

VERA SYLVIA CASTANHO

**EFEITOS DA MENOPAUSA E DA
TERAPIA DE REPOSIÇÃO HORMONAL SOBRE
PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E RADIOLÓGICOS DE
ATEROSCLEROSE PRECOCE**

CAMPINAS

Unicamp

2008

VERA SYLVIA CASTANHO

**EFEITOS DA MENOPAUSA E DA
TERAPIA DE REPOSIÇÃO HORMONAL SOBRE
PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E RADIOLÓGICOS DE
ATEROSCLEROSE PRECOCE**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, área de concentração Patologia Clínica.

ORIENTADORA: PROFA. DRA. ELIANA COTTA DE FARIA

CAMPINAS

Unicamp

2008

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

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

C275e Castanho, Vera Sylvia
 Efeitos da menopausa e da terapia de reposição hormonal sobre
 parâmetros bioquímicos e radiológicos de aterosclerose precoce. / Vera
 Sylvia Castanho. Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Eliana Cotta de Faria
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Pos-menopausa. 2. Terapia de reposição hormonal.
3. Aterosclerose. 4. Auto-anticorpos. I. Faria, Eliana Cotta de.
II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências
Médicas. III. Título.

**Título em inglês: Menopause and hormone replacement therapy effects in
bioquimic and radiologic parameters of atherosclerosis
precocious**

**Keywords: . Postmenopause
 Hormone replacement therapy
 Atherosclerosis
 Auto-antibodies**

Área de concentração: Patologia Clínica

Titulação: Doutor em Ciências Médicas

Banca examinadora: Profª. Drª. Eliana Cotta de Faria

Profº. Drº. Fabio Bernardi Dalpino

Profª. Drª. Águeda Cleofe Marques Zarantin

Profº. Drº. Eros Antônio de Almeida

Profª. Drª. Denise Engelbrecht Zantutw Wittmann

Data da defesa: 28 – 07 - 2008

Banca examinadora da tese de Doutorado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Eliana Cotta de Faria

Membros:

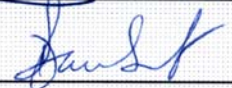
1. Profa. Dra. Eliana Cotta de Faria –



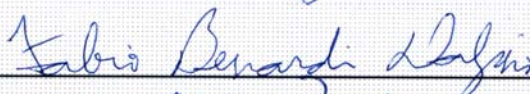
2. Prof. Dr. Eros Antonio de Almeida –



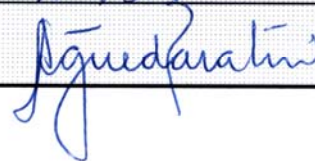
3. Profa. Dra. Denise Engelbrecht Zantut Wittmann –



4. Prof. Dr. Fabio Bernardi Dalpino –



5. Profa. Dra. Águeda Cleofe Marques Zaratin –



Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 28/07/2008

AGRADECIMENTOS

Ao Edu pelo incentivo.

À Dra. Eliana Cotta de Faria, minha orientadora, pelo conhecimento demonstrado ao longo das orientações, que permitiram alcançar meu propósito.

Ao Dr. Aarão Mendes Pinto Neto pela atenção recebida e por possibilitar que este estudo fosse atualizado, completado e assim finalizado.

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xxiii
INTRODUÇÃO.....	27
JUSTIFICATIVA.....	59
OBJETIVOS.....	63
MATERIAL E MÉTODOS.....	67
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	73
RESULTADOS.....	77
Manuscrito 1.....	79
Manuscrito 2.....	101
DISCUSSÃO GERAL.....	121
CONCLUSÕES.....	127
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	131
ANEXOS.....	147
Anexo I.....	149
Anexo II.....	151

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP	acetato de medroxiprogesterona
anti-D, anti-D2 e anti-A	anti-epítomos proteicos da apolipoproteína B oxidada
Apo AI	apolipoproteína AI
Apo B100	apolipoproteína B
CAT	catalase
CETP	proteína de transferência do éster de colesterol (<i>cholesteryl ester transfer protein</i>)
DAC	doença arterial coronariana
DCV	doença cardiovascular
EIM	espessamento da camada íntima-média das artérias carótidas
EO	estresse oxidativo
EROS	espécies reativas de oxigênio
FSH	hormônio folículo estimulante
GPx	glutathione peroxidase
HDL	lipoproteína de alta densidade (<i>high-density lipoprotein</i>)
IDL	lipoproteínas de densidade intermediária intermediate density lipoprotein

IMC	índice de massa corpórea
IMT	intima media thikness
LDL	lipoproteína de densidade baixa (<i>low-density lipoprotein</i>)
MDA	malondialdeído
NHDL	não HDL colesterol
NO	óxido nítrico
QM	quilomícrons
LH	lipase hepática (<i>hepatic lipase</i>)
LPL	lipoproteína lipase (<i>lipoprotein lipase</i>)
PLTP	proteína de transferência de fosfolípidos (<i>phospholipid transfer protein</i>)
SOD	superóxido dismutase
TBARS	espécies reativas do ácido tiobarbitúrico
TG	triglicérides
TRH	terapia de reposição hormonal
VLDL	lipoproteína de densidade muito baixa (<i>very-low density lipoprotein</i>)

LISTA DE QUADRO

	Pág.
Quadro 1- Efeitos da terapia de reposição hormonal sobre marcadores de oxidabilidade lipídica na mulher: revisão da literatura.....	57

RESUMO

Esta tese envolveu estudos com 287 mulheres, 69 não menopausadas e 218 pós-menopausadas; destas 84 em e 124 sem terapia de reposição hormonal (TRH), todas atendidas em hospitais públicos da Universidade Estadual de Campinas, Estado de São Paulo. As voluntárias foram recrutadas junto aos ambulatórios de dislipidemias (n=193), do Hospital das Clínicas Unicamp, e do ambulatório de menopausa (n=94), do CAISM/Unicamp. Seu intervalo de idades foi de 20 a 82 anos. As pós-menopausadas apresentavam idade acima de 40 anos e amenorréia por período superior a um ano.

O grupo em terapia de reposição hormonal foi subdividido de acordo com o tipo de TRH em 2 subgrupos: pacientes em uso de estrógenos isoladamente (0.625mg/dia, n=48) ou pacientes em reposição hormonal combinada com acetato de medroxiprogesterona, (2,5mg/dia, 10% e 5mg/dia, 90%, n=36), por no mínimo um ano. Caracterizaram a metodologia a definição da menopausa, através do preenchimento de questionário sobre o tempo de amenorréia natural, a determinação do uso e tipo de terapia de reposição hormonal por meio de entrevistas, seguidas de exame médico clínico.

Foi objetivo a determinação dos efeitos do uso da terapia de reposição hormonal oral no período pós-menopausal, estrogênica ou estrogênica associada à progestágenos sobre diversos marcadores séricos de oxidação no plasma.

Como evento ponto-final da aterosclerose precoce determinou-se os efeitos da menopausa e da menopausa tratada com reposição hormonal sobre a aterosclerose precoce carotidiana e sua regulação metabólica.

A abordagem de efeitos metabólicos da TRH foi realizada com a determinação após uso da terapia de reposição hormonal oral das atividades de proteínas reguladoras do metabolismo das lipoproteínas plasmáticas: a lipase hepática, a lipoproteína lipase, a proteína de transferência de colesterol-éster e a proteína de transferência de fosfolípidos.

Foram analisados também os seguintes parâmetros: colesterol, não HDL colesterol (NHDLcol), colesterol de lipoproteínas de alta densidade (HDLcol), colesterol de lipoproteínas de baixa densidade (LDLcol), triglicérides (TG), apolipoproteínas (AI e B 100), lipoproteína (a) Lp(a), autoanticorpos anti-LDL oxidada, anticorpos anti-epítomos proteicos da apolipoproteína B oxidada (anti-D, anti-D2 e anti-A); atividades das proteínas de transferência de colesteril-éster (CETP) e de fosfolípidos (PLTP), da lipase hepática (LH), da lipoproteína lipase (LPL), a atividade séricas da catalase, determinação do nitrato, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e PCR séricos. O parâmetro radiológico medido foi o espessamento íntimo-médio da camada carotídiana (EIM) das artérias carótidas comuns direita e esquerda (ultra-sonografia Doppler).

A análise estatística dos dados foi realizada através do programa SAS. Procedeu-se à correções para idade e IMC, quando indicado. A análise de regressão linear múltipla foi utilizada para acessar a influência dos diversos parâmetros bioquímicos e antropométricos sobre a EIM carotídea.

Foram observados vários efeitos bioquímicos e antropométricos pró-aterogênicos da menopausa: aumento do EIM, do IMC, da medida da cintura e títulos de autoanticorpos anti-LDL oxidada e anti-D.

A terapia de reposição hormonal apresentou efeitos modificadores benéficos reduzindo a lipase hepática (maior magnitude com a terapia conjugada), aumento de HDLcol, redução de autoanticorpos anti-D2 e aumento da concentração da catalase, (maior magnitude na terapia combinada). Outros marcadores de estresse oxidativo os nitratos, as substancias reativas ao ácido tiobarbitúrico e os lipoperóxidos não se modificaram com a TRH.

Nas análises multivariadas a TRH conjugada e estrogênica modulou a EIM através de três fatores: via triglicérides, CETP (negativo) e lipoperóxidos (ao contrário do grupo sem TRH, com sete fatores de regulação); a terapia estrogênica atuou apenas via TG. Houve influência positiva do tratamento sobre a regulação positiva pela PCR a qual desapareceu.

Este estudo reitera o risco aumentado para a doença cardiovascular (DCV) pelo aumento de um conjunto de fatores de risco na mulher em pós-menopausa, fato já demonstrado em estudos prévios.

A TRH foi benéfica do ponto de vista de melhora do perfil de lípidos. Modificou favoravelmente a lipase hepática aumentando o colesterol da HDL, lipoproteína anti-aterogênica. A redução de autoanticorpos contra a oxidação apoproteica B100 e o aumento da atividade sérica da catalase demonstram capacidade antioxidante maior e redução do estresse oxidativo plasmático. Não menos importante e apesar do efeito ter sido insuficiente amostra populacional para alterar a EIM, a TRH modificou a modulação da aterosclerose precoce no sentido de maior ateroproteção.

ABSTRACT

This thesis was composed of studies conducted on 287 women: pre menopausal (69) and post (218); the last with (n=84, WHRT) and without (n=134, WTRT) hormone replacement therapy (HRT), attended at the UNICAMP university hospitals, São Paulo state. The volunteers were recruited from Hospital de Clínicas (n=193) and CAISM hospital (n=94). They aged from 20 to 82 years (y). Postmenopausal women were 40y old and above and presented amenorrhea for at least 1 year. WHRT women were subdivided in 2 groups: one using conjugated estrogens (0.625mg/day, n=48) or estrogen associated with medroxyprogesterone acetate (2.5, 10% of all or 5mg/day 90% of all, n=36).

The methodology was characterized by the menopause definition and through questionnaires and a clinical exam.

The objective of this study was to verify if HRT, estrogenic or combined, modified plasmatic oxidative markers. The end-point for atherosclerosis was the measurement of common carotid intima-media thickness (IMT), as well as its metabolic regulation.

The study also determined the activities of several proteins of lipid metabolism: lipoprotein lipase, hepatic lipase, cholesteryl ester and phospholipid transfer protein under HRT estrogenic or combined. ELISA, nephelometric, enzymatic and radiometric methods were used to determine several parameters: cholesterol, non HDL cholesterol (NHDLchol), HDL-cholesterol, LDL-cholesterol triglycerides (TG), apolipoproteins (AI e B 100), lipoprotein (a), Lp(a), autoantibodies against oxidized LDL, epitopes of oxidized apolipoprotein B100 (anti-D, anti-D2 e anti-A); activities of CETP, PLTP, HL LH and LPL, catalase, nitrates, TBARS, lipid peroxides, CRP. The radiologic common carotid intima-media thickness was done by Doppler ultrasound.

The data were analyzed by the SAS statistical package. Multiple linear regression analyses were used to assess the influence of diverse biochemical markers on carotid IMT.

In this study several postmenopausal anthropometric and biochemical effects were pro-atherogenic: increases in IMT, BMI (body mass index), WC (waist circumference), antibodies against oxidized LDL and anti-apoD antibodies titers.

HRT showed beneficial actions, decreasing HL activity, reducing anti-D2 antibody titers, increasing HDLchol and catalase activity. The nitrate concentration, TBARS and hydroperoxides showed no changes with HRT.

HRT improved the women's lipid profiles but not ApoAI and B100. decreased hepatic lipase and increased HDLchol, an anti-atherogenic lipoprotein, reduced anti-D2 and increased catalase activity.

Although HRT was insufficient to modify IMT, the multivariate analysis demonstrated that conjugated and estrogen HRT modulated IMT through triglycerides concentration, CETP (negative) and lipid peroxides a situation differently from non-treated women that presented 7 modulators; under estrogenic treatment only TG regulated IMT. As well the hormone treatment influenced favorably excluding the effects positive of CRP.

This study reinforces the higher risk of CAD in post-menopausal women and the beneficial action of HRT by improving lipid profiles.

It changed favorably HL, HDL-cholesterol, decreased antibodies against oxidized apoB100 and increased catalase activity indicating reduced oxidative stress; not less important are the results showing that HRT although not changing carotid IMT, modified beneficially the relationship of precocious atherosclerosis and its modulators suggesting an atheroprotective action.

INTRODUÇÃO



CLIMATÉRIO E MENOPAUSA

De acordo com a Organização Mundial da Saúde o climatério é o processo de transição entre o período reprodutivo e o não reprodutivo da mulher que ocorre dos 35 aos 65 anos quando os ciclos menstruais se tornam irregulares e cessam progressivamente. A partir de então a mulher não dispõe mais de patrimônio folicular para uma gravidez (Wolfgang Halbe e Fonseca, 1999).

Costuma-se confundir ou, até mesmo, inverter os conceitos de menopausa e climatério. O climatério é o período fisiológico durante o qual ocorre a regressão da função ovariana, portanto, precede a menopausa. O climatério engloba a pré-menopausa, menopausa e a perimenopausa. Termina um ano após a menopausa e caracteriza-se por perturbações menstruais de duração indefinida, mas que obrigatoriamente cessam após um período de 12 meses de amenorréia (Wolfgang Halbe e Fonseca, 1999).

Para a Organização Mundial da Saúde, o climatério é uma fase da vida biológica da mulher, não considerada processo patológico. Mesmo na ausência de lesão orgânica ou funcional localizada nos demais sistemas do organismo, o climatério pode ser acompanhado de manifestações clínicas, sendo as mais características os sintomas vasomotores: ondas de calor e sudorese. Aproximadamente 75% das mulheres climatéricas apresentam ondas de calor, em episódios que podem durar semanas ou continuar por alguns anos. Quando se restringe o emprego do termo síndrome do climatério somente para mulheres cujo bem estar biopsicossocial se encontre afetado pelas manifestações clínicas, a incidência da síndrome climatérica cai para 25% dos casos ou menos. Computando-se as mulheres, cujos sintomas são de curta duração, que desaparecem sem interferência terapêutica, a cifra é um pouco maior. Os sintomas crônicos são encontrados, principalmente, na síndrome pós-climatérica, já em plena pós-menopausa, e decorrem das alterações devidas ao envelhecimento e ao déficit hormonal: atrofia urogenital e tegumentar e aceleração dos fenômenos da osteoporose e da aterosclerose.

O diagnóstico do climatério é eminentemente clínico:

a) pré-menopausa - mulheres com mais de 40 anos, com sangramento irregular, acompanhado ou não de sintomas (neurovegetativos, neuropsíquicos ou genitais).

b) pós-menopausa - mulheres em idade compatível com a menopausa natural (acima de 40 anos), em amenorréia há mais de 1 ano, com ou sem sintomas (neurovegetativos, neuropsíquicos ou genitais, como o comprometimento do trofismo vaginal), ou com menos de um ano e que não apresentam sangramento de supressão após a ingestão de 10mg de medroxiprogesterona por 5 a 10 dias (Marinho et al., 2001).

Em alguns casos, pode ser útil a dosagem do hormônio folículo estimulante (FSH) especialmente em mulheres histerectomizadas mais jovens, assintomáticas ou com sintomas sugestivos de deficiência estrogênica, nas quais se pretende fazer a reposição hormonal (Marinho et al., 2001).

A cessação permanente da ovulação cíclica com conseqüente declínio da produção de estrógeno pelos ovários e suspensão menstrual definitiva é um fenômeno natural, que ocorre na mulher ao redor dos 50 anos de idade (variável de acordo com fatores comportamentais, genéticos e ambientais) e representa o fenômeno da menopausa (Fonseca AM, 1997).

A menopausa pode resultar também de ooforectomia bilateral cirúrgica, realizada na mulher ainda em idade fértil (Fonseca AM, 1997). A idade de ocorrência da menopausa natural varia com fatores comportamentais, genéticos e ambientais. No Brasil, estudo realizado em mulheres brasileiras residentes em Campinas (Pedro AO, 1999) mostrou que a média etária da ocorrência da menopausa natural foi de 47,5 anos, inferior à média etária da menopausa em mulheres de países industrializados do Ocidente (McKinlay et al, 1972) e dos Estados Unidos (Stanford et al, 1987) que são ao redor de 50 e 51,1 anos, respectivamente.

Sabe-se que o tabagismo antecipa-a em 1,5 a 2 anos. Outros fatores que a antecipam são a nuliparidade, os ciclos menstruais de pequena duração e a ooforectomia unilateral. Em contraste, ciclos menstruais irregulares e elevado nível sócio-econômico, atrasam a menopausa (Barrwtti-Connor e Stuenkel, 1999).

Fatores nutricionais também alteram a menopausa. Por exemplo, a dieta vegetariana, pode adiantar a menopausa em aproximadamente dois anos; elevado consumo de gordura, colesterol e café também aceleram a menopausa, enquanto o moderado consumo de álcool atrasa (Barrwtti-Connor e Stuenkel, 1999).

Com relação aos fatores genéticos, observa-se que a menopausa precoce de mães está correlacionada a menopausa precoce nas filhas. Outros fatores, como abortos espontâneos, idade da menarca, peso, uso de anticoncepcional oral, podem influenciar na idade da menopausa, mas seu impacto necessita ser melhor estudado. (Barrwtti-Connor e Stuenkel, 1999).

Nos Estados Unidos aonde a idade mediana da menopausa é entre 50 e 51 anos, cerca de um quarto das mulheres apresenta a menopausa espontânea antes dos 45 anos, e mais ou menos metade a apresenta entre 45 e 50 anos, e o quarto restante depois dos cinqüenta anos. Entretanto muitos ginecologistas ficam impressionados com a freqüência com que pode persistir uma menstruação aparentemente regular durante a sexta década (Barrwtti-Connor e Stuenkel, 1999).

A transição menopausal começa com a pré-menopausa, condição clínica caracterizada por amenorréia com três meses de duração, em mulheres com mais de 45 anos de idade, sem alteração da regularidade dos ciclos menstruais anteriores. A condição clínica caracterizada por amenorréia com 3 a 11 meses de duração, em mulheres com mais de 45 anos de idade, é denominada perimenopausa. Portanto, a perimenopausa é o período intermediário entre a pré-menopausa e a menopausa cuja existência só se justifica em trabalhos científicos (Wolfgang Halbe e Fonseca, 1999).

A pré-menopausa é representada por mulheres com ciclos menstruais regulares ou com padrões menstruais similares ao que elas tiveram durante toda vida reprodutiva; a perimenopausa - mulheres com ciclos regulares durante os últimos doze meses mas com mudança do padrão menstrual e a pós-menopausa - quando o último período menstrual ocorreu pelo menos há doze meses da entrevista.

Calculou-se que existem cerca de 380 000 oócitos disponíveis, contidos nos folículos ovarianos na menarca. Em cada ciclo menstrual, certo número dessas estruturas foliculares é estimulado para o desenvolvimento, apenas para sofrerem atresia, enquanto que o folículo dominante evolui até a ovulação. Ocorre um decréscimo geral na população de folículos contendo oócitos e um aumento relativo na quantidade de estroma ovariano. Depois de aproximadamente 35 anos de idade o ovário humano começa a diminuir de volume e peso, contém menos oócitos e estruturas foliculares e mais folículos atrésicos e em degeneração. Essa perda de oócitos e folículos levam finalmente a uma diminuição gradativa de estrogênio e inibina.

Vários anos antes da menopausa, a inibina diminuída produz uma elevação do hormônio folículo estimulante (FSH), a primeira indicação laboratorial da perimenopausa.

O nível de estradiol em mulheres após a menopausa está reduzido em 75% em relação aos níveis em pré-menopausa. Alguns estudos de menopausa natural têm demonstrado que os níveis de estrógeno não vão caindo gradualmente, mas tornam-se muito menores no ano que antecede a última menstruação, permanecendo estáveis após.

O FSH aumentado, que é dosado durante o ciclo e não apenas nos estágios iniciais, induz um rápido desenvolvimento folicular, e o encurtamento posterior dos ciclos é o primeiro indício clínico da perimenopausa.

À medida que o número de folículos diminui ainda mais, a produção de estrogênio continua a cair e alcança um nível não compatível com a indução de uma onda de hormônio luteinizante e a ovulação pode terminar ou, com mais frequência, pode tornar-se irregular. Clinicamente isso está associado com ciclos irregulares e uma fase lútea encurtada ou ciclos anovulatórios com estímulo estrogênico sem oposição e hiperplasia de endométrio. Quando a ovulação cessa por completo começa a elevação do FSH e surge a menopausa. Contudo é importante que os mecanismos de retrocontrole possam produzir reajustes entre a hipófise e o ovário, enquanto existem folículos restantes no ovário para responderem, e durante um período de um ou dois anos pode ocorrer uma inversão dos dados laboratoriais bem como sinais e sintomas clínicos.

Embora o ovário menopáusico possa não ter folículos, as células normalmente secretam estrogênio e progesterona, portanto a maioria das mulheres menopausadas não está totalmente desprovidas de estrogênio. As células do estroma ovariano, bem como as células da supra-renal têm uma capacidade esteroidogênica para produzirem androstenediona que é convertida em estrona pela pele e seus apêndices. Os ovários em aproximadamente um terço das mulheres idosas apresentam hipertecose das células do estroma ovariano, indicando uma função esteroidogênica contínua. A menopausa é, sem dúvida, devida à deficiência da função ovariana decorrente da exaustão do depósito de folículos primários e da esteroidogênese diminuída associada. Isso por sua vez perturba os mecanismos de retroalimentação hipofisário-hipotalâmicos, ocasionando uma elevação das gonadotrofinas hipofisárias e talvez do um aumento no hormônio hipotalâmico de liberação da gonadotrofina. Embora a secreção ovariana de estradiol e progesterona esteja muito reduzida, o ovário menopáusico ainda é capaz de uma esteroidogênese substancial. Apresenta uma secreção direta em quantidades mínimas de estrona e estradiol e seu estroma produz androstenediona e testosterona pelo estímulo contínuo do hormônio luteinizante. Assim embora as mulheres menopáusicas tenham um meio estrogênico inferior ao necessário para a função reprodutora, ele não é negligenciável nem ausente, mas satisfatório para manter os tecidos de apoio (Edwards et al., 1995).

O diagnóstico da menopausa é eminentemente clínico:

- mulheres em idade compatível com a menopausa natural (acima de 40 anos), em amenorréia há mais de um ano, com ou sem sintomas (neurovegetativos, neuropsíquicos ou genitais)
- ou com menos de um ano e que não apresentam sangramento de supressão após a ingestão de 10mg de medroxiprogesterona por 5 a 10 dias. (Marinho et al., 2001).

TRATAMENTO DA MENOPAUSA

A Sociedade Norte-americana de Menopausa estabelece as seguintes recomendações a respeito de terapia de reposição hormonal: as primeiras indicações são para sintomas urogenitais e vasomotores. A única indicação para tratamento com progesterona é a proteção endometrial. A terapia de reposição hormonal não deve ser prescrita para prevenção primária ou secundária de doença coronariana. As terapias alternativas devem ser consideradas para prevenção de osteoporose. O estabelecimento de um perfil de risco individual é essencial. Ênfase para a restrição de uso hormonal em pacientes com risco de doença tromboembólicas (Gurdol, et al., 1997).

Na TRH é imprescindível considerar os tipos de hormônios, as vias e esquemas de administração. Os hormônios mais utilizados neste período são os estrógenos e progesteronas.

A ação estrogênica no organismo vai depender além da dose utilizada, da sua estrutura química. Os esteróides sintéticos (alcalinos) têm efeitos mais pronunciados que os esteróides naturais, como o 17- betaestradiol.

A forma de administração de estrógenos afeta a magnitude da resposta metabólica. A administração oral apresenta como vantagens o menor custo, a maior facilidade de administração, bem como a possibilidade de ajuste de dose

e interrupção quando necessário. Os estrógenos quando administrados por via oral, são metabolizados no fígado e excretados pela urina e bile. Em sua passagem pelo fígado, inibem a lipase hepática, com conseqüente aumento dos níveis do HDLcolesterol.

A via parenteral tem como vantagem uma boa aceitação pelas mulheres, principalmente aquelas portadoras de distúrbios digestivos, pois provocam um menor impacto sobre o metabolismo glicídico, além de apresentar uma absorção hormonal uniforme. Entre elas citam-se: a transdérmica (na apresentação de adesivos ou gel); os implantes cutâneos; a nasal, a vaginal e a intra-uterina (DIU).

O efeito hipolipemiante das preparações estrogênicas transdérmicas é muito menos significativo do que o da preparação oral, embora ambas as formas levem ao mesmo grau de vasodilatação. Ainda não se sabe como a preparação transdérmica afeta os eventos cardiovasculares, porém já se demonstrou que a TRH transdérmica atua mais intensamente na redução da superóxido dismutase (SOD) quando comparada com a TRH via oral (Gurdol, et al., 1997).

O uso de esquema combinado cíclico, ou seja, a prescrição de estrógenos durante 21 a 25 dias associados à progesterona (10 a 12 últimos dias dos estrógenos), está indicado em mulheres com útero na pré-menopausa, pois nas mulheres não histerectomizadas a reposição hormonal combinada com a progesterona protege contra a neoplasia endometrial (Gurdol et al., 1997).

Na pós-menopausa pode-se utilizar o esquema combinado contínuo, principalmente naquelas mulheres que não desejam menstruar.

Indica-se o esquema com estrógenos, isoladamente, nas mulheres histerectomizadas (Wolfgang Halbe e Fonseca, 1999).

Os andrógenos são utilizados isoladamente ou em associação com os esquemas anteriores; são indicados, principalmente, para os casos de osteoporose, depressão, alteração de sexualidade e sintomatologia resistente aos

medicamentos convencionais. Os fitoestrógenos (isoflavonas e lignanas) até o momento estão indicados para a sintomatologia de ondas de calor; entretanto a literatura é ainda controversa (Bednarek-Tupikowska, 2001).

A reposição hormonal pós-menopausal pode prevenir a formação das mudanças ateroscleróticas embora seus mecanismos ainda não estejam totalmente esclarecidos (Barrett-Connor e Bush, 1991).

ESTRÓGENOS

O estrogênio é secretado principalmente pelos ovários e também sintetizado em baixas concentrações pelo córtex supra-renal. Existem três formas distintas encontradas no organismo feminino: o 17 beta estradiol, a estrona e o estriol. Estas três formas são derivadas de esteróides e sintetizadas a partir do colesterol (Wolfgang Halbe e Fonseca, 1999).

O uso isolado de estrógeno, não antagonizado por progestágenos na pós- menopausa causa alta incidência de sangramento anormal e tem um risco dose dependente de hiperplasia endometrial e câncer do endométrio (de duas a quatro vezes, maior do que o visto em mulheres que não usam hormônio). Esse risco parece ser reduzido para valores muito baixos com a adição de progesterona e esta redução também parece ser dose dependente e duração dependente (Vura et al., 2005). O uso dos estrógenos isolados, não antagonizados por progestágenos, deve ser restrito apenas a mulheres histerectomizadas.

Há controvérsias com relação a um possível risco de desenvolvimento de carcinoma de mama em mulheres em uso de reposição estrogênica. Enquanto uma metanálise não mostrou maior risco (Greendale GA, 1999), outra mostrou um risco relativo de 1,3 somente após 15 anos de uso continuado de estrogênio (Massafra et al. 1997).

Outros efeitos colaterais indesejáveis do uso do estrogênio na mulher durante a menopausa são o desenvolvimento ou recrudescimento da calculose biliar, colecistite aguda e o reaparecimento de cefaléias tipo vasomotora (Radowski, et al., 2003).

Até o presente não existe conclusão válida quanto à influência do tratamento de reposição hormonal sobre o câncer de ovário, embora os resultados dos estudos até agora realizados sejam tranquilizadores. Em relação ao câncer de cólon, a sua incidência parece estar reduzida em mulheres utilizando o tratamento de reposição hormonal (Wolfgang Halbe e Fonseca, 1999).

No nível celular, os estrógenos regulam a produção de RNA mensageiro que está envolvido na produção de proteínas que regulam o metabolismo lipídico (Wood et al., 1995; Mertz, 1990).

No tecido adiposo o estradiol tem efeito direto na lipoproteína lipase que é sintetizada mais rapidamente (Guemouri, 1991).

Os esteróides sexuais além de influenciar o metabolismo lipídico podem alterar as apolipoproteínas, que constituem a parte protéica do sistema de transporte dos lípidos. No fígado, o estradiol regula a síntese de apolipoproteínas para VLDL e HDL. Reduz a síntese de apoB 100 enquanto estimula a síntese de apo A1 e apo A2. No hepatócito, o estrógeno estimula a síntese de apoCIII enquanto diminui a síntese de lipase hepática. Portanto, estríol através da regulação do metabolismo lipídico nos adipócitos e hepatócitos modula a concentração dos lípidos no plasma e a queda de seus níveis, na mulher pós-menopausada, incide em alterações do metabolismo lipídico (Deng et al., 1990).

O estrógeno exógeno atua através de dois mecanismos de ação: ação rápida (não genética) e ação lenta (genética). A ação rápida corresponde à vasodilatação imediata (minutos após a sua administração) e efeitos protetores diretos na função vascular. O efeito direto vasodilatador ocorre pela liberação de

óxido nítrico, ação antagonista à do canal de cálcio e efeito antiproliferativo na musculatura lisa da parede vascular (Wakatsuki et al., 2003).

O efeito tardio ocorre devido ao aumento da expressão de genes que produzem várias substâncias vasodilatadoras, as alterações benéficas no perfil lipídico e ao aumento de resistência para a aterosclerose (Wood et al., 1995; Mertz, 1990; Guemouri, 1991).

A ação estrogênica na TRH através do estímulo da síntese hepática de receptores de LDL (Wakatsuki et al., 2003) diminui a concentração de colesterol total sangüíneo, de LDLcol, lipoproteína (a) e apolipoproteína B, e pode aumentar os níveis de HDLcol e TG (Barrett-Connor e Bush, 1991; Wood et al., 1990; Lowe et al., 2002; Rontu et al., 2004).

Outros efeitos estrogênicos favoráveis incluem a melhoria do tônus vasomotor, aumento da sensibilidade à insulina, atenuação da aterogênese e melhoria no relaxamento miocárdico (Barrett-Connor e Bush, 1991; Guemouri et al., 1991; Pereira et al., 2003). O estrógeno pode também atenuar o processo inflamatório associado com a aterosclerose pela melhora da reconstituição da célula endotelial e inibição da proliferação de células musculares lisas em resposta à injúria vascular. Essas moléculas participam do recrutamento de leucócitos na superfície do endotélio e iniciam o processo aterosclerótico (Feletou e Vanhoutte, 2006).

O estrógeno reverte a vasoconstrição paradoxal após a infusão de acetilcolina na artéria aterosclerótica (Barrett-Connor e Bush, 1991; Ke et al., 2003). A ação vasodilatadora é vista com preparações de TRH oral e transdérmica e parece não ser atenuada pela adição de progesterona (Akav et al., 2000).

O estudo PEPI (Signorelli et al., 2001) mostrou o aumento de níveis de HDLcol, quando a TRH é efetuada com qualquer um dos seguintes esquemas terapêuticos: estrógenos eqüinos conjugados VO (0,625 mg/dia), estrógenos eqüinos conjugados mais acetato de medroxiprogesterona (10 mg/dia), durante

12 dias no mês, colesterol eqüino conjugado mais acetato de medróxiprogesterona contínuo (2,5 mg/dia) ou colesterol eqüino conjugado mais progesterona micronizada (200 mg/dia), por 12 dias ao mês (Signorelli et al., 2001).

O aumento do HDLcol é atenuado com adição de progesterona na TRH, porém a progesterona micronizada possui o menor efeito atenuante. A TRH (em todos os esquemas de tratamento citados acima) diminui os níveis de fibrinogênio.

Estrógenos reduzem o LDLcol e aumentam o HDLcol; entretanto essas alterações no perfil lipídico contribuem somente com aproximadamente 25% do efeito protetor do estrógeno (Bhavnani et al., 2001). Outros potenciais mecanismos incluem proteção contra LDL oxidação, redução na lipoproteína a, aumento da fibrinólise e aumento da sensibilidade a insulina. Nas artérias o estrógeno parece também inibir a formação de LDLcolesterol oxidada, um acelerador da aterogênese precoce (Van Der Loo, 2000).

PROGESTÁGENOS

Os progestágenos, também chamados de progestogênios ou gestagênios são hormônios com efeito similar ao da progesterona, o único progestágeno natural. (Kannel, 1987). Todos outros progestágenos são sintéticos e são, por vezes, chamados de progestinas. Os progestágenos têm a capacidade de mudar a mucosa uterina da fase proliferativa para a fase secretória. Seus efeitos dependem, entretanto, da dosagem e da fase do ciclo menstrual em que são administrados. A progesterona é um hormônio esteróide produzido, a partir da puberdade, pelo corpo lúteo e pela placenta durante a gravidez. É o segundo hormônio feminino e é produzido principalmente no ovário. A progesterona age em todo o corpo físico e emocional da mulher preparando-a para a gravidez. É um hormônio essencial na manutenção da gravidez.

É primeiramente sintetizado pelo corpo lúteo do ovário, até cerca de 8 semanas de gestação, sendo depois sintetizado pela placenta (Szafran e Smielak-Korombel, 1998). Muitas mulheres inférteis, com falhas de implantação e com aborto recorrente apresentam baixos níveis de progesterona no sangue, sendo indicada uma suplementação de progesterona na fase inicial da gravidez. Estimula as células do endométrio a se proliferarem e garante com que o embrião se fixe no cório para a formação da placenta. Também é o hormônio responsável pela continuidade da gravidez pois evita a descamação do endométrio, que ocasionaria um aborto (Bednarek-Tupikoviski et al., 2004). A progesterona natural é pouco absorvida quando ingerida oralmente e vários progestágenos sintéticos têm sido desenvolvidos. Podem ser divididos em dois grupos: 1) pregnanos – derivados da 17 alfa-hidroprogesterona, como o acetato de medroxiprogesterona; 2) cestranos – derivados da 19 nortestosterona, como a nortestosterona e a levonorgestrona. Em geral, os pregnanos têm alta afinidade por receptores de progesterona, mínimo efeito estrogênico e atividade androgênica, enquanto os progestágenos derivados da nortestosterona possuem somente atividade androgênica. A tibolona pertence ao grupo da nortestosterona. É um esteróide complexo, que apresenta, além da atividade estrogênica, propriedades progestagênicas e androgênicas (Vural et al., 2005).

Os progestágenos apresentam ação protetora sobre o endométrio, evitando o aparecimento de lesões pré-malignas e diminuindo a incidência das malignas. Os estrógenos associados aos progestágenos podem ser administrados mediante dois tipos de esquemas: cíclico ou contínuo. O esquema cíclico compreende a administração dos estrógenos entre 21 e 25 dias por mês, associados ao progestágenos nos 10 ou 14 últimos dias. O esquema contínuo compreende o uso ininterrupto de estrógenos associados ao progestágeno durante 10 a 14 dias mensais. O esquema cíclico é utilizado geralmente antes da menopausa ou nos primeiros anos após a menopausa, por que ocorrem menstruações ou metrorragias com maior frequência. O esquema combinado contínuo é preferido no caso de não haver desejo de menstruações ou na

pós-menopausa avançada (mais de cinco anos depois da menopausa) (Stampfer et al., 1991).

A progesterona é a principal fonte de efeitos colaterais no tratamento de reposição hormonal, que pode simular a síndrome pré-menstrual. Por essa razão foi introduzido esquema que consiste no uso de estrógeno associado ao progestágeno a cada quatro meses. As contra-indicações ao uso dos progestágenos são as hepatopatias graves e antecedentes tromboembólicos (Ozden et al., 2001).

Os progestágenos possuem efeito oposto à ação dos estrógenos. O uso de progesterona natural e de pregnano tem pouco efeito nas lipoproteínas plasmáticas porém o uso de estrógenos, combinados com progesteronas, tem mostrado um aumento dos níveis de VLDL e LDL. Os progestógenos possuem efeito negativo no perfil lipídico, inibindo a taxa de metabolismo de todas as lipoproteínas bem como efluxo e influxo celular do colesterol, porém reduzem os níveis de triglicerídeos (Kannel, 1987; Szafran e Smielak-Korombel, 1998).

DOENÇA CARDIOVASCULAR NO SEXO FEMININO E EFEITOS DA TRH

A doença cardiovascular (DCV) representa a maior causa de mortalidade e morbidade no sexo feminino, acima de qualquer tipo de câncer, tanto nos países desenvolvidos (Estados Unidos e Europa) como no Brasil (Kannel, 1997).

Do ponto de vista anátomo-patológico, a DCV incide mais tardiamente na mulher do que no homem principalmente nas artérias coronárias. Porém permanece a primeira causa de morte e inabilidade física em mulheres, mesmo com uma defasagem de 10 anos em relação ao homem (Koivu et al., 2004).

Durante as duas últimas décadas, o número absoluto de mulheres que falecem por DCV continua a crescer, mesmo com a redução observada no índice de mortalidade e o significativo declínio da taxa de mortalidade por doença cardiovascular nos EUA, que tem sido muito menos dramático na mulher do que no homem. De acordo com os cálculos atuais das 113 milhões de mulheres nos Estados Unidos, 32 milhões (28%) têm 50 anos ou mais e 11% têm 65 anos ou mais (Szafran e Smielak-Korombel, 1998).

As doenças cardiovasculares causam anualmente 8,5 milhões de mortes entre mulheres, sendo responsável por um terço de todas as mortes do sexo feminino no mundo todo. É a maior causa de morte entre ala feminina, superando em muito os índices de mortalidade do câncer de mama, motivo de enorme preocupação no mundo feminino. As mulheres morrem cinco vezes mais por doença cardiovascular do que por câncer de mama (Szafran e Smielak-Korombel, 1998) e em países desenvolvidos metade das mortes ocorre em mulheres com mais de 50 anos.

Nas últimas décadas, a incidência de doenças cardiovasculares em mulheres tem, em muitos países, igualado ou mesmo ultrapassado o índice masculino. De acordo com dados da Sociedade Brasileira de Cardiologia, na cidade de São Paulo, por exemplo, a relação de mortalidade por doença arterial coronária entre homens e mulheres era de dez homens para cada mulher em 1970. Porém, em 2002 a proporção já mudou para 2,5 casos masculinos para cada feminino. Isto se deve essencialmente ao fato de que com o progressivo aumento da expectativa de vida, o contingente de mulheres com mais de 50 anos (e, portanto, em pós-menopausa) é muito maior hoje do que em décadas anteriores. Hoje, a média da expectativa de vida das mulheres dos países ocidentais é de 71 anos, e será mais prolongada. Assim, uma mulher que atualmente alcança os 50 anos pode esperar outros 21 anos de vida e gastar um terço de sua vida após a menopausa, ou seja, com baixos níveis de estrógeno (Vural et al., 2005).

O declínio da produção de estrógenos endógenos, que ocorre com a menopausa, é a razão principal para o aumento de risco de doença cardiovascular em relação às mulheres na pós-menopausa descrito em muitos estudos (Alcav et al., 2000; Szafran e Smielak-Korombel, 1998; Van Der Loo et al., 2000).

Numerosos autores têm mostrado efeitos favoráveis da suplementação com estrógenos exógenos após a menopausa (Van Der Loo, 2000). Entretanto, esses dados observacionais necessitam ser interpretados com cuidado. As mulheres que usam estrógeno podem estar mais direcionadas para exercitar-se, seguir dieta hipogordurosa e abraçar hábitos de vida saudáveis (Feletou e Vanhoutte, 2006; Bednarek-Tupikoviski et al., 2004). Esses fatores são de difícil determinação em estudos observacionais. Por isso, os estudos são passíveis de sofrer influências de fatores dificilmente controláveis e que podem se transformar em vieses (bias) metodológicos, os quais acabam influenciando também os resultados. Estudos coortes são menos factíveis de sofrerem desses vieses, mas somente estudos prospectivos, randomizados e controlados, respondem com maior fidelidade se uma forma terapêutica relaciona-se a um evento em análise.

Estudos epidemiológicos observacionais mostram uma redução de 40 a 50% nos eventos cardiovasculares em mulheres que recebem TRH. (Pereira et al., 2003).

O estudo de Framingham foi o primeiro ensaio clínico prospectivo coorte a estabelecer uma relação de risco entre menopausa e aparecimento de doença coronária, a qual era independente do mecanismo natural ou cirúrgico da menopausa (Pereira, 2003).

Pouco menos de uma década depois, Stampfer e colaboradores (1991) publicaram sua primeira análise do Nurses Health Study, posteriormente estendido para um total de mais de 148 000 mulheres sadias pós-menopausa por 10 anos. Nesse estudo prospectivo coorte, os autores demonstraram que as mulheres que faziam uso de estrógeno tinham uma significativa redução de 50% na taxa de desenvolvimento de DAC em relação às mulheres que nunca haviam usado estrógeno.

O estudo HERS (Heart and Estrogen-Progestin Replacement Study), publicado por Hulley e colaboradores, ensaio clínico prospectivo randomizado, cego, placebo controlado, testou a utilização de 0,625 mg de estrógeno associado a 2,5 mg de progesterona em 2763 mulheres na menopausa e com cardiopatia coronária em relação ao desenvolvimento de eventos cardíacos e não cardíacos ao final de 4 anos de seguimento. Após 4,1 anos de tratamento, a taxa de doença coronariana não foi diferente entre os grupos tratados com medicação ou com placebo (12,5% x 12,7%) embora houvesse melhora do perfil lipídico das mulheres tratadas com terapia hormonal (decréscimo de 11% no LDLcol e aumento de 10% no HDLcol). Não se observou qualquer diferença significativa nas taxas de óbitos cardíacos e não cardíacos, IAM não fatal e necessidade de revascularização miocárdica entre mulheres em uso de terapia hormonal em relação ao placebo. Além disso, houve um aumento significativo de quase três vezes na taxa de eventos tromboembólicos venosos em relação ao placebo e o estudo mostrou um aumento de 50% no risco de doença cardiovascular no primeiro ano de acompanhamento.

O ERA Study (Estrogen Replacement and Atherosclerosis), apresentado no Colégio Americano de Cardiologistas avaliou a estenose arterial coronária antes e depois do tratamento com 0,625 mg/dia de estrógenos eqüinos conjugados e 0,625 mg/dia de estrógenos eqüinos conjugados mais 2,5 mg/dia de medroxiprogesterona contra placebo. A média de seguimento foi de 3,2 anos. O diâmetro médio luminal coronário não apresentou diferença significativa entre os grupos e também não se notou alteração significativa no diâmetro da estenose ou desenvolvimento de novas lesões com o tratamento. O estudo mostrou não haver benefício em mulheres com DAC em terapia estrogênica.

Uma das vertentes do estudo WHI (Woman's Health Initiative Study) (Signorelli et al., 2001), foi recentemente abortado devido ao fato de os riscos serem muito maiores do que os benefícios encontrados. Os principais achados foram: aumento de risco de trombo-embolismo e diminuição de risco de fraturas por osteoporose. Nenhum efeito benéfico foi detectado quanto à doença cardiovascular.

As informações sobre a importância da progesterona administrada como parte da TRH no estresse oxidativo são insuficientes e apresentam controvérsias.

Com o uso da TRH mista, estudos mostram melhora dos níveis lipídicos sanguíneos, das apolipoproteínas, do *lag time* da oxidação das LDL, da taxa de propagação e da concentração máxima de dienos conjugados como índices marcadores da suscetibilidade da LDL à oxidação pelo cobre (Radowicki et al., 2003; Jackson et al., 1993).

Estudos utilizando associação de estradiol com AMP confirmam os resultados anteriores, ou seja, a inibição da geração de radicais livres e o aumento do potencial antioxidante aos níveis encontrados em mulheres na pré-menopausa (Bednarek-Tupikoviski et al., 2004; Rontu, 2004). Em sintonia com os resultados anteriores, estudo comparando TRH mista com estrogênica isolada mostra aumento dos níveis de óxido nítrico (NO) séricos, após tratamento hormonal (Bureau et al., 2002).

Interessante estudo americano mostrou diferença racial na resposta endotelial ao uso de TRH. Mulheres caucasianas apresentaram níveis de nitrito, (reação de Greiss), significativamente mais elevados quando comparado com as americanas africanas, após o uso de TRH mista (Telci et al., 2002).

Em contra partida, estudo que comparou uso de TRH durante 11 anos, estrogênica isolada (estradiol) e mista (estradiol associado à levonorgestrol) não mostrou diferenças na capacidade de inibição da oxidação da LDL lipoproteína, ou na habilidade de resistência, in vivo e in vitro, à oxidação lipídica (Peterson, 1998).

Do mesmo modo, um estudo francês comparativo de estresse oxidativo e oxidabilidade de LDL em mulheres com e sem TRH mista (estradiol e didrogestrona) não mostra influência no *status* oxidativo mesmo com modificações benéficas no perfil lipídico (Bureau et al., 2002). Em sintonia, Massafra et al (1997), mostraram que a progesterona não induz a mudanças no EO plasmático.

DISLIPIDEMIAS E EFEITOS DA TRH

As dislipidemias principalmente aquelas com elevação do colesterol de baixa densidade e redução do colesterol de alta densidade, além do aumento dos triglicérides, são relacionadas com a doença aterosclerótica, IAM e morte cardíaca (Peterson, 1998). Os lípides circulam no plasma na forma de macroagregados moleculares designados lipoproteínas. As principais classes de Lp são: os quilomícrons (QM), as VLDL, as lipoproteínas de densidade intermediária (intermediate density lipoprotein, IDL), as LDL e as lipoproteínas de densidade alta (high density lipoproteins, HDL) (Ashok et al., 2005).

O estudo de Framingham demonstrou que, apesar do colesterol aumentar progressivamente com a idade em ambos os sexos, o incremento tem maior magnitude nas mulheres, principalmente após os 45 anos.

Alguns estudos demonstram que mulheres no período pré-menopausa têm menores, níveis plasmáticos de LDLcol que os homens. Entretanto, após a idade de 50 anos, estes níveis se elevam consideravelmente, ultrapassando inclusive aos dos homens de mesma faixa etária. Em relação ao HDLcol, nenhuma modificação significativa foi observada nas mulheres entre os períodos pré e pós-menopausa, mas seus níveis plasmáticos sempre foram maiores que nos homens.

Os triglicérides séricos também aumentam com a idade e estão associados com a elevação das VLDL. (Fujii et al., 2005).

A lipase hepática (LH) é uma proteína pequena de 472 aa que apresenta 50% de homologia com a lipase periférica (LPL) e liga-se aos proteoglicanos de heparan na superfície dos hepatócitos. É produzida primariamente pelo hepatócito, mas também encontrada na glândula adrenal e nos ovários. É um membro da superfamília das lipases e é homóloga da lipoproteína lipase e da lipase pancreática. Diferentemente da lipoproteína lipase, não necessita de apo CII para sua ativação. Pode hidrolisar triglicérides e

fosfolípidos de todas as lipoproteínas plasmáticas, mas atua predominantemente na conversão de lipoproteínas de densidade intermediária (IDL) para LDL e na hidrólise de triglicérides de HDL no período pós alimentar.

A seguir alguns dados de literatura sobre a aterogenicidade da LH. Por um lado pode ser considerada como fator pró- aterogênico devido à (Tranquilli et al., 1995; Massafra et al., 1997; Radowski et al., 2003; Vogel, 1997; Fonceca et al., 2000; Thomas, 1999):

- relação inversa da atividade de LH com concentrações de HDL anti- aterogênico;
- associação positiva com o nível de partículas de LDL pequenas e densas;
- camundongos com deficiência de apo E desenvolvem menos aterosclerose se forem também deficientes em LH.

Outros autores mostram que pode ser considerada como fator anti-aterogênico (Vogel, 1997; Fonceca et al., 2000; Thomas, 1999):

- camundongos transgênicos para LH têm 42% menos depósito de colesterol aórtico do que não transgênicos
- pacientes com deficiência genética de LH desenvolvem DAC.

A LPL hidrolisa os triglicérides dos quilomícrons e das VLDL e em decorrência as partículas aumentam sua proporção relativa de colesterol e diminuem seu tamanho transformando-se no que classicamente denominam-se remanescentes. A reação ocorre no endotélio vascular onde a enzima fica ancorada (proteoglicanos sulfatos de heparan) e na hidrólise são liberados ácidos graxos para uso do metabolismo celular. A LPL necessita de APO CII para sua ativação e é fortemente inibida pelos ácidos graxos que fazem o *feedback* no controle de sua atividade. Um estudo mostra aumento de atividade de LPL após a menopausa que parece não se alterar com a TRH (Subbiah et al., 2004).

A CETP é uma glicoproteína de 74 kda que catalisa a transferência de lípides não polares como triglicérides e ésteres de colesterol entre as lipoproteínas plasmáticas. Tem fundamental importância no metabolismo do HDL e no transporte reverso de colesterol. Porém, seu significado clínico ainda é controverso. Catalisando a troca de triglicérides de VLDL por colesterol de HDL leva à formação de partículas de HDL ricas em triglicérides que são substrato para LH ocorrendo assim a formação de pré-beta HDL, partículas anti-aterogênicas, responsáveis pelo transporte reverso do colesterol. Por outro lado, a atividade de CETP na transferência de colesterol das HDL leva à formação de partículas de VLDL e LDL ricas em colesterol que são chamadas “beta-VLDL”, que são pró-aterogênicas (Ramirez-Bosca, 2004; Berliner et al., 1995).

A literatura a respeito de climatério e atividade de CETP é bastante controversa. Estudo mostra que a atividade de CETP nas mulheres em pós-menopausa é significativamente mais baixa (versus pré-menopausa) e que o estrógeno exógeno aumenta sua atividade (Tardif, 2005).

Já em outro estudo, a concentração de CETP foi similar entre grupos em pré e pós-menopausa, com TRH (estrogênica ou mista) e sem TRH.

Prévio estudo mostra que a concentração de CETP não se altera com a TRH em mulheres pós-menopausadas (Signorelli et al., 2001).

Outro autor (Agarwal et al., 2005) mostrou que a concentração de CETP em mulheres pós-menopausadas foi significativamente mais baixa que nas pré-menopausadas.

ESTRESSE OXIDATIVO NO CLIMATÉRIO E TRH

Existe uma relação direta entre a perda progressiva da proteção contra a aterosclerose na pós-menopausa e o aumento do estresse oxidativo (EO) quando são comparadas aos homens da mesma idade. No homem,

o envelhecimento poderá depender apenas da dieta e outros fatores comportamentais como tabagismo, alcoolismo e sedentarismo enquanto que nas mulheres, mesmo havendo um estilo de vida saudável, não estarão totalmente protegidas do estresse oxidativo derivado da queda dos níveis estrogênicos (Szafran e Smielak-Korombel, 1998).

De acordo com a revisão de Offerman e Medford (Berliner et al., 1995), o presente modelo da aterogênese associa o EO e a homeostase da parede vascular com as reações do sistema imune e com o acúmulo de macrófagos e de produtos oxidados lipídicos e proteicos na parede vascular, para o início do processo inflamatório local e da proliferação celular que vão levar à lesão aterosclerótica estabelecida (Tardif, 2005; Agarwal, 2005).

O EO é um termo genérico usado para descrever um estado de dano oxidativo celular, tecidual ou orgânico, causado por espécies reativas de oxigênio (EROS) nas células intactas e tem sido implicado na patogênese da menopausa como consequência do aumento da peroxidação lipídica e/ou da deficiência da defesa antioxidante (Zambon et al., 1993; Fujii et al., 2005; Cherubini et al., 2005). É responsável por causar dano nos oócitos contribuindo para o declínio do número e qualidade dos folículos, podendo levar ao adiantamento da idade de menopausa (Miguel et al., 2006) e tem sido descrito como um fator de risco para a DCV (Vogel, 1997).

As EROS podem funcionar como mensageiros intracelulares estimulando sinalizadores já isolados, como dois membros da família da proteinoquinase (ERK1/2 e macroquinase BMK1) (Deng H et al, 1997), a tirosinaquinase e diferentes isoenzimas da creatinofosfoquinase que atuam na transducção modificando a atividade do fator de transcrição (NFkB) que resultam em alterações na expressão gênica e nas respostas celulares (Fonceca et al., 2000).

Os alvos biológicos principais das EROS incluindo todos os radicais livres são as proteínas, cuja oxidação conduz à perda de função ou à degradação prematura nos proteossomas, os lípidos, cuja oxidação altera as propriedades

físicas das membranas celulares e, conseqüentemente, a sua função e o DNA, cuja oxidação pode conduzir a mutações genéticas, à síntese protéica anormal, à alteração na expressão gênica, apoptose e morte celular (Thomas, 1999; Krstevska et al., 2001).

O processo de envelhecimento per si é responsável pela toxicidade celular residual de oxigênio resultante do EO e pela deficiência dos mecanismos antioxidantes, porém com a perda da proteção estrogênica na pós-menopausa, e especial vulnerabilidade das membranas celulares e das mitocôndrias das células diferenciadas ao ataque dos oxi-radicais, ocorre um aumento significativo dos valores sangüíneos de peróxidos lipídicos, marcadores de reações de radicais livres bem como redução da resposta antioxidante (Ashok et al., 2005; Clement, 1999; Subbiah et al., 2004).

As células diferenciadas, incluindo as ovarianas produtoras de estrógeno estão diretamente envolvidas na aterogênese. Estas contem um grande número de mitocôndrias com altas concentrações de oxigênio que são utilizadas na cadeia respiratória no processo de fosforilação oxidativa. Como recentemente demonstrado por Ramirez-Bosca (2004), altos níveis de respiração celular são acompanhados de imperfeita desintoxicação de oxi-radicais e de deficiente regeneração de mitocôndrias, portanto não somente a queda estrogênica, mas também o estresse oxidativo é responsável pelos sintomas e processos degenerativos da pós-menopausa.

As lipoproteínas podem sofrer modificações químicas em sua estrutura, tais como oxidação, glicação, glicooxidação e desialização, e, conseqüentemente, no seu comportamento biológico, tornando-se mais aterogênicas.

Na última década tem ficado evidente que na patogênese da aterosclerose a vulnerabilidade da lipoproteína de baixa densidade (LDL) à oxidação é tão importante quanto os níveis de LDLcol, e o mecanismo da ação estrogênica inclui a proteção contra a oxidação da LDL (Subbiah, 2004; Strocker, 2004; Hansson, 2001).

Portanto a aterogenicidade da LDL está relacionada principalmente ao seu tamanho e densidade. A LDL oxidada (LDLoxi), que apresenta modificações químicas em sua estrutura e, conseqüentemente, no seu comportamento biológico, torna-se mais aterogênica, sendo uma partícula crítica para início e progressão da aterosclerose. Contribui para a disfunção endotelial e instabilização da placa de ateroma através de vários mecanismos e triplica o risco de DAC.

Estudos científicos em humanos têm demonstrado que a LDLoxi está presente nas placas ateromatosas juntamente com subfrações lipídicas oxidadas que se originam em parte da LDLoxi e em parte da degradação de foam cells. A LDLoxi na lesão aterosclerótica pode ser quantificada e visualizada (Sache et al., 1994).

A medida da preservação da saúde na pós-menopausa está na relação entre déficit estrogênico, EO e lesões da parede vascular (Kannl, 1998).

O sistema imune apresenta papel importante na aterogênese tanto através de mecanismos humorais como celulares. Linfócitos T isolados do sangue total em pacientes com síndromes coronarianas agudas ou isolados de placas carotidianas reconhecem a LDLoxi e proliferam quando expostos a elas (Hansson, 2001).

A LDLoxi é altamente imunogênica e induz a formação de autoanticorpos de vários epitópos. O peptídeo D, um derivado da lipoproteína ApoB, foi selecionado em estudos anteriores, de acordo com parâmetros conhecidos para a predição de peptídeos imunogênicos como a presença de regiões anfipáticas, a probabilidade da exposição da superfície da molécula em sua configuração terciária, os domínios relacionados com os receptores celulares de LDL, a acessibilidade da tripsina (onde a inabilidade da tripsina clivar sugeriria que este epítipo escondido somente é acessível em uma molécula apoB degradada) e a solubilidade na água (para melhorar a manipulação e imunização). Além disso, o potencial imunogênico dos peptídeos foi baseado na informação física sobre a molécula intacta da apo B, obtida de um banco de dados

do específico (ExPASy Molecular Biology Server: www.expasy.ch). Vinte e cinco seqüências de peptídeos foram sintetizadas em fase contínua, cada uma com 18-25 resíduos de aminoácidos e com um grupo de amino na extremidade do C-terminal. Destas, uma seqüência especial chamada de peptídeo D, foi selecionada após apresentar um bom potencial imunogênico para o uso em testes de ELISA. Esse peptídeo corresponde a uma das duas seqüências que constituem a região de ligação da LDL com o receptor de LDL nos macrófagos (Boschcov et al, 2000).

Estudos consideráveis de populações humanas com doença cardiovascular estável sugerem que a elevação de autoanticorpos tem valor diagnóstico e prognóstico na determinação da presença e extensão da aterosclerose. Estudo focalizando a determinação de anticorpos anti-LDLoxi, durante longo período de uso de TRH estrogênica (estradiol), estrogênica combinada com levonorgestrel ou com AMP, não mostrou diferenças significativas (Stocker e Keaney Jr., 2004) em consonância com Bureaux, (2006).

A LDLoxi na lesão aterosclerótica pode ser quantificada e visualizada, é altamente imunogênica e induz à formação de autoanticorpos de vários epitópos. Estudos de populações humanas com doença cardiovascular estável sugerem que a elevação de autoanticorpos anti LDLoxi tem valor diagnóstico e prognóstico na determinação da presença e extensão da aterosclerose. Porém o assunto ainda é controverso. Outro estudo que focaliza a determinação de anticorpos anti-LDLoxi, durante longo período de uso de TRH estrogênica (estradiol) e estrogênica combinada com levonorgestrel ou com AMP, não mostrou diferenças significativas (Signorelli et al., 2001).

O aumento da atividade de LH na pós-menopausa também está relacionado com elevados níveis dessas lipoproteínas no sangue (Zambon et al., 1993; Strocker e Keaney Jr., 2004).

Além do aumento da LDLcol, as mulheres na pós-menopausa apresentaram valores de marcadores séricos de peroxidação lipídica mais elevados que agravaram quanto mais precocemente ocorreu a menopausa

(Signorelli et al., 2001). O aumento da peroxidação é maior na mulher de média idade (41-60 anos) quando comparado com homens da mesma idade (Szafran e Smielak-Korombel, 1998).

A ação estrogênica nos lípidos e lipoproteínas são responsáveis por 25-50% de seus mecanismos ateroprotetores, enquanto que os efeitos diretos no sistema vascular (especialmente na parede vascular) são responsáveis pelo restante (Barrett-Connor e Bush, 1991). O estrógeno atenua o processo inflamatório associado com a aterosclerose através de efeitos benéficos nas moléculas de adesão celular circulatória que participam do recrutamento de leucócitos na superfície do endotélio. Estas atuam no processo aterosclerótico através da síntese e/ou liberação de mediadores locais como o óxido nítrico (ON) e endotelina (Peterson, 1998), acarretando melhora da reconstituição celular endotelial e inibição da proliferação de células musculares lisas em resposta à injúria vascular, além da atuação direta na contratilidade da parede arterial (Adams et al., 1990).

Yokoyama et al. (2000) demonstraram que a parede vascular produz espécies reativas de oxigênio que alteram o tônus vascular. As mulheres em pós-menopausa tem a bioatividade do ON reduzida, porém ainda não está claro se é devido à baixa produção da óxido nítrico sintetase ou à sua inativação pela enzima SOD gerada pelas células endoteliais que formam anions peróxidonitritos, agentes fortemente oxidantes (Feletou e Vanhoutte, 2006).

A redução da bioavaliabilidade do óxido nítrico conseqüente à alteração da produção de prostanóides incluindo a prostaciclina, tromboxano A2 e/ou isoprostano bem como o aumento de liberação de endotelina contribuem para a disfunção endotelial (Feletou e Vanhoutte, 2006).

Na mesma linha, outros estudos em humanos, demostraram que a deficiência no relaxamento vascular dependente do endotélio está associada à inatividade do NO pela formação dos peróxi-nitritos (Pereira et al., 2003; Ke et al., 2003; Van Der Loo et al., 2000).

A estrutura molecular hidrofenólica do estrógeno pode doar átomos de hidrogênio para radicais peróxidos lipídicos bloqueando a reação de peroxidação em cadeia (Kannel, 1987; Bednarek-Tupikoviski, 2004). Além de atuar através de sua estrutura química (anel fenólico), tem importante ação antioxidante, através da influência na atividade do sistema de enzimas antioxidantes naturais como a catalase (CAT) (Ozden, 2001; Bednarek et al., 2001; Guemouri, 1991).

Embora as células possuam numerosos mecanismos de defesa para se proteger, sabe-se que as mitocôndrias são especialmente importantes no estresse oxidativo, e as defesas mitocondriais dependentes principalmente da superóxido dismutase (SOD) e da glutationala peroxidase (GPX), e as microssomais, dependentes da CAT podem estar comprometidas devido as EOR geradas endogenamente (Bednarek-Tupikoviski et al., 2004; Signorelli et al., 2001; Signorelli et al., 2001; Subbiah, 1993).

Na menopausa e na ovariectomia as atividades das enzimas antioxidantes como a SOD, a CAT e a GPX estão diminuídas e os valores de determinação do malonaldeído, um dos produtos finais do processo de peroxidação lipídica, estão aumentados principalmente nas mulheres com DCV. Ocorre também decréscimo de alguns antioxidantes como o ácido ascórbico e o alfa tocoferol juntamente com uma queda geral dos micronutrientes antioxidantes (Wood et al., 1995; Mertz, 1990). A variabilidade biológica como a idade, o sexo, o índice de massa corpórea, e a menopausa modificam os limites de referência dos marcadores antioxidantes (Guemouri et al., 1991).

Embora vários estudos demonstrem efeitos antioxidantes importantes como a queda das atividades da SOD, da GPX e dos tióis protéicos totais com o uso da TRH estrogênica, alguns estudos mostram aumento dos TBARS (espécies reativas do ácido tiobarbitúrico), marcador da peroxidação lipídica plasmática (Rontu et al., 2004; Akcav et al., 2000).

A proteína C reativa, uma proteína de fase aguda positiva, ou seja, a concentração sérica se eleva logo após uma agressão ao organismo, é utilizada, classicamente, como marcador de processos infecciosos ou inflamatórios.

Para esta finalidade, considera-se como limite de referência a concentração de até 0,50 mg/dL.

Recentemente, observou-se que a aterosclerose possui um componente inflamatório que pode ser caracterizado por elevações discretas da PCR e que esta elevação guarda relação com o risco da ocorrência de episódios agudos de ruptura da placa aterosclerótica e, conseqüentemente, de infarto agudo do miocárdio. Quando utilizada para esta finalidade, o valor de referência é até 0,11 mg/dL, definido em 2001 pelas III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias, da Sociedade Brasileira de Cardiologia (Santos et al., 2001).

Em janeiro de 2003, a American Heart Association (AHA) e o CDC (Centers for Disease Control and Prevention) emitiram conjuntamente um posicionamento científico sobre o uso da PCR de alta sensibilidade para a avaliação de risco cardiovascular, definindo:

- que teste deve ser utilizado: definiu-se que é a PCR de alta sensibilidade, e que se deve fazer a média de duas dosagens da PCR, independente de jejum, separadas por duas semanas, pois é uma estimativa mais estável do nível de PCR do que uma única dosagem.
- que pacientes devem ser testados e para quais indicações: definiu-se que o uso da PCR para triagem de risco cardiovascular de toda população adulta é inapropriado, sendo recomendada para os pacientes classificados como risco intermediário (aqueles que têm 10 a 20% de chance de desenvolver doença coronariana nos próximos 10 anos), em que o clínico pode necessitar de informação adicional para guiar outras avaliações ou a terapia. Estima-se que 40 milhões de pessoas nos EUA apresentam risco intermediário de acordo com essa classificação. (Santos et al., 2001).

EIM E CLIMATÉRIO

A medida do espessamento da camada íntima-média (EIM) das artérias carótidas apresenta boa correlação com a mortalidade cardiovascular e é utilizada para acessar a extensão e a severidade da aterosclerose e monitorar intervenções terapêuticas, em estudos populacionais (Takahashi et al., 2004). A EIM, medida por ultrasonografia de modo B, é considerada como um bom marcador também para a arteriosclerose coronária. Numerosos estudos, que investigaram o risco de enfarte, ou o risco de enfarte miocárdico, utilizaram este parâmetro. Diversos estudos demonstraram que a menopausa está associada com aumento da EIM, enquanto que a TRH está associada com menor EIM (Dobs et al., 1999; Joakimsen et al., 2000; Hodis et al., 2003). Em discordância, o estudo ERA, ao realizar angiogramas coronários repetidos, antes de iniciar a TRH e após três anos de seguimento (Herrington et al., 2000) conclui que a progressão da arteriosclerose coronária durante este período foi a mesma para as que não utilizavam TRH versus com TRH. Outro importante estudo recente avaliou o efeito da terapia hormonal oral sobre a progressão da arteriosclerose carotídea em mulheres saudáveis com um espessamento da EIM, >1 mm, estabelecido na avaliação basal (Herrington et al., 2000). Ao fim de 48 semanas de seguimento, as alterações na EIM foram semelhantes para as mulheres com vs sem TRH. Em contraste com os resultados desse estudo, outro estudo mostrou que a progressão da arteriosclerose carotídea subclínica durante um seguimento de 2 anos foi significativamente mais lento em usuárias de estradiol do que no grupo placebo (Hodis et al., 2001).

Conclui-se que a TRH pode retardar o desenvolvimento de placas ateroscleróticas quando o endotélio está ainda intacto, mas uma vez que a mulher tenha já uma arteriosclerose arterial estabelecida o tratamento com estrógenos provavelmente terá efeito menor ou nulo quanto à sua progressão. Um grupo de estudos em macacos mostrou resultados que apóiam este conceito (Hodis et al., 2001).

A seguir apresenta-se um quadro resumindo dados da literatura sobre os efeitos pró e antioxidantes da TRH.

Quadro 1- Efeitos da terapia de reposição hormonal sobre marcadores de oxidabilidade lipídica na mulher: revisão da literatura

	TRH Estrogênica	TRH Mista	Melhora	Não altera	Agrava
Mac Manus J, 1997	EC VO ou estradiol trans	EC + AMP		EO total e lag time de oxidação da LDL	
Koh KK, Am J Cardiol 1997				Sem efeito EO total	
Leal M, Obstet Gynecol 2000		ETrans 50 µg, 3x/sem + AMP 5 mg (4m)	> Status total AO (<grupos sulfidril e < peróxidos lipídicos)		
Özden S, Maturitas 2001		EC + AMP (3 anos)	< TBARS, >GPX eritroc plasmática		
Signorelli SS, Gynecol Endocrinol 2001				Espessamento da IM parede vascular e > malonaldeído em meno precoce	
Bhavnani BR, Menopause 2001	EC 0,625mg/d	EC 0,625 + AMP 5	Proteção contra oxidação LDL		
Telci A, Gynecol Obstet Invest 2002		EC 0,625 mg + AMP 2,5 (6m)	< dano oxidativo proteico (carbonil prot e nitrotirosina) <Tióis totais, >GPX eri, >ON		
Bureau I, J Am Coll Nutr 2002		Estradiol 1,5 a 2mg/d + dehidrogesteron 10 mg (6m)		GPX, capacidade AO, lag time de oxid LDL e anti LDL-oxidada	> TBARS
Noto H, Atherosclerosis 2003			>lag time oxidação LDL e HDL > Paraoxonase 1		
Ke RW, Fertil Steril 2003		EC 0,625 mg + AMP 2,5 (6 sem)	< isoprostrano >nitrito		
Kaminnyi AI, Mol Cell Biochem 2004			< Decréscimo peróxidos lipídicos LDL > sig lúmen arterial min < sig grau oclusão		
Bednarek, 2004	E Transd 50µg 2x/ sem (4m)		< peróxidos lipídicos >Status plasmaticoantioxidante total		
Rontu R, Free Radic Res 2004	Estradiol 2mg/d (10 anos)	Estradiol 2mg/d + levonorgestrel 0,25 mg/d		Lag time oxidação LDL, conc conjugados dienos excreção urinária 8iso PGF2α	
HA BJ, Arch Pharm Res 2004	Estradiol			Lag time oxidação LDL	
Agarwal A, Reprod Biomed Online 2005	Estradiol		Lag time oxidação LDL		
Unfer TC, ClinChimActa 2006	EC ou estradiol			CAT, GPX, TBARS	
Hong SC, J Immunol 2006			< MDA (> paraoxonase 1 sang)	SOD (> paraoxonase 1 sang)	
Ben J Wu, Exp Med. 2006			> Inibição acúmulo macrófagos > reendotelização < prol cels musc (hemeoxigenase-1)	> GPX	

JUSTIFICATIVA

A doença cardiovascular representa, hoje, a maior causa de mortalidade e morbidade dentre as mulheres. Ocorre principalmente na pós-menopausa devido a um aumento considerável do risco aterosclerótico, conseqüente ao declínio da produção de estrógenos endógenos. A importância da inflamação e da oxidação associadas à dislipidemia em todos os estágios da doença aterosclerótica confirma-se por evidências experimentais. As abordagens que envolvem o desenvolvimento e a utilização de antioxidantes, que protejam as células para além das suas defesas naturais, para a prevenção e terapia desta doença, adquiriram especial interesse no tratamento destes pacientes, além do que, existem poucos estudos que avaliam a influência da TRH na atividade das enzimas antioxidantes na pós-menopausa.

Os parâmetros de oxidabilidade plasmática e as lipoproteínas sanguíneas sofrem alterações nessa fase da vida da mulher cujos mecanismos não estão bem esclarecidos e precisam ser melhor estudados, para servir de alertas precoces do risco cardiovascular e, dessa maneira, garantir a prevenção de tal doença.

OBJETIVOS

1- Determinar os efeitos do uso da terapia de reposição hormonal oral no período pós-menopausal, estrogênica ou estrogênica associada à progestágenos, sobre os marcadores plasmáticos de oxidação: catalase, nitrato, substâncias reativas ao oxigênio, lipoperóxidos, anticorpos anti-epítomos proteicos da apolipoproteína B oxidada, anti-D, anti-D2 and anti-A; e a proteína C reativa.

2- Determinar os efeitos do uso da terapia de reposição hormonal oral no período pós-menopausal, estrogênica ou estrogênica associada à progestágenos, sobre as atividades de proteínas reguladoras do metabolismo das lipoproteínas plasmáticas: lipase hepática, lipoproteína lipase, proteína de transferência de colesteril-éster e proteína de transferência de fosfolípidos.

3- Determinar os efeitos do uso da terapia de reposição hormonal oral no período pós-menopausal sobre a aterosclerose precoce da íntima-média carotidiana.

MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da FCM e do CAISM/UNICAMP. As voluntárias foram recrutadas junto aos ambulatórios de dislipidemias (n=193), do Hospital das Clínicas, e do ambulatório de menopausa (n=94), do CAISM/UNICAMP, perfazendo um total de duzentos e oitenta e sete (287) voluntárias, 69 não menopausadas e 218 pós-menopausadas. Destas, 84 apresentavam-se com e 134 sem terapia de reposição hormonal. O intervalo de idades variou de 20 a 82 anos. As pós-menopausadas apresentavam amenorréia por período mínimo de um ano.

Foram critérios de exclusão para a participação no estudo: alcoolismo, tabagismo, atletismo, obesidade ($IMC \geq 27 \text{ Kg/m}^2$), dislipidemias severas com valores de HDLcol $\leq 40\text{mg/L}$, LDLcol $\geq 190\text{mg/L}$ e triglicérides $\geq 400\text{mg/L}$, doenças sistêmicas graves agudas ou crônicas com comprometimento do estado geral (nefropatias, hepatopatias, endocrinopatias e/ou doenças pulmonares). As pacientes assinaram um termo de consentimento conforme anexo II e todas foram examinadas nos respectivos ambulatórios (dislipidemias ou menopausa). Os dados pesquisados para o preenchimento do questionário padrão foram coletados através de entrevistas pessoais, eventuais contatos telefônicos e, quando necessário, completados pela leitura de prontuários. Para assegurar a qualidade dos dados, as mulheres selecionadas foram entrevistadas por uma entrevistadora apenas que lia o Termo de Consentimento Pós-Informação Oral (ANEXO I) antes da entrevista, caso a paciente aceitasse participar do estudo. Quando não era possível realizar a entrevista na mesma hora, ela era marcada para outra data, horário e local.

O grupo recrutado no ambulatório de Dislipidemias constituiu-se de sessenta e nove (69) mulheres pré-menopausadas e cento e vinte e quatro (124) pós-menopausadas. Das pós-menopausadas setenta e uma (71) não faziam uso de TRH e cinquenta e três utilizavam TRH.

As mulheres com TRH foram subdivididas, de acordo com o tipo de TRH, em dois subgrupos: uso (VO) de 0,625 mg de estrógenos conjugados (EC), isoladamente (n=28) ou de EC 0,625 mg combinados com acetato de

medroxiprogesterona, (AMP), 2,5 ou 5 mg/d, (n=25) por no mínimo 1 ano e máximo de dois anos em ambos os casos.

O segundo grupo de mulheres estudadas (defasagem de 2 anos), recrutadas junto ao CAISM, era formado por 63 mulheres pós-menopausadas em TRH, sendo 20 em uso de TRH estrogênica isolada (0.625mg/dia) e 11 com TRH conjugada (acetato de medroxiprogesterona, 5 ou 10mg/d), também por no mínimo um ano e no máximo dez anos.

Para tanto, definiu-se menopausa como a presença de amenorréia natural, durante período superior a um ano, em mulheres, com mais de quarenta (40) anos, de acordo com critérios estabelecidos pela Sociedade Norte-americana de Menopausa (Guemouri et al., 1991).

Os exames laboratoriais foram realizados na Seção de Bioquímica Clínica do HC, no Laboratório de Lípidos da FCM, ambos da UNICAMP e no laboratório de Imunologia do ICB e no laboratório de Lípidos da USP.

Para as dosagens séricas do colesterol total, triglicérides, das apolipoproteínas (B100 e AI) e da lipoproteína (a) foram utilizados métodos enzimáticos colorimétricos, em analisador químico automatizado Hitachi 917 (Roche). O LDL e o HDLcol foram obtidos através de métodos diretos, homogêneos, enzimático-colorimétricos em sistema automatizado Hitachi 917 (Roche).

As concentrações séricas das proteínas de transferência de colesterol éster foram determinadas por métodos exógenos (Lagrost, 1998).

As atividades séricas das lipases, lipoproteica e hepática, foram determinadas, em amostras colhidas pós-injeção intradérmica de heparina (100U/Kg), através da trioleína marcada (Ehnhholm e Kuusi, 1986).

As atividades das proteínas de transferência de fosfolípidos foram medidas por métodos exógenos radiométricos (Damen et al., 1982).

Os anticorpos anti-LDL oxidada e anti-epítomos proteicos da apolipoproteína B oxidada (anti-D, anti-D2 and anti-A) foram determinados pelo método ELISA, utilizando LDL altamente oxidada como antígeno (Gidlund et al., 1996).

A determinação de anticorpos séricos contra os antígenos utilizados foi realizada pelo método de ELISA: placas de 96 poços (Costar®, cód. 3690) foram sensibilizadas com 50 µl/poço de antígeno (1mg/ml) diluídas em tampão carbonato/bicarbonato, pH 9,4. As placas foram armazenadas a 4°C overnight. Após este período, foram lavadas quatro vezes com 100 ml de tampão PBS e bloqueadas com 100 ml de gelatina (Difco) (1%) diluída em PBS, por 2h à temperatura ambiente. Após uma segunda lavagem, amostras de soro diluídas (1:200) (50 µl) foram adicionadas aos poços e as placas mantidas por 2h à temperatura ambiente. Em seguida foram realizadas quatro lavagens com 100 ml em PBS/Tween 20, e foi adicionado o anticorpo de cabra conjugado com peroxidase anti-IgG de camundongo (50 µl, diluído 1:1500). Após 1h de incubação à temperatura ambiente, as placas foram novamente lavadas. O substrato para enzima (75 µl/poço) mais 250 mg de tetrametilbenzidina diluído em 50 µl de DMSO, 10 ml de H₂O₂ e 12ml de tampão citrato (pH 5,5) foi adicionado e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente e a reação foi suspensa com 25mL de 2,0 M de ácido sulfúrico. A leitura da densidade óptica foi realizada em 450 nm.

Para avaliar a amplitude da variabilidade da reação do grupo controle para o anti LDL oxi utilizamos o valor da média com seu desvio padrão que oscilou de 0,17 a 0,65.

Numa possível comparação entre as diferentes baterias de ensaios para a determinação de anticorpos foi utilizado um controle interno (IgG total com concentração 100mg/ml – Santa Cruz Biotechnology) e um controle branco (usando PBS no lugar da amostra) em cada placa. Desta maneira os resultados foram expressos através da Absorbância relativa calculada pela seguinte fórmula: Abs relativa = {(Abs anticorpo)-(Abs branco)}. (Abs controle interno) (Chen et al, 1988; Boschcov et al, 2000; Damasceno et al, 2000; Ketelhuth et al 2001).

As determinações da atividade sérica da catalase (Johansson, et al., 1998), hidroperóxidos (Cross et al., 1987), nitrito (Rosselli, et al. 1995) e TBARS séricos (Yagi, 1998) foram realizadas através de kits comerciais (Cayman).

O método Cayman (Chemical Catalase Assay Kit) utiliza a função de peroxidação da CAT para a determinação de sua atividade sérica através de elisa imunoensaio. É baseado na reação da enzima com metanol em presença de ótima concentração de H_2O_2 . O formaldeído produzido é medido espectrofotometricamente com 4-amino-3-hidrazino-5-mercaptop-1,2,4-triazole (Purpald) como cromógeno. O coeficiente de variação do método é 3,8%.

A peroxidação lipídica resulta na formação de hidroperóxidos de lipídeos saturados e insaturados e sua quantificação é essencial para avaliar o dano oxidativo. O reagente Cayman (kit Lipid Hydroperoxide Assay) mede diretamente os hidroperóxidos séricos através de sua reação com íons ferro.

O método Cayman Chemical Nitrate/Nitrite Assay Kit avalia a concentração sérica do nitrito total pela conversão de nitrato a nitrito utilizando nitrato redutase seguida da adição do reagente de Griess que converte o nitrito em substância colorimétrica. O coeficiente de variação do método é 2,7%.

A medida da concentração sérica do TBARS é utilizada para monitorar a peroxidação lipídica através da formação de malondialdeído (MDA), que é quantificado colorimetricamente.

Para a medida da EIM das artérias carótida, comun direita e esquerda foi realizada ultra-sonografia Doppler no Laboratório de Imagem Diagnóstica (Campinas, São Paulo) em aparelhos ATL HDI 1500 e 3500 Ultrasound System (Advanced Technology Laboratories Ultrasound, Bothell, EUA), com transdutores lineares Doppler de 6-9 MHz. O protocolo incluiu o estudo das duas carótidas comuns. O EIM foi calculado como a média de 5 medidas na parede posterior de ambas as carótidas de acordo com método padronizado. Os resultados foram expressos como a média em milímetros (mm) das 2 artérias (Damen et al., 1982).

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram analisados pelo SAS no setor de estatística da FCM, UNICAMP, utilizando os seguintes testes para avaliação das diferenças entre os grupos: teste ANOVA monofatorial e/ou teste Mann-Whitney, ajustados por idade e IMC (ANCOVA). Os resultados analisados foram expressos como médias $\pm$ desvio padrão e estabeleceu-se o nível de significância em $p \leq 0,05$.

O teste de Spearman e o teste de Person foram utilizados para correlacionar as variáveis nos grupos.

A análise de regressão linear múltipla foi utilizada para acessar a influência das lipoproteínas, das apolipoproteínas, da CETP e PLTP além das atividades das lípases hepática e lipoprotéica, independentemente, sobre o EIM das artérias carótidas comuns. Os resultados foram expressos como coeficientes de determinação R^2 que representa a percentagem de variação na variável dependente explicada pelas variáveis independentes.

RESULTADOS

POSTMENOPAUSAL HORMONE THERAPY REDUCES AUTOANTIBODIES AGAINST OXIDIZED APOLIPOPROTEIN B100

¹CASTANHO, V; ²GIDLUND M; ³NAKAMURA R; ^{1*}DE FARIA, EC. ¹Clinical Pathology Department/FCM/University of Campinas, Faculty of Medical Sciences, ²Imunology Department, University of São Paulo; ³Diagnostic Image Laboratory, Campinas, Faculty of Medical Sciences, São Paulo, Brazil

Abstract

Introduction: Oxidized low-density lipoprotein (oxiLDL) is increased during postmenopausal period and closely related to higher prevalence of atherosclerotic complications. **Objective:** The aim of this study was to verify if postmenopausal hormone replacement therapy (HRT) modifies autoantibody titers against oxidized LDL (antioxidized LDL), epitopes of oxidized apolipoprotein B100 and common carotid intima-media thickness (IMT) in women metabolically well characterized. **Methods:** One-hundred and ninety-three women were recruited: 69 in premenopause (PMW) and 124 in postmenopause (POMW); 53 in use of HRT at least for 12 months; 28 received conjugated estrogens alone (EHRT) and 25 conjugated estrogen and medroxyprogesterone acetate (CHRT). ELISA assays were used to determine autoantibodies, using as antigens highly oxidized LDL or oxidized Apo B protein epitopes (anti-D, anti-D2 and anti-A). Enzymatic and nephelometric methods were used for lipids and lipoproteins; lipoprotein lipase (LPL), hepatic lipase (HL), cholesterol ester transfer protein (CETP) and phospholipid transfer protein (PLTP) activities were assayed using radiometric methods. IMT was measured using Doppler ultrasound. **Results:** Antioxidized LDL and anti-D antibodies increased by 40% ($p \leq 0.003$) and 42% ($p \leq 0.006$),

respectively, with menopause. There was a surprising and significant 7% reduction of anti-D2 antibody titers with HRT ($p \leq 0.050$), indicating positive effect of treatment on the immune response to oxidized LDL. HRT increased HDLchol by 9%. Combined HRT decreased HL and LPL activities. HRT did not change common carotid IMT, which was increased by 32%, as expected after menopause ($p \leq 0.030$). **Conclusion:** This study describes for the first time the protective effect of HRT on decreasing autoantibody titers against oxidized apolipoprotein B in LDL.

Keywords: Postmenopausal hormone replacement therapy; autoantibodies against oxidized LDL; common carotid intima media thickness; HDL-cholesterol; hepatic lipase; atherosclerosis.

*Corresponding author: 55 19 35217387; fax: 55 19 3521943

e-mail: cotta@fcm.unicamp.br (Eliana Cotta de Faria)

1- INTRODUCTION

It is well documented that women may live 30 years or longer after menopause with a higher incidence of cardiovascular disease (CVD) (1). After natural and surgical menopause, women are more likely to develop coronary artery disease than premenopausal women of the same age (2). The natural loss of estrogen may contribute to an increased cardiovascular risk (3).

Lipid and lipoprotein metabolism is markedly altered in postmenopausal women by reducing HDL-cholesterol (HDLchol), and elevating apolipoprotein B levels, total cholesterol, VLDL, LDL, and triglycerides (TG). (4, 5) There is a consensus that the cardioprotective effect of HRT is to some extent secondary to changes in the plasma lipid profile, mainly the increase in high-density lipoprotein cholesterol. Since this therapy constitutes a potential method for raising HDL levels (6), it may be useful for exploring the mechanisms that regulate HDL metabolism.

Serum HL, LPL, CETP and PLTP concentrations are subject to hormonal control (7, 8, 9, 10, 11, 12). Many in vitro and in vivo studies have demonstrated that HL is inhibited by exogenous estrogens (7, 13); however, another study (14) demonstrated no differences in hepatic lipase activity between pre- and postmenopausal women.

Recent epidemiological evidence suggests that, although lowering low-density lipoprotein cholesterol is important in decreasing cardiovascular disease morbidity and mortality, it accounts only for part of the coronary artery disease improvement. Free radical induces lipid peroxidation and has been proposed as an etiological factor in various age-related diseases after menopause, including atherosclerosis (14).

Oxidative stress is higher in postmenopausal women (15, 16) and closely related to atherosclerotic disease in part by inducing autoantibody formation against oxidized lipoproteins – a hallmark in the development of atherosclerosis. Several epitopes are involved in this process: oxidized LDL,

oxidized apolipoprotein (Apo) B - anti-D, anti-D2 and anti-A (17, 18). Estrogen acts as an antioxidant to buffer the actions of oxygen free radicals, such as hydroxyl radicals, hydrogen peroxide and superoxide radicals. These reactive oxygen species attack cell membrane phospholipids and circulating LDL lipoproteins, contributing to endothelial damage and atherosclerotic disease (17, 18, 19).

The influence of oxidative stress on postmenopausal women has been studied by many authors; however, the literature is inconclusive with respect to the effects of hormone replacement therapy on reducing plasma oxidative stress (16, 17, 18, 19, 20).

Carotid intima-media thickness is a sensible and precocious cardiovascular disease predictor used to evaluate early atherosclerosis in population studies and also to assay the progress of therapeutic intervention (21). There are controversial discussions about common carotid IMT and the beneficial/adverse effects of estrogen therapy on cardiovascular risk. (20, 22, 23, 24, 25, 26)

Considering that the effects of HRT are controversial in some aspects of cardiovascular risk factors, the aim of the present study was to verify if HRT modifies oxidized LDL, oxidized (Apo) B protein epitopes (anti-D, anti-D2 and anti-A) and to detect the modulators of common carotid intima-media thickness in postmenopausal hormone treated or not.

2- MATERIALS AND METHODS

2.1- Subjects

A total of 193 women were recruited for this study. Six groups were assigned as follows: PMW (n=69), POMW (n=124), WTHRT (n=71), WHRT (n=53), EHRT (n=28) and CHRT (n=25).

The PMW, with a mean age of 37 years, received no hormonal contraceptive treatment and were physically healthy. One-hundred and twenty-four were POMW, with a mean age of 62 years. All patients were clinically evaluated at the Ambulatory of Dyslipidemia of the Faculty of Medical Sciences, University of Campinas. The presence of menopause was assumed among women aged ≥ 40 years with at least one year of natural menopause or surgical bilateral oophorectomy, according to the criteria of North American Menopause Society. (27)

The POMW group comprised 71 women without and 53 with hormone reposition therapy for at least one year before the study. Fifty-three percent of them used conjugated estrogens (0.625mg/d) and forty-seven percent used estrogen (0.625mg/d) and medroxyprogesterone acetate (5 or 10mg/d) for hormone replacement therapy. All women had a mean body mass index (BMI) below 27kg/m^2 . Blood samples were collected from patients by venipuncture after 12-hour fasting. Heparin (Liquemine, Roche) was injected intravenously (100 international units/kg of body weight), as described for measurement of lipases (28), and the samples were collected 15min later. The plasma was isolated by centrifugation at 1000g at 4°C for 10min.

Written informed consents were obtained from the subjects before admission to the study, which were approved by the Research Ethics Committee of the Faculty of Medical Sciences, University of Campinas.

2.2- Autoantibody determination

Autoantibodies against oxidized LDL were evaluated in plasma of all participants by ELISA assay, using as antigens highly oxidized LDL (29, 30) and oxidized Apo B protein epitopes to autoantibodies, anti-D, anti-D2 and anti-A epitopes (31).

Antibodies against holo-oxidized LDL or antibodies anti-apoB epitopes derived from LDL oxidized were measured in plasma by ELISA (31). ApoB-D is a 22 amino acid peptide from a region of apoB-100. Polystyrene microtiter plates were coated with 1µg/ml of oxidized human LDL (20mM Cu²⁺, 24hrs) or 0.1µg/ml of apoB-D in carbonate-bicarbonate buffer (20µl/well), pH 9.4, and kept overnight at 4°C. The plates were blocked with a 5% solution of fat-free milk (Molico/Nestlé, SP, Brazil), and then incubated for 2hrs at room temperature, followed by washing four times with PBS (100µl). Plasma samples (20µl) were added and the plates were incubated overnight at 4°C, followed by washing with 1% Tween 20 in PBS. A peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG antibody (20 µl; 1:1,500) was added, and after 1h at room temperature, the plates were washed. Finally, 75µl of substrate solution (250mg of tetramethylbenzidine diluted into 50ml of DMSO, 10µl of 30% H₂O₂, 12ml of citrate buffer, pH 5.5) were added and, after incubation at room temperature for 15min, the reaction was discontinued by adding 25µl of 2.0 M sulfuric acid. The optical density (OD) was then measured using a microplate reader (Titertek Multiskan MCC/340P, model 2.20, Labsystems, Finland) at 450nm. Results were expressed in relation to total plasma IgG concentration. The plates were incubated with individual plasma samples diluted 20x in carbonate buffer for detection of total IgG levels, instead of being treated with oxidized LDL. The procedure then was followed exactly as described above. (31)

2.3- Other biochemical methods

Cholesterol and triglyceride (TG) were determined using enzymatic-colorimetric methods (Hitachi 917, Roche, Mannheim, Germany). Plasma LDL chol and HDLchol were analyzed in the supernatant substance after precipitation of plasma apoB 100-containing lipoproteins. Apolipoproteins (AI and B 100) were measured by nephelometric assays.

The CETP activity was determined by exogenous assay, which measures the transfer of radiolabeled CE between a normal donor pool of 14CE-HDL and an unlabeled acceptor mixture of very-low-density lipoproteins

(VLDL) plus over 4hrs by using plasma as the CETP source, and results are expressed as percentages of CE transferred. (32).

The phospholipid transfer protein was measured by an exogenous radiometric method, using PL liposomes as substrate, and HDL pool obtained from plasma donors as acceptor. The activity was expressed as the rate of radioactively labeled PL transfer per hour. (33)

HL and LPL activities were measured in fasted post-heparin plasma samples on the basis of fatty acid release, by using a radiolabeled triolein emulsion as substrate and NaCl (1M) as LPL inhibitor, with results expressed as nanomoles of NEFA per milliliter per hour (28).

2.4- Measurements of common carotid arteries intima-media thickness (IMT)

They were determined using the HDI 1500 Ultrasound System equipment (ATL Ultrasound, Botheli, WA, USA), with a 7- to 12-MHz color Doppler probe. The common carotid IMT was calculated as the mean of five far-wall measurements, from the left and right common carotid arteries, according to a standardized method. (23) Individual results were expressed in millimeters as an average of the left and right common carotid IMT.

2.5- Statistical analysis

The data were analyzed by the SAS statistical package: ANCOVA with rank transformation was used for adjustments. The Spearman's test was used to correlate the variables between the groups.

Multiple linear regression analysis using the stepwise criteria for the selection of variables was used to assess the influence of titers of antioxidized LDL and antioxidized apolipoprotein (Apo) B (anti-D, anti-D2 and anti-A), antibody titers

on common carotid intima-media thickness, as well as for lipids, lipoproteins, transfer proteins, lipases and anthropometric variables. The results are expressed as coefficients of determination (R^2) that represent the percentages of variation in the dependent variable explained by the independent variables.

The analytical results are expressed as means $\pm$ SD. A probability value lower than 0.05 (two-tailed) was considered significant and p-values between 0.05 and 0.10 had borderline significance.

3- RESULTS

Table 1 summarizes the clinical and biochemical characteristics of the participants:

Table 1- Anthropometric, clinic and biochemical parameters in pre and postmenopausal women, with and without HRT

GROUPS/ PARAMETERS	PMW	POMW	WTHRT	WHRT	EHRT	CHRT
AGE	37±9 ¹	62±9 ¹	63±10 ⁶	61±7 ⁶	60±8	61±7
(years)	(69)	(124)	(71)	(53)	(28)	(25)
BMI	25±6 ²	27±5 ²	27±5	27±5	27±5	26±5
(Kg/m ²)	(58)	(122)	(69)	(53)	(28)	(25)
WC	77±12 ³	83±12 ³	86±11	79±12	81±13	76±10
(cm)	(56)	(121)	(68)	(53)	(28)	(25)
IMT	0.61±0.12 ^{4,5}	0.89±0.2 ⁴	0.88±0.2	0.90±0.18 ⁵	0.92±0.19	0.88±0.17
(mm)	(46)	(73)	(38)	(35)	(17)	(18)
Chol	188±42	230±42	229±40	233±44	240±51	226±36
(mg/dL)	(62)	(123)	(71)	(52)	(27)	(25)
HDLchol	65±17	72±19	69±16 ^{7,8}	76±22 ⁷	81±26 ⁸	71±16
(mg/dL)	(62)	(123)	(71)	(52)	(27)	(25)
LDLchol	108±34	136±34	137±35	136±34	140±37	131±32
(mg/dL)	(62)	(122)	(70)	(52)	(27)	(25)
TG	79± 36	109±46	109±48	108±45	100±43	116±46
(mg/dL)	(62)	(123)	(71)	(52)	(27)	(25)
APO B100	90± 32	120 ±27	123±28	115±25	113±23	116±29
(mg/dL)	(61)	(62)	(123)	(71)	(52)	(27)
APOAI	160± 31	175±40	172±32	180±50	185±49	174±22
(mg/dL)	(61)	(119)	(70)	(49)	(26)	(23)
CETP	13±7	10±7	10±7	10±7	9±5	11±8
(%)	(45)	(110)	(63)	(47)	(26)	(21)
HL	1766±1352	1447±1114	1499 ±1049 ¹	1377±1205	1748±1287 ²	869 ±881 ^{1,2}
(mmolAGL/mL)	(57)	(106)	(61)	(45)	(26)	(19)
LPL	2984±1575	2776±1939	2872±1940	2644±1951	3221±2082 ³	1855±1463 ³
(mmolAGL/mL)	(57)	(107)	(62)	(45)	(26)	(19)
PLTP	12±9	17±10	17.2±10.3	17.1±11	16±10	18.4±11.2
(%)	(44)	(98)	(54)	(44)	(25)	(19)

Values as mean±sd, (n), range; PMW=premenopausal women; POMW=postmenopausal women; WTHRT=without HRT; WHRT=with HRT; EHRT=estrogen hormone replacement therapy; CHRT=estrogen and medroxyprogesterone acetate conjugated replacement therapy; BMI=body mass index; WC=waist circumference; IMT=common carotid íntima-media thickness; Chol=total cholesterol; HDLchol=high density cholesterol lipoprotein; LDLchol=low density lipoprotein cholesterol; TG=triglycerides; APOB=B apolipoprotein; APO A1=AI apolipoprotein; CETP=cholesterol ester transfer protein activity; HL=hepatic lipase activity; LPL=lipoprotein lipase activity; PLTP=phospholipids transfer protein activity; statistical comparisons between groups by Mann-Whitney test or ANCOVA adjusted for age and BMI; 1 (p<0.0001), 2 (p=0.0002), 3 (p=0.0005), 4 (p=0.0262), 5 (p=0.0303), 6 (p=0.0008), 7(p=0.0534), 8 (p=0.0300)

The mean postmenopausal age was 62 and ranged from 30-82 years. Women without HRT were older than women with TRH ($p \leq 0.0008$). There were differences for BMI and waist circumference among postmenopausal women (versus pre-), ($p \leq 0.0001$ and $p \leq 0.0005$, respectively); however, when comparing the subgroups (WTHRT, WHTR, EHRT and CHRT) no differences were observed. The mean common carotid IMT was higher in postmenopausal women (versus premenopausal women, $p \leq 0.026$) and in WHRT versus PMW group (0.90×0.61 , $p \leq 0.030$). No difference was observed in IMT among postmenopausal groups. The mean common carotid IMT showed a significant positive correlation with total cholesterol in POMW ($r = 0.251$, $p \leq 0.034$, data not shown).

The cholesterol levels in POMW exceeded the desirable maximum value of 200 mg/dL and the mean plasma TG did not exceed the desirable maximum limit of 150 mg/dL. No significant difference of total cholesterol or LDLchol was observed between the groups (table 1). Concomitantly, higher HDLchol (9%) was observed in postmenopausal women with estrogen HRT versus premenopausal women ($p \leq 0.030$). The mean serum concentration of HDLchol in POMW failed to differ from that in PMW.

Fasting CETP and PLTP activities showed no differences between the groups; however, serum CETP activity correlated inversely and significantly with HDL cholesterol in premenopausal women ($r = -0.541$, $p \leq 0.001$), as expected.

HRT reduced the HL activity by 42% in CHRT versus WTHRT group, $p \leq 0.0031$, and by 50% in CHRT versus EHRT, $p \leq 0.0014$.

Conjugated HTR decreased LPL by 50% ($p \leq 0.033$). The LPL activity showed a significant positive correlation with cholesterol in premenopausal women ($r \leq 0.300$, $p \leq 0.022$).

The autoantibodies titers of oxidized LDL and oxidized Apo B100 proteic epitopes, anti-D, anti-D2 and anti-A are shown according to group in table 2.

Table 2- Antibodies against oxidized LDL and apolipoprotein B 100 (anti-LDLoxi, anti-D, anti-D2, anti-A) in pre and postmenopausal women, with and without HRT (estrogen or conjugated)

GROUPS/ PARAMETERS	PMW	POMW	WTHRT	WHRT	EHRT	CHRT
Anti-LDLoxi	0.41±0.24^{1,2,3}	0.68 ±0.49¹	0.69±0.55²	0.66±0.38³	0.66±0.42	0.67±0.34
(OD)	(51)0.1-1.1	(91)0.12-3.04	(54)0.1-3.0	(37)0.2-2.2	(21)0.55-0.543	(16)0.24-1.4
Anti-D	0.79±0.39^{4,5}	1.36±1.14	1.4±1.2⁴	1.32±1.11⁵	1.3±0.9	1.34±1.4
(OD)	(34)0.3-1.9	(60)0.31-5.49	(36)0.5-5.5	(24)0.3-5.0	(14)0.50-2.88	(10)0.31-5.03
Anti-D 2	0.99±0.31	1.17±0.51	1.25±0.66⁶	1.04±0.45⁶	0.98±0.18	1.13±0.68
(OD)	(31)0.3-1.5	(60)0.36-3.38	(36)0.7-3.4	(24)0.4-2.8	(14)0.60-1.25	(10)0.36-2.75
Anti-A	0.78±0.39	1.45±1.18	1.44±1.14	1.46±1.24	1.39±1.02	1.58±1.6
(OD)	(22)0.4-2.1	(56)0.46-5.45	(33)0.5-4.9	(23)0.5-5.4	(14)0.46-3.23	(9)0.57-5.45

Values as mean±sd; (n), range; anti-LDLoxi=antibody anti-LDLoxidized; Anti-D=antibody anti-D; anti-D2=antibody anti-D2; anti-A=antibody anti-A; PMW=pré-menopausal women; POMW=postmenopausal women; WTHRT=without HRT; WHRT=with HRT; EHRT=estrogen replacement therapy; CHRT=estrogen and medroxyprogesterone acetate conjugated replacement therapy; statistical comparisons between groups by ANCOVA adjusted by age and BMI; 1 p=0.003; 2 and 3 p=0.008; 4 and 5 p=0.023; 6 p=0.053

The titers of autoantibodies against oxidized LDL increased from 0.41±0.24, in PMW, to 0.68±0.49 in POMW ($p \leq 0.003$); to 0.69±0.55 ($p \leq 0.008$) in WTHRT and to 0.66±0.38 ($p \leq 0.008$) in WHRT. The anti-D titers increased from 0.79±0.39 (PMW) to 1.14±1.2 ($p \leq 0.023$) in WTHRT and to 1.32±1.11, in WHRT group ($p \leq 0.023$). No significant changes in anti-A titers, in either group, were observed.

Table 3- Multiple linear regression coefficients for common carotid intima-media thickness in pre and postmenopausal women with and without hormone replacement therapy

Groups	Independent variables	Parameters	<i>p</i>	R ²
PMW	CETP	0.020	< 0.0001	0.9740
	LPL	0.0001	< 0.0001	
	HDLchol	0.004	0.0007	
	LDLchol	-0.002	0.005	
	APO AI	0.003	0.0001	
	APO B	0.004	0.0001	
WTHRT	Chol	0.005	0.0002	0.5610
	LDLchol	-0.004	0.0037	
WHRT	CETP	-0.011	0.0294	0.5871
	TG	0.003	0.0016	
EHRT	TG	0.002	0.0022	0.7468

PMW=premenopausal women; WTHRT=without HRT; WHRT=with HRT; EHRT=estrogen replacement therapy; CETP=cholesterol ester transfer protein activity; LPL=lipoprotein lipase activity; HDLchol=high density cholesterol lipoprotein; LDLchol=low density lipoprotein cholesterol; APO A1=A1 apolipoprotein; APOB=B apolipoprotein; chol=total cholesterol; TG=triglycerides

In order to evaluate whether some of the relations observed in the correlation analysis were important to explain common carotid IMT, the lipids, lipoproteins and apolipoproteins were studied in each group (PMW, POMW, WHRT, WTHRT, EHRT and CHRT) by multiple linear regression analysis, using a stepwise method adjusted by age and BMI (table 3).

Common carotid IMT was explained in PMW by CETP and LPL activities, HDLchol, LDLchol (inverse), APO AI and APO B 100 serum concentrations. The strongest predictors of common carotid IMT in PMW were HDLchol concentrations and LPL activities. The WTHRT group was influenced by chol and LDLchol, where common carotid IMT was determined by CETP activity

and TG concentration, a relation probably dependent in part on estrogen, as seen in EHRT regulation by TG. Several risk factor associations disappeared in the treated groups, suggesting an atheroprotected effect. No correlation was observed between D2 titers and IMT.

4- DISCUSSION

Oxidative modifications of low-density lipoprotein have been suggested to play an important role in the pathogenesis of atherosclerosis, and autoantibodies against oxidized LDL have been recently found to reflect this process (34). The presence of small, dense LDL particles, which are more oxidative, is associated with a 3-fold increase in CAD risk (34, 35).

The influence of oxidative stress on postmenopausal women has been studied by many authors; however, the results are still controversial (7, 18, 19, 20).

This study revealed increased plasma oxidative stress in postmenopausal women, indicated by increased antioxidized LDL and anti-D antibodies, and provided further information, for the first time in the literature, that HRT decreased the titers of anti-D2 antibodies (1.04×1.25 , $p=0.053$), suggesting a protective antioxidant action with the treatment.

It was found increased antioxidized LDL titers in POMW group versus premenopausal women (0.68×0.41 , $p=0.003$), and the HRT did not influence antioxidized LDL titers in either group (WTHRT group antioxidized LDL=0.69, $p=0.008$, and WHRT group antioxidized LDL=0.66, $p=0.008$). Therefore, the groups WTHRT and WHRT showed significant changes in anti-D titers when compared with PMW (1.4 and 1.32, $p=0.023$, respectively). According to a few previous clinical studies, the role of antibodies against LDLoxidized remains unclear. Heikkinen AM et al found in a longitudinal study that a 1-year combined estrogen-progestogen treatment was not effective enough in inducing changes in oxidized-LDL-autoantibody titer. (17) Uint et al showed that HRT significantly

increased antibodies against LDL with a low degree of oxidative modification. (38) In a special group of postmenopausal women (hypercholesterolemic with coronary heart disease), Hooherbrugge et al showed that estrogen replacement therapy may have antioxidative effects with decrease of autoantibodies against oxidized LDL. (39)

In addition, it was shown a proatherogenic clinical postmenopausal effect of increasing common carotid IMT (32%), a significantly positive correlation with LDLchol in POMW ($r=0.251$, $p\leq 0.034$, data not shown).

The higher mean common carotid IMT was observed in postmenopausal versus premenopausal women ($p\leq 0.026$) and in WHRT versus PMW groups ($p\leq 0.030$).

There were no beneficial effects of HRT on common carotid IMT in postmenopausal women in this study; however, paradoxically increased IMT was seen in the group of all treated women taken together. ($p=0.030$). The Estrogen in the Prevention of Atherosclerosis Trial (EPAT) (26) found a beneficial effect of estrogen therapy (baseline IMT=0.764 mm), while adverse effects were found in the Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) (baseline IMT=1.193 mm) (27).

In the multivariate analysis, the strongest predictor of common carotid IMT with EHRT was TG serum concentration (73%). McNamara et al suggested that the plasma level of TG is the single most important factor affecting the LDL particle size (40)

To assay earlier stages of atherosclerosis, IMT is portable, easy to use and correlates with atherosclerosis risk factors, including age, hypertension, dyslipidemias, diabetes and smoking pack years; however, there are controversial discussions in the literature about IMT and the beneficial/adverse effects of estrogen therapy on cardiovascular risk. Longitudinal studies have found a lower incidence of common carotid atherosclerosis lesions (44) and a lesser progression of IMT (25, 45, 46) in HRT users. However, other randomized trials provided conflicting results (47, 48). This difference may depend on the varied

characteristics of the study population (age, BMI, late start of HRT, previous associated cardiovascular risks or healthy women) or may be due to differences in methods to measure IMT (internal carotid arteries, carotid bifurcation and common carotid arteries).

Menopause may correspond to health alterations in women, and there is not only alteration in lipid and lipoprotein levels (49), but also an enhanced hepatic lipase activity that regulates the metabolism of VLDL (very-low-density lipoprotein)-LDL cascade (50). HL activity levels are modulated by a number of endogenous (HL gene polymorphism, estrogen levels, central adiposity) and exogenous factors (drugs), being correlated with coronary disease progression (7, 51). Many in vitro and in vivo studies have demonstrated that the enzyme is inhibited by exogenous estrogens (13, 50, 51).

In this study, the hepatic lipase activity did not change between pre- and postmenopause women, like other studies (5, 52, 53), and increased with estrogen therapy; however, CETP, PLTP and LPL were unchanged after treatment.

This study demonstrated increased antiatherogenic activity of HDL concentration, probably secondary to reduced hepatic lipase activity in women treated with conjugated HRT (1499 vs 869, $p=0.003$). The HL activity was reduced by 42% in CHRT versus WTHRT, $p= 0.001$, and by 50% in CHRT versus EHRT, $p= 0.0002$.

Some studies have shown that progestin increases lipoprotein lipase and hepatic lipase activities; however, newer 19-nortestosterona derivatives, such as desogestrel and norgestimate, have a lesser effect on circulating lipoproteins (54). Progestogen should be added to estrogen for all postmenopausal women with an intact uterus to prevent the elevated risk of estrogen-induced endometrial hyperplasia and adenocarcinoma. Considering the controversial effects resulting from progestogen type, dosage or route, the studies should individualize the therapy to minimize the bias by the different progestogen regimens.

In this study, CETP concentration was similar in all groups studied (PMW, POMW, WHRT, WTHRT, EHRT and CHRT) and showed correlation with HDL and IMT ($r=-0.541$, $p=0.000$ and $r=-0.450$, $p=0.031$, respectively). According to previous studies, CETP concentration was not altered by HRT in postmenopausal women (10, 11).

Postmenopausal women older than premenopausal women (62 vs 37 years, $p\leq 0.0001$) and higher BMI and waist circumference among postmenopausal women in comparison to premenopausal women (27x25, $p\leq 0.0001$) show that they have higher atherosclerotic risk. In POMW, a direct significant correlation was found between IMC and plasma cholesterol ($r=0.325$, $p\leq 0.011$), LDL cholesterol ($r=0.291$, $p\leq 0.023$) and apolipoprotein B ($r=0.291$, $p\leq 0.024$).

This study, by testing the effect of HRT on several autoantibodies against oxidized apolipoprotein B100 and oxidized LDL, anti-oxidized LDL, anti-oxidized (Apo) B protein epitopes (anti-D, anti-D2 and anti-A), detected that plasma oxidative stress in postmenopausal women was partially reverted by increased titers of autoantibodies and anti-D2, although the treatment did not influence common carotid IMT. The multivariate analysis indicated a reduced association of lipase and lipoprotein parameters with hormone treatments.

The modification points to favorable cardiovascular effect by increasing HDLchol, HL activity, decreasing autoantibody D2 titers and attenuating common carotid IMT with HRT.

ACKNOWLEDGMENTS

This work originated from a doctoral thesis by VSC and was supported by grants from the State of São Paulo Research Foundation (Fapesp) and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq). The authors thank Mirian Danelon and Aparecida Pereira de Souza for their technical assistance.

REFERENCES

- [1] Kannel WB. Metabolic risk factors for coronary artery disease in women: prospective from the Framingham study. *Am Heart J* 1987; 114: 413-419.
- [2] Kannel WB, Hjortland MC, McNamara PM, Gordon T. Menopause and risk of cardiovascular disease: the Framingham study. *Ann Intern Med* 1976; 85(4):447-52.
- [3] Manson JE. Postmenopausal hormone therapy and atherosclerotic disease. *Am Heart J* 1994; 128:1337-43.
- [4] Mesalić L, Tupković E, Kendić S, Balić D. Correlation between hormonal and lipid status in women in menopause. *Bosn J Basic Med Sci*; 2008; 8(2):188-92.
- [5] Wakatsuki A, Sagara Y. Lipoprotein metabolism in postmenopausal and oophorectomized women. *Obstet Gynecol* 1995; 85: 523-528.
- [6] Walsh B, Li H, Sacks F: Effects of postmenopausal hormone replacement with oral and transdermal estrogen on high density lipoprotein metabolism. *J Lipid Res* 1994; 35: 2083-2093.
- [7] Zambon A, Hokanson JE, Brown BG, Brunzell JD. Evidence for a new pathophysiological mechanism for coronary artery disease regression: Hepatic lipase-mediated changes in LDL density. *Circulation* 1999; 99:19-59.
- [8] Lagrost L et al. Structure and function of the plasma phospholipids transfer protein. *Curr Opin Lipidol* 1998; 9:2033-209.
- [9] Lewis-Barned NJ, Sutherland WH, Walker RJ, Walker HL, De Jong SA, Edwards EA, Markham VH. Plasma cholesterol esterification and transfer, the menopause, and hormone replacement therapy in women. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84(10): 3534-8.

- [10] Zang C et al. Relationship between endogenous estrogen concentrations and serum cholesteryl ester transfer protein concentrations in Chinese women. Clin Chim Acta 2001; 314: 77-83.
- [11] Barter P: CETP and atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000; 20:2029-31.
- [12] Yatsuya H. Serum phospholipids transfer protein mass as a possible protective factor for coronary heart diseases. Circ J 2004; 68(1): 11-6.
- [13] Berg GA et al. Higher values of hepatic lipase activity in postmenopause: relationship with atherogenic intermediate density and low density lipoproteins. Menopause 2001; 8:51-7.
- [14] Halperin H et al. Intermediate-density lipoproteins and liver lipase in postmenopausal women. Medicina (B Aires) 1992; 52(3):213-9.
- [15] Yla-Herttuala S et al. Pathogenesis of atherosclerosis. Maturitas 1996; 9:23-47.
- [16] Vogel RA; Coronary risk factors, endothelial function, and atherosclerosis: a review. Clin Cardiol 1997; 20: 426-432.
- [17] Heikkinen AM et al. Postmenopausal hormone replacement therapy and autoantibodies against oxidized LDL. Maturitas 1998; 29: 155-61.
- [18] Ketelhuth DF et al. Separation of low-density lipoprotein (LDL) and oxidised LDL (oxLDL) subspecies and reactivity against autoantibodies. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 2001; 34:72-8.
- [19] Signorelli SS et al. Behaviour of some indicators of oxidative stress in postmenopausal and fertile women. Maturitas 2006; 53(1): 77-82.
- [20] Bureau I et al. No antioxidant effect of combined HTR on oxidizability and oxidative stress biomarkers in treated post-menopausal women. J Am Choll Nutr 2002; 21 (4): 333-8.

- [21] Byington RP, Furberg CD, Herrington DM, Herd JA, Hunninghake D, Lowery M, Riley W, Craven T, Chaput L, Ireland CC, Applegate WB. Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study Research Group. Effect of estrogen plus progestin on progression of carotid atherosclerosis in postmenopausal women with heart disease: HERS B-mode substudy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22(10):1692-7.
- [22] Espeland MA, Applegate W, Furberg CD, Lefkowitz D, Rice L, Hunninghake D. Estrogen replacement therapy and progression of intimal-medial thickness in the carotid arteries of postmenopausal women. ACAPS Investigators. Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Progression Study. *Am J Epidemiol* 1995; 142(10):1011-9.
- [23] Hodis HN, St John JA, Xiang M, Cushman M, Lobo RA, Mack WJ. Inflammatory markers and progression of subclinical atherosclerosis in healthy postmenopausal women (from the Estrogen in the Prevention of Atherosclerosis Trial). *Am J Cardiol*. 2008;101(8):1131-3.
- [24] Griewing B, Römer T, Spitzer C, Lüdemann J, Günther A, Kessler C. Hormone replacement therapy in postmenopausal women: carotid intima-media thickness and 3-D volumetric plaque quantification. *Maturitas* 1999; 32(1): 33-40.
- [25] Takahashi K, Tanaka E, Murakami M, Mori-Abe A, Kawagoe J, Takata K, Ohmichi M, Kurachi H. Long-term hormone replacement therapy delays the age related progression of carotid intima-media thickness in healthy postmenopausal women. *Maturitas*. 2004 Oct 15; 49(2): 170-7.
- [26] Hodis HN et al. Women's Estrogen-Progestin Lipid-Lowering Hormone Atherosclerosis Regression Trial Research Group. Hormone therapy and the progression of coronary-artery atherosclerosis in postmenopausal women. *N Engl J Med* 2003; 349(6): 535-45.
- [27] Ettinger B, Woods NF, Barrett-Connor E, Pressman A. The North American Menopause Society 1998 menopause survey: Part II. Counseling about hormone replacement therapy: association with socioeconomic status and access to medical care. *Menopause* 2000; 7(3): 143-8.

- [28] Ehnholm C and Kuusi T. Preparation, characterization and measurement of hepatic lipase. *Methods Enzymol* 1986; 129: 7716-738.
- [29] Gidlund M, Damasceno NR, Lindoso JA, Abdalla DS and Goto H. Monoclonal antibodies against low density lipoprotein with various degrees of oxidative modifications. *Braz J Med Res* 1996; 29:1625-28.
- [30] Damasceno NR, Goto H, Rodrigues FM, Dias CT, Okawabata FS, Abdalla DS and Gidlund M. Soy protein isolate reduces the oxidizability of LDL and the generation of oxidized LDL autoantibodies in rabbits with diet-induced atherosclerosis. *J Nutr* 2000; 130: 2641-2647.
- [31] Boschov P, Juliano L, Juliano MA, and Gidlund M. Development of a peptide-based ELISA for the detection of antibodies against oxidized low density lipoprotein (oxLDL). *Atherosclerosis* 2000; 151: 224-28.
- [32] Lagrost L, Determination of the mass concentration and the activity of the plasma cholesteryl ester transfer protein (CETP). *Methods Mol Biol* 1998; 110:231-241.
- [33] Damen J, Regts J and Scherphof G. Transfer of [^{14}C] phosphatidylcholine between liposome and human plasma high density lipoprotein. partial purification of a transfer-stimulating plasma factor using a rapid transfer assay. *Biochim Biophys Acta* 1982; 712: 444-52.
- [34] Akcay T et al. Effects of hormone replacement therapy on lipid peroxides and oxidation system in postmenopausal women. *J Toxicol Environ Health A* 2000; 59(1):1-5.
- [35] Agarwal A, Gupta S, and Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol* 2005; 3: 28-67.
- [36] Bednarek, Signorelli SS et al. Behaviour of some indicators of oxidative stress in posmenopausal and fertile women. *Maturitas* 2001; 38:165-70.

- [38] Uint L, Gebara OC, Pinto LB, Wajngarten M, Boschcov P, da Luz PL, Gidlund M. Hormone replacement therapy increases levels of antibodies against heat shock protein 65 and certain species of oxidized low density lipoprotein. *Braz J Med Biol Res* 2003; 36(4): 491-4.
- [39] Hoogerbrugge N, Zillikens MC, Jansen H, Meeter K, Deckers JW, Birkenhäger JC. Estrogen replacement decreases the level of antibodies against oxidized low-density lipoprotein in postmenopausal women with coronary heart disease. *Metabolism* 1998; 47(6): 675-80.
- [40] McNamara JR, Jenner JL, Li Z, Wilson PW, Schaefer EJ. Change in LDL particle size is associated with change in plasma triglyceride concentration. *Arterioscler Thromb* 1992; 12(11):1284-90.
- [41] Lassila HC, Tyrrell KS, Matthews KA, Wolfson SK, Kuller LH. Prevalence and determinants of carotid atherosclerosis in healthy postmenopausal women. *Stroke* 1997; 28(3): 513-7.
- [42] Sutton-Tyrrell K, Lassila HC, Meilahn E, Bunker C, Matthews KA, Kuller LH. Carotid atherosclerosis in premenopausal and postmenopausal women and its association with risk factors measured after menopause. *Stroke* 1998; 29(6): 1116-21.
- [43] Matthews KA, Kuller LH, Sutton-Tyrrell K, Chang YF. Changes in cardiovascular risk factors during the perimenopause and postmenopause and carotid artery atherosclerosis in healthy women. *Stroke* 2001; 32(5): 1104-11.
- [44] Le Gal G. Hormone replacement therapy use is associated with a lower occurrence of carotid atherosclerotic plaques but not with intima-media thickness progression among postmenopausal women. The vascular aging (EVA) study 2003 *Atherosclerosis*; 166(1): 163-70.
- [45] Karim R et al. Determinants of the effects of estrogen on the progress of subclinical atherosclerosis: Estrogen in the Prevention of Atherosclerosis Trial; *Menopause* 2005; 12(4): 357-8.

- [46] Naessen T, Rodriguez-Macias K. Menopausal estrogen therapy counteracts normal aging effects on intima thickness, media thickness and intima/media ratio in carotid and femoral arteries. An investigation using noninvasive high-frequency ultrasound. *Atherosclerosis* 2006; 189(2): 387-92.
- [47] Somunkiran A and all. Effects of tibolone on blood flow resistance and intima-media thickness of the carotid arteries: effect of time since menopause. *Climacteric* 2006; 9(1): 59-65.
- [48] Byington RF. Effect of estrogen plus progestin on progression of carotid atherosclerosis in postmenopausal women with heart disease: HERS B-mode substudy 2002; 22(10): 1692-7.
- [49] Campos H, McNamara JR, Wilson PW, Ordovas JM, Schaefer EJ. Differences in low density lipoprotein subfractions and apolipoproteins in premenopausal and postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 67(1): 30-5.
- [50] Tikkanen MJ et al. Effects of oestradiol and levonorgestrol on lipoprotein lipids and post-heparin plasma lipase activities in normolipoproteinemic women. *Acta Endocrinol* 1982; 99: 630-5.
- [51] Brinton EA. Oral estrogen replacement therapy in postmenopausal women selectively raises levels and production rates of lipoprotein A-I and lowers hepatic lipase activity without lowering the fractional catabolic rate. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 523-8.
- [52] Halperin H et al. Intermediate-density lipoproteins and liver lipase in postmenopause women. *Medicina (B Aires)* 1992; 52(3):213-9.
- [53] Zambon A et al. Effect of hepatic lipase on LDL in normal men and those with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb* 1993; 13:147-53.
- [54] Tilly-Kiesi M. Responses of HDL subclasses, Lp(A-I) and Lp(A-I:A-II) levels and lipolytic enzyme activities to continuous oral estrogen-progestin and transdermal estrogen with cyclic progestin regimens in postmenopausal women. *Atherosclerosis* 1997; 129(2): 249-59.

POSTMENOPAUSAL THERAPY REDUCES CATALASE ACTIVITY AND ATTENUATES ASSOCIATIONS OF CARDIOVASCULAR RISK FACTORS WITH CAROTID INTIMA-MEDIA THICKNESS

¹CASTANHO V; ²NAKAMURA R; ³PINTO-NETO, AM; ⁴DE FARIA EC, ^{1,4}Clinical Pathology Department, NMCE/FCM/University of Campinas, ²Faculty of Medical Sciences, Department of Radiology, ³Tocogynecology Department/FCM/University of Campinas, Faculty of Medical Sciences, São Paulo, Brazil

ABSTRACT

Oxidative stress can change plasma redox status of postmenopausal women; however, data concerning the relationship between hormone replacement therapy and plasmatic antioxidative system are controversial.

Objective: Determine if hormone replacement therapy (HRT) affects plasma lipid concentration, lipoproteins, cholesteryl ester transfer protein (CETP), blood antioxidant enzyme catalase (CAT), lipid peroxidation (concentration of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), and serum lipid peroxide levels (LPO)), nitrate/nitrites (nitrate), high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) and common carotid intima-media thickness (IMT) in postmenopausal women with and without HRT.

Methods: The ninety-four postmenopausal women (POMW) assigned to participate in this study were divided into four groups: women without hormone replacement therapy (WTHRT, n=63), women with hormone reposition therapy for at least 12 months (WHRT, n=31), women using conjugated estrogens, (EHRT, n=20) and women using estrogen and medroxyprogesterone acetate conjugated

replacement therapy (CHRT, n=11). **Results:** We observed that HRT antagonizes the decrease in CAT activity that may occur after menopause. No differences were found between the groups for CETP, TBARS, LPO, nitrate, hs-CRP and common carotid IMT. Estrogen-based HRT attenuated associations of cardiovascular risk factors with IMT, as seen in the multivariate analysis.

Conclusions: Estrogen administration in postmenopausal women was beneficial, reducing oxidative stress and associations of cardiovascular risk factors with carotid atherosclerosis. This model elucidates some benefits of HRT with respect to their antioxidant and atheroprotective actions.

Keywords: hormone replacement therapy; postmenopausal women; oxidative stress markers; common carotid intima-media thickness, cardiovascular risk factors.

INTRODUCTION

The fact of oxygen stress being involved in the pathogenesis of atherosclerosis has received considerable attention (1, 2, 3). Furthermore, according to a research review (4), current models of atherogenesis bind these disturbances to the trigger of a process of focal inflammation and cellular proliferation, leading to mature atherosclerotic lesions.

Antioxidant enzymes protected aerobic cells against the oxidative injury caused by reactive oxygen species (ROS) that are generated during normal cell metabolism (5). Either a ROS overproduction or a deficiency in enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems may result in oxidative stress, which is considered responsible for a number of pathological conditions in humans and also for aging process (5, 6). Menopause may correspond to health alterations in women, and the excessive free oxygen radicals with consequent oxidative status are markedly altered in postmenopausal women (7). Oxidative stress is implicated in physiological changes occurring after menopause, such as increased oxidative damage and changes in antioxidant enzyme system (8, 9). However, studies evaluating the HRT effect on antioxidant enzyme activities in postmenopausal women are limited (7) and refer to a short period of HRT use.

C reactive protein is a proinflammatory protein, positively associated with cardiovascular disease; the literature is controversial but HRT seems to reduce us-CRP increase in postmenopause women (10).

Carotid IMT, an appropriate intermediate endpoint to investigate clinically relevant effects on atherogenesis, can assess earlier stages of atherosclerosis, and correlates with risk factors, including age, dyslipidemias, and oxidative stress (11, 12, 13). Information regarding the HRT impact on carotid atherosclerosis is limited, and the HRT effect on IMT is still controversial. Many epidemiological and basic studies have reported that HRT has a beneficial effect on the progression of carotid artery IMT in postmenopausal women (14, 15, 16), although others had not demonstrated significant effects (17, 18).

Another study suggest that HRT use may prevent the development of atherosclerotic plaques in postmenopausal women, but IMT did not differ between ever and never HRT users (16, 19, 20). To date this warrants further investigation.

There is limited information regarding the association between inflammation markers, such as high-sensitivity C-reactive protein, and adverse events in postmenopausal women (21).

In addition, lipid and lipoprotein metabolism is markedly altered (22) after menopause, and a natural less of estrogen leads to: increased rates of remnant removal by the liver, liver VLDL secretion, liver uptake of VLDL remnants, and an increased rate of LDL uptake by estrogen-upregulated LDL receptor. HDL metabolism is also increased by an increase in apolipoprotein A-I synthesis and increase in HDL cholesterol concentration. Lipoprotein lipase (LPL), hepatic lipase (HL) activities, cholesteryl ester transfer protein (CETP) and plasma cholesteryl ester transfer protein (PLTP) activities contribute to the formation of small density LDL and HDL particles and modulate the reverse cholesterol transport. Their serum concentrations are subject to hormonal control and studies indicate that would serve as a predictor of CHD, independent of other established risk factors (23, 24, 25, 26).

In order to determine if HRT affects plasma lipid concentration and lipoprotein cholesteryl ester transfer protein, blood antioxidant enzyme CAT, lipid peroxidation (concentration of thiobarbituric acid-reactive substances, TBARS, and serum lipid peroxide levels, LPO), nitrate/nitrites and plasmatic hs-CRP concentration in postmenopausal women, we evaluated a group of 94 postmenopausal women with and without HRT and searched for the effect of postmenopausal hormone replacement therapy on free radical oxidative stress and on a proinflammatory marker; as a cardiovascular endpoint, the precocious marker of atherosclerosis common carotid intima-media thickness was determined.

MATERIALS AND METHODS

Subjects:

Ninety-four postmenopausal women were studied. Four groups were assigned for POMW: women without HRT (n=63), women with hormone reposition therapy (WHRT, n=31), women using conjugated estrogens, 0.625mg/d, (n=20) and women using estrogen and medroxyprogesterone acetate conjugated (5 mg/d) replacement therapy (n=11).

The POMW (mean age 59) were clinically evaluated at the Dyslipidemia and Menopause Outpatient Clinics of the Faculty of Medical Sciences of the University of Campinas. The presence of menopause was assumed among women aged ≥ 40 years with at least one year of natural menopause or surgical bilateral oophorectomy, in accordance with the criteria of the North American Menopause Society (27).

All women had a mean body mass index (BMI) below 25 kg/m², and the mean waist circumference (WC) was 87 cm. All POMW were treated for at least one year (mean of five years) with estrogen (0.625 mg/d) / progesterone (2.5-5mg /day) hormone therapy or with continuous oral estrogen (0.625 mg/d).

Each subject signed a written informed consent before admission to the study, which was approved by the Research Ethics Committee of the Faculty of Medical Sciences, University of Campinas.

Samples

During the study, blood samples were collected from patients and controls by venipuncture, after 12-hour fasting. The plasma was isolated by centrifugation at 1000 g for 10 minutes at 4° C.

General analytical methods

Total cholesterol and triglyceride (TG) were determined using enzymatic-colorimetric methods (Hitachi 917, Roche, Mannheim, Germany). Plasma LDL and HDLchol were analyzed in the supernatant fluid after precipitation of apoB 100-containing lipoproteins by homogeneous direct enzymatic-colorimetric method. Apolipoproteins (A1 and B 100) were measured by nephelometric assays.

Nitrate, the stable oxidation metabolites of NO, was measured by using Greiss reagent, by commercially Cayman Chemical Nitrate/Nitrite Assay Kit (28).

Catalase activity was assayed in plasma by ELISA (Cayman reagent, 29) as well as TBARS (30). LPO was assayed by a colorimetric method (31).

The high-sensitive CRP concentration was analyzed by the Behring latex-enhanced CRP assay, using a Behring Nephelometer Analyzer System (Dade Behring, Tokyo, Japan). The common carotid artery intima-media thickness was measured using the HDI 1500 Ultrasound System equipment (ATL Ultrasound, Botheli, WA, USA); with a 7-to 12-MHz color Doppler probe. The common carotid IMT was calculated as the mean of five measurements in the far wall from the left and right common carotid arteries, according to a standardized method (20). Individual results were expressed in millimeters as an average of the left and right carotid IMT.

Statistics

The data were analyzed by the SAS Statistical Package. ANCOVA with rank transformation, adjusted by age, and BMI or the Mann-Whitney test was used. The analytical results are expressed as means $\pm$ SD. A probability value lower than 0.05 (two-tailed) was considered significant. The Spearman's test was used to correlate the variables in the groups.

A multiple linear regression analysis with stepwise criteria for selection of variables was used to assess the influence of lipoproteins, apolipoproteins, CETP, catalase, nitrate, TBARS, LPO and hs-CRP serum concentrations on common carotid intima-media thickness. The results are expressed as coefficients of determination (R^2) that represent the percentages of variation in the dependent variable explained by the independent variables.

RESULTS

Table 1 summarizes the clinical and biochemical characteristics of the participants. Postmenopausal ages ranged from 36-76 years. No age and blood pressure differences were observed between WTHRT and WHRT groups. There were differences of BMI ($29 \times 26 \text{ Kg/m}^2$, $p=0.021$) and waist circumference ($89 \times 83 \text{ cm}$, $p=0.007$) between WTHRT and WHRT groups. The mean common carotid IMT varied from 0.83 to 0.91mm and no differences were observed among postmenopausal groups.

Table 1- Anthropometric and radiological parameters in postmenopausal women with and without HRT

Groups/ Parameters	AGE (years)	SBP (mmHg)	DBP (mmHg)	BMI (Kg/m ²)	WC (cm)	IMT (mm)
POW	(94)58±8	(94)12±1.0	(94)8±0.9	(92)28±5	(92) 87±13	(84) 0.88±0.2
WITHOUT HRT	(63)59±7	(63)12±1.1	(63)8.1±0.1	(63)29¹±5	(63)89^{3,4}±14	(55)0.89±0.19
WITH HRT	(31)56±8	(31)12±0.9	(31)7.9±0.8	(30)26^{1,2}±4	(30)83³±10	(29)0.85±0.14
EHRT	(20)56±9	(20)12±0.5	(20)7.9±0.7	(20)26²±4	(20)80⁴±9	(20)0.83±0.14
CHRT	(11)57±7	(11)12±1.4	(11)8±0.9	(11)28±4	(11)88±9	(9)0.91±0.14

(n); SBP=systolic blood pressure; DBP=diastolic blood pressure; BMI=body mass index; WC=waist circumference; IMT=carotid intima-media thickness, POMW=postmenopausal women; EHRT=estrogen replacement therapy; CHRT=estrogen and medroxyprogesterone acetate conjugated replacement hormone therapy; 1 $p=0.021$; 2 and 3 $p=0.007$; 4 $p=0.0184$ (Mann-Whitney and Kruskal-Wallis).

Table 2- Lipids, lipoproteins and cholesteryl ester transfer protein in postmenopausal women with and without HRT

Parameters/ Groups	POMW	WITHOUT HRT	WITH HRT	EHRT	CHRT
Chol (mg/dL)	(94)224±39	(63)229±40	(31)215±36	(20)215±37	(11)213±36
HDLchol (mg/dL)	(94)61±14	(63)60±12	(31)65 ±17	(20)69³±17	(11)57³±14
LDLchol (mg/dL)	(94)133±36	(63)140^{1,4}±34	(29)118¹±37	(20)115⁴±40	(10)126±29
NHDLchol (mg/dL)	(94)164±40	(63)170²±40	(31)151²±40	(20)148±40	(11)157±41
TG (mg/dL)	(94)153±89	(63)147±66	(31)165±224	(20)158±88	(11)178±176
LDLchol/ HDLchol	(93)2.4±0.7	(63)2.41^{5,6}±0.7	(30)1.93⁵±0.8	(20)1.76⁶±0.8	(10)2.27±0.8
APOAI (mg/dL)	(94)172±26	(63)167±24	(31)181±30	(20)188±33	(11)167±17
APO B100 (mg/dL)	(94)120±27	(63)123±28	(31)115±25	(20)113±23	(11)116±29
Lp(a) (mg/dL)	(94)29±30	(63)28±29	(31)32±30	(20)24±27	(11)44±35
CETP (% CE transfer)	(92)32±12	(61)32±11	(31)32±13	(20)31±14	(11)34±11

(n), mean±sd; Chol=total cholesterol; HDLchol=high-density cholesterol lipoprotein; LDLchol=low-density lipoprotein cholesterol; TG=triglycerides; LDLchol/HDLchol=Castelli II; APO A1=AI Apolipoprotein; APOB=B lipoprotein; Lp(a)=lipoprotein (a); CETP=cholesterol ester transfer protein activity; POMW=postmenopausal women; ETRH=estrogen replacement therapy; CTRH=estrogen and medroxyprogesterone acetate conjugated replacement therapy; 1 (p=0.013); 2 (p=0.048); 3 (p=0.041); 4 (p=0.034); 5 (p=0.017); 6 (p=0.013)

As shown in table 2, mean serum total cholesterol concentration in POMW exceeded the maximum desirable value of 200 mg/dL, but plasma TG did not (150 mg/dL). Higher LDLchol and NHDLchol were observed in postmenopausal

women without HRT versus WHRT postmenopausal women ($p=0.013$ and 0.048 , respectively, table 2). Lp (a) was unchanged. Concomitantly, increased HDLchol was observed in postmenopausal women with estrogen HRT versus postmenopausal women with CHRT ($p=0.041$). Insulin levels were identical in all groups (not shown). The Castelli II index decreased with HTR at expense of estrogen treatment. CETP activity was equal among the groups.

Table 3 presents the similarity of biomarkers among the groups; however, a striking increase (42%) in catalase activity is observed with HRT and combined HRT in all groups.

Table 3- Oxidative and inflammatory biomarkers in postmenopausal women with and without HRT

Parameters/ Groups	CATALASE (%)	NITRATE ($\mu\text{m/L}$)	TBARS nmol/tmp/gprot	LIPID PEROXIDES (umoles/L)	hs-CRP (mg/L)
WITHOUT HRT	(62)22 ^{1,2} ±24	(62)8.6±6	(55)2.8±1.1	(29)4.3±1.0	(61)0.5±0.8
WITH HRT	(30)38 ¹ ±30	(31)9±7	(26)2.4±0.9	(24)5.3±4.8	(29)0.4±0.4
EHRT	(20)39±31	(20)8.2±5	(17)2.4±0.8	(17)5.8±5.7	(19)0.5±0.4
CHRT	(10)37 ² ±30	(11)10±11	(9)2.4±1.1	(7)4.2±0.9	(10)0.4±0.4

(n), mean±sd; EHRT=estrogen replacement therapy; CHRT=estrogen and medroxyprogesterone acetate conjugated replacement therapy; nitrate=nitrate/nitrites; TBARS=thiobarbituric acid-reactive substances; hs-CRP=high-sensitivity C-reactive protein; 1 $p=0.015$; 2 $p=0.029$

The strong correlations observed with three atherosclerotic markers and IMT seen in table 4 changed after combined HRT, as seen by disappearance of correlations with age, hs-CRP and waist circumference, although this group has presented different correlations with two well-known noninflammatory atherosclerotic markers, LDLchol and blood pressure.

Table 4- Significant correlation coefficients (p-values) between common carotid intima-media thickness and metabolic or anthropometric variables

WTHRT (55)	AGE	WC	hs-CRP
mean IMT (mm)	0.414(0.002)	0.296(0.028)	0.308(0.025)
R IMT (mm)	0.386(0.004)	0.316(0.018)	0.430(0.043)
L IMT (mm)	0.400(0.003)	-	0.306(0.026)
CHRT (9)	SBP	LDLchol	-
R IMT(mm)	-	0.826(0.011)	-
L IMT(mm)	0.734(0.025)	0.766(0.027)	-
mean IMT(mm)	0.686(0.041)	0.826(0.002)	-

WTHRT=without HRT; WC=waist circumference; hs-CRP=high-sensitivity C-reactive protein right (R); left (L); IMT=common carotid intima-media thickness; SBP=systolic blood pressure; LDLchol=low-density lipoprotein cholesterol; CHRT=conjugated replacement therapy

In table 5, IMT-treated women were positively regulated by age and waist circumference; relationship of IMT with age and lipoproteins was observed only with EHRT, a finding that suggests atheroprotection by estrogen. In addition, several other factors regulated IMT-untreated women: age, Lp(a), surprisingly inverse, nitrate and hs-CRP.

Table 5- Multiple linear regression coefficients for common carotid intima-media thickness in postmenopausal women with and without (estrogen or conjugated) hormone replacement therapy

Groups	Independent variables	Parameters	P-values	Cumulative R ²
WTHRT (20)				0.8788
	Age	0.0022	<0.001	?
	Lp(a)	-0.0014	0.035	?
	Nitrates	0.0095	0.003	?
	us-CRP	0.2298	0.000	?
WHRT (13)				0.3810
	Age	0.0043	0.416	
	Waist circumference	0.0118	0.048	
E HRT (9)				0.8748
	Age	-0.1120	0.026	
	LPO	-0.1724	0.041	

WTHRT=without HRT; WHRT=with HRT, estrogen and medroxyprogesterone acetate conjugated replacement therapy; EHRT=estrogen replacement therapy; Lp(a)=lipoprotein(a); nitrate=nitrate/nitrites; us CRP=ultrasensitive C reactive protein; LPO=lipoperoxides

DISCUSSION

The key role of oxidation in binding lipids and inflammation to atherosclerosis is compelling and supported by experimental evidence (31). Inflammation has a fundamental role in mediating all stages of the disease. However, the relevance of the antioxidant hypothesis for the treatment of patients with atherosclerosis has not been definitively proven.

This study comprised 94 postmenopausal women: 31 with HRT and 63 without HRT.

HRT is one of the effective cardioprotective mechanisms to measure lipoprotein levels (32). As expected, we found a significant difference in lipid patterns among our studied groups, and an unfavorable lipid pattern in women without HRT. The group with HRT showed significantly lower plasma LDLchol ($p=0.013$), NHDLchol ($p=0.048$), and LDLchol/HDLchol ($p=0.001$). HDLchol in estrogen HRT was higher when compared with women with CHRT ($p=0.041$).

Remodeling of plasma lipoproteins by neutral lipid transfer, such as cholesteryl ester and triglyceride, is the best characterized function of the cholesteryl ester transfer protein (33). Epidemiological and experimental evidences have shown that CETP may play an important role in the development of atherosclerosis (34); however, the precise effects of CETP on atherogenesis are still controversial. In humans, increased incidence of coronary heart disease has been associated with both CETP deficiency (35) and augmentation (36). Various researchers are attempting to target CETP as a form of therapy (38, 39, 40, 41), but these approaches will be unless the circumstances in which CETP acts as pro or anti-atherogenic are properly clarified.

In this study, CETP was unaffected by HRT, in agreement with previous studies that CETP concentration was not altered by HRT in postmenopausal women (42). Free radical-induced lipid peroxidation has been proposed as an etiological factor in ageing after menopause and various age-related diseases including atherosclerosis. (43)

We measured serum LPO and TBARS levels as indicators of free-radical production and lipid peroxidation, and observed no differences in their concentration in women with or without HRT use after menopause. These data are in contrast with previous findings (44); however, another study found significantly higher level of TBARS in postmenopausal women under HRT(43). The mean age of the women here studied was different (WTHRT=59 and WHRT=56) than that found in that study (without HRT=47 and with HRT=52), a fact that may have accounted for the discrepancies in the results. (43)

Serum nitrates/nitrites levels also did not differ in postmenopausal women with and without HRT, according to our study. These results are in agreement with data from Cagnacci et al. (41). In contrast, Kesim et al. (45) found significantly higher nitrite levels in postmenopausal women under HRT.

We could observe that HRT antagonizes the decrease in CAT activity, which may occurs after menopause (WTHRT CAT=22% vs EHRT CAT= 37%, $p=0.029$). In contrast to Unfer et al (46), who did not show differences in CAT activity when comparing women with and without HRT; however, our results favor HRT.

There were no age differences among women without HRT and with HRT, in this study, which were lower than that found in several other studies. This fact with metabolic contexts of the study participant's health may have resulted in part for different findings.

No differences were observed in IMT among postmenopausal groups, showing no change with HRT. Mean common carotid IMT showed a significant positive correlation with age, waist and hs CRP correlation that disappeared with treatment. In addition, the multiple regression analysis showed inverse relationships for age and LPO after estrogen HRT, indicating atheroprotection.

In conclusion, HRT in postmenopausal women induced several advantageous lipid and lipoprotein changes by reducing Castelli II risk index, increasing plasma catalase activity and generating more favorable association between cardiovascular risk factors and precocious atherosclerosis.

ACKNOWLEDGMENTS

This work is part of a doctoral thesis by VSC and was supported by grants from the State of São Paulo Research Foundation (Fapesp) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq). The authors thank Mirian Danelon, Aline Urban and Robert Schreiber for their accurate biochemical analysis and Aparecida de Souza for her technical assistance to the volunteers.

REFERENCES

1. Jialal I and Devaraj S. Inflammation and atherosclerosis: the value of the high-sensitivity C-reactive protein assay as a risk marker. *Am J Clin Pathol*. 2001 Dec; 116 Suppl:S108-15.
2. Holvoet P, Collen D. Oxidized lipoproteins in atherosclerosis and thrombosis *FASEB J*. 1994 Dec;8(15):1279-84.
3. Berliner JÁ et al. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation and genetics. *Circulation* 1995, 91: 2488-2496.
4. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol* 2005, 3:28-35.
5. Thompson, GR and Barter PJ. Therapeutic approaches to reducing the LDL- and HDL-associated risks of coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol*, 2000, 11: 567-570.
6. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science*. 1978 sep8; 201(4359):875-80.
7. Signorelli SS et al. Behaviour of some indicators of oxidative stress in postmenopausal and fertile women. *Maturitas* 2006, 10, 53(1): 77-82.
8. Bednarek-Tupikowska G et al. Effects of oestradiol and oestrogen on erythrocyte antioxidative enzyme system activity in postmenopausal women. *Clin Endocrinol* 2006; 64(4):463-8.
9. Gürdöl F, Oner-Yyidothan Y, Yalçın O, Genç S, Buyru F. Changes in enzymatic antioxidant defense system in blood and endometrial tissues of women after menopause. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*. 1997 Jul; 97(1):38-46.
10. Hodis HN, St John JA, Xiang M, Cushman M, Lobo RA, Mack WJ. Inflammatory markers and progression of subclinical atherosclerosis in healthy postmenopausal women (from the Estrogen in the Prevention of Atherosclerosis Trial). *Am J Cardiol* 2008 Apr 15;101(8):1131-3.

11. Hodis HN et al. The role of carotid arterial intima-media thickness in predicting clinical coronary events. 1998 *Ann Intern Méd*; 128:262-9.
12. Bots ML et al. Common carotid intima-media thickness and risk of stroke and myocardial infarction: the Rotherdam Study *Circulation*. 1997 *Circulation*; 96: 1432-7.
13. Davis PH et al. Increased carotid intimal-medial thickness and coronary calcification are related in young and middle-aged adults. The Muscaline study. *Circulation* 1999; 100:838-42.
14. Karim R et al. Determinants of the effects of estrogen on the progress of subclinical atherosclerosis: Estrogen in the Prevention of Atherosclerosis Trial. *Menopause*, 2005, 12(4): 357-8.
15. Naessen T, Rodriguez-Macias K. Menopausal estrogen therapy counteracts normal aging effects on intima thickness, media thickness and intima/media ratio in carotid and femoral arteries. An investigation using noninvasive high-frequency ultrasound. *Atherosclerosis* 2006, 189(2): 387-92.
16. Takahashi K et al. Long-term hormone replacement therapy delays the age related progression of carotid intima-media thickness in healthy postmenopausal women. *Maturitas* 2004, 15, 49(2): 170-7.
17. Somunkiran A and all. Effects of tibolone on blood flow resistance and intima-media thickness of the carotid arteries: effect of time since menopause. 2006 *Climacteric*; 9(1):59-65.
18. Byington RF. Effect of estrogen plus progestin on progression of carotid atherosclerosis in postmenopausal women with heart disease: HERS B-mode substudy. 2002; 1:22(10): 1692-7.
19. Le Gal G. Hormone replacement therapy use is associated with a lower occurrence of carotid atherosclerotic plaques but not with intima-media thickness progression among postmenopausal women. The vascular aging (EVA) study 2003 *Atherosclerosis*; 166(1) 163-70.

20. Hodis HN, Mack WJ. Atherosclerosis imaging methods: assessing cardiovascular disease and evaluating the role of estrogen in the prevention of atherosclerosis. *Am J Cardiol*. 2002 Jun 20;89(12A):19E-27E.
21. Corrado E, Rizzo M, Muratori I, Coppola G, Novo S. Older age and markers of inflammation are strong predictors of clinical events in women with asymptomatic carotid lesions. *Menopause*. 2008 Mar-Apr;15(2):240-7.
22. Berg GA et al. Higher values of hepatic lipase activity in post menopause: relationship with atherogenic intermediate density and low density lipoproteins *Menopause* 2001; 8:51-7.
23. Tikkanen MJ et al. Effects of oestradiol and levonorgestrol on lipoprotein lipids and post-heparin plasma lipase activities in normolipoproteinemic women. *Acta Endocrinol* 1982; 99:630-5.
24. Brinton EA. Oral estrogen replacement therapy in postmenopausal women selectively raises levels and production rates of lipoprotein A-I and lowers hepatic lipase activity without lowering the fractional catabolic rate. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16:523-8.
25. Halperin H et al. Intermediate-density lipoproteins and liver lipase in postmenopausal women. *Medicina (B Aires)* 1992;52(3):213-9.
26. Yatsuya H. Serum phospholipids transfer protein mass as a possible protective factor for coronary heart diseases. *Circ J* 2004; 68(1): 11-6.
27. Ettinger B, Woods NF, Barrett-Connor E, Pressman A. The North American Menopause Society 1998 menopause survey: Part II. Counseling about hormone replacement therapy: association with socioeconomic status and access to medical care. *Menopause*. 2000 May-Jun;7(3):143-8.
28. Rosselli M, Imthurn B, Keller PJ, Jackson EK, Dubey RK. Circulating nitric oxide (nitrite/nitrate) levels in postmenopausal women substituted with 17 beta-estradiol and norethisterone acetate. A two-year follow-up study. *Hypertension*. 1995 Apr;25(4 Pt 2):848-53.

29. Johansson, L.H., Borg, L.A.H. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Anal Biochem* 1988; 174: 331-336.
30. Yagi, K. Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. *Methods in Molecular Biology* 108 101-106
31. Cross, C.E., Halliwell, B., Borish, E.T., et al. Oxygen radicals and human disease. *Ann Int Med*; 1987, 107: 526-545.
32. Walsh BW, Schiff I, Rosner B, Greenberg L, Ravnkar V, Sacks FM. Effects of postmenopausal estrogen replacement on the concentrations and metabolism of plasma lipoproteins. *N Engl J Med*. 1991 Oct 24;325(17):1196-204.
33. Bruce, C., R. A. Chouinard, Jr., and A. R. Tall. 1998. Plasma lipid transfer proteins, high-density lipoproteins, and reverse cholesterol transport. *Annu. Rev. Nutr.* 18: 297-330.
34. Inazu, A., J. Koizumi, and H. Mabuchi. 2000. Cholesteryl ester transfer protein and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* 11: 389-396.
35. Zhong, S., D. S. Sharp, J. S. Grove, C. Bruce, K. Yano, J. D. Curb, and A. R. Tall. 1996. Increased coronary heart disease in Japanese-American men with mutation in the cholesteryl ester transfer protein gene despite increased HDL levels. *J. Clin. Invest.* 97: 2917-2923.
36. Bhatnagar, D., P. N. Durrington, K. M. Channon, H. Prais, and M. I. Mackness. 1993. Increased transfer of cholesteryl esters from high density lipoproteins to low density and very low density lipoproteins in patients with angiographic evidence of coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 98: 25-32.
37. Sacks FM, Walsh BW. The effects of reproductive hormone on serum lipoproteins: unresolved issues in biology and clinical practice. *Ann NY Acad Sci* 1990; 592:272-85.
38. Hirano, K., S. Yamashita, and Y. Matsuzawa. 2000. Pros and cons of inhibiting cholesteryl ester transfer protein. *Curr. Opin. Lipidol.* 11: 589-596.

39. Hirano KS and Matsuzawa Y. Pros and cons of inhibiting cholesteryl ester transfer protein. *Curr Opin Lipidol* 2000; 11: 589-596.
40. Thompson GR and Barter PJ. Therapeutic approaches to reducing the LDL- and HDL-associated risks of coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol* 2000; 11: 567-570.
41. Watts GF, Barrett PH, Chan DC. HDL metabolism in context: looking on the bright side. *Curr Opin Lipidol* 2008; 19(4):395-404.
42. Dildar K, Kadir YH, Gülizar K. The effects of hormone replacement therapy on lipid peroxidation and antioxidant status. *Maturitas*. 2001 Apr 20;38(2):165-70.
43. Bednarek-Tupikowska G, Tupikowski K, Bidzińska B, Bohdanowicz-Pawlak A, Antonowicz-Juchniewicz J, Kosowska B, Milewicz A. Serum lipid peroxides and total antioxidant status in postmenopausal women on hormone replacement therapy. *Gynecol Endocrinol*. 2004 Aug; 19(2):57-63.
44. Cagnacci A, Tarquini R, Perfetto F, Arangino S, Zanni AL, Cagnacci P, Facchinetti F, Volpe A. Endothelin-1 and nitric oxide levels are related to cardiovascular risk factors but are not modified by estradiol replacement in healthy postmenopausal women. A cross-sectional and a randomized cross-over study. *Maturitas*. 2003 Feb 25;44(2):117-24.
45. Kesim MD, Aydin Y, Erdemir M, Atis A. Nitric oxide in postmenopausal women taking three different HRT regimens. *Maturitas*. 2005 Jan 10;50(1):52-7.
46. Unfer TC, Conterato GM, da Silva JC, Duarte MM, Emanuelli T. Influence of hormone replacement therapy on blood antioxidant enzymes in menopausal women. *Clin Chim Acta*. 2006 Jul 15;369(1):73-7.

DISCUSSÃO GERAL

A doença cardiovascular (DCV) representa a maior causa de mortalidade e morbidade no sexo feminino, acima de qualquer tipo de câncer, tanto nos países desenvolvidos (Estados Unidos e Europa) como no Brasil (Castelli WP, 1988).

O número absoluto de mulheres que falecem por DCV continua a crescer mesmo com a redução observada no índice de mortalidade e com o significativo declínio da taxa de mortalidade por doença cardiovascular nos EUA durante as últimas duas décadas. Observa-se que neste período, este declínio tem sido muito menos dramático na mulher do que no homem. As mulheres morrem 5 vezes mais por DCV do que por câncer de mama (Castelli WP, 1988).

A DCV é menos prevalente nas mulheres em pré versus pós-menopausa e (Barrett-Connor E, 1991) do ponto de vista anátomo-patológico e incide mais tardiamente na mulher do que no homem, principalmente nas artérias coronárias, com uma defasagem de 10 anos em relação ao sexo masculino (Castelli WP, 1988).

Atualmente, as mulheres sobrevivem 30 anos ou mais após a menopausa com associação de fatores de risco e elevado risco para doença cardiovascular (Manson JE, 1997). Sabe-se que a doença aterosclerótica depende não somente da quantidade de LDLcol mas principalmente de alterações na sua composição através principalmente de reações de oxidação que alteram sua densidade, tamanho e composição química (Cresh J et al, 1993). Entre os vários fatores de risco presentes nessa fase da vida da mulher, o estresse oxidativo apresenta grande importância em ambos os processos ateroscleróticos, precoce e tardio (Vogel RA et al, 1997). O excesso de radicais livres com conseqüente comprometimento do status oxidativo plasmático total está marcadamente alterado na pós-menopausa (Signorelli SS et al, 2006). Atualmente, tem-se dado relevância à determinação de autoanticorpos contra a LDLoxidada no estudo da etiologia da aterosclerose (Palinski W; Witztum JL, 2000). Epitópicos característicos da LDL oxidada podem ser identificados nas lesões ateroscleróticas por métodos imunoenzimáticos (Koivu et al, 2006) e parecem ser preditivos de alterações

precoces além de estarem fortemente associados com o envelhecimento no sexo feminino (Wilson PW et al., 2006).

O objetivo principal deste estudo foi avaliar o estado pós-menopausal com e sem terapia de reposição hormonal, sobre um marcador de aterosclerose precoce, a medida do espessamento da íntima-média das artérias carótidas e sobre indicadores do estresse oxidativo plasmático como as determinações de LDLoxidada plasmática, de autoanticorpos anti-LDLoxidada, anti-epítomos proteicos da apolipoproteína B oxidada anti-D, anti-D2 e anti-A; além de marcadores plasmáticos de oxidação como a atividade da catalase, os nitratos, substâncias reativas ao oxigênio e hidroperóxidos. A proteína C reativa foi o marcador pró-inflamatório neste estudo.

Embora não tenha havido diferenças no colesterol total, LDLcol ou HDLcol entre os grupos pré e pós-menopausa, observou-se elevação do HDLcol (9%) com decréscimo do índice de Castelli II, no grupo em pós-menopausa com terapia estrogênica isolada versus grupo pré-menopausa ($p=0.030$) sugerindo efeito benéfico antiaterogênico do tratamento hormonal estrogênico.

Verificamos aumento significativo da LDL oxidada nas mulheres pós-menopausadas versus pré-menopausadas, porém a terapia de reposição hormonal estrogênica apresentou efeitos modificadores benéficos sobre LDLcol e HDLcol e houve redução significativa dos autoanticorpos anti-D2 com a TRH.

A terapia de reposição hormonal apresentou efeitos redutores da lipase hepática (maior magnitude com a terapia conjugada) e possivelmente atuou aumentando o HDLcol. Já a lipoproteína lipase foi reduzida na reposição estrogênica com relação à combinada. CETP modulou a EIM (análise multivariada) e a PLTP não foi modificada pelo tratamento.

Antropometricamente houve melhora do IMC e da cintura com a reposição hormonal.

A EIM, moderno exame radiológico que permite acessar estágios precoces da aterosclerose, além de ser portátil, de fácil e rápida realização, apresenta boa correlação com fatores de risco para aterosclerose como a idade, as dislipidemias e o estresse oxidativo (Hodis HN, 1998).

Observamos aumento da EIM (32%, $p=0,026$) nas mulheres em pós-menopausa versus pré-menopausa embora não tenha havido modificação com o uso da TRH, estrogênica ou conjugada. Porém nas análises multivariadas a TRH conjugada e estrogênica modularam a EIM positivamente via triglicérides, CETP, idade e cintura e negativamente via lipoperóxidos e idade (estrogênica).

Estudos na literatura, envolvendo IMT e longo período de TRH são poucos e seus resultados controversos. Alguns mostram efeitos benéficos da TRH (Karim R et al, 2005; Takahashi K et al, 2004), enquanto outros não demonstram efeitos significativos (Somunkiran et al, 2006; Byington RF, 2002).

Na menopausa a atividade de enzimas antioxidantes como a CAT está diminuída e os valores do malonaldeído um produto final do processo de peroxidação lipídica estão aumentados (Deng H, 1990). Observamos efeito benéfico da TRH sobre a atividade da catalase aumentada significativamente em 42%, porém outros marcadores de estresse oxidativo mensurados, nitratos, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e hidroperóxidos não se modificaram com a TRH neste grupo.

A TRH foi benéfica do ponto de vista de melhora do perfil de lípidos, mas não de apolipoproteínas, e do risco para a doença arterial coronariana. Modulou favoravelmente a lipase hepática, além de aumentar a HDLcol, uma lipoproteína anti-aterogênica, com redução de autoanticorpos anti-D2 e aumento da atividade da catalase. A TRH neste estudo apesar de insuficiente para alterar a EIM modificou a qualidade da modulação da aterosclerose precoce nas mulheres tratadas induzindo ateroproteção. Na análise multivariada a TRH conjugada e estrogênica modularam a EIM através de três fatores: triglicérides, CETP (negativo) e lipoperóxidos (ao contrário do grupo sem TRH, onde houve

sete fatores de regulação); além disso a terapia estrogênica modulou apenas via TG. Houve também influência positiva do tratamento sobre a PCR cuja regulação desapareceu.

Este estudo mostrou a associação da pós-menopausa com estresse oxidativo plasmático e aterosclerose de carótidas e efeito antiaterogênico em parâmetros do estresse oxidativo como a atividade da catalase e determinação do autoanticorpo anti D2.

Os parâmetros de oxidabilidade e as lipoproteínas plasmáticas modificam-se desfavoravelmente nessa fase da vida da mulher por mecanismos não totalmente esclarecidos, portanto necessitam ser melhor estudados, para servir de alertas precoces do risco cardiovascular e, dessa maneira, garantir a prevenção de tal doença.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

- Este estudo envolvendo 287 mulheres atendidas no complexo hospitalar da Universidade Estadual de Campinas reitera que o estado pós-menopausal tem características pró-aterogênicas evidentes do ponto de vista antropométrico, bioquímico e vascular.

- Com o uso da terapia de reposição hormonal oral, estrogênica ou combinada, houve reversão parcial de algumas características, por redução do estresse oxidativo plasmático demonstrado através de menores títulos de autoanticorpos D2 séricos contra a apolipoproteína B100 oxidada (-40%), sendo este resultado o primeiro já descrito, além de aumento da atividade da catalase sérica (+42%).

- Houve também redução de LDLcol (-18%), NHDLcol (+13%) e aumento de HDLcol (+15%) com redução do índice de risco, Castelli II (-27%), sem mudança na lipoproteína (a), e melhora dos parâmetros antropométricos (cintura, -7% e IMC, -10%) como descrito em alguns estudos prévios.

- A atividade de lipase hepática reduziu-se benéficamente em 60%, ao contrário das proteínas de transferência de ésteres de colesterol e de fosfolípidos que não se modificaram com a terapia.

- Apesar das mudanças supracitadas terem ocorrido no sentido de prevenção cardiovascular, estas não refletiram em variações do espessamento da parede das artérias carótidas comuns. Porém, na caracterização de sua modulação, a associação entre estes vasos e diversos parâmetros metabólicos, alguns definidos como fatores de risco para a doença cardiovascular, modificou-se de maneira favorável e significativa com a TRH, especialmente com a estrogênica isolada.

CONCLUSÃO FINAL

Preconiza-se, como nas Diretrizes de Prevenção de Aterosclerose (IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose, Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2007), a prática da prevenção da doença cardiovascular no grupo populacional de mulheres pós-menopausadas, em conjunção com o seu tratamento hormonal, quando indicado, em vista dos resultados deste estudo de que diversos efeitos cardiovasculares precoces benéficos foram obtidos com o uso da terapia de reposição hormonal oral, estrogênica ou combinada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams MR et al. Inhibition of coronary artery atherosclerosis by 17-beta estradiol in ovariectomized monkeys. *Arteriosclerosis* 1990; 10:1051-7

After the early termination of the Women's Health Initiative study American Recommendations for postmenopausal hormone therapy. Stjernquist M.: North American Society Advisory Panel. *Lakartidningen* 2003; 100 (20): 1790-95

Agarwal A, Sajal G and Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol* 2005; vol 3: 28-67

Akçay T et al. Effects of hormone replacement therapy on lipid peroxides and oxidation system in postmenopausal women. *J Toxicol Environ Health A* 2000; 59(1):1-5

Angerer P, Stork S, Kothny W, Schmitt P and von Schacky C. Effect of oral postmenopausal hormone replacement on progression of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:262-268

Barrett-Connor E, Bush TI. Estrogen and coronary heart disease in women. *JAMA* 1991; 265:1861-7

Barter P: CETP and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:2029-31.

Bednarek-Tupikowski G et al. Serum lipid peroxides and total antioxidant status in postmenopausal women on replacement therapy. *Gynecol Endocrinol* 2004; 19(2): 57-63

Bednarek-Tupikowska G et al. Serum lipid peroxide levels and erythrocyte dismutase activity in premenopausal and postmenopausal women. *Gynecol Endocrinol* 2001; 14(4):298-303

Bednarek-Tupikowska G et al. Effects of oestradiol and oestrogen on erythrocyte antioxidative enzyme system activity in postmenopausal women. *Clin Endocrinol* 2006; 64(4):463-8

Berg GA et al. Higher values of hepatic lipase activity in post menopause: relationship with atherogenic intermediate density and low density lipoproteins. *Menopause* 2001; 8:51-7

Berliner JA et al. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation and genetics. *Circulation* 1995; 91: 2488-2496

Bhatnagar D et al. Increased transfer of cholesteryl esters from high density lipoproteins to low density and very low density lipoproteins in patients with angiographic evidence of coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1993; 98: 25–32

Bhavnani et al. Comparison of the antioxidant effects of equine estrogens, red wine components, vitamin E, and probucol on low-density lipoprotein oxidation in postmenopausal women. *Menopause* 2001; 8(6): 408-419

Bots ML et al. Common carotid intima-media thickness and risk of stroke and myocardial infarction: the Rotherdam Study *Circulation*. 1997 *Circulation*; 96: 1432-7

Boschcov P et al. Development of a peptide-based ELISA for the detection of antibodies against oxidized low density lipoprotein (oxLDL). *Atherosclerosis* 2000; 151: 224-77

Brinton EA. Oral estrogen replacement therapy in postmenopausal women selectively raises levels and production rates of lipoprotein A-I and lowers hepatic lipase activity without lowering the fractional catabolic rate. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16:523-8

Bruce CR, Chouinard AJr and Tall AR. Plasma lipid transfer proteins, high-density lipoproteins, and reverse cholesterol transport. *Annu Rev Nutr* 1998; 18: 297–330

Brunzel JD and Deeb SS. Familial lipoprotein lipase deficiency, apoCII deficiency and hepatic lipase deficiency. In: Scriver CR et al. *The metabolic and molecular basis of inherited disease*, 8th ed. New York, NY: McGraw-Hill 2001; 2789-2816

Bureau I et al. No antioxidante effect of combined HTR on LDL oxidizability and oxidative stress biomarkers in treated post-menopausal women. Journal of the American College of Nutrition 2002; 21: 333-338

Byington RP et al. Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study Research Group. Effect of estrogen plus progestin on progression of carotid atherosclerosis in postmenopausal women with heart disease: HERS B-mode substudy. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2002; 22(10):1692-7

Cagnacci A et al. Endothelin-1 and nitric oxide levels are related to cardiovascular risk factors but are not modified by estradiol replacement in healthy postmenopausal women. A cross-sectional and a randomized cross-over study. Maturitas 2003; Feb 25; 44(2):117-24

Castelli WP: Cardiovascular disease in women. Am J Obstet Gynecol 1988, 158: 1553-1560

Chen PF et al. Primary sequence mapping of human apolipoprotein B-100 epitopes. Comparisons of trypsin accessibility and immunoreactivity and implication for apoB conformation. Eur J Biochem 1988; 175 (1): 111-11876

Cherubini A et al. Role of antioxidants in atherosclerosis: epidemiological and clinical update. Curr Pharm Des 2005;11(16):2017-32

Clement C. Antioxidant effect of short-term hormonal treatment in postmenopausal women. Maturitas 1999; 31: 137-142

Consenso Brasileiro sobre Dislipidemias: detecção-avaliação-tratamento. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Arq Bras Cardiol 1996; 67:1-16 e 113-28

Corrado E, Rizzo M, Muratori I and Novo S. Older age and markers of inflammation are strong predictors of clinical events in women with asymptomatic carotid lesions. Menopause 2008; 15(2):240-7

Cross CE, Halliwell B, Borish ET et al. Oxygen radicals and human disease. *Ann Int Med* 1987; 107: 526-545

Damasceno NR et al. Casein and soy protein isolate in experimental atherosclerosis: influence on hyperlipidemia and lipoprotein oxidation. *Ann Nutr Metab* 2001; 45 (1): 38-46

Davis PH et al. Increased carotid intimal-medial thickness and coronary calcification are related in young and middle-aged adults. The Muscaline study. *Circulation* 1999; 100:838-42

Deng H, Zhou H and Sun M. Roles of sex hormones and oxygen free radical in coronary heart disease. *HUMAN Yi Ke Da Xue Xue Bao* 1990; 24(4):343-6

Dildar K, Kadir YH and Gülizar K. The effects of hormone replacement therapy on lipid peroxidation and antioxidant status. *Maturita*. 2001; Apr 20;38(2):165-70

Dobs AS et al. Risk factors for popliteal and carotid wall thickness in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am J Epidemiol* 1999; 150:1055-1067

Ehnhholm C and Kuusi T. Preparation, characterization and measurement of hepatic lipase. *Methods Enzymol* 1986; 129: 7716-738

Espeland MA, Applegate W, Furberg CD, Lefkowitz D, Rice L and Hunninghake D. Estrogen replacement therapy and progression of intimal-medial thickness in the carotid arteries of postmenopausal women. ACAPS Investigators. Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Progression Study. *Am J Epidemiol* 1995; 142(10):1011-9

Ettinger B, Woods NF, Barrett-Connor E and Pressman A. The North American Menopause Society 1998 menopause survey: Part II. Counseling about hormone replacement therapy: association with socioeconomic status and access to medical care. *Menopause* 2000; 7(3):143-8

Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. JAMA 2001; 285(19): 2486-97

Feletou M and Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2006; 2: 21-27

Fonceca R, Carvajal C, Almarza C and Leighton F. Endothelial cell oxidative stress and signal transduction. Biol Res 2000; 33(2): 89-96

Fonseca AM. Terapia de reposição hormonal. In: Piatto S. Tratado de ginecologia. São Paulo. Editora Artes Médicas 1997; 509-520

Fridovich I. The biology of oxygen radicals. Science 1978; 201:875-80

Fujii J, Iuchi Y and Okada F. Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. Reprod Biol Endocrinol 2005; 2: 43-5

Gidlund M, Damasceno NR, Lindoso JA, Abdalla DS and Goto H. Monoclonal antibodies, against low density lipoprotein with various degrees of oxidative modifications. Braz J Med Biol Res 1996; 29(12): 1625-8

Greendale GA, Lee NP and Arriola ER. The menopause. Lancet 1999; 353: 571-80

Griewing B, Römer T, Spitzer C, Lüdemann J, Günther A and Kessler C. Hormone replacement therapy in postmenopausal women: carotid intima-media thickness and 3-D volumetric plaque quantification. Maturitas 1999; 32(1):33-40

Guemouri L et al. Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood. Clin Chem 1991; 37(11):1932-7

Gürdöl F et al. Changes in enzymatic antioxidant defense system in blood and endometrial tissues of women after menopause. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1997; 97(1):38-46

Halperin H et al. Intermediate-density lipoproteins and liver lipase in postmenopausal women. *Medicina (B Aires)* 1992; 52(3):213-9

Hansson GK. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1876-90

Heikkinen AM et al. Postmenopausal hormone replacement therapy and autoantibodies against oxidized LDL. *Maturitas* 1998; 29:155-61

Herrington DM et al. Effects of estrogen replacement on the progression of coronary artery atherosclerosis. *N Engl J Med* 2000; 343:522-529

Hirano KS et al. Pros and cons of inhibiting cholesteryl ester transfer protein. *Curr Opin Lipidol* 2000; 11: 589–596

Hodis HN et al. Women's Estrogen-Progestin Lipid-Lowering Hormone Atherosclerosis Regression Trial Research Group. Hormone therapy and the progression of coronary-artery atherosclerosis in postmenopausal women. *N Engl J Med* 2003; 349(6):535-45

Hodis HN et al. The role of carotid arterial intima-media thickness in predicting clinical coronary events. *Ann Intern Méd* 1998; 128:262-9

Hodis HN et al. Estrogen in the prevention of atherosclerosis. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 2001; 135:939-953

Hodis HN and Mack WJ. Atherosclerosis imaging methods: assessing cardiovascular disease and evaluating the role of estrogen in the prevention of atherosclerosis. *Am J Cardiol.* 2002; 89(12A):19E-27E

Hodis HN, St John JA, Xiang M, Cushman M, Lobo RA and Mack WJ. Inflammatory markers and progression of subclinical atherosclerosis in healthy postmenopausal women (from the Estrogen in the Prevention of Atherosclerosis Trial). Am J Cardiol 2008; 101(8):1131-3

Holvoet P, Collen D. Oxidized lipoproteins in atherosclerosis and thrombosis FASEB J. 1994 Dec;8(15):1279-84

IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose Departamento de Aterosclerose da Sociedade brasileira de Cardiologia. Arq Brás cardiol 2007; vol 88 supl I

Inazu AJ et al. Cholesteryl ester transfer protein and atherosclerosis. Curr. Opin. Lipidol 2000; 11: 389–396

J Damen, Regts J and Scherphof G. Transfer of [^{14}C] phosphatidylcholine between liposome and human plasma high density lipoprotein partial purification of a transfer-stimulating plasma factor using a rapid transfer assay. Biochim Biophys Acta 1982; 712: 444-52

Jackson RL, Ku G and Thomas CE. Antioxidants: A biological defense mechanism for the prevention of atherosclerosis. Med Res Rev 1993; 13: 161-82

Jialal I and Devaraj S. Inflammation and atherosclerosis: the value of the high-sensitivity C-reactive protein assay as a risk marker. Am J Clin Pathol 2001; 116 Suppl:S108-15

Joakimsen O et al. Population-based study of age at menopause and ultrasound assessed carotid atherosclerosis. The Tromso study. J Clin Epidemiol 2000; 53:525-530

Johansson LH and Borg LAH. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. Anal Biochem 1988; 174: 331-336

Kannel WB, Hjortland MC, McNamara PM and Gordon T. Menopause and risk of cardiovascular disease: the Framingham study. *Ann Intern Med* 1976; 85(4): 447-52

Kannel, WB. Metabolic risk factors for coronary heart disease in women: perspective from the Framingham Study. *Am Heart J* 1987; 114: 413-419

Karim R et al. Determinants of the effects of estrogen on the progression of subclinical atherosclerosis: Estrogen in the Prevention of Atherosclerosis Trial. *Menopause* 2005; 12(4): 357-8

Ke RW, Todd Pace D and Ahokas RA. Effect of short-term hormone therapy on oxidative stress and endothelial function in African American and Caucasian postmenopausal women. *Fertil Steril* 2003; 79(5): 1118-22

Ketelhuth DF et al. Separation of low-density lipoprotein (LDL) and oxidised LDL (oxLDL) subspecies and reactivity against autoantibodies. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2001; 34:72-8

Kesim MD, Aydin Y, Erdemir M and Atis A. Nitric oxide in postmenopausal women taking three different HRT regimens. *Maturitas* 2005; 50(1):52-7

Koivu TA et al. The relation of oxidized LDL autoantibodies and long-term hormone replacement therapy to ultrasonographically assessed atherosclerotic plaque quantity and severity in postmenopausal women. *Atherosclerosis* 2001; 157: 471-47

Krstevska M, Dzhekova-Stojkova S and Bosilkova G. Menopause, coronary artery disease and antioxidants. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39(7):641-4

Kuller LH. Hormone replacement therapy and risk of cardiovascular disease: implications of the results of the Women's Health Initiative. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23(1):11-6

Lagrost L. Determination of the mass concentration and the activity of the plasma cholesteryl ester transfer protein (CETP). *Methods Mol Biol* 1998;110: 231-241

Lagrost L et al. Structure and function of the plasma phospholipids transfer protein. *Curr Opin Lipidol* 1998; 9:2033-209

Le Gal G. Hormone replacement therapy use is associated with a lower occurrence of carotid atherosclerotic plaques but not with intima-media thickness progression among postmenopausal women. The vascular aging (EVA) study *Atherosclerosis* 2003; 166(1) 163-70

Lewis-Barned NJ et al. Plasma cholesterol esterification and transfer, the menopause, and hormone replacement therapy in women. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84(10): 3534-8.

Manson JE. Postmenopausal hormone therapy and atherosclerotic disease. *Am Heart J* 1994; 128:1337-43

Massafra C, Buonocore G, Gioia D, Sargentini I and Farina G. Effects of estradiol and medroxyprogesterone-acetate treatment on erythrocyte antioxidant enzyme activities and malondialdehyde plasma levels in amenorrhoeic women. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997 Jan; 82(1):173-5.

Mertz W. The role of trace elements in the aging process. *Prog Clin Biol Res* 1990; 326: 229-240

Mesalić L, Tupković E, Kendić S and Balić D. Correlation between hormonal and lipid status in women in menopause. *Bosn J Basic Med Sci* 2008; 8(2):188-92

Mikkola TS and Clarkson TB. Estrogen replacement therapy, atherosclerosis and vascular function. *Cardiovasc Res* 2002; 53: 605-619

Miquel J, Ramirez-Bosca A, Ramirez-Bosca JV and Alperi JD. A review on the role of oxygen stress and favorable effects of dietary antioxidants. *Arch GerontolGeriatr* 2006; 25: 87-90

Miquel J et al. Increase with age of serum lipid peroxides: implications for the prevention of atherosclerosis. *Mech Ageing Dev.* 1998;100(1):17-24

Naessen T and Rodriguez-Macias K. Menopausal estrogen therapy counteracts normal aging effects on intima thickness, media thickness and intima/media ratio in carotid and femoral arteries. An investigation using noninvasive high-frequency ultrasound. *Atherosclerosis* 2006; 189(2): 387-92

Ozden S et al. The effects of hormone replacement therapy on lipid peroxidation and antioxidant status. *Maturitas* 2001; 38:165-170

Palinski W and Witztum JL. Immune responses to oxidative neoepitopes on LDL and phospholipids modulate the development of atherosclerosis. *J Intern Med* 2000; 21: 95-100

Pereira IRO et al. Lipid Peroxidation and nitric oxide inactivation in postmenopausal women. *Arq Brás Cardiol* 2003; 80(4):415-23

Peterson LR. Estrogen replacement therapy and coronary artery disease. *Curr Opin Cardiol* 1998; 13 (4): 223-31

Radowski S, Jankowska S and Kunicki M. Influence of hormone replacement therapy (oral and transdermal) on activity of erythrocyte Zn/Cu superoxide dismutase (Zn/Cu-SOD) in postmenopausal women. *Ginekol Pol* 2003; 74(4):282

Rich-Edwards JW, Manson JE, Hennekens CH and Buring JE. The primary prevention of coronary heart disease in women. *N Engl J Med* 1995; 332: 1758-66

Rontu R et al. Impact of long-term hormone replacement therapy on in vivo and in vitro markers of lipid oxidation. *Free Radic Res* 2004; 38(2): 129-37

Rosselli M et al. Circulating nitric oxide (nitrite/nitrate) levels in postmenopausal women substituted with 17 beta-estradiol and norethisterone acetate. A two-year follow-up study. *Hypertension* 1995; 25: 848-53

Sack MN, Rader DJ and Cannon RO: Oestrogen and inhibition of oxidation of low-density lipoproteins in postmenopausal women. *Lancet* 1994; 343: 269-270

Sacks FM, McPherson R and Walsh BW. Effect of post menopausal estrogen replacement on plasma Lp (a) concentrations. *Arch Intern Med* 1994; 154: 1106-10

Sacks FM and Walsh BW. The effects of reproductive hormone on serum lipoproteins: unresolved issues in biology and clinical practice. *Ann NY Acad Sci* 1990; 592: 272-85

Santos, R D et al. III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias e Diretrizes de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arq Bras Cardiol* 2001; 77: 1-48

Signorelli SS et al. Duration of menopause and behavior of malondialdehyde, lipids, lipoproteins and wall artery intima-media thickness. *Maturitas* 2001; 39(1):39-42

Signorelli SS et al. Behavior of some indicators of oxidative stress in postmenopausal and fertile women. *Maturitas* 2006; 53(1): 77-82

Somunkiran A et al. Effects of tibolone on blood flow resistance and intima-media thickness of the carotid arteries: effect of time since menopause. *Climacteric* 2006; 9(1):59-65

Spencer CP, Godsland IF and Stevenson JC. Is there a menopausal metabolic syndrome? *Gynecological Endocrinology* 1997; 11: 341-355

Stampfer MJ et al. Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease. Ten year follow up from the Nurses'health study. *New Engl J Med* 1991; 325: 756-62

Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC and Witztum JL. Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989; 320:915-924

Strocker R and Keaney Jr JF. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 2004; 84:1381-1478

Subbiah MTR et al. Antioxidant potencial of specific estrogens on lipid peroxidation. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77:1095-7

Szafran H and Smielak-Korombel W. The role of estrogens in hormonal regulation in hormonal regulation of lipide metabolism in women. *Przegl Lek* 1998; 55 (5): 266-70

Takahashi K et al. Long-term hormone replacement therapy delays the age related progression of carotid intima-media thickness in healthy postmenopausal women. *Maturitas* 2004; 49(2):170-7

Tall AR. Plasma cholesteryl ester transfer protein. *JLipid Res* 1993; 34:1255-74

Tardif JC. Antioxidants and atherosclerosis: emerging drug therapies. *Curr Atheroscler Rep* 2005; 7(1):71-7

Tardif JC. Insights into oxidative stress and atherosclerosis 2000; 16 Suppl D:2D-4D

Telci A, Cakatay U, Akhan SE, Bilgin ME and Sivas AT. Postmenopasal hormone replacement therapy use decreases oxidative protein damage. *Gynecol Obstet Invest* 2002; 54(2): 88-93

The Women's Health Iniciative Study Group. Design of the Women's Health Iniciative clinical trial and observacional study. *Control Clin Trials* 1998; 19:61-109

Thompson GR and Barter PJ. Therapeutic approaches to reducing the LDL- and HDL-associated risks of coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol* 2000; 11: 567-570

Tikkanen MJ et al. Effects of oestradiol and levonorgestrol on lipoprotein lipids and post-heparin plasma lipase activities in normolipoproteinemic women. *Acta Endocrinol* 1982; 99:630-5

Tilly-Kiesi M. Responses of HDL subclasses, Lp(A-I) and Lp(A-I:A-II) levels and lipolytic enzyme activities to continuous oral estrogen-progestin and transdermal estrogen with cyclic progestin regimens in postmenopausal women. *Atherosclerosis* 1997; 129(2):249-59

Ulloa N et al. Sequential Estrogen-Progestin Replacement Therapy in Healthy Postmenopausal Women: Effects on Cholesterol Efflux Capacity and Key Proteins Regulating High-Density Lipoprotein Levels. *Metabolism* 2002; 11: 1410-17

Unfer TC, Conterato GM, da Silva JC, Duarte MM and Emanuelli T. Influence of hormone replacement therapy on blood antioxidant enzymes in menopausal women. *Clin Chim Acta* 2006; 369(1):73-7

Urabe M et al. Effect of estrogen replacement therapy on hepatic triglyceride lipase, lipoprotein lipase and lipids including apolipoprotein E in climacteric elderly women. *Endocr J* 1996; 43 (6): 737-42

Van Der Loo B et al. Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging. *J exp MED* 2000; 14: 1731-44

Vogel RA: Coronary risk factors, endothelial function and atherosclerosis: a review. *Clin Cardiol* 1997; 20: 426-432

Vural P, Akgul C and Canbaz M. Effects of menopause and tibolone on antioxidants in postmenopausal women. *Ann Clin Biochem* 2005; 42(Pt 3): 220-3

Wakatsuki A, Okatani Y, Ikenoue N, Shinohara K, Watanabe K and Fukaya T. Effect of lower dose of oral conjugated equine estrogen on size and oxidative susceptibility of low-density lipoprotein particles in postmenopausal women. *Circulation* 2003;108(7):808-13

Wakatsuki A and Sagara Y. Lipoprotein metabolism in postmenopausal and oophorectomized women. *Obstet Gynecol* 1995; 85: 523-528

Walsh BW, Schiff I, Rosner B, Greenberg L, Ravnikar V and Sacks FM. Effects of postmenopausal estrogen replacement on the concentrations and metabolism of plasma lipoproteins. *N Engl J Med* 1991; 325(17): 1196-204

Wolfgang Halbe H and da Fonseca MA. Síndrome do Climatério, Tratado de Ginecologia. Editora Roça Ltda 1999; cap 139, vol 2

Wood RJ, Suter PM and Russel RM: Mineral requirements of elderly people. *Am J Clin Nutr* 1995; 62: 493-505

Yagi K. Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. *Methods in Molecular Biology* 1998; 108: 101-106

Yatsuya H. Serum phospholipids transfer protein mass as a possible protective factor for coronary heart diseases. *Circ J* 2004; 68(1): 11-6

Yla-Herttuala S et al. Pathogenesis of atherosclerosis. *Maturitas* 1996; 9:23-47

Zambon A et al. Effect of hepatic lipase on LDL in normal men and those with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb* 1993; 13:147-53

Zambon A, Hokanson JE, Brown BG and Brunzell JD. Evidence for a new pathophysiological mechanism for coronary artery disease regression: Hepatic lipase-mediated changes in LDL density. *Circulation* 1999; 99:19-59

Zang C et al. Relationship between endogenous estrogen concentrations and serum cholesteryl ester transfer protein concentrations in Chinese women. *Clin Chim Acta* 2001; 314: 77-83

Zhong SDS et al. Increased coronary heart disease in Japanese-American men with mutation in the cholesteryl ester transfer protein gene despite increased HDL levels. *J Clin Invest* 1996; 97: 2917–2923

ANEXOS

Anexo I

QUESTIONÁRIO INDIVIDUAL

DATA :		HC:	
NOME:			
DATA DE NASCIMENTO:		IDADE:	
ENDEREÇO:			
TELEFONE:			
PESO:		ALTURA:	
CINTURA:		IMC:	
IDADE DA ÚLTIMA MENSTRUÇÃO:			
SINTOMAS DA MENOPAUSA:			
USO DE TRH: ☐ SIM ☐ NÃO		QTO TEMPO:	☐ E ☐ MISTA
NOME DA MEDICAÇÃO DE TRH:			
DOSE UTILIZADA:			
OUTROS MEDICAMENTOS EM USO:			
HAS: ☐ SIM ☐ NÃO		QTO TEMPO:	
DM2: ☐ SIM ☐ NÃO		QTO TEMPO:	
TABAGISMO: ☐ SIM ☐ NÃO		QTO TEMPO:	
SEDENTARISMO: ☐ SIM ☐ NÃO		QTO TEMPO:	
QUAL ATIVIDADE FÍSICA PRÁTICA:			
QUANTAS VEZES POR SEMANA/ DURANTE QUANTO TEMPO:			
ESTÁ SEM PRATICAR A QTO TEMPO:			
CARDIOPATIA ISQUEMICA: ☐ SIM ☐ NÃO		QTO TEMPO:	
SINTOMAS (ANGINA): ☐ SIM ☐ NÃO			
OUTROS SINTOMAS:			
ÚLTIMOS EXAMES (ECG, ECOCARDIOGRAMA, CAT):			
DATA/ ANO DOS ÚLTIMOS EXAMES:			
CIRURG. REVASC. CARDÍACA / CARÓTIDA: ☐ SIM ☐ NÃO			
AVC: ☐ SIM ☐ NÃO			

ANEXO II

Consentimento pós-informação

Dados dos Pacientes:

Nome: _____ Sexo: _____ Idade: _____
RG: _____ HC: _____
End: _____

Responsável pelo paciente:

Nome: _____ Sexo: _____ Idade: _____
Parentesco: _____ Documento comprobatório: _____
End: _____

Justificativa / Objetivos

Estudo dos efeitos da pós-menopausa, da terapia de reposição hormonal através da determinação de marcadores precoces de doença cardiovascular, correlacionando-os a sinais clínicos e radiológicos de aterosclerose.

Procedimentos: Exames clínicos e laboratoriais

O procedimento será dividido em duas partes:

1. O paciente virá ao hospital para exame clínico e laboratorial de triagem;
2. Em outro dia comparecerá na clínica de ultra-som vascular para a realização de ultra-sonografia das carótidas, com duração de 30 a 40 minutos.

Exame de ultra-sonografia: ultra-sonografia não invasiva

Transtornos:

1. O voluntário terá que dispor de um dia para participar do exame clínico de triagem e do procedimento;
2. Desconforto causado pela punção venosa para coletas de sangue (Triagem);

Benefícios esperados:

Contribuição sobre os efeitos da TRH na prevenção da arteriosclerose.

Vantagem dos procedimentos:

Dar-se-á aos voluntários a possibilidade de diagnóstico de hiperlipidemia e encaminhamento ao ambulatório especializado de Dislipidemia (Cód. 2001)

Garante-se ao voluntário:

1. Atestado médico;
2. Esclarecimento de qualquer dúvida que possa surgir durante a realização do projeto;
3. Desistência na participação do projeto a qualquer momento;
4. Sigilo das informações recebidas destes;
5. Privacidade e compromisso de que sua identidade não será revelada nas conclusões e/ou publicações do trabalho;
6. Acesso à informações quanto aos resultados decorrentes da pesquisa;

Campinas,.....de.....de.....

Assinatura do paciente.....