO	Óxido nítrico
NPS	Nitroprussiato
NTG	Nitroglicerina
P	Grupo placebo
PAD	Pressão arterial diastólica
PAI-1	Inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1
PAS	Pressão arterial sistêmica
PCR	Proteína C-reativa
PCR-US	Proteína C-reativa ultrasensível
PEPI	<i>The postmenopausal estrogen/progestin interventions</i>
PET	Tomografia por emissão de pósitrons
POV	Pletismografia por oclusão venosa
RV	Resistência vascular
SHBG	Globulina ligadora de hormônios sexuais
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
TG	Triglicerídeos
THM	Terapia hormonal da menopausa
TOTG	Teste oral de tolerância à glicose
TSH	Hormônio estimulante da tireoide
TVDH _{max}	Tempo para alcançar a VDH _{max}
TVP	Trombose venosa profunda
USG TV	Ultrassonografia transvaginal
VCAM-1	Molécula de adesão vascular
VCLP	Videocapilaroscopia dinâmica do leito periungueal
VDH	Velocidade de deslocamento das hemácias em repouso
VDH _{max}	Velocidade de deslocamento máximo das hemácias durante a hiperemia reativa
VLDL	Lipoproteína de muita baixa densidade
WHI	<i>Women's Health Initiative</i>

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
1 TERAPIA HORMONAL DA MENOPAUSA E RISCO CARDIOVASCULAR ...	17
1.1 Menopausa: definição e sua associação com risco cardiovascular.....	17
1.2 Terapia hormonal da menopausa e contexto histórico	19
1.3 Terapia hormonal da menopausa e eventos cardiovasculares	20
1.3.1 <u>Terapia hormonal da menopausa e acidente vascular encefálico (AVE)</u>	21
1.3.2 <u>Terapia hormonal da menopausa, trombose venosa profunda (TVP) e embolia pulmonar (EP)</u>	22
1.4 Paradigmas da terapia hormonal da menopausa	22
2 TERAPIA HORMONAL DA MENOPAUSA, ENDOTÉLIO E MICROCIRCULAÇÃO	24
2.1 Fisiologia e métodos de aferição da função endotelial e microvascular: visão prática.....	24
2.2 Estrogênio e ações cardiovasculares com foco na função endotelial	27
2.3 Terapia hormonal da menopausa e função endotelial: revisão de literatura	32
3 EFEITOS DA TERAPIA HORMONAL DA MENOPAUSA EM OUTROS FATORES DE RISCO CARDIOVASCULAR	37
3.1 Terapia hormonal da menopausa e obesidade.....	37
3.2 Terapia hormonal da menopausa e metabolismo glicêmico.....	38
3.3 Terapia hormonal da menopausa e inflamação de baixo grau	41
3.4 Terapia hormonal da menopausa e coagulação sanguínea.....	45
3.5 Terapia hormonal da menopausa e viscosidades sanguínea e plasmática	47
4 HIPÓTESE.....	49
5 OBJETIVOS	50
5.1 Objetivo primário	50
5.2 Objetivos secundários	50
5.2.1 <u>Objetivo secundário 1</u>	50
5.2.2 <u>Objetivo secundário 2</u>	50
5.2.3 <u>Objetivo secundário 3</u>	50
5.2.4 <u>Objetivo secundário 4</u>	50
6 MATERIAL E MÉTODOS	51

6.1	Características gerais do estudo	51
6.2	Critérios de inclusão e exclusão	51
6.3	Recrutamento e seleção da população do estudo	52
6.4	Intervenção e acompanhamento	54
6.5	Coleta dos dados	55
6.5.1	<u>Índice menopausal de Kupperman e Blatt (IMKB)</u>	56
6.5.2	<u>Medidas antropométricas</u>	57
6.5.3	<u>Bioimpedância</u>	57
6.5.4	<u>Aferição da pressão arterial sistêmica</u>	58
6.5.5	<u>Avaliação microvascular</u>	58
6.5.6	<u>Viscosidade sanguínea e plasmática</u>	61
6.5.7	<u>Avaliação laboratorial</u>	62
6.6	Categorização da síndrome metabólica, da glicemia de jejum alterada e da hipertensão arterial sistêmica	64
6.7	Estatística e análise	64
7	RESULTADOS	66
7.1	Características clínicas, antropométricas, de composição corporal e da pressão arterial sistêmica	67
7.2	Exames de bioquímica e de sangue total	70
7.3	Hormônios sexuais	70
7.4	Avaliação Microvascular	73
7.4.1	<u>Reatividade microvascular em tecido muscular do antebraço</u>	73
7.4.2	<u>Reatividade microvascular nutritiva no leito periungueal</u>	75
7.5	Moléculas de adesão e PAI-1	77
7.6	Sensibilidade insulínica	78
7.7	Viscosidades sanguínea, plasmática e relativa	79
7.8	Correlações	80
7.8.1	<u>Correlações das variáveis microvasculares com os hormônios sexuais, níveis pressóricos, índices de sensibilidade insulínica e moléculas de adesão celular</u>	81
7.8.2	<u>Correlações entre os hormônios sexuais, níveis pressóricos, índices de sensibilidade insulínica, viscosidades plasmática e sanguínea e moléculas de adesão celular</u>	83
7.9	Eventos adversos	84
8	DISCUSSÃO	86
	RESUMO DOS ACHADOS	102

CONCLUSÃO	103
REFERÊNCIAS	104
APÊNDICE A - Termo de consentimento livre e informado do estudo	135
APÊNDICE B - Anúncios e cartazes para divulgação do projeto	138
APÊNDICE C - Ficha de anamnese e exame físico do estudo	139
ANEXO - Carta de aprovação do estudo pelo comitê de ética e pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto.....	

INTRODUÇÃO

A partir dos anos 80 o envelhecimento populacional tornou-se um fenômeno global, inicialmente observado nos países desenvolvidos e mais recentemente nos países em desenvolvimento. Entre 1980 e 2000, a proporção de brasileiros com mais de 60 anos aumentou de 6,1% para 8,6%, devendo chegar a 14% até 2025 (1). O aumento na expectativa de vida ocorreu em ambos os sexos, no entanto, o aumento mais expressivo ocorreu na população feminina. Segundo os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) de 1991, as mulheres viveriam 7,2 anos a mais que os homens. Já no ano de 2000 esses dados apontavam que esta tendência havia aumentado, passando a ser de 7,8 anos e 22% das mulheres tinham 45 anos ou mais, sendo que 9,45% delas apresentavam idades entre 45 e 54 anos, período no qual a grande maioria das mulheres atinge a menopausa. Isto significa que cada vez mais, um maior número de mulheres estará vivendo mais tempo no período pós-menopáusicas, o qual atualmente já corresponde a um terço de suas vidas. O relatório dos dados de 2012 indica que a expectativa de vida da mulher brasileira já ultrapassa os 75 anos (2), fazendo com que haja uma maior procura nos serviços de saúde brasileiros por mulheres com queixas relacionadas ao climatério (3).

A prevalência da obesidade tem aumentado dramaticamente em todo o mundo. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima para 2015 uma prevalência de 2,3 bilhões de adultos com sobrepeso e mais de 700 milhões com obesidade (4). Evidências recentes indicam que a obesidade ultrapassará o tabagismo como maior causa de morte evitável no mundo (5). A Pesquisa de Orçamento Familiar (POF) realizado pelo IBGE em 2010 mostrou que no Brasil um em cada dois adultos tem sobrepeso (6). Assim, é evidente que a prevalência de mulheres na pós-menopausa com excesso de peso aumentará. O que torna esse dado mais relevante é o fato da obesidade associada ao hipoestrogenismo serem importantes fatores de risco para doenças cardiovasculares e metabólicas (7;8), podendo potencializar o desenvolvimento do processo aterosclerótico, que atualmente é o principal responsável pela causa de morte nestas mulheres (9).

Apesar de dados ainda controversos, estudos evidenciam que a terapia hormonal da menopausa (THM) pode diminuir o número de eventos cardiovasculares (10). Até o momento não está estabelecido qual perfil de mulher poderia se beneficiar desta terapêutica, assim como qual tipo de THM seria mais adequado para determinadas situações. É verdade que

alguns dados clínicos já estão mais esclarecidos, quanto ao possível benefício da THM se usada em mulheres saudáveis com menos de 10 anos da menopausa (11), assim como seus malefícios, se usada em mulheres com idade avançada ou que já apresentam doença isquêmica coronariana (12). O *Women's Health Initiative* (WHI) avaliou 16.608 mulheres, entre 50 a 79 anos, para testar a eficácia da THM na prevenção primária de eventos cardiovasculares (13). O risco de doença coronariana foi maior nas usuárias de estrogênio associado à progesterona comparado ao grupo placebo. Cabe ressaltar que aproximadamente 70% das mulheres do WHI apresentavam excesso de peso e 65% apresentavam idade superior a 60 anos. O objetivo deste estudo é definir se mulheres com excesso de peso, porém com menopausa recente, apresentam benefícios em alguns fatores de risco cardiovascular, tanto tradicionais como emergentes, com o uso da THM.

1 TERAPIA HORMONAL DA MENOPAUSA E RISCO CARDIOVASCULAR

1.1 Menopausa: definição e sua associação com risco cardiovascular

O climatério é um fenômeno endócrino decorrente do esgotamento dos folículos ovarianos que ocorre em todas as mulheres de meia idade. Inicia-se entre os 35 e 40 anos, estendendo-se aos 65 anos, caracterizando-se por um estado de hipoestrogenismo progressivo (14). O esgotamento folicular inicia-se ainda na vida intrauterina. Na 22ª semana de gestação o ovário possui entre seis a oito milhões de oócitos primários que por meio de um processo contínuo de atresia reduzem-se a dois milhões ao nascimento e a 300.000 ou 400.000 na menarca. O processo de atresia continua a cada ciclo menstrual até o total esgotamento folicular, ocasionando uma queda progressiva da secreção de estrogênio. A suspensão definitiva dos ciclos menstruais, ao último denomina-se menopausa, reflete a ausência de níveis de estrogênio suficientes para proliferação do endométrio. Nos anos que seguem a menopausa aproximadamente 50% a 80% das mulheres referem sintomas somáticos e dificuldades emocionais, com destaque para ondas de calor ou “fogachos”, devido as suas implicações negativas para qualidade de vida dessas mulheres (15).

A diminuição da produção dos hormônios ovarianos exerce influência nas funções metabólicas e hemodinâmicas, ocasionando uma maior prevalência de hipertensão arterial sistêmica (HAS), *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2), dislipidemia e síndrome metabólica em comparação com o período da pré-menopausa (16). O hipoestrogenismo está relacionado com alterações desfavoráveis no peso corporal, na distribuição da gordura corporal, na sensibilidade à insulina e no perfil lipídico. Mulheres na pós-menopausa tendem a ganhar peso, além de modificar o padrão de distribuição da gordura corporal, de ginecóide tornam-se fenotipicamente mais semelhantes ao padrão andróide (17). A relação causal entre a deficiência de estrogênio e ganho de peso corporal é sugerida pela evidência de que mulheres que utilizam THM mantêm seu índice de massa corporal (IMC) e seu padrão de distribuição de gordura mais próximos de quando estavam na pré-menopausa do que as mulheres que não utilizaram a THM (18). O aumento do peso corporal e da proporção de gordura visceral estão fortemente correlacionados com o desenvolvimento da HAS, resistência insulínica e inúmeros fatores de risco metabólicos para doenças cardiovasculares (19).

Após a menopausa também ocorrem mudanças no perfil lipêmico, tornando-se mais aterogênico, com aumento nas concentrações séricas de triglicerídeos (TG), colesterol total

(CT), lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteína (a) [Lp(a)] em torno de 6 meses após a menopausa, enquanto que os níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL) declinam gradualmente (20;21). Com o uso da THM, em geral este perfil aterogênico é revertido, observando-se aumento nos níveis de HDL e diminuição do LDL e da Lp(a). Com relação a via de administração e seus efeitos no perfil lipêmico, normalmente agentes orais produzem alterações mais evidentes do que os transdérmicos. Entretanto, em relação aos TG os agentes orais costumam aumentar seus níveis enquanto os transdérmicos normalmente desempenham efeito neutro (22).

A HAS é o fator de risco mais importante para doenças cardíacas e cerebrovasculares em mulheres idosas, especialmente quando associada à resistência insulínica ou ao diabetes (23). Embora antes da idade de 50 anos, a HAS é mais prevalente em homens, aos 65 anos quase 60% das mulheres tornam-se hipertensas. Pareadas por idade, as mulheres na pós-menopausa têm maiores pressões sistólica e diastólica do que aquelas na pré-menopausa, sugerindo um efeito negativo da privação hormonal ovariana sobre a pressão arterial. No entanto, o efeito da menopausa sobre a pressão arterial é difícil de avaliar, porque ambos fatores estão associados com o envelhecimento e são influenciados por fatores comuns, tais como IMC, nível socioeconômico e tabagismo (24). Outras mudanças que ocorrem durante o climatério são alterações em marcadores inflamatórios e fatores pró-coagulantes, como o aumento do fibrinogênio e do inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1 (PAI-1) (25).

A disfunção endotelial é a alteração mais precoce do processo aterosclerótico. No entanto em mulheres menopausadas, é difícil quantificar a contribuição independente da idade ou do tempo decorrido desde a menopausa para o desenvolvimento da disfunção endotelial. Em uma população de mulheres na pós-menopausa com idade média de $53,5 \pm 7,8$ anos, tempo de menopausa ou início da THM de $5,3 \pm 5,4$ anos e com baixo escore de risco de Framingham (ERF), a função endotelial demonstrou tanto uma redução dependente da idade quanto uma redução dependente do tempo de menopausa (26). Outros estudos corroboram o dado que a disfunção endotelial torna-se mais pronunciada na pós-menopausa (27;28).

No que se refere às doenças cardiovasculares, durante a fase fértil de vida ou menacme, a incidência de cardiopatia isquêmica feminina é cerca de três vezes menor que a masculina. Entretanto após a menopausa, o risco cardiovascular feminino aumenta progressivamente, equivalendo-se ao do homem aos 75 anos (29), tornando-se a maior causa de óbito nestas mulheres. A importância dessa questão é observada em dados sobre a mortalidade no Brasil, onde no ano de 2000, a doença cardiovascular isquêmica levou ao óbito 32.936 mulheres, enquanto o câncer de mama foi responsável por 8.308 óbitos (30).

1.2 Terapia hormonal da menopausa e contexto histórico

Foi Dogués em 1833 que admitiu a possível participação dos ovários no fenômeno da menstruação, comprovando que a castração feminina levaria a atrofia uterina e perda da menstruação. A partir desta constatação, uma série de descobertas ocorreu, como o isolamento da foliculina em 1923, da estrona em 1929, do estriol em 1930, seguido do estradiol em 1933, da progesterona em 1937, do etinilestradiol em 1938, do estilbestrol em 1939 e da comercialização dos estrogênios equinos conjugados (EEC) em 1942. No entanto, a história da THM só tem início em 1963 com a divulgação dos benefícios da estrogênio-terapia. Em 1966, um ginecologista de Nova Iorque, o Dr. Robert Wilson, publicou um *best-seller* chamado *Feminine Forever*, exaltando as virtudes da reposição do estrogênio como forma de salvar a mulher da “tragédia da menopausa, que muitas vezes destrói a personalidade e a saúde”. Nos primeiros nove anos do lançamento deste livro houve um aumento estimado de 400% da venda dos estrogênios (31).

Em 1975 dois artigos publicados no *New England Journal of Medicine* associaram a terapia com estrogênios contínuos ao aumento do risco para câncer de endométrio (32;33). Sete anos após observou-se que o tratamento com estrogênios isolados causava hiperplasia endometrial em torno de 25% das usuárias. Entretanto, quando progestógenos eram administrados sete dias por mês a hiperplasia ocorria em 3 a 4% dos casos, e quando empregados por 10 ou 12 dias por mês as lesões hiperplásicas ocorriam em 2% e nenhum caso, respectivamente (34). Com estas verificações a terapia substitutiva passou a ser vista como solução de muitos dos problemas da mulher em processo de envelhecimento. Alguns benefícios foram atribuídos à THM como o rejuvenescimento de pele, a manutenção da libido, a melhora da qualidade de vida e o controle da depressão associada à menopausa (35).

Um grande número de evidências apoiados na crença de que a THM poderia reduzir a ocorrência de doenças cardiovasculares, levaram a prescrição destas medicações até para mulheres com doenças cardiovasculares preexistentes nas décadas de 80 e 90 (36-38). Durante esse período houve aumento da prescrição da THM, inclusive por cardiologistas, visando profilaxia primária ou secundária de eventos cardiovasculares. No entanto, resultados provenientes de alguns desses estudos mostraram-se sujeitos a vieses de seleção, pois as mulheres incluídas apresentavam características mais favoráveis à manutenção da saúde em geral e da boa condição cardiovascular (39). Os estudos longitudinais realizados até aquele momento também demonstravam bons resultados com a THM, porém os desfechos eram intermediários ou substitutos com menor relevância clínica (40).

A prescrição e as indicações da THM foram modificadas completamente com o surgimento dos primeiros ensaios clínicos randomizados de grande porte no final da década de 90 e início de 2000, os quais contestaram os resultados de estudos prévios, modificando a fundamentação para o uso racional da THM. Dentre eles, podemos citar o WHI (19) e o *Heart and Estrogen-Progestin Replacement Study* (HERS I e II) (12;41). A partir destes estudos, a recomendação atual é de que nenhum regime de THM está indicado para prevenção primária ou secundária de doença cardiovascular. Além disso, somado a evidência do aumento do risco de câncer de mama em mulheres usuárias desta terapêutica, principalmente naquelas em uso de progesterona, a THM tomou novos rumos, apresentando atualmente indicações restritas.

1.3 Terapia hormonal da menopausa e eventos cardiovasculares

Como citado previamente, até a década de 90 muitos estudos observacionais (36;38) sugeriam que a THM apresentasse benefícios na prevenção da doença cardiovascular. Em um estudo de coorte de enfermeiras americanas, denominado *The Nurses' Health Study* (36), após ajuste de multivariáveis, foi possível observar redução de 39% na incidência de doença coronariana nas usuárias da THM comparadas às não usuárias. Uma metanálise de 25 estudos mostrou risco relativo de 0,70 para doença coronariana em usuárias de estrógenos comparadas a não usuárias. Em outros sete estudos, avaliando o risco de doença coronária em usuárias de estrogênio associados à progesterona, o risco relativo estimado foi de 0,66 (10). A partir desses resultados, houve um grande entusiasmo com relação à proteção cardiovascular oferecida pela THM. O ensaio clínico *The Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions* (PEPI) (40) também mostrou benefícios cardiovasculares com o uso da THM, mas empregou níveis de lipoproteínas como desfechos intermediários ao invés de desfechos brutos, como morbimortalidade cardiovascular. O WHI (19) testou a eficácia da THM na prevenção primária da doença coronariana tendo como desfechos primários o infarto agudo do miocárdio não fatal e morte cardiovascular. Foram acompanhadas 16.608 mulheres, entre 50 a 79 anos, randomizadas para receber 0,625 mg de EEC com 2,5 mg de acetato de medroxiprogesterona (MPA) ou placebo. Outro grupo do estudo, de mulheres histerectomizadas, só receberam EEC. O risco de doença coronariana foi 29% maior nas usuárias da THM, correspondendo a um risco absoluto de sete eventos coronarianos por 10.000 pessoas/ano. De forma surpreendente, o resultado desse estudo contraindicou o emprego da THM na prevenção primária da doença cardiovascular. Ressalta-se que aquelas em uso isolado de estrogênio não

demonstraram diferença significativa no número de eventos cardiovasculares comparadas ao placebo.

O ensaio clínico randomizado HERS (12) avaliou por 4,1 anos a associação de 0,625 mg de EEC com 2,5 mg de MPA na prevenção secundária da doença cardiovascular em 2.763 mulheres pós-menopáusicas. Os desfechos principais foram infarto agudo do miocárdio não fatal e mortalidade por doença coronariana. A taxa combinada desses eventos não diferiu entre o grupo tratado e placebo, respectivamente (12,5% vs. 12,7%; RR = 0,99; IC95%: 0,80-1,22). Entretanto, observou-se um aumento de 52% no risco de doença cardíaca isquêmica (28-42,5/1000 pessoas/ano) no primeiro ano do estudo naquelas expostas à THM. O seguimento desse estudo, denominado HERS II, confirmou que o risco cardiovascular não diminuía com o uso prolongado da terapia (41).

1.3.1 Terapia hormonal da menopausa e acidente vascular encefálico (AVE)

Dentro do estudo WHI foi avaliado o papel da THM na incidência de AVEs isquêmicos e hemorrágicos. Houve 50% a mais de chance de eventos isquêmicos (RR=1,44; IC95%: 1,09-1,90) nas usuárias da THM combinada (42). No grupo em uso de estrogênio isolado, a razão de risco para AVE foi 1,39 (IC95%; 0,97-1,99) ou um excesso absoluto de 12 eventos adicionais por 10.000 mulheres por ano, embora não tenha sido estatisticamente significativo (43). No HERS, os dados referentes à incidência de AVE não apresentaram diferenças significativas (44).

O *Women's Estrogen for Stroke Trial* (WEST) foi conduzido para determinar se a terapia com 1mg de estradiol oral diário, associado a 5 mg de MPA por 12 dias no mês, reduziria o risco de AVE e morte em mulheres com eventos cerebrovasculares prévios (45). Durante um período de 2,8 anos de seguimento, não houve diferença entre o grupo estrogênio e placebo (RR: 1,1; IC 95%: 0,8-1,4). Os autores concluíram que o estradiol oral não era efetivo na prevenção de acidentes cerebrovasculares, porém por outro lado não aumentava a sua incidência, sugerindo que o tipo de estrogênio utilizado poderia influenciar em alguns desfechos cardiovasculares. A dose e a via de administração do estrogênio também parecem influenciar no risco de AVE. Um estudo de caso-controle com base populacional realizado na Inglaterra mostrou que as usuárias de estradiol transdérmico em baixas doses não apresentavam aumento do risco de AVE comparadas as não usuárias de THM (46).

1.3.2 Terapia hormonal da menopausa, trombose venosa profunda (TVP) e embolia pulmonar (EP)

O estudo HERS encontrou um risco praticamente três vezes maior de TVP (RR= 2,89; IC95%: 1,50-5,58) em usuárias de THM combinada em comparação a não usuárias e ainda uma tendência para maior risco de EP (12). Posteriormente, o ensaio WHI encontrou razão de risco 2,06 maior (IC 95%: 1,57-2,70) para TVP e 2,13 (IC 95%: 1,39-3,25) para EP em usuárias de THM combinada, representando oito casos a mais de EP em 10.000 pessoas/ano. Esse risco foi atribuído à combinação do estrogênio a progesterona (19). Uma metanálise de ensaios clínicos randomizados e estudos observacionais calculou que o uso da THM está associado a um risco relativo de 2,14 (IC 95%; 1,64-2,81) para TVP (47). Alguns estudos sugerem que o risco para TVP em usuárias de THM transdérmica não estaria aumentado comparado ao placebo (48;49), mesmo em pacientes com trombofilia pré-existente (50). Consequentemente, a via de administração do estrogênio e progesterona também poderia desempenhar um fator importante nestes desfechos cardiovasculares.

1.4 Paradigmas da terapia hormonal da menopausa

Estudos observacionais e diversos outros em animais têm sugerido que a THM diminui o risco de doenças cardiovasculares e reduz mortalidade (51;52), porém grandes ensaios clínicos demonstraram o contrário. É paradoxal as mulheres na pré-menopausa estarem protegidas de doenças cardiovasculares enquanto aquelas na pós-menopausa submetidas a THM não apresentarem benefício cardiovascular. As controvérsias sobre riscos e benefícios da THM na prevenção primária de doenças cardiovasculares continuam, e recentemente, alguns trabalhos publicados têm chamado a atenção para o tempo decorrido da menopausa até o início da THM. Este pode resultar em uma grande diferença nos desfechos cardiovasculares. Além disso, o tipo e a dosagem do estrogênio/progesterona utilizados e a via de administração também parecem influenciar esses desfechos (53-55).

Na maioria dos estudos observacionais, as mulheres começaram a THM na época da menopausa, ou seja, em torno dos 50 anos. Em contraposição a isto, o WHI (19) analisou mulheres pós-menopáusicas entre 50 e 79 anos, em média com 63,3 anos, sendo que 67% estavam entre 60 a 79 anos e 73% nunca tinham recebido THM. Diversos autores presumem que muitas destas mulheres já eram portadoras de placas ateroscleróticas e, portanto, estavam predispostas a eventos tromboembólicos (56). A aterosclerose mesmo que subclínica pode ter

exercido um profundo impacto sobre o resultado do uso da THM. Reforçando a hipótese de que o tempo decorrido da menopausa poderia influenciar os resultados cardiovasculares, o estudo *Coronary Artery Calcium Study* (WHI-CACS), restrito a mulheres pós-menopáusicas entre 50-59 anos, mostrou que a THM iniciada mais cedo reduziu a calcificação da artéria coronária e a prevalência de doença arterial coronariana subclínica (57). Por fim, uma análise secundária do conjunto de dados do WHI mostrou que aquelas que iniciaram a THM mais próxima da menopausa, em no máximo 10 anos, tendem a ter um risco reduzido de doenças cardiovasculares (11). Recentemente, um estudo de coorte com seguimento de longo prazo mostrou que mulheres submetidas à ooforectomia bilateral antes dos 45 anos apresentam aumento na mortalidade cardiovascular e este risco foi significativamente reduzido pelo tratamento com estrogênio (58). Tomados em conjunto, esses estudos apoiam a hipótese de que a THM pode ter um benefício cardiovascular quando iniciada próxima ao início da menopausa.

Estudos que provavelmente nos ajudarão a responder algumas questões sobre a via de administração, tempo de início e tipos de THM para prevenção de doenças cardiovasculares são o *Kronos Early Estrogen Prevention Study* (KEEPS) (59) e o *Early vs. Late Intervention Trial with Estradiol* (ELITE) (60). O KEEPS foi concebido para comparar os efeitos do uso do EEC oral ou do estradiol transdérmico, com ou sem progesterona micronizada, sobre a aterosclerose e a calcificação coronariana em mulheres dentro de até três anos da menopausa. O ELITE, com desfecho primário semelhante, randomizou 504 mulheres para receber estrogênio oral por 2 a 5 anos, porém dividiu os grupos em tempo desde a menopausa em menos de 6 anos ou mais de 10 anos.

2 TERAPIA HORMONAL DA MENOPAUSA, ENDOTÉLIO E MICROCIRCULAÇÃO

2.1 Fisiologia e métodos de aferição da função endotelial e microvascular: visão prática

O endotélio vascular, tradicionalmente considerado como uma camada única e contínua de células que separa o sangue da parede vascular e do interstício é atualmente reconhecido como um sítio ativo que controla a liberação de moléculas vasoativas, com a função essencial de manutenção da homeostase vascular. O endotélio é uma estrutura interna de revestimento de aproximadamente 4000 a 7000 m², pode representar até 1 kg da massa corpórea de um homem adulto e funciona como uma interface entre o sangue e os outros tecidos. O endotélio recebe estímulos físicos e químicos como força de cisalhamento, temperatura, citocinas, quimiocinas, espécies reativas de oxigênio (EROs), hipóxia, pH, dentre outros, para regular a homeostase circulatória, atuando no tônus vasomotor, no tráfego de leucócitos para os tecidos, na proliferação dos vasos e também atua como uma barreira de troca entre o sistema circulatório e os tecidos.

O endotélio regula a distribuição do volume sanguíneo através da vasodilatação, adaptando todo o sistema a mudanças no débito cardíaco, com conseqüente regulação dos fluxos regionais na dependência da demanda. Seu principal regulador reconhecido é o óxido nítrico (NO). Entretanto, existem outras substâncias, como o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), as cininas e as prostaciclina (PGI₂) com impacto positivo na saúde vascular. Há uma série de etapas que culminam na produção e liberação do NO pelo endotélio e na sua ação nas células da musculatura lisa vascular. Inicialmente, as células endoteliais precisam captar o aminoácido L-arginina que na presença da enzima óxido nítrico-sintase endotelial (eNOS) e cofatores, como a tetrahydrobiopterina, irá ser convertido em citrulina e NO. Uma vez que o NO é um gás, este rapidamente se difunde até as fibras da musculatura lisa vascular, estimulando a produção de guanilato ciclase, o que eleva os níveis de guanosina monofosfato cíclico (GMPc). Esse aumento de GMPc irá diminuir a sensibilidade do miofilamento ao cálcio, causando o relaxamento da miofibrila. Um grande número de estímulos pode causar a liberação e produção de NO, entretanto fisiologicamente, este é produzido em quantidades adequadas para a manutenção da homeostase vascular através da enzima eNOS. A força de cisalhamento, provocada pelo atrito do sangue com a camada endotelial, é um dos principais agentes responsáveis para a produção do NO.

A ação do NO sobre o sistema cardiovascular não se limita à regulação de fluxo local. A produção constante desta molécula inibe o processo inflamatório, a proliferação celular e a coagulação. Além disso, o NO inibe a fosforilação oxidativa, diminuindo consequentemente o dano celular causado por EROs, assim como a inflamação subsequente. Em resumo, o endotélio é responsável não só pela manutenção do tônus vascular, mas também pela regulação da agregabilidade plaquetária e da coagulação, modulação da fibrinólise, dissolução de trombos intravasculares formados e modulação da inflamação através da regulação da adesão e ativação de leucócitos e de quimiocinas. Quando há injúria endotelial, todas estas propriedades vaso-protetoras são perdidas ou alteradas, e o endotélio passa a ser considerado disfuncional e propicia a formação de um ambiente vascular pró-constritivo, pró-trombótico e antifibrinolítico, ou seja, ocorre uma predisposição para ativação da agregação plaquetária, migração e proliferação das células da musculatura lisa vascular, oxidação da LDL, adesão de monócitos e plaquetas e síntese de citocinas inflamatórias (61). Esse fenômeno denomina-se ativação endotelial. Do ponto de vista clínico é denominado disfunção endotelial sendo caracterizado por uma alteração do relaxamento vascular dependente do endotélio, ou seja, quando os efeitos das substâncias vasoconstritoras, como a angiotensina II, a endotelina-1 (ET-1), o tromboxano A2 e as EROs se superpõem aos efeitos das substâncias vasodilatadoras, como o NO, o EDHF, as cininas e as PGI2.

Tradicionalis fatores de risco cardiovascular, como hipercolesterolemia, tabagismo, estados de resistência insulínica, *diabetes mellitus*, HAS, obesidade, hiperhomocisteinemia, ou mesmo a combinação desses fatores, estão relacionadas à disfunção endotelial e a maior incidência de doença aterosclerótica (62-65). A disfunção endotelial precede e também se sobrepõe ao desenvolvimento da aterosclerose clínica, já que a sua presença é fator preditivo de eventos cardiovasculares, mesmo em indivíduos com angiografia normal (66). Estudos prospectivos em humanos demonstram claramente que a disfunção endotelial e a microvascular são preditores independentes de eventos cardiovasculares isquêmicos e de prognóstico em longo prazo (67-69).

Uma vez destacada a importância da função endotelial no desenvolvimento de doenças cardiovasculares ateroscleróticas, é fundamental o uso de técnicas para sua mensuração e quantificação, de forma segura, ou ainda para testar a resposta do endotélio a eventuais tratamentos. Existem muitas técnicas para a investigação do endotélio, daqueles que incidem sobre os aspectos moleculares e celulares, por meio de métodos que envolvem a cultura de tecidos e técnicas de biologia molecular, além daquelas aplicadas *in vivo*, através de procedimentos invasivos e não invasivos para avaliar a vasodilatação dependente do

endotélio, ou a determinação de substâncias plasmáticas que indicam a ativação endotelial e danos a esse tecido (70). Vamos descrever com mais detalhes conceitos da função endotelial avaliada através da reatividade vascular microvascular e através das dosagens de substâncias plasmáticas, os quais foram os métodos empregados neste estudo.

Inicialmente realizados de maneira invasiva na macrocirculação, principalmente relacionados ao sítio coronário, os estudos de reatividade vascular foram sendo desenvolvidos e hoje há inúmeras técnicas que quantificam a reatividade endotelial em diferentes sítios e com propósitos distintos. A maioria das técnicas disponíveis usa como modelo básico a avaliação da vasodilatação secundária a dois estímulos, um dependente do endotélio e outro independente. No primeiro estímulo, o endotélio é incitado por estímulos fisiológicos como isquemia, estresse mental, ou por infusão de drogas, como a acetilcolina (ACh), a produzir substâncias vasodilatadoras, dentre elas o NO. No segundo, um composto doador de NO é fornecido, usualmente nitroglicerina (NTG) ou nitroprussiato de sódio (NPS). Com isso, somos capazes de observar a resposta vasodilatadora da musculatura lisa vascular, onde o mecanismo efetor de resposta foi a produção de NO no endotélio do próprio segmento vascular mensurado (vasodilatação dependente do endotélio) ou se esta ocorreu por ação do NO exógeno doado àquele segmento vascular analisado (vasodilatação independente do endotélio).

A microcirculação é definida como o território vascular que engloba vasos com diâmetro menor que 100 μm e que inclui vênulas, capilares, arteríolas e microlinfáticos. É nesse sítio que a principal função do sistema vascular ocorre, permitindo a troca de nutrientes com os tecidos e a remoção de excreta celular em resposta às variações de demanda (71). Além desta função, a microcirculação é responsável pelo equilíbrio hidrostático, evitando grandes flutuações desta nos capilares. Neste sítio ocorre uma importante queda da pressão arterial e, obviamente, a microcirculação se impõe como importante fator determinante da resistência vascular periférica total (72). Em condições normais, mecanismos autorregulatórios, sistêmicos e locais, especialmente miogênicos e metabólicos, permitem o funcionamento normal do endotélio e da microcirculação. Entretanto, em condições patológicas, a perda destes mecanismos resulta em disfunção microvascular.

Existem algumas técnicas utilizadas para aferir a função endotelial na microcirculação, entre elas citamos a fluxometria por laser Doppler (LDF), a videocapilaroscopia do leito periungueal (VCLP) e a pletismografia por oclusão venosa (POV). A LDF avalia o fluxo sanguíneo microvascular não nutritivo do tecido cutâneo. O estímulo à vasodilatação dependente do endotélio é desencadeado através de isquemia e subsequente hiperemia reativa,

estímulo térmico ou ainda através da iontoforese cutânea de drogas vasoativas, como a ACh. Com esta última técnica é possível demonstrar a ocorrência de variações de fluxo microvascular em diferentes doses, estabelecendo curvas dose-resposta da reatividade microvascular cutânea. Através desta técnica, foi possível a observação de correlação inversa entre a reatividade microvascular e risco cardiovascular (73). Outra técnica é a VCLP. Esse método é capaz de visualizar os capilares presentes no leito periungueal através de um microscópio ligado a um sistema digital de imagem. Medidas da velocidade de deslocamento das hemácias em estado de repouso (VDH) e também durante a hiperemia reativa, denominado velocidade de deslocamento máximo das hemácias (VDH_{max}) circulantes, assim como o tempo necessário para alcançá-lo ($TVDH_{max}$) podem ser mensurados, mostrando boa correlação com parâmetros antropométricos, de riscos cardiovasculares e metabólicos (74). Como é nos capilares que a principal função do sistema circulatório ocorre, isto é, a troca de nutrientes e oxigênio e de excretas dos tecidos e a circulação, é possível afirmar que esta técnica avalia a reatividade microvascular nutritiva.

A POV é capaz de medir diferenças de volume de membros superiores ou inferiores, através de um elástico normalmente contendo mercúrio colocado na região a ser analisada, que funciona com um sensor do aumento do volume do antebraço ou da perna. Nessa técnica, o fluxo sanguíneo do antebraço (FSA) ou da perna pode ser aferido e seus achados baseiam-se principalmente em alterações na reatividade de artérias de resistência no músculo. Esta técnica foi capaz de prever novos eventos coronários em portadores de doença arterial coronária, mostrando boa correlação entre achados da circulação de membros periféricos com a doença arterial coronária (68). A mensuração da reatividade endotelial em membros periféricos durante a hiperemia reativa também demonstra ser um preditor de eventos cardiovasculares primários (69).

2.2 Estrogênio e ações cardiovasculares com foco na função endotelial

Os receptores de estrogênios são membros da superfamília dos receptores de hormônios esteróides, que atuam como fatores de transcrição, alterando a expressão gênica após a sua ativação. À semelhança dos receptores de androgênios, os de estrogênio possuem o domínio de ligação do DNA N-terminal e o domínio de ligação do ligante C-terminal. Foram identificados dois subtipos de receptores de estrogênio. Esses subtipos diferem na sua estrutura, são codificados por diferentes genes e têm distribuição tecidual distinta. O receptor

de estrogênio alfa (ER- α) é encontrado predominantemente no endométrio, nas células do câncer de mama e no estroma ovariano, enquanto o beta (ER- β) é encontrado predominantemente nas células da granulosa e nas espermátides.

Os receptores de estrogênio são, em sua maior parte nucleares, mas também podem ser encontrados no citoplasma. O estrogênio livre sofre difusão para o interior da célula e liga-se ao domínio de ligação do ligante do receptor, que se dissocia de suas proteínas chaperones citoplasmáticas. A seguir, o complexo estrogênio-receptor é transferido para o núcleo da célula, onde se liga na forma de homodímeros ou heterodímeros às sequências de DNA, denominadas elementos de resposta dos estrogênios, regulando a transcrição gênica. Os efeitos fisiológicos do estrogênio através da ativação da transcrição gênica, ou também denominado efeito nuclear ou genômico, levam vários minutos ou horas para se manifestarem. Alguns efeitos agudos dos estrogênios não podem ser explicados pelo mecanismo de transcrição e representam o resultado da ação estrogênica direta sobre as membranas celulares, sendo denominados efeitos extranucleares ou não-genômicos.

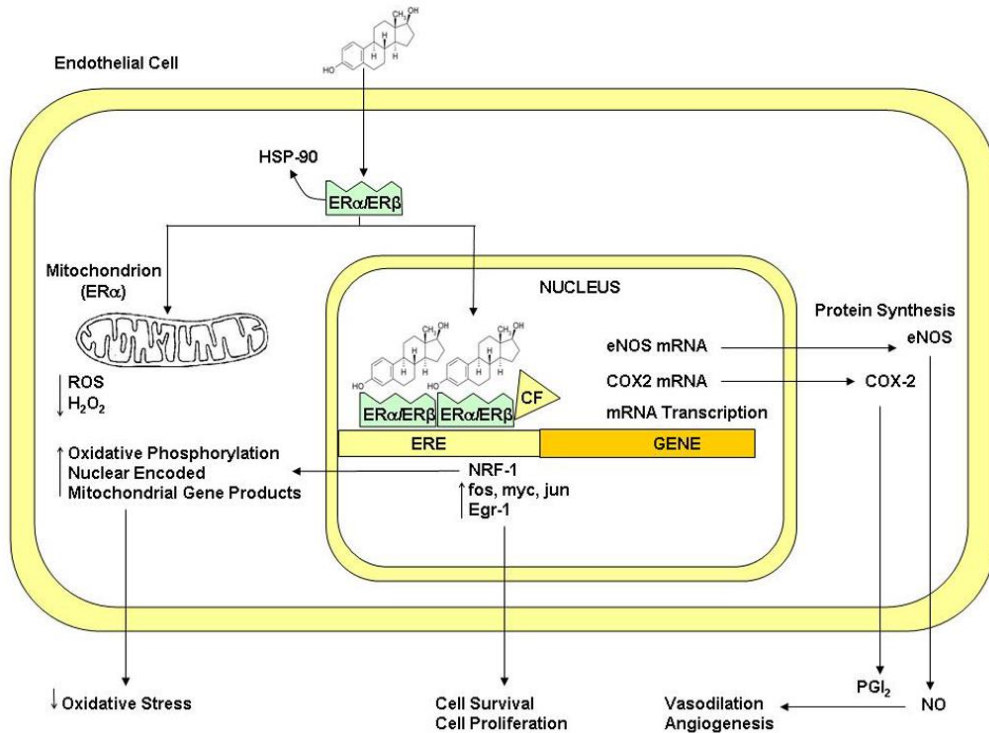
Estudos têm revelado ações agudas do estrogênio em diferentes sistemas, especialmente em tecidos não reprodutivos, como o sistema cardiovascular (75). Já foi identificada a presença de ER- α e ER- β nas células endoteliais, nos cardiomiócitos e nas células musculares lisas vasculares. Pela ação extranuclear, o estrogênio exerce efeitos benéficos como vasodilatação aguda, efeitos anti-inflamatórios, regulação da proliferação e da migração das células vasculares e confere ainda proteção aos cardiomiócitos. Estas ações extranucleares não exigem a expressão do gene ou síntese protéica e são independentes da ativação dos receptores nucleares (76). A ação extranuclear do estrogênio ocorre através de complexas interações com moléculas sinalizadoras associadas à membrana, tais como canais iônicos, proteínas G (GPR30) e tirosina quinase c-Src, as quais levam à ativação de cascatas reguladoras, como proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e o fosfatidil-inositol-3-quinase (PI3-K) (77).

O estrogênio parece desempenhar um importante papel protetor no sistema cardiovascular, pois é capaz de induzir vasodilatação tanto por ação não-genômica, resultando em aumentos súbitos de NO, como por ação genômica, através da indução da transcrição da eNOS. Estes efeitos sobre a biodisponibilidade de NO permitem que o estrogênio tenha a capacidade de melhorar a resposta da parede arterial após lesão vascular e inibir o desenvolvimento da aterosclerose pela promoção da reendotelização, da inibição da proliferação da célula muscular lisa vascular e deposição de matriz extracelular (78). Os seus efeitos na modulação do relaxamento vascular podem ocorrer também através do estímulo do

EDHF e da inibição da produção de ET-1 (79;80). Além disso, os estrogênios podem modular as respostas vasculares miogênicas, resultando em redução do tônus basal microvascular (81). Os efeitos protetores do estrogênio sobre a estrutura e função vascular estão associados não só às suas ações sobre a produção de NO, mas também ao fato deste hormônio aumentar a biodisponibilidade do NO, reduzindo sua degradação (82). Barbacanne e colaboradores (83) observaram que a piora da disfunção endotelial, desencadeada pela ooforectomia de ratas espontaneamente hipertensas (SHR), poderia ser corrigida com a reposição de estrogênio, sem alterar a atividade e a expressão da eNOS na aorta, mas reduzindo a geração de EROs. Está bem estabelecido que na presença de EROs, em especial O_2^- , o NO sintetizado pela célula endotelial pela sua alta afinidade com o O_2^- liga-se rapidamente a esta molécula e é transformado em peroxinitrito. Essa reação ocorre antes da liberação do NO para os tecidos, tornando-o, portanto, menos disponível (84). O estrogênio pode então modular a função endotelial por aumentar a geração de NO e também por reduzir a formação de EROs, em especial o O_2^- , diminuindo seus efeitos deletérios sobre o NO e promovendo maior biodisponibilidade de NO ao tecido vascular.

As figuras 1 e 2 demonstram de modo esquemático a ação genômica, mitocondrial e não-genômica do estrogênio, respectivamente, sobre a célula endotelial e sobre a célula muscular lisa vascular.

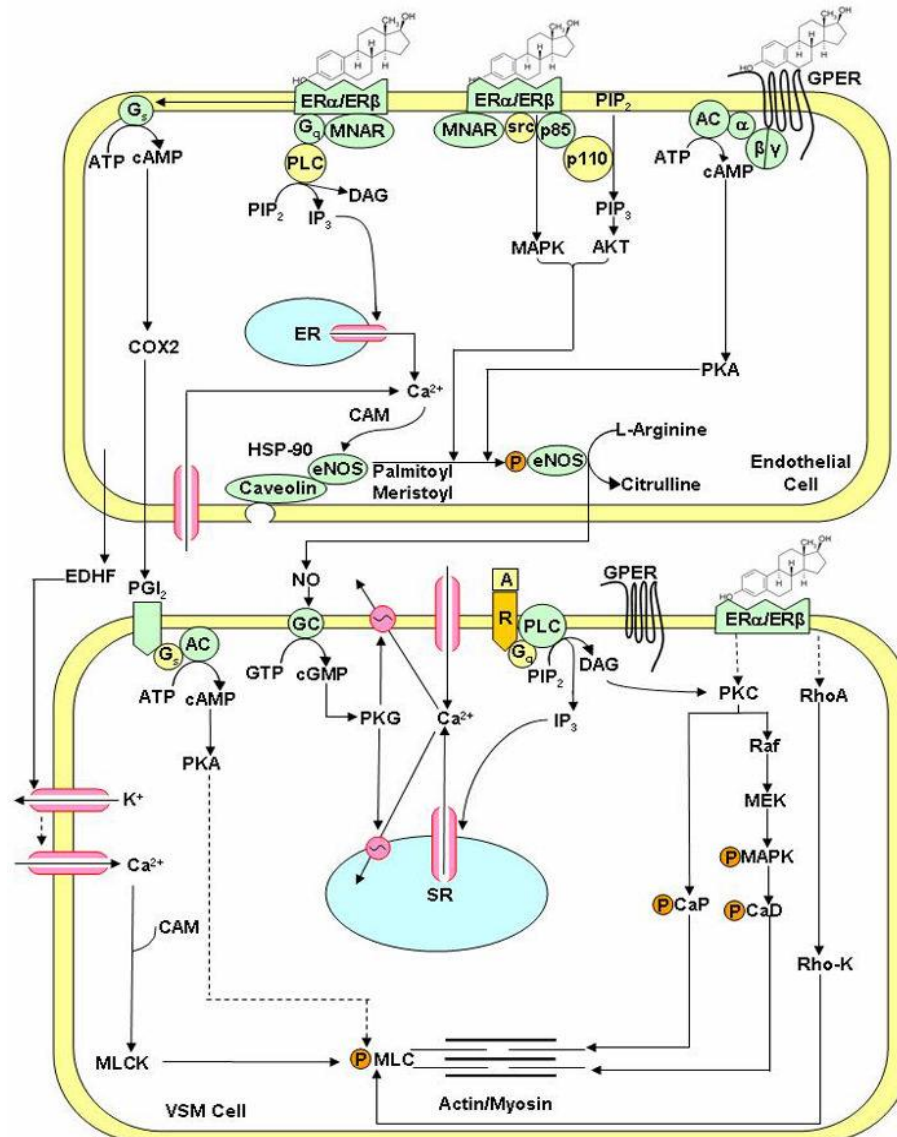
Figura 1 - Efeitos genômico e mitocondrial do estrogênio nas células endoteliais



O estrogênio liga-se ao seu receptor (ER) no citosol e dissocia-se da proteína de choque térmico 90 (HSP-90). O complexo ER/estrogênio transloca-se para a mitocôndria onde diminui a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e H₂O₂, reduzindo o estresse oxidativo e aumentando a fosforilação oxidativa celular. No núcleo, o complexo, aumenta a expressão do fator respiratório nuclear-1 (NRF-1), aumentando os níveis dos genes mitocondriais codificados nucleares. ER/estrogênio também aumenta a expressão de fos, myc, e jun, promovendo o crescimento e proliferação celular, além de estimular a Egr-1, a qual é regulada em resposta a uma lesão aguda e crônica. O estrogênio pode aumentar a transcrição do gene da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e ciclo-oxigenase-2 (COX-2), levando ao aumento da produção de óxido nítrico (NO) e prostaciclina (PGI₂), com consequente estimulação da vasodilatação e angiogênese.

Fonte: *Current Drug Metabolism* 2010;11(8):693–714. (85)

Figura 2 - Efeito não-genômico do estrogênio sobre a célula endotelial e a célula muscular lisa vascular



O estrogênio liga-se a receptores de estrogênio (ERs) na membrana celular e ativa a fosfolipase C (PLC), que conduz a geração de inositol trifosfato (IP_3) e liberação de Ca^{2+} das reservas intracelulares. O Ca^{2+} ativa a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), dissociando-se da caveolina-1. O estrogênio também estimula a transformação do fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP_2) em fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP_3), a qual ativa a AKT e a fosforilação citosólica da eNOS, que transloca-se de volta para a membrana celular onde se submete a miristoilação e palmitoilação. O estrogênio aumenta a fosforilação da eNOS pela ativação da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e a proteína quinase dependente de AMPc (PKA). Ativada a eNOS, esta converte L-arginina em citrulina, resultando em aumento da produção de NO. A liberação de NO a partir de células endoteliais ativa a proteína quinase dependente de cGMP (PKG) na célula da musculatura lisa vascular, que por sua vez diminui o Ca^{2+} intracelular, por estimular a extrusão deste íon e as bombas de troca iônica. O estrogênio também ativa a ciclo-oxigenase-2 (COX-2), com conseqüente aumento da prostaciclina (PGI_2). PGI_2 aumenta o AMPc na célula da musculatura lisa vascular, induzindo uma diminuição do Ca^{2+} intracelular por mecanismos semelhantes aos do cGMP. O estrogênio pode também aumentar a liberação do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) levando a hiperpolarização da célula da musculatura lisa vascular, resultando em relaxamento. O estrogênio também atua em vias inibitórias da contração da célula da musculatura lisa vascular, como impedir a entrada de Ca^{2+} , inibir a proteína quinase C (PKC), Rho-quinase e MAPK. As setas tracejadas na figura indicam inibição da via.

Fonte: *Current Drug Metabolism* 2010;11(8):693–714.(85)

2.3 Terapia hormonal da menopausa e função endotelial: revisão de literatura

Existem diversos estudos que avaliam os efeitos da THM sobre a função endotelial, porém na maioria deles o sítio de estudo é a macrocirculação (86-89). Em relação a esse sítio vascular, o método mais empregado é a dilatação mediada pelo fluxo (do inglês, *flow-mediated dilation* - FMD), geralmente avaliado por ultrassonografia de alta resolução na artéria braquial (90). Este método consiste em mensurar a variabilidade do diâmetro arterial em resposta ao aumento do fluxo sanguíneo após estímulo desencadeado para produção endotelial de NO: normalmente este estímulo é pós-isquêmico, porém pode ser químico (91). Ao contrário do exposto com relação à macrocirculação, existem poucos estudos avaliando os efeitos da THM sobre a microcirculação.

Em estudos observacionais, um estudo avaliou os efeitos da THM sobre a reatividade microvascular e função endotelial de indivíduos com e sem DM2. Foram estudados seis grupos de mulheres: na pré-menopausa saudáveis (n=28, 41± 8 anos), na pré-menopausa com DM2 (n=16, 43±6 anos), na pós-menopausa saudáveis (n=12, 57±4 anos), na pós-menopausa com DM2 (n=17, 62±5 anos), na pós-menopausa saudáveis em THM (n=13, 51±5 anos) e na pós-menopausa com DM2 em THM (n=11, 57±7 anos). Utilizou-se a LDF para medir a vasodilatação da microcirculação não nutritiva cutânea do antebraço em resposta a iontoforese de ACh e NPS. Tanto a vasodilatação dependente do endotélio quanto a independente foram significativamente maiores em mulheres saudáveis na pré-menopausa comparadas àquelas diabéticas na pré-menopausa (p<0,001). O mesmo padrão de resposta ocorreu quando foram comparadas mulheres na pós-menopausa saudáveis com diabéticas e saudáveis em THM com diabéticas em THM (p<0,001), ou seja, mulheres com DM2 apresentam piora da função endotelial independente do *status* hormonal (92).

Utilizando a tomografia por emissão de pósitrons (PET scan) para aferir o fluxo sanguíneo microvascular do leito coronário em repouso, durante o teste pressor ao frio e durante a hiperemia reativa induzida pelo dipiridamol, 54 mulheres pós-menopáusicas sem doença arterial coronariana, sendo que 23 não faziam uso de hormônio e 31 faziam uso de estrogênio isolado ou associado a um progestógeno, foram comparadas a 12 jovens saudáveis. Cada grupo foi subdividido por fatores de risco coronariano. O dado positivo mais relevante foi que mulheres em uso da THM sem fatores de riscos cardiovasculares apresentaram resultados do teste pressor ao frio semelhantes a mulheres jovens saudáveis. A associação de progesterona não anulou os efeitos do estrogênio (93). Em um seguimento deste estudo, as mulheres com riscos cardiovasculares iniciaram tratamento para minimizá-los, como o uso de

estatinas, inibidor plaquetário e antihipertensivos, e após um seguimento de 24 ± 14 meses, os autores observaram que aquelas que continuavam com a THM apresentaram uma função coronariana dependente do endotélio mais preservada do que as que não estavam mais em uso do tratamento (94).

Com relação aos ensaios clínicos avaliando os efeitos da THM na microcirculação, existem estudos com alto poder de evidência, como os randomizados, duplo-cegos e controlados, assim como outros sujeitos a viéses, como estudos de intervenção sem grupo controle. Os principais estudos encontrados estão listados na tabela 1. Discorrerei com mais detalhes aqueles que apresentam maior relevância clínica.

Usando como método de avaliação da microcirculação nutritiva a VCLP, observou-se que a THM, avaliada com o uso de estrogênio transdérmico ou oral associados a 14 dias de progesterona, ou ao uso isolado de tibolona, determinou um aumento da velocidade de deslocamento de hemácias após 6 e 12 meses de intervenção e conseqüentemente levou a um aumento no fluxo microvascular na ordem de 20 a 30% dos valores iniciais, respectivamente. As pacientes testadas (n=41) apresentavam idade média de 52,6 anos, IMC de $24,9\text{kg/m}^2$ e tempo da menopausa em torno de 2 a 3 anos (95).

Com a POV, o predomínio da resposta vascular é dado por arteríolas de resistência e atualmente é considerado o padrão-ouro para avaliação da função endotelial neste sítio microvascular. Comparando pós-menopáusicas, com média de idade de 54 anos, IMC de $22,3\text{kg/m}^2$ e intervalo médio de menopausa de 6 anos, após 3 meses de intervenção com $0,625\text{mg}$ de CEE associado à $2,5\text{mg}$ MPA, ou $0,3\text{mg}$ de CEE associado à $2,5\text{mg}$ de MPA e ainda com um grupo controle, observou-se aumento semelhante no FSA durante hiperemia reativa, ocasionada por oclusão arterial de 5 minutos, em ambos os grupos com tratamento ativo ($p < 0,01$). As alterações no FSA, após administração sublingual de NTG, foram semelhantes em todos os três grupos, não apresentando diferença estatística (96).

Outro estudo comparou o uso de THM oral com 1mg de estradiol oral e $0,5\text{mg}$ de acetato de noretisterona (NETA) em pós-menopáusicas saudáveis com média de idade de 65 anos, IMC de $28,8\text{kg/m}^2$ e duração da menopausa de 13 anos, com diabéticas do tipo 2, com média de idade de 61 anos, IMC de $26,2\text{kg/m}^2$ e duração da menopausa de 9 anos. Após 6 meses de THM não houve alterações significativas nos parâmetros microvasculares das mulheres saudáveis, porém nas diabéticas, observou-se uma redução na resposta hiperêmica da pele, tanto para ACh ($p = 0,01$) quanto para o NPS ($p = 0,01$) (97).

Tabela 1 - Principais estudos demonstrando as ações de diversos tipos de THM sobre a função microvascular

Autores	Características da população de estudo					Grupos do estudo	Métodos/parâmetros avaliados/tempo intervenção	Resultados
	Idade (anos)	IMC (kg/m ²)	TM	N	Seleção			
Haenggi et al., 1995 (95)	52	24,9	03	140	Mulheres saudáveis	<u>4 grupos</u> - Controle (não usou placebo) - 2mg de E2 + 10mg de didrogesteron oral - 50µg E2 adesivo TD + 10mg de didrogesteron oral - Tibolona 2,5mg oral	VCLP Fluxo sanguíneo capilar basal TI: 12 meses	•Aumento de 20 a 30% no fluxo sanguíneo capilar basal em todos os grupos, com exceção do controle.
Vehkavaara et al., 2000 (98)	55	25	04	27	Mulheres saudáveis	<u>3 grupos</u> - Placebo - 2mg E2 oral - 50µg E2 adesivo TD	POV FSA basal, infusão arterial de ACh e NPS TI: 03 meses	• Apenas no grupo que recebeu E2 oral ocorreu aumento do FSA após infusão de ACh e NPS.
Peterson et al., 2001 (99)	58	34	10	24	Mulheres obesas	<u>02 grupos</u> - Placebo - 0,625mg EEC	PET Scan FSM no repouso, após estímulo com adenosina e RPM TI: 04 a 06 semanas	• Não houve diferença nos parâmetros avaliados entre os grupos.
Higashi et al., 2001(100)	52	23	-	35	Mulheres normotensas e hipertensas	<u>4 grupos</u> - Hipertensas controle (não usaram placebo) - Hipertensas em uso de 0,625mg EEC + 2,5mg AMP - Normotensas controle - Normotensas em uso de 0,625mg EEC + 2,5mg AMP	Hiperemia reativa (isq. 5 min) e NTG SL TI: 3 meses	•FSA basal não alterou nos 4 grupos; •Aumento do FSA durante a hiperemia reativa nos 2 grupos tratados com EEC, sendo mais acentuado no grupo com HAS; •Sem alterações com a NTG.

Sanada et al., 2003 (96)	54	22,3	06	51	Mulheres saudáveis	<u>3 grupos</u> - Controle (não usou placebo) -0,625mg EEC + 2,5mg AMP -0,3mg EEC+ 2,5mg AMP	POV Hiperemia reativa (isq. 5 min) e NTG SL TI: 3 meses	<ul style="list-style-type: none"> •FSA basal não alterou; •Aumento do FSA durante a hiperemia reativa de modo similar nos 2 grupos tratados; •Sem alterações com a NTG.
Chabbert-Buffet et al., 2003 (101)	-	-	-	16	Mulheres saudáveis	<u>2 grupos</u> - Placebo - 1mg E2 oral + 0,25mg promegestona	LDF Fluxo no dorso do pé em repouso e na hiperemia reativa TI: 6 meses	<ul style="list-style-type: none"> • Sem diferenças intragrupo e intergrupos.
Duvernoy et al., 2004 (102)	60	30	-	15	Mulheres com níveis ↑ de CT e excesso de peso + outro RCV	<u>2 grupos</u> - Placebo -0,625mg EEC + 200mg progesterona micronizada oral	PET Scan FSM no repouso, teste pressor ao frio e adenosina TI: 3 meses	<ul style="list-style-type: none"> •Sem alterações nos parâmetros microcirculatórios avaliados.
Gooding et al., 2005 (97)	63	27	11	37	Mulheres saudáveis e com DM2	<u>2 grupos</u> - Saudáveis em uso de 01mg E2 + 0,5mg noretisterona oral - Diabéticas em uso de 01mg E2 + 0,5mg noretisterona oral	LDF ACh e NPS TI: 6 meses	<ul style="list-style-type: none"> •Cada grupo foi comparado apenas com ele próprio, no basal e após 06 meses de intervenção; •Diminuição das UP no grupo das diabéticas tanto ao estímulo da Ach quanto do NPS;
Knuuti et al., 2007 (103)	60	25	-	56	Mulheres com angina ao exercício ou ao repouso	<u>2 grupos</u> - Placebo - 1mg E2 + 02mg drospirenona oral	PET Scan RPM TI: 6 semanas	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento da reserva de perfusão miocárdica no grupo E2.

IMC: índice de massa corporal; TM: tempo decorrido desde a menopausa; N: número de participantes do estudo; E2: estradiol; TD: transdérnico; VCLP: videocapilaroscopia do leito periungueal; TI: tempo de intervenção; POV: pletismografia por oclusão venosa; FSA: fluxo sanguíneo do antebraço; RVP: resistência vascular periférica; LDF: laser Doppler fluxometria; NTG SL: nitroglicerina sublingual; EEC: estrogênios equinos conjugados; PET: tomografia por emissão de pósitrons; FSM: fluxo sanguíneo do miocárdio; RPM: reserva de perfusão do miocárdio, obtido através da divisão do FSM em repouso pelo FSM após adenosina; AMP: acetato de medroxiprogesterona; DM2: *diabetes mellitus* tipo 2; ACh: acetilcolina; NPS: nitroprussiato de sódio; CT: colesterol total; RCV: risco cardiovascular; ↓: diminuição; ↑: aumento.

Baseado nestes dados pode-se inferir que os efeitos crônicos ou subagudos da THM sobre a função endotelial e microvascular corroboram resultados recentes de ensaios clínicos, onde mulheres saudáveis com até 60 anos e início da THM próximo a menopausa, no máximo 10 anos, sem doença aterosclerótica evidente, ou seja, sem diabetes ou doença coronária, possam se beneficiar da THM visando uma maior proteção cardiovascular.

3 EFEITOS DA TERAPIA HORMONAL DA MENOPAUSA EM OUTROS FATORES DE RISCO CARDIOVASCULAR

3.1 Terapia hormonal da menopausa e obesidade

Nosso organismo armazena o excesso de energia absorvida sob a forma de TG, em gotículas lipídicas, em um processo denominado lipogênese. Quando há demanda para essa energia, os TG são catabolizados em ácidos graxos livres (AGL) por meio das vias lipolíticas. A lipase lipoproteica (LPL) é a enzima encarregada por transformar TG em AGL. Diversas vias endócrinas são capazes de regular o desenvolvimento e a função do tecido adiposo, entre elas sabe-se que os esteróides sexuais podem desempenhar esta função. Camundongos fêmeas apresentam maior capacidade lipogênica quando comparadas a machos, mesmo tendo adipócitos menores (104). Camundongos ooforectomizadas tratadas com estrogênio exibem nos adipócitos uma taxa de lipogênese reduzida (105). Quando níveis circulantes de estrogênio são elevados acima de uma taxa fisiológica, o metabolismo do tecido adiposo é alterado, ocasionando uma menor deposição de gordura pela redução da taxa de lipogênese. Camundongos com *knockout* do ER- α exibem volume aumentado de tecido adiposo sem diferenças na ingesta calórica, o que sugere que o ER- α desempenhe um papel importante na fisiologia do tecido adiposo (106). Isto é apoiado por observações epidemiológicas nas quais os níveis de TG encontram-se aumentados na pós-menopausa e que a atividade da LPL reduz com o uso de estrogênio (107).

Estudos indicam que camundongos fêmeas com *knockout* de ER- β , submetidos à dieta com alto teor de gordura, apresentam maior peso corporal comparado ao tipo selvagem (108). A justificativa para este achado foi um aumento na adipogênese. Além disso, o receptor ativado por proliferadores do peroxissoma (PPAR- γ), que atuam induzindo a diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos, foi regulado negativamente pelo ER- β , sugerindo que PPAR γ poderia ser um mediador dos efeitos metabólicos observados em camundongos com *knockout* de ER- β (108). Em resumo, parece que ambas as isoformas de receptores de estrogênio participam nas ações antilipogênicas do estrogênio.

Os efeitos da THM na distribuição de peso e gordura corporal em humanos, ainda não estão totalmente definidos. No estudo *Women's Health, Osteoporosis, Progestin, Estrogen*

(*Women's HOPE*), 822 mulheres saudáveis com tempo de menopausa de 1 a 4 anos foram tratadas durante 02 anos com diferentes combinações de THM oral ou placebo. Foi notada uma redução no ganho de peso, com menor incremento na porcentagem de massa gorda, naquelas que usaram THM em comparação ao placebo (109).

No estudo PEPI com seguimento de 3 anos, as mulheres que usaram 0,625 mg de EEC com ou sem progesterona, ganharam 1 kg a menos de peso corporal e 1,2 cm a menos na circunferência da cintura do que as mulheres que usaram placebo (110). Gambacciani e colaboradores utilizando densitometria por dupla emissão de raios-X para avaliação da composição corporal em 31 mulheres, observaram que o grupo controle apresentou um aumento significativo no peso corporal ($P < 0,05$) e na porcentagem total de gordura no tronco ($P < 0,05$), sugerindo um aumento na distribuição central de gordura em comparação ao grupo que fez uso da THM (111). Uma metanálise mostrou que o uso da THM em mulheres sem diagnóstico de diabetes, promoveu aumento da massa magra corporal, diminuição da circunferência da cintura e da gordura abdominal, em comparação ao placebo ou a nenhum tratamento (22). Em contrapartida, uma revisão sistemática de 22 estudos clínicos mostrou que a THM com ou sem a adição de progesterona não desempenhou efeito sobre o peso ou distribuição de gordura em mulheres pós-menopáusicas (112). Desta forma, ainda são bastante controversos os efeitos dos diversos tipos de THM sobre o ganho de peso e a composição corporal.

3.2 Terapia hormonal da menopausa e metabolismo glicêmico

Os receptores de estrogênio ER- α e ER- β estão envolvidos no balanço energético (113) embora, até o momento, o ER- α parece desempenhar um maior papel. Ratos com *knockout* para ER- α , bem como aqueles com *knockout* para aromatase (Arko), são obesos e resistentes à insulina (114;115). O ER- α está envolvido na manutenção do metabolismo da glicose em vários tecidos, incluindo os principais tecidos envolvidos na sensibilidade à insulina como fígado, músculo esquelético e tecido adiposo, mas também nas células β pancreáticas e no sistema nervoso central. Estudos utilizando clampeamento euglicêmico hiperinsulinêmico (CEH) revelaram que o *knockout* do ER- α está associado com resistência insulínica hepática (116). Homens identificados com deficiência de expressão do ER- α , apresentam diminuição do metabolismo da glicose e polimorfismos no gene ER- α estão

associados com o desenvolvimento de DM2 e síndrome metabólica (117;118). O papel crítico do ER- α na manutenção da homeostase da glicose foi estabelecido em ratos *Ob/Ob*, quando o tratamento com o ligante seletivo do ER- α melhorou a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina (119).

Os estrogênios são também conhecidos por regular a função das células β pancreáticas, através de um mecanismo ER- α -dependente. Um estudo em ratos sugere que a exposição crônica ao estrogênio aumenta a expressão do gene da insulina e sua liberação sem alterar o volume das células β (120). No músculo, os dois subtipos de receptores de estrogênio têm mostrado efeitos opostos com o ER- α induzindo e o ER- β inibindo a expressão da proteína transportadora de insulina tipo 4 (GLUT4) (121). Curiosamente, estudos recentes mostram que camundongos com *knockout* do receptor acoplado a GPR 30, uma proteína integral da membrana plasmática com elevada afinidade para o estrogênio, apresentam tolerância à glicose prejudicada, sugerindo que a via de ação não genômica do estrogênio também possa apresentar propriedades antidiabéticas (122). Além disso, estudos em roedores demonstraram que a deficiência do ER- α piora a homeostase lipídica tanto no músculo esquelético quanto no fígado, diminuindo a capacidade da insulina em suprimir a produção hepática de glicose e a utilização desta pelo músculo. A ativação do ER- α em roedores submetidos a uma dieta com alto teor de gordura e com resistência genética a leptina (*Ob/Ob*), melhora a sensibilidade insulínica por diminuição de depósitos ectópicos de lipídios no músculo esquelético (116;123). O efeito do ER- α em mediar a sensibilidade insulínica via mecanismos centrais permanece indeterminado.

As mulheres na pré-menopausa são mais sensíveis à insulina em comparação aos homens (124). Em estudo observacional, a THM mostrou melhorar a sensibilidade à insulina e diminuir a glicemia tanto em mulheres pós-menopáusicas saudáveis quanto em diabéticas (125). O WHI demonstrou que no grupo intervenção (EEC 0,625mg + MPA 2,5mg) ocorreu diminuição dos níveis de glicose e insulina no jejum, com melhora da sensibilidade insulínica avaliado pelo *homeostatic model assessment – insulin resistance* (HOMA-IR), principalmente com um ano de seguimento, comparado ao grupo placebo (126). Uma metanálise mostrou que a THM reduziu em 12,9% o HOMA-IR comparado ao controle, reduzindo no jejum a glicemia em 2,5% e a insulinemia em 9,3% (22). O estudo PEPI (127), com seguimento de 03 anos, randomizado com 875 participantes comparou placebo com diversos tipos de THM. Os níveis de insulina e glicose em jejum diminuiram respectivamente, 16,1% e 2,2 mg/dl,

comparando todos os grupos que utilizaram THM com o placebo. No entanto, avaliando a glicemia de 2h do teste oral de tolerância à glicose (TOTG), os níveis de glicose aumentaram nos grupos com tratamento ativo, sem correspondente aumento nos níveis de insulina. Este estudo também sugeriu que o benefício máximo da THM sobre o metabolismo dos carboidratos é alcançado em pacientes mais hiperglicêmicos e hiperinsulinêmicos no início da terapia. Entretanto, existem muitos outros estudos que não demonstraram benefício algum da THM na sensibilidade insulínica (128-130).

Ensaio clínico utilizando o CEH, método padrão ouro para avaliar a sensibilidade insulínica, na maioria das vezes não demonstraram benefício da THM, às vezes ocorrendo até piora. Os principais estudos encontrados estão listados na tabela 2.

Avaliando 22 mulheres saudáveis, com idade média de 43 anos e IMC de 24,8 kg/m² após menopausa cirúrgica, o uso de 50 µg de estradiol transdérmico associado ou não a 1mg de NETA, não provocou melhora na sensibilidade insulínica comparado ao placebo (128). Um estudo randomizado, duplo-cego, placebo controlado, investigou 51 mulheres saudáveis na pós-menopausa, com idade média de 51 anos e IMC de 24,9 kg/m², em uso de EEC 0,625mg associado à MPA 2,5mg. As gorduras intra-abdominal e subcutânea não apresentaram diferenças entre os grupos tratados. No sexto mês de seguimento, a sensibilidade à insulina não se alterou no grupo placebo mas diminuiu 17% no grupo da THM, mantendo-se alterada até o término do estudo, após 02 anos de intervenção (p<0,01). Após um ano da retirada da medicação, o CEH foi repetido, demonstrando um aumento de 25% no grupo que usava a THM, ficando semelhante a do grupo placebo, ou seja, o efeito da resistência insulínica provocado pelo hormônio foi revertido com sua retirada (129). Cooper e colaboradores, também encontraram piora da sensibilidade insulínica em mulheres saudáveis, com média de 55 anos e IMC menor que 30 kg/m², submetidas a EEC 0,625mg e MPA 2,5mg por 1 ano comparadas ao grupo placebo (130). No entanto, é importante ressaltar que estes estudos citados, utilizando o CEH, não avaliaram sujeitos com condições clínicas que sabidamente ocasionam resistência insulínica. Neste contexto, Andersson e colaboradores selecionaram 25 diabéticas tipo 2, sem uso de insulina, com idade média de 59 anos e IMC de 30,4 kg/m², para usarem placebo ou 2 mg de estradiol oral associado a 1 mg de NETA apenas no terceiro mês, em um estudo com delineamento cruzado, duplo-cego com cada período de tratamento durando três meses, intercalado por um período de “descanso” de oito semanas entre os tratamentos. Ocorreu diminuição significativa com o uso de estradiol da glicemia de

jejum (GJ), da hemoglobina glicosilada (HbA1c) e dos níveis de peptídeo-C comparado ao placebo, porém sem melhora significativa da sensibilidade insulínica avaliada pela técnica do clampeamento (131). De maneira discordante, 28 mulheres com sobrepeso ou obesidade, idade média de 58 anos, IMC de 31,5 kg/m², não diabéticas, em uso de THM por no mínimo 03 anos, com estrogênio isolado ou associado à progesterona, foram selecionadas para realizarem o CEH. Como grupo controle foram selecionadas mulheres com as mesmas características do grupo ativo, pareadas por idade, peso e IMC. O uso de hormônios não só não demonstrou melhorar a sensibilidade insulínica como até a piorou comparado ao grupo controle (132).

Os efeitos da THM sobre a sensibilidade insulínica são muitos controversos. Em pacientes saudáveis parece não haver benefício no uso do hormônio, às vezes até podendo causar piora na sensibilidade insulínica, enquanto faltam dados para avaliar os efeitos em pacientes que apresentam características clínicas de resistência insulínica. Existem hipóteses se o tipo ou a via de administração do estrogênio resultaria em efeitos diferentes na sensibilidade insulínica, alguns trabalhos conotam que o estrogênio oral apresentaria um maior efeito que o transdérmico (22), enquanto outros mostram dados contrários (133). As controvérsias neste assunto persistem (134). Outra questão é se a progesterona ou o tipo empregado não poderia abolir possíveis efeitos positivos do estrogênio na sensibilidade insulínica (134;135). Existem muitas dúvidas ainda envolvendo a relação THM e sensibilidade insulínica que devem ser esclarecidas com estudos futuros.

3.3 Terapia hormonal da menopausa e inflamação de baixo grau

A inflamação desempenha um papel central na patogênese de muitas formas de doença vascular (66). Processos inflamatórios participam de todo o processo patogênico da aterosclerose, desde fases iniciais, como injúria às células endoteliais, até fases tardias, como ruptura de placas instáveis (136). A lesão aterosclerótica é a anormalidade mais comum encontrada nas artérias, decorrente inicialmente de dois processos básicos: acúmulo de colesterol e proliferação das células musculares lisas na túnica íntima, alterações nas quais, após longo tempo e ação persistente de diversos fatores, resultam na formação de uma placa fibrosa que se projeta para o lúmen, modificando a túnica média e levando a uma série de complicações circulatórias.

Tabela 2 - Principais estudos demonstrando as ações dos diversos tipos de THM sobre o metabolismo glicêmico, mensurado através do clampeamento euglicêmico hiperinsulinêmico

Autores	Características do estudo				Tipos de THM	Efeitos no CEH
	Idade (anos)	IMC (kg/m ²)	N	Duração do estudo		
O'Sullivan e Ho (133)	61	25	9	3 meses	• Estradiol 100 µg patch • EEC 1,25mg oral	= =
Andersson et al. †(137)	59	30	25	3 meses	• Estradiol 2 mg oral + NETA 1mg	=
Cucinelli et al. (138)	52	27	21	6 meses	• Estradiol 50 µg <i>patch</i> • Estradiol 50 µg <i>patch</i> + didrogesterona 10mg	= +
Kimmerle et al.(139)	56	25	54	3 meses	• Estradiol 2 mg oral + NETA 1mg • Estradiol 1 mg oral + NETA 0,5 mg	- =
Duncan et al. (128)	44	25	22	6 semanas	• Estradiol 50 µg <i>patch</i> • Estradiol 50 µg <i>patch</i> + NETA 1mg	= =
Walker et al. (140)	52	27	30	6 meses	• Estradiol 2 mg oral + NETA 1mg	=
Mattiasson et al. (141)	52	-	51	3 meses	• Estradiol 2mg oral	=
Soranna et al. (135)	54	<25	43	3 meses	• Estradiol 2mg oral • Estradiol 2mg oral + didrogesterona 5mg • Estradiol 2mg oral + didrogesterona 10mg	- - -
Morin-Papunen et al. (142)	56	32	16	12 meses	• Valerato de estradiol 2mg oral + didrogesterona 20mg	=
Sites et al. (129)	51	25	76	24 meses	• EEC 0,625 mg + MPA 2,5mg	-
Cooper et al. (130)	55	<30	45	12 meses	• EEC 0,625 mg + MPA 2,5mg	-
Villa et al. (143)	53	27	48	3 meses	• Estradiol 1mg oral • Estradiol 2 mg oral	+ -
Villa et al. (144)	52	26	40	6 meses	• Estradiol 1mg oral + drospirenona 2mg	=

IMC: índice de massa corporal; N: número de participantes do estudo; THM: terapia hormonal da menopausa; CEH: clampeamento euglicêmico hiperinsulinêmico; EEC: estrogênios equinos conjugados; NETA: acetato de noretisterona; MPA: acetato de medroxiprogesterona.

† população diabética tipo 2 sem uso de insulina.

+ positivo; - negativo; = neutro.

Como previamente mencionado, a disfunção endotelial inicia-se bem antes de qualquer manifestação morfológica da aterosclerose (145). O ponto marcante da aterogênese é o recrutamento e acúmulo de leucócitos. A célula endotelial normal geralmente resiste a interações adesivas com leucócitos, no entanto, no endotélio disfuncional ou ativado, os leucócitos se aderem e começam a acumular lipídeos, originando as células espumosas. As células endoteliais lesadas expressam e produzem uma série de moléculas, como a molécula de adesão intercelular (ICAM-1) e a molécula de adesão vascular (VCAM-1), que atraem leucócitos (monócitos e linfócitos-T), favorecendo sua aderência às células vasculares (146). O bloqueio da VCAM-1 e ICAM-1 é capaz de proteger o vaso sanguíneo contra o desenvolvimento de aterosclerose e reestenose arterial (147;148) demonstrando a importância destas moléculas na fisiopatologia deste processo. Selectinas constituem outra gama de moléculas de adesão de leucócitos que medeiam o rolamento dos leucócitos ao longo do endotélio (149). A E-selectina é seletivamente expressa pelas células endoteliais e, preferencialmente, recruta leucócitos polimorfonucleares, um tipo de célula raramente encontrada no início do processo aterosclerótico, mas um protagonista essencial na inflamação aguda (149). A P-selectina, expressada pelas plaquetas, demonstrou preceder a infiltração de células inflamatórias nas paredes dos vasos e o seu bloqueio com anticorpos atenuou tanto a adesão e o rolamento dos leucócitos ao endotélio quanto o desenvolvimento de lesões ateromatosas (150;151). A migração subsequente de células inflamatórias para o espaço subendotelial requer quimiotaxia, um processo mediado por quimiocinas induzidas por citocinas primárias (152), tais como a interleucina-6 (IL-6) liberada para a circulação e capaz de aumentar a produção de reagentes de fase aguda no fígado, incluindo a proteína C-reativa (PCR) e a proteína amilóide sérica A (153). A PCR é uma potente ativadora do fator nuclear kappaB (NF- κ B), facilitando a transcrição de numerosos genes pró-inflamatórios (154). A síntese de algumas citocinas, tais como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), IL-6 e interleucina-8 (IL-8), é mediada por NF- κ B, tal como a expressão da cicloxigenase. O aumento destas citocinas promovem a expressão de moléculas pró-inflamatórias e o extravassamento de leucócitos, resultando na perpetuação do processo inflamatório (155).

Grande série de estudos prospectivos tem demonstrado que a PCR é um importante preditor de risco para futuros eventos cardiovasculares e morte em indivíduos aparentemente saudáveis, bem como aqueles com doença cardiovascular conhecida (156). Embora seja principalmente derivada do fígado, a PCR também pode ser produzida nas paredes vasculares, particularmente na camada íntima das artérias coronárias ateroscleróticas. A PCR *per se* pode influenciar diretamente doenças vasculares através de vários mecanismos, como aumentar a expressão local de moléculas de adesão, aumentar a expressão endotelial do PAI-1, reduzir a bioatividade de NO endotelial e aumentar a captação de LDL pelos macrófagos nas lesões ateroscleróticas (154;157). Além disso, a PCR pode atuar como um pró-coagulante, induzindo a expressão do fator de monócito tecidual, acelerando os processos de trombose intravascular e aterogênese (153).

Vários estudos (158;159) demonstraram que a PCR aumenta de modo rápido e sustentado após o início da THM oral (estrogênios com ou sem progesteronas). No entanto, o aumento dos níveis da PCR não foi acompanhado por elevações na IL-6, E-selectina, fibrinogênio, ou outros reagentes inflamatórios de fase aguda. Em comparação com a THM oral, a via transdérmica desempenhou um efeito neutro sobre a PCR e às vezes até sua redução (160;161). Existem explicações biológicas para estas variações no comportamento da PCR conforme a via de administração. O metabolismo de primeira passagem hepática parece ser o responsável pelo aumento da PCR com a THM oral e o tipo de progesterona usado também pode exercer influência, uma vez que progesteronas com efeito androgênico desempenham maior atividade anti-inflamatória (161).

Concentrações séricas solúveis de ICAM-1 e VCAM-1 são maiores em mulheres na pós-menopausa com doença arterial coronariana sem uso de THM comparadas aqueles em uso de TRH (162). Vários estudos demonstram redução em 10% nos níveis destas moléculas de adesão com o uso da THM (163;164). Além disso, não houve diferenças significativas entre terapias com progesterona sintética ou natural. A THM transdérmica também diminuiu os níveis séricos solúveis de ICAM-1 e VCAM-1 (165). Estes resultados indicam que a THM transdérmica poderia desempenhar um efeito benéfico superior sobre a progressão da aterosclerose em mulheres pós-menopáusicas, uma vez que diminui as moléculas de adesão e não exerce influência nos níveis da PCR.

No estudo *Atherosclerosis Risk in Communities* (ARIC), maiores níveis séricos de E-selectina foram encontrados em pacientes com doença arterial coronária e aterosclerose da

artéria carótida do que em indivíduos saudáveis (166). Níveis de E-selectina podem contribuir diretamente para a aterosclerose. Ensaios clínicos demonstraram uma redução global de 15% nos níveis de E-selectina solúvel com a THM (164;167-169). Reduções na E-selectina solúvel também foram observados com EEC com ou sem MPA no ensaio PEPI (158).

Em resumo a THM, incluindo uma variedade de preparações de estrogênio com ou sem progesterona, diminui os níveis da maioria dos marcadores inflamatórias solúveis, como a E-selectina, as moléculas de adesão celular e o TNF- α (87). Além de aumentar os níveis da PCR com estrogênios orais, porém não com o uso transdérmico e de apresentar efeitos inconclusivos na IL-6.

3.4 Terapia hormonal da menopausa e coagulação sanguínea

A coagulação sanguínea é um processo dinâmico com o intuito de manter a homeostase circulatória. Quando há injúria tissular, lacerações em arteríolas e vênulas ativam o sistema hemostático, que inclui plaquetas, células endoteliais e proteínas da coagulação, para impedir que o extravasamento do sangue para os tecidos ou para o meio externo. As plaquetas migram e se aderem rapidamente ao subendotélio exposto e mais plaquetas se aderem àquelas já aderidas ao vaso, formando um tampão. Ao mesmo tempo, fatores de coagulação produzem uma rede de fibrina, que, como um tecido, sustenta as plaquetas, originando o coágulo (170).

Se a amplificação da coagulação é vital para que o vaso seja ocluído rapidamente, existem mecanismos no endotélio íntegro que não só inibem esse processo, mas também ajudam a degradar a rede de fibrina, num mecanismo denominado fibrinólise, que é resultado da conversão da pró-enzima inerte (plasminogênio) na sua forma proteolítica ativa, a plasmina, que degrada a fibrina em produtos solúveis. Há dois mecanismos distintos de ativação do plasminogênio: o ativador tissular do plasminogênio (t-PA) e o ativador uroquinase (u-PA) (171). Quando aderidos às células, tanto a plasmina quanto o t-PA estão protegidos de neutralização, respectivamente, pela antiplasmina e pelo PAI-1. Entretanto, livre na corrente sanguínea o t-PA é logo inativado pelo PAI-1, deixando de ativar o plasminogênio (172).

O aumento da expressão do PAI-1 inibe a fibrinólise *in vivo*, levando conseqüentemente a deposição patológica de fibrina e danos teciduais (173). Além disso, o

PAI-1 interage diretamente com as células vasculares, estando envolvido na regulação da replicação celular e angiogênese (174). Estudos realizados em artérias de humanos documentaram níveis significativamente mais elevados da expressão de PAI-1 em vasos ateroscleróticos em comparação com artérias normais ou ligeiramente afetadas (175).

Em uma metanálise (22), que avaliou 107 estudos, com um total de 33.315 participantes, a THM reduziu os fatores prócoagulantes, fibrinogênio e PAI-1, em comparação ao placebo ou a nenhum tratamento. O emprego da THM não apresentou nenhum efeito em inibidores de coagulação, como proteína C ou proteína S. Agentes orais foram os responsáveis pela redução significativa dos níveis de PAI-1, enquanto os agentes transdérmicos não apresentaram nenhum efeito. THM não afetou o t-PA, a antitrombina III ou o fator de von Willebrand.

Uma revisão sistemática (176), comparando a THM em uso oral com a via transdérmica, demonstrou que os efeitos sobre alguns parâmetros de coagulação eram menores ou até ausentes nesta última. O aumento na resistência para ativação da proteína C (APCr - *resistance to activated protein C*) foi significativamente menor do que o observado pela via oral. Além disso, a diminuição do t-PA e PAI-1 observadas com a administração oral foi menos evidente com a terapia transdérmica. No entanto, nenhuma diferença foi encontrada nos níveis do complexo plasmina- α 2-antiplasmina e do D-dímero.

As causas das alterações no sistema de coagulação provocadas pela THM não foram completamente estabelecidas. Uma possível explicação entre as diferenças encontradas pela via de administração seria o metabolismo hepático de primeira passagem. O estradiol quando ingerido é convertido em estrona no intestino e fígado, e esta é um potente estimulante da síntese de proteínas hepáticas devendo exercer também ações na produção de fatores da coagulação. A trombina é o ponto chave da cascata de coagulação, sendo responsável pela conversão do fibrinogênio em fibrina. Foi demonstrado que parâmetros de geração de trombina encontravam-se aumentados com a THM oral ($p < 0,001$), enquanto com a transdérmica estes não apresentavam diferenças ao compará-los ao grupo controle. Níveis de estrona correlacionaram-se com o pico de geração de trombina ($R = 0,451$, $p < 0,001$) em mulheres em uso de THM oral, mas não houve correlação com a via transdérmica (177). Estes dados demonstram que a THM transdérmica é mais inócua à homeostase sanguínea comparada à oral. Tal fato se reproduz em achados clínicos, onde o uso transdérmico não aumentou o risco de eventos tromboembólicos (178;179).

3.5 Terapia hormonal da menopausa e viscosidades sanguínea e plasmática

Viscosidade é a propriedade associada à resistência que o fluido oferece a deformação por cisalhamento. De outra maneira, pode-se dizer que a viscosidade mede a resistência interna oferecida ao movimento relativo de diferentes partes desse fluido.

A avaliação das propriedades reológicas do sangue é baseada na medição da viscosidade do sangue total e do plasma, além da determinação da agregação de eritrócitos e sua capacidade de deformação. As viscosidades plasmática e sanguínea são um dos principais determinantes reológicos do fluxo sanguíneo e seu valor é proporcional à concentração do fibrinogênio (180). As concentrações de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) e LDL influenciam positivamente o valor das viscosidades plasmática e sanguínea (181). O fibrinogênio e a viscosidade do sangue total associam-se, independentemente, com a doença aterosclerótica coronária (182). Ainda existem muitas dúvidas com relação ao papel da viscosidade na fisiopatologia das doenças cardiovasculares. Nos últimos anos, muitas discussões surgiram em relação ao aumento da viscosidade e a promoção da aterosclerose. A visão tradicional postula que um aumento na viscosidade sanguínea desempenha invariavelmente um impacto negativo sobre a perfusão tecidual e, por conseguinte, deve ser considerado como um fator de risco cardiovascular. Porém, uma hipótese mais recente defende que pequenos aumentos na viscosidade sanguínea desempenhariam um efeito vasodilatador, por aumento do estresse por cisalhamento sobre os vasos sanguíneos e conseqüentemente ocorreria uma melhora da perfusão tecidual (183).

Com relação à THM, um ensaio clínico avaliou o impacto dos seguintes esquemas terapêuticos sobre a viscosidade do plasma em 23 mulheres na pós-menopausa: (1) 1 mg de estradiol associado à 2,5mg de MPA (n=7); (2) 1 mg de estradiol isolado (n=8); e (3) placebo (n=8). A viscosidade do plasma e os níveis de fibrinogênio foram determinados no início e após 12 semanas de intervenção. Níveis de viscosidade do plasma foram positivamente correlacionados com o fibrinogênio ($r=0,46$; $P=0,03$) e a viscosidade diminuiu nos grupos tratados tanto com a terapia associada quanto naquele que fez uso isolado do estrógeno ($p<0,01$) (184).

Em uma avaliação de 32 mulheres na pós-menopausa avaliadas no 6º e 12º mês de tratamento com 5 mg de MPA por via oral e 1,5 mg de estradiol transdérmico, observou-se

uma diminuição na viscosidade do plasma no primeiro semestre da THM, mantido constante ao longo do 12^o mês. A viscosidade do sangue mostrou o mesmo comportamento. Os achados foram justificados por diminuição simultânea do fibrinogênio no plasma (185). Em outro estudo, no qual 45 mulheres com idade média de 53,5 anos foram divididas em dois grupos: 27 delas com IMC menor que 25 kg/m² e 18 com IMC acima de 25 kg/m². As pacientes foram tratadas com estradiol transdérmico contínuo e um curso de 12 dias de MPA a cada 2 meses, sendo avaliadas no início e após 6 meses de tratamento. Os resultados mostraram uma diminuição da viscosidade plasmática em ambos os grupos ($p < 0,01$), entretanto, uma menor diminuição foi notada naquelas com sobrepeso (186). Estes dados demonstram que tanto o estrogênio oral quanto o transdérmico podem exercer um importante fator de proteção cardiovascular, diminuindo a viscosidade sanguínea/plasmática, se considerarmos a teoria clássica que associa inversamente a viscosidade ao risco cardiovascular.

4 HIPÓTESE

Foi demonstrado que o uso do estrogênio, tanto oral quanto transdérmico, avaliado por diferentes métodos pode exercer uma ação benéfica sobre a função endotelial e esta resposta parece depender de características clínicas dos indivíduos testados. O uso da THM em mulheres com baixo risco cardiovascular parece ser benéfico, desde que iniciado em um período próximo da menopausa. Em contrapartida, o seu uso em mulheres com alto risco cardiovascular, como diabéticas ou portadoras de lesões ateroscleróticas já estabelecidas, e ainda naquelas com início em um período superior a 10 anos da menopausa parece ser prejudicial. Nestes extremos de perfis clínicos não parece haver muitos questionamentos sobre indicar ou não a THM, porém não há definição quanto à indicação do uso da THM e seus possíveis benefícios para aquelas mulheres com risco cardiovascular intermediário, isto é aquelas fora dos extremos descritos acima como por exemplo, mulheres com sobrepeso ou obesidade.

Como exposto anteriormente, mulheres com excesso de peso na pós-menopausa diferem da população de menopausadas em geral por apresentarem risco aumentado de doença arterial coronariana (7;8), de AVE (187;188) e de TVP (189). Consequentemente, existem atualmente algumas evidências de que a via de administração transdérmica do estrogênio (49;190;191), além do uso de baixas doses hormonais (51;192), parece ser a forma mais segura para o uso de THM nestas mulheres.

Nossa hipótese é que mulheres com risco cardiovascular intermediário, representadas por portadoras de excesso de peso e menopausa recente apresentam melhora da função endotelial com o uso de estrogênio através do estudo da reatividade microvascular e da mensuração plasmática das moléculas de adesão celular. Também acreditamos que outros fatores de risco cardiovascular, tanto tradicionais quanto não-tradicionais, podem ser modificados com o uso do estrogênio transdérmico e, talvez, as possíveis alterações destes fatores de risco possam se correlacionar com a melhora da função endotelial.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo primário

Demonstrar os efeitos de curto prazo do estradiol transdérmico na reatividade microvascular e em marcadores plasmáticos de função endotelial em mulheres na pós-menopausa com sobrepeso ou obesidade.

5.2 Objetivos secundários

5.2.1 Objetivo secundário 1

Demonstrar os efeitos de curto prazo na sensibilidade insulínica do estradiol transdérmico em mulheres na pós-menopausa com sobrepeso ou obesidade.

5.2.2 Objetivo secundário 2

Demonstrar os efeitos de curto prazo na viscosidade sanguínea e plasmática do estradiol transdérmico em mulheres na pós-menopausa com sobrepeso ou obesidade.

5.2.3 Objetivo secundário 3

Determinar se há correlação entre função microvascular e sensibilidade insulínica após o uso de curto prazo do estradiol transdérmico em mulheres na pós-menopausa com sobrepeso ou obesidade.

5.2.4 Objetivo secundário 4

Determinar se há correlação entre função microvascular e viscosidade sanguínea e/ou plasmática após o uso de curto prazo do estradiol transdérmico em mulheres na pós-menopausa com sobrepeso ou obesidade.

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Características gerais do estudo

O estudo caracteriza-se como um ensaio clínico, randomizado, duplo-cego, placebo-controlado. A intervenção consistiu no uso transdérmico de estrogênio ou placebo por um período de três meses. Este estudo foi realizado integralmente na Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) pelo Laboratório de Pesquisas Clínicas e Experimentais em Biologia Vascular (BioVasc), vinculado ao Departamento de Ciências Fisiológicas do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, pela Disciplina de Endocrinologia do Departamento de Medicina Interna, da Faculdade de Ciências Médicas, pelo Laboratório de Hormônios do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE) e pelo Laboratório de Lípidos (LabLip), vinculado à Faculdade de Ciências Médicas, localizado na Policlínica Piquet Carneiro. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HUPE (2499-CEP/HUPE – CAAE: 0074.0.228.000-09) (ANEXO), e atende às normas sobre pesquisa envolvendo seres humanos, que constam na resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, de 10 de outubro de 1996. As mulheres só iniciaram o estudo após compreensão e assinatura do termo de consentimento livre e informado (APÊNDICE A).

6.2 Critérios de inclusão e exclusão

Critérios de inclusão:

☐ Idade entre 47 a 55 anos;

☐ Menopausa, definida como: amenorréia durante 12 meses consecutivos e elevação dos níveis séricos do hormônio folículo estimulante (FSH) compatíveis com falência ovariana (FSH > 35 mIU/ml), níveis de estradiol < 40 pg/ml e sintomas de hipoestrogenismo clínico. Nas mulheres histerectomizadas foi considerado o início dos sintomas > 02 anos.

☐ Tempo de menopausa de até 10 anos;

☐ IMC entre 27,5 - 34,9 kg/m² relatados há pelo menos 05 anos;

☐ Cintura abdominal igual ou superior a 80 cm.

Critérios de exclusão:

- a) História prévia ou atual de câncer estrogênio-dependente;
- b) Presença de nódulos ou outras patologias mamárias identificadas pela mamografia ou ultrassonografia de mamas;
- c) Presença de patologia uterina ou espessamento endometrial $\geq 05\text{mm}$ identificado pela ultrassonografia pélvica transvaginal;
- d) Doença tromboembólica prévia ou atual (trombose venosa profunda, doença coronariana ou cerebrovascular);
- e) *Diabetes mellitus*;
- f) Hipertensão arterial descompensada clinicamente, em estágios $> \text{II}$ (193) ou história e sintomas de insuficiência cardíaca congestiva;
- g) Hipertrigliceridemia ($> 400 \text{ mg/dl}$) ou hipercolesterolemia ($> 300 \text{ mg/dl}$);
- h) Doença psiquiátrica;
- i) Doença renal, hematológica ou hepática;
- j) Tabagismo;
- l) Uso prévio de qualquer tipo de THM;
- m) Uso de hipolipemiantes ou ácido acetilsalicílico;
- n) Impossibilidade da visualização dos capilares periungueais através da VCLP.

6.3 Recrutamento e seleção da população do estudo

A divulgação do projeto foi realizada no ambulatório de climatério do HUPE e em veículos de comunicação, por meio impresso ou pela *internet* (APÊNDICE B). As mulheres interessadas em participar do estudo entravam em contato com a secretaria do BioVasc, onde, após entrevista telefônica, era agendada uma consulta.

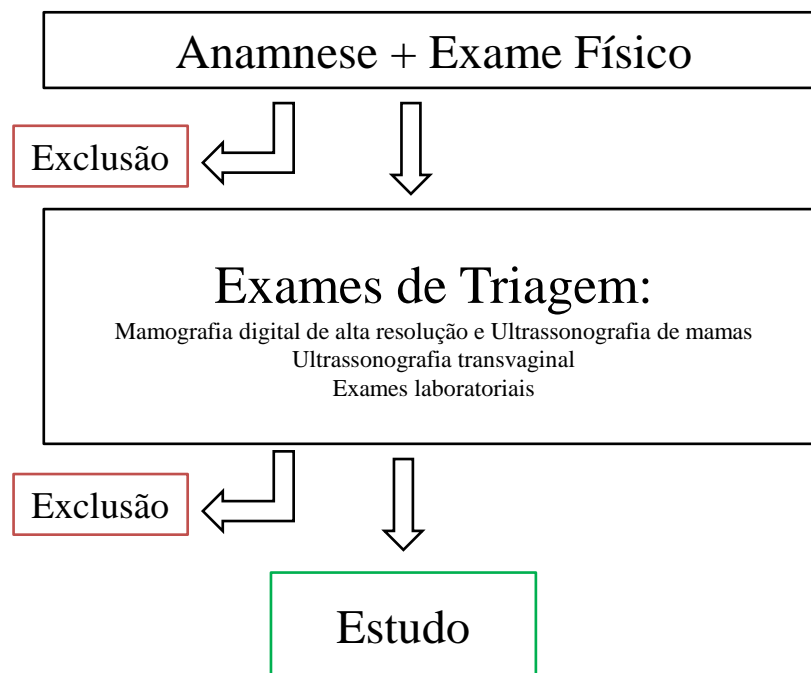
As participantes interessadas foram avaliadas por endocrinologistas e uma ficha foi preenchida com os dados clínicos e do exame físico de cada participante (APÊNDICE C). As mulheres que preenchiam os critérios de inclusão foram encaminhadas para exames de triagem, enquanto as que não preenchiam foram encaminhadas para o ambulatório de climatério do HUPE, para avaliação e acompanhamento.

Os exames de triagem consistiam de mamografia digital bilateral de alta resolução, ultrassonografia de mamas (quando a mamografia isolada não era esclarecedora),

ultrassonografia pélvica transvaginal (USG TV) e exames laboratoriais, que consistiam em hemograma completo, GJ, CT, TG, creatinina, aspartato transaminase (AST), alanina transaminase (ALT), gama-glutamil transpeptidase (gama-GT), fosfatase alcalina, insulina, hormônio estimulante da tireóide (TSH), FSH e estradiol. Os exames de imagem foram realizados na unidade Nova América do grupo Clínica de Diagnóstico por Imagem e interpretados pelo mesmo examinador.

Após os exames de triagem, se as participantes não apresentassem nenhuma alteração nos exames citados e os níveis de FSH e estradiol fossem compatíveis com os da pós-menopausa, elas eram selecionadas para fase de intervenção do estudo. Nos casos de alterações nos exames de imagem ou laboratoriais, as voluntárias eram excluídas e encaminhadas para avaliação e acompanhamento no ambulatório de climatério do HUPE. A figura 3 mostra um esquema das etapas de seleção.

Figura 3 - Etapas da seleção da amostra do estudo



6.4 Intervenção e acompanhamento

As participantes selecionadas para intervenção foram randomizadas em dois grupos, estrogênio transdérmico (ET) ou placebo (P) e pareadas por IMC, circunferência abdominal (CA), GJ, insulina e HOMA-IR. Este pareamento foi realizado por um pesquisador não cegado. O mesmo não participou da coleta dos dados nem tampouco da análise dos exames das pacientes.

A intervenção consistiu no uso transdérmico (via percutânea) de estradiol hemi-hidratado ou placebo, por um período de três meses, em gel, disponibilizados em frascos idênticos com bomba dosadora, onde cada compressão liberava 1g do gel, o que equivale a 1mg de estradiol hemi-hidratado no grupo ativo. A aplicação do gel foi feita pela própria paciente, após instruções teóricas e práticas. A recomendação foi para a aplicação ser realizada uma vez ao dia, sobre a pele limpa do abdome ou região anterior do antebraço, de preferência à noite, após o banho, de forma homogênea e suave, não sendo necessário massagear o local.

O envasamento do gel foi realizado por uma empresa especializada (PhD Farmácia de Manipulação®) e cada frasco continha uma numeração, que identificava o conteúdo dos frascos. No grupo ET o gel utilizado foi o do produto Estreva®, enquanto no placebo foi um gel clínico para meios de contato (Gel RMC®). Antes do início do estudo, a eficácia do envasamento para conservação do produto foi testada clínica e laboratorialmente, em uma participante que se submeteu ao uso do estradiol gel durante quatro meses.

O seguimento das mulheres durante o período de intervenção ocorreu por meio de consultas e contatos telefônicos. As consultas foram agendadas mensalmente com a finalidade de monitorar possíveis efeitos colaterais, solucionar dúvidas e verificar a aderência ao uso do gel. Nesta ocasião também entregávamos um novo frasco do produto. Os contatos telefônicos foram feitos entre uma a duas semanas com a finalidade de detectar possíveis efeitos colaterais e averiguar a aderência das participantes. Todas as mulheres foram orientadas a entrar em contato com a equipe médica, assim que necessitassem.

Ao término do período de intervenção, todas as participantes não-histerectomizadas foram submetidas a um novo USG TV para reavaliação da espessura endometrial, e

independente do resultado deste, todas participantes eram submetidas ao uso de uma progesterona, 10mg de didrogesteron durante 14 dias, para permitir a descamação do endométrio. A continuação do seguimento das participantes foi realizado no ambulatório de climatério do HUPE.

6.5 Coleta dos dados

É importante ressaltar que, para a realização dos exames, as participantes foram orientadas a seguir um jejum de 10 horas. Os dados coletados para a análise do estudo antes e ao final da intervenção foram os seguintes (figura 4):

- Índice menopáusico de Kupperman e Blatt (IMKB):

- Medidas antropométricas;

Peso, altura, IMC, CA e circunferência do quadril (CQ) e relação cintura/quadril (RCQ).

- Bioimpedância;

Avaliação da porcentagem de massa magra (MM) e gorda (MG).

- Aferição da pressão arterial sistêmica;

- Avaliação microvascular;

Realizada por dois métodos diferentes, a POV e a VCLP.

- Viscosidades sanguínea e plasmática;

- Avaliação laboratorial.

- sangue total: hemograma completo;

- bioquímica: CT, HDL, LDL, TG, ácido úrico, proteínas totais e frações;

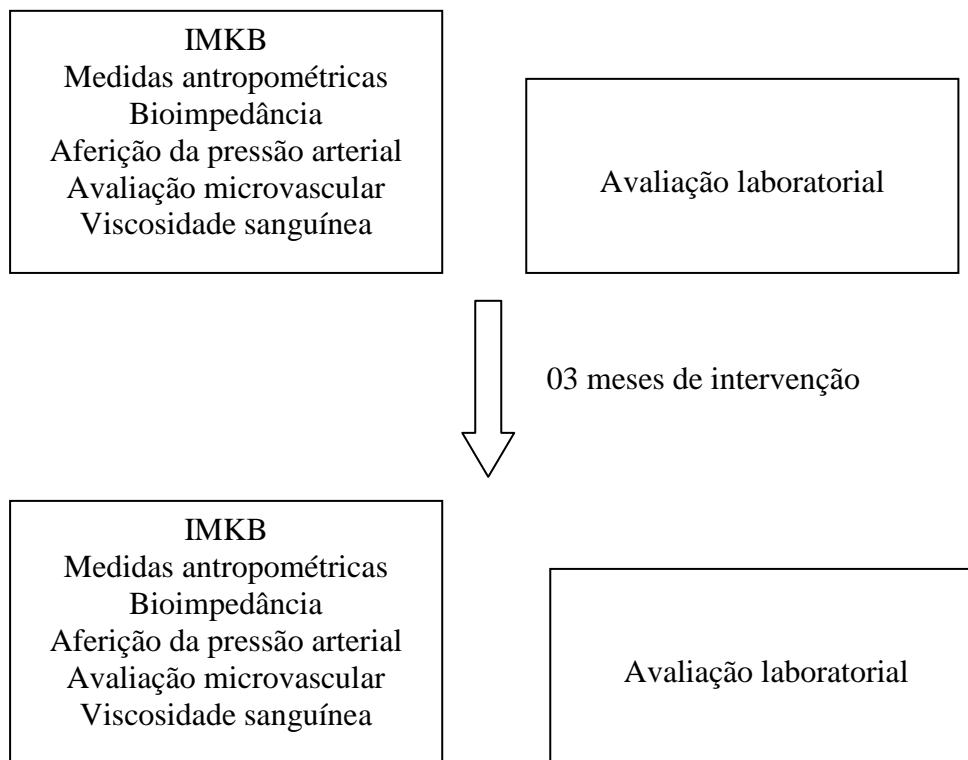
- sensibilidade insulínica: dosagens da glicose e insulina durante o TOTG (basal, 1 e 2 horas);

- marcadores inflamatórios e moléculas de adesão: proteína C-reativa ultrasensível (PCR-US), E-selectina, ICAM-1, VCAM-1 e PAI-1;

- hormônios sexuais: FSH, estradiol, globulina ligadora de hormônios sexuais (SHBG), testosterona total e testosterona livre.

Os marcadores inflamatórios e todos os outros exames foram realizadas no BioVasc, exceto os exames de sangue total, bioquímica, sensibilidade insulínica e hormônios sexuais. A coleta do TOTG na avaliação laboratorial exigiu a necessidade do retorno da paciente em mais de um dia de coletas, já que a bioimpedância, a avaliação microvascular e a viscosidade sanguínea e plasmática, necessitavam que a participante estivesse em jejum. O intervalo máximo entre a avaliação laboratorial e os outros exames foi de 07 dias (figura 4). Em resumo, eram necessários dois dias para coleta dos dados pré-intervenção e outros dois dias na fase pós-intervenção.

Figura 4 - Modelo esquemático temporal das avaliações do estudo



IMKB: índice menopausal de Kupperman e Blatt.

6.5.1 Índice menopausal de Kupperman e Blatt (IMKB)

O IMKB (figura 5) foi criado pelos médicos Kupperman e Blatt com base na observação clínica das pacientes. Foi divulgado em 1953 e passou a ser usado como referência clínica para avaliação de sintomas climatéricos (194). Consiste na avaliação de vários sintomas, medidos de acordo com a intensidade de acometimento referida pela

paciente. Para cada sintoma é estabelecido um peso diferente, de acordo com a intensidade. O IMKB é considerado leve se o resultado for menor ou igual a 19, moderado se for entre 20 e 35 e acentuado se for maior que 35 (194).

Figura 5 - Índice menopausal de Kupperman e Blatt

SINTOMAS	LEVES	MODERADOS	INTENSOS
ONDAS DE CALOR	4	8	12
PARESTESIA	2	4	6
INSÔNIA	2	4	6
NERVOSISMO	2	4	6
DEPRESSÃO	1	2	3
FADIGA	1	2	3
ARTRALGIA/MIALGIA	1	2	3
CEFALÉIA	1	2	3
PALPITAÇÃO	1	2	3
ZUMBIDO NO OUVIDO	1	2	3
TOTAL	17	34	51

6.5.2 Medidas antropométricas

A massa corporal (kg) foi mensurada em balança plataforma da marca Filizola® com precisão de 100g. A estatura foi aferida com estadiômetro, com precisão de 0,1 cm. O IMC foi obtido pela divisão do peso (kg) pela altura² (m). A cintura foi medida em duplicata com fita flexível com precisão de 0,1 cm no ponto médio entre o último arco costal e a crista ilíaca, durante expiração. A circunferência do quadril foi medida em duplicata no ponto de maior circunferência da região glútea. A RCQ foi obtida pela divisão da cintura pelo quadril. As médias das medidas em duplicata da cintura e do quadril foram utilizadas nas análises.

6.5.3 Bioimpedância

A avaliação da bioimpedância (*Bio dynamic 450 Body Composition AnalyzerTM*, Bio Dynamic Corporation®, SE, EUA) foi feita com as pacientes em jejum de 10 horas e sem ingestão de bebida alcoólica ou prática de atividade física nas 24h que precederam o exame. Foi avaliada a porcentagem de massa magra e gorda de cada indivíduo.

6.5.4 Aferição da pressão arterial sistêmica

Um equipamento semi-automático (*Spacelabs Medical, Redmond, WA, USA*) foi utilizado para todas as medidas da pressão arterial sistêmica, as quais foram realizadas no braço direito com as participantes na posição supina. Essas medidas foram realizadas no repouso, antes e durante a realização da POV. No total foram realizadas 05 medidas em cada indivíduo e a média das medidas foi utilizada na análise estatística.

6.5.5 Avaliação microvascular

Para as avaliações microvasculares as mulheres eram acomodadas em uma sala climatizada com temperatura controlada a $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (media \pm SD) por 20 min antes do início dos procedimentos.

6.5.5.1 Pletismografia por oclusão venosa

O FSA foi avaliado pela POV (*EC-6; Hokanson, Bellevue, WA, USA*) como previamente descrito (195). Este método consiste no uso de um elástico com mercúrio, que nada mais é que um sensor de estiramento disposto no maior diâmetro do antebraço, o qual é conectado a um pletismógrafo com o intuito de aferir o FSA.

Como a mão apresenta muitos *shunts* arteriovenosos, isto poderia interferir nas aferições do FSA, assim, um minuto antes de iniciar as análises, um manguito foi insuflado no punho a 200 mmHg para isolar a circulação da mão.

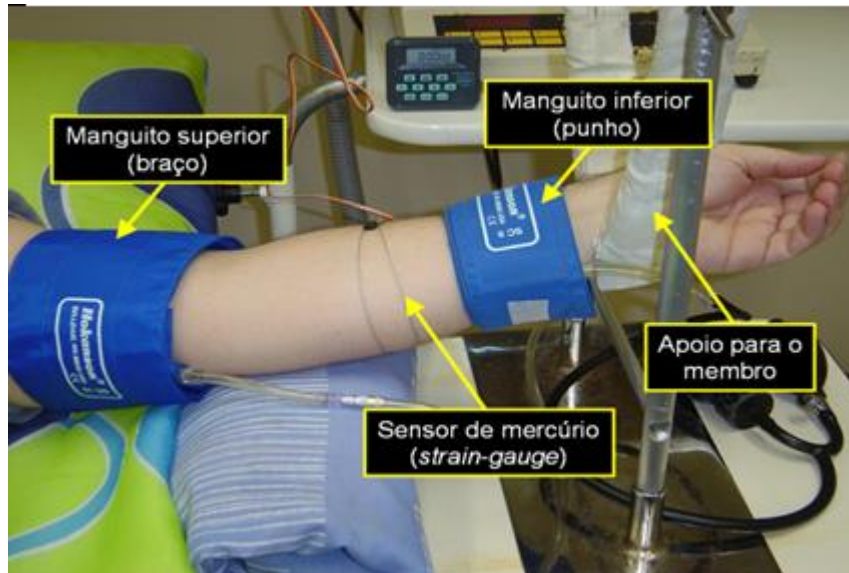
Para análise do FSA, um bloqueio do retorno venoso na porção proximal do braço é realizado por 10 segundos, pela insuflação de um manguito a 50 mmHg, seguido por um período de 05 segundos de liberação do retorno venoso, quando o manguito permanece desinflado (figura 6). Durante a insuflação do manguito, observa-se um bloqueio ao retorno venoso com manutenção do aporte sanguíneo arterial para o antebraço. Tal fato promove um aumento do volume do antebraço por formação de edema e conseqüentemente um estiramento do elástico com mercúrio, interpretado pelo pletismógrafo como uma curva (com a parte ascendente da curva representando o bloqueio do retorno venoso e a parte descendente, a liberação do retorno venoso). A média de quatro curvas, ciclos de 15 segundos cada (10

segundos de insuflação: 05 segundos de desinsuflação), foi utilizada para a determinação do FSA ($\text{ml}/\text{min} \cdot 100\text{ml tecido}^{-1}$). O FSA basal foi realizado com o indivíduo em repouso sem qualquer estímulo vascular. Para mensurar a vasodilatação dependente do endotélio, uma isquemia arterial de três minutos foi realizada através da insuflação do manguito localizado na região proximal do braço 60 mmHg acima da PAS. Após liberação do manguito, inicia-se a aferição do FSA durante a hiperemia reativa pós-oclusiva (HRPO), da mesma maneira descrita para o FSA basal, porém as quatro curvas neste período são denominadas respectivamente de c1, c2, c3 e c4. Após esta aferição, devido à isquemia realizada, a participante fica em repouso durante 15 minutos com o intuito do reestabelecimento da homeostase vascular. Posteriormente, realiza-se uma nova aferição do FSA basal, porém agora denominado FSA basal 02 (FSA_{b2}), seguido da avaliação da vasodilatação independente do endotélio, que é realizada após administração por via sublingual de 400 μg NTG (*Nitrolingual® pumpspray, Aventis, Auckland, Austrália*). A NTG sublingual apresenta meia-vida de aproximadamente três minutos (196), sendo a medida do FSA realizada entre o quarto e sexto minutos após sua administração (FSA_{NTG}).

Avaliou-se o FSA basal 01 (FSA_{b1}), seguido do FSA durante a hiperemia reativa pós-oclusiva (FSA_{HRPO}). Após intervalo de 15 minutos foi avaliado o FSA_{b2} , seguido do FSA_{NTG} . É importante ressaltar que na análise do FSA_{HRPO} , além da sua apresentação pela média das quatro curvas, também há sua apresentação como FSA_{c1} , que representa o fluxo sanguíneo apenas da primeira curva após a isquemia, e FSA_{c234} , que representa a média do fluxo sanguíneo das 2^a, 3^a e 4^a curvas.

A pressão arterial sistêmica foi aferida no membro superior contralateral em todos os tempos de mensuração do FSA. O equipamento da POV foi conectado a um conversor analógico-digital (*PowerLab/8SP, AD instruments, Castle Hill, Australia*) e os dados foram analisados pelo programa *Power Lab (8SP-AD Instruments, Castle Hill, Australia)* em computador IBM[®] compatível. A resistência vascular (RV) foi calculada dividindo-se o valor da pressão arterial média pelo fluxo sanguíneo de cada tempo, representada como $\text{mmHg}/\text{ml}/\text{min} \cdot 100\text{ml tecido}^{-1}$. Com estas medidas são geradas curvas de incremento de fluxo sanguíneo e de decremento de resistência vascular (197).

Figura 6 - Posicionamento dos artefatos técnicos para a realização da pletismografia por oclusão venosa



6.5.5.2 Videocapilaroscopia dinâmica do leito periungueal

As mulheres foram confortavelmente sentadas em uma cadeira com o braço esquerdo colocado ao nível do coração em uma sala com temperatura constante em $22 \pm 1^\circ\text{C}$. O membro superior esquerdo (porção dorsal para cima) foi disposto em repouso sobre uma superfície fixa e o 4º dedo colocado sobre um pedestal montado em estado X-Y de um microscópio Leica DM/LM (figura 7). O topo do dedo, distal ao leito ungueal, é gentilmente imobilizado por um grampo, para impedir mínimos movimentos. Os capilares do leito ungueal são visualizados por um microscópio usando epi-iluminação (100 w Xe lâmpada de arco) conectado a um circuito de TV, acoplado a um gravador de *Compact Disc*. Os experimentos foram realizados com gravação contínua da temperatura da pele do dedo, onde um sensor de medição de temperatura foi posicionado sobre a pele cerca de 1 cm do leito periungueal e gotas de óleo de imersão foram aspergidas sobre este sítio.

Em repouso, foi obtida a velocidade de deslocamento das hemácias (VDH), utilizando-se uma lente com magnificação de 680x. Após esta aferição, um manguito de pressão (1 cm largura), previamente disposto em volta da falange proximal do 4º dedo e conectado a um manômetro de mercúrio, é insuflado para causar oclusão arterial por 1 minuto. Após a liberação do manguito, ocorre a fase de HRPO. Neste período foram

determinados o pico máxima de incremento da VDH acima do repouso (VDH_{max}) e o tempo para alcançá-lo ($TVDH_{max}$). As medidas foram todas realizadas com o programa *CapImage*. Esta técnica já foi previamente validada no BioVasc (198).

Figura 7 - Videocapilaroscopia dinâmica do leito periungueal

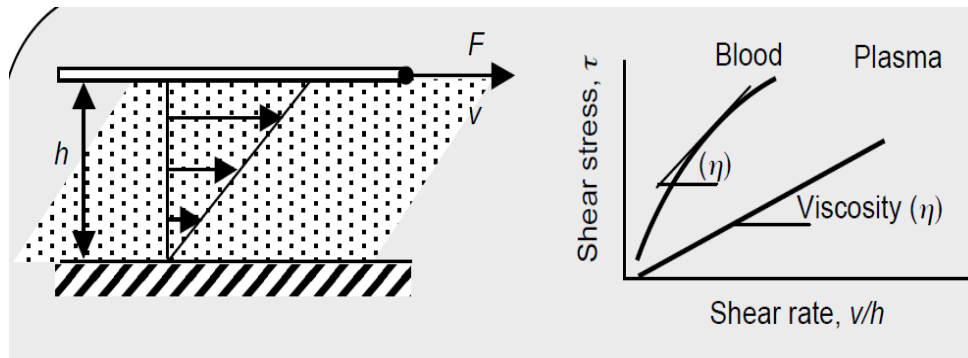


6.5.6 Viscosidade sanguínea e plasmática

A viscosidade foi aferida conforme as normas internacionais (199) e o aparelho utilizado foi o viscosímetro rotacional DV-II+ PRO Digital (*Brookfield Engineering Laboratories, Middleboro, MA, USA*). Para esta análise, o sangue ou o plasma são depositados entre duas placas paralelas. A placa superior realiza um movimento rotacional, desempenhando uma força de cisalhamento, representada na figura 8 como F , sobre o fluido, a qual resulta em diferentes camadas de fluido com diferentes velocidades. A diferença na velocidade entre camadas distintas de fluido provoca uma ação de cisalhamento ou atrito entre elas. A taxa de cisalhamento, representada como *shear rate*, é o deslocamento relativo de uma camada de fluido em relação à próxima, podendo ser calculada como a velocidade da camada de fluido do topo (v) e a distância entre as placas (h), ou seja, a taxa de cisalhamento é igual a v / h . A força de cisalhamento, F , dividida pela área de contato entre o líquido e a placa dá a tensão de cisalhamento, t ou *shear stress*, enquanto a relação entre a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento representa a viscosidade (n). À temperatura e pressão constantes, a viscosidade de fluidos newtonianos permanece constante, independente da taxa de

cisalhamento. O sangue e o plasma são fluidos não newtonianos, pois suas viscosidades são alteradas conforme a taxa de cisalhamento utilizada para sua aferição.

Figura 8 - Modelo esquemático da mensuração da viscosidade através do viscosímetro rotacional



As viscosidades do plasma e sangue foram testadas com uma taxa de cisalhamento de 375 s^{-1} à temperatura constante de 37°C . Foram feitas duas medidas de cada fluido em cada tempo e a média foi utilizada na análise estatística. A viscosidade inicial obtida do sangue é denominada de viscosidade com hematócrito nativo. Ao corrigir o valor da viscosidade pelo valor do hematócrito do indivíduo obtemos a viscosidade sanguínea corrigida pelo hematócrito, a partir da seguinte fórmula: $\eta_b Ht = (\eta_b)^{45/Ht}$, onde $\eta_b Ht$: significa viscosidade sanguínea corrigida pelo hematócrito; η_b : viscosidade sanguínea com hematócrito nativo; e Ht : equivale ao hematócrito do indivíduo no momento da leitura da viscosidade. A viscosidade relativa foi calculada conforme a seguinte equação: $\eta_r = (\eta_b/\eta_p)^{45/Ht}$, onde η_r significa viscosidade relativa; η_b , viscosidade sanguínea com hematócrito nativo; η_p , viscosidade plasmática; e Ht , hematócrito.

6.5.7 Avaliação laboratorial

Os exames laboratoriais foram realizados em 03 unidades, no LabLip, no BioVasc e no laboratório de hormônios do HUPE. Entretanto, a coleta sanguínea só foi realizada no LabLip, onde cada participante além da coleta de sangue basal, após jejum noturno de 10 horas, também foi submetido à coleta sanguínea na 1ª e 2ª hora após sobrecarga oral com 75g

de glicose anidra. As amostras coletadas após o estímulo glicêmico só foram utilizadas para as dosagens de glicose e insulina.

Algumas análises já eram processadas no dia da coleta sanguínea, que foram as de sangue total e bioquímica, realizadas no LabLip, enquanto outra parte era armazenada à -80°C, sob a forma de plasma. Posteriormente, este material congelado foi transportado para o laboratório de hormônios do HUPE para as dosagens dos hormônios sexuais e insulina, e para o BioVasc, para as dosagens das moléculas de adesão e PAI-1.

O hemograma completo foi processado pelo contador hematológico automatizado *XS1000i Sysmex®* (Sysmex Corporation, Kobe, Kansai, JPN) e as análises de bioquímica com o analisador automático *A25 BioSystems®* (Biosystems S.A., Barcelona, ESP). Glicose, CT, HDL e TG foram quantificados por espectrofotometria pelos seguintes métodos, respectivamente, glicose oxidase/peroxidase [Coeficiente de variação (CV) intraensaio: 1,2% e interensaio: 2,7%], colesterol oxidase/peroxidase (CV intraensaio: 1,1% e interensaio: 1,9%), detergente direto (CV intraensaio: 0,8% e interensaio: 1,3%) e glicerol-3-fosfato/peroxidase (CV intraensaio: 1,7% e interensaio: 2,6%). O LDL foi calculado pela equação Friedewald (200). Proteínas totais, albumina e ácido úrico foram quantificados por espectrofotometria pelos seguintes métodos, respectivamente, biureto (CV intraensaio: 1,1% e interensaio: 1,8%), verde de bromocresol (CV intraensaio: 1,4% e interensaio: 1,9%) e uricase/peroxidase (CV intraensaio: 0,4% e interensaio: 2,1%). A globulina foi determinada através do cálculo: **proteínas totais – albumina**. A PCR-US foi quantificada por turbidimetria, pelo método látex de alta sensibilidade (CV intraensaio: 1,8% e interensaio: 3,6%).

Os exames hormonais foram realizados pelo aparelho *Cobas e 411 Roche/Hitachi* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DEU) e quantificados por imunoensaio de eletroquimioluminescência com os *kits* determinados pelo fabricante (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA). FSH (CV intraensaio: 1,5% e interensaio: 3,8%), estradiol (CV intraensaio: 2,4% e interensaio: 5,8%), SHBG (CV intraensaio: 2,4% e interensaio: 2,8%), testosterona total (CV intraensaio: 4,7% e interensaio: 8,4%) e insulina (CV intraensaio: 1,9% e interensaio: 2,8%). A testosterona livre foi calculada pelo método de Vermeulen (201), utilizando SHBG, albumina e testosterona total.

E-selectina, ICAM-1, VCAM-1 e PAI-1 foram quantificados no aparelho *Luminex® 200™* (Luminex Corporation, Austin, TX, USA), utilizando o *kit Human CVD Panel 1*

(Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) conforme as normas do fabricante, apresentando CVs intra e interensaio < 15%.

O índice de resistência insulínica baseado na glicemia e insulinemia de jejum utilizado foi o HOMA-IR.

- **HOMA-IR:** $(\text{Glicemia de jejum}_{\text{mmol/l}} \times \text{insulinemia de jejum}_{\mu\text{IU/ml}}) / 22,5$.

Os índices de sensibilidade insulínica (ISI) derivados do TOTG foram:

- **ISI Belfiore:** $2 / [(\text{INSp}_{\mu\text{IU/ml}}) \times (\text{GLIp}_{\text{mg/dl}}) + 1]$, onde INSp: área sob a curva (AUC) da insulina durante o TOTG dividido pela média de valores de sujeitos não diabéticos, e GLIp: AUC da glicose durante o TOTG dividido pela média de valores de sujeitos não diabéticos (202). A média dos valores dos sujeitos não diabéticos adotada foi baseada na média dos resultados de cinco estudos clínicos (203-207);

- **ISI Cederholm:** $[75000 + (\text{glicemia de jejum} - \text{glicemia de } 120\text{min}_{\text{mmol/l}}) \times 1,15 \times 180 \times 0,19 \times \text{peso corporal}_{\text{kg}}] / [120 \times (\text{média logarítmica da insulinemia}_{\mu\text{IU/ml}}) \times \text{média da glicemia}_{\text{mmol/l}}]$ (208);

- **ISI Avignon:** $\{(0,137 \times [10^8 / \text{insulinemia de jejum}_{\mu\text{IU/ml}} \times \text{glicemia de jejum}_{\text{mg/dl}} \times \text{VD}]) + [10^8 / (\text{insulinemia de } 120 \text{ min}_{\mu\text{IU/ml}} \times \text{glicemia de } 120\text{min}_{\text{mg/dl}} \times \text{VD})]\} / 2$, onde VD é o volume de distribuição [150 (ml/kg) x peso corporal_{kg}] (209).

6.6 Categorização da síndrome metabólica, da glicemia de jejum alterada e da hipertensão arterial sistêmica

O diagnóstico de síndrome metabólica foi realizado segundo os critérios do *Joint Interim Statement* (210), da GJ alterada conforme os critérios da *International Diabetes Federation* (IDF) (211) e da HAS conforme *The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure* (JNC 7) (193).

6.7 Estatística e análise

O cálculo amostral (*G*Power 3.1.3, Düsseldorf, NW, DEU*) foi baseado na variável TVDH_{max} da VCLP. O poder estatístico utilizando a distribuição bicaudal para comparações entre dois grupos independentes foi de 0,95 com uma probabilidade de erro α de 0,05. Baseado no estudo de Kraemer de Aguiar e colaboradores (198), os TVDH_{max} (média \pm DP) para os grupos 1 e 2 foram, respectivamente de $11 \pm 1,73$ e $9 \pm 1,35$ s; estimando-se um

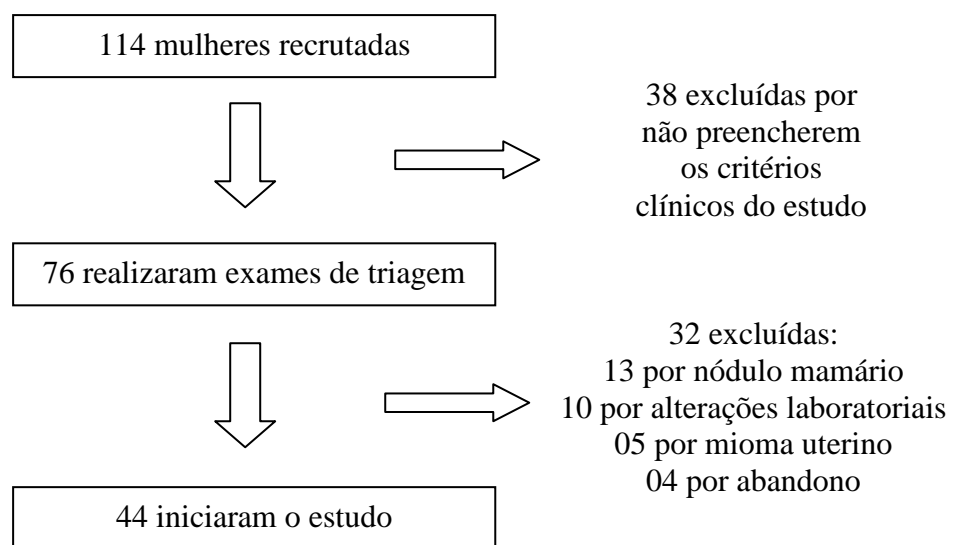
tamanho de amostra de 17 pacientes/grupo e um tamanho total da amostra de 34 pacientes. Foi considerado um decréscimo de 18% no TVDH_{max} como uma diferença clinicamente relevante para o tempo de reperfusão microvascular (TVDH_{max}). Considerando-se o curto período de seguimento do estudo, esperávamos uma taxa de abandono de no máximo 20%. De acordo com estes resultados, foi sugerido um tamanho amostral de 20 pacientes/grupo.

Para as análises, foi utilizado o programa StatSoft 2004 (*STATISTICA7; Tulsa, OK, USA*). Os testes de normalidade (*Kolmogorov-Smirnov, D'Agostino & Pearson e Shapiro-Wilk*) foram feitos para verificar a distribuição das variáveis. Os dados que apresentaram distribuição normal foram descritos como média \pm DP e os sem distribuição normal, como mediana [1^o-3^oquartis]. Para as comparações intergrupos foram aplicados os testes de *Mann Whitney* e o teste *t* não pareado, para as variáveis contínuas sem e com distribuição normal, respectivamente. Para as comparações intragrupo foram aplicados o teste de *Wilcoxon* pareado e o teste *t* pareado para as variáveis sem e com distribuição normal, respectivamente. A AUC total foi calculada para glicose e insulina, utilizando as 03 medidas de cada variável, ou seja, glicemia e insulinemia em jejum e na 1^a e 2^a hora do TOTG. A correlação entre as variáveis foi testada pelo coeficiente de correlação de postos de *Spearman rho*. As possíveis divergências de distribuição entre os grupos, como prevalência de síndrome metabólica, HAS e GJ alterada foram calculadas pelo teste exato de *Fisher*. Um P valor $< 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

7 RESULTADOS

Foram avaliadas 114 mulheres, destas 76 apresentaram os critérios clínicos para participarem do estudo e realizaram os exames de triagem. Trinta e duas pacientes foram excluídas por apresentarem alterações nos exames laboratoriais ou de imagem e 44 iniciaram o estudo (figura 9).

Figura 9 - Seleção da amostra do estudo

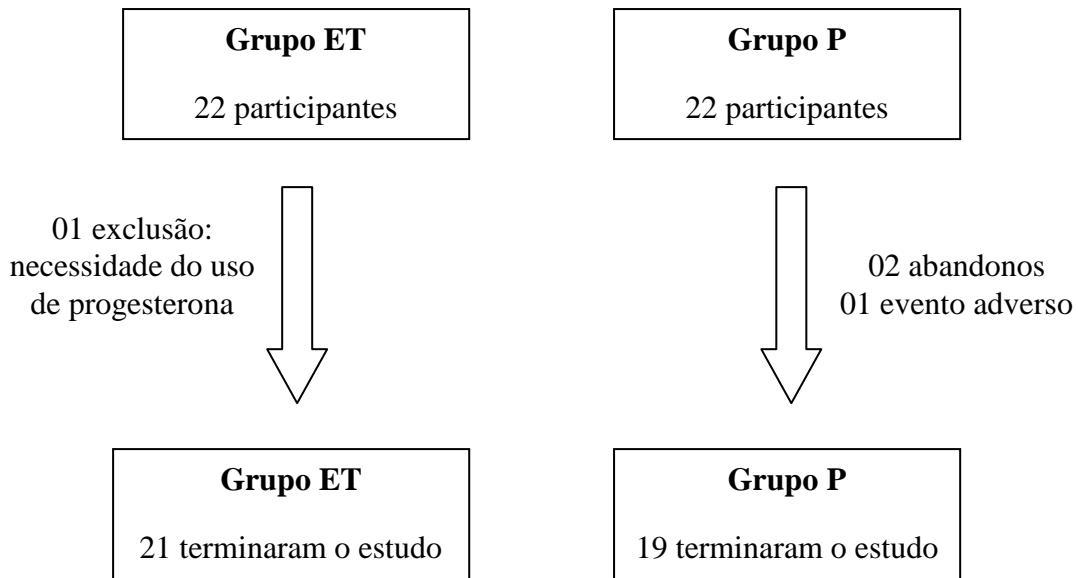


*Alterações laboratoriais: 04 apresentaram hormônio folículo estimulante (FSH) < 35 mIU/ml ou estradiol > 40 pg/ml; 02 apresentaram hormônio estimulante da tireóide (TSH) < 0,45 mUI/l; 02 apresentaram triglicerídeos (TG) > 400 mg/dl; e 02 apresentaram colesterol total > 300 mg/dl.

As participantes foram randomizadas em número igual (n:22) entre os grupos ET e P. Durante o seguimento do estudo, uma paciente do grupo ET foi excluída por necessitar do uso de progesterona para cessar o sangramento vaginal persistente, enquanto três do grupo P não completaram o estudo, duas por abandono e uma por relatar cefaléia intensa após o início do gel (figura 10).

Conforme o ERF, as participantes foram classificadas em baixo, intermediário ou alto risco cardiovascular. A maioria apresentou baixo risco (risco abaixo de 10% para evento ou morte cardiovascular em 10 anos), no entanto como a síndrome metabólica é um fator agravante de risco, o indivíduo com o diagnóstico desta síndrome é classificado à categoria de risco imediatamente superior (tabela 3).

Figura 10 - Seguimento do estudo



ET: estrogênio transdérmico; P: placebo.

Das 22 mulheres alocadas no grupo ET, dez apresentaram critérios para o diagnóstico de síndrome metabólica, dez eram hipertensas em tratamento e nenhuma foi diagnosticada com HAS virgem de tratamento, cinco apresentaram GJ alterada, quatro tinham menopausa cirúrgica e três estavam em uso de levotiroxina devido hipotireoidismo primário. Das 22 mulheres alocadas no grupo P, nove apresentaram critérios para o diagnóstico de síndrome metabólica, sete eram hipertensas em tratamento e nenhuma foi diagnosticada com HAS virgem de tratamento, quatro apresentaram GJ alterada, três tinham menopausa cirúrgica e duas estavam em uso de levotiroxina para tratamento de hipotireoidismo primário (tabela 3). Nenhum dos dados citados apresentou diferença estatística entre os grupos.

7.1 Características clínicas, antropométricas, de composição corporal e da pressão arterial sistêmica

A amostragem populacional do estudo apresentou idade de $51,77 \pm 2,3$ anos, IMC de $31,52 \pm 2,54$ kg/m² e tempo de menopausa de 3 [2 - 5] anos. Os dados estão apresentados na tabela 4. No basal, não houve diferenças entre os grupos. Após 3 meses, o grupo ET apresentou diminuição do IMKB, da pressão arterial sistólica (PAS) e da diastólica (PAD) (figura 11), enquanto no grupo P apenas houve redução do IMKB. Comparando os dois

grupos após a intervenção, não houve quaisquer diferenças (figura 12), a não ser, de nota, uma tendência à diminuição da PAD no grupo estrogênio comparado ao placebo ($74,09 \pm 7,12$ vs. $78,26 \pm 5,83$ mmHg; $P=0,051$).

Tabela 3 - Características das participantes no início do estudo, conforme diagnóstico de comorbidades e uso de medicamentos

	Grupo ET – n (%)	Grupo P – n (%)
ERF	6,3 [3,85-9,27]	5,1 [4,7-7,22]
*Grau de risco:		
Baixo/intermediário/alto	11/10/01	12/09/01
Síndrome metabólica	10 (45,4)	9 (40,9)
HAS em tratamento	10 (45,4)	7 (31,8)
Glicemia de jejum alterada	5 (22,7)	4 (18,2)
Mulheres histerectomizadas	4 (18,2)	3 (13,6)
Hipotireóideas em tratamento	3 (13,6)	2 (9,1)
Número de antihipertensivos por participante	1,70	1,57
	IECA: 2	IECA: 3
	BRA: 4	BRA: 1
Antihipertensivos em uso	β -bloqueador: 3	β -bloqueador: 2
	Diurético tiazídico: 7	Diurético tiazídico: 4
	BCC: 1	VD: 1

ET: estrogênio transdérmico; P: placebo; ERF: escore de risco de Framingham; HAS: hipertensão arterial sistêmica; IECA: inibidores da enzima conversora de angiotensina-I; BRA: bloqueadores dos receptores da angiotensina II; BCC: bloqueadores dos canais de cálcio; VD: vasodilatadores de ação direta.

*Grau de risco conforme a IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose.

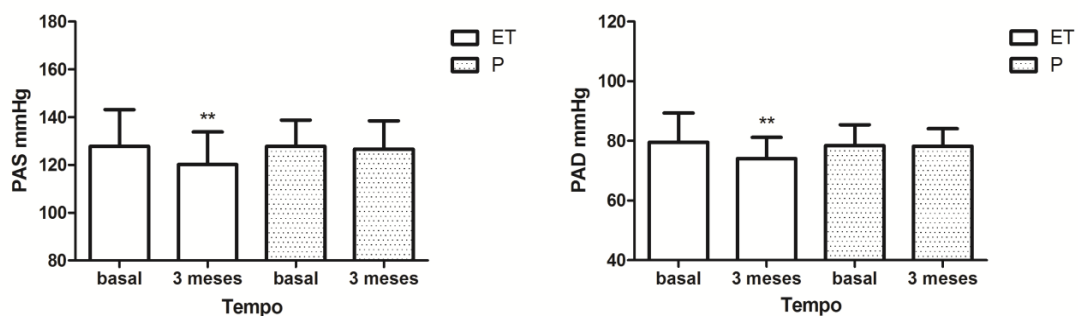
Tabela 4 - Efeito do tratamento e comparações entre os grupos nas características clínicas, antropométricas, de composição corporal e da pressão arterial na amostra estudada

Variáveis	Grupo ET		Grupo P	
	Basal (n=22)	03 meses (n=21)	Basal (n=22)	03 meses (n=19)
Idade (anos)	52,09 ± 2,44	-	51,45 ± 2,15	-
T.M. (anos)	3,50 [1,47–7,0]	-	3,0 [2,0–4,25]	-
IMKB (pontos)	27,45 ± 10,23	12,23 ± 7,23**	23,5 ± 8,02	14,05 ± 8,26**
Peso (kg)	76,64 ± 9,04	76,86 ± 9,17	79,46 ± 10,32	79,8 ± 10,45
Estatura (cm)	155,68 ± 6,92	-	151,52 ± 34,07	-
IMC (kg/m ²)	31,55 ± 2,24	31,65 ± 2,32	31,48 ± 2,85	31,54 ± 2,81
CA (cm)	99,22 ± 4,9	98,71 ± 5,06	99,09 ± 6,75	99,31 ± 6,14
CQ (cm)	108,84 ± 5,06	108,59 ± 4,06	108,47 ± 7,07	109,44 ± 6,43
RCQ	0,90 ± 0,04	0,90 ± 0,04	0,90 ± 0,03	0,90 ± 0,03
MM (%)	60,05 ± 2,76	60,48 ± 2,81	60,75 ± 3,04	60,63 ± 2,8
MG (%)	39,94 ± 2,76	39,51 ± 2,81	39,25 ± 3,04	39,36 ± 2,8
PAS (mmHg)	127,81 ± 15,42	120,23 ± 13,63**	127,81 ± 10,94	126,73 ± 11,8
PAD (mmHg)	79,57 ± 9,79	74,09 ± 7,12**	78,4 ± 7,04	78,26 ± 5,83

T. M.: tempo desde a menopausa; IMKB: índice menopáusico de Kupperman e Blatt; IMC: índice de massa corporal; CA: circunferência abdominal; CQ: circunferência do quadril; RCQ: relação cintura/quadril; MM: massa magra; MG: massa gorda; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica.

Em comparação ao basal: **P < 0,01.

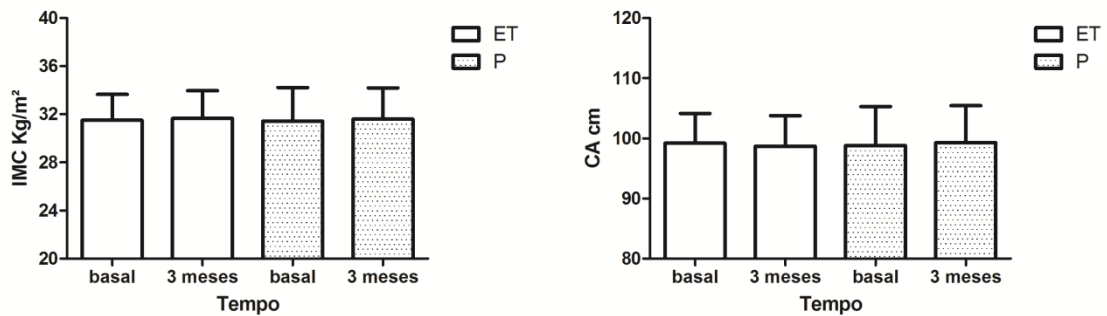
Figura 11 - Comparações da PAS e PAD no basal e após 3 meses



PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica.

Em comparação ao basal: **P < 0,01.

Figura 12 - Comparações do IMC e CA no basal e após 3 meses



IMC: índice de massa corporal; CA: circunferência abdominal.

7.2 Exames de bioquímica e de sangue total

No basal, o grupo total de participantes apresentou colesterol total de $213,8 \pm 28,57$ mg/dl, HDL de $52,77 \pm 9,22$ mg/dl, LDL de $132,7 \pm 24,09$ mg/dl e TG de $124 [100,3 - 163,5]$ mg/dl. Os exames de sangue total e bioquímica não apresentaram quaisquer diferenças entre os grupos (tabela 5), tanto no basal quanto após 03 meses de intervenção, além disso, não observamos qualquer efeito intragrupo nos grupos ET e P.

7.3 Hormônios sexuais

No basal, a amostra populacional do estudo apresentou estradiol de $13,91 [6,39 - 21,59]$ pg/ml e FSH de $62,1 [46,33 - 85,7]$ mIU/ml, sem diferenças entre os grupos (tabela 6). Após a intervenção, no grupo ET houve aumento dos níveis de SHBG e estradiol e diminuição dos níveis de testosterona livre e FSH (figura 13), enquanto no grupo placebo os níveis hormonais permaneceram semelhantes.

Tabela 5 - Efeito do tratamento e comparações entre os grupos nos exames de bioquímica e de sangue total na amostra estudada

Exames	Grupo ET		Grupo P	
	Basal (n=22)	03 meses (n=21)	Basal (n=22)	03 meses (n=19)
CT (mg/dl)	215,31 ± 29,96	217,23 ± 39,23	212,18 ± 27,72	213,05 ± 36,53
HDL (mg/dl)	52,63 ± 7,94	49,90 ± 6,67	52,9 ± 10,54	49,52 ± 10,10
LDL (mg/dl)	134,68 ± 25,08	139,95 ± 32,87	130,68 ± 23,46	133,89 ± 27,23
TG (mg/dl)	119 [97,25-153]	127 [94-162]	132 [109-191]	131 [101-192]
PCR-US (mg/dl)	0,41 [0,26-0,63]	0,53 [0,24-0,76]	0,61 [0,17-0,97]	0,70 [0,26-1,08]
Ácido úrico (mg/dl)	4,1 [3,77-5,0]	4,5 [3,75-5,95]	3,9 [3,35-4,82]	4,0 [3,3-4,7]
Prot. T (g/dl)	6,89 ± 0,34	6,91 ± 0,44	7,03 ± 0,45	7,08 ± 0,37
Albumina (g/dl)	3,75 ± 0,31	3,60 ± 0,25	3,85 ± 0,35	3,75 ± 0,23
Globulina (g/dl)	3,12 ± 0,46	3,28 ± 0,47	3,15 ± 0,46	3,35 ± 0,33
Hemoglobina (g/dL)	12,83 ± 0,69	12,15 ± 2,70	13,02 ± 0,89	12,88 ± 0,87
Hematócrito (%)	39,5 ± 1,8	39,20 ± 1,44	39,68 ± 2,54	39,38 ± 2,27
Leucócitos (mil/mcl)	5650 ± 1709	5676 ± 1327	5740 ± 1316	6131 ± 1411
Plaquetas (mil/mcl)	248,68 ± 47,68	246,42 ± 53,21	239,68 ± 56,83	251,31 ± 51,81

CT: colesterol total; HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; TG: triglicérides; PCR-US: proteína C-reativa ultrasensível; Prot. T: proteínas totais.

Tabela 6 - Efeito do tratamento e comparações entre os grupos nos hormônios sexuais na amostra estudada

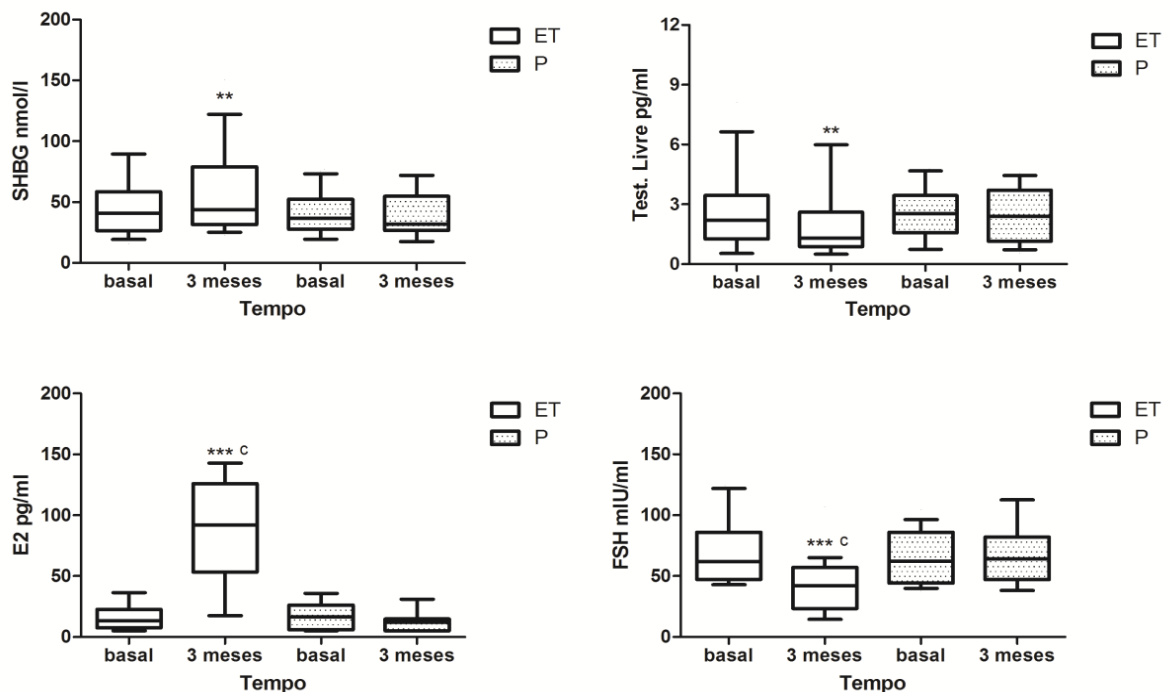
Hormônios	Grupo ET		Grupo P	
	Basal (n=22)	03 meses (n=21)	Basal (n=22)	03 meses (n=19)
SHBG (nmol/l)	40,93[26,56-58,62]	43,75[31,52-78,89]**	36,82[27,8-52,49]	32[26,68-54,68]
Test. Total (ng/dl)	17,05 [8,87-20,8]	11,8 [6,25-21,4]	14,1 [7,77-18,32]	14 [7-19,3]
Test. Livre (pg/ml)	2,2 [1,27-3,45]	1,31 [0,88-2,62]**	2,54 [1,57-3,44]	2,4 [1,16-3,71]
E2 (pg/ml)	13,44 [7,5-22,73]	92 [53,45-126,1]*** ^c	16,45 [5,97-20,52]	12,51 [8,35-17]
FSH (mIU/ml)	61,83 [47,32-86]	42,04 [23,35-57,1]*** ^c	62,48 [44,29-86]	64 [47,1-82,11]

SHBG: globulina ligadora de hormônios sexuais; Test.: testosterona; E2: estradiol; FSH: hormônio folículo estimulante.

Em comparação ao basal: **P < 0,01; ***P < 0,001.

Em comparação ao grupo P ao final do tratamento: ^cP < 0,001.

Figura 13 - Comparações da SHBG, Testosterona Livre, estradiol e FSH no basal e após 3 meses



SHBG: globulina ligadora de hormônios sexuais; Test. livre: testosterona livre; E2: estradiol; FSH: hormônio folículo estimulante.

Em comparação ao basal: **P < 0,01; ***P < 0,001.

Em comparação ao grupo P ao final do tratamento: ^cP < 0,001.

7.4 Avaliação Microvascular

7.4.1 Reatividade microvascular em tecido muscular do antebraço

No basal, as variáveis microvasculares avaliadas pela POV foram semelhantes entre os grupos. O uso do estradiol promoveu aumento do FSA e diminuição da RV periférica em todos os tempos analisados (tabela 7 e figuras 14 e 15) em comparação ao basal, no entanto, comparando os grupos após a intervenção, o grupo ET apresentou maior FSA_{b1}, FSA_{b2} e FSA_{NTG}, e menor RV_{b1}, RV_{HRPO}, RV_{c234}, RV_{b2} e RV_{NTG} do que o grupo P. O grupo P não apresentou nenhuma diferença estatisticamente significativa em comparação ao seu estado basal.

Tabela 7 - Efeito do tratamento e comparações entre os grupos na reatividade microvascular em tecido muscular do antebraço na amostra estudada

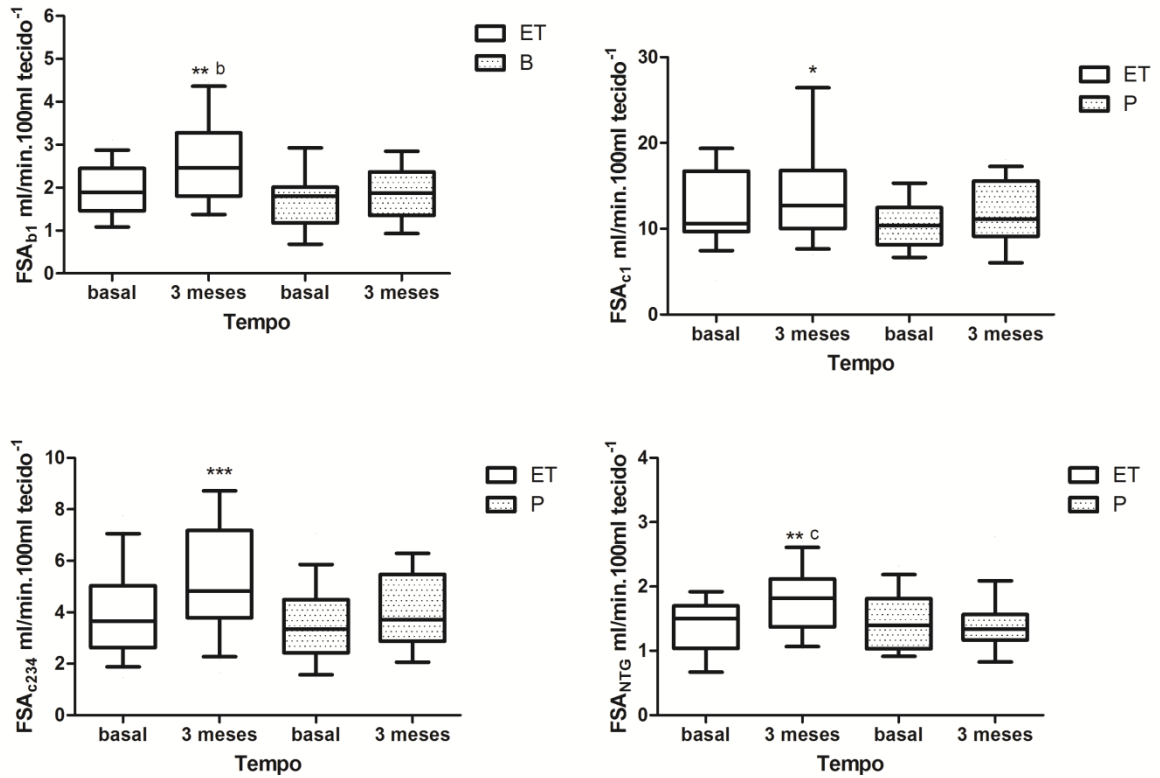
Variáveis	Grupo ET		Grupo P	
	Basal (n=22)	03 meses (n=21)	Basal (n=22)	03 meses (n=19)
FSA _{b1}	1,89 [1,46-2,44]	2,46 [1,81-3,28] ^{***b}	1,81[1,17-2,04]	1,83[1,35-2,35]
RV _{b1}	46,83[38,11-64,67]	36,37[24,9-51,27] ^{**b}	55,71[45,19-80,94]	51,3[40,88-70,03]
FSA _{HRPO}	5,23[4,62-7,47]	6,39[5,37-9,39] ^{***}	5,47[3,98-6,46]	5,57[4,82-7,55]
RV _{HRPO}	23,43[18,06-31,63]	15,93[11,32-22,29] ^{***b}	24,71[18,91-33,78]	22,13[16,46-29,7]
FSA _{c1}	10,59[9,66-16,7]	12,69[10,01-16,82] [*]	10,74[8,16-14,1]	11,11[9,34-15,59]
RV _{c1}	9,64[6,24-10,3]	7,45[5,35-9,4] [*]	9,54[7,00-11,49]	7,70[6,21-9,93]
FSA _{c234}	3,66[2,62-5,03]	4,82[3,79-7,18] ^{***}	3,34[2,43-4,49]	3,72[2,87-5,47]
RV _{c234}	28,18[20,97-38,92]	18,45[13,1-26,21] ^{***a}	30,27[22,81-41,1]	26,95[19,04-36,5]
FSA _{b2}	1,63[1,2-1,95]	2,1[1,65-2,55] ^{**b}	1,24[1,00-1,76]	1,32[1,07-1,69]
RV _{b2}	58,1[44,97-85,47]	44,37[31,74-56,17] ^{***b}	78,53[58,11-89,64]	71,08[48,21-94,06]
FSA _{NTG}	1,50[1,03-1,70]	1,82[1,37-2,12] ^{**c}	1,39[1,03-1,77]	1,33[1,16-1,56]
RV _{NTG}	64,05[48,02-85,14]	47,47[38,15-60,83] ^{**b}	68,59[51,23-86,70]	69,86[51,93-85,77]

FSA_{b1}: fluxo sanguíneo do antebraço basal pré-oclusão; RV_{b1}: resistência vascular basal pré-oclusão; FSA_{HRPO}: fluxo sanguíneo do antebraço durante a hiperemia reativa pós-oclusiva (HRPO); RV_{HRPO}: resistência vascular durante a HRPO; FSA_{c1}: fluxo sanguíneo do antebraço da primeira curva durante a HRPO; RV_{c1}: resistência vascular da primeira curva durante a HRPO; FSA_{c234}: média do fluxo sanguíneo do antebraço da 2^a, 3^a e 4^a curvas durante a HRPO; RV_{c234}: média da resistência vascular da 2^a, 3^a e 4^a curvas durante a HRPO; FSA_{b2}: fluxo sanguíneo do antebraço basal pré-nitroglicerina; RV_{b2}: resistência vascular basal pré-nitroglicerina; FSA_{NTG}: fluxo sanguíneo do antebraço após nitroglicerina; RV_{NTG}: resistência vascular após nitroglicerina. FSA: representado em ml/min.100ml tecido⁻¹; RV: representada em mmHg/ml/min.100ml tecido⁻¹.

Em comparação ao basal: *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001.

Em comparação ao grupo P ao final do tratamento: ^aP < 0,05; ^bP < 0,01; ^cP < 0,001

Figura 14 - Comparações do FSA_{b1} , FSA_{c1} , FSA_{c234} e FSA_{NTG} no basal e após 3 meses

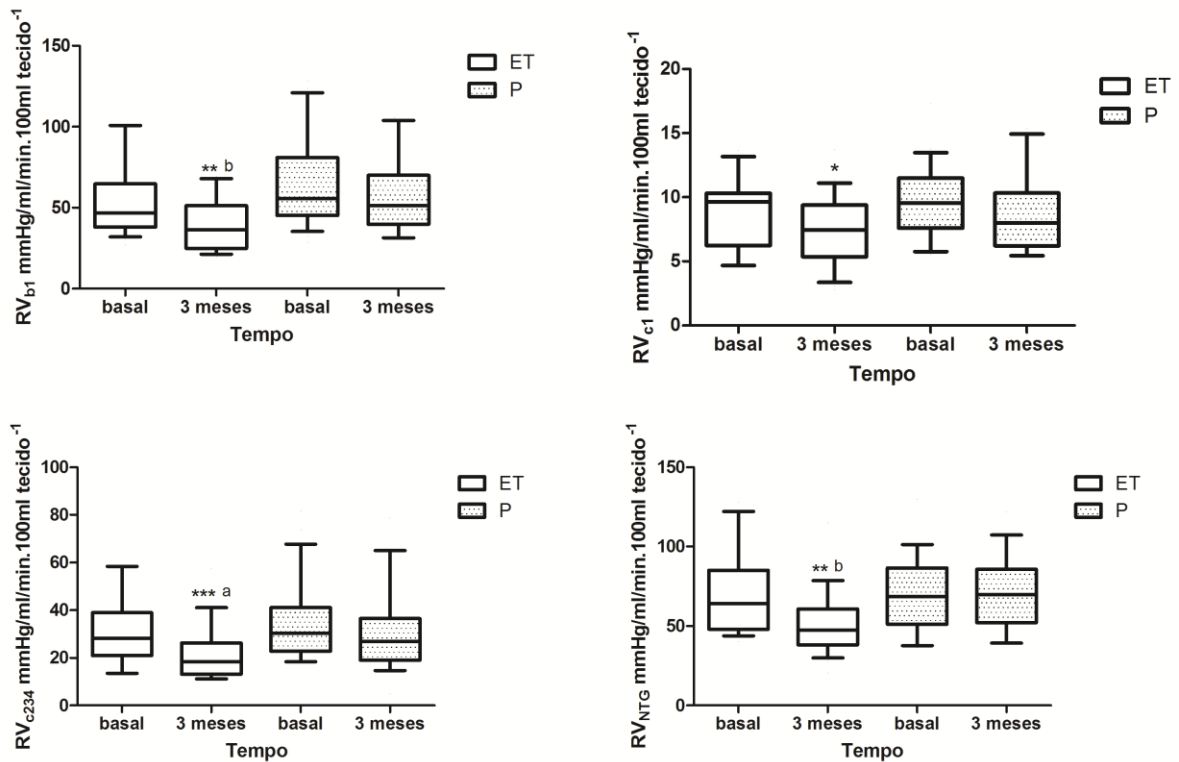


FSA_{b1} : fluxo sanguíneo do antebraço basal pré-oclusão; FSA_{c1} : fluxo sanguíneo do antebraço da primeira curva durante a hiperemia reativa pós-oclusiva (HRPO); FSA_{c234} : média do fluxo sanguíneo do antebraço da 2^a, 3^a e 4^a curvas durante a HRPO; FSA_{NTG} : fluxo sanguíneo do antebraço após nitroglicerina.

Em comparação ao basal: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Em comparação ao grupo P ao final do tratamento: ^b $P < 0,01$; ^c $P < 0,001$.

Figura 15 - Comparações do RV_{b1} , RV_{c1} , RV_{c234} e RV_{NTG} no basal e após 3 meses



RV_{b1} : resistência vascular basal pré-oclusão; RV_{c1} : resistência vascular da primeira curva durante a hiperemia reativa pós-oclusiva (HRPO); RV_{c234} : média da resistência vascular da 2^a, 3^a e 4^a curvas durante a HRPO; RV_{NTG} : resistência vascular após nitroglicerina.

Em comparação ao basal: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Em comparação ao grupo P ao final do tratamento: ^a $P < 0,05$; ^b $P < 0,01$.

7.4.2 Reatividade microvascular nutritiva no leito periungueal

Por motivos técnicos não foi possível a obtenção de dados de uma participante no basal e três após intervenção no grupo ET, e uma participante no basal e duas após intervenção no grupo P. No basal, os grupos não apresentaram diferenças nas variáveis microvasculares avaliadas pela VCLP (tabela 8). Após a intervenção, o grupo ET apresentou maior VDH e VDH_{max} do que o grupo P (figura 16). O uso de estradiol promoveu um aumento da VDH e VDH_{max} e uma diminuição do $TVDH_{max}$, em comparação ao basal.

Tabela 8 - Efeito do tratamento e comparações entre os grupos na reatividade microvascular nutritiva no leito periungueal na amostra estudada

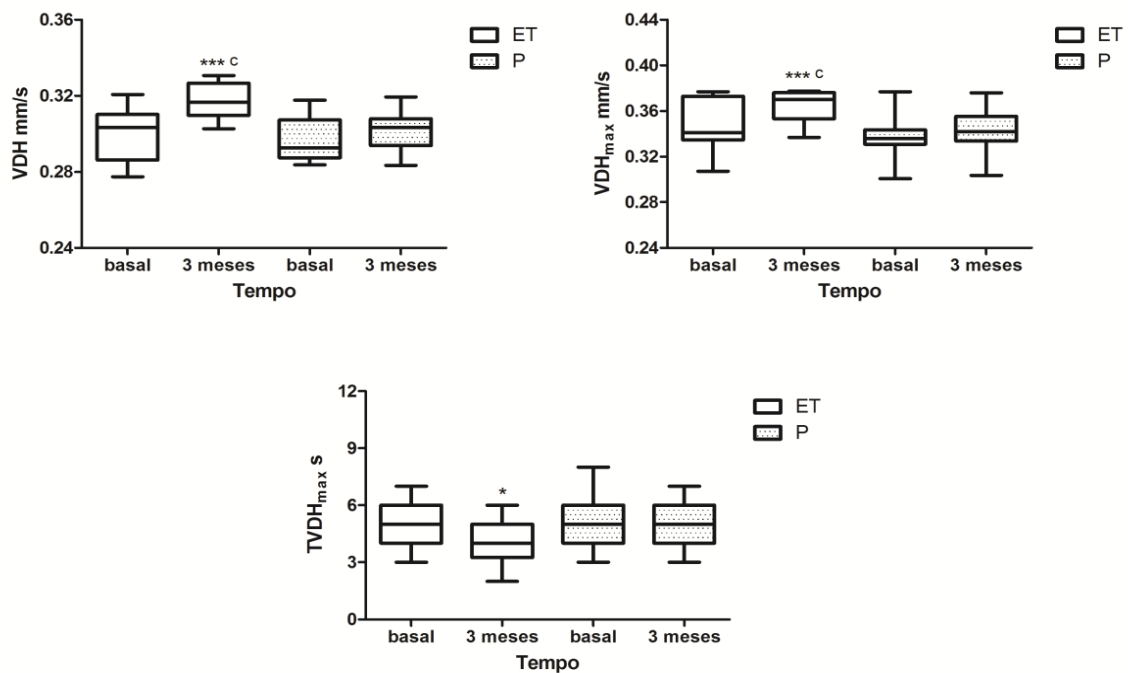
Variáveis	Grupo ET		Grupo P	
	Basal (n=21)	03 meses (n=18)	Basal (n=21)	03 meses (n=17)
VDH (mm/s)	0,303[0,285-0,310]	0,316[0,309-0,326] ^{***c}	0,295[0,286-0,307]	0,303[0,293-0,308]
VDH _{max} (mm/s)	0,341[0,334-0,373]	0,374[0,353-0,376] ^{***c}	0,336[0,330-0,343]	0,341[0,333-0,355]
TVDH _{max} (s)	5,0[4,0-6,0]	4,0[3,25-5,0] [*]	5,0[4,0-6,0]	5,0[4,0-6,0]

VDH: velocidade de deslocamento das hemácias; VDH_{max}: velocidade de deslocamento máximo das hemácias durante hiperemia reativa pós-oclusiva; TVDH_{max}: tempo de reperfusão na hiperemia reativa pós-oclusiva.

Em comparação ao basal: ^{*}P < 0,05; ^{***}P < 0,001.

Em comparação ao grupo P ao final do tratamento: ^cP < 0,001.

Figura 16 - Comparações da VDH, VDH_{max} e TVDH_{max} no basal e após 3 meses



VDH: velocidade de deslocamento das hemácias; VDH_{max}: velocidade de deslocamento máximo das hemácias durante hiperemia reativa; TVDH_{max}: tempo de reperfusão na hiperemia reativa.

Em comparação ao basal: ^{*}P < 0,05; ^{***}P < 0,001.

Em comparação ao grupo P ao final do tratamento: ^cP < 0,001.

7.5 Moléculas de adesão e PAI-1

Os níveis de E-Selectina, VCAM-1, ICAM-1 e PAI-1 foram semelhantes no basal (tabela 9) entre os grupos. O uso de estradiol gel durante 03 meses diminuiu os níveis de E-Selectina e ICAM-1 (figura 17). Não houve diferenças nas demais comparações tanto intergrupo quanto intragrupo.

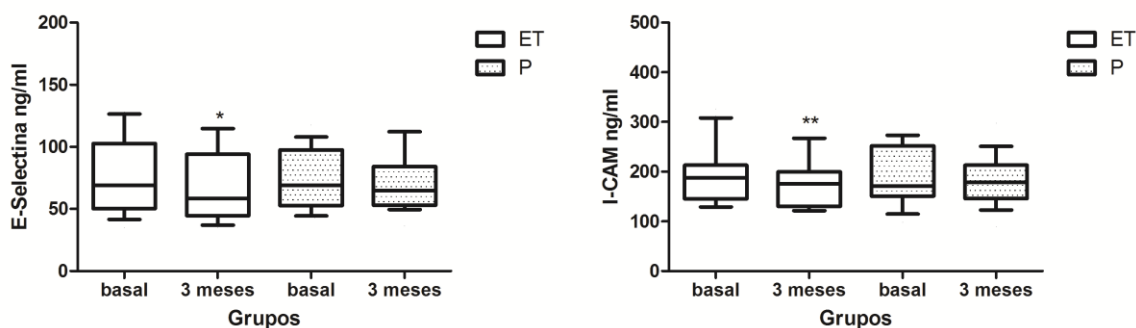
Tabela 9 - Efeito do tratamento e comparações entre os grupos nas moléculas de adesão e PAI-1 na amostra estudada

Variáveis	Grupo ET		Grupo P	
	Basal (n=22)	03 meses (n=21)	Basal (n=22)	03 meses (n=19)
E-Selectina (ng/ml)	68,95[50,18-102,8]	58,4[44,53-94,03]*	69[52,75-97,59]	64,8[52,85-84,18]
VCAM-1 (ng/ml)	1015 ± 159	995 ± 179	1003 ± 182	1058 ± 205
ICAM-1 (ng/ml)	188[145-212]	175[130-200]**	171[151-253]	178[146-213]
PAI-1 (ng/ml)	94,23 ± 32,46	105,29 ± 29,18	88,64 ± 23,53	88,36 ± 29,1

VCAM-1: molécula de adesão vascular-1; ICAM-1: molécula de adesão intercelular-1; PAI-1: inibidor do ativador do plasminogênio-1.

Em comparação ao basal: *P < 0,05; **P < 0,01.

Figura 17 - Comparações da E-Selectina e ICAM-1 no basal e após 3 meses



ICAM-1: molécula de adesão intercelular.

Em comparação ao basal: *P < 0,05; **P < 0,01.

7.6 Sensibilidade insulínica

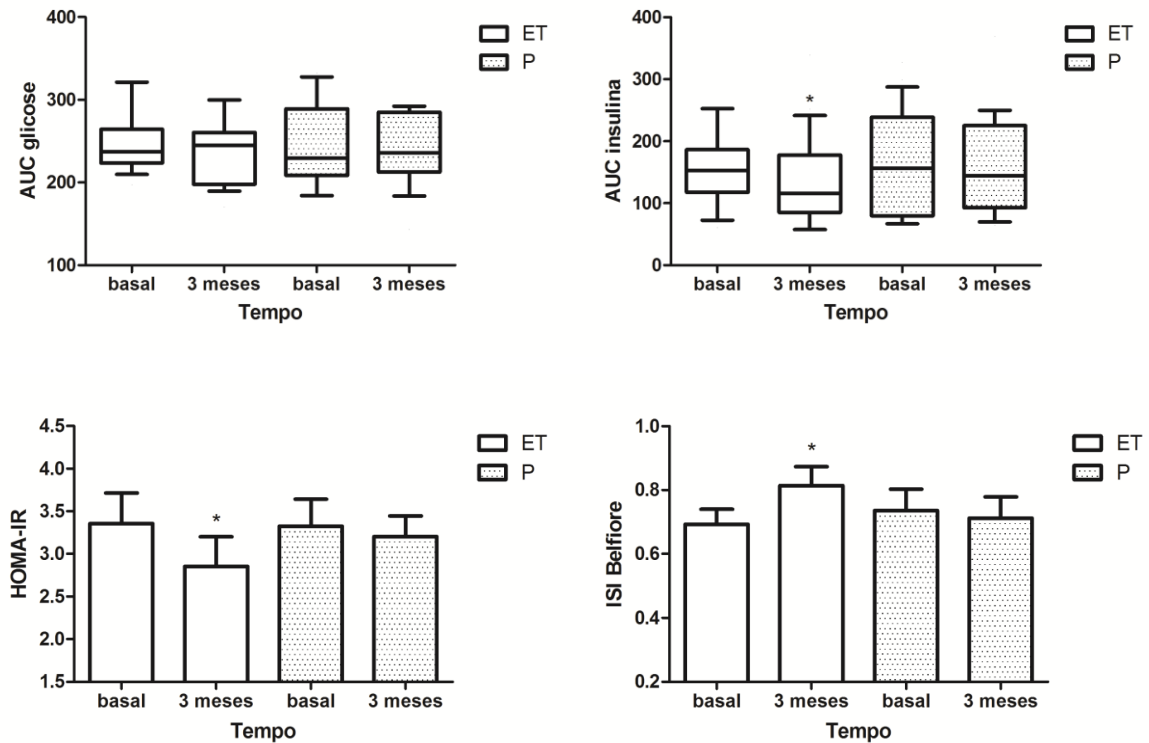
No início do estudo, as 44 participantes apresentavam GJ de $94,43 \pm 7,79$ mg/dl e insulinemia de jejum de $14,17 \pm 6,31$ μ U/ml. Não houve diferenças intergrupos tanto no basal quanto após 3 meses de intervenção (tabela 10). No entanto, ocorreu melhora da sensibilidade insulínica, avaliada pelo HOMA-IR, pela AUC da insulina e pelo ISI de Belfiore no grupo ET (figura 18), enquanto no grupo P não houve qualquer diferença. O índice de Cederholm não apresentou diferença entre o grupo ET e P, respectivamente, no basal $63,75$ [56,67-76,37] vs. $62,46$ [52,85-88,03] e após três meses $67,61$ [61,14-87,02] vs. $69,35$ [55,17-83,24]. Assim como o índice de Avignon não demonstrou diferença estatística significativa entre o grupo ET e P, respectivamente, tanto no basal 6472 [4683-8424] vs. 5758 [3987-11774] quanto após três meses de intervenção 8012 [5946-12736] vs. 7144 [4366-10438].

Tabela 10 - Efeito do tratamento e comparações entre os grupos na homeostase glicêmica e em índices de sensibilidade insulínica na amostra estudada

Variáveis	Grupo ET		Grupo P	
	Basal (n=22)	03 meses (n=21)	Basal (n=22)	03 meses (n=19)
GJ (mg/dl)	$94,36 \pm 8,92$	$91 \pm 9,54$	$94,5 \pm 6,68$	$93,74 \pm 6,86$
G 1h (mg/dl)	135 [126 - 160]	133 [109 - 155]	127 [112 - 171]	136 [113 - 173]
G 2h (mg/dl)	113 [99 - 123]	111 [95 - 131]	107 [100 - 120]	105 [95 - 123]
IJ (μ U/ml)	$14,19 \pm 6,56$	$12,45 \pm 6,55$	$14,15 \pm 6,2$	$13,86 \pm 4,37$
I 1h (μ U/ml)	101,5 [68 - 138]	76,1 [61 - 129]	108 [51 - 171]	118 [64 - 144]
I 2h (μ U/ml)	66,9 [49 - 103]	51,8 [35 - 77]	76,1 [38 - 121]	77,4 [33 - 113]
HOMA-IR	$3,35 \pm 1,67$	$2,85 \pm 1,60^*$	$3,32 \pm 1,50$	$3,20 \pm 1,05$
AUC glicose	237 [223 - 264]	244 [197 - 260]	229 [208 - 289]	235 [212 - 285]
AUC insulina	152 [117 - 186]	115 [85 - 178]*	156 [79 - 238]	144 [92 - 225]
ISI Belfiore	$0,69 \pm 0,22$	$0,81 \pm 0,27^*$	$0,73 \pm 0,31$	$0,71 \pm 0,29$

GJ: glicemia de jejum; G 1h: glicemia após 1h do TOTG; G 2h: glicemia após 2h do TOTG; IJ: insulinemia de jejum; I 1h: insulinemia após 1h do TOTG; I 2h: insulinemia após 2h do TOTG; HOMA-IR: *homeostasis model assessment of insulin resistance*; AUC glicose: área sob a curva dos 03 tempos de glicose; AUC insulina: área sob a curva dos 03 tempos de insulina; ISI: índice de sensibilidade insulínica. Em comparação ao basal: *P<0,05.

Figura 18 - Comparações da AUC da glicose e insulina, do HOMA-IR e do ISI Belfiore no basal e após 3 meses



AUC glicose: área sob a curva dos 03 tempos de glicose; AUC insulina: área sob a curva dos 03 tempos de insulina; HOMA-IR: *homeostasis model assessment of insulin resistance*; ISI Belfiore: índice de sensibilidade insulínica de Belfiore.

Em comparação ao basal: * $P < 0,05$.

7.7 Viscosidades sanguínea, plasmática e relativa

As viscosidades sanguínea, plasmática e relativa não apresentaram diferenças no basal, porém, após a intervenção houve diminuição das viscosidades sanguínea com hematócrito nativo e plasmática no grupo ET, embora não houve diferença da viscosidade sanguínea corrigida pelo hematócrito ($P=0,07$). Também não houve mudanças significativas das viscosidades no grupo P (tabela 11). Comparando os grupos após três meses de intervenção, o grupo ET apresentou menor viscosidade sanguínea do que o grupo placebo (figura 19).

Tabela 11 - Efeito do tratamento e comparações entre os grupos nas viscosidades sanguínea, plasmática e relativa na amostra estudada

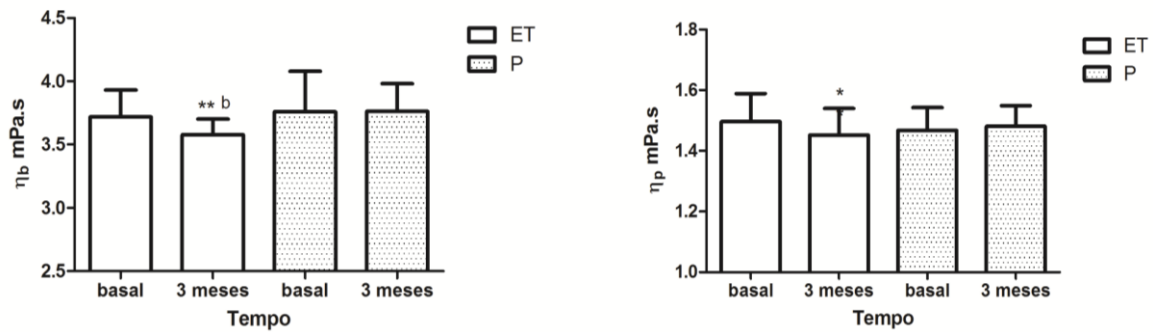
Viscosidades	Grupo ET		Grupo P	
	Basal (n=22)	03 meses (n=21)	Basal (n=22)	03 meses (n=19)
η_b (mPa.s)	$3,72 \pm 0,21$	$3,57 \pm 0,12^{**b}$	$3,75 \pm 0,32$	$3,76 \pm 0,22$
η_{bHt} (mPa.s)	$4,47 \pm 0,34$	$4,32 \pm 0,21^b$	$4,49 \pm 0,39$	$4,55 \pm 0,25$
η_p (mPa.s)	$1,49 \pm 0,09$	$1,45 \pm 0,08^*$	$1,46 \pm 0,07$	$1,48 \pm 0,07$
η_r	$2,81 \pm 0,19$	$2,82 \pm 0,18$	$2,90 \pm 0,19$	$2,90 \pm 0,16$

η_b : viscosidade sanguínea com hematócrito nativo; η_{bHt} : viscosidade sanguínea corrigida pelo hematócrito; η_p : viscosidade plasmática; η_r : viscosidade relativa.

Em comparação ao basal: *P < 0,05; **P < 0,01.

Em comparação ao grupo P ao final do tratamento: ^bP < 0,01.

Figura 19 - Comparações das viscosidades sanguínea e plasmática no basal e após 3 meses



η_b : viscosidade sanguínea com hematócrito nativo; η_p : viscosidade plasmática.

Em comparação ao basal: *P < 0,05; **P < 0,01.

Em comparação ao grupo P ao final do tratamento: ^bP < 0,01.

7.8 Correlações

A fim de investigar as possíveis associações entre as diversas variáveis analisadas realizamos um estudo de correlação com o grupo total de pacientes e também com cada grupo isoladamente.

7.8.1 Correlações das variáveis microvasculares com os hormônios sexuais, níveis pressóricos, índices de sensibilidade insulínica e moléculas de adesão celular

Analisando as 40 participantes que concluíram o estudo, o fluxo sanguíneo muscular em repouso (FSA_{b1}), apresentou correlação positiva com os níveis de estradiol e negativa com os níveis de FSH, assim como a RV em repouso (RV_{b1}) demonstrou correlação negativa com o estradiol e positiva com o FSH (tabela 12). Os níveis de SHBG, testosterona total e livre não se associaram com as variáveis microvasculares.

A PAS apresentou correlação positiva com a RV muscular tanto em repouso (RV_{b1}) quanto na HRPO (RV_{c234}), além de associar-se negativamente com o fluxo sanguíneo muscular em repouso (FSA_{b1}) e com a velocidade máxima do fluxo microvascular nutritivo do leito periungueal (VDH_{max}). A velocidade de deslocamento de hemácias (VDH) e o tempo de reperfusão microvascular ($TVDH_{max}$) não se associaram com nenhum dos parâmetros analisados. A PAD correlacionou-se positivamente com a RV muscular em repouso (RV_{b1}) e após estímulo com a NTG (RV_{NTG}) e negativamente com o fluxo sanguíneo muscular após uso da NTG (FSA_{NTG})

O ISI Belfiore demonstrou associação positiva com o fluxo sanguíneo muscular em repouso (FSA_{b1}), e negativa com a RV muscular tanto em repouso (RV_{b1}) quanto na HRPO (RV_{c234}). Enquanto o HOMA-IR, apresentou correlação negativa com o fluxo sanguíneo muscular na HRPO (FSA_{c234}). As associações das diversas variáveis com a AUC da insulina não foram observadas, pois esta variável apresentou expressiva correlação negativa ($\rho = -0,96$) com o ISI de Belfiore, conseqüentemente suas associações foram semelhantes àquelas apresentadas por este índice.

Enquanto a E-Selectina, VCAM-1 e PAI-1 não se correlacionaram com nenhuma variável microvascular, a ICAM-1 apresentou correlação negativa com o fluxo sanguíneo muscular em repouso (FSA_{b1}) e positiva com a RV (RV_{b1}).

As viscosidades plasmática e sanguínea com hematócrito nativo não apresentaram correlações com as variáveis microvasculares.

Tabela 12 - Correlações das variáveis microvasculares com os hormônios sexuais, níveis pressóricos, índices de sensibilidade insulínica e moléculas de adesão celular

	FSA _{b1}	RV _{b1}	FSA _{c1}	RV _{c1}	FSA _{c234}	RV _{c234}	FSA _{NTG}	RV _{NTG}	VDH _{max}
E2	0,45**	-0,31*	-	-	-	-	-	-	-
FSH	-0,34*	0,33*	-	-	-	-	-	-	-
PAS	-0,39*	0,50***	-	-	-	0,46**	-	-	-0,35*
PAD	-	0,38*	-	-	-	-	-0,35*	0,37*	-
ISI Belf.	0,33*	-0,39*	-	-	-	-0,36*	-	-	-
HOMA-IR	-	-	-	-	-0,32*	-	-	-	-
ICAM-1	-0,40*	0,43**	-	-	-	-	-	-	-
VDH _{max}	-	-	-	-	-	-0,37*	-	-	1

E2: estradiol; FSH: hormônio folículo estimulante; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; ISI Belf.: índice de sensibilidade insulínica de Belfiore; HOMA-IR: *homeostasis model assessment of insulin resistance*; FSA_{b1}: fluxo sanguíneo do antebraço basal pré-oclusão; RV_{b1}: resistência vascular basal pré-oclusão; FSA_{c1}: fluxo sanguíneo do antebraço da primeira curva durante a hiperemia reativa pós-oclusiva (HRPO); RV_{c1}: resistência vascular da primeira curva durante a HRPO; FSA_{c234}: média do fluxo sanguíneo do antebraço da 2ª, 3ª e 4ª curvas durante a HRPO; RV_{c234}: média da resistência vascular da 2ª, 3ª e 4ª curvas durante a HRPO; FSA_{NTG}: fluxo sanguíneo do antebraço após nitroglicerina; RV_{NTG}: resistência vascular após nitroglicerina; VDH_{max}: velocidade de deslocamento máximo das hemácias durante a HRPO; ICAM-1: molécula de adesão intercelular-1.

*P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001.

Ao separarmos os grupos em relação à intervenção aplicada e analisarmos as correlações das 21 participantes do grupo ET que terminaram o estudo, pudemos observar que os níveis de estradiol não mais se correlacionaram com a RV_{b1}. Entretanto, de forma importante, observamos uma associação negativa com a RV_{c234} (ρ -0,44; P < 0,01). A PAS passou a apresentar correlações com o FSA_{c1} (ρ -0,57; P < 0,001), a RV_{c234} (ρ 0,44; P < 0,01) e o FSA_{c234} (ρ -0,64; P < 0,001), enquanto que a PAD apresentou correlação com o FSA_{c234} (ρ -0,45; P < 0,01). O ISI Belfiore e o HOMA-IR não demonstraram mais suas correlações com as variáveis microvasculares. Na análise com as 19 pacientes do grupo P que terminaram o estudo, os níveis de estradiol mantiveram suas correlações com o FSA_{b1} (ρ 0,49; P < 0,01) e com a RV_{b1} (ρ -0,53; P < 0,001). A PAS manteve suas correlações com o FSA_{b1} (ρ -0,55; P < 0,001), a RV_{b1} (ρ 0,61; P < 0,001) e a RV_{c234} (ρ 0,56; P < 0,001), enquanto a PAD não mais manteve suas correlações com as variáveis microvasculares. O ISI Belfiore manteve suas correlações com o FSA_{b1} (ρ 0,46; P < 0,01), a RV_{b1} (ρ -0,53; P < 0,001) e a RV_{c234} (ρ -0,54; P = 0,001), além de apresentar uma nova correlação com o

FSA_{c234} (ρ 0,51; $P < 0,001$). O HOMA-IR manteve correlação com o FSA_{c234} (ρ -0,49; $P < 0,01$), além de passar a apresentar associação com o FSA_{c1} (ρ -0,47; $P < 0,01$) e a RV_{c1} (ρ 0,49; $P < 0,01$).

Em ambas as análises isoladas dos grupos, as viscosidades plasmática e sanguínea com hematócrito nativo não apresentaram correlações com outras variáveis, a não ser entre elas, assim como as moléculas de adesão.

7.8.2 Correlações entre os hormônios sexuais, níveis pressóricos, índices de sensibilidade insulínica, viscosidades plasmática e sanguínea e moléculas de adesão celular

Analisando as 40 participantes que concluíram o estudo, os níveis de estradiol apresentaram correlação negativa com a PAD, HOMA-IR, viscosidade plasmática, níveis de ICAM-1 e FSH, e positiva com os níveis de SHBG (tabela 12). Pela importante correlação negativa entre estradiol e o FSH ($\rho=-0,82$), este último apresentou correlações semelhantes àquela e não foram demonstradas na tabela 13. Os níveis de SHBG demonstraram estar associados negativamente com a viscosidade plasmática e com os níveis de E-Selectina.

O ISI Belfiore correlacionou-se negativamente com a PAS, PAD e com o HOMA-IR. As viscosidades plasmática e sanguínea com hematócrito nativo demonstraram associação positiva com os níveis de ICAM-1 (tabela 13).

Tabela 13 - Correlações dos hormônios sexuais, dos níveis pressóricos, dos índices de sensibilidade insulínica, das viscosidades plasmática e sanguínea e das moléculas de adesão celular

	E2	SHBG	PAS	PAD	ISI Belf.	HOMAIR	η_p	η_b	E-Select	ICAM-1
E2	1	0,32*	-	-0,36*	-	-0,46**	-0,47**	-	-	-0,32*
SHBG	0,32*	1	-	-	-	-	-0,32*	-	-0,35*	-
PAS	-	-	1	0,76***	-0,31*	-	-	-	-	-
PAD	-0,36*	-	0,76***	1	-0,37*	-	-	-	-	-
ISI Belf.	-	-	-0,31*	-0,37*	1	-0,40*	-	-	-	-
HOMAIR	-0,46**	-	-	-	-0,40*	1	-	-	-	-
η_p	-0,47**	-0,32*	-	-	-	-	1	0,58***	-	0,35*
η_b	-	-	-	-	-	-	0,58***	1	-	0,36*
E-Select	-	-0,35*	-	-	-	-	-	-	1	0,60***
ICAM-1	-0,32*	-	-	-	-	-	0,35*	0,36*	0,60***	1

E2: estradiol; SHBG: globulina ligadora de hormônios sexuais; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; ISI Belf.: índice de sensibilidade insulínica de Belfiore; HOMA-IR: *homeostasis model assessment of insulin resistance*; η_p : viscosidade plasmática; η_b : viscosidade sanguínea com hematócrito nativo; E-Select: E-Selectina; ICAM-1: molécula de adesão intercelular-1.

*P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001.

7.9 Eventos adversos

Cabe ressaltar que quatro participantes no grupo ET e três no grupo P eram histerectomizadas, e mesmo assim o principal evento adverso foi o sangramento vaginal, ocorrendo em nove das 18 participantes com útero intacto do grupo ET e em uma das 19 participantes com útero intacto do grupo P, respectivamente (50% VS. 5,3%, P < 0,01), seguido pela mastalgia (27,3% VS. 4,5%, P = 0,09) (tabela 14). Os sangramentos vaginais foram de pequeno volume (*spotting*), cessando espontaneamente, com exceção de uma participante do grupo ET, que necessitou do uso de progesterona e foi excluída do estudo, como citado previamente. A USG TV demonstrou espessura do eco endometrial semelhante no início do estudo entre os grupos ET e P ($0,29 \pm 0,14$ vs. $0,27 \pm 0,11$ mm; NS), respectivamente. Após três meses de acompanhamento, no grupo P a variação da espessura do endométrio não foi importante ($0,27 \pm 0,11$ vs. $0,34 \pm 0,15$ mm; NS), sendo que uma das participantes apresentou eco endometrial ≥ 5 mm, enquanto houve significativo aumento da espessura endometrial no grupo ET ($0,29 \pm 0,14$ vs. $0,49 \pm 0,24$ mm; P < 0,01) e oito

participantes apresentaram eco endometrial $\geq 5\text{mm}$, sendo que destas, seis tinham referido sangramento vaginal durante o seguimento.

Tabela 14 - Principais eventos adversos durante o seguimento do estudo

Eventos adversos	Grupo ET – n (%)	Grupo P – n (%)
[§] Sangramento vaginal	9 (50) ^b	1 (5,3)
Eco endometrial $\geq 5\text{mm}$	8 (47) ^b	1 (5,3)
Mastalgia	6 (27,3)	1 (4,5)
Dor em baixo ventre	1 (4,5)	0
Prurido vulvar	1 (4,5)	0
ITU	0	1 (4,5)
Excluídas por eventos adversos	1 (4,5) = sangramento vaginal intenso	1 (4,5) = cefaléia

[§]Sangramento vaginal de pequeno volume (*spotting*), cessando espontaneamente, não sendo necessário suspender a medicação. ITU: infecção do trato urinário.
Em comparação ao grupo P ao final do tratamento: ^bP < 0,01.

8 DISCUSSÃO

Entre 1980 e 2009 a expectativa de vida do brasileiro aumentou 10,6 anos, ao passar de 62,5 para 73,1 anos (212). Paralelamente a este fenômeno de envelhecimento populacional, a prevalência da obesidade vem aumentando dramaticamente no Brasil (6). Assim, há uma tendência em nossa população dos indivíduos tornarem-se cada vez mais idosos e com maior prevalência de sobrepeso na senilidade, com conseqüente aumento do risco cardiovascular.

Muitas evidências demonstram que a obesidade *per se* está associada à disfunção endotelial, mesmo em crianças sem outras comorbidades (213;214). Em adultos com peso normal, um ganho médio de 4,1 kg é o suficiente para diminuir a dilatação fluxo-mediada (FMD) da artéria braquial, restaurada após redução do peso corporal (215). Em obesos, há uma diminuição da vasodilatação dependente e independente do endotélio, avaliada em artérias de resistência do antebraço (216). Está também descrito uma redução na densidade capilar do músculo esquelético de indivíduos obesos comparados a magros (217), assim como no tecido cutâneo (65). Ao avaliarmos os capilares nutritivos do leito periungueal de 189 mulheres sem diagnóstico de DM2 ou HAS, com ampla faixa etária, de 12 a 64 anos, e IMC médio de 30,5 kg/m², a circunferência da cintura e o IMC apresentaram associação com a função microvascular (74), assim como o fluxo sanguíneo miocárdico de mulheres obesas na pós-menopausa correlacionou-se negativamente com a CA e o IMC (218). Tem sido proposto que o aumento do volume da gordura visceral seria o principal responsável pela disfunção endotelial existente em obesos (219;220), porém os mecanismos fisiopatológicos não estão totalmente esclarecidos. Em modelos experimentais desenvolvidos para o estudo da obesidade, a redução da biodisponibilidade do NO já está bem documentada (221) e diversas causas têm sido aventadas, dentre elas podemos citar, o aumento do estresse oxidativo celular induzido por diversas condições patológicas, como a resistência insulínica (222), a hiperglicemia (223), a HAS (224), a produção ou ativação de citocinas inflamatórias pelo tecido adiposo (225) e alterações no sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) (226).

A privação estrogênica também apresenta associação com a disfunção endotelial. Mulheres submetidas à ooforectomia bilateral apresentam piora da função endotelial (227;228), mesmo se avaliadas em curto período de tempo após a cirurgia (229). Mulheres jovens com baixos níveis de estrogênio endógeno, como as com menopausa precoce (230), com amenorréia atlética (231) ou com hipogonadismo central (232) também demonstram piora da função endotelial. Vários estudos (233-235) comprovam que mulheres pós-

menopáusicas saudáveis (53 a 58 anos) apresentam diminuição da vasodilatação dependente do endotélio em comparação àquelas na pré-menopausa (30 a 35 anos). Assim, as pacientes do nosso estudo, caracterizadas pelo excesso de peso e baixos níveis plasmáticos de estradiol, apresentam condições que estão relacionadas à disfunção endotelial, que por sua vez é um indicador prognóstico de eventos cardiovasculares testado em diversas populações (236-238), inclusive em mulheres na pós-menopausa (239).

A disfunção endotelial representa o *primum movens* do processo aterosclerótico e da remodelação vascular. Estes processos são as causas do desenvolvimento de doenças cardiovasculares clinicamente relevantes (240;241). Desta maneira, o endotélio vem se consolidando como um novo alvo terapêutico e diversas pesquisas estão sendo realizadas com o intuito de encontrar intervenções que consigam reverter ou amenizar a disfunção endotelial, visando assim, uma provável diminuição de eventos cardiovasculares.

Nosso estudo demonstrou que o uso de estradiol transdérmico em uma população de mulheres com excesso de peso e menopausa recente promoveu melhora da função microvascular em arteríolas de resistência do leito vascular braquial e em capilares nutritivos do leito periungueal, assim como reduziu os níveis de marcadores inflamatórios endoteliais. No tecido muscular, o uso do estrogênio promoveu aumento do fluxo sanguíneo tanto em condições basais (FSA_b), quanto após estímulo dependente (FSA_{C1} e FSA_{C234}) e independente do endotélio (FSA_{NTG}). Além disso, houve melhora da reatividade microvascular no leito periungueal tanto em condições basais (VDH) quanto na hiperemia reativa (VDH_{max}), e ainda redução nos níveis de ICAM-1 e E-selectina solúveis. Todos estes achados demonstraram que o estradiol transdérmico exerce efeitos benéficos sobre a função endotelial de mulheres com menopausa recente e excesso de adiposidade corporal. A comparação dos nossos achados com o de outros autores é uma tarefa difícil, uma vez que muitos fatores que podem influenciar a função endotelial e diversas divergências entre os estudos estão presentes, como por exemplo, as características clínicas ou laboratoriais da população em estudo, assim como o tipo, a dose e a via de administração da THM utilizada. Além disso, a técnica e o método utilizados para aferir a função endotelial também são bastante divergentes entre os estudos, o que pode gerar resultados diferentes. Desta maneira, tomamos o cuidado de descrever as principais características da população de cada estudo citado, assim como a THM utilizada.

Dados que avaliam o efeito da THM sobre a microcirculação com os mesmos métodos que utilizamos são escassos e foram realizados em mulheres saudáveis, com peso dentro da

normalidade, além de associarem o uso de progesterona ao de estrogênio. Haenggi e colaboradores demonstraram através da VCLP um aumento do fluxo sanguíneo capilar basal do leito periungueal tanto com o uso do estradiol oral quanto com o transdérmico. Entretanto, diferente do nosso estudo ambas terapêuticas foram associadas à didrogesterona (95). Em estudos realizados com a POV (96;100), o uso de EEC associado à MPA não provocou diferenças no FSA basal e no FSA_{NTG}, apenas demonstrou aumento do FSA durante a hiperemia reativa comparado ao placebo, porém o fato das mulheres não serem obesas, o tipo de estrogênio utilizado e a associação da progesterona dificulta a comparação com os nossos resultados. Mulheres na pós-menopausa magras parecem apresentar uma morfologia vascular mais preservada comparada às obesas (218;242), podendo justificar o efeito neutro da THM sobre o FSA_{NTG}. Embora existam controvérsias (164), é possível que a progesterona anule os efeitos benéficos do estrogênio sobre a função endotelial, principalmente a MPA (86;243). Deve-se considerar ainda que o EEC comparado ao estradiol, parece apresentar menor efeito na expressão da eNOS e produção de NO (244), e conseqüentemente, exercer um menor efeito vasodilatador.

Devemos ressaltar que estudos que avaliaram o efeito da terapêutica isolada do estrogênio sobre a função endotelial foram realizados em populações ou com métodos diferentes ao do nosso estudo. Em mulheres com peso normal, o uso isolado de estrogênio aumentou o FSA tanto após infusão de ACh quanto de NPS na artéria braquial com o uso do estradiol oral, enquanto não houve diferenças com a administração transdérmica comparado ao placebo (98). Cabe ressaltar que os níveis de estrogênio foram duas vezes maior no grupo que fez uso da terapia oral comparado ao grupo da terapia transdérmica (98). Porém, outros estudos demonstraram efeitos positivos do estrogênio transdérmico sobre a reatividade da artéria braquial (FMD), avaliada pela ultrassonografia (89;245).

Em mulheres obesas, o uso de EEC isolado (99) ou associado à progesterona micronizada (102), sem e com fatores de risco cardiovascular, respectivamente, não demonstrou qualquer efeito sobre o fluxo sanguíneo do miocárdio, no entanto as participantes apresentavam idade mais avançada (60 anos), assim como maior tempo de menopausa (10 anos) do que a nossa população, fatores estes, que parecem estar relacionados à resposta estrogênica vascular diminuída (246) e pior desfecho cardiovascular (247).

Até a presente data não conhecemos estudos que avaliaram os efeitos do estradiol transdérmico isolado sobre a reatividade vascular em mulheres com excesso de peso, faixa

etária e tempo de menopausa semelhante ao da nossa população, porém, existem dados com o uso do estrogênio oral associado à progesterona. Em mulheres com sobrepeso, IMC de 27 kg/m², com ou sem HAS, o uso de EEC associado à MPA ou à progesterona micronizada durante dois meses aumentou a FMD da artéria braquial (248). Assim como em mulheres com diagnóstico de síndrome metabólica e IMC de 27 kg/m², o uso de 1mg de estradiol associado a 2mg de drospirenona também promoveu essa resposta positiva na FMD (249). Um estudo interessante foi o *Estrogen in the Prevention of Atherosclerosis Trial* (EPAT) que avaliou o efeito do estradiol oral em 222 participantes que foram submetidas à ultrassonografia carotídea para mensuração da espessura média-intimal na prevenção da aterosclerose por um período de dois anos (250). Em uma subanálise deste estudo, selecionando apenas mulheres obesas sem uso de hipolipemiantes, houve diminuição da progressão da espessura média-intimal no grupo do hormônio comparado ao placebo, um dado relevante que sugere melhora da função endotelial (251). No entanto, em mulheres com excesso de peso e com DM2, o uso de EEC ou estradiol oral demonstrou efeitos respectivamente, neutro e negativo, sobre a FMD da artéria braquial e a microcirculação cutânea (97;252).

Baseado nestes resultados, podemos inferir que a THM parece exercer efeitos endoteliais benéficos em populações específicas. Mulheres saudáveis com baixo risco cardiovascular e aquelas com menopausa recente se beneficiam da terapia estrogênica, enquanto diabéticas ou mulheres com início da reposição estrogênica após longo tempo da menopausa não teriam o mesmo benefício. Tal fato demonstra que a reatividade endotelial ao estrogênio parece depender principalmente de três fatores: tempo do início da reposição estrogênica após a menopausa, grau de aterosclerose e idade.

Algumas evidências ajudam a elucidar possíveis causas dos efeitos divergentes do estrogênio sobre a função endotelial em diferentes populações. Em modelo animal, o tempo da privação dos hormônios ovarianos antes da reintrodução do estrogênio influencia a ação deste sobre a função endotelial e o relaxamento vascular em vasos saudáveis, fazendo com que ratos após oito meses da ooforectomia não apresentem os efeitos vasculoprotetores do estrogênio observados naqueles que iniciaram a terapia estrogênica com um e quatro meses da ooforectomia (253). Em primatas hipercolesterolêmicos foi demonstrado que a eficácia do estrogênio em prevenir a progressão da placa aterosclerótica estava inversamente relacionada com a duração do período de privação estrogênica após ooforectomia (254). Estudo *in vitro* de cultura de células endoteliais demonstrou que a expressão do ER- α diminuiu após privação

estrogênica (255), assim como em espécimes de artérias coronárias de mulheres, foi identificada expressão dos ERs na maioria das artérias normais, enquanto que nas artérias ateroscleróticas uma minoria expressou os ERs (256). A idade é o fator de risco mais importante para o desenvolvimento da aterosclerose e suas complicações. A placa de ateroma altera diretamente a função endotelial, sendo que a vasodilatação estimulada pela ACh correlaciona-se inversamente com a porcentagem de infiltração aterosclerótica da parede arterial (257). Além disso, o 27-hidroxicolesterol, um abundante metabólito do colesterol, que se eleva na hipercolesterolemia e é encontrado nas lesões ateroscleróticas, é um antagonista competitivo da ação dos ERs na vasculatura, podendo ser mais um fator que contribui para a perda das ações protetoras do estrogênio em artérias doentes (258). Com base nesses achados, a expressão dos ERs é menor quanto maior o grau de aterosclerose e o tempo de privação estrogênica.

Nossa população, composta por mulheres com excesso de peso, menopausa recente e predominantemente com risco cardiovascular baixo a intermediário, segundo o ERF, apresenta um endotélio responsivo ao estrogênio. Uma vez que com o uso da terapia proposta não houve mudanças significativas na CA, IMC, PCR-US e perfil lipídico, fatores que sabidamente podem influenciar a reatividade endotelial, a melhora das variáveis avaliadas ocorreu provavelmente pelas ações benéficas do estradiol. Podemos especular que essa ação benéfica se deu sobre a produção, liberação e biodisponibilidade dos fatores vasodilatadores derivados do endotélio, tais como NO, PGI₂ e EDHF, bem como na inibição dos fatores vasoconstritores, como a ET-1 (259).

Diversos estudos também investigaram os efeitos da THM sobre a função endotelial utilizando marcadores inflamatórios relacionados à função endotelial como método de avaliação de sua eficácia. Estudos *in vitro* e em modelos animais demonstram que o estrogênio diminui a expressão das moléculas de adesão (260;261). Em mulheres saudáveis na pós-menopausa, o estradiol transdérmico isolado ou combinado com MPA diminuiu os níveis solúveis de ICAM-1 (262). O uso de EEC associado à MPA ou à progesterona micronizada também demonstrou de modo consistente a redução dos níveis de E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1 (158;263-265). Os benefícios parecem ser independentes da dose ou rota de administração do estrogênio e/ou progesterona (266). Este efeito do estrogênio de reduzir os níveis das moléculas de adesão, em especial da VCAM-1, é regulado pela inibição da interleucina-1 (267). Deve-se ressaltar que tal benefício parece não ocorrer naquelas mulheres

com DM2, onde alguns estudos não observaram redução dos níveis das moléculas de adesão com o uso da THM (252;268;269).

Existem muitas evidências na literatura que demonstram o efeito neutro do estradiol transdérmico sobre os níveis da PCR (160;270), enquanto a terapia oral promove elevação dos seus níveis (158;270;271). Estes diferentes efeitos sobre a PCR conforme a via de administração do estrogênio provavelmente ocorre pelo metabolismo hepático de primeira passagem, assim como, a administração transdérmica do estradiol parece exercer uma menor influência no sistema de coagulação do que a oral (22;176;177). Essa última é a provável explicação de muitos autores para uma menor incidência de eventos trombóticos com o uso transdérmico da terapia hormonal (46;50;272). Corroborando esses dados, em nosso estudo não houve variações significativas dos níveis da PCR-US e do PAI-1.

Grandes ensaios clínicos demonstram efeitos benéficos da THM no metabolismo dos carboidratos. Em uma subanálise do estudo PEPI (110), que comparou o uso do placebo com diversos tipos de THM (EEC isolado, EEC associado à MPA contínuo, EEC associado à MPA cíclica e EEC associado à progesterona micronizada cíclica), avaliando 788 mulheres com idade média de 56 anos e IMC de 26 kg/m², houve diminuição dos níveis de insulina e glicose de jejum naquelas em terapia hormonal em comparação ao grupo placebo, embora durante o TOTG, os grupos em uso da THM apresentaram aumento da glicemia. Enquanto os efeitos da THM sobre a GJ mostraram-se mais evidente entre as mulheres com concentrações mais elevadas de insulina no jejum e na primeira hora após a sobrecarga glicêmica. Avaliando mulheres mais velhas com doença coronariana, com maior IMC e RCQ, ou seja, mulheres com maior risco para desenvolverem DM2, o estudo HERS (273) randomizou 2763 mulheres para receberem EEC associado à MPA ou placebo. A GJ aumentou significativamente nas mulheres em uso de placebo durante um seguimento de 4,1 anos e não se alterou no grupo da THM. Este resultado foi ainda mais evidente quando avaliado apenas um subgrupo de participantes diabéticas. Um dado de grande relevância foi a observação de que a incidência de DM2 diminuiu em 35% no grupo em uso da terapia hormonal. Se traçarmos um paralelismo, este dado é muito expressivo, uma vez que o uso da metformina, 850mg duas vezes ao dia, diminuiu a incidência de DM2 em 31% no *Diabetes Prevention Program*. O estudo WHI (126) também encontrou diminuição em 21% na incidência de DM2 no grupo que usou THM comparado ao placebo, além de menores taxas de glicose e insulina em jejum e redução no HOMA-IR após um ano de tratamento. Nenhum destes três grandes ensaios

clínicos citados encontrou justificativa para melhora da sensibilidade insulínica baseado em mudanças da CA ou IMC.

O estrogênio atua sobre o metabolismo dos carboidratos em diversas vias de sinalização celular e em diferentes órgãos e tecidos. Já foi demonstrado que o estradiol estimula a fosforilação de substratos do receptor de insulina, da PI3K/Akt e da proteína quinase ativada por AMP (AMPK), mecanismos estes que estimulam a captação celular de glicose (274). Além disso, o estrogênio estimula a expressão do GLUT4 via ER- α no músculo esquelético (121), a produção e secreção da insulina pelo pâncreas (120), além de desempenhar um efeito antiapoptótico nas células β pancreáticas (275). No fígado, o estrogênio tanto inibe a produção glicose (116;276) quanto estimula a depuração da insulina (277;278), além de diminuir os níveis de ácidos graxos livres plasmáticos (133;279), contribuindo para uma melhora na sensibilidade insulínica (280).

O uso de estradiol transdérmico por três meses em nosso estudo não alterou os níveis de glicose e insulina em jejum, porém promoveu redução do HOMA-IR. Tal fato demonstra que possivelmente houve melhora na sensibilidade insulínica hepática naquelas em uso de THM. Embora os níveis de glicose e insulina aos 60 e 120 min no TOTG também não demonstrassem diferenças, houve melhora de índices derivados do TOTG - AUC da insulina e o ISI Belfiore, que avaliam principalmente a sensibilidade insulínica muscular. Deve-se ressaltar que Matsuda e colaboradores demonstraram uma boa correlação ($r = 0,654$) do ISI Belfiore com o CEH em população não diabética (281).

Avaliando ensaios clínicos com menor número de participantes, porém utilizando o CEH como método de aferição da sensibilidade insulínica, o uso de EEC associado à MPA em mulheres não obesas causou piora da sensibilidade insulínica (129;130;282). O uso de estradiol oral associado à NETA apresentou efeito neutro ou negativo na sensibilidade insulínica (137;139;140), enquanto o uso de estradiol transdérmico associado à mesma progesterona não demonstrou qualquer efeito (128). O uso isolado do estradiol oral exerceu efeito neutro ou negativo (135;141), enquanto o uso do estradiol transdérmico não afetou o metabolismo glicêmico (128;133;138). Apenas a associação do estradiol transdérmico com a didrogestrona promoveu melhora da sensibilidade insulínica avaliada pelo CEH (138;283). É importante ressaltar que dois destes estudos foram realizados em mulheres com DM2 (137;283). Deste modo, parece que o estrogênio transdérmico mostrou ser o mais seguro com relação ao metabolismo glicêmico comparado ao oral.

Avaliando outros desfechos, que não seja a captação de glicose periférica avaliada pelo CEH, podemos extrair outras informações dos efeitos da THM sobre o metabolismo glicêmico, principalmente se selecionarmos estudos onde as participantes apresentavam características clínicas ou laboratoriais de resistência insulínica. Um destes estudos (138), avaliou em 21 mulheres com IMC de 27 kg/m², o uso de estradiol *patch* 50 µg/dia por três meses. Após este período, associava-se didrogesteron oral para um seguimento de mais três meses. As avaliações foram realizadas no basal, após o uso de estradiol isolado e após três meses da associação da progesterona. As mulheres foram subdivididas em normoinsulinêmicas (n=12) e hiperinsulinêmicas (n=9) conforme a AUC da insulina. Após a terapia hormonal, a AUC da glicemia no TOTG não apresentou diferença comparada ao basal em todos os grupos de participantes. A AUC da insulina apresentou diminuição tanto com o estradiol isolado quanto associado à progesterona, porém apenas nas hiperinsulinêmicas, assim como houve aumento da depuração insulínica hepática apenas neste grupo. A AUC do peptídeo-C aumentou tanto nas normoinsulinêmicas quanto nas hiperinsulinêmicas. A utilização periférica da glicose durante o CEH aumentou apenas na associação das terapias, não demonstrando efeito significativo com o estrogênio isolado. Cuccinelli e colaboradores concluíram com esse estudo que o uso transdérmico do estrogênio isolado ou associado à didrogesteron reduz a hiperinsulinemia provocada pela sobrecarga glicêmica em mulheres na pós-menopausa com resistência insulínica. De acordo com este resultado, o uso por 12 meses de valerato de estradiol oral associado à didrogesteron a cada três meses em 31 mulheres não diabéticas obesas com IMC de 32 kg/m², foi capaz de diminuir os níveis de glicose e insulina em jejum comparado aos valores basais, assim como o HOMA-IR. Além disso, apesar de no TOTG ocorrer um aumento da AUC da glicemia e dos níveis de peptídeo-C após 30 min da sobrecarga glicêmica, houve diminuição dos níveis de insulina aos 60 e 120 min do TOTG, além da AUC da insulina apresentar uma tendência à redução (P=0,07). A depuração hepática da insulina no jejum aumentou comparada ao valor basal e não houve diferença na sensibilidade insulínica aferida pelo CEH (142). Deste modo parece que alguns tipos de THM, principalmente em mulheres com resistência insulínica, tanto promove um aumento da secreção pancreática insulínica, observada pelo aumento dos níveis de peptídeo-C, como aumenta sua depuração. Assim, a população que parece mais se beneficiar dos efeitos da reposição estrogênica sobre a homeostase glicêmica, ou pelo menos qual o efeito é mais

aparente, é a que apresenta algum grau de resistência insulínica, embora ainda existam controvérsias (284-286).

Aproximadamente 65% das participantes do nosso estudo apresentavam resistência insulínica baseado no HOMA-IR (287). Porém com a metodologia empregada em nosso estudo, não temos como confirmar se a redução dos níveis de insulina ocorreu por uma melhora da ação insulínica nos tecidos periféricos ou se foi por um aumento em sua depuração. Se este achado apresenta alguma relevância clínica, não sabemos, no entanto, a indução de hiperinsulinemia crônica fisiológica em ratos (288) e em humanos (289) demonstrou alterar alguns mecanismos de ação insulínica através de uma redução da supressão de ácidos graxos livres plasmáticos e menor utilização da glicose periférica (288;289). Assim, é possível que a redução nos níveis de insulina encontrado em nossa população, possa trazer benefícios ao metabolismo glicêmico, justificando talvez, a menor incidência de DM2 encontrada em grandes estudos clínicos (126;273).

A menopausa está associada a um aumento acelerado da rigidez vascular das grandes artérias relacionado com a idade (290) e mulheres na pós-menopausa têm níveis superiores de pressão arterial sistêmica, tanto em repouso quanto em resposta ao estresse mental ao compará-las com aquelas na pré-menopausa de mesma idade (291;292). Este aumento da pressão arterial poderia explicar parcialmente o aumento do risco de eventos cardiovasculares observados nesta população (29). No entanto, em mulheres saudáveis ou com doença coronariana estabelecida alguns grandes estudos clínicos encontraram aumento da PAS com a reposição de EEC isolado ou associado à progesterona (13;43). O estudo WHI constatou que após seguimento das participantes por dois anos havia um aumento significativo na PAS. Ao comparar os grupos que usaram EEC associado à MPA e aquelas que usaram EEC isolado com o placebo, este aumento na PAS foi de 1,5 e 1,1 mmHg, respectivamente, entretanto não houve diferenças na PAD (43). Avaliando esses resultados, sugere-se que o uso de estrogênio oral poderia desencadear um aumento da PAS, porém, cabe ressaltar que estes ensaios clínicos utilizaram EEC na THM, que contém uma elevada porcentagem de derivados equinos (30-40%) e outros componentes de origem animal que não são naturalmente produzidos no humano. Tal fato pode ser o responsável pelo efeito negativo dos EEC na pressão arterial, além disso a administração oral pode promover aumento dos níveis hormonais de maneira supra-fisiológica no fígado, o que altera a síntese de proteínas ou substâncias capazes de exercer alguma influência nos níveis pressóricos.

Ainda não há um grande estudo avaliando o efeito do uso do estrogênio transdérmico sobre os níveis pressóricos, porém na análise conjunta de estudos randomizados e controlados com placebo a pressão arterial permaneceu clinicamente inalterada. Em estudos que utilizaram a monitorização ambulatorial da pressão arterial por 24 horas (MAPA 24h) como método de aferição, houve redução de 4-5 mmHg na PAS e de 2-3 mmHg na PAD (293-299) com o uso deste estrogênio. A redução foi observada tanto em normotensas (294;300;301) quanto em hipertensas (296). Nossos resultados demonstraram uma redução de 7 mmHg na PAS e 5 mmHg na PAD, o que possivelmente promoveria redução de risco cardiovascular nessa população se analisado isoladamente. Modena e colaboradores observaram que a adição do estrogênio transdérmico à terapia antihipertensiva também é capaz de promover uma maior redução da massa ventricular esquerda comparada àquelas que usaram apenas antihipertensivos (299), sugerindo um papel protetor deste estrogênio sobre os níveis pressóricos.

Diferentes mecanismos fisiopatológicos têm sido estudados para explicar o possível efeito divergente da administração oral ou transdérmica do estrogênio sobre a pressão arterial. Dentre estes mecanismos podemos citar o SRAA, o sistema nervoso simpático, as concentrações do fator-1 de crescimento insulina-símile (IGF-1) e efeitos na rigidez arterial. O estrogênio oral aumenta a produção hepática de angiotensinogênio (302), com simultâneo aumento dos níveis plasmáticos de angiotensina II, o que poderia justificar um aumento da pressão arterial, apesar de não exercer alterações nos níveis de renina plasmática ou da atividade da enzima conversora de angiotensina (302;303). O estrogênio transdérmico não interfere na produção hepática de angiotensinogênio (302) e não altera os níveis circulantes de renina ou aldosterona (294;304). Porém, em mulheres na pós-menopausa submetidas a uma sobrecarga oral de sal, o estradiol transdérmico atenuou o aumento da pressão arterial, sugerindo um possível efeito protetor (305). Em mulheres saudáveis na pós-menopausa a administração de estrogênio transdérmico diminuiu a atividade do sistema nervoso simpático, um estímulo neural para a liberação de noradrenalina (300;306;307), com isso, diminuindo os níveis plasmáticos de catecolaminas em repouso (308) ou em resposta ao estresse mental (309), enquanto o estrógeno oral não desempenhou efeito significativo (300;306;307). A redução da atividade simpática com o estrogênio transdérmico foi associada com uma redução significativa na pressão arterial, evidente apenas com o uso crônico da medicação e não com a administração aguda, o que sugere um mecanismo genômico para essa ação (300). O

estrogênio oral diminui a síntese hepática de IGF-1 (310), enquanto o transdérmico não exerce essa influência (311). A administração de IGF-1 diminui a atividade simpática e a PA em ratos (312), assim como a deficiência deste fator de crescimento está associada com hiperatividade simpática e elevação da PA em humanos (313). Outro mecanismo que poderia explicar a redução da PAS é a demonstração de que a administração do estrogênio diminuiu a rigidez arterial observada através de redução na velocidade de onda de pulso aórtica (293) e exerceu um aumento da complacência arterial carotídea avaliada por ressonância magnética (314). Um estudo indicou que o estrogênio transdérmico foi mais eficaz do que o oral para reduzir índices de rigidez aórtica (315), embora existam controvérsias (316). Apesar de não ser o objetivo deste trabalho o estudo dos mecanismos que geraram os efeitos benéficos observados nos níveis pressóricos, acreditamos que a redução desses se deu pelo efeito vasodilatador do estrogênio com conseqüente diminuição da resistência vascular periférica, demonstrados pela POV, associado a uma provável melhora da complacência arterial e/ou diminuição da atividade simpática.

A viscosidade do sangue é um fator preditor de doenças cardiovasculares, como HAS e AVE (317). Diversas variáveis podem exercer influência sobre a viscosidade sanguínea, incluindo o hematócrito, a agregação dos eritrócitos e ainda a viscosidade plasmática (317-321). Um dos principais determinantes da viscosidade plasmática são os níveis de fibrinogênio (322). Enquanto a visão tradicional postula que um aumento da viscosidade do sangue tem sempre um impacto negativo sobre a perfusão tecidual (323), uma hipótese mais recente sugere que um pequeno aumento da viscosidade teria efeitos benéficos por aumentar a tensão de cisalhamento sobre o endotélio e com isso estimular a produção de substâncias vasodilatadoras derivadas do endotélio, com conseqüente melhora da perfusão tecidual (324-326). Nossos resultados demonstraram redução da viscosidade plasmática e da viscosidade sanguínea com hematócrito nativo no grupo ET comparado ao basal. No entanto, quando a viscosidade sanguínea é corrigida pelo valor do hematócrito esta redução perde a significância ($P=0,07$). A viscosidade relativa, obtida a partir da subtração da viscosidade sanguínea corrigida pelo hematócrito pela viscosidade plasmática, com a finalidade de avaliar principalmente as propriedades mecânicas dos eritrócitos, como sua deformabilidade, também não demonstrou diferenças entre os grupos. Estes dados sugerem que a redução da viscosidade observada em nosso estudo ocorreu principalmente por alteração de algum componente plasmático. Alguns estudos demonstraram redução da viscosidade plasmática em

mulheres na pós-menopausa após administração da THM (327), tanto com o uso do estradiol oral isolado (185) quanto com o transdérmico associado à MPA (186;328;329). A redução da viscosidade foi correlacionada com a redução dos níveis de fibrinogênio (185;327), efeito já bem demonstrado em mulheres que fazem a THM (40;330;331), inclusive com o estrogênio transdérmico (332;333). Embora não tenhamos observado correlações das viscosidades sanguínea e plasmática com as variáveis microvasculares em nossos resultados, podemos notar uma correlação positiva com os níveis solúveis de ICAM, sugerindo que a diminuição da viscosidade sanguínea ou plasmática após o uso do estrogênio estaria relacionada a uma menor ativação endotelial, e talvez, desta maneira justificando a redução nos níveis de fibrinogênio encontrado por alguns estudos (332;333).

A disfunção microvascular está presente na obesidade, na HAS e em estados de resistência à insulina. As anormalidades microvasculares encontradas nestas patologias ocasionam uma piora da perfusão tecidual, condição esta sistêmica, que afeta múltiplos tecidos e órgãos (334-336), estando envolvida com lesões e complicações em vários leitos vasculares, como retinopatia, acidente vascular cerebral lacunar, microalbuminúria e insuficiência cardíaca (334). A disfunção microvascular é um indicador prognóstico e aumenta a incidência de eventos cardiovasculares (68;69) . O ERF está inversamente correlacionado com o recrutamento capilar da pele (73), densidade cutânea capilar máxima (337) e reserva do fluxo coronário (338). Uma nova hipótese sugere que as alterações microvasculares presentes na obesidade não seriam apenas consequência desta, mas estariam envolvidas na gênese de suas complicações como a HAS e a resistência insulínica (339;340).

Durante muitos anos a rarefação microvascular foi reconhecida como uma alteração secundária à elevação sustentada da pressão sanguínea (334), porém, atualmente há evidências de que as alterações na microcirculação precedem o aumento na pressão arterial e portanto, pode ser um componente causal. Estudos prospectivos, com base populacional, demonstram que um menor diâmetro arteriolar da retina em indivíduos normotensos de meia-idade foi capaz de predizer o desenvolvimento de HAS (341;342). Em modelos matemáticos baseados na microcirculação, foi observado uma relação exponencial entre o número de capilares e arteríolas com a resistência vascular (343). Uma rarefação superior a 42% (dentro da faixa observada em humanos hipertensos) pode aumentar a resistência vascular tecidual em 21% (344). Assim, parece provável que as anormalidades microvasculares na obesidade podem tanto causar quanto contribuir para o desenvolvimento da HAS (345).

No endotélio de indivíduos saudáveis, a insulina em concentrações fisiológicas atua como um vasodilatador por estimular a produção endotelial de NO, além de ativar a via da PI3K e regular a produção da NO insulino-dependente (346). Conseqüentemente, além de sua ação metabólica, a insulina apresenta ação hemodinâmica. Na microcirculação do tecido muscular, este estímulo à vasodilatação em arteríolas pré-capilares, por redução do tônus arteriolar pré-capilar e/ou alteração da vasomotricidade arteriolar, determina um aumento no recrutamento capilar. Tal fato resulta em uma maior área de perfusão tecidual e pode promover a liberação da própria insulina e de seu substrato aos tecidos insulino-sensíveis em maior quantidade. A ação hemodinâmica da insulina determina um aumento do fluxo sanguíneo total (347) e paralelamente ocorre aumento na captação de glicose insulino-mediada (348;349). Foi demonstrado que esse aumento na captação de glicose precede o aumento do fluxo sanguíneo total. Isto sugere que a atuação da insulina no recrutamento capilar funcional precede o aumento de fluxo sanguíneo total e direciona o fluxo microvascular de sítios não-nutritivos para nutritivos, com subsequente aumento de superfície tissular de troca, ocasionando uma maior captação de glicose em tecidos sensíveis (350;351). No entanto, em estados de resistência insulínica, a sinalização insulínica endotelial encontra-se alterada. A insulina passa a ativar predominantemente outra via de sinalização, a da MAPK, que aumenta a produção de ET-1 por intermédio de ERK1/2 (352). Assim, em estados de resistência insulínica, tanto o recrutamento capilar durante a hiperemia reativa quanto a vasomotricidade microvascular dos tecidos muscular e cutâneo encontram-se comprometidos (353;354). Um estudo muito interessante demonstrou que a piora da sinalização insulínica nas células endoteliais, devido à redução na expressão dos substratos do receptor da insulina 2 (IRS2) e fosforilação da eNOS insulino-mediada, causou atenuação do recrutamento capilar e conseqüentemente reduziu a captação de glicose pelo músculo esquelético. A restauração da fosforilação da eNOS insulino-mediada reverteu completamente a redução do recrutamento capilar e a captação de glicose pelo músculo esquelético em ratos com *knockout* do IRS2 (355). Desta maneira, a “resistência insulínica microvascular” pode contribuir para uma redução na captação total de glicose em tecidos insulino-sensíveis (355). Recentemente, uma metanálise realizada por Muris e colaboradores demonstra a capacidade preditora para o DM2 de populações com disfunção microvascular, analisadas através de quatro metodologias distintas (356), e corrobora achados descritos acima.

Em nosso estudo, os níveis de estradiol apresentaram correlações com as variáveis microvasculares em estado de repouso e realizando as correlações apenas com as participantes do grupo ET, os níveis de estradiol também se correlacionaram com a RV periférica durante a hiperemia reativa, um dado que fortalece os efeitos positivos do estrogênio sobre a microcirculação. Avaliando todas as participantes, houve correlação negativa dos níveis de estradiol com os níveis solúveis de ICAM-1, justificando um provável efeito antiinflamatório. Além disso, os níveis de estradiol também se correlacionaram negativamente com a PAD e HOMA-IR, sugerindo um efeito protetor cardiometabólico importante do estrogênio. Podemos observar que o fluxo microvascular muscular correlacionou-se positivamente com o ISI Belfiore e negativamente com os níveis pressóricos e o HOMA-IR, reforçando a hipótese de que a função microvascular, a pressão arterial e a sensibilidade insulínica estão integradas. Nesse sentido, também observamos que a PAS e a PAD apresentaram correlação negativa com o ISI Belfiore. O aumento do fluxo sanguíneo microvascular causado pelo estradiol transdérmico não significa necessariamente que houve um aumento do recrutamento capilar (357;358), porém como houve diversas correlações entre as variáveis microvasculares e metabólicas sugere-se que o estradiol pode ter promovido aumento no recrutamento capilar, seja através de uma melhora na sensibilidade insulínica e/ou pela diminuição da RV periférica. Essa afirmação pode ser validada com dados previamente publicados em sujeitos saudáveis submetidos a um estímulo da fase cefálica da digestão utilizando como sítio de estudo o tecido cutâneo, onde observou-se aumento do recrutamento capilar concomitantemente com o incremento do fluxo microvascular e redução do tempo de reperfusão microvascular (359). Com base nessa afirmação deveríamos observar uma associação entre a sensibilidade insulínica e a função microvascular no grupo ET, entretanto este grupo não manteve as correlações do HOMA-IR e do ISI Belfiore com as variáveis microvasculares.

Devemos ressaltar que os níveis de estradiol correlacionaram-se positivamente com os níveis de SHBG e avaliando apenas as correlações no grupo ET, os níveis de estradiol também se correlacionaram negativamente com os de testosterona livre ($\rho = -0,57$). É descrito que um baixo nível de SHBG é um fator de risco independente para o desenvolvimento de DM2 (360;361) e mulheres na pós-menopausa com DM2 parecem ser relativamente hiperandrogênicas em comparação a mulheres saudáveis da mesma idade e IMC (362). Observa-se também que mulheres com síndrome dos ovários policísticos,

caracterizadas por um hiperandrogenismo, apresentam maior risco para o desenvolvimento de DM2 (363). Desta maneira, postula-se que a resistência insulínica poderia ser uma consequência dos efeitos androgênicos (364). O uso de androgênios em mulheres transexuais (365) e em pacientes com anemia aplásica (366) pode desencadear resistência insulínica e ser parcialmente revertida com a administração de estrogênio (137). No entanto, em nossa população os níveis de SHBG e testosterona livre não se correlacionaram com as variáveis do metabolismo glicêmico.

Um dado interessante do nosso estudo é que mesmo com o uso do placebo as mulheres apresentaram uma redução significativa dos sintomas da menopausa testadas pelo IMKB. Acreditamos que o efeito placebo associado ao acompanhamento frequente das participantes, realizado por contato telefônico semanal e consultas mensais, pode ter contribuído para este resultado.

Como limitações do estudo podemos citar o uso de antihipertensivos pelas participantes, onde alguns exercem efeitos sobre a função endotelial, o que pode ter influenciado nossos resultados, porém, além da randomização, tentamos contornar esta situação não alterando as medicações durante o período de avaliação e selecionando participantes que estavam no mínimo a três meses com o mesmo esquema antihipertensivo. Deve ser enfatizado que nossa população, devido suas características, apresenta alta prevalência de HAS, assim, é coerente que as mulheres hipertensas participassem do estudo. Os métodos utilizados para avaliação da sensibilidade insulínica estão sujeitos a críticas por conta de sua sensibilidade e especificidade para a mensuração da sensibilidade insulínica e não nos permite uma compreensão precisa dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos, no entanto, a redução do HOMA-IR e dos níveis de insulina durante o TOTG, sugerem um efeito benéfico no metabolismo dos carboidratos. Os exames microvasculares e bioquímicos não foram realizados no mesmo dia, o que pode ter exercido influência nas correlações das variáveis, uma vez que não foram obtidos no mesmo momento. No entanto, as condições para a realização de todos os exames foram as mais semelhantes possíveis. Os exames microvasculares levavam em média 3,5 horas para sua execução e a participante permanecia em jejum durante todo este período, o que tornava impossível a submissão da paciente a uma prova de sobrecarga glicêmica no mesmo dia. Devido à alta prevalência do número de sangramentos vaginais ou aumento da espessura endometrial com o uso isolado por três meses do estradiol transdérmico na população estudada, não podemos afirmar que os

benefícios endoteliais e em outros fatores de risco cardiovascular alcançados possam suplantam os riscos da hiperplasia endometrial em mulheres com útero intacto.

Em conclusão, nosso estudo demonstrou que mulheres não diabéticas com excesso de peso, menopausa recente e sem evento cardiovascular prévio, apresentaram respostas benéficas sobre alguns fatores de risco cardiovascular com o uso transdérmico do estradiol, demonstrados pela melhora da função endotelial e redução dos níveis pressóricos. Também observamos melhora em índices utilizados para avaliar a sensibilidade insulínica, sugerindo um possível efeito benéfico sobre o metabolismo glicêmico e ainda uma redução da viscosidade plasmática que pode ter exercido um efeito adicional positivo na função endotelial. Estes dados são muito relevantes, uma vez que há um progressivo envelhecimento e incremento na prevalência da obesidade populacional, com consequente aumento no percentual de mulheres com excesso de peso na menopausa. As mulheres com sobrepeso referem uma maior frequência de sintomas menopáusicos (367), assim uma grande parte delas poderá ter indicação clínica para o uso da THM. É importante para este grupo de mulheres, que apresentam um maior número de eventos cardiovasculares, a escolha de uma medicação segura, que além de oferecer alívio dos sintomas menopáusicos possa também oferecer benefícios cardiometabólicos e redução de risco cardiovascular.

RESUMO DOS ACHADOS

Com este estudo foi possível observar que mulheres com excesso de peso e menopausa recente apresentaram após o uso de curto prazo de estradiol transdérmico:

- Melhora da reatividade microvascular e da função endotelial;
- Melhora nos índices utilizados para aferir a sensibilidade insulínica;
- Redução da viscosidade plasmática;

Além disso, nestas pacientes observamos ainda:

- Uma correlação positiva entre a função microvascular e alguns índices da sensibilidade insulínica;
- Ausência de correlação entre função microvascular e a viscosidade sanguínea e plasmática.

CONCLUSÃO

Em mulheres não diabéticas com excesso de peso, menopausa recente e sem evento cardiovascular prévio, o uso por curto prazo de estradiol transdérmico demonstrou efeitos benéficos na função endotelial, no metabolismo glicêmico e ainda redução da viscosidade plasmática.

REFERÊNCIAS

- (1) Uchoa E. [An anthropological approach to senior citizens' health issues]. *Cad Saude Publica* 2003 May;19(3):849-53.
- (2) IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Diretoria de Pesquisas (DPE), Coordenação de População e Indicadores Sociais (COPIS). 2012.
- (3) Pedro AO, Pinto-Neto AM, Costa-Paiva L, Osis MJ, Hardy E. [Climacteric women seeking medical care, Brazil]. *Rev Saude Publica* 2002 Aug;36(4):484-90.
- (4) Manson JE, Bassuk SS. Obesity in the United States: a fresh look at its high toll. *JAMA* 2003 Jan 8;289(2):229-30.
- (5) Sturm R, Wells KB. Does obesity contribute as much to morbidity as poverty or smoking? *Public Health* 2001 May;115(3):229-35.
- (6) IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009. Antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil. 2010.
- (7) Schenck-Gustafsson K. Risk factors for cardiovascular disease in women. *Maturitas* 2009 Jul 20;63(3):186-90.
- (8) Page JH, Rexrode KM, Hu F, Albert CM, Chae CU, Manson JE. Waist-height ratio as a predictor of coronary heart disease among women. *Epidemiology* 2009 May;20(3):361-6.
- (9) Secretaria de Vigilância em Saúde. Mortalidade do adulto no Brasil: taxas de mortalidade segundo o sexo, as causas e as regiões. 2010.
- (10) Barrett-Connor E, Grady D. Hormone replacement therapy, heart disease, and other considerations. *Annu Rev Public Health* 1998;19:55-72.
- (11) Rossouw JE, Prentice RL, Manson JE, Wu L, Barad D, Barnabei VM, et al. Postmenopausal hormone therapy and risk of cardiovascular disease by age and years since menopause. *JAMA* 2007 Apr 4;297(13):1465-77.
- (12) Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B, 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* 1998 Aug 19;280(7):605-13.
- (13) Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, Lacroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal

- women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2002 Jul 17;288(3):321-33.
- (14) Dennerstein L, Lehert P, Guthrie J. The effects of the menopausal transition and biopsychosocial factors on well-being. *Arch Womens Ment Health* 2002 Aug;5(1):15-22.
 - (15) De Lorenzi DRS, anelon C, aciloto B, adilha Jr I. Fatores indicadores da sintomatologia climatérica. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2005;27(1):12-9.
 - (16) Colditz GA, Willett WC, Stampfer MJ, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH. Menopause and the risk of coronary heart disease in women. *N Engl J Med* 1987 Apr 30;316(18):1105-10.
 - (17) Binfá L, Blümel M. Obesidad, estrógenos y salud de la mujer. *Rev Chil Obstet Ginecol* 2001;66(4):340-6.
 - (18) Gambacciani M, Ciaponi M, Cappagli B, Benussi C, De SL, Genazzani AR. Climacteric modifications in body weight and fat tissue distribution. *Climacteric* 1999 Mar;2(1):37-44.
 - (19) Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, Lacroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2002 Jul 17;288(3):321-33.
 - (20) de AD, Gambacciani M, Meschia M, Pansini F, Bacchi MA, Bolis PF, et al. The effect of menopause on blood lipid and lipoprotein levels. The Icarus Study Group. *Atherosclerosis* 1999 Nov 1;147(1):147-53.
 - (21) Assmann G, Schulte H. The importance of triglycerides: results from the Prospective Cardiovascular Munster (PROCAM) Study. *Eur J Epidemiol* 1992 May;8 Suppl 1:99-103.
 - (22) Salpeter SR, Walsh JM, Ormiston TM, Greyber E, Buckley NS, Salpeter EE. Meta-analysis: effect of hormone-replacement therapy on components of the metabolic syndrome in postmenopausal women. *Diabetes Obes Metab* 2006 Sep;8(5):538-54.
 - (23) Staessen JA, Celis H, Fagard R. The epidemiology of the association between hypertension and menopause. *J Hum Hypertens* 1998 Sep;12(9):587-92.
 - (24) Reckelhoff JF. Gender differences in the regulation of blood pressure. *Hypertension* 2001 May;37(5):1199-208.
 - (25) Gebara OC, Mittleman MA, Sutherland P, Lipinska I, Matheney T, Xu P, et al. Association between increased estrogen status and increased fibrinolytic potential in the Framingham Offspring Study. *Circulation* 1995 Apr 1;91(7):1952-8.

- (26) Clapauch R, Mecenas AS, Maranhao PA, Bouskela E. Microcirculatory function in postmenopausal women: role of aging, hormonal exposure and metabolic syndrome. *Microvasc Res* 2009 Dec;78(3):405-12.
- (27) Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Mattei P, Sudano I, Bernini G, et al. Menopause is associated with endothelial dysfunction in women. *Hypertension* 1996 Oct;28(4):576-82.
- (28) Jensen-Urstad K, Johansson J. Gender difference in age-related changes in vascular function. *J Intern Med* 2001 Jul;250(1):29-36.
- (29) Bassan R. Cardiovascular changes and cardiac morbidity of menopause. Effects of hormone replacement therapy. *Arq Bras Cardiol* 1999 Jan;72(1):85-98.
- (30) De Lorenzi DR, Baracat EC, Saciloto B, Padilha I, Jr. [Factors related to quality of life in post-menopause]. *Rev Assoc Med Bras* 2006 Sep;52(5):312-7.
- (31) Barret-Connor E. Hormone Replacement. *Am J Geriatr Cardiol* 1993 Oct;2(5):36-7.
- (32) Smith DC, Prentice R, Thompson DJ, Herrmann WL. Association of exogenous estrogen and endometrial carcinoma. *N Engl J Med* 1975 Dec 4;293(23):1164-7.
- (33) Ziel HK, Finkle WD. Increased risk of endometrial carcinoma among users of conjugated estrogens. *N Engl J Med* 1975 Dec 4;293(23):1167-70.
- (34) Whitehead MI, Townsend PT, Pryse-Davies J, Ryder T, Lane G, Siddle NC, et al. Effects of various types and dosages of progestogens on the postmenopausal endometrium. *J Reprod Med* 1982 Aug;27(8 Suppl):539-48.
- (35) Khaw KT. Hormone replacement therapy again. Risk-benefit relation differs between populations and individuals. *BMJ* 1998 Jun 20;316(7148):1842-4.
- (36) Grodstein F, Stampfer MJ, Manson JE, Colditz GA, Willett WC, Rosner B, et al. Postmenopausal estrogen and progestin use and the risk of cardiovascular disease. *N Engl J Med* 1996 Aug 15;335(7):453-61.
- (37) Gruchow HW, Anderson AJ, Barboriak JJ, Sobocinski KA. Postmenopausal use of estrogen and occlusion of coronary arteries. *Am Heart J* 1988 May;115(5):954-63.
- (38) Grodstein F, Stampfer M. The epidemiology of coronary heart disease and estrogen replacement in postmenopausal women. *Prog Cardiovasc Dis* 1995 Nov;38(3):199-210.
- (39) Ettinger B. Overview of estrogen replacement therapy: a historical perspective. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998 Jan;217(1):2-5.
- (40) Effects of estrogen or estrogen/progestin regimens on heart disease risk factors in postmenopausal women. The Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Trial. The Writing Group for the PEPI Trial. *JAMA* 1995 Jan 18;273(3):199-208.

- (41) Grady D, Herrington D, Bittner V, Blumenthal R, Davidson M, Hlatky M, et al. Cardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II). *JAMA* 2002 Jul 3;288(1):49-57.
- (42) Wassertheil-Smoller S, Hendrix SL, Limacher M, Heiss G, Kooperberg C, Baird A, et al. Effect of estrogen plus progestin on stroke in postmenopausal women: the Women's Health Initiative: a randomized trial. *JAMA* 2003 May 28;289(20):2673-84.
- (43) Anderson GL, Limacher M, Assaf AR, Bassford T, Beresford SA, Black H, et al. Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2004 Apr 14;291(14):1701-12.
- (44) Simon JA, Hsia J, Cauley JA, Richards C, Harris F, Fong J, et al. Postmenopausal hormone therapy and risk of stroke: The Heart and Estrogen-progestin Replacement Study (HERS). *Circulation* 2001 Feb 6;103(5):638-42.
- (45) Kernan WN, Brass LM, Viscoli CM, Sarrel PM, Makuch R, Horwitz RI. Estrogen after ischemic stroke: clinical basis and design of the Women's Estrogen for Stroke Trial. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 1998 Jan;7(1):85-95.
- (46) Renoux C, Dell'aniello S, Garbe E, Suissa S. Transdermal and oral hormone replacement therapy and the risk of stroke: a nested case-control study. *BMJ* 2010;340:c2519.
- (47) Miller J, Chan BK, Nelson HD. Postmenopausal estrogen replacement and risk for venous thromboembolism: a systematic review and meta-analysis for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 2002 May 7;136(9):680-90.
- (48) Rosendaal FR, Helmerhorst FM, Vandenbroucke JP. Female hormones and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002 Feb 1;22(2):201-10.
- (49) Canonico M, Oger E, Plu-Bureau, Conard J, Meyer G, Levesque H, et al. Hormone therapy and venous thromboembolism among postmenopausal women: impact of the route of estrogen administration and progestogens: the ESTHER study. *Circulation* 2007 Feb 20;115(7):840-5.
- (50) Renoux C, Dell'aniello S, Suissa S. Hormone replacement therapy and the risk of venous thromboembolism: a population-based study. *J Thromb Haemost* 2010 May;8(5):979-86.
- (51) Grodstein F, Manson JE, Colditz GA, Willett WC, Speizer FE, Stampfer MJ. A prospective, observational study of postmenopausal hormone therapy and primary prevention of cardiovascular disease. *Ann Intern Med* 2000 Dec 19;133(12):933-41.
- (52) Grodstein F, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Manson JE, Joffe M, et al. Postmenopausal hormone therapy and mortality. *N Engl J Med* 1997 Jun 19;336(25):1769-75.

- (53) Rosano GM, Vitale C, Fini M. Cardiovascular aspects of menopausal hormone replacement therapy. *Climacteric* 2009;12 Suppl 1:41-6.
- (54) Hodis HN. Assessing benefits and risks of hormone therapy in 2008: new evidence, especially with regard to the heart. *Cleve Clin J Med* 2008 May;75 Suppl 4:S3-12.
- (55) Haines CJ, Farrell E. Menopause management: a cardiovascular risk-based approach. *Climacteric* 2010 Aug;13(4):328-39.
- (56) Harman SM, Vittinghoff E, Brinton EA, Budoff MJ, Cedars MI, Lobo RA, et al. Timing and duration of menopausal hormone treatment may affect cardiovascular outcomes. *Am J Med* 2011 Mar;124(3):199-205.
- (57) Manson JE, Allison MA, Rossouw JE, Carr JJ, Langer RD, Hsia J, et al. Estrogen therapy and coronary-artery calcification. *N Engl J Med* 2007 Jun 21;356(25):2591-602.
- (58) Rivera CM, Grossardt BR, Rhodes DJ, Brown RD, Jr., Roger VL, Melton LJ, III, et al. Increased cardiovascular mortality after early bilateral oophorectomy. *Menopause* 2009 Jan;16(1):15-23.
- (59) Miller VM, Black DM, Brinton EA, Budoff MJ, Cedars MI, Hodis HN, et al. Using basic science to design a clinical trial: baseline characteristics of women enrolled in the Kronos Early Estrogen Prevention Study (KEEPS). *J Cardiovasc Transl Res* 2009 Sep;2(3):228-39.
- (60) Smiley DA, Khalil RA. Estrogenic compounds, estrogen receptors and vascular cell signaling in the aging blood vessels. *Curr Med Chem* 2009;16(15):1863-87.
- (61) Kalinowski L, Malinski T. Endothelial NADH/NADPH-dependent enzymatic sources of superoxide production: relationship to endothelial dysfunction. *Acta Biochim Pol* 2004;51(2):459-69.
- (62) Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Sudano I, Salvetti A. Effects of antihypertensive drugs on endothelial dysfunction: clinical implications. *Drugs* 2002;62(2):265-84.
- (63) Vogel RA. Cholesterol lowering and endothelial function. *Am J Med* 1999 Nov;107(5):479-87.
- (64) Williams SB, Goldfine AB, Timimi FK, Ting HH, Roddy MA, Simonson DC, et al. Acute hyperglycemia attenuates endothelium-dependent vasodilation in humans in vivo. *Circulation* 1998 May 5;97(17):1695-701.
- (65) Kraemer-Aguiar LG, Laflor CM, Bouskela E. Skin microcirculatory dysfunction is already present in normoglycemic subjects with metabolic syndrome. *Metabolism* 2008 Dec;57(12):1740-6.
- (66) Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999 Jan 14;340(2):115-26.

- (67) Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF, Jr., Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003 Oct 1;42(7):1149-60.
- (68) Fichtlscherer S, Breuer S, Zeiher AM. Prognostic value of systemic endothelial dysfunction in patients with acute coronary syndromes: further evidence for the existence of the "vulnerable" patient. *Circulation* 2004 Oct 5;110(14):1926-32.
- (69) Anderson TJ, Charbonneau F, Title LM, Buithieu J, Rose MS, Conradson H, et al. Microvascular function predicts cardiovascular events in primary prevention: long-term results from the Firefighters and Their Endothelium (FATE) study. *Circulation* 2011 Jan 18;123(2):163-9.
- (70) Maturana MA, Irigoyen MC, Spritzer PM. Menopause, estrogens, and endothelial dysfunction: current concepts. *Clinics (Sao Paulo)* 2007 Feb;62(1):77-86.
- (71) Jonk AM, Houben AJ, de Jongh RT, Serne EH, Schaper NC, Stehouwer CD. Microvascular dysfunction in obesity: a potential mechanism in the pathogenesis of obesity-associated insulin resistance and hypertension. *Physiology (Bethesda)* 2007 Aug;22:252-60.
- (72) Struijker Boudier HA, le Noble JL, Messing MW, Huijberts MS, le Noble FA, van EH. The microcirculation and hypertension. *J Hypertens Suppl* 1992 Dec;10(7):S147-S156.
- (73) Ijzerman RG, de Jongh RT, Beijk MA, van Weissenbruch MM, Delemarre-van de Waal HA, Serne EH, et al. Individuals at increased coronary heart disease risk are characterized by an impaired microvascular function in skin. *Eur J Clin Invest* 2003 Jul;33(7):536-42.
- (74) Panazzolo DG, Sicuro FL, Clapauch R, Maranhao PA, Bouskela E, Kraemer-Aguiar LG. Obesity, metabolic syndrome, impaired fasting glucose, and microvascular dysfunction: a principal component analysis approach. *BMC Cardiovasc Disord* 2012;12:102.
- (75) Mendelsohn ME. Genomic and nongenomic effects of estrogen in the vasculature. *Am J Cardiol* 2002 Jul 3;90(1A):3F-6F.
- (76) Simoncini T, Mannella P, Fornari L, Varone G, Caruso A, Genazzani AR. Dehydroepiandrosterone modulates endothelial nitric oxide synthesis via direct genomic and nongenomic mechanisms. *Endocrinology* 2003 Aug;144(8):3449-55.
- (77) Fu XD, Simoncini T. Extra-nuclear signaling of estrogen receptors. *IUBMB Life* 2008 Aug;60(8):502-10.
- (78) Mendelsohn ME, Karas RH. Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences. *Science* 2005 Jun 10;308(5728):1583-7.
- (79) Villar IC, Hobbs AJ, Ahluwalia A. Sex differences in vascular function: implication of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *J Endocrinol* 2008 Jun;197(3):447-62.

- (80) Pearson LJ, Yandle TG, Nicholls MG, Evans JJ. Regulation of endothelin-1 release from human endothelial cells by sex steroids and angiotensin-II. *Peptides* 2008 Jun;29(6):1057-61.
- (81) Orshal JM, Khalil RA. Gender, sex hormones, and vascular tone. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004 Feb;286(2):R233-R249.
- (82) Cid MC, Schnaper HW, Kleinman HK. Estrogens and the vascular endothelium. *Ann N Y Acad Sci* 2002 Jun;966:143-57.
- (83) Barbacanne MA, Rami J, Michel JB, Souchard JP, Philippe M, Besombes JP, et al. Estradiol increases rat aorta endothelium-derived relaxing factor (EDRF) activity without changes in endothelial NO synthase gene expression: possible role of decreased endothelium-derived superoxide anion production. *Cardiovasc Res* 1999 Mar;41(3):672-81.
- (84) Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005 Jan;25(1):29-38.
- (85) Masood DE, Roach EC, Beauregard KG, Khalil RA. Impact of sex hormone metabolism on the vascular effects of menopausal hormone therapy in cardiovascular disease. *Curr Drug Metab* 2010 Oct;11(8):693-714.
- (86) Wakatsuki A, Okatani Y, Ikenoue N, Fukaya T. Effect of medroxyprogesterone acetate on endothelium-dependent vasodilation in postmenopausal women receiving estrogen. *Circulation* 2001 Oct 9;104(15):1773-8.
- (87) Wakatsuki A, Ikenoue N, Shinohara K, Watanabe K, Fukaya T. Effect of lower dosage of oral conjugated equine estrogen on inflammatory markers and endothelial function in healthy postmenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004 Mar;24(3):571-6.
- (88) Sumino H, Ichikawa S, Ohyama Y, Takahashi T, Saito Y, Nakamura T, et al. Effect of transdermal hormone replacement therapy on the monocyte chemoattractant protein-1 concentrations and other vascular inflammatory markers and on endothelial function in postmenopausal women. *Am J Cardiol* 2005 Jul 1;96(1):148-53.
- (89) Gerhard M, Walsh BW, Tawakol A, Haley EA, Creager SJ, Seely EW, et al. Estradiol therapy combined with progesterone and endothelium-dependent vasodilation in postmenopausal women. *Circulation* 1998 Sep 22;98(12):1158-63.
- (90) Bechlioulis A, Naka KK, Papanikolaou O, Kontostolis E, Kalantaridou SN, Michalis LK. Menopause and hormone therapy: from vascular endothelial function to cardiovascular disease. *Hellenic J Cardiol* 2009 Jul;50(4):303-15.
- (91) Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol* 2002 Jan 16;39(2):257-65.

- (92) Lim SC, Caballero AE, Arora S, Smakowski P, Bashoff EM, Brown FM, et al. The effect of hormonal replacement therapy on the vascular reactivity and endothelial function of healthy individuals and individuals with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 1999 Nov;84(11):4159-64.
- (93) Campisi R, Nathan L, Pampaloni MH, Schoder H, Sayre JW, Chaudhuri G, et al. Noninvasive assessment of coronary microcirculatory function in postmenopausal women and effects of short-term and long-term estrogen administration. *Circulation* 2002 Jan 29;105(4):425-30.
- (94) Schindler TH, Campisi R, Dorsey D, Prior JO, Olschewski M, Sayre J, et al. Effect of hormone replacement therapy on vasomotor function of the coronary microcirculation in post-menopausal women with medically treated cardiovascular risk factors. *Eur Heart J* 2009 Apr;30(8):978-86.
- (95) Haenggi W, Linder HR, Birkhaeuser MH, Schneider H. Microscopic findings of the nail-fold capillaries--dependence on menopausal status and hormone replacement therapy. *Maturitas* 1995 Jun;22(1):37-46.
- (96) Sanada M, Higashi Y, Nakagawa K, Tsuda M, Kodama I, Kimura M, et al. A comparison of low-dose and standard-dose oral estrogen on forearm endothelial function in early postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2003 Mar;88(3):1303-9.
- (97) Gooding KM, MacLeod KM, Spyer G, Ewings P, Tooke JE, Shore AC. Impact of hormone replacement therapy on microvascular function in healthy and Type 2 diabetic postmenopausal women. *Diabet Med* 2005 May;22(5):536-42.
- (98) Vehkavaara S, Hakala-Ala-Pietila T, Virkamaki A, Bergholm R, Ehnholm C, Hovatta O, et al. Differential effects of oral and transdermal estrogen replacement therapy on endothelial function in postmenopausal women. *Circulation* 2000 Nov 28;102(22):2687-93.
- (99) Peterson LR, Eyster D, Davila-Roman VG, Stephens AL, Schechtman KB, Herrero P, et al. Short-term oral estrogen replacement therapy does not augment endothelium-independent myocardial perfusion in postmenopausal women. *Am Heart J* 2001 Oct;142(4):641-7.
- (100) Higashi Y, Sanada M, Sasaki S, Nakagawa K, Goto C, Matsuura H, et al. Effect of estrogen replacement therapy on endothelial function in peripheral resistance arteries in normotensive and hypertensive postmenopausal women. *Hypertension* 2001 Feb;37(2 Pt 2):651-7.
- (101) Chabbert-Bufferet N, Bonnin P, Levy B, Abdoucheli-Baudot N, Tribout L, Gaitz JP, et al. Cutaneous microvascular effects of mid-term hormone replacement therapy in healthy postmenopausal women: a prospective placebo controlled trial. *J Mal Vasc* 2003 Oct;28(4):190-3.

- (102) Duvernoy C, Martin J, Briesmiester K, Bargardi A, Muzik O, Mosca L. Myocardial blood flow and flow reserve in response to hormone therapy in postmenopausal women with risk factors for coronary disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2004 Jun;89(6):2783-8.
- (103) Knuuti J, Kalliokoski R, Janatuinen T, Hannukainen J, Kalliokoski KK, Koskenvuo J, et al. Effect of estradiol-drospirenone hormone treatment on myocardial perfusion reserve in postmenopausal women with angina pectoris. *Am J Cardiol* 2007 Jun 15;99(12):1648-52.
- (104) Macotela Y, Boucher J, Tran TT, Kahn CR. Sex and depot differences in adipocyte insulin sensitivity and glucose metabolism. *Diabetes* 2009 Apr;58(4):803-12.
- (105) D'Eon TM, Souza SC, Aronovitz M, Obin MS, Fried SK, Greenberg AS. Estrogen regulation of adiposity and fuel partitioning. Evidence of genomic and non-genomic regulation of lipogenic and oxidative pathways. *J Biol Chem* 2005 Oct 28;280(43):35983-91.
- (106) Heine PA, Taylor JA, Iwamoto GA, Lubahn DB, Cooke PS. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 Nov 7;97(23):12729-34.
- (107) Iverius PH, Brunzell JD. Relationship between lipoprotein lipase activity and plasma sex steroid level in obese women. *J Clin Invest* 1988 Sep;82(3):1106-12.
- (108) Foryst-Ludwig A, Clemenz M, Hohmann S, Hartge M, Sprang C, Frost N, et al. Metabolic actions of estrogen receptor beta (ERbeta) are mediated by a negative cross-talk with PPARgamma. *PLoS Genet* 2008 Jun;4(6):e1000108.
- (109) Thorneycroft IH, Lindsay R, Pickar JH. Body composition during treatment with conjugated estrogens with and without medroxyprogesterone acetate: analysis of the women's Health, Osteoporosis, Progestin, Estrogen (HOPE) trial. *Am J Obstet Gynecol* 2007 Aug;197(2):137.
- (110) Espeland MA, Stefanick ML, Kritz-Silverstein D, Fineberg SE, Waclawiw MA, James MK, et al. Effect of postmenopausal hormone therapy on body weight and waist and hip girths. Postmenopausal Estrogen-Progestin Interventions Study Investigators. *J Clin Endocrinol Metab* 1997 May;82(5):1549-56.
- (111) Gambacciani M, Ciaponi M, Cappagli B, De SL, Orlandi R, Genazzani AR. Prospective evaluation of body weight and body fat distribution in early postmenopausal women with and without hormonal replacement therapy. *Maturitas* 2001 Aug 25;39(2):125-32.
- (112) Norman RJ, Flight IH, Rees MC. Oestrogen and progestogen hormone replacement therapy for peri-menopausal and post-menopausal women: weight and body fat distribution. *Cochrane Database Syst Rev* 2000;(2):CD001018.
- (113) Barros RP, Machado UF, Gustafsson JA. Estrogen receptors: new players in diabetes mellitus. *Trends Mol Med* 2006 Sep;12(9):425-31.

- (114) Heine PA, Taylor JA, Iwamoto GA, Lubahn DB, Cooke PS. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor- α knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 Nov 7;97(23):12729-34.
- (115) Takeda K, Toda K, Saibara T, Nakagawa M, Saika K, Onishi T, et al. Progressive development of insulin resistance phenotype in male mice with complete aromatase (CYP19) deficiency. *J Endocrinol* 2003 Feb;176(2):237-46.
- (116) Bryzgalova G, Lundholm L, Portwood N, Gustafsson JA, Khan A, Efendic S, et al. Mechanisms of antidiabetogenic and body weight-lowering effects of estrogen in high-fat diet-fed mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008 Oct;295(4):E904-E912.
- (117) Yamada Y, Ando F, Niino N, Ohta S, Shimokata H. Association of polymorphisms of the estrogen receptor α gene with bone mineral density of the femoral neck in elderly Japanese women. *J Mol Med (Berl)* 2002 Jul;80(7):452-60.
- (118) Okura T, Koda M, Ando F, Niino N, Ohta S, Shimokata H. Association of polymorphisms in the estrogen receptor α gene with body fat distribution. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003 Sep;27(9):1020-7.
- (119) Lundholm L, Bryzgalova G, Gao H, Portwood N, Falt S, Berndt KD, et al. The estrogen receptor α -selective agonist propyl pyrazole triol improves glucose tolerance in ob/ob mice; potential molecular mechanisms. *J Endocrinol* 2008 Nov;199(2):275-86.
- (120) Alonso-Magdalena P, Ropero AB, Carrera MP, Cederroth CR, Baquie M, Gauthier BR, et al. Pancreatic insulin content regulation by the estrogen receptor ER α . *PLoS One* 2008;3(4):e2069.
- (121) Barros RP, Machado UF, Warner M, Gustafsson JA. Muscle GLUT4 regulation by estrogen receptors ER β and ER α . *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 Jan 31;103(5):1605-8.
- (122) Balhuizen A, Kumar R, Amisten S, Lundquist I, Salehi A. Activation of G protein-coupled receptor 30 modulates hormone secretion and counteracts cytokine-induced apoptosis in pancreatic islets of female mice. *Mol Cell Endocrinol* 2010 May 14;320(1-2):16-24.
- (123) Gao H, Bryzgalova G, Hedman E, Khan A, Efendic S, Gustafsson JA, et al. Long-term administration of estradiol decreases expression of hepatic lipogenic genes and improves insulin sensitivity in ob/ob mice: a possible mechanism is through direct regulation of signal transducer and activator of transcription 3. *Mol Endocrinol* 2006 Jun;20(6):1287-99.
- (124) Kuhl J, Hilding A, Ostenson CG, Grill V, Efendic S, Bavenholm P. Characterisation of subjects with early abnormalities of glucose tolerance in the Stockholm Diabetes Prevention Programme: the impact of sex and type 2 diabetes heredity. *Diabetologia* 2005 Jan;48(1):35-40.

- (125) Crespo CJ, Smit E, Snelling A, Sempos CT, Andersen RE. Hormone replacement therapy and its relationship to lipid and glucose metabolism in diabetic and nondiabetic postmenopausal women: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *Diabetes Care* 2002 Oct;25(10):1675-80.
- (126) Margolis KL, Bonds DE, Rodabough RJ, Tinker L, Phillips LS, Allen C, et al. Effect of oestrogen plus progestin on the incidence of diabetes in postmenopausal women: results from the Women's Health Initiative Hormone Trial. *Diabetologia* 2004 Jul;47(7):1175-87.
- (127) Fineberg SE. Glycaemic control and hormone replacement therapy: implications of the Postmenopausal Estrogen/Progestogen Intervention (PEPI) study. *Drugs Aging* 2000 Dec;17(6):453-61.
- (128) Duncan AC, Lyall H, Roberts RN, Petrie JR, Perera MJ, Monaghan S, et al. The effect of estradiol and a combined estradiol/progestagen preparation on insulin sensitivity in healthy postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1999 Jul;84(7):2402-7.
- (129) Sites CK, L'Hommedieu GD, Toth MJ, Brochu M, Cooper BC, Fairhurst PA. The effect of hormone replacement therapy on body composition, body fat distribution, and insulin sensitivity in menopausal women: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2005 May;90(5):2701-7.
- (130) Cooper BC, Burger NZ, Toth MJ, Cushman M, Sites CK. Insulin resistance with hormone replacement therapy: associations with markers of inflammation and adiposity. *Am J Obstet Gynecol* 2007 Feb;196(2):123-7.
- (131) Hahn L, Mattsson LA, Andersson B, Tengborn L. The effects of oestrogen replacement therapy on haemostatic variables in postmenopausal women with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1999 Mar;10(2):81-6.
- (132) Ryan AS, Nicklas BJ, Berman DM. Hormone replacement therapy, insulin sensitivity, and abdominal obesity in postmenopausal women. *Diabetes Care* 2002 Jan;25(1):127-33.
- (133) O'Sullivan AJ, Ho KK. A comparison of the effects of oral and transdermal estrogen replacement on insulin sensitivity in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1995 Jun;80(6):1783-8.
- (134) Colacurci N, Zarcone R, Mollo A, Russo G, Passaro M, de SL, et al. Effects of hormone replacement therapy on glucose metabolism. *Panminerva Med* 1998 Mar;40(1):18-21.
- (135) Soranna L, Cucinelli F, Perri C, Muzj G, Giuliani M, Villa P, et al. Individual effect of E2 and dydrogesterone on insulin sensitivity in post-menopausal women. *J Endocrinol Invest* 2002 Jun;25(6):547-50.

- (136) Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002 Dec 19;420(6917):868-74.
- (137) Andersson B, Mattsson LA, Hahn L, Marin P, Lapidus L, Holm G, et al. Estrogen replacement therapy decreases hyperandrogenicity and improves glucose homeostasis and plasma lipids in postmenopausal women with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1997 Feb;82(2):638-43.
- (138) Cucinelli F, Paparella P, Soranna L, Barini A, Cinque B, Mancuso S, et al. Differential effect of transdermal estrogen plus progestagen replacement therapy on insulin metabolism in postmenopausal women: relation to their insulinemic secretion. *Eur J Endocrinol* 1999 Mar;140(3):215-23.
- (139) Kimmerle R, Heinemann L, Heise T, Bender R, Weyer C, Hirschberger S, et al. Influence of continuous combined estradiol-norethisterone acetate preparations on insulin sensitivity in postmenopausal nondiabetic women. *Menopause* 1999;6(1):36-42.
- (140) Walker RJ, Lewis-Barned NJ, Sutherland WH, Goulding A, Edwards EA, de Jong SA, et al. The effects of sequential combined oral 17beta-estradiol norethisterone acetate on insulin sensitivity and body composition in healthy postmenopausal women: a randomized single blind placebo-controlled study. *Menopause* 2001 Jan;8(1):27-32.
- (141) Mattiasson I, Rendell M, Tornquist C, Jeppsson S, Hulthen UL. Effects of estrogen replacement therapy on abdominal fat compartments as related to glucose and lipid metabolism in early postmenopausal women. *Horm Metab Res* 2002 Oct;34(10):583-8.
- (142) Morin-Papunen LC, Vauhkonen I, Ruokonen A, Tapanainen JS, Raudaskoski T. Effects of tibolone and cyclic hormone replacement therapy on glucose metabolism in non-diabetic obese postmenopausal women: a randomized study. *Eur J Endocrinol* 2004 May;150(5):705-14.
- (143) Villa P, Sagnella F, Perri C, Suriano R, Costantini B, Macri F, et al. Low- and standard-estrogen dosage in oral therapy: dose-dependent effects on insulin and lipid metabolism in healthy postmenopausal women. *Climacteric* 2008;11(6):498-508.
- (144) Villa P, Suriano R, Ricciardi L, Tagliaferri V, De CS, De FP, et al. Low-dose estrogen and drospirenone combination: effects on glycoinsulinemic metabolism and other cardiovascular risk factors in healthy postmenopausal women. *Fertil Steril* 2011 Jan;95(1):158-63.
- (145) Blake GJ, Ridker PM. Novel clinical markers of vascular wall inflammation. *Circ Res* 2001 Oct 26;89(9):763-71.
- (146) Ley K, Huo Y. VCAM-1 is critical in atherosclerosis. *J Clin Invest* 2001 May;107(10):1209-10.
- (147) Yasukawa H, Imaizumi T, Matsuoka H, Nakashima A, Morimatsu M. Inhibition of intimal hyperplasia after balloon injury by antibodies to intercellular adhesion

- molecule-1 and lymphocyte function-associated antigen-1. *Circulation* 1997 Mar 18;95(6):1515-22.
- (148) Suzuki J, Isobe M, Yamazaki S, Horie S, Okubo Y, Sekiguchi M. Inhibition of accelerated coronary atherosclerosis with short-term blockade of intercellular adhesion molecule-1 and lymphocyte function-associated antigen-1 in a heterotopic murine model of heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 1997 Nov;16(11):1141-8.
- (149) Dong ZM, Chapman SM, Brown AA, Frenette PS, Hynes RO, Wagner DD. The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J Clin Invest* 1998 Jul 1;102(1):145-52.
- (150) Frenette PS, Wagner DD. Insights into selectin function from knockout mice. *Thromb Haemost* 1997 Jul;78(1):60-4.
- (151) Collins RG, Velji R, Guevara NV, Hicks MJ, Chan L, Beaudet AL. P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Exp Med* 2000 Jan 3;191(1):189-94.
- (152) Luster AD. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998 Feb 12;338(7):436-45.
- (153) Yeh ET, Anderson HV, Pasceri V, Willerson JT. C-reactive protein: linking inflammation to cardiovascular complications. *Circulation* 2001 Aug 28;104(9):974-5.
- (154) Szmitko PE, Wang CH, Weisel RD, de Almeida JR, Anderson TJ, Verma S. New markers of inflammation and endothelial cell activation: Part I. *Circulation* 2003 Oct 21;108(16):1917-23.
- (155) Willerson JT, Ridker PM. Inflammation as a cardiovascular risk factor. *Circulation* 2004 Jun 1;109(21 Suppl 1):II2-10.
- (156) Ridker PM. Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention. *Circulation* 2003 Jan 28;107(3):363-9.
- (157) Verma S, Wang CH, Li SH, Dumont AS, Fedak PW, Badiwala MV, et al. A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. *Circulation* 2002 Aug 20;106(8):913-9.
- (158) Cushman M, Legault C, Barrett-Connor E, Stefanick ML, Kessler C, Judd HL, et al. Effect of postmenopausal hormones on inflammation-sensitive proteins: the Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Study. *Circulation* 1999 Aug 17;100(7):717-22.
- (159) Herrington DM, Howard TD, Hawkins GA, Reboussin DM, Xu J, Zheng SL, et al. Estrogen-receptor polymorphisms and effects of estrogen replacement on high-

- density lipoprotein cholesterol in women with coronary disease. *N Engl J Med* 2002 Mar 28;346(13):967-74.
- (160) Decensi A, Omodei U, Robertson C, Bonanni B, Guerrieri-Gonzaga A, Ramazzotto F, et al. Effect of transdermal estradiol and oral conjugated estrogen on C-reactive protein in retinoid-placebo trial in healthy women. *Circulation* 2002 Sep 3;106(10):1224-8.
- (161) Vongpatanasin W, Tuncel M, Wang Z, Arbique D, Mehrad B, Jialal I. Differential effects of oral versus transdermal estrogen replacement therapy on C-reactive protein in postmenopausal women. *J Am Coll Cardiol* 2003 Apr 16;41(8):1358-63.
- (162) Caulin-Glaser T, Farrell WJ, Pfau SE, Zaret B, Bunger K, Setaro JF, et al. Modulation of circulating cellular adhesion molecules in postmenopausal women with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1998 Jun;31(7):1555-60.
- (163) Stork S, von SC, Angerer P. The effect of 17beta-estradiol on endothelial and inflammatory markers in postmenopausal women: a randomized, controlled trial. *Atherosclerosis* 2002 Dec;165(2):301-7.
- (164) Koh KK, Jin DK, Yang SH, Lee SK, Hwang HY, Kang MH, et al. Vascular effects of synthetic or natural progestagen combined with conjugated equine estrogen in healthy postmenopausal women. *Circulation* 2001 Apr 17;103(15):1961-6.
- (165) Koh KK, Yoon BK. Controversies regarding hormone therapy: Insights from inflammation and hemostasis. *Cardiovasc Res* 2006 Apr 1;70(1):22-30.
- (166) Hwang SJ, Ballantyne CM, Sharrett AR, Smith LC, Davis CE, Gotto AM, Jr., et al. Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Circulation* 1997 Dec 16;96(12):4219-25.
- (167) van Baal WM, Emeis JJ, Kenemans P, Kessel H, Peters-Muller ER, Schalkwijk CG, et al. Short-term hormone replacement therapy: reduced plasma levels of soluble adhesion molecules. *Eur J Clin Invest* 1999 Nov;29(11):913-21.
- (168) Zanger D, Yang BK, Ardans J, Waclawiw MA, Csako G, Wahl LM, et al. Divergent effects of hormone therapy on serum markers of inflammation in postmenopausal women with coronary artery disease on appropriate medical management. *J Am Coll Cardiol* 2000 Nov 15;36(6):1797-802.
- (169) Kang HS, Ahn HS, Kang HJ, Gye MC. Effect of estrogen on the expression of occludin in ovariectomized mouse brain. *Neurosci Lett* 2006 Jul 10;402(1-2):30-4.
- (170) Segers K, Dahlback B, Bock PE, Tans G, Rosing J, Nicolaes GA. The role of thrombin exosites I and II in the activation of human coagulation factor V. *J Biol Chem* 2007 Nov 23;282(47):33915-24.
- (171) Lijnen HR. Pleiotropic functions of plasminogen activator inhibitor-1. *J Thromb Haemost* 2005 Jan;3(1):35-45.

- (172) Hoylaerts M, Rijken DC, Lijnen HR, Collen D. Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin. *J Biol Chem* 1982 Mar 25;257(6):2912-9.
- (173) Aso Y. Plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 in vascular inflammation and thrombosis. *Front Biosci* 2007;12:2957-66.
- (174) Chen Y, Budd RC, Kelm RJ, Jr., Sobel BE, Schneider DJ. Augmentation of proliferation of vascular smooth muscle cells by plasminogen activator inhibitor type 1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006 Aug;26(8):1777-83.
- (175) Schneiderman J, Sawdey MS, Keeton MR, Bordin GM, Bernstein EF, Dilley RB, et al. Increased type 1 plasminogen activator inhibitor gene expression in atherosclerotic human arteries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992 Aug 1;89(15):6998-7002.
- (176) Hemelaar M, van der Mooren MJ, Rad M, Klufft C, Kenemans P. Effects of non-oral postmenopausal hormone therapy on markers of cardiovascular risk: a systematic review. *Fertil Steril* 2008 Sep;90(3):642-72.
- (177) Bagot CN, Marsh MS, Whitehead M, Sherwood R, Roberts L, Patel RK, et al. The effect of estrone on thrombin generation may explain the different thrombotic risk between oral and transdermal hormone replacement therapy. *J Thromb Haemost* 2010 Aug;8(8):1736-44.
- (178) Canonico M, Scarabin PY. Hormone therapy and risk of venous thromboembolism among postmenopausal women. *Climacteric* 2009;12 Suppl 1:76-80.
- (179) Scarabin PY, Oger E, Simon T, Plu-Bureau. Estrogen plus progestin and risk of venous thrombosis. *JAMA* 2005 Mar 16;293(11):1322-3.
- (180) Yarnell JW, Baker IA, Sweetnam PM, Bainton D, O'Brien JR, Whitehead PJ, et al. Fibrinogen, viscosity, and white blood cell count are major risk factors for ischemic heart disease. The Caerphilly and Speedwell collaborative heart disease studies. *Circulation* 1991 Mar;83(3):836-44.
- (181) Koenig W, Sund M, Filipiak B, Doring A, Lowel H, Ernst E. Plasma viscosity and the risk of coronary heart disease: results from the MONICA-Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998 May;18(5):768-72.
- (182) Smith A, Patterson C, Yarnell J, Rumley A, Ben-Shlomo Y, Lowe G. Which hemostatic markers add to the predictive value of conventional risk factors for coronary heart disease and ischemic stroke? The Caerphilly Study. *Circulation* 2005 Nov 15;112(20):3080-7.
- (183) Martini J, Carpentier B, Chavez NA, Cabrales P, Tsai AG, Intaglietta M. Beneficial effects due to increasing blood and plasma viscosity. *Clin Hemorheol Microcirc* 2006;35(1-2):51-7.

- (184) Rosenson RS, Tangney CC, Mosca LJ. Hormone replacement therapy improves cardiovascular risk by lowering plasma viscosity in postmenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998 Dec;18(12):1902-5.
- (185) Spengler MI, Goni GM, Mengarelli G, Bravo LM, Bocanera R, Tozzini R, et al. Effect of hormone replacement therapy upon haemorheological variables. *Clin Hemorheol Microcirc* 2003;28(1):13-9.
- (186) Persico N, Mancini F, Artini PG, De IP, Volpe A, de AD, et al. Transdermal HRT and Doppler findings in normotensive and hypertensive postmenopausal patients. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2005 Oct;26(5):546-51.
- (187) Rexrode KM, Hennekens CH, Willett WC, Colditz GA, Stampfer MJ, Rich-Edwards JW, et al. A prospective study of body mass index, weight change, and risk of stroke in women. *JAMA* 1997 May 21;277(19):1539-45.
- (188) Yatsuya H, Folsom AR, Yamagishi K, North KE, Brancati FL, Stevens J. Race- and sex-specific associations of obesity measures with ischemic stroke incidence in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Stroke* 2010 Mar;41(3):417-25.
- (189) Cushman M, Kuller LH, Prentice R, Rodabough RJ, Psaty BM, Stafford RS, et al. Estrogen plus progestin and risk of venous thrombosis. *JAMA* 2004 Oct 6;292(13):1573-80.
- (190) Canonico M, Plu-Bureau, Lowe GD, Scarabin PY. Hormone replacement therapy and risk of venous thromboembolism in postmenopausal women: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2008 May 31;336(7655):1227-31.
- (191) Canonico M, Fournier A, Carcaillon L, Olie V, Plu-Bureau, Oger E, et al. Postmenopausal hormone therapy and risk of idiopathic venous thromboembolism: results from the E3N cohort study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010 Feb;30(2):340-5.
- (192) Jick H, Derby LE, Myers MW, Vasilakis C, Newton KM. Risk of hospital admission for idiopathic venous thromboembolism among users of postmenopausal oestrogens. *Lancet* 1996 Oct 12;348(9033):981-3.
- (193) Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jr., et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA* 2003 May 21;289(19):2560-72.
- (194) KUPPERMAN HS, BLATT MH, WIESBADER H, FILLER W. Comparative clinical evaluation of estrogenic preparations by the menopausal and amenorrheal indices. *J Clin Endocrinol Metab* 1953 Jun;13(6):688-703.
- (195) De Aguiar LG, Bahia LR, Villela N, Laflor C, Sicuro F, Wiernsperger N, et al. Metformin improves endothelial vascular reactivity in first-degree relatives of type 2 diabetic patients with metabolic syndrome and normal glucose tolerance. *Diabetes Care* 2006 May;29(5):1083-9.

- (196) Kirsten R, Nelson K, Kirsten D, Heintz B. Clinical pharmacokinetics of vasodilators. Part II. *Clin Pharmacokinet* 1998 Jul;35(1):9-36.
- (197) Fahs CA, Rossow LM, Seo DI, Loenneke JP, Sherk VD, Kim E, et al. Effect of different types of resistance exercise on arterial compliance and calf blood flow. *Eur J Appl Physiol* 2011 Dec;111(12):2969-75.
- (198) Kraemer de Aguiar LG, Laflor CM, Bahia L, Villela NR, Wiernsperger N, Bottino DA, et al. Metformin improves skin capillary reactivity in normoglycaemic subjects with the metabolic syndrome. *Diabet Med* 2007 Mar;24(3):272-9.
- (199) Baskurt OK, Boynard M, Cokelet GC, Connes P, Cooke BM, Forconi S, et al. New guidelines for hemorheological laboratory techniques. *Clin Hemorheol Microcirc* 2009;42(2):75-97.
- (200) Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972 Jun;18(6):499-502.
- (201) Vermeulen A, Verdonck L, Kaufman JM. A critical evaluation of simple methods for the estimation of free testosterone in serum. *J Clin Endocrinol Metab* 1999 Oct;84(10):3666-72.
- (202) Belfiore F, Iannello S, Volpicelli G. Insulin sensitivity indices calculated from basal and OGTT-induced insulin, glucose, and FFA levels. *Mol Genet Metab* 1998 Feb;63(2):134-41.
- (203) Bonora E, Zavaroni I, Alpi O, Pezzarossa A, Bruschi F, Guerra L, et al. Insulin and C-peptide responses to 75 g oral glucose load in the healthy man. *Diabete Metab* 1986 Jun;12(3):143-8.
- (204) Zavaroni I, Dall'Aglio E, Bruschi F, Bonora E, Alpi O, Pezzarossa A, et al. Effect of age and environmental factors on glucose tolerance and insulin secretion in a worker population. *J Am Geriatr Soc* 1986 Apr;34(4):271-5.
- (205) Reaven GM, Hollenbeck CB, Chen YD. Relationship between glucose tolerance, insulin secretion, and insulin action in non-obese individuals with varying degrees of glucose tolerance. *Diabetologia* 1989 Jan;32(1):52-5.
- (206) Reaven GM, Brand RJ, Chen YD, Mathur AK, Goldfine I. Insulin resistance and insulin secretion are determinants of oral glucose tolerance in normal individuals. *Diabetes* 1993 Sep;42(9):1324-32.
- (207) Gelding SV, Nithyananthan R, Chan SP, Skinner E, Robinson S, Gray IP, et al. Insulin sensitivity in non-diabetic relatives of patients with non-insulin-dependent diabetes from two ethnic groups. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1994 Jan;40(1):55-62.
- (208) Cederholm J, Wibell L. Insulin release and peripheral sensitivity at the oral glucose tolerance test. *Diabetes Res Clin Pract* 1990 Oct;10(2):167-75.

- (209) Avignon A, Boegner C, Mariano-Goulart D, Colette C, Monnier L. Assessment of insulin sensitivity from plasma insulin and glucose in the fasting or post oral glucose-load state. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999 May;23(5):512-7.
- (210) Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 2009 Oct 20;120(16):1640-5.
- (211) Internacional Diabetes Federation. Global Guideline for Type 2 Diabetes. 2012.
- (212) IBGE. Observações sobre a evolução da mortalidade no Brasil: o passado, o presente e perspectivas. IBGE 2010 Available from: URL: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/tabuadaevinda/2009/notastecnicas.pdf>
- (213) Kapiotis S, Holzer G, Schaller G, Haumer M, Widhalm H, Weghuber D, et al. A proinflammatory state is detectable in obese children and is accompanied by functional and morphological vascular changes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006 Nov;26(11):2541-6.
- (214) Karpoff L, Vinet A, Schuster I, Oudot C, Goret L, Dauzat M, et al. Abnormal vascular reactivity at rest and exercise in obese boys. *Eur J Clin Invest* 2009 Feb;39(2):94-102.
- (215) Romero-Corral A, Sert-Kuniyoshi FH, Sierra-Johnson J, Orban M, Gami A, Davison D, et al. Modest visceral fat gain causes endothelial dysfunction in healthy humans. *J Am Coll Cardiol* 2010 Aug 17;56(8):662-6.
- (216) Sivitz WI, Wayson SM, Bayless ML, Sinkey CA, Haynes WG. Obesity impairs vascular relaxation in human subjects: hyperglycemia exaggerates adrenergic vasoconstriction arterial dysfunction in obesity and diabetes. *J Diabetes Complications* 2007 May;21(3):149-57.
- (217) Gavin TP, Stallings HW, III, Zwetsloot KA, Westerkamp LM, Ryan NA, Moore RA, et al. Lower capillary density but no difference in VEGF expression in obese vs. lean young skeletal muscle in humans. *J Appl Physiol* 2005 Jan;98(1):315-21.
- (218) Martin JW, Briesmiester K, Bargardi A, Muzik O, Mosca L, Duvernoy CS. Weight changes and obesity predict impaired resting and endothelium-dependent myocardial blood flow in postmenopausal women. *Clin Cardiol* 2005 Jan;28(1):13-8.
- (219) Hashimoto M, Akishita M, Eto M, Kozaki K, Ako J, Sugimoto N, et al. The impairment of flow-mediated vasodilatation in obese men with visceral fat accumulation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1998 May;22(5):477-84.

- (220) Marchesi S, Vaudo G, Lupattelli G, Lombardini R, Roscini AR, Brozzetti M, et al. Fat distribution and endothelial function in normal-overweight menopausal women. *J Clin Pharm Ther* 2007 Oct;32(5):477-82.
- (221) Frisbee JC, Stepp DW. Impaired NO-dependent dilation of skeletal muscle arterioles in hypertensive diabetic obese Zucker rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001 Sep;281(3):H1304-H1311.
- (222) Erdos B, Miller AW, Busija DW. Impaired endothelium-mediated relaxation in isolated cerebral arteries from insulin-resistant rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002 Jun;282(6):H2060-H2065.
- (223) Ruderman NB, Williamson JR, Brownlee M. Glucose and diabetic vascular disease. *FASEB J* 1992 Aug;6(11):2905-14.
- (224) Jaap AJ, Shore AC, Tooke JE. The influence of hypertension on microvascular blood flow and resistance to flow in the skin of patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabet Med* 1994 Nov;11(9):883-7.
- (225) Ijzerman RG, Voordouw JJ, van Weissenbruch MM, Yudkin JS, Serne EH, Delemarre-van de Waal HA, et al. TNF-alpha levels are associated with skin capillary recruitment in humans: a potential explanation for the relationship between TNF-alpha and insulin resistance. *Clin Sci (Lond)* 2006 Mar;110(3):361-8.
- (226) Karlsson C, Lindell K, Ottosson M, Sjostrom L, Carlsson B, Carlsson LM. Human adipose tissue expresses angiotensinogen and enzymes required for its conversion to angiotensin II. *J Clin Endocrinol Metab* 1998 Nov;83(11):3925-9.
- (227) Pinto S, Viridis A, Ghiadoni L, Bernini G, Lombardo M, Petraglia F, et al. Endogenous estrogen and acetylcholine-induced vasodilation in normotensive women. *Hypertension* 1997 Jan;29(1 Pt 2):268-73.
- (228) Viridis A, Ghiadoni L, Pinto S, Lombardo M, Petraglia F, Gennazzani A, et al. Mechanisms responsible for endothelial dysfunction associated with acute estrogen deprivation in normotensive women. *Circulation* 2000 May 16;101(19):2258-63.
- (229) Ohmichi M, Kanda Y, Hisamoto K, Morishige K, Takahashi K, Sawada K, et al. Rapid changes of flow-mediated dilatation after surgical menopause. *Maturitas* 2003 Feb 25;44(2):125-31.
- (230) Kalantaridou SN, Naka KK, Papanikolaou E, Kazakos N, Kravariti M, Calis KA, et al. Impaired endothelial function in young women with premature ovarian failure: normalization with hormone therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 2004 Aug;89(8):3907-13.
- (231) Rickenlund A, Eriksson MJ, Schenck-Gustafsson K, Hirschberg AL. Amenorrhea in female athletes is associated with endothelial dysfunction and unfavorable lipid profile. *J Clin Endocrinol Metab* 2005 Mar;90(3):1354-9.

- (232) Bairey Merz CN, Johnson BD, Sharaf BL, Bittner V, Berga SL, Braunstein GD, et al. Hypoestrogenemia of hypothalamic origin and coronary artery disease in premenopausal women: a report from the NHLBI-sponsored WISE study. *J Am Coll Cardiol* 2003 Feb 5;41(3):413-9.
- (233) Colacurci N, Manzella D, Fornaro F, Carbonella M, Paolisso G. Endothelial function and menopause: effects of raloxifene administration. *J Clin Endocrinol Metab* 2003 May;88(5):2135-40.
- (234) Bush DE, Jones CE, Bass KM, Walters GK, Bruza JM, Ouyang P. Estrogen replacement reverses endothelial dysfunction in postmenopausal women. *Am J Med* 1998 Jun;104(6):552-8.
- (235) Sorensen KE, Dorup I, Hermann AP, Mosekilde L. Combined hormone replacement therapy does not protect women against the age-related decline in endothelium-dependent vasomotor function. *Circulation* 1998 Apr 7;97(13):1234-8.
- (236) Yeboah J, Crouse JR, Hsu FC, Burke GL, Herrington DM. Brachial flow-mediated dilation predicts incident cardiovascular events in older adults: the Cardiovascular Health Study. *Circulation* 2007 May 8;115(18):2390-7.
- (237) Shimbo D, Grahame-Clarke C, Miyake Y, Rodriguez C, Sciacca R, Di TM, et al. The association between endothelial dysfunction and cardiovascular outcomes in a population-based multi-ethnic cohort. *Atherosclerosis* 2007 May;192(1):197-203.
- (238) Gokce N, Keaney JF, Jr., Hunter LM, Watkins MT, Nedeljkovic ZS, Menzoian JO, et al. Predictive value of noninvasively determined endothelial dysfunction for long-term cardiovascular events in patients with peripheral vascular disease. *J Am Coll Cardiol* 2003 May 21;41(10):1769-75.
- (239) Modena MG, Bonetti L, Coppi F, Bursi F, Rossi R. Prognostic role of reversible endothelial dysfunction in hypertensive postmenopausal women. *J Am Coll Cardiol* 2002 Aug 7;40(3):505-10.
- (240) Vogel RA. Coronary risk factors, endothelial function, and atherosclerosis: a review. *Clin Cardiol* 1997 May;20(5):426-32.
- (241) Anderson TJ. Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. *J Am Coll Cardiol* 1999 Sep;34(3):631-8.
- (242) Siepi D, Marchesi S, Vaudo G, Lupattelli G, Bagaglia F, Pirro M, et al. Preclinical vascular damage in white postmenopausal women: the relevance of osteoprotegerin. *Metabolism* 2008 Mar;57(3):321-5.
- (243) Kawano H, Motoyama T, Hirai N, Yoshimura T, Kugiyama K, Ogawa H, et al. Effect of medroxyprogesterone acetate plus estradiol on endothelium-dependent vasodilation in postmenopausal women. *Am J Cardiol* 2001 Jan 15;87(2):238-40, A9.

- (244) Novensa L, Selent J, Pastor M, Sandberg K, Heras M, Dantas AP. Equine estrogens impair nitric oxide production and endothelial nitric oxide synthase transcription in human endothelial cells compared with the natural 17{beta}-estradiol. *Hypertension* 2010 Sep;56(3):405-11.
- (245) Kawano H, Yasue H, Hirai N, Yoshida T, Fukushima H, Miyamoto S, et al. Effects of transdermal and oral estrogen supplementation on endothelial function, inflammation and cellular redox state. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2003 Aug;41(8):346-53.
- (246) Sherwood A, Bower JK, McFetridge-Durdle J, Blumenthal JA, Newby LK, Hinderliter AL. Age moderates the short-term effects of transdermal 17beta-estradiol on endothelium-dependent vascular function in postmenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007 Aug;27(8):1782-7.
- (247) Rossouw JE, Prentice RL, Manson JE, Wu L, Barad D, Barnabei VM, et al. Postmenopausal hormone therapy and risk of cardiovascular disease by age and years since menopause. *JAMA* 2007 Apr 4;297(13):1465-77.
- (248) Koh KK, Ahn JY, Jin DK, Yoon BK, Kim HS, Kim DS, et al. Effects of continuous combined hormone replacement therapy on inflammation in hypertensive and/or overweight postmenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002 Sep 1;22(9):1459-64.
- (249) De FP, Mainini G, Labriola D, Leo S, Santangelo F, Luisi A, et al. Low-dose estrogen and drospirenone combination: effects on metabolism and endothelial function in postmenopausal women with metabolic syndrome. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2013;40(2):233-5.
- (250) Hodis HN, Mack WJ, Lobo RA, Shoupe D, Sevanian A, Mahrer PR, et al. Estrogen in the prevention of atherosclerosis. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 2001 Dec 4;135(11):939-53.
- (251) Mack WJ, Hameed AB, Xiang M, Roy S, Slater CC, Stanczyk FZ, et al. Does elevated body mass modify the influence of postmenopausal estrogen replacement on atherosclerosis progression: results from the estrogen in the prevention of atherosclerosis trial. *Atherosclerosis* 2003 May;168(1):91-8.
- (252) Koh KK, Kang MH, Jin DK, Lee SK, Ahn JY, Hwang HY, et al. Vascular effects of estrogen in type II diabetic postmenopausal women. *J Am Coll Cardiol* 2001 Nov 1;38(5):1409-15.
- (253) Pinna C, Cignarella A, Sanvito P, Pelosi V, Bolego C. Prolonged ovarian hormone deprivation impairs the protective vascular actions of estrogen receptor alpha agonists. *Hypertension* 2008 Apr;51(4):1210-7.
- (254) Clarkson TB, Appt SE. Controversies about HRT--lessons from monkey models. *Maturitas* 2005 May 16;51(1):64-74.

- (255) Ihionkhan CE, Chambliss KL, Gibson LL, Hahner LD, Mendelsohn ME, Shaul PW. Estrogen causes dynamic alterations in endothelial estrogen receptor expression. *Circ Res* 2002 Nov 1;91(9):814-20.
- (256) Losordo DW, Kearney M, Kim EA, Jekanowski J, Isner JM. Variable expression of the estrogen receptor in normal and atherosclerotic coronary arteries of premenopausal women. *Circulation* 1994 Apr;89(4):1501-10.
- (257) Darblade B, Caillaud D, Poirot M, Fouque M, Thiers JC, Rami J, et al. Alteration of plasmalemmal caveolae mimics endothelial dysfunction observed in atheromatous rabbit aorta. *Cardiovasc Res* 2001 Jun;50(3):566-76.
- (258) Umetani M, Domoto H, Gormley AK, Yuhanna IS, Cummins CL, Javitt NB, et al. 27-Hydroxycholesterol is an endogenous SERM that inhibits the cardiovascular effects of estrogen. *Nat Med* 2007 Oct;13(10):1185-92.
- (259) Reslan OM, Khalil RA. Vascular effects of estrogenic menopausal hormone therapy. *Rev Recent Clin Trials* 2012 Feb;7(1):47-70.
- (260) Miller AP, Feng W, Xing D, Weathington NM, Blalock JE, Chen YF, et al. Estrogen modulates inflammatory mediator expression and neutrophil chemotaxis in injured arteries. *Circulation* 2004 Sep 21;110(12):1664-9.
- (261) Caulin-Glaser T, Watson CA, Pardi R, Bender JR. Effects of 17beta-estradiol on cytokine-induced endothelial cell adhesion molecule expression. *J Clin Invest* 1996 Jul 1;98(1):36-42.
- (262) Koh KK, Bui MN, Mincemoyer R, Cannon RO, III. Effects of hormone therapy on inflammatory cell adhesion molecules in postmenopausal healthy women. *Am J Cardiol* 1997 Dec 1;80(11):1505-7.
- (263) Wakatsuki A, Okatani Y, Ikenoue N, Fukaya T. Effect of medroxyprogesterone acetate on vascular inflammatory markers in postmenopausal women receiving estrogen. *Circulation* 2002 Mar 26;105(12):1436-9.
- (264) Lamon-Fava S, Posfai B, Schaefer EJ. Effect of hormonal replacement therapy on C-reactive protein and cell-adhesion molecules in postmenopausal women. *Am J Cardiol* 2003 Jan 15;91(2):252-4.
- (265) Koh KK, Jin DK, Yang SH, Lee SK, Hwang HY, Kang MH, et al. Vascular effects of synthetic or natural progestagen combined with conjugated equine estrogen in healthy postmenopausal women. *Circulation* 2001 Apr 17;103(15):1961-6.
- (266) Rajtar-Ciosek A, Huras H, Krzysiek J, Reron A, Wilczak M, Jach R. Beneficial influence of postmenopausal estrogen therapy on serum adhesion molecules is independent of the route and dose of administration. *Neuro Endocrinol Lett* 2011;32(3):340-4.

- (267) Nakai K, Itoh C, Hotta K, Itoh T, Yoshizumi M, Hiramori K. Estradiol-17 beta regulates the induction of VCAM-1 mRNA expression by interleukin-1 beta in human umbilical vein endothelial cells. *Life Sci* 1994;54(13):L221-L227.
- (268) Kernohan AF, Spiers A, Sattar N, Hillier C, Cleland SJ, Small M, et al. Effects of low-dose continuous combined HRT on vascular function in women with type 2 diabetes. *Diab Vasc Dis Res* 2004 Oct;1(2):82-8.
- (269) Manning PJ, Sutherland WH, Allum AR, de Jong SA, Jones SD. Effect of hormone replacement therapy on inflammation-sensitive proteins in post-menopausal women with Type 2 diabetes. *Diabet Med* 2002 Oct;19(10):847-52.
- (270) Vehkavaara S, Silveira A, Hakala-Ala-Pietila T, Virkamaki A, Hovatta O, Hamsten A, et al. Effects of oral and transdermal estrogen replacement therapy on markers of coagulation, fibrinolysis, inflammation and serum lipids and lipoproteins in postmenopausal women. *Thromb Haemost* 2001 Apr;85(4):619-25.
- (271) Silvestri A, Gebara O, Vitale C, Wajngarten M, Leonardo F, Ramires JA, et al. Increased levels of C-reactive protein after oral hormone replacement therapy may not be related to an increased inflammatory response. *Circulation* 2003 Jul 1;107(25):3165-9.
- (272) Fournier A. Should transdermal rather than oral estrogens be used in menopausal hormone therapy? A review. *Menopause Int* 2010 Mar;16(1):23-32.
- (273) Kanaya AM, Herrington D, Vittinghoff E, Lin F, Grady D, Bittner V, et al. Glycemic effects of postmenopausal hormone therapy: the Heart and Estrogen/progestin Replacement Study. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 2003 Jan 7;138(1):1-9.
- (274) Barros RP, Gustafsson JA. Estrogen receptors and the metabolic network. *Cell Metab* 2011 Sep 7;14(3):289-99.
- (275) Yamabe N, Kang KS, Zhu BT. Beneficial effect of 17beta-estradiol on hyperglycemia and islet beta-cell functions in a streptozotocin-induced diabetic rat model. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010 Nov 15;249(1):76-85.
- (276) Matute ML, Kalkhoff RK. Sex steroid influence on hepatic gluconeogenesis and glucogen formation. *Endocrinology* 1973 Mar;92(3):762-8.
- (277) Brussaard HE, Gevers Leuven JA, Frolich M, Kluft C, Krans HM. Short-term oestrogen replacement therapy improves insulin resistance, lipids and fibrinolysis in postmenopausal women with NIDDM. *Diabetologia* 1997 Jul;40(7):843-9.
- (278) Cagnacci A, Soldani R, Carriero PL, Paoletti AM, Fioretti P, Melis GB. Effects of low doses of transdermal 17 beta-estradiol on carbohydrate metabolism in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1992 Jun;74(6):1396-400.
- (279) Jensen MD, Martin ML, Cryer PE, Roust LR. Effects of estrogen on free fatty acid metabolism in humans. *Am J Physiol* 1994 Jun;266(6 Pt 1):E914-E920.

- (280) Martins AR, Nachbar RT, Gorjao R, Vinolo MA, Festuccia WT, Lambertucci RH, et al. Mechanisms underlying skeletal muscle insulin resistance induced by fatty acids: importance of the mitochondrial function. *Lipids Health Dis* 2012;11:30.
- (281) Matsuda M, DeFronzo RA. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care* 1999 Sep;22(9):1462-70.
- (282) Goodrow GJ, L'Hommedieu GD, Gannon B, Sites CK. Predictors of worsening insulin sensitivity in postmenopausal women. *Am J Obstet Gynecol* 2006 Feb;194(2):355-61.
- (283) Borissova AM, Tankova T, Kamenova P, Dakovska L, Kovacheva R, Kirilov G, et al. Effect of hormone replacement therapy on insulin secretion and insulin sensitivity in postmenopausal diabetic women. *Gynecol Endocrinol* 2002 Feb;16(1):67-74.
- (284) Karjalainen A, Paasilta M, Heikkinen J, Backstrom AC, Savolainen M, Kesaniemi YA. Effects of peroral and transdermal oestrogen replacement therapy on glucose and insulin metabolism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2001 Feb;54(2):165-73.
- (285) Paoletti AM, Pilloni M, Orru M, Floris S, Pistis M, Guerriero S, et al. Efficacy and safety of oral and transdermal hormonal replacement treatment containing levonorgestrel. *Maturitas* 2002 Jun 25;42(2):137-47.
- (286) Cagnacci A, Tuveri F, Cirillo R, Setteneri AM, Melis GB, Volpe A. The effect of transdermal 17-beta-estradiol on glucose metabolism of postmenopausal women is evident during the oral but not the intravenous glucose administration. *Maturitas* 1997 Dec 15;28(2):163-7.
- (287) Geloneze B, Vasques AC, Stabe CF, Pareja JC, Rosado LE, Queiroz EC, et al. HOMA1-IR and HOMA2-IR indexes in identifying insulin resistance and metabolic syndrome: Brazilian Metabolic Syndrome Study (BRAMS). *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2009 Mar;53(2):281-7.
- (288) Koopmans SJ, Kushwaha RS, DeFronzo RA. Chronic physiologic hyperinsulinemia impairs suppression of plasma free fatty acids and increases de novo lipogenesis but does not cause dyslipidemia in conscious normal rats. *Metabolism* 1999 Mar;48(3):330-7.
- (289) Iozzo P, Pratipanawatr T, Pijl H, Vogt C, Kumar V, Pipek R, et al. Physiological hyperinsulinemia impairs insulin-stimulated glycogen synthase activity and glycogen synthesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001 May;280(5):E712-E719.
- (290) Staessen JA, van der Heijden-Spek JJ, Safar ME, Den HE, Gasowski J, Fagard RH, et al. Menopause and the characteristics of the large arteries in a population study. *J Hum Hypertens* 2001 Aug;15(8):511-8.

- (291) Owens JF, Stoney CM, Matthews KA. Menopausal status influences ambulatory blood pressure levels and blood pressure changes during mental stress. *Circulation* 1993 Dec;88(6):2794-802.
- (292) Mercurio G, Zoncu S, Saiu F, Mascia M, Melis GB, Rosano GM. Menopause induced by oophorectomy reveals a role of ovarian estrogen on the maintenance of pressure homeostasis. *Maturitas* 2004 Feb 20;47(2):131-8.
- (293) da Costa LS, de Oliveira MA, Rubim VS, Wajngarten M, Aldrighi JM, Rosano GM, et al. Effects of hormone replacement therapy or raloxifene on ambulatory blood pressure and arterial stiffness in treated hypertensive postmenopausal women. *Am J Cardiol* 2004 Dec 1;94(11):1453-6.
- (294) Seely EW, Walsh BW, Gerhard MD, Williams GH. Estradiol with or without progesterone and ambulatory blood pressure in postmenopausal women. *Hypertension* 1999 May;33(5):1190-4.
- (295) Mercurio G, Zoncu S, Pilia I, Lao A, Melis GB, Cherchi A. Effects of acute administration of transdermal estrogen on postmenopausal women with systemic hypertension. *Am J Cardiol* 1997 Sep 1;80(5):652-5.
- (296) Mercurio G, Zoncu S, Piano D, Pilia I, Lao A, Melis GB, et al. Estradiol-17beta reduces blood pressure and restores the normal amplitude of the circadian blood pressure rhythm in postmenopausal hypertension. *Am J Hypertens* 1998 Aug;11(8 Pt 1):909-13.
- (297) Pripp U, Hall G, Csemiczky G, Eksborg S, Landgren BM, Schenck-Gustafsson K. A randomized trial on effects of hormone therapy on ambulatory blood pressure and lipoprotein levels in women with coronary artery disease. *J Hypertens* 1999 Oct;17(10):1379-86.
- (298) Affinito P, Palomba S, Bonifacio M, Fontana D, Izzo R, Trimarco B, et al. Effects of hormonal replacement therapy in postmenopausal hypertensive patients. *Maturitas* 2001 Oct 31;40(1):75-83.
- (299) Modena MG, Muia N, Jr., Aveta P, Molinari R, Rossi R. Effects of transdermal 17beta-estradiol on left ventricular anatomy and performance in hypertensive women. *Hypertension* 1999 Nov;34(5):1041-6.
- (300) Vongpatanasin W, Tuncel M, Mansour Y, Arbique D, Victor RG. Transdermal estrogen replacement therapy decreases sympathetic activity in postmenopausal women. *Circulation* 2001 Jun 19;103(24):2903-8.
- (301) Zacharieva S, Atanassova I, Kirilov G, Kalinov K, Shigarminova R, Nachev E, et al. Effect of transdermal estrogen therapy on some vasoactive humoral factors and 24-h ambulatory blood pressure in normotensive postmenopausal women. *Climacteric* 2002 Sep;5(3):293-9.

- (302) Schunkert H, Danser AH, Hense HW, Derkx FH, Kurzinger S, Riegger GA. Effects of estrogen replacement therapy on the renin-angiotensin system in postmenopausal women. *Circulation* 1997 Jan 7;95(1):39-45.
- (303) Harvey PJ, Morris BL, Miller JA, Floras JS. Estradiol induces discordant angiotensin and blood pressure responses to orthostasis in healthy postmenopausal women. *Hypertension* 2005 Mar;45(3):399-405.
- (304) Spritzer PM, Vitola D, Vilodre LC, Wender MC, Reis FM, Ruschel S, et al. One year follow-up of hormone replacement therapy with percutaneous estradiol and low-dose vaginal natural progesterone in women with mild to moderate hypertension. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2003 Aug;111(5):267-73.
- (305) Scuteri A, Lakatta EG, Anderson DE, Fleg JL. Transdermal 17 beta-oestradiol reduces salt sensitivity of blood pressure in postmenopausal women. *J Hypertens* 2003 Dec;21(12):2419-20.
- (306) Weitz G, Elam M, Born J, Fehm HL, Dodt C. Postmenopausal estrogen administration suppresses muscle sympathetic nerve activity. *J Clin Endocrinol Metab* 2001 Jan;86(1):344-8.
- (307) Hunt BE, Taylor JA, Hamner JW, Gagnon M, Lipsitz LA. Estrogen replacement therapy improves baroreflex regulation of vascular sympathetic outflow in postmenopausal women. *Circulation* 2001 Jun 19;103(24):2909-14.
- (308) Girdler SS, Hinderliter AL, Wells EC, Sherwood A, Grewen KM, Light KC. Transdermal versus oral estrogen therapy in postmenopausal smokers: hemodynamic and endothelial effects. *Obstet Gynecol* 2004 Jan;103(1):169-80.
- (309) Del RG, Velardo A, Menozzi R, Zizzo G, Tavernari V, Venneri MG, et al. Acute estradiol and progesterone administration reduced cardiovascular and catecholamine responses to mental stress in menopausal women. *Neuroendocrinology* 1998 Apr;67(4):269-74.
- (310) O'Sullivan AJ, Crampton LJ, Freund J, Ho KK. The route of estrogen replacement therapy confers divergent effects on substrate oxidation and body composition in postmenopausal women. *J Clin Invest* 1998 Sep 1;102(5):1035-40.
- (311) Ho KK, O'Sullivan AJ, Wolthers T, Leung KC. Metabolic effects of oestrogens: impact of the route of administration. *Ann Endocrinol (Paris)* 2003 Apr;64(2):170-7.
- (312) Duanmu Z, Lapanowski K, Dunbar JC. Insulin-like growth factor-I decreases sympathetic nerve activity: the effect is modulated by glycemic status. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997 Oct;216(1):93-7.
- (313) Sverrisdottir YB, Elam M, Herlitz H, Bengtsson BA, Johannsson G. Intense sympathetic nerve activity in adults with hypopituitarism and untreated growth hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1998 Jun;83(6):1881-5.

- (314) Bui MN, Arai AE, Hathaway L, Waclawiw MA, Csako G, Cannon RO, III. Effect of hormone replacement therapy on carotid arterial compliance in healthy postmenopausal women. *Am J Cardiol* 2002 Jul 1;90(1):82-5.
- (315) Sumino H, Ichikawa S, Kasama S, Takahashi T, Kumakura H, Takayama Y, et al. Different effects of oral conjugated estrogen and transdermal estradiol on arterial stiffness and vascular inflammatory markers in postmenopausal women. *Atherosclerosis* 2006 Dec;189(2):436-42.
- (316) Vehkavaara S, Westerbacka J, Hakala-Ala-Pietila T, Virkamaki A, Hovatta O, Yki-Jarvinen H. Effect of estrogen replacement therapy on insulin sensitivity of glucose metabolism and preresistance and resistance vessel function in healthy postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2000 Dec;85(12):4663-70.
- (317) Lowe GD, Lee AJ, Rumley A, Price JF, Fowkes FG. Blood viscosity and risk of cardiovascular events: the Edinburgh Artery Study. *Br J Haematol* 1997 Jan;96(1):168-73.
- (318) Chabanel A, Schachter D, Chien S. Increased rigidity of red blood cell membrane in young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1987 Dec;10(6):603-7.
- (319) Chien S. Blood rheology in myocardial infarction and hypertension. *Biorheology* 1986;23(6):633-53.
- (320) Dintenfass L. Blood-pressure and blood viscosity in coronary heart-disease. *Lancet* 1978 Nov 4;2(8097):993-4.
- (321) London M. The role of blood rheology in regulating blood pressure. *Clin Hemorheol Microcirc* 1997 Mar;17(2):93-106.
- (322) Rosenson RS, McCormick A, Uretz EF. Distribution of blood viscosity values and biochemical correlates in healthy adults. *Clin Chem* 1996 Aug;42(8 Pt 1):1189-95.
- (323) Kesmarky G, Kenyeres P, Rabai M, Toth K. Plasma viscosity: a forgotten variable. *Clin Hemorheol Microcirc* 2008;39(1-4):243-6.
- (324) Forconi S, Gori T. The evolution of the meaning of blood hyperviscosity in cardiovascular physiopathology: should we reinterpret Poiseuille? *Clin Hemorheol Microcirc* 2009;42(1):1-6.
- (325) Intaglietta M. Increased blood viscosity: disease, adaptation or treatment? *Clin Hemorheol Microcirc* 2009;42(4):305-6.
- (326) Salazar Vazquez BY, Martini J, Chavez NA, Tsai AG, Forconi S, Cabrales P, et al. Cardiovascular benefits in moderate increases of blood and plasma viscosity surpass those associated with lowering viscosity: Experimental and clinical evidence. *Clin Hemorheol Microcirc* 2010;44(2):75-85.

- (327) Frohlich M, Schunkert H, Hense HW, Tropitzsch A, Hendricks P, Doring A, et al. Effects of hormone replacement therapies on fibrinogen and plasma viscosity in postmenopausal women. *Br J Haematol* 1998 Mar;100(3):577-81.
- (328) Mancini F, Persico N, Genazzani AD, Volpe A, Battaglia C, de AD. Effects of hormone replacement therapy on plasma viscosity and Doppler variations in postmenopausal non-smokers and heavy smokers. *Gynecol Endocrinol* 2005 Apr;20(4):221-6.
- (329) Persico N, Mancini F, Artini PG, Regnani G, Volpe A, de AD, et al. Transdermal hormone replacement therapy and Doppler findings in normal and overweight postmenopausal patients. *Gynecol Endocrinol* 2004 Nov;19(5):274-81.
- (330) Salomaa V, Rasi V, Pekkanen J, Vahtera E, Jauhiainen M, Vartiainen E, et al. Association of hormone replacement therapy with hemostatic and other cardiovascular risk factors. The FINRISK Hemostasis Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995 Oct;15(10):1549-55.
- (331) Acs N, Vajo Z, Miklos Z, Siklosi G, Paulin F, Felicetta JV, et al. The effects of postmenopausal hormone replacement therapy on hemostatic variables: a meta-analysis of 46 studies. *Gynecol Endocrinol* 2002 Aug;16(4):335-46.
- (332) Fait T, Vrablik M, Zizka Z, Kostirova M. Changes in hemostatic variables induced by estrogen replacement therapy: comparison of transdermal and oral administration in a crossover-designed study. *Gynecol Obstet Invest* 2008;65(1):47-51.
- (333) Margarido PF, Bagnoli VR, Maggio da FA, Maciel GA, Soares JM, Jr., D'Amico EA, et al. Transdermal estrogen therapy effects on fibrinogen levels in women with a past history of venous thromboembolism: a pilot study. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2011;38(3):232-5.
- (334) Levy BI, Schiffrin EL, Mourad JJ, Agostini D, Vicaud E, Safar ME, et al. Impaired tissue perfusion: a pathology common to hypertension, obesity, and diabetes mellitus. *Circulation* 2008 Aug 26;118(9):968-76.
- (335) Schelbert HR. Coronary circulatory function abnormalities in insulin resistance: insights from positron emission tomography. *J Am Coll Cardiol* 2009 Feb 3;53(5 Suppl):S3-S8.
- (336) Wong TY, Duncan BB, Golden SH, Klein R, Couper DJ, Klein BE, et al. Associations between the metabolic syndrome and retinal microvascular signs: the Atherosclerosis Risk In Communities study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004 Sep;45(9):2949-54.
- (337) Debbabi H, Uzan L, Mourad JJ, Safar M, Levy BI, Tibirica E. Increased skin capillary density in treated essential hypertensive patients. *Am J Hypertens* 2006 May;19(5):477-83.

- (338) Wang L, Jerosch-Herold M, Jacobs DR, Jr., Shahar E, Folsom AR. Coronary risk factors and myocardial perfusion in asymptomatic adults: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *J Am Coll Cardiol* 2006 Feb 7;47(3):565-72.
- (339) Wiernsperger N, Nivoit P, De Aguiar LG, Bouskela E. Microcirculation and the metabolic syndrome. *Microcirculation* 2007 Jun;14(4-5):403-38.
- (340) De Boer MP, Meijer RI, Wijnstok NJ, Jonk AM, Houben AJ, Stehouwer CD, et al. Microvascular dysfunction: a potential mechanism in the pathogenesis of obesity-associated insulin resistance and hypertension. *Microcirculation* 2012 Jan;19(1):5-18.
- (341) Ikram MK, Witteman JC, Vingerling JR, Breteler MM, Hofman A, de Jong PT. Retinal vessel diameters and risk of hypertension: the Rotterdam Study. *Hypertension* 2006 Feb;47(2):189-94.
- (342) Wong TY, Klein R, Sharrett AR, Duncan BB, Couper DJ, Klein BE, et al. Retinal arteriolar diameter and risk for hypertension. *Ann Intern Med* 2004 Feb 17;140(4):248-55.
- (343) Greene AS, Tonellato PJ, Lui J, Lombard JH, Cowley AW, Jr. Microvascular rarefaction and tissue vascular resistance in hypertension. *Am J Physiol* 1989 Jan;256(1 Pt 2):H126-H131.
- (344) Hudetz AG. Percolation phenomenon: the effect of capillary network rarefaction. *Microvasc Res* 1993 Jan;45(1):1-10.
- (345) Levy BI, Ambrosio G, Pries AR, Struijker-Boudier HA. Microcirculation in hypertension: a new target for treatment? *Circulation* 2001 Aug 7;104(6):735-40.
- (346) Zeng G, Nystrom FH, Ravichandran LV, Cong LN, Kirby M, Mostowski H, et al. Roles for insulin receptor, PI3-kinase, and Akt in insulin-signaling pathways related to production of nitric oxide in human vascular endothelial cells. *Circulation* 2000 Apr 4;101(13):1539-45.
- (347) Baron AD, Brechtel-Hook G, Johnson A, Hardin D. Skeletal muscle blood flow. A possible link between insulin resistance and blood pressure. *Hypertension* 1993 Feb;21(2):129-35.
- (348) Laakso M, Edelman SV, Brechtel G, Baron AD. Decreased effect of insulin to stimulate skeletal muscle blood flow in obese man. A novel mechanism for insulin resistance. *J Clin Invest* 1990 Jun;85(6):1844-52.
- (349) Baron AD, Steinberg H, Brechtel G, Johnson A. Skeletal muscle blood flow independently modulates insulin-mediated glucose uptake. *Am J Physiol* 1994 Feb;266(2 Pt 1):E248-E253.
- (350) Clark MG, Wallis MG, Barrett EJ, Vincent MA, Richards SM, Clerk LH, et al. Blood flow and muscle metabolism: a focus on insulin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003 Feb;284(2):E241-E258.

- (351) Kim JA, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation* 2006 Apr 18;113(15):1888-904.
- (352) Muniyappa R, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. Cardiovascular actions of insulin. *Endocr Rev* 2007 Aug;28(5):463-91.
- (353) de Jongh RT, Clark AD, Ijzerman RG, Serne EH, de VG, Stehouwer CD. Physiological hyperinsulinaemia increases intramuscular microvascular reactive hyperaemia and vasomotion in healthy volunteers. *Diabetologia* 2004 Jun;47(6):978-86.
- (354) Serne EH, Ijzerman RG, Gans RO, Nijveldt R, de VG, Evertz R, et al. Direct evidence for insulin-induced capillary recruitment in skin of healthy subjects during physiological hyperinsulinemia. *Diabetes* 2002 May;51(5):1515-22.
- (355) Kubota T, Kubota N, Kumagai H, Yamaguchi S, Kozono H, Takahashi T, et al. Impaired insulin signaling in endothelial cells reduces insulin-induced glucose uptake by skeletal muscle. *Cell Metab* 2011 Mar 2;13(3):294-307.
- (356) Muris DM, Houben AJ, Schram MT, Stehouwer CD. Microvascular dysfunction is associated with a higher incidence of type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012 Dec;32(12):3082-94.
- (357) Barrett EJ, Eggleston EM, Inyard AC, Wang H, Li G, Chai W, et al. The vascular actions of insulin control its delivery to muscle and regulate the rate-limiting step in skeletal muscle insulin action. *Diabetologia* 2009 May;52(5):752-64.
- (358) Clark MG. Impaired microvascular perfusion: a consequence of vascular dysfunction and a potential cause of insulin resistance in muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008 Oct;295(4):E732-E750.
- (359) Buss C, Kraemer-Aguiar LG, Maranhao PA, Marinho C, de Souza MG, Wiernsperger N, et al. Novel findings in the cephalic phase of digestion: a role for microcirculation? *Physiol Behav* 2012 Feb 28;105(4):1082-7.
- (360) Lindstedt G, Lundberg PA, Lapidus L, Lundgren H, Bengtsson C, Bjorntorp P. Low sex-hormone-binding globulin concentration as independent risk factor for development of NIDDM. 12-yr follow-up of population study of women in Gothenburg, Sweden. *Diabetes* 1991 Jan;40(1):123-8.
- (361) Haffner SM, Valdez RA, Morales PA, Hazuda HP, Stern MP. Decreased sex hormone-binding globulin predicts noninsulin-dependent diabetes mellitus in women but not in men. *J Clin Endocrinol Metab* 1993 Jul;77(1):56-60.
- (362) Andersson B, Marin P, Lissner L, Vermeulen A, Bjorntorp P. Testosterone concentrations in women and men with NIDDM. *Diabetes Care* 1994 May;17(5):405-11.

- (363) Krentz AJ, von MD, Barrett-Connor E. Searching for polycystic ovary syndrome in postmenopausal women: evidence of a dose-effect association with prevalent cardiovascular disease. *Menopause* 2007 Mar;14(2):284-92.
- (364) Maturana MA, Spritzer PM. Association between hyperinsulinemia and endogenous androgen levels in peri- and postmenopausal women. *Metabolism* 2002 Feb;51(2):238-43.
- (365) Polderman KH, Gooren LJ, Asscheman H, Bakker A, Heine RJ. Induction of insulin resistance by androgens and estrogens. *J Clin Endocrinol Metab* 1994 Jul;79(1):265-71.
- (366) Woodard TL, Burghen GA, Kitabchi AE, Wilimas JA. Glucose intolerance and insulin resistance in aplastic anemia treated with oxymetholone. *J Clin Endocrinol Metab* 1981 Nov;53(5):905-8.
- (367) Thurston RC, Sowers MR, Chang Y, Sternfeld B, Gold EB, Johnston JM, et al. Adiposity and reporting of vasomotor symptoms among midlife women: the study of women's health across the nation. *Am J Epidemiol* 2008 Jan 1;167(1):78-85.

APÊNDICE A - Termo de consentimento livre e informado do estudo**BioVasc**

(Laboratório de Pesquisas Clínicas e Experimentais em Biologia Vascular)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Este termo tem o objetivo de obter seu consentimento para participar desta pesquisa clínica. Leia atentamente e, caso haja palavras ou informações que não tenha entendido perfeitamente, pergunte aos membros da equipe de estudo que estão à disposição para esclarecê-la. Você receberá uma cópia deste documento para seu registro.

Equipe de estudo: Luiz Guilherme Kraemer de Aguiar, Diogo Guarnieri Panazzolo, Lenora Maria Camarate Silveira Martins Leão, Lucia Henriques Alves da Silva.

Local de estudo: Laboratório de Pesquisas Clínicas e Experimentais em Biologia Vascular (BioVasc).

Objetivo do estudo

O objetivo deste estudo é avaliar se, em mulheres que fizeram a menopausa e que estejam acima do peso ideal (até determinado grau), a terapia hormonal com estrogênio via percutânea é benéfica em melhorar a função da microcirculação e sua interferência na coagulação sanguínea e inflamação.

Descrição do estudo

As pacientes selecionadas, que voluntariamente concordarem em participar do estudo e que não apresentem contraindicações à terapia hormonal da menopausa, serão submetidas ao tratamento com estrogênio em gel, via percutânea (aplicada na pele) durante um período de três meses. Antes e depois da intervenção, serão avaliados função dos vasos sanguíneos que compõem a microcirculação, além de parâmetros relacionados à coagulação sanguínea e inflamação.

Duração da participação no estudo

Sua participação neste estudo será de três meses. Após este período, se assim desejar, o acompanhamento médico continuará no ambulatório de Climatério do Hospital Universitário Pedro Ernesto.

Etapas do estudo

- **Primeira visita:** Neste primeiro contato, será feita uma avaliação clínica geral, a coleta de amostras de sangue e, se necessário for, a solicitação de exames complementares (exame colpocitológico preventivo, mamografia e ultrassonografia transvaginal). Isto é necessário para avaliar se você poderá participar efetivamente do estudo. Se você for selecionada para o estudo, passa-se para a

próxima etapa. Se não for, você será encaminhada ao ambulatório de Climatério do Hospital Universitário Pedro Ernesto para o seguimento de seu tratamento.

- **Segunda visita:** Nesta fase, se após a avaliação preliminar for selecionada para participar do estudo, você será submetida a exames não-invasivos (ou seja, que não necessitam de qualquer punção, abertura ou agressão a seu corpo) que tem o objetivo de avaliar a microcirculação. Os exames são os seguintes:
 - **Videocapilaroscopia:** exame indolor que avalia a microcirculação através da cutícula. Pedimos que você não retire a cutícula das unhas do quarto dedo (anular) da mão esquerda por três semanas antes do exame.
 - **Laser-doppler fluxometria:** exame indolor em que são colocados adesivos plásticos no seu antebraço. Nestes adesivos serão colocadas duas substâncias que provocarão a dilatação dos vasos sanguíneos daquele local apenas. Após a retirada dos adesivos, é comum a presença de discreta vermelhidão que desaparecerá espontaneamente após alguns minutos.
 - **Pletismografia:** exame indolor em que você deverá estar em jejum há 12 horas. Você será conduzida a uma sala com um leito onde permanecerá deitada, em repouso. Um manguito, semelhante a um aparelho de pressão será colocado em seu braço e no pulso, ambos do lado esquerdo e será avaliada a variação do fluxo sanguíneo no local através do enchimento destes manguitos. No outro braço, será feita a medida da pressão arterial de forma tradicional. Após estes exames, você poderá retornar normalmente a suas atividades habituais e, se necessário for, forneceremos declaração de comparecimento caso você tenha perdido horas de trabalho.
- **Terceira visita:** Os exames de sangue e os exames não-invasivos serão repetidos após os três meses do início do tratamento para avaliar se realmente houve benefício.

Riscos

Os exames realizados não trazem nenhum risco a sua saúde.

Benefícios

Todos os exames serão realizados gratuitamente. Os resultados deste estudo poderão contribuir com o avanço do conhecimento médico nesta área através da publicação dos resultados em artigos e apresentações em congressos científicos.

Confidencialidade

As informações obtidas para o estudo, incluindo identificação e registros médicos-hospitalares serão tratadas de forma confidencial e não serão reveladas sem seu consentimento por escrito.

Participação

Sua participação neste estudo é voluntária. Você pode recusar-se a participar a qualquer momento. Caso esta seja sua decisão, solicitamos que telefone para os membros da equipe e isto não afetará qualquer benefício que tenha recebido neste local. Você será comunicado sobre qualquer achado no decorrer do estudo que possa influenciar no seu desejo de continuar no mesmo.

Declaro que li e entendi as informações precedentes descritas neste documento e todas as minhas dúvidas foram respondidas de forma adequada. Dou meu livre consentimento para participação neste estudo até que eu decida pelo contrário.

Rio de Janeiro _____ de _____ de 20____

Nome completo da paciente _____

Assinatura da paciente _____

Nome do investigador _____

Assinatura do investigador _____

APÊNDICE B - Anúncios e cartazes para divulgação do projeto



Se você está **acima do peso**,
possui entre **47 - 55 anos**,
não é diabética, está na **menopausa**
e nunca fez reposição hormonal,
nos procure para que possamos te ajudar!!!

SINTOMAS DA MENOPAUSA

- ▶ Ondas de calor;
- ▶ Menor desejo sexual;
- ▶ Ressecamento vaginal;
- ▶ Suores noturnos;
- ▶ Irritabilidade;
- ▶ Dor durante o ato sexual;
- ▶ Insônia;
- ▶ Depressão;
- ▶ Diminuição da memória.

Venha participar da nossa pesquisa em
menopausa, sem qualquer custo!!!

CEP: 20550-013
UERJ



Informações: 2334 – 0703 (Eliza)



Projeto Saúde na Menopausa: GRATUITO!

Público-alvo:

Mulheres entre 47 a 55 anos, acima do peso, com sintomas da menopausa (ondas de calor, irritabilidade...), sem apresentar menstruação há mais de 01 ano. Não pode ser diabética e nem fumante.

O projeto prevê:

Exames médico, laboratorial e de imagem (Mamografia).
Tratamento gratuito.

**Laboratório BioVasc
UERJ (Maracanã)**

Contato: 2334-0703 (Eliza)



APÊNDICE C - Ficha de anamnese e exame físico do estudo

Ficha Estudo: Terapia Hormonal na Menopausa

Data: ____/____/____ Prontuário: _____

Identificação:

Nome: _____

Idade: _____ Data de Nascimento _____ Profissão: _____

Endereço: _____

Cidade: _____ UF: _____ CEP: _____

Telefone: _____ Celular: _____ E-mail _____

Escolaridade: Nenhuma 1º Grau 2º Grau Superior

Estado Civil: Casada Solteira(sem união estável) Solteira(com união estável) Viúva

Cor: Branca Não-Branca

Naturalidade: _____

Disponibilidade de horários: manhã _____ tarde _____

Antecedentes Pessoais:

Obesidade S N desde ____ anos de idade

Doença Cárdio-cerebrovascular S N

HAS AVC IAM TVP Tromboflebite Outra _____

GJ alterada/IG S N _____ Dislipidemias S N _____

Tireoidopatia S N _____ Gastrite/colecistopatia S N _____

Nefropatia S N _____ Hepatopatia S N _____

Cirurgia/Fratura S N _____

Câncer S N _____

Alergias S N _____ Outras _____

doenças S N _____

Hábitos de Vida:

Tabagismo S N cigarros/dia _____ Ex-tabagista S N iniciou aos ____ anos e parou aos ____ anos

Etilismo S N Tipo bebida _____ Frequência _____

Atividade física S N _____ Tempo/semana em min. _____

Renda familiar até 01 SM 2-3 SM 3-5 SM >05 SM

Medicações em uso S N _____

Antecedentes Familiares(1- mãe e pai; 2- irmãos; 3 avós)

DM S N _____ Obesidade S N _____ Dislipidemias S N _____

Câncer de mama S N _____ Câncer de útero S N _____ Câncer de ovário S N _____

Câncer cólon S N _____ Osteoporose S N _____ Córdio-cerebrovascular S N _____

HAS AVC IAM TVP Outra _____

Outros S N _____

Antecedentes TocoginecológicosMenarca _____ anos Ciclos regulares S N _____G: ___ P: ___ A: ___ Idade do 1º parto _____ DM Gestacional S N**DUM** ___/___/___ **Idade Menopausa:** _____ **Tempo de menopausa:** _____Patologias prévias: miomas nódulos mamários câncer de mamacâncer de útero câncer de ovário endometriose SOP

Tipo de Menopausa:

NaturalCirúrgicaHisterectomia S NOoforectomia bilateral S N**Uso prévio de Hormônios**Pilula: S N Qual? _____ Tempo de uso: _____Reposição hormonal S N Qual? _____ Dose: _____ Tempo de uso: _____Atividade sexual atual S N: dispareunia disúria/infecções urinárias repetiçãoredução de libido**Dados Antropométricos:**

	Visita 1 ___/___/___	Visita 2 ___/___/___	Visita 3 ___/___/___
PA 1			
PA 2			
FC			
Altura (cm)			
Peso (kg)			
C. abdominal	/	/	/
C. quadril	/	/	/
RCQ			
IMC			
IM de BK			
Bioimpedância			

Acantose *nigricans*:

Hirsutismo:

Tireóide:

Aparelho cardiovascular:

Aparelho pulmonar:

Abdômen:

MMII:

	Visita 1 ___/___/___	Visita 2 ___/___/___	Visita 3 ___/___/___
Blatt e Kupperman			
USG Transvaginal			
Citologia Vaginal			
Mamografia			
USG Mamas			

Efeitos colaterais do Estradiol - Data:

Mastalgia S NDistensão abd. ou pélvica S NAnsiedade S NNervosismo/Agressividade S N

Outros:

**ANEXO - Carta de aprovação do estudo pelo comitê de ética e pesquisa do Hospital
Universitário Pedro Ernesto**



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**



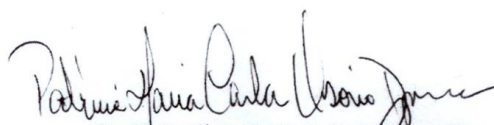
Rio de Janeiro, 16 de dezembro de 2009

Do: Comitê de Ética em Pesquisa
Profª. Patrícia Maria C. O. Duque
Para: Coord. Prof. Luiz Guilherme Kraemer de Aguiar

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, após avaliação, considerou o projeto (2499-CEP/HUPE – CAAE: 0074.0.228.000-09) "SOBREPESO/ OBESIDADE, RESISTÊNCIA INSULÍNICA, DISFUNÇÃO ENDOTELIAL E MICROVASCULAR EM MULHERES NA PERIMENOPAUSA" aprovado, encontrando-se este dentro dos padrões éticos da pesquisa em seres humanos, conforme Resolução n.º196 sobre pesquisa envolvendo seres humanos de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde, bem como o consentimento livre e esclarecido.

O pesquisador deverá informar ao Comitê de Ética qualquer acontecimento ocorrido no decorrer da pesquisa.

O Comitê de Ética solicita a V. Sª., que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.


Profª. Patrícia Maria C. O. Duque
Membro do Comitê de Ética em Pesquisa
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
HUPE/UERJ

CEP - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
AV. VINTE E OITO DE SETEMBRO, 77 TÉRREO - VILA ISABEL - CEP 20551-030
TEL: 21 2587-6353 – FAX: 21 2264-0853 - E-mail: cep-hupe@uerj.br