

**EFEITOS DE DIFERENTES TERAPIAS DE  
REPOSIÇÃO HORMONAL SOBRE A PRESSÃO  
ARTERIAL E BALANÇO MINERAL ÓSSEO DE  
RATAS CASTRADAS**

**Wagner de Brito Vêras**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS  
CENTRO BIOMÉDICO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**

**Vitória-ES, Dezembro de 2005**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO BIOMÉDICO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

WAGNER DE BRITO VÉRAS

**EFEITOS DE DIFERENTES TERAPIAS DE  
REPOSIÇÃO HORMONAL SOBRE A PRESSÃO  
ARTERIAL E BALANÇO MINERAL ÓSSEO DE  
RATAS CASTRADAS**

ORIENTADOR

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Gláucia Rodrigues de Abreu

Dissertação de Mestrado apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Fisiológicas da Universidade  
Federal do Espírito Santo para a  
obtenção do grau de Mestre em Ciências  
Fisiológicas.

Vitória  
2005

Véras, Wagner de Brito

Efeitos de diferentes terapias de reposição hormonal sobre a pressão arterial e balanço mineral ósseo. Vitória, 2005.55p.

Tese de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Centro Biomédico, Universidade Federal do Espírito Santo.

Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Gláucia Rodrigues de Abreu

1. Estrogênio 2. Isoflavonas 3. Raloxifeno

# **EFEITOS DE DIFERENTES TERAPIAS DE REPOSIÇÃO HORMONAL SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL E BALANÇO MINERAL ÓSSEO DE RATAS CASTRADAS**

**WAGNER DE BRITO VÉRAS**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gláucia Rodrigues de Abreu (orientadora)**  
**Departamento de Ciências Fisiológicas-UFES**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Margareth Ribeiro Moysés**  
**Departamento de Ciências Fisiológicas-UFES**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sônia Alves Gouvêa**  
**Departamento de Ciências Fisiológicas-Salesiano**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ester Miyoki Nakamura Palacios**  
**Coordenador do PPGCF-UFES**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**

**Vitória-ES, Dezembro de 2005.**

## **DEDICO**

Ao meu pai, pelo amor e dedicação até o último momento...

A minha mãe e meus irmãos pelo apoio e incentivo, mesmo à distância.

A todos aqueles que me fizeram acreditar e realizar essa conquista.

## **AGRADECIMENTOS**

A DEUS, pelo dom da Vida.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gláucia Rodrigues de Abreu pelas orientações e cobranças nas horas necessárias.

À minha grande amiga e co-orientadora informal Ivy Alcoforado Felisberto. Sem sua ajuda, a finalização deste trabalho teria sido mais difícil.

À minha grande amiga, Roberta Carvalho Caetano, pelo companheirismo e apoio.

Ao funcionário da Faculdade Salesiana, Luciano Simonassi, pela valiosa ajuda na coleta de dados.

Aos alunos de iniciação científica: Flávia, Uli, Vanessa, Juliana e Luciana camisa, cuja ajuda foi crucial à realização da parte experimental deste trabalho.

Aos demais colegas de laboratório: Sônia, Jaqueline, César, Marcelo, Thiago e Walquíria, pelo apoio e torcida.

Aos Professores, Dr<sup>a</sup>. Margareth Ribeiro Moysés, Dr<sup>a</sup>. Nazaré Souza Bissoli e Dr<sup>a</sup>. Maria Cicilini pela amizade, apoio e auxílio.

Ao Laboratório Tommasi pela grande colaboração e confiança.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas pela orientação e incentivo.

A todos aqueles que, na humildade do anonimato, contribuíram com seu trabalho e seu sorriso.

“Aquele que habita no esconderijo do Altíssimo,  
à sombra do Onipresente descansará”  
Salmo 91

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Valores médios da pressão arterial média de ratas controles (C), ratas castradas (CC), castradas e tratadas com estrogênio (CE), com isoflavona (CI) e com raloxifeno (CR), após 12 semanas de tratamento .....32
- Figura 2** - Valores médios do cálcio sérico de ratas controles (C), ratas castradas (CC), castradas e tratadas com estrogênio (CE), com isoflavona (CI) e com raloxifeno (CR), após 12 semanas de tratamento .....33
- Figura 3** - Média dos valores de fósforo sérico de ratas controles (C), ratas castradas (CC), castradas e tratadas com estrogênio (CE), com isoflavona (CI) e com raloxifeno (CR), após 12 semanas de tratamento .....33
- Figura 4** - Média dos valores de cálcio ósseo de ratas controles (C), ratas castradas (CC), castradas e tratadas com estrogênio (CE), com isoflavona (CI) e com raloxifeno (CR), após 12 semanas de tratamento .....34
- Figura 5** - Média dos valores de fósforo ósseo de ratas controles (C), ratas castradas (CC), castradas e tratadas com estrogênio (CE), com isoflavona (CI) e com raloxifeno (CR), após 12 semanas de tratamento.....35
- Figura 6** - Média dos valores do peso úmido do fêmur direito de ratas controles (C), ratas castradas (CC), castradas e tratadas com estrogênio (CE), com isoflavona (CI) e com raloxifeno (CR), após 12 semanas de tratamento.....36
- Figura 7** - Média dos valores do peso seco do fêmur direito de ratas controles (C), ratas castradas (CC), castradas e tratadas com estrogênio (CE), com isoflavona (CI) e com raloxifeno (CR), após 12 semanas de tratamento.....37
- Figura 8** - Média dos valores do peso úmido do fêmur esquerdo de ratas controles (C), ratas castradas (CC), castradas e tratadas com estrogênio (CE), com isoflavona (CI) e com raloxifeno (CR), após 12 semanas de tratamento.....38



<b>Figura 9</b> - Média dos valores do peso seco do fêmur esquerdo de ratas controles (C), ratas castradas (CC), castradas e tratadas com estrogênio (CE), com isoflavona (CI) e com raloxifeno (CR), após 12 semanas de tratamento .....	39
<b>Figura 10</b> - Média dos valores do peso úmido do ventrículo esquerdo de ratas controles (C), ratas castradas (CC), castradas e tratadas com estrogênio (CE), com isoflavona (CI) e com raloxifeno (CR), após 12 semanas de tratamento.....	40
<b>Figura 11</b> - Média dos valores do peso seco do ventrículo esquerdo de ratas controles (C), ratas castradas (CC), castradas e tratadas com estrogênio (CE), com isoflavona (CI) e com raloxifeno (CR), após 12 semanas de tratamento .....	41
<b>Figura 12</b> - Média dos valores do peso úmido do útero de ratas controles (C), ratas castradas (CC), castradas e tratadas com estrogênio (CE), com isoflavona (CI) e com raloxifeno (CR), após 12 semanas de tratamento .....	42
<b>Figura 13</b> - Média dos valores do peso seco do útero de ratas controles (C), ratas castradas (CC), castradas e tratadas com estrogênio (CE), com isoflavona (CI) e com raloxifeno (CR), após 12 semanas de tratamento .....	43

## SUMÁRIO

<b>1 RESUMO</b> .....	12
<b>2 ABSTRACT</b> .....	14
<b>3 INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	23
<i>4.1 Objetivo Geral</i> .....	23
<i>4.2 Objetivo Específico</i> .....	23
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	24
<i>5.1 Animais Experimentais</i> .....	24
<i>5.2 Grupos Experimentais</i> .....	24
<i>5.3 Protocolo Experimental</i> .....	24
<i>5.4 Tratamento com Estrogênio</i> .....	25

5.5 Tratamento com Isoflavona .....	25
5.6 Tratamento com Raloxifeno .....	25
5.7 Procedimentos Cirúrgicos .....	25
5.7.1 Castração .....	25
5.7.2 Cateterização .....	26
5.8 Procedimento Experimental .....	26
5.8.1 Medida da Pressão Arterial .....	26
5.8.2 Coleta de Sangue .....	27
5.8.3 Dosagem de Cálcio Sérico .....	27
5.8.4 Dosagem de Fósforo Sérico .....	27
5.8.5 Dosagem de Cálcio e Fósforo Ósseo .....	27
5.8.6 Estimativa das Massas dos Tecidos .....	28
5.9 Análise Estatística.....	29
<b>6 Resultados .....</b>	<b>30</b>
6.1 Efeito dos Tratamentos na Pressão Arterial Média .....	30
6.2 Efeito dos Tratamentos sobre os Níveis Séricos e Ósseos de Cálcio e Fósforo .....	30
6.2.1 Cálcio Sérico .....	30
6.2.2 Fósforo Sérico .....	31
6.2.3 Cálcio Ósseo .....	32
6.2.4 Fósforo Ósseo.....	32
6.3 Efeitos dos Tratamentos sobre o Peso Corporal .....	33
6.4 Efeitos dos Tratamentos sobre o Peso dos Fêmures Úmidos e Secos .....	34
6.4.1 Peso Úmido do Fêmur Direito .....	34
6.4.2 Peso Seco do Fêmur Direito .....	35
6.4.3 Peso Úmido do Fêmur Esquerdo .....	35
6.4.4 Peso Seco do Fêmur Esquerdo .....	36
6.5 Efeitos dos Tratamentos sobre o Peso do Ventrículo Esquerdo .....	37
6.5.1 Peso Úmido do Ventrículo Esquerdo .....	37
6.5.2 Peso Seco do Ventrículo Esquerdo .....	38
6.6 Efeitos dos Tratamentos sobre o Peso do Útero .....	39

6.6.1 Peso Úmido do Útero .....	39
6.6.2 Peso Seco do Útero .....	40
<b>7 DISCUSSÃO .....</b>	<b>42</b>
<b>8 RREFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>47</b>

## Resumo

O estrogênio tem um importante papel na regulação homeostática de vários tecidos do organismo, bem ilustrados pelas alterações fisiopatológicas que ocorrem na sua deficiência, na menopausa. Com o objetivo de amenizar estas alterações, tem-se estudado o uso da terapia de reposição hormonal (TRH) na pós-menopausa, em função de seus benefícios na prevenção da osteoporose e doenças cardiovasculares. Entretanto, a TRH tradicional com estrogênio está associada a uma maior incidência no desenvolvimento de câncer de mama e endométrio. Uma das alternativas para a reposição hormonal são as isoflavonas (fitoestrogênios derivados da soja) e o raloxifeno (SERM).

Este estudo tem como objetivo avaliar os possíveis efeitos do 17- $\beta$ -estradiol, isoflavonas e raloxifeno sobre ratas castradas por meio da medida da pressão arterial, concentração de cálcio e fósforo ósseo e sérico, peso corpóreo, da câmara ventricular esquerda e uterino.

Ratas Wistar adultas foram divididas em cinco grupos (n=8). Um grupo controle (C), um grupo castrado (CC) e os grupos castrados e tratados com estrogênio (CE), isoflavona (CI) e raloxifeno (CR). Dez semanas após a ovariectomia, iniciou-se o tratamento dos grupos CE, CI e CR que durou 12 semanas. No final do tratamento, foi feita a medida direta da pressão arterial e coletadas amostras de sangue, cuja concentração de cálcio e fósforo foram medidas. Os animais foram, então, sacrificados para se analisar o peso úmido e seco dos fêmures direito e esquerdo, ventrículo esquerdo e útero, além da análise da concentração de cálcio e fósforo dos fêmures.

O tratamento com a 17- $\beta$ -estradiol, isoflavonas e raloxifeno não alterou os níveis pressóricos dos grupos C, CC, CE, CI e CR ( $90,8 \pm 2,0$  vs.  $94,7 \pm 1,7$  vs.  $95,1 \pm 0,9$  vs.  $91,3 \pm 0,9$  vs.  $94,1 \pm 1,2$  mmHg, respectivamente). Os grupos CE e CR obtiveram os menores níveis plasmáticos ( $6,1 \pm 0,7$  e  $6,3 \pm 0,1$  mg/dL, respectivamente) e os maiores níveis ósseos ( $19,3 \pm 0,5$  e  $18,7 \pm 0,6$  mg/g de fêmur, respectivamente) de cálcio. O grupo CR apresentou o menor nível de fósforo sérico ( $5,5 \pm 0,5$  mg/dL) e os grupos CE e CR apresentaram os menores níveis de fósforo ósseo ( $9,2 \pm 0,7$  e  $10,0 \pm 0,5$  mg/g de fêmur, respectivamente). O grupo CE obteve o menor ganho de peso corporal ( $203,8 \pm 4,3$  g). Quanto ao peso dos fêmures, os grupos CE e CR obtiveram os maiores ganho de massa óssea ( $2,3 \pm$

0,04;  $2,0 \pm 0,06$  mg/g de fêmur). O ventrículo esquerdo apresentou peso maior no grupo CE ( $0,49 \pm 0,01$  mg/g), assim como o peso do útero ( $0,64 \pm 0,02$  mg/g).

Com base nos resultados obtidos, concluímos que os tratamentos com a isoflavona e o raloxifeno apresentaram maiores benefícios, quando comparados ao tratamento com o 17- $\beta$ -estradiol, pois aumentaram a concentração de cálcio e a massa óssea sem alterar a pressão arterial e nem o trofismo das células cardíacas e uterinas.

## Abstract

The estrogen has an important role in the homeostatic regulation of some tissues of the organism, good illustrated by the pathophysiological alterations that occur in its deficiency, in the menopause. With the objective to brighten up these alterations, the use of the hormonal replacement therapy (HRT) in the after-menopause has been studied, in function of its benefits in the prevention of osteoporosis and cardiovascular diseases. However, the traditional HRT with estrogen is associated with a bigger incidence in the development of cancer of breast and endometrium. One of the alternatives for the hormonal replacement is isoflavones (phytoestrogens derivatives of the soy) and the raloxifene (SERM).

This study it has as objective to evaluate the possible effect of 17- $\beta$ -estradiol, isoflavones and raloxifene on rats ovariectomized through the measure of the arterial pressure, bone and plasmatic calcium and phosphorus concentration, corporeal, left ventricular and uterine weight.

Adult Wistar rats had been divided in five groups (n=8). A group has controlled (C), a castrated group (CC) and the groups castrated and dealt with estrogen (CE), isoflavone (CI) and raloxifene (CR). Ten weeks after the ovariectomy, initiated the treatment of groups CE, CI and CR that lasted 12 weeks. In the end of the treatment, the direct measure of the pressure arterial and collected samples of blood was made, whose concentration of calcium and match had been measured. The animals had been, then, sacrificed to analyze the humid and dry weight of thighbone right and left, left ventricle and uterus, beyond the analysis of the concentration of calcium and match of thighbone.

The treatment with 17- $\beta$ -estradiol, isoflavones and raloxifene did not modify the blood pressure levels of the rats. Groups CE and CR had gotten the lesser plasmatic levels and the biggest bone calcium levels. Group CR presented the lesser level of plasmatic match and groups CE and CR had presented the lesser levels of bone match. Group CE got the lesser profit of corporeal weight. How much to the weight of thighbone, biggest groups CE and CR had gotten the profit of bone mass. The left ventricle presented bigger weight in group CE, as well as the weight of uterus.

On the basis of the gotten results, we conclude that the treatments with isoflavone and the raloxifene had presented greater benefits, when comparative to the treatment with 17- $\beta$ -estradiol, therefore they had increased the calcium concentration and the bone mass without modifying the arterial pressure and nor the tropism of the cardiac and uterine cells.

O envelhecimento é um processo multifatorial determinado pelo declínio fisiológico, bioquímico e funcional dos órgãos, o que aumenta a susceptibilidade às doenças crônico-degenerativas, exibindo características próprias em diferentes indivíduos. A mulher, especificamente, experimenta umas das mais inevitáveis conseqüências do envelhecimento após a instalação da menopausa. A depleção dos folículos ovarianos, com conseqüente falência funcional dos ovários, culmina com a interrupção definitiva dos ciclos menstruais, caracterizando a menopausa (Gebara; Aldrighi, 1999).

Os ovários produzem dois importantes hormônios: o estrogênio e a progesterona. Os estrogênios constituem um grupo de hormônios essenciais para o desenvolvimento do útero, da mama e de outras importantes transformações associadas com a puberdade, determinando as características femininas de distribuição de gordura além do processo de reprodução. Os estrogênios têm efeito sobre inúmeros tecidos do organismo feminino, tais como o sistema nervoso central, ossos, trato urinário, fígado, coração, vasos sanguíneos, dentre outros. O declínio funcional dos ovários ocorre de forma gradativa, englobando um período de transição, denominado climatério, que se inicia aos 35 anos (Nilsson, 1985; Brincat et al., 1988; te Velde et al., 1998).

A falência ovariana, com o fim da produção de estrogênios, ainda é acompanhada por pequena produção de hormônio masculino, a testosterona, transformada em estradiol na gordura corporal. A glândula adrenal também mantém a produção de hormônio masculino, da mesma forma transformada em estrona e estradiol. Ao lado do estroma cortical ovariano, essas são as únicas fontes de produção de estrogênios após a menopausa, bastante aquém da produção que ocorre na fase reprodutiva da mulher (Davison et al., 1995). A mais potente forma de estrogênio é o estradiol, seguido pelo estriol e a estrona.

Embora seja um processo fisiológico, a menopausa resulta em profundas modificações no organismo da mulher, determinando, quase sempre, diversos sintomas clínicos, além de torná-las susceptível ao aparecimento de doenças, como a osteoporose, as doenças cardiovasculares (DCV), atrofia urogenital, declínio cognitivo, depressão e a doença de Alzheimer (Xu et al., 2005).

Estudos epidemiológicos mostram que, até os 35 anos de idade, a prevalência de hipertensão é maior no sexo masculino, porém, após os 60 anos mulheres são também acometidas. A hipertensão arterial é reconhecidamente um



importante fator de risco para desenvolvimento de DCV. O efeito da menopausa na pressão arterial ainda não está completamente entendido, mas o aumento progressivo da pressão arterial com o climatério é indiscutível. O estrogênio apresenta um efeito vasodilatador que é dependente do endotélio. Receptores estrogênicos são encontrados ao longo de toda parede vascular, e, quando estimulados respondem com vasodilatação. Além disso, o estrogênio parece estimular a liberação de substâncias como o óxido nítrico e a prostraciclina, que são potentes vasodilatadores. As alterações no mecanismo de ação e na produção dessas substâncias vasoativas seriam os principais responsáveis por modificações na pressão arterial ocorrida na mulher após a menopausa (Webb et al., 2000; Fisman et al., 2002).

O estrogênio também está envolvido no processo de hipertrofia do miocárdio, através do sistema renina-angiotensina, cujo já conhecido efeito de remodelação e aumento da transcrição gênica de proteínas no músculo cardíaco parece ser modulado pelos receptores estrogênicos encontrados nas células musculares cardíacas (Grobe et al., 2005; Agabiti-Rosei et al., 2002; Naoharu et al., 1995)

Depois das DCV, a osteoporose (OST) é outra doença com alta incidência em mulheres pós-menopausa. A OST é caracterizada por perda de massa óssea com deterioração da microarquitetura do tecido ósseo, resultando em fragilidade dos ossos e, conseqüentemente, aumentando o risco de fraturas. É a principal causa de colapso vertebral e a maior causa de fraturas nos idosos.

Na menopausa ocorrem alterações de remodelação óssea, com aumento da reabsorção e aumento na atividade dos osteoclastos, à medida que os osteoblastos deixam de exercer sua função reparadora. A ação estrogênica se faz diretamente sobre os ossos através dos receptores estrogênicos e por efeitos sobre o colágeno. Nessa fase, os efeitos positivos dos estrogênios sobre a calcitonina, metabolismo da vitamina D e absorção de cálcio estão diminuídos (Bjarnason et al., 1998; O'Connell et al., 1998).

O metabolismo ósseo é regulado por três hormônios sistêmicos, responsáveis pelo balanço homeostático corporal de cálcio: paratormônio (PTH), 1,25 diidroxivitamina D [1,25(OH)<sub>2</sub>D] e calcitonina (CT) (Aksnes, 1992). O PTH e o 1,25(OH)<sub>2</sub>D agem conjuntamente para manter os precisos limites séricos de cálcio. Sendo assim, diminuição dos níveis séricos de cálcio leva estes hormônios a aumentar a reabsorção óssea e diminuição da excreção renal de cálcio e

exatamente o inverso com o fósforo (Heaney, 2004). Já a CT age diretamente sobre as células osteoclásticas, embora de forma aguda, diminuindo sua função e, portanto, inibindo a reabsorção óssea (Bikle, 1995; Kim et al., 2003).

No sistema ósseo, o estrogênio age diretamente estimulando o aumento do número de células osteoblásticas que são células responsáveis por sintetizar matriz óssea e inibe a atividade osteoclástica que são células responsáveis pela reabsorção óssea. Indiretamente, o estrogênio modula o metabolismo renal da vitamina D e aumenta a secreção de calcitonina, ambos os mecanismos inibidores da reabsorção (Fontana & Delmas, 1999), portanto a ausência de estrogênio justifica as alterações no metabolismo ósseo. Estudo realizado por Fontana & Delmas (1999), mostra que o estrogênio age reduzindo o risco de fratura óssea, através do aumento da densidade mineral óssea na coluna, rádio e quadril em mulheres pós-menopausa reduzindo o risco de adquirir OST. Sendo assim, o uso do estrogênio na terapia de reposição hormonal (TRH) seria benéfico para o osso.

A TRH é o recurso mais importante na (1) prevenção da osteoporose decorrente de hipostrogenismo, diminuindo a reabsorção óssea com conseqüente prevenção da perda óssea; e (2) prevenção das DCV e a mesma terapia pode elevar os riscos de desenvolvimento de câncer de mama e de útero (Purdie, 2000).

A ação do estrogênio, assim como de outros esteróides, depende, em parte, da ligação com receptores intracelulares, abundantes em todo organismo (Hall, 2004). A interação estrogênio/receptor resulta na formação de um complexo móvel que se desloca até o núcleo, ligando-se com regiões específicas do DNA e modulando a transcrição gênica (Beato; Sanchez-Pacheco, 1996). Isso explica os mecanismos genômicos do estrogênio que necessitam de horas ou dias para ocorrerem e requerem transcrição gênica com subseqüente modulação na expressão de proteínas (Klein-Hitpass et al., 1986). Alguns dos efeitos do estrogênio são mediados por receptores localizados na superfície da célula, uma vez que formas do estrogênio impermeáveis à membrana celular induzem a mitose pela ativação da proteína quinase, assim como, a estimulação na produção de GMPc e liberação de óxido nítrico (ON). A ativação de receptores de superfície de membrana está relacionada a mecanismos não-genômicos do estrogênio, que envolvem vias de sinalização rápida tais como acoplamento com proteínas G e geração de segundos mensageiros (Russel et al., 2000).

Estes receptores estrogênicos foram descobertos por Jensen e Jacobson (1962). A clonagem do receptor de estrogênio (RE), hoje conhecido como RE $\alpha$ , foi relatada por Green et al. e Greene et al., em 1986. Por muito tempo, acreditou-se que só havia um tipo de receptor, entretanto, em 1996, Kuiper e colegas clonaram um receptor proveniente da próstata de ratos, que foi denominado de RE $\beta$ . A distribuição tecidual e a afinidade relativa dos ligantes é diferente para os receptores RE $\alpha$  e RE $\beta$  e essa descoberta pôde ajudar a explicar a ação seletiva do estrogênio sobre diferentes tecidos (Paech et al., 1997). Estudos recentes indicaram que o RE $\beta$  pode antagonizar ou controlar a atividade do RE $\alpha$  em vários tecidos, incluindo o útero, e mediar efeitos estrogênicos independentes da ação do RE $\alpha$  em alguns tecidos, tais como osso e o sistema imune. Uma moderada a alta expressão de RE $\alpha$  tem sido identificada na hipófise, rins, epidídimo e supra-renal, ao passo que uma moderada a alta expressão do RE $\beta$  tem sido observada na próstata, pulmão, bexiga e cérebro. Sobreposição de receptores RE $\alpha$  e RE $\beta$  têm sido identificadas nos ovários, testículos, útero e ossos (Kuiper et al., 1997; Paech et al., 1997).

Mesmo com o aparente efeito benéfico do estrogênio na prevenção e tratamento da osteoporose e alívio dos sintomas da menopausa, têm surgido importantes restrições quanto à segurança da TRH nos esquemas terapêuticos disponíveis. A TRH vem sendo associada ao desenvolvimento de câncer de endométrio e mamas, além de seu uso prolongado estar relacionado a maior incidência de eventos cardiovasculares e tromboembólicos venosos. Um estudo prospectivo publicado em 1998 gerou grande polêmica na comunidade científica. Foi denominado de HERS (“Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study”) e incluiu 2763 mulheres com idades entre 44 e 79 anos que apresentavam doenças coronárias prévias e útero intacto. Todas foram acompanhadas por um período de 4,1 anos, com visitas a cada quatro meses para avaliações parciais dos resultados. Foi concluído que a associação do estrogênio/progesterona não foi capaz de reduzir as taxas de doenças coronárias, mas, em contraste, observou-se um aumento significativo destas no primeiro ano. Além do mais, houve uma elevação significativa de tromboembolismo e doença biliar. É interessante notar que, após quatro anos de seguimento, constatou-se significativa queda na taxa das doenças coronárias. Esse estudo foi interrompido, não permitindo uma melhor avaliação do benefício, em longo prazo, da TRH (Grady et al., 1998). Esses fatos têm incentivado pesquisas de

terapias alternativas ao estrogênio que sejam mais seguras e aceitáveis (Kessel,1998).

Outro estudo mais recente, o WHI (*Women's Health Initiative*) de 2002, foi planejado para avaliar os riscos e benefícios de estratégias que potencialmente reduziram a incidência de doenças cardiovasculares, câncer de mama e colorretal e fraturas osteoporóticas. Estas estratégias incluíam TRH, vitaminas e dieta em 16.608 mulheres com idades entre 50 e 79 anos. A parte do estudo que comparou a utilização de TRH (estrogênio associado à progestógeno) com placebo foi interrompida em 2002, pois o comitê de segurança do estudo constatou excesso de risco de câncer de mama invasivo após média de 5,2 anos de seguimento. Por outro lado, houve uma redução de 5% de fraturas de quadril no grupo que usava TRH.

Outros estudos observaram que mulheres do sudoeste asiático, cuja dieta básica é alimentos ricos em soja e seus derivados, apresentam menor incidência de câncer, osteoporose e doenças cardiovasculares e sofrem menos com os sintomas da menopausa que mulheres do ocidente. Esses baixos índices permaneceram em asiáticas que migraram para o ocidente e que mantiveram seus hábitos alimentares. Entretanto, as imigrantes que aderiram à dieta ocidental, com baixo teor de fitoestrogênios, apresentaram os índices semelhantes às das mulheres ocidentais (Parkin, 1989; Shimizu et al.,1991; Adlercreutz,1990 e 1998; Adlercreutz et al.,1993a). Este fato levou as isoflavonas, principais representantes dos fitoestrogênios, encontrados na soja, a serem anunciadas como terapias alternativas para uma variedade de condições hormônio-dependentes, incluindo diminuição nos riscos de câncer, alívio nos sintomas da menopausa (como ondas de calor), efeitos positivos sobre a função cognitiva e demência e sobre a preservação óssea. Por isso, as isoflavonas se encontram sob intensa investigação.

A soja e seus derivados são de isoflavonas. A maior parte das isoflavonas ingeridas encontra-se na sua forma glicosídica (genistina, daidzina e glicitina) e para serem absorvidas precisam, primeiramente, ser convertidas pelas glicosidases das bactérias intestinais em agliconas como a genisteína, daidzeína e gliciteína. Após absorção intestinal, cai na circulação porta apresentando intenso metabolismo hepático, sendo convertidas em seus metabólitos que também são farmacologicamente ativos (Setchell et al.,1984). A daidzeína é biotransformada em equol, dihidrodaidzeína ou o-desmetilangolesin (O-DMA), enquanto a genisteína é convertida em p-etilfenol (Axelson et al.,1984; Kelly et al., 1993).

As isoflavonas têm estrutura química muito semelhante aos estrogênios de mamíferos (Setchell; Adlercreutz,1988), sendo o anel fenólico a estrutura principal para a maioria dos compostos capazes de se ligarem aos receptores de estrogênio e estimular a transcrição gênica (Leclercq; Heuson,1979). Vários trabalhos mostram que as isoflavonas apresentam atividade estrogênica fraca, quando comparadas ao estradiol e atuam tanto como agonistas parciais quanto antagonistas dos receptores de estrogênio (Makela et al.,1995a e b, Brzozowski et al.,1997), dependendo de sua concentração, tipo de receptor, presença ou ausência de estrogênios endógenos e o tipo de tecido-alvo (Kuiper et al.,1996). A afinidade relativa da daidzeína aos receptores RE $\alpha$  e RE $\beta$  é, respectivamente, 1000 vezes e 200 vezes menor do que as mesmas concentrações do estradiol. A afinidade relativa da genisteína ao receptor RE $\alpha$  é 25 vezes menor do que a do estradiol, ao passo que em relação ao receptor RE $\beta$  é equivalente (Kuiper et al.,1997).

A incidência de osteoporose e o risco de fraturas são significativamente menores em mulheres japonesas do que em mulheres ocidentais na pós-menopausa (Cooper et al.,1992). A ipriflavona, fitoestrogênio sintético que apresenta como principal metabólito a daidzeína, foi capaz de prevenir perda óssea e aumentar a formação do osso, sendo utilizada como alternativa para TRH na prevenção da OST na pós-menopausa (Brandi, 1993). Foi demonstrado por Arjmandi et al. (1996 e 1998) que a densidade óssea foi maior em ratas adultas ovariectomizadas alimentadas com proteínas da soja do que naquelas alimentadas com dietas à base de caseína. O efeito poupador ósseo era mediado pelas isoflavonas contidas nas proteínas da soja. Parece que a ação de fitoestrogênios não-esteroidais sobre a remodelagem óssea difere dos estrogênios clássicos (Blair et al.,1996). A recente identificação de RE $\beta$  nos ossos e a alta afinidade dos fitoestrogênios a esse tipo de receptor podem explicar os efeitos das isoflavonas nesse tecido (Kuiper et al., 1997 e 1998). Esses efeitos não parecem ser estritamente hormonais, uma vez que fatores de crescimento e citocinas apresentam um importante papel na regulação da atividade dos osteoclastos (Manolagas; Jilka,1995). Várias dessas substâncias agem via fosforilação da tirosina quinase, e, portanto, podem ser perfeitamente influenciadas pela genisteína. Mais recentemente, tem sido sugerido que a genisteína pode estimular a produção de fator de crescimento transformador  $\beta$ 1 (FCT $\beta$ 1) nos osteoclastos e que isto precipitaria a apoptose dessas células, diminuindo a reabsorção óssea (Kim et al., 1998).

Além da isoflavona, outros compostos foram alvos de pesquisas, na expectativa de se encontrar nestes novos compostos, o perfil do estrogênio para serem usados na fase pós-menopausa sem causar os efeitos proliferativos sobre a mama e endométrio, e que sejam capazes de reproduzir os efeitos benéficos do estrogênio sobre o sistema cardiovascular e no tecido esquelético (Delmas et al., 1997; Heaney & Draper, 1996; Mitlak & Cohen, 1997). Os Moduladores Seletivos de Receptores de Estrogênio (SERM) tais como o tamoxifeno e o raloxifeno foram desenvolvidos com esse intuito (Mitlak & Cohen, 1997).

Um dos composto da classe dos SERMs é o raloxifeno (Ly-139481). O raloxifeno foi desenvolvido para prevenir a osteoporose (Cosman & Lindsay, 1999; Hochner-Celnikier, 1999) sem causar efeitos estimulatórios sobre a mama e o útero. O raloxifeno mantém a densidade óssea em mulheres pós-menopausa atuando sobre o remodelamento ósseo de forma similar como faz o estrogênio, reduzindo a reabsorção e o ciclo metabólico do osso (Fontana & Delmas, 1999). Mulheres tratadas com raloxifeno apresentaram ganho nos valores basais da densidade mineral óssea da coluna e quadril em relação as que receberam placebo que apresentaram diminuição da densidade mineral óssea (Delmas et al., 1997). O raloxifeno também possui efeitos no fígado alterando o metabolismo lipídico (Mitlak & Cohen, 1997; Cosman & Lindsay, 1999). O provável mecanismo para o raloxifeno reduzir o colesterol aparentemente implica na redução de receptores hepáticos de LDL mediada por RE, no qual tem como resultado a intensificação da depuração de lipoproteínas séricas que contém as apolipoproteínas (apo B e apo E) (Brown & Goldstein, 1980; Ma et al., 1986).

Diante deste amplo leque de tratamento para os sintomas e doenças associadas ao climatério, faz necessário maiores estudos comparativos entre os possíveis tratamentos, com o objetivo de auxiliar a escolha do mais eficaz e/ou menos prejudicial à saúde da mulher com a chegada da menopausa.

## **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar os efeitos do tratamento com o 17- $\beta$ -estradiol, as isoflavonas e o raloxifeno em ratas menopausadas por ovariectomia.

## **2.2 Objetivos Específicos**

Avaliar os efeitos da terapia de reposição hormonal com 17- $\beta$ -estradiol, as isoflavonas e o raloxifeno sobre:

- Peso corporal, peso do útero, peso da câmara ventricular esquerda e dos fêmures direito e esquerdo.
- Pressão arterial
- Concentração de cálcio sérico e ósseo.
- Concentração de fosfato sérico e ósseo.

### **3.1 Animais Experimentais**

Foram utilizadas ratas Wistar, fêmeas, com idade de três meses e peso corporal variando entre (250-280g), fornecidos pelo Biotério de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo.

Os animais foram mantidos em temperatura controlada (20-25°C) e iluminação artificial de acordo com o recomendado para biotérios de pesquisa (FINEP). As ratas eram acomodadas em gaiolas (quatro por gaiola) com livre acesso à ingestão de água e ração.

### **3.2 Grupos Experimentais**

As ratas foram divididas em cinco grupos (n= 8), da seguinte forma:

- 1) Ratas controle (C).
- 2) Ratas castradas (CC).
- 3) Ratas castradas e tratadas com estrogênio (CE).
- 4) Ratas castradas e tratadas com isoflavona (CI).
- 5) Ratas castradas e tratadas com raloxifeno (CR).

### **3.3 Protocolo Experimental**

1º dia do protocolo

- Verificação do peso corporal.
- Castração dos animais.

10 semanas após a castração (70º dia do protocolo)

- Início do tratamento para os grupos CE, CI e CR

12 semanas após o início do tratamento (154º dia do protocolo)

- Verificação do peso corporal.
- Cateterização da artéria femoral para medida da pressão arterial direta (8 horas depois).
- Após a medida da pressão arterial foram coletadas amostras de sangue para dosagem do cálcio e fosfato plasmática.



- Os animais foram sacrificados e o ventrículo esquerdo, útero e fêmur direito e esquerdo foram isolados para obtenção do peso úmido e peso seco.

### **3.4 Tratamento com Estrogênio**

Ao grupo de animais que foram tratados com estrogênio (17- $\beta$ -estradiol, diluído em óleo vegetal), foram administradas doses diárias de 0,2 mg/100g de peso corporal por via intramuscular por 12 semanas.

### **3.5 Tratamento com Isoflavonas**

Ao grupo de animais que foram tratados com isoflavonas (diluído em água), foram administradas, durante 12 semanas, doses diárias de 0,6 mg/100g de peso corporal por via oral pelo método de gavage, onde era introduzido na boca do animal até atingir o esôfago, uma cânula de aproximadamente 5 cm de comprimento, através do qual o medicamento era injetado.

### **3.6 Tratamento com Raloxifeno**

Ao grupo de animais que foram tratados com raloxifeno (diluído em água), foram administradas, durante 12 semanas, doses diárias de 0,3 mg/ 100g de peso corporal por via oral pelo método de gavage, onde era introduzido na boca do animal até atingir o esôfago, uma cânula de aproximadamente 5 cm de comprimento, através do qual o medicamento era injetado

Todos os animais foram alimentados com a ração do tipo MP-77 da marca Primor®.

### **3.7 Procedimento Cirúrgico**

#### **3.7.1 Castração**

Após anestesia com Hidrato de Cloral 10%, as fêmeas foram submetidas a uma incisão de 1 a 1,5 cm na pele, entre a última costela e a coxa, a 1 cm da linha mediana, seguida de uma incisão na camada muscular, abrindo a cavidade peritoneal para posterior ligadura da trompa uterina e remoção dos ovários. Após a retirada da trompa uterina, foi realizada sutura da musculatura e pele. O mesmo processo foi realizado no lado oposto. Ao final do procedimento, os animais

receberam 0,1 ml do antibiótico Enrofloxacina 2,5% (Flotril®), por via intramuscular e foram colocados em gaiolas.

### **3.7.2 Cateterização**

Os cateteres foram confeccionados pela conexão de duas cânulas de polietileno PE10 e PE50, medindo três e 15 cm de comprimento respectivamente, montadas sobre um mandril de aço inoxidável e soldadas por aquecimento. Após a anestesia com éter etílico, a artéria femoral foi isolada através de uma incisão na região inguinal e nela introduzida a extremidade de menor calibre da cânula PE10. A extremidade livre da cânula PE50 foi mantida e preenchida com solução salina (NaCl 0,9%) e ocluída com o uso de um pino inoxidável. Foi feita a coleta de sangue (um ml) para posteriores dosagens bioquímicas. Logo após a coleta do volume de sangue, foi feita reposição com salina, através da cânula, para garantir que não houvesse alterações na medida direta da pressão arterial. A cânula então foi heparinizada com solução de heparina a 2% para que não ocorresse formação de coágulos, que poderiam atrapalhar a medição da pressão direta. Foi feita a exteriorização da cânula, por meio de um trocáter, até próximo à região médio-cervical posterior do animal; após ser exteriorizada, a cânula foi fixada por um fio de sutura, a fim de evitar que o animal pudesse arrancá-la e/ou mordê-la. Esse procedimento permitiu que o estudo pudesse ser realizado com animal acordado e com o mínimo de manuseio e perturbação durante o procedimento. A cânula arterial foi utilizada para verificação direta da pressão arterial (PA) e ainda para a retirada de amostra sangüínea para dosagem do perfil lipídico, cálcio e fosfato sérico.

## **3.8 Procedimentos Experimentais**

### **3.8.1 Medida direta da pressão arterial**

No final do estudo, 8 horas após a cateterização, com o animal acordado e com um mínimo de perturbação e manuseio, o cateter de polietileno (cânula) foi conectado a um transdutor de pressão (Spectramed P23XL) e os dados de pressão arterial média (PAM), foram digitalizadas (Acqknowledge for Windows; Biopac Inc.) e armazenados em disco rígido do computador para análises futuras.

### **3.8.2 Coleta de sangue**

Durante o processo de cateterização, antes da heparinização da cânula foi coletado um ml de amostra de sangue. No momento da coleta os animais não se encontravam em jejum.

### **3.8.3 Dosagem de Cálcio Sérico**

Método: Química Seca - Vitros (Johnson Produtos Profissionais) - Método Colorimétrico de ponto final, baseado na complexação do cálcio com o quelante Arsenazo III.

### **3.8.4 Dosagem de Fósforo Sérico**

Método: Química Seca - Vitros (Johnson Produtos Profissionais) - Método Colorimétrico de ponto final baseado na formação do complexo fosfomolibdato de amônio (descrito inicialmente por Fiske e Subbarow), identificado através do p-metilaminofenol.

### **3.8.5 Dosagem de Cálcio e Fósforo Ósseo**

A dosagem de cinzas foi realizada com colocação do fêmur em cadinhos de porcelana vazios na mufla a uma temperatura de 525° C, durante 15 minutos. Após o resfriamento em dessecador, por um período de 1 hora, os cadinhos de porcelana foram tarados para obtenção do peso de 10 g da amostra.

A amostra foi carbonizada (em bico de Bunsen) sob temperatura de 200° C e incinerada em mufla à temperatura de 525° C. Após a queda da temperatura da mufla até 200° C, a amostra foi retirada e resfriada em um dessecador até temperatura ambiente para a medida do peso final.

Para a dosagem de cálcio e fósforo, a amostra foi submetida à incineração, em mufla conforme o procedimento para determinação de cinzas. As cinzas obtidas com ácido clorídrico (1+1) foram dissolvidas, adicionadas 2 gotas de ácido nítrico e 20ml de água e filtradas em balão volumétrico de 100ml. Para a determinação de cálcio foram adicionados 250 ml de água, 20 ml de trietanolamina a 30% e solução de hidróxido de sódio até atingir pH 12. Além disso, foi colocada uma pastilha

indicador-tampão. A Titulação com EDTA foi feita com solução de EDTA 0,1 M até que a coloração da solução passasse de vermelho-violáceo a verde.

### **3.8.6 Estimativa da massa dos tecidos**

Sacrificados os animais, o coração, útero e fêmures foram isolados, limpos e lavados com solução fisiológica. O excesso de líquido foi removido com papel de filtro e em seguida foram pesados. O índice de hipertrofia do ventrículo esquerdo, dos rins e do útero foram estimados e corrigidos em mg de tecido úmido/100g de peso corporal. Para obtenção do peso seco desses órgãos, foram colocados em estufa à temperatura de 100°C por 24 horas para eliminação da água. Os órgãos foram pesados e o índice de hipertrofia do ventrículo esquerdo, dos rins e do útero foram estimados e corrigidos em mg de tecido seco/100g de peso corporal.

### **3.9 Análise Estatística**

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) para todos os grupos estudados, comparando-se os grupos CS, CC, CE, CI e CR. Os níveis de significância estabelecidos foram 0.05 e 0.01. Para a análise estatística, foram realizadas análises de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo cálculo das diferenças mínimas significativas entre as médias pelo teste post hoc Fisher's LSD.

#### 4.1. Efeito dos tratamentos sobre a Pressão Arterial Média

Na figura 1, estão demonstrados os valores basais da pressão arterial média (PAM). Não foram observadas alterações entre os valores pressóricos entre os grupos C, CC, CE, CI e CR ( $90,8 \pm 2,0$  vs.  $94,7 \pm 1,7$  vs.  $95,1 \pm 0,9$  vs.  $91,3 \pm 0,9$  vs.  $94,1 \pm 1,2$  mmHg, respectivamente).

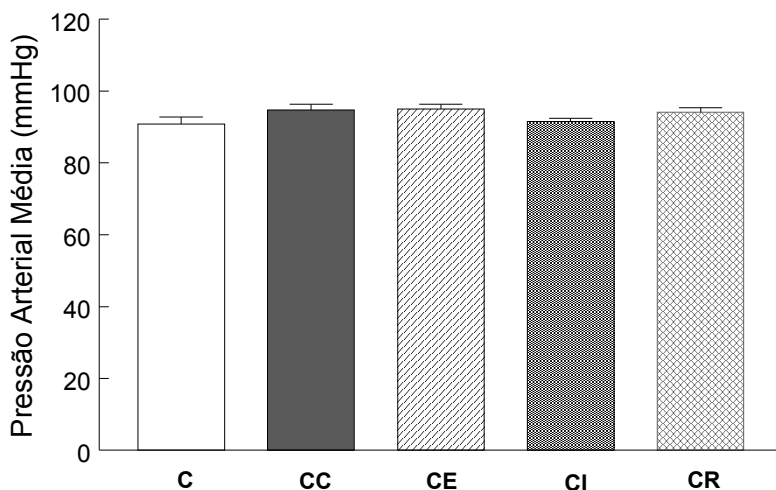


Figura 1: Valores médios da pressão arterial média de ratos controles (C), ratos castrados (CC), castrados e tratados com estrogênio (CE), com isoflavona (CI) e com raloxifeno (CR), após 12 semanas de tratamento, n = 8. Os valores são fornecidos como média  $\pm$  EPM.

#### 4.2. Efeito dos tratamentos sobre os Níveis Séricos e Ósseos de Cálcio e Fósforo

##### 4.2.1. Cálcio Sérico

Na figura 2, está demonstrado os valores médios do cálcio sérico. Foi observado que o tratamento com estrogênio e raloxifeno foi capaz de diminuir o cálcio sérico quando comparado com o grupo castrado ( $6,1 \pm 0,7$ ;  $6,3 \pm 0,1$  e  $8,2 \pm 0,1$  mg/dL, respectivamente, com  $p < 0,05$ ).

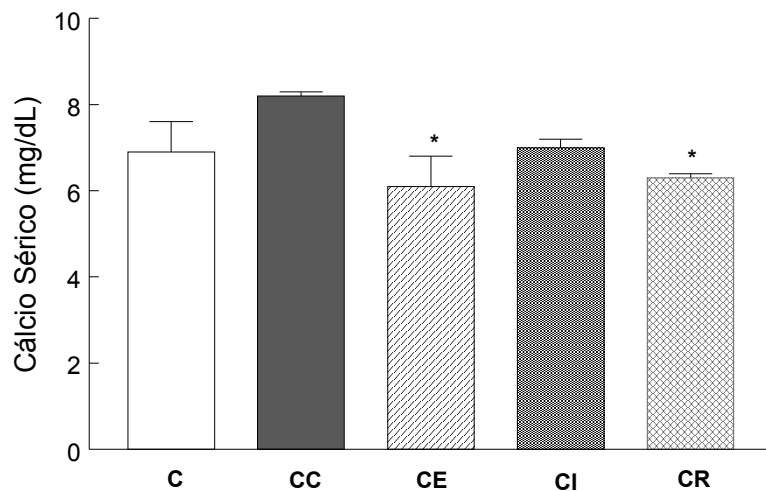


Figura 2: Valores médios do cálcio sérico de ratas controles (C), ratas castradas (CC), castradas e tratadas com estrogênio (CE), com isoflavona (CI) e com raloxifeno (CR), após 12 semanas de tratamento, n = 8. Os valores são fornecidos como média  $\pm$  EPM.  
\* p<0,05 vs. CC

#### 4.2.2. Fósforo Sérico

Na figura 3, está demonstrado os valores médios de fósforo sérico. Foi observado que o grupo CR ( $5,5 \pm 0,5$ ) teve o fósforo sérico menor que o C e CE ( $6,7 \pm 0,3$  e  $7,0 \pm 0,5$  mg/dL, respectivamente, com p< 0,05) e CI e CC ( $7,1 \pm 0,6$  e  $7,2 \pm 0,5$  mg/dL).

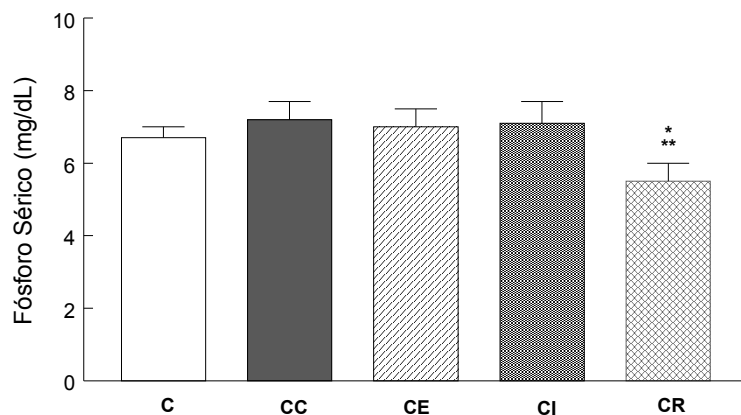


Figura 3: Média dos valores de fósforo sérico de ratas controles (C), ratas castradas (CC), castradas e tratadas com estrogênio (CE), com isoflavona (CI) e com raloxifeno (CR), após 12 semanas de tratamento, n = 8. Os valores são fornecidos como média  $\pm$  EPM.  
\* p<0,05 vs. C e CE  
\*\* p<0,01 vs. CI e CC

### 4.2.3. Cálcio Ósseo

Na figura 4, está demonstrado os valores médios de cálcio ósseo. Foi observado que o grupo C ( $19,4 \pm 1,0$  mg/g de fêmur) apresentou o cálcio ósseo, estatisticamente, maior que os grupos CC, CI e CR ( $17,2 \pm 1,0$ ;  $17,6 \pm 0,6$  e  $18,7 \pm 0,6$  mg/g de fêmur, respectivamente com  $p < 0,01$ ). O grupo CC ( $17,2 \pm 1,0$  mg/g de fêmur) apresentou níveis de cálcio ósseo, significativamente, menor que os grupos CE, CI e CR ( $19,3 \pm 0,5$ ;  $17,6 \pm 0,6$  e  $18,7 \pm 0,6$  mg/g de fêmur, respectivamente com  $p < 0,01$ ). O grupo CE ( $19,3 \pm 0,5$  mg/g de fêmur) também apresentou cálcio ósseo maior que os grupos CI e CR ( $17,6 \pm 0,6$  e  $18,7 \pm 0,6$  mg/g de fêmur, respectivamente com  $p < 0,01$ ). E, por fim, o grupo CR ( $18,7 \pm 0,6$  mg/g de fêmur) foi, significativamente, maior que o grupo CI ( $17,6 \pm 0,6$  mg/g de fêmur, com  $p < 0,01$ ).

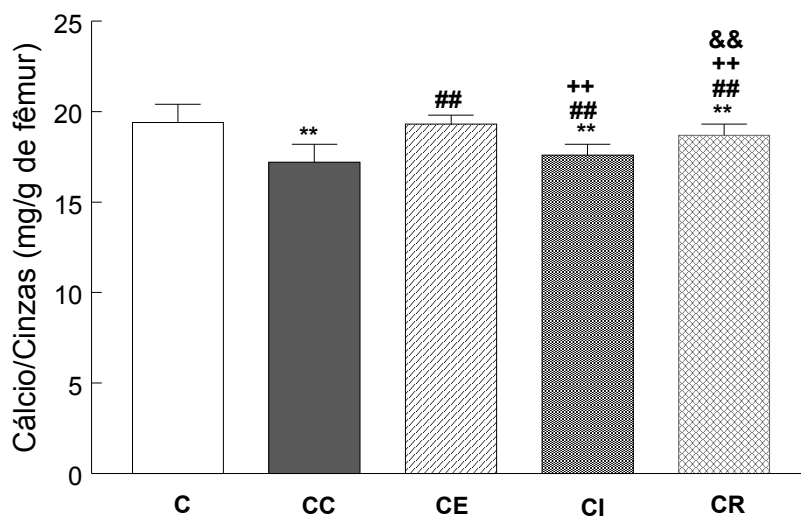


Figura 4: Média dos valores de cálcio ósseo de ratos controles (C), ratos castrados (CC), castrados e tratados com estrogênio (CE), com isoflavona (CI) e com raloxifeno (CR), após 12 semanas de tratamento, n = 8. Os valores são fornecidos como média  $\pm$  EPM.

\*\*  $p < 0,01$  vs. C

##  $p < 0,01$  vs. CC

++  $p < 0,01$  vs. CE

&&  $p < 0,01$  vs. CI

### 4.2.4. Fósforo Ósseo

Na figura 5, está demonstrado os valores médios de fósforo ósseo. Foi observado que o grupo C ( $9,3 \pm 0,8$  mg/g de fêmur) apresentou níveis de fósforo ósseo, significativamente, menor que os grupos CC, CI e CR ( $12,0 \pm 0,6$ ;  $11,1 \pm 1,3$  e  $10,0 \pm 0,5$  mg/g de fêmur, respectivamente, com  $p < 0,01$ ). O grupo CC ( $12,0 \pm 0,6$



mg/g de fêmur) apresentou nível de fósforo ósseo maior que os grupos CE, CI e CR ( $9,2 \pm 0,7$ ;  $11,1 \pm 1,3$  e  $10,0 \pm 0,5$  mg/g de fêmur, respectivamente, com  $p < 0,01$ ). O grupo CE ( $9,2 \pm 0,7$  mg/g de fêmur) foi, estatisticamente, menor que os grupos CI e CR ( $11,1 \pm 1,3$  e  $10,0 \pm 0,5$  mg/g de fêmur, respectivamente, com  $p < 0,01$ ). Por fim, o grupo CI ( $11,1 \pm 1,3$  mg/g de fêmur) foi, significativamente, maior que o grupo CR ( $10,0 \pm 0,5$  mg/g de fêmur com  $p < 0,01$ ).

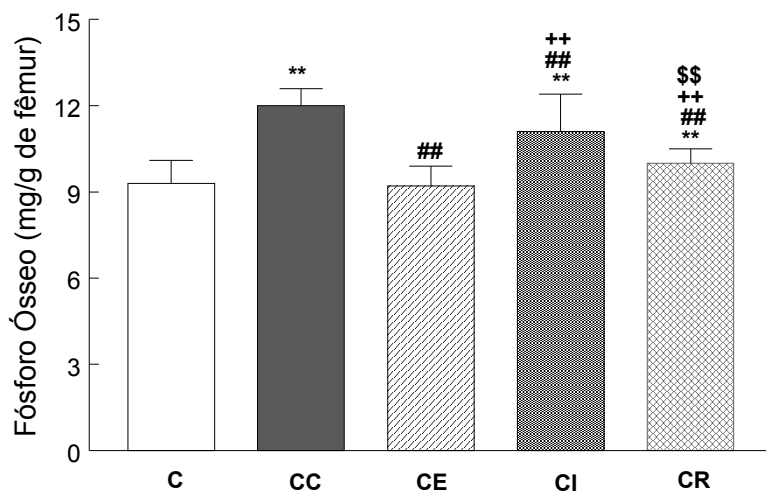


Figura 5: Média dos valores de fósforo ósseo de ratas controles (C), ratas castradas (CC), castradas e tratadas com estrogênio (CE), com isoflavona (CI) e com raloxifeno (CR), após 12 semanas de tratamento, n = 8. Os valores são fornecidos como média ± EPM.

\*\*  $p < 0,01$  vs. C

##  $p < 0,01$  vs. CC

++  $p < 0,01$  vs. CE

\$\$  $p < 0,01$  vs. CI

#### 4.3. Efeito dos tratamentos sobre o Peso Corporal

Os resultados das médias dos pesos corporais iniciais e finais estão descritos na tabela 1.

GRUPO	C	CC	CE	CI	CR
<b>Peso Inicial (g)</b>	196,5 ± 3,3	205,7 ± 3,4	203,8 ± 4,3	197,7 ± 2,4	197,5 ± 3,1
<b>Peso Final (g)</b>	268,1 ± 1,4	291,2 ± 1,9 ##	258,1 ± 3,3 **	288,6 ± 5,8 ## ++	277,1 ± 8,2 # ++

Tabela 1: Médias dos pesos corporais iniciais e finais de ratas controles (C), ratas castradas (CC), castradas e tratadas com estrogênio (CE), com isoflavona (CI) e com raloxifeno (CR), após 12 semanas de tratamento, n = 8. Os valores são fornecidos como média ± EPM

##  $p < 0,01$  vs. C

\*\*  $p < 0,01$  vs. CC

#  $p < 0,05$  vs. CC

++  $p < 0,01$  vs. CE

Como esperado, não houve diferença significativa no peso corporal inicial das ratas. Entretanto, ao final do tratamento, o grupo C teve ganho de peso, estatisticamente, menor que os grupos CC e CI ( $p < 0,01$ ). O grupo CC ganhou, significativamente, mais peso que os grupos CE (0,01) e CR ( $p < 0,05$ ). E o grupo CE ganhou menos peso teve ganho menor que o CI ( $p < 0,01$ ). E o grupo CE ganhou menos peso que os grupos CI e CR ( $p < 0,01$ ).

#### **4.4. Efeito dos tratamentos sobre o Peso dos Fêmures Úmidos e Secos**

##### **4.4.1. Peso Úmido do Fêmur Direito**

Na figura 6, estão ilustrados o peso úmido do fêmur direito corrigido pelo peso corporal final das ratas. O grupo C ( $3,2 \pm 0,14$  mg/g) apresentou peso, estatisticamente, maior que o grupo CC ( $2,8 \pm 0,13$  mg/g, com  $p < 0,01$ ) e CI ( $2,9 \pm 0,06$  mg/g, com  $p < 0,05$ ). O peso do grupo CE ( $3,3 \pm 0,08$  mg/g) foi maior que o CC e CI ( $2,8 \pm 0,13$  e  $2,9 \pm 0,06$  mg/g, com  $p < 0,01$ ) e o CR ( $3,0 \pm 0,08$  mg/g, com  $p < 0,05$ ).

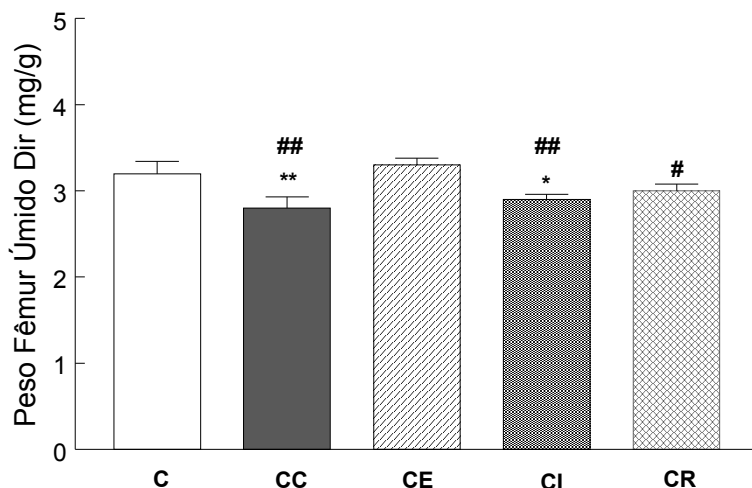


Figura 6: Média dos valores do peso úmido do fêmur direito de ratas controles (C), ratas castradas (CC), castradas e tratadas com estrogênio (CE), com isoflavona (CI) e com raloxifeno (CR), após 12 semanas de tratamento,  $n = 8$ . Os valores são fornecidos como média  $\pm$  EPM.

\*\*  $p < 0,01$  vs. C

\*  $p < 0,05$  vs. C

##  $p < 0,01$  vs. CE

#  $p < 0,05$  vs. CE

#### 4.4.2. Peso Seco do Fêmur Direito

Na figura 7, estão ilustrados o peso seco do fêmur direito corrigido pelo peso corporal final das ratas. O peso do grupo C ( $2,1 \pm 0,08$  mg/g) foi maior que o CC ( $1,8 \pm 0,06$  mg/g, com  $p < 0,01$ ). O peso do grupo CE ( $2,3 \pm 0,04$  mg/g) foi maior que os grupos CC, CI e CR ( $1,8 \pm 0,06$ ;  $1,9 \pm 0,01$  e  $2,0 \pm 0,06$  mg/g, respectivamente, com  $p < 0,01$ ).

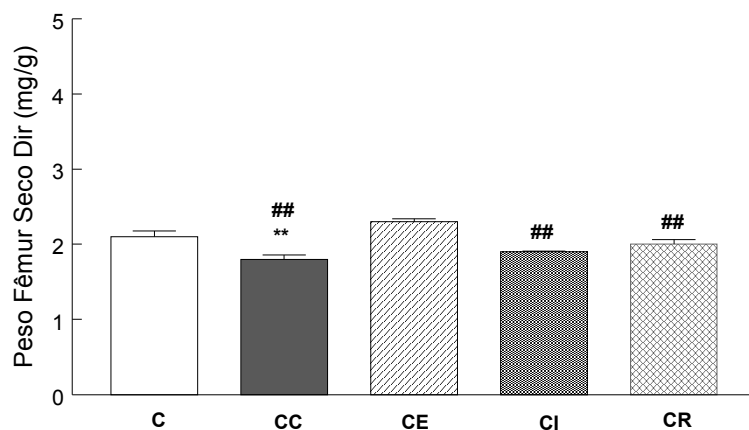


Figura 7: Média dos valores do peso seco do fêmur direito de ratas controles (C), ratas castradas (CC), castradas e tratadas com estrogênio (CE), com isoflavona (CI) e com raloxifeno (CR), após 12 semanas de tratamento,  $n = 8$ . Os valores são fornecidos como média  $\pm$  EPM.

\*\*  $p < 0,01$  vs. C

##  $p < 0,01$  vs. CE

#### 4.4.3. Peso Úmido do Fêmur Esquerdo

Na figura 8, estão ilustrados o peso úmido do fêmur esquerdo corrigido pelo peso corporal final das ratas. O peso do grupo C ( $3,2 \pm 0,09$  mg/g) foi maior que os grupos CC e CI ( $2,6 \pm 0,16$  e  $2,8 \pm 0,08$  mg/g, respectivamente, com  $p < 0,01$ ) e o grupo CR ( $2,9 \pm 0,11$  mg/g, com  $p < 0,05$ ). O peso do grupo CE foi maior que os grupos CC e CI ( $2,6 \pm 0,16$  e  $2,8 \pm 0,08$  mg/g, respectivamente, com  $p < 0,01$ ) e CR ( $2,9 \pm 0,11$  mg/g, com  $p < 0,05$ ).

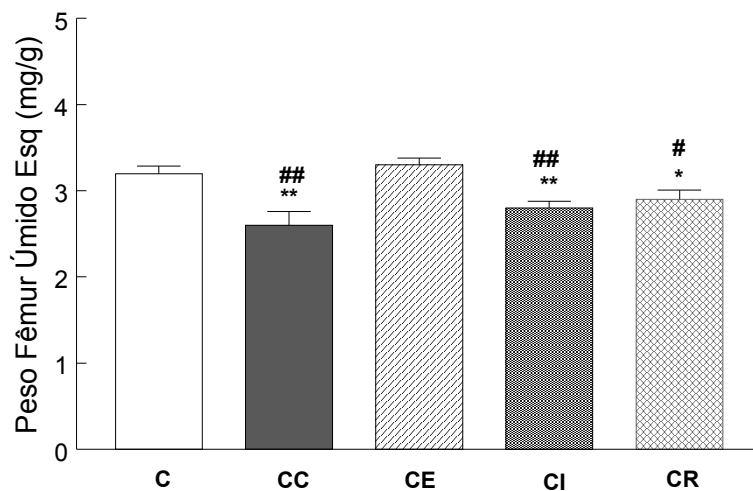


Figura 8: Média dos valores do peso úmido do fêmur esquerdo de ratas controles (C), ratas castradas (CC), castradas e tratadas com estrogênio (CE), com isoflavona (CI) e com raloxifeno (CR), após 12 semanas de tratamento, n = 8. Os valores são fornecidos como média  $\pm$  EPM.

\*\* p<0,01 vs. C

\* p<0,05 vs. C

## p<0,01 vs. CE

# p<0,05 vs. CE

#### 4.4.4. Peso Seco do Fêmur Esquerdo

Na figura 9, estão ilustrados o peso seco do fêmur esquerdo corrigido pelo peso corporal final das ratas. O grupo C ( $2,1 \pm 0,05$  mg/g) apresentou peso, estatisticamente, maior que o grupo CC ( $1,8 \pm 0,07$  mg/g, com  $p < 0,01$ ) e CI ( $1,9 \pm 0,06$  mg/g, com  $p < 0,05$ ). O peso do grupo CC ( $1,8 \pm 0,07$  mg/g) foi menor que o CR ( $2,0 \pm 0,09$  mg/g, com  $p < 0,05$ ). O peso do grupo CE ( $2,2 \pm 0,02$  mg/g) foi maior que o CC e CI ( $1,8 \pm 0,07$  e  $1,9 \pm 0,06$  mg/g, com  $p < 0,01$ ) e o CR ( $2,0 \pm 0,09$  mg/g, com  $p < 0,05$ ).

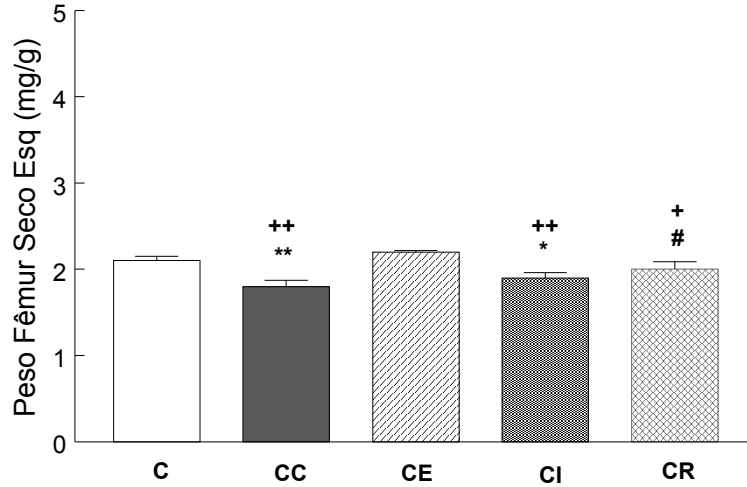


Figura 9: Média dos valores do peso seco do fêmur esquerdo de ratas controles (C), ratas castradas (CC), castradas e tratadas com estrogênio (CE), com isoflavona (CI) e com raloxifeno (CR), após 12 semanas de tratamento, n = 8. Os valores são fornecidos como média  $\pm$  EPM.

\*\* p<0,01 vs. C

\* p<0,05 vs. C

# p<0,05 vs. CC

++ p<0,01 vs. CE

+ p<0,05 vs. CE

## 4.5. Efeito dos tratamentos sobre o Peso do Ventrículo Esquerdo

### 4.5.1. Peso Úmido do Ventrículo Esquerdo

Na figura 10, estão demonstrados os pesos úmidos do ventrículo esquerdo corrigidos pelo peso corporal final das ratas. Foi observado que o peso do grupo C ( $1,7 \pm 0,06$  mg/g) foi menor que o grupo CE ( $1,9 \pm 0,04$  mg/g, com p<0,01) e maior que o grupo CI ( $1,5 \pm 0,05$  mg/g, com p<0,05). E o peso do grupo CE ( $1,9 \pm 0,04$  mg/g) foi, significativamente, maior que os grupos CC, CI e CR ( $1,7 \pm 0,06$ ;  $1,5 \pm 0,05$  e  $1,6 \pm 0,05$  mg/g, respectivamente, com p<0,01).

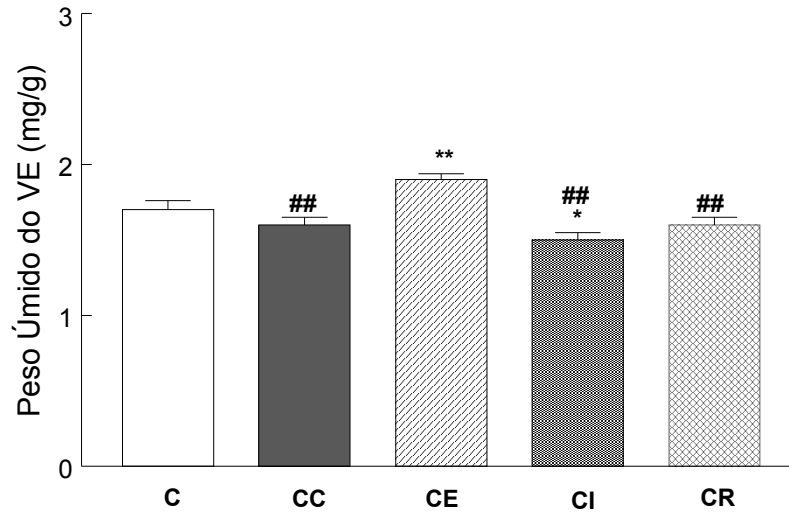


Figura 10: Média dos valores do peso úmido do ventrículo esquerdo de ratas controles (C), ratas castradas (CC), castradas e tratadas com estrogênio (CE), com isoflavona (CI) e com raloxifeno (CR), após 12 semanas de tratamento, n = 8. Os valores são fornecidos como média  $\pm$  EPM.

\*\* p<0,01 vs. C

\* p<0,05 vs. C

## p<0,01 vs. CE

#### 4.5.2. Peso Seco do Ventrículo Esquerdo

Na figura 11, estão demonstrados os pesos secos do ventrículo esquerdo corrigidos pelo peso corporal final das ratas. Foi observado que o peso do grupo C ( $0,47 \pm 0,02$  mg/g) foi maior que o grupo CC ( $0,42 \pm 0,0$  mg/g, com  $p < 0,05$ ) e o grupo CI ( $0,39 \pm 0,0$  mg/g, com  $p < 0,01$ ). O grupo CE ( $0,49 \pm 0,01$  mg/g) foi, estatisticamente, maior que os grupos CC e CI ( $0,42 \pm 0,0$  e  $0,39 \pm 0,0$  mg/g, respectivamente, com  $p < 0,01$ ) e CR ( $0,44 \pm 0,01$  mg/g, com  $p < 0,05$ ). Por fim, o peso do grupo CI ( $0,39 \pm 0,0$  mg/g) foi menor que o grupo CR ( $0,44 \pm 0,01$  mg/g, com  $p < 0,05$ ).

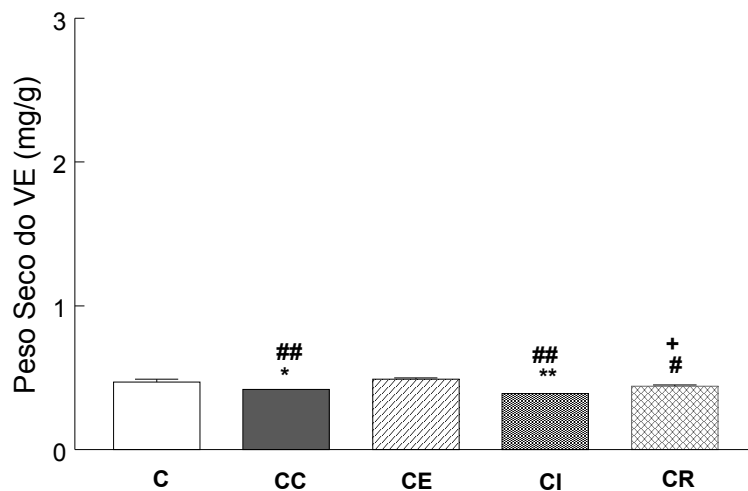


Figura 11: Média dos valores do peso seco do ventrículo esquerdo de ratas controles (C), ratas castradas (CC), castradas e tratadas com estrogênio (CE), com isoflavona (CI) e com raloxifeno (CR), após 12 semanas de tratamento, n = 8. Os valores são fornecidos como média  $\pm$  EPM.

\* p<0,05 vs. C

\*\* p<0,01 vs. C

## p<0,01 vs. CE

# p<0,05 vs. CE

+ p<0,05 vs. CI

## 4.6. Efeito dos tratamentos sobre o Peso do Útero

### 4.6.1. Peso Úmido do Útero

Na figura 12, estão demonstrados os pesos úmidos do útero corrigidos pelo peso corporal final das ratas. Foi observado que o peso do grupo C ( $3,2 \pm 0,14$  mg/g) foi, significativamente, maior que os grupos CC, CE, CI e CR ( $0,6 \pm 0,05$ ;  $1,9 \pm 0,07$ ;  $1,0 \pm 0,08$  e  $1,0 \pm 0,13$  mg/g, respectivamente, com p<0,01). O peso do grupo CC ( $0,6 \pm 0,05$  mg/g) foi, menor que os grupos CE e CI ( $1,9 \pm 0,07$  e  $1,0 \pm 0,08$  mg/g, respectivamente, com p<0,01) e do grupo CR ( $1,0 \pm 0,13$  mg/g, com p<0,05). Por fim, o peso do grupo CE ( $1,9 \pm 0,07$  mg/g) foi, estatisticamente, maior que os grupos CI e CR ( $1,0 \pm 0,08$  e  $1,0 \pm 0,13$  mg/g, respectivamente, com p<0,01).

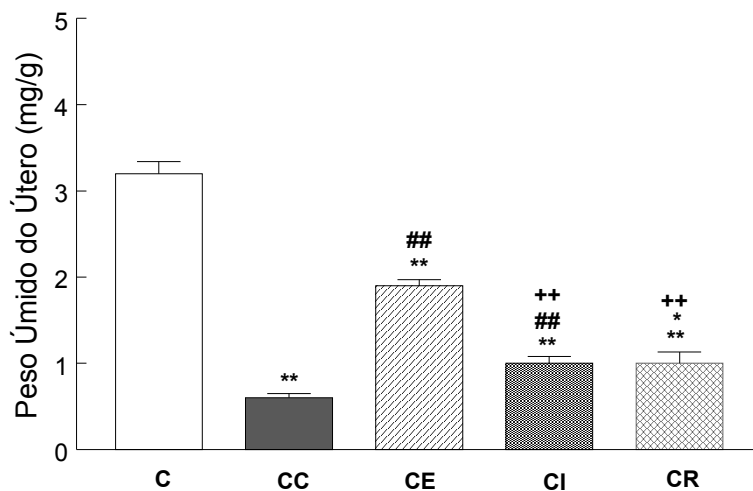


Figura 12: Média dos valores do peso úmido do útero de ratas controles (C), ratas castradas (CC), castradas e tratadas com estrogênio (CE), com isoflavona (CI) e com raloxifeno (CR), após 12 semanas de tratamento, n = 8. Os valores são fornecidos como média  $\pm$  EPM.

\*\* p<0,01 vs. C

## p<0,01 vs. CC

\* p<0,05 vs. CC

++ p<0,01 vs. CE

#### 4.6.2. Peso Seco do Útero

Na figura 13, estão demonstrados os pesos secos do útero corrigidos pelo peso corporal final das ratas. Foi observado que o peso do grupo C ( $0,79 \pm 0,03$  mg/g) foi, significativamente, maior que os grupos CC, CE, CI e CR ( $0,34 \pm 0,04$ ;  $0,64 \pm 0,02$ ;  $0,44 \pm 0,02$  e  $0,43 \pm 0,03$  mg/g, respectivamente, com p<0,01). O peso do grupo CC ( $0,34 \pm 0,04$  mg/g) foi menor que o grupos CE ( $0,64 \pm 0,02$  mg/g, com p<0,01) e do grupo CI ( $0,44 \pm 0,02$  mg/g, com p<0,05). Por fim, o peso do grupo CE ( $0,64 \pm 0,02$  mg/g) foi, estatisticamente, maior que os grupos CI e CR ( $0,44 \pm 0,02$  e  $0,43 \pm 0,03$  mg/g, respectivamente, com p<0,01).



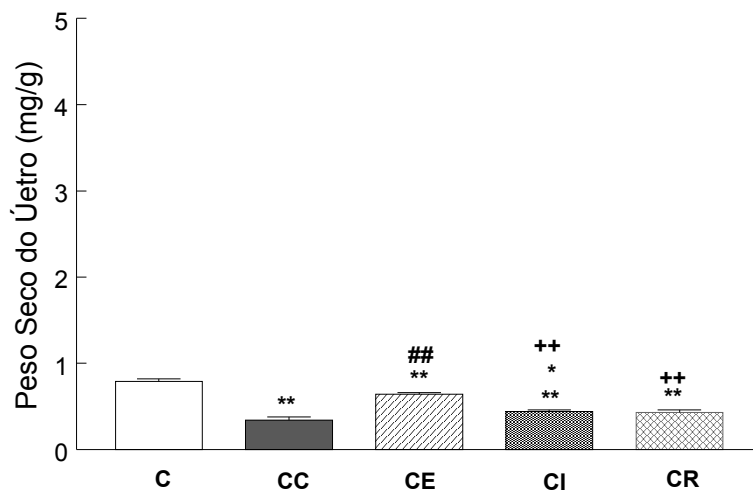


Figura 13: Média dos valores do peso seco do útero de ratas controles (C), ratas castradas (CC), castradas e tratadas com estrogênio (CE), com isoflavona (CI) e com raloxifeno (CR), após 12 semanas de tratamento, n = 8. Os valores são fornecidos como média  $\pm$  EPM.

\*\* p<0,01 vs. C  
 ## p<0,01 vs. CC  
 \* p<0,05 vs. CC  
 ++ p<0,01 vs. CE

A importância do hormônio sexual feminino – o estrogênio, na atividade homeostática de muitas células e tecidos no organismo, torna-se evidente por ocasião da queda na sua produção no climatério, que acarreta uma série de alterações fisiopatológicas. Dentre estas, as doenças cardiovasculares e a osteoporose, têm motivado muitos estudos por parte da comunidade científica. Por essa razão, a terapia de reposição hormonal (TRH) tem sido recomendada para mulheres na pós-menopausa com o objetivo de prevenir e reduzir os sintomas observados (Lobo,1990). Entretanto, a mesma terapia tem sido associada a efeitos colaterais graves, como o de câncer de mama e útero. Diante do paradoxo efeito da TRH tradicional, vem aumentando o número de pesquisas sobre substâncias alternativas que possam substituir o estrogênio na TRH em mulheres na pós-menopausa (Kessel,1998). Dentre essas alternativas destacam-se as isoflavonas (fitoestrogênio derivado da soja) e o raloxifeno.

Vários estudos têm mostrado que a incidência de hipertensão é menor em mulheres na pré-menopausa do que em homens, igualando-se aos homens após a menopausa. Dubey e Jackson (2001) mostraram que as mulheres na menopausa apresentaram elevação da pressão arterial. Lip et al. (1995) descreveram que mulheres na menopausa usando TRH com estrogênio, apresentaram menor probabilidade de desenvolver hipertensão do que mulheres na mesma idade não-tratadas. Essas observações levaram os cientistas a supor que a deficiência dos hormônios esteróides, estrogênio e progesterona contribuem para o aumento da pressão arterial.

Nevala et al. (2002) relacionou o efeito anti-hipertensivo do 17- $\beta$ -estradiol e genisteína (metabólito da isoflavona). Ele afirma que o efeito de vasoconstrição direta da angiotensina II é reduzido em 38% quando ratas espontaneamente hipertensas são tratadas com o 17- $\beta$ -estradiol e em 31% quando tratadas com a genisteína por duas semanas. Além disso, a genisteína, agudamente, tem um efeito inibidor sobre a fosforilação da tirosina quinase, sendo isso independente dos efeitos estrogênicos da genisteína.

Quanto ao raloxifeno, Pavo et al. (2000) demonstrou alterações na síntese de óxido nítrico e a resposta de aumento da pressão arterial induzida por vasopressina em ratas ovariectomizadas, foi prevenida pelo tratamento de um mês com raloxifeno ou 17- $\beta$ -estradiol.

Nesse estudo, avaliamos os efeitos do 17- $\beta$ -estradiol, isoflavona e raloxifeno sobre a pressão arterial e balanço mineral ósseo de ratas pós-menopausadas. Não observamos alterações nos níveis de pressão arterial nas ratas castradas tratadas ou não, embora haja uma tendência do grupo tratado com o estrogênio (17- $\beta$ -estradiol) a ter nível pressórico maior. Sainz et al. (2004) em seus experimentos, também observaram que nem a castração e nem o tratamento com 17- $\beta$ -estradiol não foram capazes de alterar a pressão arterial.

A ação do estrogênio no osso se dá via receptores estrogênicos alfa (RE $\alpha$ ) e beta (RE $\beta$ ). Bonnelye et al. (2002) demonstrou que o RE $\alpha$  está presente nas células osteoblásticas e tem um papel funcional na proliferação e diferenciação osteoprogenitora, além de demonstrar que os níveis de RNAm da síntese de RE $\alpha$  estão diminuídos em ratas ovariectomizadas. Outros estudos também confirmam a efeito protetor sobre a densidade mineral óssea dos estrogênios, isoflavonas e SERMs (Kim et al., 2003; Lee et al., 2004; Sato et al., 1994). Efeito adicional do estrogênio parece ser a inibição a produção de paratormônio (PTH), pela glândula paratireóide. Gonen et al. (2005), encontraram níveis diminuídos de PTH no plasma sanguíneo, assim como aumento de densidade óssea em ratas grávidas onde teor de estrogênio encontra-se aumentado.

Na nossa pesquisa, a ovariectomia diminuiu o conteúdo de cálcio ósseo e o peso dos fêmures, além de aumentar os níveis de fósforo ósseo e cálcio sérico. Resultado semelhante foi encontrado por Kim et al. (2003), que trataram ratas ovariectomizadas com ipriflavona pura ou co-administrada com estrogênio por cinco semanas e, Lee et al. (2004), que trataram ratas ovariectomizadas com isoflavona ou 17- $\beta$ -estradiol por 16 semanas. Estes dois trabalhos também corroboram com nossos resultados, pois demonstram a prevenção da perda de conteúdo ósseo de cálcio e aumento de fosfato do tratamento com 17- $\beta$ -estradiol e isoflavona. Sato et al. (1994) também obtiveram resultados semelhantes ao nosso estudo, pelo efeito preventivo do tratamento com raloxifeno sobre o conteúdo ósseo de cálcio e densidade mineral óssea, no tratamento por cinco semanas de ratas ovariectomizadas.

Além da ação sobre o osso, vários estudos têm relacionado a TRH com alteração do trofismo do músculo cardíaco. O miócito cardíaco possui receptores estrogênicos RE $\alpha$  e RE $\beta$ , cuja ação está associada ao aumento do diâmetro e comprimento da fibra muscular cardíaca de camundongos (Forsters et al., 2004).

A hipertrofia cardíaca é caracterizada pelo aumento do tamanho das células miocárdicas, alto grau de organização dos sarcômeros, reativação do programas de genes fetais e alterações na transcrição e translação gênica, resultando no incremento da síntese protéica (Sugden; Clerk,1998).

Dentre os fatores associados a gênese da hipertrofia destaca-se a Angiotensina II. A AII é um importante peptídeo que atua na regulação da pressão e volume sangüíneo. Sabe-se que a AII tem um importante papel no desenvolvimento de várias doenças cardiovasculares. A AII apresenta atividade inotrópica e cronotrópica diretas sobre o coração (Ferrario et al.,1991). Além disso, a AII estimula a migração, proliferação, hipertrofia e a síntese protéica das células musculares lisas, dos miócitos cardíacos e dos fibroblastos. Estudos recentes mostraram ações adicionais da AII sobre a hipertrofia cardíaca por ser capaz de estimular a proteína quinase B (PQB) via ativação do receptor AT1 e, para isso, é requerida a ativação da tirosina quinase e trifosfato de inositol (IP3) (Takahashi et al.,1999).

A genisteína é uma potente inibidora da tirosina quinase e tem sido demonstrado que ela é capaz de inibir a ativação da PQB (Matsui et al.,2002). Isso nos sugere que a genisteína pode inibir a hipertrofia cardíaca mediada pela PQB. Em nosso estudo, o grupo que recebeu isoflavona, realmente, obteve menor peso de ventrículo esquerdo, seja úmido ou seco.

Ogita et al. (2004) mostrou que o raloxifeno também foi capaz de prevenir a hipertrofia cardíaca em camundongos. No nosso estudo, o grupo tratado com raloxifeno teve o peso da câmara cardíaca esquerda menor que o grupo tratado com estrogênio, mas maior que o grupo tratado com isoflavona. Não houve diferença em relação aos outros grupos, não evidenciando papel preventivo do raloxifeno sobre o aumento do peso do ventrículo esquerdo.

Muitas teorias tentam demonstrar o efeito anti-hipertrófico do 17- $\beta$ -estradiol sobre o músculo cardíaco. O mesmo estimula a liberação do fator natriurético atrial, que por sua vez age sobre a guanilato ciclase e inibe a hipertrofia do miócito cardíaco (Babiker et al., 2004). No entanto, também há um aumento da quantidade de AII tecidual no miocárdio em resposta ao tratamento com estrogênio, que poderia induzir uma hipertrofia cardíaca (Grohe, 1998). Nossos resultados demonstraram maior peso ventricular do grupo que recebeu estrogênio quando comparado aos demais grupos.

Um dos maiores problemas das terapias tradicionais de reposição hormonal com estrogênio está no aumento do risco de desenvolvimento do câncer de mama e endométrio (Ravnikar, 1992).

Santell et al. (1997) estudando ratas Sprague-Dawley ovariectomizadas, observaram que a ingestão de 750µg/g de isoflavonas, induziu a um aumento do peso uterino e da expressão de *c-fos*, um marcador molecular da atividade estrogênica. Isso sugere que a ação da genisteína sobre o útero é via receptor de estrogênio. Diel et al. (2001) utilizando ratas DA/Han (raça, com alteração congênita, capaz de desenvolver tumores do sistema reprodutor e urinário espontaneamente) observaram os efeitos da genisteína sobre o endométrio e o epitélio vaginal, em ratas normais e com câncer de endométrio induzido. Nas ratas normais, eles observaram que a genisteína estimulou a proliferação tanto do endométrio quanto do epitélio vaginal e aumentou a expressão do complemento C3, outro marcador da atividade estrogênica no útero de ratas, de uma forma dose-dependente. Porém, no modelo experimental de câncer endometrial, apesar de ter estimulado a expressão do gene C3, a genisteína não foi capaz de promover o crescimento tumoral. Nesses estudos, os efeitos proliferativos induzidos pela genisteína sobre o útero foram significativamente menores que os observados na administração do 17-β-estradiol, mesmo quando as doses da genisteína correspondiam a valores 10 ou 100 vezes maiores que a concentração do estrogênio.

Em nosso estudo, observamos que o grupo castrado teve redução de 81 e 56% do peso do útero úmido e seco, respectivamente, quando comparados ao grupo controle. Este resultado demonstra, enfaticamente, o efeito uterotrófico do estrogênio endógeno. Já no grupo castrado e tratado com 17-β-estradiol esta redução foi de apenas 40 e 18%, respectivamente, para peso úmido e seco. Isso mostra que o estrogênio exógeno também exerce um forte efeito uterotrófico. No grupo tratado com isoflavona, esta redução foi de 68 e 44%, mostrando uma fraca ação uterotrófica da isoflavona.

Black et al. (1994) em sua pesquisa, observou que o raloxifeno não apresentou atividade uterotrófica. Este resultado foi semelhante ao deste estudo, onde o peso seco do útero do grupo tratado com raloxifeno foi igual ao do grupo castrado. Carthew et al. (1999), também encontrou resultado semelhante em camundongos.

Concluindo, este trabalho demonstrou serem válidas as terapias alternativas de reposição hormonal com raloxifeno e estrogênio, quando se quer evidenciar efeito protetor na osteoporose pós-menopausa, sem os efeitos colaterais de elevação da pressão arterial ou uterina.

ADLERCREUTZ, H. Western diet and western diseases: Some hormonal and biochemical mechanisms and associations. *Scand J Clin Lab Invest.* 1990; 50:3S-23S.

ADLERCREUTZ, H. Epidemiology of phytoestrogens. *Balliere Clin Endocrinol Met.* 1998; 12:605– 623.

ADLERCREUTZ, H.; MARKKANEN, H.; WATANABE, S. Plasma concentrations of phyto-oestrogens in Japanese men. *Lancet* 1993a; 342: 1209–1210.

AGABITI-ROSEI, E.; MUIESAN M. L. Left ventricular hypertrophy and heart failure in women. *J Hypertens Suppl.* 2002 May;20(2):S34-8.

AKSNES, L. A simplified high-performance liquid chromatographic method for determination of vitamin D<sub>3</sub>, 25-hydroxyvitamin D<sub>2</sub> and 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> in human serum. *Scand J Clin Lab Invest.* 1992 May;52(3):177-82

ARJMANDI, B.H.; ALEKEL, L.; HOLLIS, B.W.; AMIN, D.; STACEWIEZ-SAPUNTZAKIS, M.; GUO, P.; KUKREJA, S.C. Dietary soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis. *J Nutr.* 1996; 126: 161–167.

ARJMANDI, B.H.; BIRNBAUM, R.; GOYAL, N.V.; GETLINGER, M.J.; JUMA, S.; ALEKEL, L.; HASLER, C.M.; DRUM, M.L.; HOLLIS, B.W.; KUKREJA, S.C. Bonesparing effect of soy protein in ovarian hormone-deficient rats is related to its isoflavone content. *Am J Clin Nutr.* 1998; 68: 1364–1368.

AXELSON, M.; SJOVALL, J.; GUSTAFSSON, B.; SETCHELL, K.D.R. Soya—a dietary source of the non-steroidal oestrogen equol in humans and animals. *J Endocrinol.* 1984; 102: 49–56.

BABIKER, F.A.; de WINDT, L.J.; van EICKELS, M.; THIJSEEN, V.; BRONSAER, R.J.; GROHE, C.; van BILSEN, M.; DOEVENDANS, P.A. 17beta-estradiol antagonizes cardiomyocyte hypertrophy by autocrine/paracrine stimulation of a guanylyl cyclase A receptor-cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase pathway. *Circulation.* 2004 Jan 20;109(2):269-76. Epub 2004 Jan 12.

BEATO, M.; SANCHEZ-PACHECO, A. Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex. *Endocrine Rev.* 1996; 17:587-609

BIKLE, D.D. A Bright Future for the Sunshine Hormone. *Scientific American*, 2:58-68, 1995

BONNELYE, E.; KUNG V.; LAPLACE C.; GALSON D.L.; AUBIN J.E. Estrogen receptor-related receptor alpha impinges on the estrogen axis in bone: potential function in osteoporosis. *Endocrinology.* 2002 Sep;143(9):3658-70.

BLACK, L.J.; SATO, M.; ROWLEY, E.R.; MAGEE, D.E.; BEKELE, A.; WILLIAMS, D.C.; CULLINAN, G.J.; BENDELE, R.; KAUFFMAN, R.F.; BENSCH, W.R. Raloxifene

(LY139481 HCl) prevents bone loss and reduces serum cholesterol without causing uterine hypertrophy in ovariectomized rats. *J Clin Invest.* 1994 Jan;93(1):63-9.

BLAIR, H.; JORDAN, S.E.; PETERSON, T.G.; BARNES, S. Various effects of tyrosine-kinase inhibitors on avian osteoclastic activity and reduction of bone loss in ovariectomized rats. *J Cell Biochem.* 1996; 61: 629–637.

BJARNASON, N.H.; HASSAGER C.; CHRISTIANSEN C. Postmenopausal bone remodelling and hormone replacement. *Climacteric.* 1998 Mar;1(1):72-9.

BRANDI, M.L. New treatment strategies: ipriflavone, strontium, vitamin D metabolites, and analogs. *Am J Med.* 1993; 95: 69-74.

BRINCAT, M.; STUDD, J.W. Menopause--a multi system disease. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol.* 1988 Jun;2(2):289-316

BROWN, M.S. & GOLDSTEIN, J.L. (1980). The estradiol-stimulated lipoprotein receptor of rat liver. *Journal Biological Chemistry*, 254:11360-11366.

BRZOZOWSKI, A.M.; PIKE, A.C.W.; DAUTER, Z.; HUBBARD, R.E.; BONN, T.; ENGSTROM, O.; OHMAN, L.; GREENE, G.L.; GUSTAFSSON, J.-A.; CARLQUIST, M. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature.* 1997; 389: 753–758.

CARTHEW, P.; EDWARDS, R.E.; NOLAN, B.M. Uterotrophic effects of tamoxifen, toremifene, and raloxifene do not predict endometrial cell proliferation in the ovariectomized CD1 mouse. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1999 Jul 1;158(1):24-32.

COOPER, C.; CAMPION, G.; MELTON L. J. Hip fractures in the elderly: a world-wide projection. *Osteoporosis Int.* 1992; 285-289.

COSMAN, F. & LINDASAY, R. (1999). Estrogens hits the surface. *National Medicine*, 5: 1130-1131.

DAVISON, S.L.; BELL, R.; DONATH, S.; MONTALTO, J.G.; DAVIS, S.R. Androgen levels in adult females: changes with age, menopause, and oophorectomy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 Jul;90(7):3847-53. Epub 2005 Apr 12.

DELMAS, P.D.; BJARNASON, N.H.; MITLAK B.H.; RAVOUX, C.A.; SHAH, A.S.; HUSTER, W.J.; DRAPER, M.; CHRISTIANSEN, C. (1997). Effects of raloxifene on bone mineral density, serum cholesterol concentrations, and uterine endometrium in postmenopausal women. *New England Journal Medicine*, 337:1641-1647.

DIEL, P.; SMOLNIKAR, K.; SCHULZ, T.; LAUDENBACH-LESCHOWSKI, U.; MICHNA, H.; VOLLMER, G. Phytoestrogens and carcinogenesis--differential effects of genistein in experimental models of normal and malignant rat endometrium. *Hum Reprod.* 2001; 16: 997–1006



DUBEY, R.K.; JACKSON, E.K. Estrogen-induced cardiorenal protection: potential cellular, biochemical, and molecular mechanisms. *Am Physiol Soc.* 2001;280: F365-F288.

FERRARIO, C.M.; JAISWAL, N.; YAMAMOTO, K.; DIZ, D.I.; SCHIAVONE, M.T. Hypertensive Mechanisms and converting enzyme inhibitors. *Clin Cardiol.* 1991; 14[suppl IV]:56-62.

FISMAN, E.Z.; TENENBAUM, A.; PINES, A. Systemic hypertension in postmenopausal women: a clinical approach. *Curr Hypertens Rep.* 2002 Dec;4(6):464-70.

FONTANA, A & DELMAS, PD (1999). Estrogenes, antiestrogenes and osteoporosis. *Elsevier Science*, 28:555-558.

FORSTER, C.; KIETZ, S.; HULTENBY, K.; WARNER, M.; GUSTAFSSON, J.A.; Characterization of the ERbeta-/-mouse heart. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Sep 28;101(39):14234-9. Epub 2004

GEBARA, O.C.E.; ALDRIGHI, J.M. *Terapêutica de reposição hormonal em cardiologia.* In: BATLOUNI, M.; RAMIRES, J.A.F. – (orgs.). *Farmacologia e Terapêutica Cardiovascular.* São Paulo: Atheneu, 1999. p567

GONEN, E.; SAHIN, I.; OZBEK, M.; KOVALAK, E.; YOLOGLU, S.; ATES, Y. Effects of pregnancy and lactation on bone mineral density, and their relation to the serum calcium, phosphorus, calcitonin and parathyroid hormone levels in rats. *J Endocrinol Invest.* 2005 Apr;28(4):322-6.

GRADY, D.; APPLGATE, W.; BUSH, T.; FURBERG, C.; RIGGS, B.; HULLEY, S.B. Heart and Estrogen/progestin replacement study (HERS): design, methods and baseline characteristics. *Controlled Clin Trials.* 1998.19:314-335.

GREEN, S.; WALTER, P.; KUMAR, V.; KRUST, A.; BORNERT, J.M.; ARGOS, P.; CHAMBON, P. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature.* 1986; 320:134-139.

GREENE, G.L.; GILNA, P.; WATERFIELD, M.; BAKER, A.; HORT, Y.; SHINE, J. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science.* 1986; 231: 1150-1154.

GROBE, J. L.; KATOVICH, M.J. Alterations in aortic vascular reactivity to angiotensin 1-7 in 17-beta-estradiol-treated female SD rats. *Regul Pept.* 2005 Oct 8.

GROHE, C.; KAHLERT S.; LOBBERT, K.; NEYSES, L.; van EICKLES, M.; STIMPEL, M.; VETTER, H. Angiotensin converting enzyme inhibition modulates cardiac fibroblast growth. *J Hypertens.* 1998 Mar;16(3):377-84

HALL, J.E. Neuroendocrine physiology of the early and late menopause. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2004 Dec;33(4):637-59

HEANEY, R.P. Phosphorus nutrition and the treatment of osteoporosis. *Mayo Clin Proc.* 2004 Jan;79(1):91-7.

HEANEY, R.P. & DRAPER, M.W. (1996). Raloxifene and estrogen: comparative bone-remodeling kinetics. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolic*, 82:3425-3429.

HOCHNER-CELNIKIER, D. (1999). Pharmacokinetics of raloxifene and its clinical application. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 85:23-29.

JENSEN, E.V.; JACOBSON, H.I. Basic guides to the mechanisms of estrogen action. *Recent Prog Horm Res.* 1962; 18: 387-414

KELLY, G.E.; NELSON, C.; WARING, M.A.; JOANNOU, G.E.; REEDER, A.Y. Metabolites of dietary (soya) isoflavones in human urine. *Clin Chim Acta.* 1993; 223: 9-22.

KESSEL, B. Alternatives to estrogen for menopausal women. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1998. 217: 38-44.

KIM, H.; PETERSON, T.G.; BARNES, S. Mechanisms of action of the soy isoflavone genistein: emerging role of its effects through transforming growth factor beta signalling. *Am J Clin Nutr.* 1998; 68: 1418S-1425S.

KIM, S.K.; LEE M.H.; RHEE M.H. Studies on the effects of biomedical agents on serum concentration of Ca<sup>2+</sup>, P and ALP activity in osteoporosis-induced rats. *J Vet Sci.* 2003 Aug;4(2):151-4.

KLEIN-HITPASS, L.; SCHORPP, M.; WAGNER, U.; RYFFEL, G.U. An estrogen-responsive element derived from the 5' flanking region of the *Xenopus vitellogenin A2* gene functions in transfected human cells. *Cell.* 1986; 46: 1053-1061

KUIPER, G.G.; NILSSON, S.; GUSTAFFSON, J. A. Characteristics and function of the novel estrogen receptor  $\beta$ . In: O'MALLEY, B.W. (ed.). *Hormones and Signaling.* Academic press. 1996; Vol.189-112.

KUIPER, G.G.; NILSSON, S.; GUSTAFFSON, J-A. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Endocrinology.* 1997; 138: 863-870

LECLERQ, G.; HEUSON, J.C. Physiological and pharmacological effects of estrogens in breast cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1979; 560: 427-455.

LOBO, R.A. Cardiovascular implications of estrogen replacement therapy. *Obstet Gynecol.* 1990; 75 (4 suppl) 18-25.

LEE, Y.B.; LEE, H.J.; KIM, K.S.; LEE, J.Y.; NAM, S.Y.; CHEON, S.W.; SOHN, H.S. Evaluation of the preventive effect of isoflavone extract on bone loss in ovariectomized rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2004 May;68(5):1040-5.

- LIP, G.Y.H.; BEEVERS, M.; CHURCHILE, D.; BEEVERS, D.G. Do clinicians prescribe hormone replacement therapy to hypertensive women? *Br J Clin Pract.* 1995; 49:61-64.
- LORELL, B.H.; CARABELLO, B.A. Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation.* 2000; 102(4):470-479.
- MA, P.T.S.; YAMAMOTO, T.; GOLDSTEIN, J.L. (1986). Increased mRNA for low density lipoprotein receptor in livers of rabbits treated with 17-ethinyl estradiol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83:792-796.
- MAKELA, S.I.; SANTTI, R.; SALO, L.; MCLACHLAN, J.A. Phytoestrogens are partial estrogen agonists in the adult male mouse. *Environ Health Perspect.* 1995a; 103: 123-127.
- MAKELA, S.I.; PYLKKANEN, L.H.; SANTTI, R.S.S.; ADLERCREUTZ, H. Dietary soybean may be antiestrogenic in male mice. *J Nutr.* 1995b; 125: 437
- MANOLAGAS, S.C.; JILKA, R. Bone marrow, cytokines and bone remodeling. *N Engl J Med.* 1995; 332: 305-311.
- MATSUI, T.; LI, L.; WU, J.C.; COOK, S.A.; NAGOSHI, T.; PICARD, M.; LIAO, R.; ROSENZWEIG, A. Phenotypic spectrum caused by transgenic overexpression of activated AKT in the heart. *J Biol Chem.* 2002; 277(5): 22896-22901.
- MITALK, B.H. & COHEN F.J. (1997). In search of optimal long-term female hormone replacement: The potential of selective estrogen receptor modulators. *Hormones Research*, 48:155-163.
- NAOHARU, I.; HITOSHI, S.; MASAHIKO, K. Cardiac Renin-Angiotensin System in the Hypertrophied Heart. *Circulation.* 1995;92:2690-2696.
- NEVALA, R.; LASSILA, M.; FINCKENBERG, P.; PAUKKU, K.; KORPELA, R.; VAPAATALO, H. Genistein treatment reduces arterial contractions by inhibiting tyrosine kinases in ovariectomized hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 2002 Sep 27;452(1):87-96.
- NILSSON, L. The hormonal situation in the perimenopausal period. *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl.* 1985;130:9-11.
- O'CONNELL, D.; ROBERTSON, J.; HENRY, D.; GILLESPIE, W. A systematic review of the skeletal effects of estrogen therapy in postmenopausal women. II. An assessment of treatment effects. *Climacteric.* 1998 Jun;1(2):112-23.
- OGITA, H.; NODE, K.; LIAO, Y.; ISHIKURA, F.; BEPPU, S.; ASANUMA, H.; SANADA, S.; TAKASHIMA, S.; MINAMINO, T.; HORI, M.; KITAKAZE, M. Raloxifene prevents cardiac hypertrophy and dysfunction in pressure-overloaded mice. *Hypertension.* 2004 Feb;43(2):237-42. Epub 2003 Dec 15.

PAECH, K.; WEBB, P.; KUIPER, G.G.; NILSSON, S.; GUSTAFFSON, J.-A.; KUSHNER, P.J.; SCALAN, T.S. Differential ligand activation of estrogen receptors ER $\alpha$  and ER $\beta$  at AP1 sites. *Science*. 1997; 277: 1508-1510

PARKIN, D.M. Cancers of the breast, endometrium and ovary: Geographical correlations. *Eur J Cancer Clin Oncol*. 1989;25:1917-1925.

PAVO, I.; LASZLO, F.; MORSCHL, E.; NEMCSIK, J.; BERKO, A.; LASZLO, F.A. Raloxifene, an oestrogen-receptor modulator, prevents decreased constitutive nitric oxide and vasoconstriction in ovariectomized rats. *Eur J Pharmacol*. 2000 Dec 20;410(1):101-4.

PURDIE, D.W. Consequences of long-term hormone replacement therapy. *Br Med Bull*. 2000;56(3):809-23.

te VELDE, E.R.; SCHEFFER, G.J.; DORLAND, M.; BROEKMANS, F.J.; FAUSER, B.C. Developmental and endocrine aspects of normal ovarian aging. *Mol Cell Endocrinol*. 1998 Oct 25;145(1-2):67-73

RAVNIKAR, V.A. Compliance with hormone replacement therapies: are women receiving the full impact of hormone replacement therapy preventive health benefits? *Women Health*. 1992; 2: 75–80.

RICHEY, P.A.; BROWN, S.P. Pathological versus physiological left ventricular hypertrophy: a review. *J Sports Sci*. 1998; 16(2): 129-41.

RUSSEL, K.S.; HAYNES, M.P.; SINHA, D.; CLERISME, E.; BENDER, J.R. Human vascular endothelial cells contain membrane binding sites for estradiol, Which mediate rapid intracellular signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97: 5930-5935

SAINZ, J.; OSUNA, A.; WAGENSTEEN, R.; DE RIOS LUNA, R.; RODRIGUEZ-GOMEZ, I.; DUARTE, J.; MORENO, J.M.; VARGAS, F. Role of sex, gonadectomy and sex hormones in the development of nitric oxide inhibition-induced hypertension. *Exp Physiol*. 2004 Mar;89(2):155-62.

SANTELL, R.C.; CHANG, Y.C.; NAIR, M.G.; HELFERICH, W.G. Dietary genistein exerts estrogenic effects upon the uterus, mammary gland and the hypothalamic/pituitary axis in rats. *J Nutr*. 1997; 127:263–269.

SATO, M.; McCLINTOCK, C.; KIM, J.; TURNER, C.H.; BRYANT, H.U.; MAGEE, D.; SLEMENDA, C.W. Dual-energy x-ray absorptiometry of raloxifene effects on the lumbar vertebrae and femora of ovariectomized rats. *J Bone Miner Res*. 1994 May;9(5):715-24.

SETCHELL, K.D.R.; BORRIELLO, S.P.; HULME, P.; KIRK, D.N.; AXELSON, M. Non-steroidal oestrogens of dietary origin: possible roles in hormone dependent disease. *Am J Clin Nutr*. 1984; 40: 569–578.

SETCHELL, K.D.R.; ADLERCREUTZ, H. Mammalian lignans and phyto-estrogens. Recent studies on their formation, metabolism and biological role in health and

disease. In: ROWLAND, I. R. (ed.). *Role of the Gut Flora in Toxicity and Cancer*. London, Academic Press, UK. 315–345., 1988.

SHIMIZU, H.; ROSS, R.K.; BERSTEIN, L.; YATANI, R.; HENDERSON, B.E.; MACK, T.M. Cancer of prostate and breast among Japanese and White imigrations and White immigrants in Los Angeles county. *Br J Cancer*. 1991;63:963-966.

SUGDEN, P.H.; CLERK, A. Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. *J Mol Med*. 1998; Oct;76(11):725-46

TAKAHASHI, T.; TANIGUCHI, T.; KONISHI, H.; KIKKAWA, U.; ISHIKAWA, Y.; YOKOYAMA, M. Activation of Akt/protein kinase B after stimulation with angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Heart Circ Physiol Soc*. 1999; 45: 1927- 1934.

WEBB, C.M.; GHATEI, M.A.; McNEILL, J.G.; COLLINS, P. 17beta-estradiol decreases endothelin-1 levels in the coronary circulation of postmenopausal women with coronary artery disease. *Circulation*. 2000 Oct 3;102(14):1617-22.

Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal womem – Principal results from the Womem's Healthy Initiative Randomized Controlled Trial. *JAMA* 2002; 288: 321-33

XU, J.; BARTOCES, M.; NEALE, A.V.; DAYLEY, R.K.; NORTHRUP, J.; SCHWARTZ, K.L. Natural history of menopause symptoms in primary care patients: a MetroNet study. *J Am Board Fam Pract*. 2005 Sep-Oct;18(5):374-82