

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos

Área de Nutrição Experimental

**Efeitos do germen de soja e da terapia de reposição hormonal sobre a
formação de metabólitos do NO , lipoproteínas oxidadas, anticorpos
antiproteínas de choque térmico e reatividade vascular em mulheres
pós-menopausa hipercolesterolêmicas**

ISABELA ROSIER OLIMPIO PEREIRA

Tese para obtenção do grau de

DOUTOR

Orientadora:

Prof^a. Titular Dulcineia Saes Parra Abdalla

**São Paulo
2004**

DEDALUS - Acervo - CQ



30100010399

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

P436e Pereira, Isabela Rosier Olimpio
Efeitos dos fitoestrogênios do gérmen de soja e da terapia de reposição hormonal sobre a formação de *NO, lipoproteínas oxidadas, anticorpos antiproteínas de choque térmico e reatividade vascular em mulheres pós-menopausa hipercolesterolêmicas / Isabela Rosier Olimpio Pereira. -- São Paulo, 2004.
110p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.
Orientador: Abdalla, Dulcineia Saes Parra

1. Soja : Isoflavona : Ciência dos alimentos 2. Hormônio : Bioquímica 3. Menopausa 4. Doenças cardiovasculares 5. Estresse oxidativo 6. Fitohormônio : Bioquímica vegetal I. T. II Abdalla, Dulcineia Saes Parra, orientador.

641.35655 CDD

Isabela Rosier Olimpio Pereira

Efeitos do gérmen de soja e da terapia de reposição hormonal sobre a formação de metabólitos do $^{\circ}\text{NO}$, lipoproteínas oxidadas, anticorpos antiproteínas de choque térmico e reatividade vascular em mulheres pós-menopausa hipercolesterolêmicas

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof^ª. Titular Dulcineia Saes Parra Abdalla

Orientador / Presidente

1^º Examinador

2^º Examinador

3^º Examinador

4^º Examinador

São Paulo, 29 de novembro de 2004.

AGRADECIMENTOS

Louvo a Deus por permitir a conclusão deste trabalho em meio a muitas dificuldades, e por permitir que a VIDA e o MUNDO DA PESQUISA pudessem me ensinar tanta coisa nesse 4 anos. Que o Seu nome possa ser glorificado através deste trabalho...

Aos meus pais, Gabriel e Mércia, e aos meus irmãos, Márcia, Gabriela, René e Marcela e sobrinhos, Caio, Gabriel e Bruno, pelo carinho, amor e apoio mesmo à distância.

À professora Dulcineia, pelo exemplo, confiança e pela paciência diante das minhas limitações.

Ao Dr. André Arpad Faludi, pelo seu empenho, profissionalismo e amizade, sem os quais este trabalho não poderia ter se realizado. Ao Dr. Marcelo Chiara Bertolami e ao Dr. José Mendes Aldrighi pelo exemplo de competência e pela imprescindível colaboração e ao Dr. Mohamed Saleh pelo árduo trabalho na análise da reatividade vascular nas mulheres.

Às mulheres, por terem inspirado este trabalho, mas especialmente àquelas que literalmente deram o seu sangue por ele de forma voluntária: a minha imensa gratidão e respeito.

Aos funcionários do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia e companheiros de "coleta de sangue", destacadamente Yara, Vera, Mustafá, Edimar e Ivanise. Às nutricionistas Renata (em especial) e Liliana, pela orientação nutricional dada às pacientes. À Viviene, pelo apoio na organização inicial do trabalho.

Às estagiárias que foram fundamentais à realização deste trabalho: Fernanda Campos, Nadjara Novaes, Fernanda Paschoal e Juliana Inácio. Aos companheiros do laboratório, pela amizade, convivência e desprendimento em ajudar: Kátia, Silene, Maurício, Edimar, Alessandra, Patrícia, Emersom, Daniela e Simone. À amiga Amouni, pela ajuda na busca por pacientes. Ao grupo do Prof. Éder Quintão, salientando Leiko e Valéria, pela colaboração com a utilização do HPLC. Ao Ralfo, que embora tenha aparecido na minha vida na fase final deste trabalho, já pôde deixar as suas marcas, trazendo um brilho diferente ao meu sorriso e pelas valiosas correções na redação em português e inglês.

À IsoSoy, Herborisa e Gama, nas pessoas de Cristiano, Norma Garderman e Leonardo Garderman, pela doação do germen de soja e pelo apoio dado. Sem nos esquecermos da própria soja, pela sua riqueza nutricional e pelas suas propriedades consagradas e outras ainda a serem desvendadas.

À Fundação de Amparo À Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro (bolsa de doutorado - processo 00/09139-1 e projeto temático - processo 97/05090-3).

Lista de Abreviaturas

*NO - óxido nítrico
*NO₂ - dióxido de nitrogênio
AMP - acetato de medroxiprogesterona
BSTFA - N,O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida
BHT - butil hidroxitolueno
DNA - ácido desoxiribonucléico
ECE - estrogênios conjugados equinos
EDRF – Fator de relaxamento vascular dependente do endotélio
EDTA - ácido etilenodiaminotetracético
ELISA - Ensaio imunoenzimático
eNOS - óxido nítrico sintase endotelial
ERA - Estrogen Replacement and Atherosclerosis
ER- α - receptor alfa
ER- β - receptor beta
GMP - guanosina 5'-monofosfato
GMP – Guanosina monofosfato
H₂O₂ - peróxido de hidrogênio
HDL - lipoproteína de densidade alta
HERS - Estrogen/progestin Replacement Study
HMG-CoA - hidroximetilglutaril-Coenzima A
HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência
HSP - proteína de choque térmico
HTGL - lipase hepática
iNOS - óxido nítrico sintase indutível
LDL - lipoproteína de densidade baixa
LDL⁻ - lipoproteína de densidade baixa eletronegativa
LDL-ox – LDL oxidada
LPS - lipopolissacarídeo
LTP - pela proteína transportadora de ésteres de colesterol
MDA - malondialdeído
MDA - malondialdeído
MTHF - N-5-metiltetrahidrofolato
MTHF - N-5-metiltetrahidrofolato
nNOS - óxido nítrico sintase neuronal
NOS - óxido nítrico sintase
NO_x - nitrito + nitrato
ONOO⁻ - ânion peroxinitrito
ONOO⁻ - peroxinitrito
PAF-AH - acetil-hidrolase do fator de ativação de plaquetas
PAF-AH - fator de ativação de plaquetas-acetil-hidrolase
PBS
PMSF - fenil-metil-sulfonil fluoreto
RNA - ácido ribonucléico
RSNO - nitrosotióis
TBS - tampão tris salino
VLDL - lipoproteína de densidade muito baixa
WHI - Women's Health Initiative

Lista de Figuras

Figura	Título	Página
1	Estrutura química do colesterol e de seus produtos de oxidação	7
2	Síntese Ovariana, Transporte e Metabolismo dos Estrogênios	15
3	Estruturas dos Receptores de Estrogênio de Humanos (alfa) e (beta)	16
4	Localização predominante dos receptores de estrogênio em diversos órgãos	18
5	Efeitos dos estrogênios e estrogênios/progestógenos no transporte de	19
6	Efeitos Diretos do Estrogênio sobre vasos sanguíneos	22
7	Mecanismo de ativação rápida não genômica da eNOS por Estrogênio em	23
8	Estrutura química das principais isoflavonas da soja e o efeito do processamento sobre a estrutura.	30
9	Semelhança estrutural entre genisteína e 17 β -estradiol e interação de genisteína com o ER β	31
10	Representação da vasodilatação endotélio dependente	54
11	Representação da vasodilatação endotélio independente	54
12	Concentração plasmática de isoflavonas após tratamento com isoflavonas	57
13	Comparação da concentração de estradiol obtida após o uso de placebo e após tratamento com isoflavonas (I), 17 β -estradiol (E) ou 17 β -estradiol + acetato de noretisterona (E+P).	57
14	Comparação da concentração de colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol e triglicérides obtidos após o uso de placebo e após tratamento com isoflavonas (I), 17 β -estradiol (E) ou 17 β -estradiol + acetato de noretisterona (E+P)	58
15	Comparação da concentração de derivados do óxido nítrico (NOx) obtidos após o uso de placebo e após tratamento com isoflavonas (I), 17 β -estradiol (E) ou 17 β -estradiol + acetato de noretisterona (E+P).	59
16	Comparação da concentração de S-nitrosotióis obtidos após o uso de placebo e após tratamento com isoflavonas (I), 17 β -estradiol (E) ou 17 β -estradiol + acetato de noretisterona (E+P)	60
17	Comparação da concentração de equivalentes de nitroalbumina obtida após o uso de placebo e após tratamento com isoflavonas (I), 17 β -estradiol (E) ou 17 β -estradiol + acetato de noretisterona (E+P)	60
18	Comparação das concentrações de óxidos de colesterol: 7 α -hidroxicolesterol (7-alfa), 7 β -hidroxicolesterol (7-beta), cholestan-5 α ,6 α -epoxy-3 β -ol (alfa-epoxi), cholestan-5 α ,6 β -epoxy-3 β -ol (beta-epoxi), cholestan-3 β ,5 α ,6 β -triol (Triol), 5-cholesten-3 β -ol-7-one (7-keto) e 5-cholesten-3 β ,25-diol (25-OH) obtidas após o uso de placebo e após tratamento com isoflavonas (I), 17 β -estradiol (E) ou 17 β -estradiol + acetato de noretisterona (E+P)	61

19	Comparação do somatório das concentrações de óxidos de colesterol obtidas após o uso de placebo e após tratamento com isoflavonas (I), 17 β -estradiol (E) ou 17 β -estradiol + acetato de noretisterona (E+P).	62
20	Comparação do somatório das concentrações de óxidos de colesterol dividido pelos valores de colesterol total obtidos após o uso de placebo e após tratamento com isoflavonas (I), 17 β -estradiol (E) ou 17 β -estradiol + acetato de noretisterona (E+P)	62
21	Comparação da concentração de LDL ⁻ obtida após o uso de placebo e após tratamento com isoflavonas (I), 17 β -estradiol (E) ou 17 β -estradiol + acetato de noretisterona (E+P)	63
22	Comparação da concentração de LDL ⁻ dividida pela concentração de LDL-colesterol obtida após o uso de placebo e após tratamento com isoflavonas (I), 17 β -estradiol (E) ou 17 β -estradiol + acetato de noretisterona (E+P)	63
23	Comparação da reatividade de anticorpos anti-HSC70 encontrada após o uso de placebo e após tratamento com isoflavonas (I), 17 β -estradiol (E) ou 17 β -estradiol + acetato de noretisterona (E+P)	64
24	Comparação da reatividade de anticorpos anti-HSP70 encontrada após o uso de placebo e após tratamento com isoflavonas (I), 17 β -estradiol (E) ou 17 β -estradiol + acetato de noretisterona (E+P)	65
25	Comparação da reatividade de anticorpos anti-HSP60 encontrada após o uso de placebo e após tratamento com isoflavonas (I), 17 β -estradiol (E) ou 17 β -estradiol + acetato de noretisterona (E+P)	65
26	Comparação da concentração de Homocisteína encontrada após o uso de placebo e após tratamento com isoflavonas (I), 17 β -estradiol (E) ou 17 β -estradiol + acetato de noretisterona (E+P)	66
27	Comparação da concentração de Metionina encontrada após o uso de placebo e após tratamento com isoflavonas (I), 17 β -estradiol (E) ou 17 β -estradiol + acetato de noretisterona (E+P)	66
28	Comparação da concentração de Cisteína encontrada após o uso de placebo e após tratamento com isoflavonas (I), 17 β -estradiol (E) ou 17 β -estradiol + acetato de noretisterona (E+P)	67
29	Comparação da concentração de Glutathiona encontrada após o uso de placebo e após tratamento com isoflavonas (I), 17 β -estradiol (E) ou 17 β -estradiol + acetato de noretisterona (E+P)	67
30	Comparação da reatividade vascular (% de dilatação da artéria braquial após hiperemia reativa) analisada após o uso de placebo e após tratamento com isoflavonas (I), 17 β -estradiol (E) ou 17 β -estradiol + acetato de noretisterona (E+P)	68
31	Correlação entre o percentual de dilatação após hiperemia reativa e a concentração plasmática de estradiol obtida após tratamento com 17 β -estradiol (E)	69

32	Correlação entre o percentual de dilatação após hiperemia reativa e a concentração plasmática de estradiol obtida após tratamento com 17 β -estradiol (E) em relação ao placebo	69
33	Correlação entre o percentual de dilatação após hiperemia reativa e a concentração plasmática de genisteína obtida após tratamento com isoflavonas (I) em relação ao placebo	70
34	Figura 34 – Correlação entre o percentual de dilatação após hiperemia reativa obtida após tratamento com isoflavonas (I) com a concentração plasmática de genisteína (A) e com a concentração plasmática de daidzeína (B)	70

Lista de Tabelas

Tabela	Título	Página
1	Comparação entre os efeitos do 17 β -Estradiol, Raloxifeno e Isoflavonas	30
2	Características iniciais de idade, tempo de menopausa, índice de massa corporal (IMC) dos grupos estudados.	56
3	Coefficientes de correlação (r) e valor de p entre algumas variáveis	71
4	Principais eventos adversos nos diferentes grupos de tratamento	72

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Óxido nítrico, Oxidação de Lipoproteínas e Reatividade Vascular	01
1.2. Expressão de Proteínas de Choque Térmico (HSP) e Formação de Auto-anticorpos Anti-HSPs	10
1.3. Estrogênio, Menopausa, Terapia de Reposição Hormonal e Proteção Vascular	14
1.4. Fitoestrogênios – uma alternativa de reposição hormonal em mulheres pós-menopausa ?	28
2. OBJETIVOS	36
3. MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1. Pacientes, Medicação e Suplementação	37
3.1.1. Critérios de Inclusão	40
3.1.2. Critérios de Exclusão	40
3.1.3. Critérios de Interrupção do Estudo	42
3.2. Local De Realização Das Várias Etapas	42
3.3. Análises Laboratoriais	43
3.4. Medida da reatividade vascular da artéria braquial e do complexo íntima-medial das artérias carótidas	52
3.5. Análise estatística	55
4. RESULTADOS	56
5. DISCUSSÃO	73
6. CONCLUSÕES	86
7. RESUMO	88
8. ABSTRACT	90
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

INTRODUÇÃO

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

1. INTRODUÇÃO

1.1. Óxido Nítrico, Oxidação de Lipoproteínas e Reatividade Vascular

O óxido nítrico (NO) é um radical livre com características especiais. O NO é sintetizado por uma família de enzimas denominadas óxido nítrico sintases (NOS) que catalisam a oxidação de um nitrogênio guanidínico da L-arginina para formar óxido nítrico e citrulina (Moncada, 1991). Há três isotipos de NOS: neuronal (nNOS); endotelial (eNOS) e indutível (iNOS). O NO é reconhecido como fator de relaxamento vascular dependente do endotélio (EDRF) e regula o tônus vascular e o fluxo sanguíneo. Após sua liberação, o óxido nítrico interage com o grupo heme da guanilato ciclase, levando à produção de GMP cíclico que é responsável pela vasodilatação (Vallance e Moncada, 1993) e está relacionado à inibição da agregação plaquetária, aos sinais de neurotransmissão e à regulação imune (Stamler *et al.*, 1992).

Sob condições fisiológicas, o endotélio exerce um efeito protetor nos vasos sanguíneos, como por exemplo, prevenindo a adesão de leucócitos, dilatando a vasculatura e inibindo a proliferação de células musculares lisas (Luscher e Noll, 1995). A disfunção endotelial atualmente é considerada como um importante precursor da doença vascular, sendo caracterizada pela perda progressiva do tônus vascular (Drexler *et al.*, 1991; Seiler *et al.*, 1991). A disfunção endotelial pode ser medida pela perda da atividade vasodilatadora fluxo-dependente, ou, pela resposta vasoconstritora a agentes que normalmente causam vasodilatação. Muitos trabalhos demonstram a existência de disfunção endotelial na hipertensão e na hipercolesterolemia (Panza *et al.*, 1995; Lusher e Noll, 1995). A disfunção endotelial na hipertensão pode estar relacionada ao aumento da resistência periférica vascular e às complicações vasculares (Luscher e Noll, 1995).

Em artérias que apresentam lesões ateroscleróticas, ou na presença de hipercolesterolemia, a administração de acetilcolina produz vasoconstrição paradoxal (Collins *et al.*, 1995).

Artérias removidas de coelhos (Maseri, 1984; Matsubara *et al.*, 1986) e macacos (Freiman *et al.*, 1986) hipercolesterolêmicos exibiram relaxamento dependente do endotélio marcadamente anormal em resposta a substâncias como acetilcolina, trombina e ionóforo de cálcio, *in vitro*. Em contraste, a vasodilatação em resposta a agentes como nitroglicerina ou nitroprussiato de sódio, que agem diretamente no músculo liso vascular, foi normal ou somente moderadamente diminuída. Ou seja, a hipercolesterolemia afeta diretamente a vasodilatação dependente do endotélio. Porém, paradoxalmente, tem sido observado que a hipercolesterolemia pode aumentar a atividade e/ou a expressão da NOS. Observou-se também que o tratamento com superóxido dismutase melhora significativamente a vasodilatação dependente do endotélio (Mugge *et al.*, 1991). Finalmente, a medida direta da produção de superóxido em aortas normais e desnudadas de coelhos hipercolesterolêmicos demonstrou um aumento de três vezes na produção de superóxido nas aortas normais em relação às desnudadas, sugerindo que a principal fonte de superóxido é o endotélio (Ohara *et al.*, 1993). O NO produzido na hipercolesterolemia seria, portanto, inativado no próprio endotélio por sua reação com o radical superóxido.

Minor *et al.* (1990) encontraram uma elevada produção de óxidos de nitrogênio em artérias ateroscleróticas de coelhos hipercolesterolêmicos, em relação às artérias normais e concluíram que o impedimento do relaxamento dependente do endotélio na aterosclerose não é devido à menor atividade da enzima responsável pela produção de óxidos de nitrogênio à partir da arginina, ou da deficiência de arginina. A alteração da atividade vasodilatadora induzida por dietas ricas em colesterol pode resultar de uma

menor incorporação de óxido nítrico em um composto mais potente, ou, à acelerada degradação do fator de relaxamento dependente do endotélio (EDRF). Freyschuss *et al.* (1996) verificaram um aumento da concentração plasmática de óxidos de nitrogênio entre três a seis semanas de uma dieta contendo 1% de colesterol, em coelhos, havendo posterior regressão aos níveis basais após a nona semana. Portanto, estes estudos indicam que a deficiência no relaxamento vascular dependente do endotélio na hipercolesterolemia e na aterosclerose, está associada a uma redução da biodisponibilidade do NO e a possível formação de peroxinitrito, que é uma espécie altamente reativa e participa da oxidação da LDL.

A localização da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) em invaginações especializadas da membrana plasmática, denominadas cavéolas, tem sido proposta como necessária para a máxima atividade dessa enzima (Boje *et al.* 1990; Goligorsky *et al.* 2002). As cavéolas são altamente enriquecidas em colesterol. O RNA mensageiro da caveolina (proteína presente nas cavéolas e que interage com eNOS) é hiper-regulado quando a entrada de colesterol livre da LDL para a célula é aumentada, sendo a regulação do efluxo de colesterol livre por via caveolar, modulada pela caveolina (Fielding *et al.* 1997). Várias evidências indicam que o aumento da regulação da caveolina, em células expostas a altos níveis de LDL-colesterol, resulta diretamente de um aumento na transcrição do gene da eNOS, induzido pelo maior conteúdo celular de colesterol (Bist *et al.* 1997). Estudos *in vitro* demonstram que, após 24 horas de exposição das células endoteliais a baixas concentrações de LDL oxidada (LDL-ox), observa-se aumento do RNA mensageiro da eNOS; porém, em altas concentrações de LDL-ox, esse efeito é revertido (Hirata *et al.* 1995). Além disso, a hipercolesterolemia pode promover a produção de óxido nítrico pela NOS indutível (Wan *et al.* 2000). Essas

observações mostram que existe correlação entre a produção de óxido nítrico, a hipercolesterolemia e a peroxidação lipídica.

Em um estudo de Fries *et al.* (1995), a LDL oxidada aumentou a síntese de óxido nítrico em cultura de células endoteliais, porém, em um estudo de Vergnani (2000), a LDL oxidada inibiu a síntese de óxido nítrico. Myers *et al.* (1994) verificaram que a LDL oxidada diminuiu a vasodilatação de anéis da artéria coronária, mas não a produção de *NO por células endoteliais. Portanto, a relação entre a produção de óxido nítrico e a hipercolesterolemia e lipoproteínas oxidadas ainda não está bem esclarecida.

O óxido nítrico tem sua bioatividade reduzida na mulher pós-menopausa; entretanto, não está claro se isto ocorre devido à sua menor produção pela óxido nítrico sintase, ou, se o óxido nítrico é inativado pela sua reação com o radical superóxido, também gerado pelas células endoteliais, formando o ânion peroxinitrito ($ONOO^-$), que é forte agente oxidante.

O peroxinitrito se decompõe em outras espécies reativas de oxigênio (Lancaster, 1996) e reage com resíduos tirosina de proteínas para formar nitrotirosina (Beckman *et al.*, 1992). Embora pouco se saiba sobre os efeitos da nitração de tirosina na função protéica *in vivo*, tem sido mostrado que o peroxinitrito e seus produtos de decomposição induzem a peroxidação dos lipídios das membranas (Radi *et al.*, 1991) e podem iniciar a peroxidação lipídica da LDL humana (Darley-Usmar *et al.*, 1992), provocando lesão endotelial e aumento da permeabilidade vascular (Lancaster, 1996).

O dióxido de nitrogênio (*NO_2) é um dos produtos oxidantes formado na decomposição do peroxinitrito, que atravessa rapidamente as membranas celulares, devido à sua alta lipofilicidade, iniciando a oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados. Assim, o dióxido de nitrogênio pode abstrair um átomo de hidrogênio das cadeias de ácidos graxos poli-insaturados, por exemplo, resultando em um dieno conjugado que

pode reagir com oxigênio molecular para formar radicais peroxila e, posteriormente, hidroperóxidos lipídicos (Schmitt *et al.* 1999). Recentemente, tem sido sugerido que o dióxido de nitrogênio também pode formar lipídeos nitrados (Lima *et al.* 2003; Lima *et al.* 2002; O'Donnell *et al.* 1999).

Modificações peroxidativas de fosfolipídeos, triacilgliceróis e ésteres de colesterol podem ocorrer em reações promovidas por radicais livres e por espécies não radicalares, como o peroxinitrito. A molécula do colesterol também pode ser oxidada com conseqüente formação dos óxidos de colesterol (figura 1). O colesterol oxidado na posição 7 pode reduzir o relaxamento dependente do endotélio e a produção de óxido nítrico por células endoteliais (Deckert *et al.* 1998). Os óxidos de colesterol são encontrados em concentrações elevadas nas artérias ateroscleróticas e em lipoproteínas de pacientes hipercolesterolêmicos (Vaya *et al.* 2001). Já foi demonstrado que alguns óxidos de colesterol, principalmente o 7-cetocolesterol, possuem atividade antiestrogênica (Murphy *et al.*, 1985; Hwang *et al.*, 1989).

Fielding (2001) verificou que óxidos de colesterol reduzem o RNA mensageiro da caveolina, o transporte de colesterol livre para a superfície das células e o efluxo celular de colesterol livre. A cavéola é uma provável intermediária do efluxo de colesterol livre via HDL (Fielding *et al.* 1997). A presença de oxisteróis na HDL reduz a capacidade desta lipoproteína de estimular o efluxo de colesterol (Gesquiere *et al.* 1997). Estudos *in vitro* demonstram que o estradiol é mais efetivo que o alfa-tocoferol ou o beta-caroteno em inibir a formação de óxidos de colesterol (Ayres *et al.* 1996; Tang *et al.* 1996). Os fitoestrogênios, pela sua similaridade estrutural, podem ter efeitos similares.

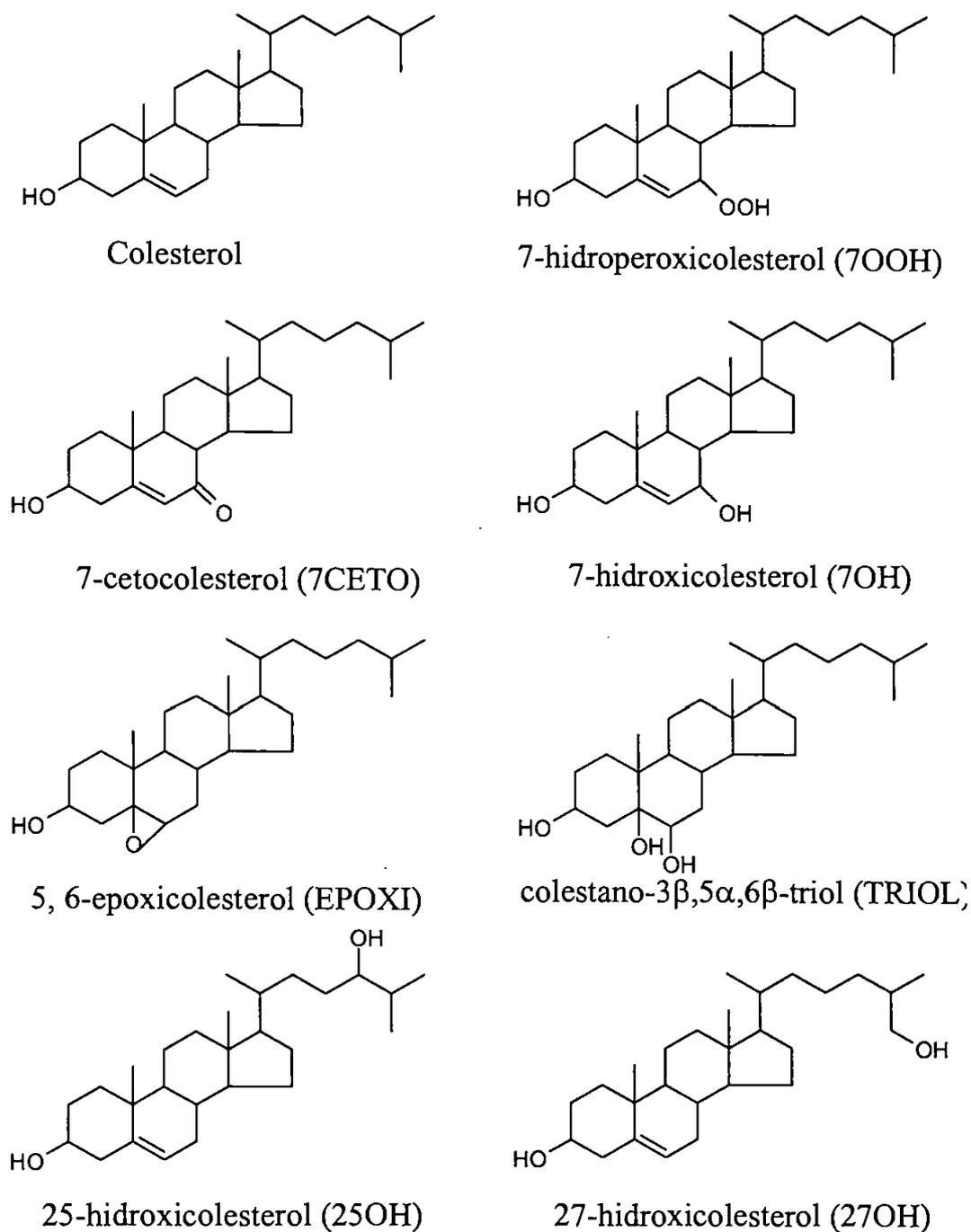


Figura 1 – Estrutura química do colesterol e de seus produtos de oxidação (Brown et al., 1999)

Complexos imunes circulantes, contendo LDL isolada de pacientes com aterosclerose coronária, têm o dobro de oxisteróis em relação à fração livre de LDL (Tertov *et al.* 1996). Na LDL eletronegativa (LDL⁻) - que é uma subfração da LDL carregada negativamente presente no sangue - isolada de macacos

hipercolesterolêmicos, os oxisteróis representaram até 50 % do total de esteróis, com o alfa-epoxicolesterol sendo o principal oxisterol encontrado (Hodis *et al.* 1994). Na LDL⁻ isolada de humanos normocolesterolêmicos, as concentrações de oxisteróis são menores, representando aproximadamente 5% do total de esteróis (Sevanian *et al.* 1997).

Esta LDL eletronegativamente carregada é uma lipoproteína parcialmente modificada oxidativamente, identificada em plasma humano e caracterizada por um aumento do conteúdo de dienos conjugados e malondialdeído (MDA) e concentração reduzida de vitamina E (Avogaro *et al.* 1988; Avogaro *et al.* 1991). A LDL⁻ tem propriedades pró-inflamatórias e aterogênicas, tais como citotoxicidade e liberação de interleucina-8 e MCP-1 por células endoteliais (De Castellarnau *et al.* 2000), que não são observadas na LDL nativa, e podem contribuir para um estado pró-oxidante facilitando reações oxidativas em componentes vasculares. Modificações que aumentam a eletronegatividade da LDL *in vitro*, tais como oxidação e glicação não enzimática, impedem a ligação da LDL aos receptores hepáticos e contribuem para o acúmulo de colesterol em macrófagos (Aviram 1993; Steinberg *et al.* 1989). A proporção de LDL⁻ está aumentada em pessoas com elevado risco cardiovascular como hipercolesterolêmicos familiares e pacientes diabéticos tipo 2 (Sanchez-Quesada *et al.* 1996). Tem sido sugerido que esta subfração da LDL poderia ser resultado da peroxidação lipídica, mas também de uma glicação não-enzimática ou conteúdo anormal de apoproteínas ou ácidos siálicos (Avogaro *et al.* 1991). A associação preferencial da PAF-AH (fator de ativação de plaquetas-acetil-hidrolase) com LDL⁻ sugere um papel pró-inflamatório desta enzima na LDL (Sanchez-Quesada *et al.*, 2004). Não há na literatura estudos que avaliem *in vivo* a influência da terapia de reposição hormonal ou fitoestrogênios sobre a formação de óxidos de colesterol e LDL⁻.

Um outro fator de risco para doença cardiovascular que está associado ao estresse oxidativo e à disfunção endotelial é a hiperhomocisteinemia. A homocisteína (Hcy) é um aminoácido sulfurado, cujo metabolismo está situado entre duas vias metabólicas: remetilação e transulfuração. Na remetilação, a homocisteína adquire um grupo metil da N-5-metiltetrahidrofolato (MTHF) ou de betaina para formar a metionina. A reação com MTHF acontece em todos os tecidos e é dependente de vitamina B₁₂, enquanto que a de betaina ocorre principalmente no fígado e rins em humanos. Na via de transulfuração a homocisteína se condensa com serina para formar a cistationa por meio de uma reação irreversível, dependente de piridoxal 5-fosfato (vitamina B₆), formando ao final a cisteína (Bostom *et al.*, 1997). A reatividade do grupo sulfidril da homocisteína tem sido vista como um dos mecanismos envolvidos na ação da homocisteína na aterosclerose. A lesão vascular induzida pela homocisteína parece ser secundária à formação de peróxido de hidrogênio, proveniente da oxidação de aminoácidos sulfurados por agentes oxidantes, tais como o cobre (Starkebaum *et al.* 1986). A formação de S-nitroso-homocisteína previne a oxidação do grupo tiol e a formação de peróxido de hidrogênio, além de ter potente ação vasodilatadora e de inibição da agregação plaquetária (Stamler *et al.*, 1995).

Os nitrosotióis (RSNO's) podem ser formados pela reação do [•]NO com grupos tióis (Marley *et al.*, 2001) (presentes em resíduos de cisteína, homocisteína e glutatona) e a sua concentração é dependente da síntese de [•]NO (Eiserich *et al.* 1998). Os RSNO's possuem ação vasodilatadora e de inibição da agregação plaquetária (Eiserich *et al.*, 1998). Estes compostos são considerados como reservatórios de [•]NO e muitos dos efeitos promovidos pelos RSNO's podem ser explicados pela liberação de [•]NO. Entretanto, nem todos os efeitos biológicos descritos para os RSNO's são atribuídos à função doadora de [•]NO desses compostos. Há evidências de um efeito intrínscico dos

RSNO's devido à ativação da guanilato ciclase, produzindo vasodilatação (Stamler, 1995).

Os eventos que desencadeiam a disfunção endotelial e o desenvolvimento da lesão aterosclerótica são os mais variados e complexos. É conhecido que hipercolesterolemia, biodisponibilidade de óxido nítrico, nitração e nitrosilação de proteínas, homocisteína e oxidação de lipoproteínas são fatores importantes relacionados ao desenvolvimento da aterosclerose. Comparar a influência da terapia de reposição hormonal e fitoestrogênios sobre estes fatores, em mulheres que constituem um grupo de risco para a doença cardiovascular, pode ser relevante.

1.2. Expressão de Proteínas de Choque Térmico (HSP) e Formação de Auto-anticorpos Anti-HSPs

A aterogênese é um processo complexo, com múltiplos mecanismos contribuindo para sua iniciação e progressão como infecções, inflamação e autoimunidade (Greaves *et al.* 2002; Leinonen *et al.* 2002; Wick 2000; Zhu *et al.* 2004). Pesquisas recentes têm enfatizado o papel da autoimunidade na aterogênese, com HSPs identificadas como possíveis determinantes autoantigênicos agindo como alvo imunológico no processo aterosclerótico (Pockley, 2002; Xu, 2002). A relação entre hipertensão, espessamento intimal e aterosclerose da carótida, em resposta a elevados títulos de anticorpos anti-HSPs e a demonstração de que estes anticorpos são citotóxicos para células endoteliais, sugerem que HSPs podem estar envolvidas na gênese e progressão da aterosclerose (Mandal *et al.* 2004). Portanto, é importante avaliar o papel da terapia de reposição hormonal sobre estes fatores.

Além dos diversos estudos demonstrando a ação do óxido nítrico sobre o relaxamento vascular dependente do endotélio e a formação de produtos altamente reativos, derivados da sua reação com o radical superóxido, estudos *in vitro* mostram que a síntese elevada deste radical livre está diretamente associada à expressão de proteínas de choque térmico (“Heat Shock Protein” - HSP) nos diversos tipos celulares (células endoteliais, musculares lisas e monócitos/macrófagos) presentes nas lesões ateroscleróticas (Hirvonen *et al.*, 1996; Xu, *et al.*, 1997; Malyshev *et al.*, 1996).

Proteínas de estresse ou de choque térmico formam uma família de cerca de 20 proteínas que apresentam uma elevada homologia entre as espécies (desde as bactérias até os humanos). Em situações de estresse como as infecções, a febre, a geração aumentada de espécies reativas de oxigênio ou estresse mecânico, ocorre um aumento

da expressão destas proteínas, cuja principal função é proteger as células contra as agressões do meio ambiente. As HSPs são divididas em sub-famílias baseadas no peso molecular (90, 70, 60 kDa e outras pequenas famílias), das quais a HSP70 é uma das mais extensivamente estudadas em células de mamíferos, sendo composta de membros constitutivos (HSC70 ou HSP73) e indutíveis (HSP70 ou HSP72). Estas proteínas são altamente conservadas através da evolução e desempenham papéis essenciais como “chaperonas” moleculares sob condições normais e de estresse, por facilitarem o dobramento de proteínas nascentes, resolubilizando proteínas agregadas e participando no redobramento de proteínas desnaturadas (Laszlo *et al.*, 1988; Langer *et al.*, 1991). HSPs desempenham um importante papel nas reações imunes, em condições normais e patológicas, através do envolvimento no processamento e apresentação de antígenos e no enovelamento das imunoglobulinas, além de poder participar na patogênese de processos autoimunes via reatividade cruzada (Young e Elliott, 1989; Kaufmann, 1990). Em condições de estresse, as HSPs movem-se do citoplasma para o núcleo. Seu efeito protetor contra lesão oxidativa pode resultar de uma proteção contra lesão do DNA induzida por oxidantes (Hirvonen, 1996).

O aumento da síntese de NO estimula a expressão de HSC70 em macrófagos e em células musculares lisas (Hirvonen, 1996). As HSPs poderiam desempenhar um papel no reparo de proteínas desnaturadas modificadas pelo NO . A liberação de NO da parede arterial, em resposta ao estresse hemodinâmico, pode ser, em parte, responsável pela produção da HSP 70 em aortas (Johnson *et al.*, 1995). Similarmente, o aumento da expressão de HSPs em lesões ateroscleróticas pode também estar relacionado ao distúrbio da produção de NO (Chen *et al.*, 1999; Bellman *et al.*, 2000). A LDL oxidada pode atuar como um indutor para a expressão da HSP70 e HSC70 (Zhu, *et al.*, 1995;

Frostegard *et al.*, 1996). Assim, o aumento da expressão de HSPs dependente de $\cdot\text{NO}$ ou da LDL oxidada, está associada com a produção inapropriada de $\cdot\text{NO}$.

O aumento da expressão dessas proteínas por diversas células pode fazer com que sejam consideradas estranhas pelo sistema imune, sendo, portanto, capazes de induzir uma reação autoimune (Xu *et al.*, 1993). A imunização de coelhos com HSP65 levou à formação de lesões ateroscleróticas, que foram agravadas pela presença de hipercolesterolemia (Xu *et al.*, 1992, Afek *et al.*, 2000). Estes autores postularam que a aterosclerose pode representar, a princípio, uma doença autoimune que se agrava pela presença de fatores de risco, tais como as hiperlipidemias, o tabagismo e a hipertensão, ou seja, fatores associados a uma situação de estresse e, portanto, capazes de induzir a expressão das proteínas de choque térmico, conforme verificado por Prummel *et al.* (1997) e Wick *et al.* (1995). Neste contexto, fatores que possam modificar a expressão destas proteínas possivelmente seriam capazes de alterar o desenvolvimento da aterosclerose.

Anticorpos anti-HSPs estão presentes na circulação de humanos saudáveis, mas ausentes em animais livres de infecções, sugerindo que a indução de anticorpos anti-HSPs depende da exposição a alguns agentes infecciosos (Xu *et al.*, 1993). Anticorpos contra HSP60, HSP70 e HSC70 estão aumentados no soro de pacientes com doenças cardiovasculares, comparados com os de controles saudáveis (Portig *et al.*, 1997). Títulos aumentados de anticorpos anti-HSP65 são associados com lesões ateroscleróticas (Xu *et al.*, 1999). O possível papel de anticorpos circulantes anti-HSP65 na aterogênese pode envolver uma reação autoimune contra células endoteliais que expressam altos níveis de HSPs devido ao estresse, tais como infecções locais e estresse hemodinâmico.

Portanto, a autoimunidade contra HSPs tem sido proposta como um importante fator de risco para aterosclerose. Sendo mulheres hipercolesterolêmicas na pós-menopausa um grupo de risco para a doença cardiovascular, seria importante avaliar a reatividade de anticorpos anti-HSPs e o possível efeito da terapia de reposição hormonal e fitoestrogênios neste grupo.

1.3. Estrogênio, Menopausa, Terapia de Reposição Hormonal e Proteção Vascular

A Organização Mundial de Saúde define menopausa como sendo a interrupção das menstruações resultante do término da atividade folicular ovariana. A perimenopausa ou climatério é o período em que se iniciam as manifestações endocrinológicas, biológicas e clínicas imediatamente anteriores à menopausa, e que se estende até o final do seu primeiro ano. A pós-menopausa é definida como a época que começa a partir da menopausa, desde que tenha sido observada 12 meses de amenorréia espontânea. (Sakamoto & Halbe, 1995)

Há um aumento do risco de doença cardiovascular na pós-menopausa. Esse risco, na mulher menopausal, fisiologicamente é três a quatro vezes maior que na pré-menopausa (Sakamoto & Halbe, 1995). Em relação aos homens, a doença cardiovascular ocorre mais tardiamente em mulheres, em parte por causa de diferenças hormonais. O estrogênio tem um importante papel na manutenção da saúde cardiovascular na mulher e a interrupção da produção ovariana do estrogênio ocorrida na menopausa aumenta o risco de doença cardiovascular (Mendelsohn *et al.*, 2002).

Os estrogênios de ocorrência natural 17 β -estradiol (E2), estrona (E1) e estriol (E3) são esteróides de 18 carbonos derivados do colesterol. Após ligação das lipoproteínas aos seus receptores, o colesterol é captado pelas células esteroidogênicas para síntese de esteróides. Androstenediona e testosterona são precursores obrigatórios dos estrogênios. Após a síntese, principalmente no ovário, o 17 (beta)-estradiol é secretado na corrente sanguínea onde se liga à proteínas de transporte (globulina e albumina). Estrogênios livres se difundem nos tecidos alvo e exercem seus efeitos genômicos e não genômicos. O catabolismo enzimático dos estrogênios gera hidroxiestrogênios e metoxiestrogênios (Figura 2, Gruber *et al.* 2002).

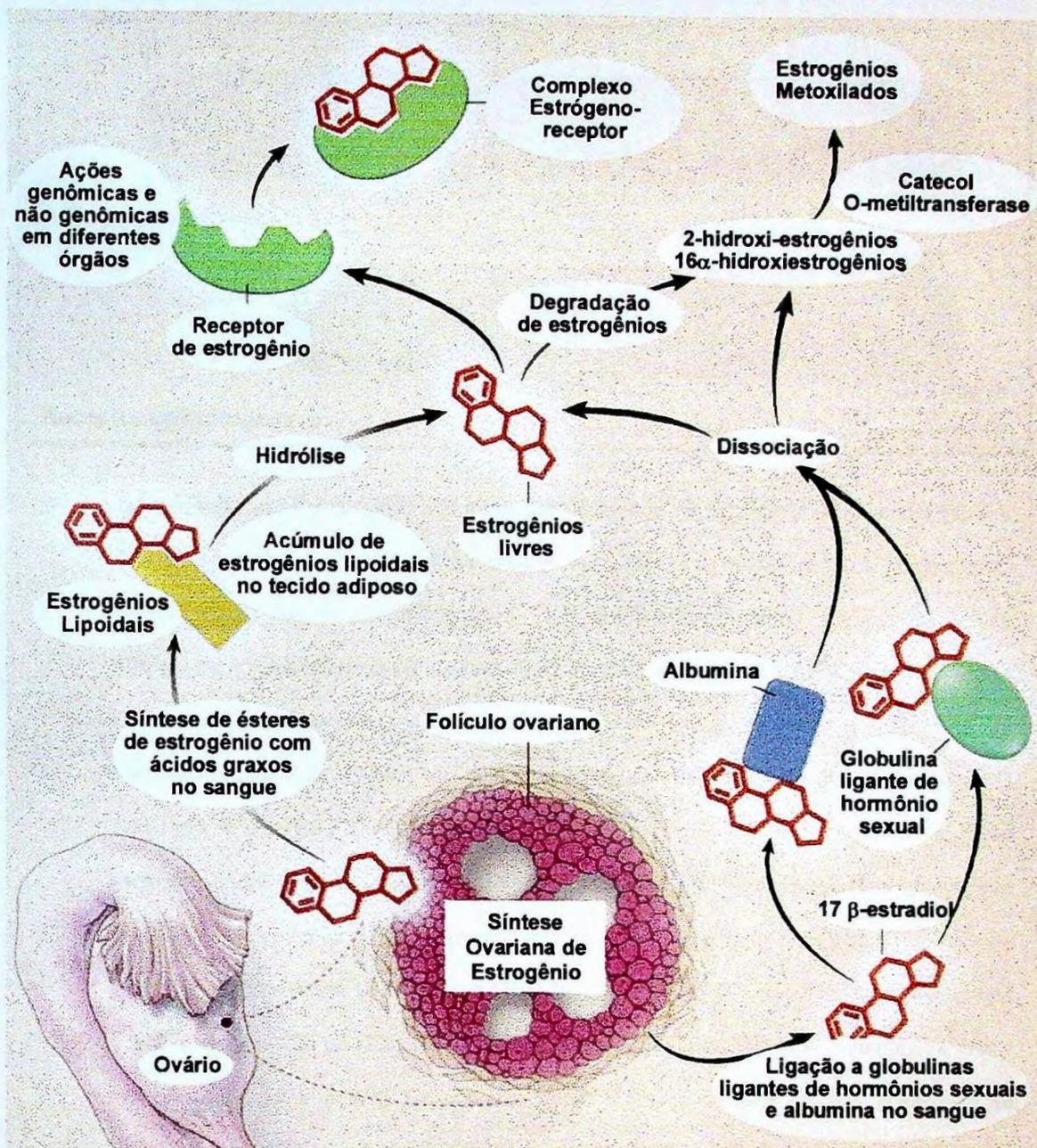


Figura 2 – (Gruber *et al.*, 2002) Síntese Ovariana, Transporte e Metabolismo dos Estrogênios. Após síntese, principalmente no ovário, 17(beta)-estradiol é secretado para a circulação sanguínea, onde se liga a proteínas de transporte (globulina e albumina). Estrogênios livres se difundem para tecidos alvos para exercer seus efeitos genômicos e não genômicos. Estrogênios lipoidais são sintetizados no sangue e outros tecidos, mas acumulam-se predominantemente no tecido adiposo. Catabolismo enzimático dos estrogênios gera hidroxiestrogênios e metoxiestrogênios.

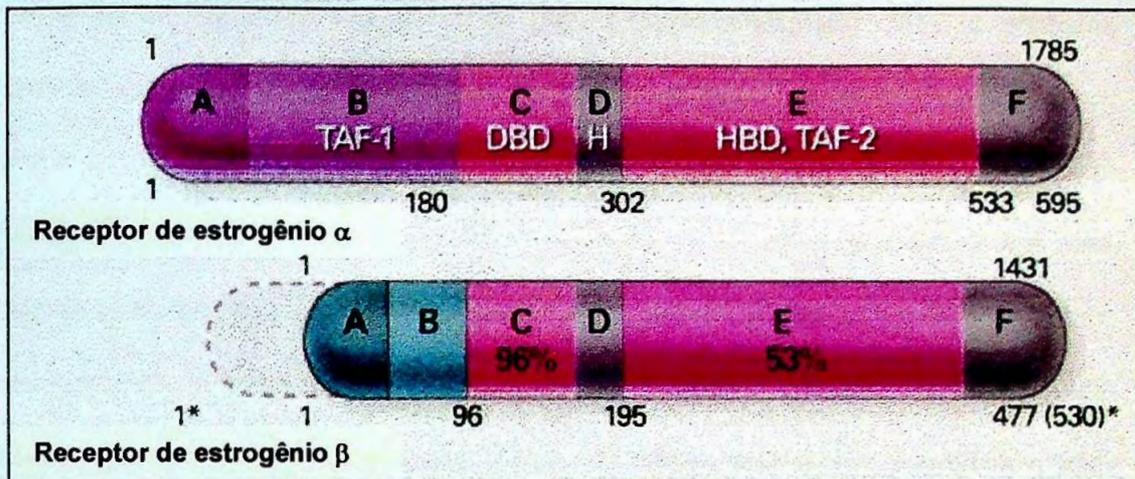


Figura 3 – (Mendelsohn and Karas, 1999) Estruturas dos Receptores de Estrogênio de Humanos (alfa e beta). Receptores de Estrogênio, como todos os receptores de esteróides são organizados em domínios. Os domínios amino-terminais A-B dos receptores de estrogênio contém uma função de ativação transcricional (TAF-1). O domínio de ligação ao DNA (DBD) contém 2 sítios de ligação ao zinco que são altamente conservados em todos os receptores de hormônios esteróides. O Domínio D é a região de dobra (hinge - H) desses receptores. O domínio E contém o domínio de ligação ao hormônio (HBD) e a função de ativação transcricional dependente de hormônio (TAF-2). O domínio F é a região variável que inclui a sequência para a hélice 12 da molécula, que provavelmente é importante para a diferença na resposta dos receptores ao estradiol e SERMs. O receptor beta tem uma elevada homologia com o receptor alfa no DBD (96 % de homologia) e no HBD (53 % de homologia), mas é diferente no domínio A-B. Os números acima e abaixo de cada receptor referem-se ao número de nucleotídeos e aminoácidos, respectivamente.

Há dois tipos de receptores de estrogênios: receptor alfa (ER- α) e receptor beta (ER- β) (Mendelsohn *et al.* (1999) - figura 3). Como todos os receptores de hormônios esteroidais, os ERs são fatores de transcrição que alteram a expressão gênica quando ativados (Mendelsohn *et al.* 1999). Os receptores ER- α e ER- β têm uma elevada homologia no domínio de ligação ao DNA (aproximadamente 96%), uma menor

homologia na região de ligação do hormônio (aproximadamente 53%) e nenhuma homologia no domínio amino terminal. Os ERs são ativados por ligantes e também por fatores de crescimento (Power *et al.* 1991). Os receptores de estrogênios se distribuem diferentemente nos tecidos do organismo (figura 4). O ER- β predomina nos rins, mucosa intestinal, pulmão, medula óssea, ossos, cérebro, células endoteliais e próstata. Em contraste, endométrio, células de câncer de mama e estroma ovariano contêm principalmente ER- α (Gruber *et al.*, 2002). O efeito protetor dos estrogênios, após agressão vascular, foi inalterado em camundongos “knockout” para ER- α (Iafrati *et al.* 1997), demonstrando que este receptor não é essencial para este efeito. Fêmeas de camundongo nas quais o gene para ER- β foi eliminado, tornaram-se inférteis. Em contraste, camundongos machos com este mesmo defeito apresentaram hiperplasia prostática e menor acúmulo de gordura abdominal, mas continuaram férteis (Krege *et al.* 1998).

A ativação de ERs no fígado aumenta a expressão de receptores para lipoproteínas resultando em diminuição das concentrações séricas de LDL (Paganini-Hill *et al.* 1996). Os estrogênios reduzem o LDL-colesterol e aumentam o HDL-colesterol (Kannel *et al.*, 1976). Estrogênios aumentam o fluxo de colesterol da dieta para o fígado através do transporte via quilomícrons e captação hepática dos remanescentes de quilomícrons. Subsequentemente, o colesterol é transportado para as células do tecido periférico através da VLDL e LDL, retornando, posteriormente, para o fígado, através do transporte reverso de colesterol via HDL e finalmente é excretado na bile. Sob a influência dos estrogênios ocorrem os seguintes eventos: os triglicerídeos plasmáticos aumentam devido ao aumento da produção de VLDL; a concentração de LDL é reduzida devido ao aumento da expressão do receptor da LDL e a HDL é aumentada devido à maior secreção de apolipoproteína A-1 e menor remoção de

lipídeos da HDL devido à redução da atividade da lipase hepática (revisado por Zhu *et al.*, 1999) (Figura 5).

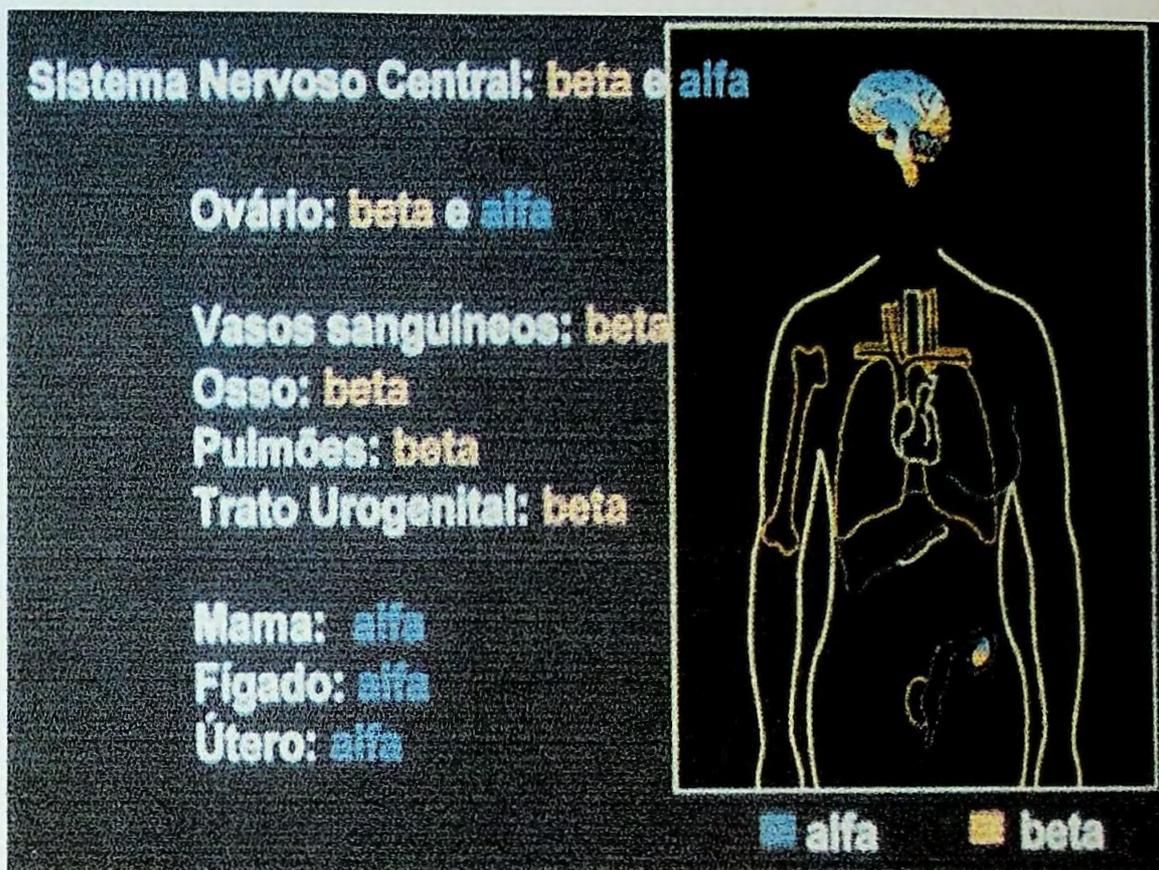


Figura 4 – Localização predominante dos receptores de estrogênio em diversos órgãos.

Entretanto, estas mudanças no perfil lipídico parecem contribuir para cerca de 25% do efeito protetor dos estrogênios na pré-menopausa (Stampfer *et al.*, 1991, (Mendelsohn *et al.* 1994). Outros mecanismos potenciais incluem a proteção contra a oxidação da LDL (Sack *et al.*, 1994), diminuição da lipoproteína (a), potencialização da fibrinólise (Koh *et al.*, 1997) e aumento da sensibilidade à insulina. Nas artérias, o estrogênio melhora a função vasodilatadora, diminui a calcificação e a secreção de

moléculas de adesão celular (E-seletina, ICAM-1 e VCAM-1) (Koh *et al.*, 1999) e a formação de lesões ateroscleróticas.

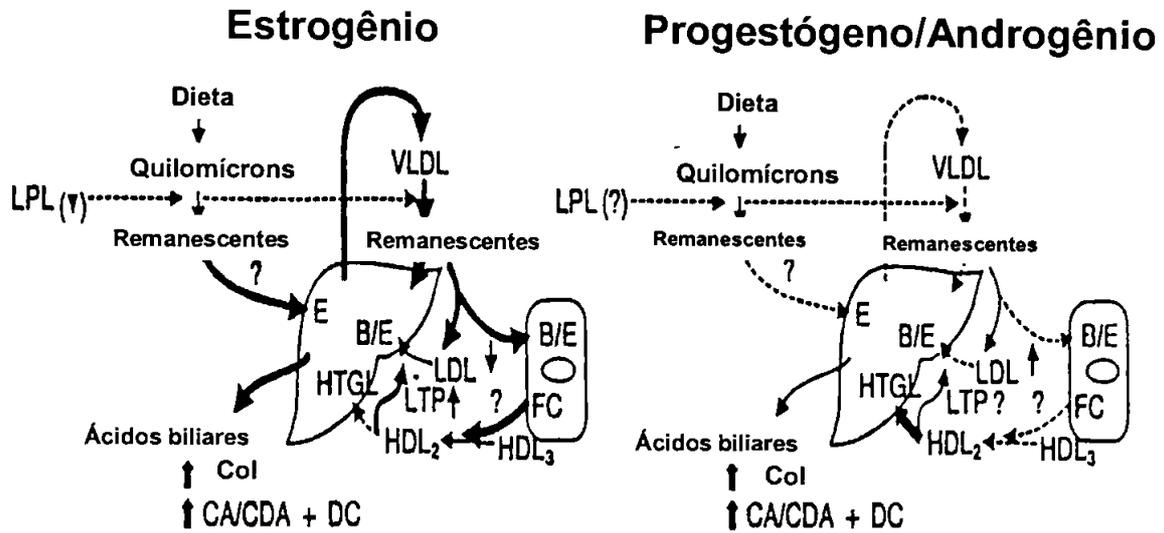


Figura 5 (Zhu *et al.*, 1999) - Efeitos dos estrogênios e estrogênios/progestógenos no transporte de lipoproteínas. A linha larga na ilustração da esquerda representa um aumento do fluxo de colesterol do intestino para o fígado e então do fígado para os tecidos periféricos e posteriormente de volta para o fígado. Todos os passos são aumentados pelo efeito do estrogênio. Estes efeitos incluem a secreção aumentada de VLDL pelo fígado, aumentada remoção de remanescentes de VLDL pelo receptor da LDL hiper-regulado e aumentada remoção de LDL também pelo receptor de LDL. A concentração de HDL é aumentada devido a um aumento da produção de apo A-1 e a redução de lipase hepática (HTGL), que conduz o HDL-colesterol do fígado de volta para a LDL, facilitada pela proteína transportadora de ésteres de colesterol (LTP). À direita é mostrado o efeito das progesteronas adicionadas a um estrogênio, que inibe todos os passos hiper-regulados pelo estrogênio.

Vários estudos têm mostrado a ação antioxidante dos estrogênios. A adição de estrogênios a um sistema de oxidação da LDL, induzida por Cu^{++} ou por células, mostrou um aumento da *lag phase* de oxidação da LDL (Zhu *et al.*, 2000). Adicionalmente, diversos trabalhos têm demonstrado o efeito dos estrogênios

administrados *in vivo* sobre a oxidação da LDL humana (Brussard *et al.*, 1997; McManus *et al.*, 1997; McKinney *et al.*, 1997).

A vasculatura é reconhecida como um importante alvo da ação dos estrogênios. Ações diretas sobre a parede arterial contribuem potencialmente para o efeito protetor cardiovascular dos estrogênios (Farhat *et al.* 1996; Mendelsohn & Karas 1994). A administração de estrogênios por períodos prolongados inibe a deposição arterial de colesterol e o espessamento da íntima em macacos e em coelhos alimentados com dieta aterogênica (Adams *et al.*, 1990). Os efeitos hemodinâmicos podem ser mediados, em parte, pela atividade dos estrogênios sobre a síntese de óxido nítrico endotelial (Hishikawa *et al.*, 1995). O 17 β -estradiol pode agir na óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), modulando o sistema Ca^{+2} /calmodulina (Hayashi *et al.*, 1997).

Os estrogênios podem agir na prevenção da aterosclerose por efeitos diretos e indiretos sobre o sistema cardiovascular (figura 6). As ações diretas dos estrogênios incluem efeitos não genômicos rápidos e efeitos a longo prazo, que envolvem mudanças na expressão gênica. Estima-se que os efeitos diretos dos estrogênios sobre a vasculatura representem a maioria das suas ações cardioprotetoras (Shibata *et al.* 1997). A vasodilatação induzida pelos estrogênios ocorre entre 5 a 20 minutos após a sua administração e não depende de mudanças na expressão gênica da eNOS, sendo esta ação dos estrogênios referida como “não genômica”. A inibição da resposta à agressão vascular e o efeito preventivo contra a aterosclerose ocorre após um período de horas ou dias após o tratamento e são dependentes de mudanças na expressão de genes no tecido vascular; portanto, essas ações são referidas como “genômicas”. (Mendelsohn 2002) Células endoteliais e do músculo liso vascular ligam-se aos estrogênios com elevada afinidade e o receptor alfa tem sido identificado em ambos os tipos de células vasculares em homens e mulheres. A expressão de ER- α e ER- β em diferentes leitos vasculares

ainda não foi bem caracterizada. Em um estudo com mulheres pré-menopausa, encontrou-se menor número de receptores alfa em mulheres com doença coronária aterosclerótica, em comparação àquelas com artérias normais, indicando a importância deste receptor para a ação protetora dos estrogênios (Farhat *et al.* 1996; Losordo *et al.* 1994). Porém, ambos os receptores são encontrados em células vasculares (Karas *et al.* 1999).

Em células endoteliais, ER- α tem sido associado às cavéolas (Mendelsohn, 2002). A ação rápida dos estrogênios em induzir vasodilatação não requer mudança na expressão gênica, mas envolve proteínas que interagem com o receptor, tais como proteína de choque térmico 90 (HSP90), que também se liga e ativa a eNOS. Concentrações fisiológicas de estrogênios estimulam rapidamente canais de potássio ativados por cálcio, podendo este efeito também contribuir para o relaxamento do músculo liso vascular (figura 7). Alguns dos efeitos cardioprotetores dos estrogênios envolvem mudanças na expressão de genes, mediadas pelos receptores alfa e beta, e incluem aumento da expressão de genes para enzimas vasodilatadoras, tais como prostaciclina sintase e eNOS (Mendelsohn, 2002). Estrogênios também aceleram o crescimento e a reposição de células endoteliais em resposta à lesão vascular (Mendelsohn & Karas 1999). A maioria dos efeitos vasculares indiretos dependentes da expressão hepática de genes específicos, tais como genes das apolipoproteínas, dos fatores de coagulação e enzimas fibrinolíticas, são mediados pelos receptores de estrogênios (Mendelsohn, 2002).

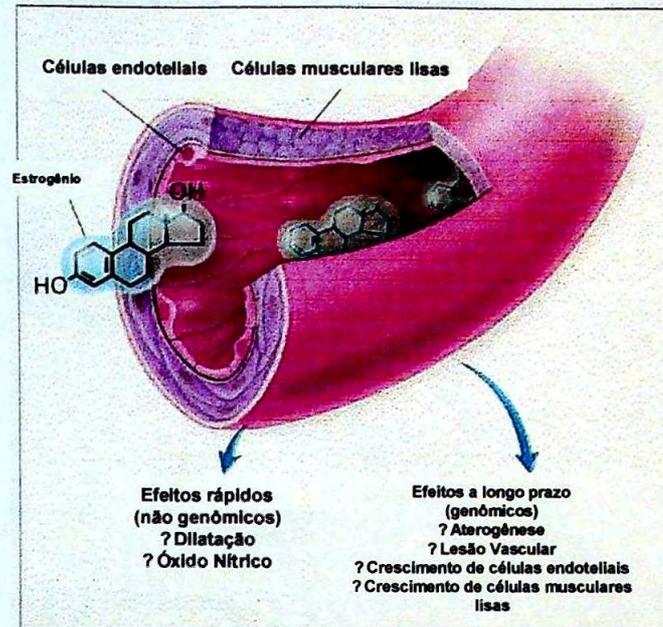


Figura 6 – (Mendelsohn & Karas 1999) Efeitos Diretos do Estrogênio sobre vasos sanguíneos. Células endoteliais e musculares lisas expressam os dois receptores de estrogênio. Estrogênios têm efeitos vasodilatadores rápidos e ações a longo prazo que inibem a resposta a agressão vascular e previnem a aterosclerose. Esses efeitos são mediados por ações sobre as células vasculares endoteliais (vermelho) e musculares lisas (roxo). Os efeitos rápidos do estrogênio sobre a parede do vaso arterial ocorrem sem qualquer mudança na expressão gênica (efeitos não genômicos), enquanto os efeitos a longo prazo envolvem mudanças na expressão gênica (efeitos genômicos) mediadas por receptores de estrogênio, que são fatores de transcrição ativados por ligantes.

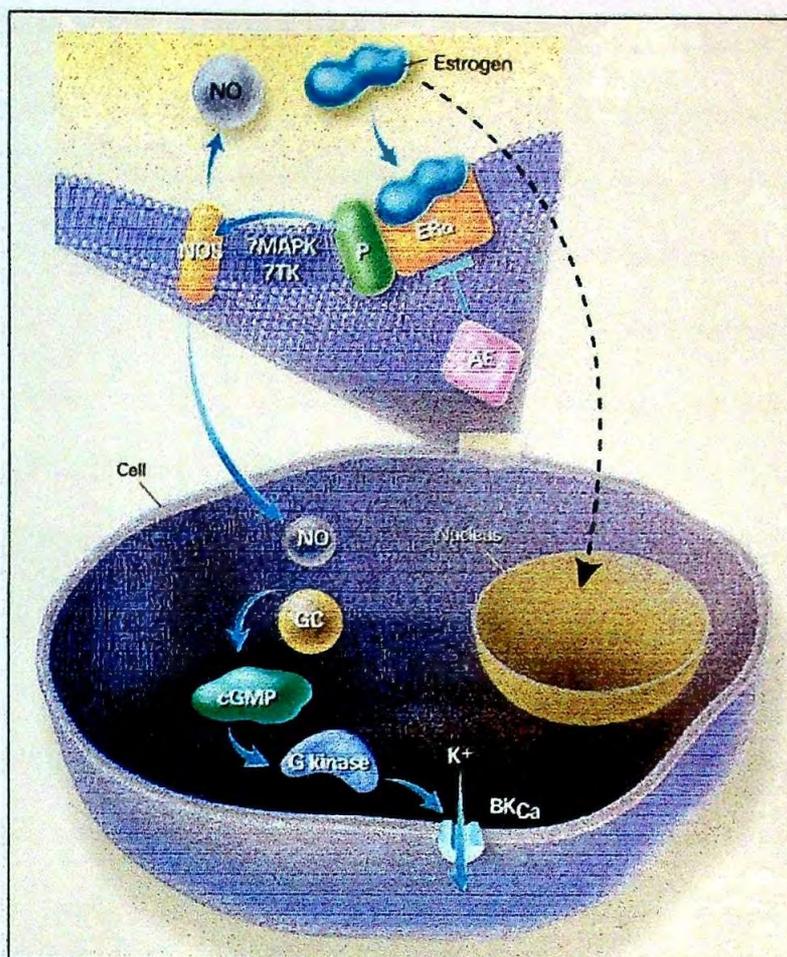


Figura 7 – (Mendelsohn & Karas 1999) Mecanismo de ativação rápida não genômica da eNOS por Estrogênio em células vasculares endoteliais e musculares lisas. Estrogênio causa ativação rápida da NOS de uma maneira que não requer transcrição gênica. Em células endoteliais (porção superior da figura), isso ocorre por uma ação do receptor alfa, é bloqueado por antiestrogênicos (AE), e requer uma classe de proteínas associadas ao receptor (P) distinta daquelas que agem com os receptores para mediar mudanças na transcrição. O resultado é uma ativação rápida da eNOS, talvez através das vias de transdução de sinal envolvendo tirosina kinase (TK) ou a proteína kinase mitógeno ativada (MAPK). Na célula muscular lisa (porção inferior da figura), estrogênio rapidamente ativa canais de potássio dependentes de cálcio (BK_{Ca}), que hiperpolariza e relaxa as células do músculo liso vascular. A ativação de BK_{Ca} no músculo liso vascular ocorre por uma via que depende de óxido nítrico (NO) e guanosina monofosfato cíclico (cGMP). GC denota guanilato ciclase, e G kinase, proteína kinase cGMP-dependente.

Há fortes evidências de que os estrogênios são importantes para a cardioproteção na pré-menopausa. Desde a última metade do século passado, as pesquisas sugeriram que a reposição dos estrogênios na menopausa poderia prevenir muitas manifestações do envelhecimento, incluindo doenças cardiovasculares, osteoporose e o declínio das funções cognitivas e sexual. Estudos observacionais mostraram menor incidência de doença cardíaca e melhoria no perfil lipídico, em mulheres pós-menopausa que recebiam estrogênios (Barrett-Connor *et al.* 1998). Mas estas observações não foram suportadas por estudos prospectivos e randomizados.

Em 1998, o “Estrogen/progestin Replacement Study” (HERS) surpreendeu quando encontrou um aumento de eventos cardiovasculares, durante o primeiro ano de terapia de reposição hormonal, e nenhum benefício cardiovascular com um acompanhamento mais prolongado (média de 4,1 anos), quando o tratamento com estrogênio/progestógeno foi comparado com placebo (Hulley *et al.* 1998). Este estudo também mostrou que a associação estrogênio/progestógeno causou aumento da incidência de tromboembolismo venoso comparado ao placebo.

Quatro anos depois, o “Women’s Health Initiative” (WHI) foi interrompido precocemente (média de 5,2 anos). A associação estrogênio/progestógeno causou aumento do risco de eventos coronarianos, acidente vascular cerebral, câncer de mama e embolismo pulmonar, além de um aumento de duas vezes na demência entre mulheres com mais de 65 anos (Rossouw *et al.* 2002). Um outro segmento deste estudo, que utilizou estrogênio isolado em mulheres histerectomizadas teve continuidade até fevereiro de 2004 (Anderson *et al.* 2004). Este segmento verificou aumento no risco de acidente vascular cerebral, diminuição do risco de fraturas de bacia, sem alteração da incidência de doença cardiovascular, após acompanhamento das pacientes por 6,8 anos. Um outro estudo denominado ERA (Estrogen Replacement and Atherosclerosis,

Herrington *et al.* 2000), envolveu pacientes com estenose coronária e mostrou que, após 3,2 anos, a terapia de reposição hormonal não preveniu a progressão da aterosclerose. Estes 3 estudos utilizaram estrogênios conjugados eqüinos (ECE) por via oral combinados com acetato de medroxiprogesterona (AMP) nas doses de 0,625 e 2,5 mg/dia.

Os progestógenos são usados juntamente com os estrogênios na reposição hormonal pós-menopausa para balancear o efeito proliferativo dos estrogênios sobre o endométrio. Portanto, para mulheres com útero se utiliza a associação de estrógeno com um progestágeno e para mulheres que não mais possuem útero se utiliza o estrógeno isolado. Entretanto, alguns progestógenos têm demonstrado atenuar os possíveis benefícios cardiovasculares do estrogênio. Progestógenos parecem reduzir o efeito estimulatório do estrogênio sobre o transporte das lipoproteínas na circulação sanguínea. Especificamente, os progestógenos reduziram a secreção hepática de VLDL e a remoção dos remanescentes pelo fígado, assim como, a atividade do receptor da LDL, que está associada ao aumento do colesterol da LDL. Adicionalmente, os progestógenos promoveriam redução da HDL, associada com um aumento da atividade da lipase hepática (revisado por Zhu *et al.*, 1999). Efeitos anti-estrogênicos dos progestógenos também têm sido relacionados ao aumento das concentrações plasmáticas de glicose, insulina e fibrinogênio (revisado por Zhu *et al.*, 1999) (Figura 5).

Vários estudos não indicaram nenhum efeito adverso da progesterona natural em primatas (Adams *et al.*, 1990), ou de progestógenos sintéticos em coelhos alimentados com colesterol (Haarbo *et al.*, 1992; Haarbo *et al.*, 1991). Porém, vários outros estudos mostram efeitos antiestrogênicos dos progestógenos naturais ou sintéticos (Hanke *et al.*, 1996; Adams *et al.*, 1997; Adams *et al.*, 1987). Imthurn *et al.* (1997) encontraram que progestógenos anulam o efeito dos estrogênios em aumentar a formação de óxidos de

nitrogênio no plasma. Esta observação é importante, pois sugere que os progestógenos poderiam anular o possível efeito dos estrogênios sobre a formação e/ou a biodisponibilidade do *NO . Outros estudos ainda verificaram que os progestógenos podem inibir o efeito antioxidante dos estrogênios (Zhu *et al.*, 2000; McManus *et al.*, 1997).

O efeito da associação de progestógenos e estrogênios sobre a reatividade vascular também é controverso. O uso de estrogênios melhora significativamente a reatividade vascular periférica em mulheres pós-menopausa (Al-Khalili *et al.*, 1998, Williams *et al.*, 1998). Acs *et al.* (2000) verificaram que o uso de medroxiprogesterona não influencia as propriedades contráteis de pequenas artérias em ratas castradas. A associação de medroxiprogesterona com estradiol não afetou a vasodilatação induzida pelo estrogênio. Em contraste, Williams *et al.* (1998) verificaram, em estudo com macacas ooforectomizadas, que a adição de acetato de medroxiprogesterona diminuiu o efeito benéfico do estrogênio em relação à resposta vasodilatadora à acetilcolina.

A manutenção dos efeitos cardioprotetores dos estrogênios pode ser dependente do tipo de progestógeno, da via e do método de administração. De acordo com a atividade androgênica os progestógenos classificam-se em derivados da 19-nortestosterona (maior atividade) e os derivados da 17-hidroxiprogesterona (menor atividade). Os derivados da 19-nortestosterona opõem-se aos efeitos do estrogênio sobre o metabolismo lipídico, os derivados da 17-hidroxiprogesterona, por sua vez, exercem nenhum ou mínimos efeitos sobre as lipoproteínas (Sacks & Walsh, 1994). Numerosos estudos em modelos experimentais têm demonstrado que certos progestógenos, tais como a progesterona micronizada, podem ser administrados juntamente com a terapia de reposição de estrogênios promovendo proteção contra a hiperplasia endometrial, sem afetar significativamente os efeitos benéficos dos estrogênios no perfil lipídico,

aterosclerose e a reatividade vascular (Wagner, 2000). Porém, a associação de estrogênios com progestógenos na terapia de reposição hormonal ainda merece mais estudos para verificar os seus efeitos sobre a reatividade vascular e a geração de óxido nítrico, assim como, em relação à oxidação e nitração de lipoproteínas.

Os estudos HERS (Hulley *et al.*, 1998), ERA (Herrington *et al.*, 2000) e WHI (Rossouw *et al.* 2002) sugerem que a terapia de reposição hormonal não tem ação cardioprotetora, em mulheres pós-menopausa, podendo aumentar o risco de tromboembolismo e eventos cardiovasculares. Esse efeito inesperado pode ter sido devido a mutações em fatores trombogênicos em um subgrupo de mulheres (Glueck *et al.*, 2001, Psaty *et al.*, 2001). Estes estudos utilizaram estrogênios conjugados equinos (ECE) por via oral combinados com acetato de medroxiprogesterona (AMP) nas doses de 0,625 e 2,5 mg/dia. Estes resultados não podem ser extrapolados a outros esquemas terapêuticos e outras vias de administração. Os estudos HERS e ERA foram avaliados ao nível de prevenção secundária de eventos cardíacos e a média de idade para início de terapia de reposição hormonal foi muito alta (67 e 65,8 anos, respectivamente) e também tem sido questionado o uso contínuo de AMP. O WHI foi o primeiro estudo randomizado, controlado por placebo, com o objetivo de avaliar a prevenção primária da DAC. O aumento do risco de doença tromboembólica observada durante a terapia de reposição hormonal é principalmente causado por mudanças induzidas pelo estrogênio em fatores da hemostase que são produzidos no fígado (Scarabin *et al.* 2003). Assim, o efeito cardioprotetor dos estrogênios ainda requer estudos adicionais.

Com estes resultados recentes e impactantes, a terapia de reposição hormonal tem sido usada com mais cautela não devendo ser recomendada para prevenção de doenças cardiovasculares na mulher pós-menopausa (Ylikorkala, 2004).

1.4. Fitoestrogênios – uma alternativa de reposição hormonal em mulheres pós-menopausa ?

Pelo fato da exposição aos estrogênios induzir proliferação endometrial, aumentar o risco de câncer de mama e, mais recentemente verificado, aumentar o risco de eventos cardíacos agudos, acidente vascular cerebral e tromboembolismo venoso, têm-se pesquisado alternativas para a terapia de reposição hormonal.

Fitoestrogênios são compostos fenólicos de origem vegetal, que possuem similaridade estrutural com os estrogênios e que, portanto, são capazes de se ligar a receptores de estrogênios. Os principais fitoestrogênios são as isoflavonas, lignanas, lactonas do ácido resorcílico e coumestanas, presentes principalmente em vegetais como soja (*Glycine max*), trevo vermelho (*Trifolium pratense*), alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra*), “black cohosh” (*Cimicifuga racemosa*), dentre outras (Piersen, 2003). No Brasil, uma fonte importante é a soja que contém as isoflavonas genisteína, daidzeína e gliciteína e seus glicosídeos. Isoflavonas são encontradas na soja e no trevo vermelho. Chá verde e várias leguminosas contêm principalmente lignanas que geram enterolactona e enterodiol por ação da flora bacteriana intestinal. (Piersen, 2003)

A descrição de um novo receptor estrogênico, ER- β (Kuiper *et al.*, 1996), tem possibilitado a compreensão de efeitos seletivos de substâncias estruturalmente relacionadas aos estrogênios. As isoflavonas genisteína, daidzeína e gliciteína (figura 8) derivadas da soja, se ligam aos receptores estrogênicos, provavelmente por suas similaridades estruturais com estrogênios (figura 9). De acordo com Kuiper *et al.* (1998), a afinidade da genisteína ao ER- β é aproximadamente 20 vezes maior que ao ER- α . Comparado com o estradiol, a afinidade de ligação da genisteína e daidzeína ao ER- α foi de 4 e 0,1%, respectivamente, e para o ER- β foi de 87 e 0,5% (Kuiper *et al.*,

1998). Algumas evidências experimentais, obtidas em modelos animais, sugerem que os fitoestrogênios podem agir como agonistas sob circunstâncias de depleção de estrogênios, mas exercem atividade antagonista sob circunstâncias de excesso de estrogênios (Messina *et al.*, 1994). Assim, o efeito das isoflavonas como fitoestrogênios pode depender tanto da “estrogenicidade do meio” quanto da expressão dos subtipos de receptores estrogênicos.

O raloxifeno, um modulador seletivo dos receptores de estrogênio (SERM), parece exercer efeitos agonistas estrogênicos em ossos e sistema cardiovascular, embora exerça efeitos antagonistas nos tecidos endometrial e mamário (Kauffmann *et al.*, 1995; Hol *et al.*, 1997) (Tabela 1). Os fitoestrogênios parecem ter propriedades semelhantes ao raloxifeno, sugerindo que poderiam agir como agonistas em ossos e tecido vascular (Honoré *et al.*, 1997; Nestel *et al.*, 1997). Há resultados conflitantes com respeito aos seus efeitos sobre o tecido mamário; alguns estudos têm sugerido efeitos agonistas e outros, antagonistas (Wang *et al.*, 1996; Adlercreutz, 1995). Um estudo recente, utilizando macacas pós-menopausa, verificou que 6 meses de terapia com isoflavonas não induziu proliferação, ou qualquer outra mudança de importância clínica, no endométrio e no tecido mamário (Foth *et al.*, 2000).

As isoflavonas são consideradas substâncias potencialmente antioxidantes (Ruiz-Larrea *et al.*, 1997), inibidoras de crescimento tumoral (Wei *et al.*, 1993) e da agregação plaquetária (Furman *et al.*, 1994). O potencial biológico das isoflavonas varia com a estrutura química; em especial, a presença de grupos hidroxila ligados aos anéis fenólicos aumentam a atividade antioxidante. A seqüência de eficácia antioxidante é a seguinte: genisteína > genistina > biocanina A > daidzeína (Ruiz-Larrea *et al.*, 1997).

Tabela 1 - Comparação entre os efeitos do 17 β -Estradiol, Raloxifeno e Isoflavonas

(Adaptada de Tikkanen *et al.*, 2000)

Órgão alvo	17 β -Estradiol	Raloxifeno	Isoflavonas
Útero	Agonista	Antagonista	Não tem efeito
Mama	Agonista	Antagonista	Agonista/Antagonista
Ossos	Agonista	Agonista	Agonista
Vasculatura	Agonista	Agonista	Agonista

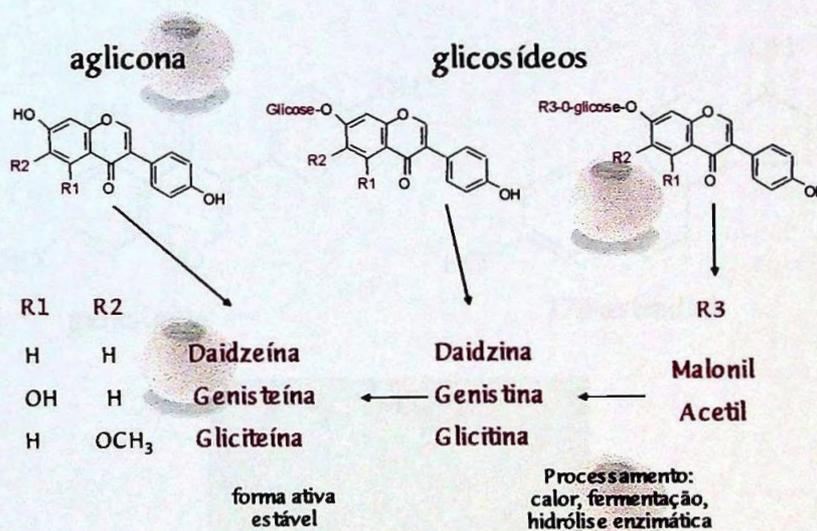


Figura 8 – Estrutura química das principais isoflavonas da soja e o efeito do processamento sobre a estrutura.

As isoflavonas da soja aumentam a resposta vasodilatadora à acetilcolina em artérias ateroscleróticas de macacas (Honoré *et al.*, 1997). A proteína isolada da soja, contendo isoflavonas, tem demonstrado um efeito na diminuição da pressão diastólica sanguínea em mulheres. Em um estudo que utilizou 51 mulheres na perimenopausa, 20

g de proteína isolada da soja (contendo 34 mg de isoflavonas) reduziu a pressão diastólica em 5 mm Hg (Washburn *et al.*, 1999). Em um outro estudo (Crouse *et al.*, 1999), no qual homens e mulheres moderadamente hipercolesterolêmicos foram suplementados com 25 g de caseína ou de proteína isolada da soja com diferentes concentrações de isoflavonas (3 a 62 mg de isoflavonas por 25 g de proteína), houve uma tendência para diminuição da pressão diastólica com o aumento da dose de isoflavonas, nas mulheres. Nenhum efeito foi observado em homens. Um outro resultado deste estudo foi que houve um efeito dose-dependente na redução das lipoproteínas plasmáticas.

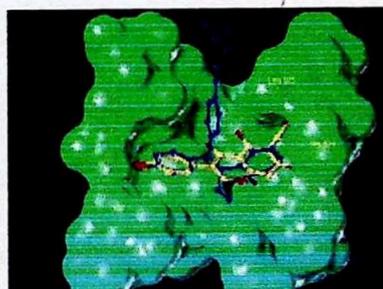
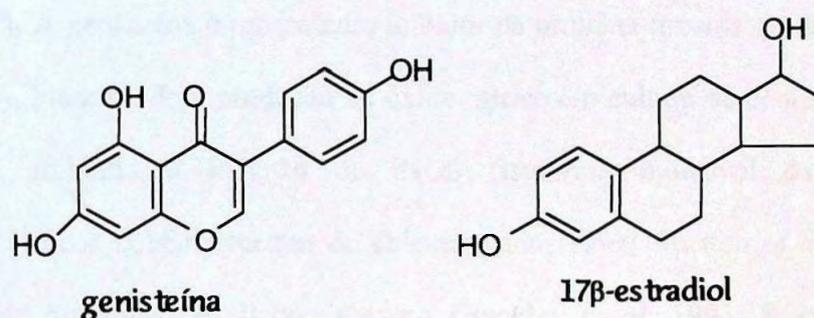


Figura 9 – Semelhança estrutural entre genisteína e 17 β-estradiol e interação de genisteína (amarelo) com o ERβ (Kuiper, 1998)

Uma outra importante ação das isoflavonas sobre as doenças cardiovasculares é a inibição da agregação plaquetária. Williams e Clarkson (1998) verificaram uma maior redução do fluxo sanguíneo após ativação das plaquetas induzida por colágeno, em

primatas fêmeas não-humanas que consumiram proteína da soja sem isoflavonas, comparadas àquelas que consumiram proteína da soja contendo isoflavonas. Quando plaquetas são ativadas, ocorre a liberação de substâncias vasoativas, incluindo serotonina que é um potente vasoconstritor. As isoflavonas inibem a agregação e ativação plaquetária e reduzem a liberação de serotonina das plaquetas, contribuindo assim para a redução do vasospasmo e da trombose.

Os efeitos das isoflavonas sobre a vasodilatação e a formação de óxido nítrico são controversos. Estudos *in vitro* têm demonstrado que a inibição das vias de transdução de sinal, associadas às proteína tirosina quinases, modifica a atividade da enzima óxido nítrico sintase e, conseqüentemente, a síntese de óxido nítrico (Redegeld *et al.*, 1997). A genisteína é um potente inibidor da proteína tirosina quinase (Sargeant *et al.*, 1993), bloqueando a produção de óxido nítrico em cultura de células (Orlicek *et al.*, 1996), inibindo a indução de iNOS (isoforma induzível da NOS) por lipopolissacarídeos (LPS) (Ruetten & Thiemermann, 1997; Ruetten *et al.*, 1999) e a expressão de proteínas de choque térmico (Buckley *et al.*, 1993; Kiang, 2003). A genisteína inibe o efeito estimulador da LDL oxidada sobre a fosforilação de tirosina em células endoteliais aórticas de coelhos (Fries *et al.*, 1995) e a fosforilação de algumas proteínas (Kapiotis *et al.*, 1997). A genisteína, mas não a daidzeína, preveniu a falência circulatória, a disfunção múltipla de órgãos, causada por endotoxina, em ratos e a indução de iNOS e cicloxigenase-2 (Ruetten & Thiermann, 1997). A biocanina A também parece inibir a NOS e a produção de óxido nítrico (Hsu *et al.* 2000). Portanto, é possível que a administração de isoflavonas, *in vivo*, possa modular a síntese de óxido nítrico.

As isoflavonas podem retardar o desenvolvimento da formação da placa aterosclerótica por inibir a adesão celular e alterar a atividade de fatores de crescimento,

como o fator de crescimento derivado de plaquetas, e citocinas que influenciam a formação da lesão aterosclerótica. Estes efeitos são mediados pela inibição da tirosina quinase (Raines *et al.*, 1995). Estudos recentes, realizados em nosso laboratório, mostram que a ingestão de isoflavonas da soja pode reduzir a expressão de proteínas de choque térmico (HSP60, HSP70 e HSC70) e conseqüentemente a presença de autoanticorpos anti-HSP no soro e na aorta de coelhos alimentados com uma dieta aterogênica, reduzindo assim a reação autoimune, a inflamação e a formação de lesões ateroscleróticas (Pereira, 2000).

As isoflavonas genisteína, daidzeína e gliciteína podem ser encontradas na natureza e em produtos processados de soja nas formas glicosiladas (genistina, daidzina e glicitina, figura 8) e complexadas aos resíduos malonil e acetil. Embora a maioria das isoflavonas presentes na soja e seus produtos esteja na forma glicosídica, estas não são detectadas no plasma porque os glicosídeos são clivados por β -glicosidases produzidas por bactérias da flora intestinal, tais como, *Lactobacilli*, *Bacteróides* e *Bifidobactéria* (Xu *et al.*, 1995; Friend *et al.* 1984), resultando em suas agliconas. Day *et al.* (1998) mostraram que homogenatos de células do intestino delgado humano são capazes de hidrolisar os glicosídeos das isoflavonas, através das β -glicosidases citosólicas. Este processo é importante porque as agliconas das isoflavonas são mais absorvidas que as suas formas conjugadas (King *et al.*, 1996 e Hutchins *et al.*, 1995). No intestino, também ocorre a formação de metabólitos específicos pelas bactérias intestinais. Assim, a genisteína pode ser convertida a p-etilfenol e 6-hidroxi-O-desmetilangesina (6-OH-O-DMA) e a daidzeína pode ser convertida ao equol e O-desmetilangesina (O-DMA) (Kelly *et al.*, 1993). As agliconas e alguns metabólitos bacterianos são absorvidos no trato gastrointestinal, sendo conjugados no fígado com ácido glicurônico e sulfato (Griffiths & Barrow, 1972). Esses conjugados, posteriormente, sofrem recirculação

entero-hepática (Joannou *et al.*, 1995). A biodisponibilidade das isoflavonas é maior em produtos de soja contendo gordura e proteína e a secreção biliar parece ser importante para a absorção das isoflavonas (Walsh *et al.* 2003). Os metabólitos das isoflavonas têm propriedades diferentes dos seus compostos precursores. O equol tem efeito estrogênico três vezes maior que a daidzeína em células de tumor endometrial (Markiewicz *et al.*, 1993). Estudos *ex vivo* têm demonstrado que o equol também é um antioxidante mais potente que a daidzeína (Arora *et al.*, 1998; Wiseman *et al.*, 1998). A excreção urinária elevada de equol tem sido associada à diminuição do risco de câncer de mama (Ingram *et al.*, 1997).

A gliciteína é uma isoflavona pouco estudada, comparada à genisteína e daidzeína, por ser pouco abundante na maioria dos produtos de soja (5 a 10% do total de isoflavonas (Song *et al.* 1999). Porém no gérmen de soja a sua concentração é significativa (até 40%, Song *et al.*, 1999), sendo maior até que a da genisteína. A gliciteína é uma isoflavona metoxilada. As bactérias intestinais *Acetobacterium woodii* (Bache *et al.*, 1981) e *Eubacterium limosum* (Eggerth *et al.*, 1935) são capazes de metabolizar compostos aromáticos metoxilados. A O-demetilação de isoflavonóides metoxilados aumenta sua atividade biológica antioxidante e estrogênica (Hur *et al.*, 2000). O produto da O-demetilação da gliciteína é a 6,7,4'-trihidroxi-isoflavona (Hur *et al.*, 2000). Poucos estudos avaliaram a atividade estrogênica da gliciteína (Song *et al.*, 1999, Kinjo *et al.* 2004). Song *et al.* encontraram que o uso de gliciteína em ratas aumentou o peso uterino em 150% enquanto genisteína em 50%, mas a afinidade de ligação da gliciteína ao ER foi menor que da genisteína *in vitro*. Já Kinjo *et al.* encontraram uma fraca atividade estrogênica da gliciteína em diferentes ensaios, mas uma maior atividade em alguns de seus metabólitos. São necessários mais estudos avaliando as propriedades desta isoflavona.

Todos esses estudos sugerem que as isoflavonas poderiam representar uma boa alternativa para a terapia de reposição hormonal em mulheres pós-menopausa. Entretanto, extrapolações de dados obtidos em cultura de células e em experimentos com animais são questionáveis. O papel dos fitoestrogênios como agonistas e antagonistas dos estrogênios sintéticos e naturais necessita ser investigado em um maior número de estudos em humanos.

Portanto, com o objetivo de contribuir para a elucidação dos efeitos dos fitoestrogênios em mulheres pós-menopausa hipercolesterolêmicas, nos propomos estudar o efeito das isoflavonas da soja sobre os a formação dos produtos derivados do óxido nítrico, da oxidação do colesterol, da LDL, dos anticorpos anti-proteínas de choque térmico e sobre a reatividade vascular em mulheres pós-menopausa hipercolesterolêmicas com hipertensão arterial e compará-los aos efeitos da terapia de reposição hormonal com 17- β estradiol isolado ou associado com acetato de noretisterona. Devido ao alto teor de isoflavonas no gérmen da soja, utilizou-se essa parte do grão como fonte de fitoestrogênios. O gérmen da soja contém aproximadamente 11,2 mg/g de daidzeína e 3 mg/g de genisteína e 9 mg/g de gliciteína , em comparação à farinha de soja que contém 1,7 mg/g de daidzeína, 1,6 mg/g de genisteína e 0,1 mg/g de gliciteína (Murphy *et al.*, 2002). Portanto, o gérmen de soja foi escolhido por ser uma fonte natural e rica de isoflavonas que não passa por nenhum processo de extração e está associado a proteína da soja, sendo mais biodisponível que os extratos de isoflavonas encontrados comercialmente.

OBJETIVOS

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

2. OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi verificar o efeito dos fitoestrogênios da soja, do 17- β estradiol e da sua associação com acetato de noretisterona sobre a formação de produtos derivados do óxido nítrico, oxidação de lipoproteínas, formação de anticorpos anti-proteínas de choque térmico e reatividade vascular em mulheres pós-menopausa hipercolesterolêmicas com hipertensão arterial e comparar os resultados das terapias propostas.

2.1. Objetivos Específicos

Determinar o efeito dos fitoestrogênios da soja, do 17- β estradiol e da sua associação com acetato de noretisterona sobre:

- a) As concentrações de colesterol plasmático total, LDL-colesterol e HDL-colesterol e triglicerídeos no plasma;
- b) As concentrações plasmáticas de apoA1 e apoB.
- c) A formação de óxido nítrico, através da determinação de nitrito + nitrato (NOx) e S-nitrosotióis no plasma;
- d) A formação de nitrotirosina no plasma;
- e) A concentrações de tióis (metionina, glutatona, cisteína, homocisteína)
- f) A formação da fração oxidada (LDL^o) da lipoproteína de baixa densidade;
- g) A formação de óxidos de colesterol no plasma;
- h) A formação de autoanticorpos anti-HSP60, HSP70 e HSC70;
- i) A concentração plasmática de isoflavonas
- j) A concentração plasmática de estradiol
- k) A reatividade vascular.

MATERIAL E MÉTODOS

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Pacientes, Medicação e Suplementação

O estudo foi submetido e aprovado nos comitês de ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia. As participantes assinaram o consentimento pós-informado no início do estudo.

Foram avaliadas e triadas no Ambulatório da Seção Médica de Dislipidemias do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia 82 mulheres pós-menopausa. Todas eram portadoras de hipertensão arterial leve a moderada, controlada com dieta hipossódica e/ou uso de medicamentos anti-hipertensivos. Apresentavam hipercolesterolemia associada ou não a hipertrigliceridemia. Todas receberam, inicialmente, orientação dietética por nutricionista com a finalidade de reduzir a colesterolemia. Para as participantes que, após período de quatro semanas de dieta regular, mantiveram as concentrações de LDL-colesterol acima de 130 mg/dl (n=70), foi introduzido placebo por quatro semanas. Após esse período permaneceram 66 mulheres com LDL-colesterol maior que 130 mg/dl.

As mulheres foram, de forma randômica, já estabelecida no início do estudo, por programa informatizado, distribuídas em 3 grupos distintos de tratamento (22 mulheres por grupo): isoflavonas (4 cápsulas de 500 mg de gérmen de soja contendo 36,6 mg de isoflavonas – grupo I), 17- β estradiol (2 mg – grupo E) e 17- β estradiol (2 mg) + acetato de noretisterona (1 mg), grupo E+P. O estudo teve duração de 12 semanas. Foram mantidas as recomendações alimentares iniciais durante todo o estudo para todas as mulheres.

No período inicial (semana 0), período de dieta (semana 4), período placebo (semana 8) e período com medicamento ativo (semanas 12, 16 e 20) as pacientes foram submetidas a avaliação de aderência ao tratamento, controles clínico (anamnese e exame físico) e dosagens de glicose, ácido úrico, creatinina, uréia, potássio, colesterol total, triglicérides, HDL-colesterol e LDL-colesterol, provas hepáticas (aspartato amino transferase (AST), alanina amino transferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), gama-glutaril transferase (γ -GT), bilirrubina total e frações), creatinoquinase (CK), hemograma e urina tipo I. Além disso, metade das pacientes de cada subgrupo, escolhidas por sorteio, foram submetidas à medição da reatividade vascular no final do período de placebo (8 semanas) e ao término do período de medicamento ativo (20 semanas).

O suplemento de isoflavonas foi fornecido pela "IsoSoy®", cápsulas de 500 mg de germen de soja contendo 7,4 mg de isoflavonas (agliconas), cada. O 17- β estradiol e o acetato de noretisterona e os placebos foram fornecidos pela "Medley®".

Composição do germen de soja:

Nutrientes	4 cápsulas (2 g)
valor calórico(Kcal)	8,0
carboidratos(g)	0,7
proteínas(g)	0,9
gorduras totais (g)	0,3
fibra alimentar(g)	0,1
cálcio(mg)	1,4
ferro(mg)	0,2
vitamina E(mg)	0,06

Protocolo do Estudo

Mulheres com menopausa natural, hipertensas e com níveis de LDL-colesterol maior que 160 mg/dL

Dieta hipogordurosa (4 semanas)

LDL-colesterol > 130 mg/dL

Placebo (4 semanas)

LDL-colesterol > 130 mg/dL

1ª Coleta de sangue (basal)

1ª Análise de Reatividade Vascular

**Isoflavonas
(60 mg)**

**17-β estradiol
(2 mg)**

**17-β estradiol
(2 mg)
+
acetato de
noretisterona
(1 mg)**

12 semanas

2ª Coleta de sangue

2ª Análise de Reatividade Vascular

3.1.1. Critérios de Inclusão

- 1- Mulheres com menopausa natural (ausência de menstruação há pelo menos um ano)
- 2- Sem distinção de raça
- 3- Idade igual ou maior a 50 anos e menor ou igual a 65 anos
- 4- Concentração de LDL-colesterol maior que 130 mg/dl e de triglicérides inferior a 400 mg/dl no período da randomização
- 5- Portadoras de hipertensão arterial leve a moderada controlada com dieta hipossódica e/ou terapia farmacológica. (pressão sistólica \leq 139 mmHg e pressão diastólica \leq 89 mmHg) ⁱ
- 6- Não fumantes ou ex-fumantes (há mais de um ano)

3.1.2. Critérios de Exclusão

Os critérios de exclusão estão relacionados com as indicações ou contra-indicações absolutas para o uso de estrogênio e progestógeno.

- 1- Pré-menopausadas.
- 2- Menopausa cirúrgica, com ou sem conservação de anexos.
- 3- Portadoras de doença aterosclerótica manifesta em qualquer território vascular.
- 4- Antecedentes de intolerância ou hipersensibilidade ao uso da terapia de reposição hormonal ou a soja e produtos de soja.

- 5- Antecedentes de reposição hormonal oral, parenteral, vaginal ou transdérmica nos três últimos meses da visita inicial ou uso de qualquer inibidor da 3-hidroxi 3-metilglutaril coenzima A redutase e/ou fibratos nas oito últimas semanas.
 - 6- História de câncer de mama ou mamografia com achado sugestivo de câncer de mama.
 - 7- Antecedente de câncer de endométrio, sangramento uterino anormal, hiperplasia endometrial.
 - 8- História de embolia pulmonar ou trombose venosa.
 - 9- Portadoras de dislipidemia secundária a diabetes melito, hipotireoidismo, hepatopatia, insuficiência renal crônica, síndrome nefrótica, icterícia obstrutiva e alcoolismo ou a medicamentos (diuréticos, betabloqueadores destituídos de atividade simpaticomimética intrínseca, corticosteróides e anabolizantes).
 - 10- Mulheres que apresentassem concentrações séricas de triglicérides maior que 400 mg/dl.
 - 11- Portadoras de hipertensão arterial não controlada. (pressão arterial sistólica \geq 140 mmHg e pressão arterial diastólica \geq 90 mmHg, em mulheres sob dieta hipossódica regular e/ou uso de terapia farmacológica).
 - 12- Consumo de álcool e/ou tabagismo.
 - 13- Elevação da ALT e/ou AST acima de 1,5 vez o limite superior da normalidade.
 - 14- Elevação da CK acima de três vezes o limite superior da normalidade.
 - 15- Pacientes que estivessem participando de outro estudo.
- Pacientes cuja aderência ao tratamento na fase de placebo (antes da randomização) tenha sido inferior a 80%.

3.1.3. Critérios de Interrupção do Estudo

Foram excluídas do estudo todas as pacientes que:

- 1- Não desejassem mais participar.
- 2- Foram hospitalizadas e, neste caso, a causa principal da internação deveria ser informada.
- 3- Apresentassem elevação das concentrações séricas de ALT e/ou AST ou da CK três ou dez vezes acima do limite superior da normalidade, respectivamente.
- 4- Manifestassem efeitos adversos graves: risco de vida ou necessidade de hospitalização.

3.2. Local De Realização Das Várias Etapas

A padronização, validação e análise das amostras foram realizadas no laboratório de Bioquímica Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, no bloco 17. A coleta das amostras foi realizada como descrito no protocolo incluso no item "Materiais e Métodos", em pacientes do Ambulatório de Lipoproteínas do Instituto Dante Pazzanese, sob supervisão do Dr. André Arpad Faludi e Dr Marcelo Chiara Bertolami. O exame de reatividade vascular foi realizado no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia pelo Dr Mohamed Saleh.

3.3. Análises Laboratoriais:

1) Coleta de Sangue

O sangue foi coletado após jejum de 12 a 15 horas em tubos seco (para a análise do perfil lipídico e anticorpos anti-HSP), contendo EDTA (para as análise de nitrotirosina, tióis, LDL-, óxidos de colesterol, isoflavonas e estradiol), contendo heparina (para as análise de NOx e S-nitrosotióis) e o plasma foi separado e armazenado em tubos contendo antioxidante (butil hidroxitolueno, BHT 20 μ M) e os inibidores de proteases aprotinina (2 μ g/ml), fenil-metil-sulfonil fluoreto, PMSF (1mM) e benzamidina (2 mM). Uma alíquota do soro colhido em tubo seco foi armazenado com glicerol (1:1) para as análises dos anticorpos. Todas as amostras foram aliquotadas e armazenadas a -70° C até as análises.

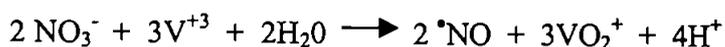
2) Determinação de Lipídeos e Apolipoproteínas

As determinações de colesterol plasmático total, HDL-colesterol e triglicerídeos, apo A1 e Apo B foram realizadas por métodos enzimáticos automatizados e LDL-colesterol foi calculada pela fórmula de Friedwald (Friedwald, 1972).

3) Determinação dos derivados de óxido nítrico (NOx) e S-nitrosotióis

A concentração de nitrato no plasma foi determinada pelo analisador de \cdot NO (NOA^{TM280}, Sievers INC., USA). O plasma foi desproteinizado previamente em etanol gelado (1:2, v/v), deixado em repouso por 30 minutos a 0 °C e centrifugado a 10.000 g

por 10 minutos. Uma alíquota de 10 uL do sobrenadante foi injetada no analisador de $\cdot\text{NO}$ (NOA^{TM280}). No NOA^{TM280}, o nitrato plasmático é reduzido a $\cdot\text{NO}$ com vanádio (III) a 90°C, e o $\cdot\text{NO}$ formado é detectado por quimiluminescência em fase gasosa, após reação com ozônio:



A intensidade da quimiluminescência é medida em mV e relacionada com uma curva de calibração com concentrações de nitrato de sódio variando de 2 a 100 uM.

A determinação de S-nitrosotióis totais foi feita de acordo com (Marley *et al.* 2000; Marley *et al.* 2001), com modificações. Alíquotas de 500 μL de plasma, previamente preparado, foram injetadas em duplicata na cela do analisador de $\cdot\text{NO}$ (NOA^{TM280}), contendo 16 mL de ácido acético glacial, 4 mL de KI 50 mg/mL, 1000 μL de decanol (agente anti-espuma) e 400 μL de CuSO_4 200 mM (esta solução foi trocada para cada 8 injeções). A curva de calibração foi feita à partir de S-nitrosoalbumina, sintetizada de acordo com Marley *et al.* 2001.

4) Determinação de Nitrotirosina

A concentração de nitrotirosina foi determinada no plasma por ELISA competitivo. As placas foram sensibilizadas com 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de albumina nitrada (ALBNO, 100 μL , concentração aproximada de nitrotirosina de 40 a 60 uM) diluída em

tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M em pH 9,4 a 37°C, *overnight*. Após lavagem com 200 µL de tampão TBS (TRIS-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4) contendo Tween 20 (0,05%), incubou-se as placas por duas horas a 37°C com 200 µL/poço de tampão TBS contendo 0,005% de tween 20 e 5 % de leite desnatado. Após nova lavagem, as placas foram incubadas com 100 µL/ poço do anticorpo policlonal anti-nitrotirosina (Upstate® biotechnology, diluído 1:1000 em TBS contendo 0,5% de leite desnatado e 0,005% de tween 20 – tampão de diluição) mais 100 uL da amostra (as amostras de plasma e a albumina nitrada utilizada na curva de calibração foram diluídas 1:4 em tampão de diluição) por duas horas a 37°C. As placas foram novamente lavadas e incubadas com 100 µL/poço do conjugado (IgG anti-coelho produzido em camundongo conjugado com peroxidase, Stressgen Biotechnologies Corp., diluído 1:2000 em TBS tampão de diluição) por 1 hora, a 37°C. Após lavagem, adicionou-se 100µL/poço de uma solução de isoluminol (2,3 mM) e p-iodofenol (0,9 mM) em tampão tris-HCl pH 8,5 contendo 0,25 uL/mL de H₂O₂ 30% (adicionado antes do uso). A leitura da quimiluminescência produzida foi realizada imediatamente, utilizando-se uma leitora de placas de ELISA para quimiluminescência (LumiCount, Packard, Meriden, USA). A concentração de nitrotirosina nas amostras foi estimada pela curva de calibração realizada com a nitroalbumina e expressa como equivalentes de nitro-ALB. As amostras e a curva de calibração foram realizadas em triplicata.

5) Determinação de Tióis

Os tióis foram determinados pela técnica de eletroforese capilar acoplada à detecção por fluorescência induzida a laser (HPE-LIF) de acordo com (Vecchione *et al.*

1999), com modificações. O sangue foi coletado com EDTA (1 mg/ml) e centrifugado a 1000g por 10 minutos a 4°C para a obtenção do plasma. Em 200 µL de plasma adicionou-se 2 µL de padrão interno (1 mM n-(2-mercaptopropionil)-glicine) e 20 µL de tri-n-butilfosfina 10% (v/v em dimetilformamide). Homogeneizou-se a preparação e incubou-se por 30 minutos a 4 °C. A seguir, adicionou-se 200 µL de ácido tricloroacético 10% contendo 1mM de EDTA dissódico. Homogeneizou-se vigorosamente e centrifugou-se as amostras a 13000 x g por 5 minutos a 4 °C. A 100 µL do sobrenadante, acrescentou-se 100 µL de tampão fosfato 0,5M e ajustou-se o pH para 7,5 com Na₃PO₄ 1M. O derivatizador (5-bromometilfluoresceína) foi adicionado às amostras em um excesso molar de 5 a 10 vezes, incubando-se as preparações por 15 minutos a 60 °C. Após a derivatização, diluiu-se as amostras 1/10 (20 µL do derivatizado em 180 µL de tampão fosfato 0,25 M pH 7,6), injetando-as com uma pressão de 0,5 psi por 1,5 segundo em um capilar de 67 cm, 75 µm de diâmetro interno. A corrida eletroforética foi realizada a 25° C, em 30 kV e polaridade positiva na injeção. O detector de fluorescência induzida por laser operou em 488 nm (excitação) e 520 nm (emissão). A cada corrida o capilar foi lavado com NaOH 1M.

6) Determinação de LDL⁻

Obtenção de LDL⁻ por HPLC

O isolamento da LDL⁻ foi realizada por HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência) - Shimadzu, utilizando o software CLASS-LC10 e detector SPD-MIOA, e uma coluna de troca iônica Mono Q 5/50 (Amershan Biosciences) com injetor manual. O fluxo utilizado foi de 1mL/ min. Gradiente linear A, TRIS 20mM,pH 7,8; B, TRIS

20mM e NaCl 1M, pH 7,8. Fase B em A 0% em 2min, de 0 % a 22% em 0,10min, B permaneceu em 22 % por 10min.,de 22% a 28% em 0,10 min., B permaneceu em 28% em 9min.,de 28% a 38% em 0,10min., B permaneceu em 38% por 5min., de 38% a 100% em 2min., B permaneceu a 100 % em 5min., de 100 % a 0% em 0,10min., permanecendo em 0% em 9 minutos até 40minutos finais. A separação de LDL⁻ foi monitorada em 280nm.

Anticorpo

O anticorpo monoclonal anti-LDL⁻ (IgG) foi produzido em nosso laboratório (Damasceno *et al.* 2002).

Biotilação do Anticorpo

O anticorpo anti-LDL⁻ foi dialisado em tampão borato de sódio 0,1 M pH 8,8 para remoção da azida 1 mg de biotina (D-biotinoyl-ε-aminocaproic acid-N-hydroxysuccinimide ester, C₂₀H₃₀N₄O₆S, Roche[®]) foi dissolvida em 100 uL de dimetilsulfóxido (DMSO). Adicionou-se 250 ug de biotina para cada mg de anticorpo que deve estar na faixa de concentração de 1 a 3 mg/mL e incubou-se a temperatura ambiente por 4 horas. Após este tempo foi adicionado cloreto de amônio 1M (20 uL / 250 ug de biotina) e incubou-se por mais 10 minutos. O anticorpo foi dialisado em PBS pH 7,4 e aliqotado.

ELISA

A concentração de LDL⁻ foi determinada no plasma por ELISA sanduíche. Foram utilizadas placas brancas (Fluoronunc, Maxi Sorp NUNC, Roskilde). As placas foram sensibilizadas com 1 µg/poço de anticorpo monoclonal (mAb) anti-LDL⁻ (50 µL,

diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M em pH 9,4 a 4°C, *overnight*. Após lavagem com 300 µL de tampão TBS (TRIS-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4) contendo Tween 20 (0.05%) por 4 vezes, as placas foram bloqueadas por duas horas a 37°C com 250 µL/poço de tampão TBS contendo caseína 0,25 %. Após nova lavagem, as placas foram incubadas com 50 µL/ poço de amostra (plasma (EDTA) diluído 1:2 em caseína 0,025% e Tween 20 0,005% em TBS (solução de diluição) por duas horas a 37°C. As placas foram novamente lavadas e incubadas com 50 µL/poço do anticorpo anti-LDL- biotilado (1:1000, 1,2 ug/mL) por duas horas a 37°C. Adicionou-se Streptavidina conjugada com peroxidase (Stressgen Biotechnologies Corp., diluída 1:1000 em solução de diluição) por 1 hora, a 37°C. Após lavagem, adicionou-se Tris-HCl 0,1M pH 8,5 contendo luminol (2,3 mM), p-iodofenol (0,9 mM) e peróxido de hidrogênio (0,25 uL de H₂O₂ 30% /mL de solução) (50µL/poço). A leitura da quimiluminescência produzida foi realizada imediatamente, utilizando-se uma leitora de placas de ELISA para quimiluminescência (LumiCount, Packard, Meriden, USA). A concentração de LDL- nas amostras foi estimada pela curva de calibração realizada com LDL- . As amostras e a curva de calibração foram realizadas em triplicata.

7) Determinação de óxidos de colesterol

A fração lipídica do plasma (1000 uL) foi extraída em clorofórmio e metanol (1:2 v/v) contendo 100µl de 5α-colestano (200 ng/µl), adicionado a cada amostra como padrão interno. O extrato lipídico foi evaporado sob corrente de nitrogênio e o resíduo foi redissolvido em 1,0 ml tolueno : acetato de etila (1:1 v/v). A fração lipídica neutra (triglicerídeos, colesterol e óxidos de colesterol) e a fração lipídica polar (fosfolipídeos) foram isoladas por eluição sequencial através de uma coluna para extração em fase

sólida (Waters Diol columns) com tolueno:acetato de etila, seguido por metanol. A fração lipídica neutra foi submetida á saponificação alcalina e metilação com diazometano etéreo. As amostras foram derivatizadas a trimetilsilil (TMS) usando 100 uL de dimetil-formamida e 100 uL de N,O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) (1:1). Os tubos foram selados, purgados com nitrogênio, aquecidos a 80°C por 20 min e a solução foi então transferida para um vial. Uma alíquota de 1µl foi injetada no cromatógrafo a gás (CG 6890-Plus – Hewlett Packard), acoplado a uma coluna DB-1 (30 m de comprimento, 0,32mm D.I., 0,25 µm de espessura do preenchimento; Hewlett Packard) e operada com *split ratio* de 1:5. Utilizou-se hidrogênio como gás carreador a um fluxo de 5 ml/min. A temperatura de injeção foi de 290°C e a temperatura inicial da coluna igual a 260°C. A corrida cromatográfica foi programada para a temperatura inicial por 2 min seguida por uma rampa de 5°C/min até 290°C. A temperatura do detector de ionização de chama foi de 300°C. Os padrões usados foram: 5-cholestene-3β,7α-diol (7α-OH), 5-cholestene-3β,7β-diol (7β-OH), cholestan-5α,6α-epoxy-3β-ol (α-epox), cholestan-5β,6β-epoxy-3β-ol (β-epox), cholestan-3β,5α,6β-triol (CT), 5-cholesten-3β-ol-7-one (7-Keto), e 5-cholesten-3β,25-diol (25-OH). O 7-keto e o 25-OH apresentam o mesmo tempo de retenção e foram quantificados como uma somatória, usando-se como padrão uma solução de concentração equimolar de cada um deles.

8) Determinação de Anticorpos Anti-proteínas de Choque Térmico

A detecção de auto-anticorpos anti-proteínas de choque térmico foi realizada através do ensaio ELISA descrito por Xu *et al.* (1993), com as seguintes modificações:

1. Foram utilizadas placas de 96 poços (Costar). Os poços foram sensibilizados com 1µg/mL de HSP60, HSP70 ou HSC70 (StressGen Biotechnologies, Victoria, BC) em 100 µL de PBS, pH 7,2 por poço a 4°C overnight e então lavados com PBS contendo 0,05% Tween 20. O bloqueio foi feito com leite desnatado 1% em PBS por 2 h a 4°C.
2. Foi feita a incubação à temperatura ambiente por 1 h com 100 µL de soro diluído 1:10 a 1:10.000 em PBS contendo 0,1% de leite desnatado e então os poços foram lavados com PBS-Tween.
3. Em cada poço da placa adicionou-se 100 µL de Imunoglobulina (IgG) anti-coelho conjugada com peroxidase (StressGen 1:2.000), diluída em PBS contendo 0,1% de leite desnatado, por 1 h a temperatura ambiente; após este tempo, realizaram-se 4 lavagens com PBS-Tween.
4. Ao final, foi adicionado 100 µL de Tampão citrato-fosfato 0,1 M pH 4,2, contendo 0,53 mg/mL de 2,2 azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazoline-6-sulfônico), e, em seguida, 0,025% de H₂O₂ 30 volumes.
5. A leitura foi feita depois de 30 min a 405 nm.

Os resultados foram expressos como o último título reativo (absorbância mínima de 0,2 acima do branco) multiplicado pela absorbância encontrada.

9) Determinação de Isoflavonas (Pereira et al., 2002)

Gérmen de soja

A extração de isoflavonas do gérmen de soja foi realizada na proporção de 1:10 (m/v) em etanol 90%. A mistura foi deixada em banho de ultrassom por 10 min e posteriormente agitada por 2 horas. O sobrenadante foi separado por centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos e reservado. Foi feita uma nova extração do resíduo por 1

hora na proporção de 1:5. Os sobrenadante foram reunidos e o extrato resultante foi submetido a hidrólise em HCl 1M (concentração final) por 30 minutos em banho fervente (para hidrólise dos glicosídeos de isoflavonas), filtrado em 0,22 μm , seco em corrente de nitrogênio e ressuspendido em 1 mL de etanol 90%, filtrado novamente e uma alíquota de 20 μL foi injetada no HPLC.

Plasma

A extração de isoflavonas no plasma foi feita de acordo com Pereira *et al.* (2002). Incubou-se 2 mL de plasma, 4 mL de acetato de amônio 0,2 M, pH 4,6 e 100 μL de glicuronidase-sulfatase (4,2 unidades/mL, Sigma S-9751) com Biocanina como padrão interno suficiente para uma concentração final de 20 μM a 37°C, *overnight*. Após este tempo, solução resultante foi aplicada a mini-coluna para extração em fase sólida (Varian-Bond Elut LRC C18 - 200 mg/10 mL, ref.1211-3024). A coluna foi lavada com água gelada (10 mL) e as isoflavonas foram eluídas em etanol 90 % (4 mL). O extrato purificado foi seco em corrente de nitrogênio e o resíduo foi ressuspendido em 200 μL de etanol 90%. A solução resultante foi filtrada em filtro 0,22 μm e uma alíquota de 50 μL foi analisada por CLAE.

Análise das Isoflavonas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Todas as análises de isoflavonas foram realizadas por CLAE, utilizando-se cromatógrafo Shimadzu CBM-10A, operando com 2 bombas LC-10AD, injetor automático SIL-10A, detector fotodiodo SPD-M10A e o Software Class LC10. Foi utilizada a metodologia de Franke *et al.* (1998) com modificações. Utilizou-se coluna de fase reversa Hypersil ODS 5 μm (250 x 4,6 mm; Supelco Co) com fluxo da fase móvel de 0,8 mL/min. Utilizou-se gradiente linear composto por: A, ácido acético em água

(10:90, v/v); B, metanol-acetonitrila-diclorometano (10:5:1, v/v); B em A (em volume) a 10% por 5 min, de 10% a 45% em 10 min, de 45% a 70% em 20 min e de 70% a 10% em 2 min, permanecendo nessa concentração por 3 minutos antes da próxima injeção. Os padrões de genisteína, genistina, daidzeína, daidzina, equol e biocanina A foram adquiridos da Endofine Chemical Co., USA. A absorção das isoflavonas foi monitorada em 254 nm e a do equol, em 280 nm. As isoflavonas foram identificadas pelo tempo de retenção e pelo espectro.

10) Determinação de estradiol

A determinação da concentração de estradiol foi realizada utilizando-se o kit IMx[®] System Estradiol da Abbott Laboratories.

3.4. Medida da reatividade vascular da artéria braquial e do complexo íntima-medial das artérias carótidas

O estudo ultra-sonográfico da artéria braquial foi realizado na Seção de Ecocardiografia do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, com a mulher posicionada em decúbito dorsal, em sala com temperatura mantida em 22° C. Com a finalidade de estabilizar os parâmetros a serem medidos, as mulheres permaneceram inicialmente em repouso por dez minutos. A avaliação da resposta à hiperemia reativa foi realizada na artéria braquial do membro superior esquerdo (MSE), cinco minutos após a insuflação com manguito de esfigmomanômetro, a 250 mmHg e deflação rápida. Posicionou-se o transdutor de ultrassonografia aproximadamente a cinco cm acima da prega antecubital.

Após liberação da compressão, mediu-se o fluxo nos quinze primeiros segundos e o diâmetro, nos 30 segundos subseqüentes.

Os diâmetros foram avaliados pela ultrassonografia vascular bidimensional, utilizando-se transdutor linear eletrônico de alta resolução e de banda larga (7 a 10 MHz), na artéria braquial, posicionando-o um a três cm proximalmente à prega cutânea antecubital, com o MSE na altura do coração. Escolheu-se um segmento localizado, quatro a cinco centímetros proximalmente à bifurcação da artéria do cotovelo, com a finalidade de garantir imagens do segmento arterial reto.

Todos os estudos e a análise dos mesmos foram realizadas por um único observador, por meio de imagens registradas em fitas de vídeo cassete. Além das medidas realizadas no momento do exame, outras duas medidas foram feitas após digitalização das imagens de vídeo pelo sistema de análise “color-vue”[®] da marca Microsonic[®]. O observador delimitou as paredes proximal e distal, e determinou o diâmetro diastólico pela média de três medidas consecutivas.

A velocidade do fluxo sistólico da artéria braquial foi obtida pelo posicionamento do volume de amostra do Doppler, posicionado no centro da luz da artéria braquial, a partir da imagem bidimensional, corrigindo-se o ângulo entre o fluxo e o feixe de ultra-som. Foi calculado o diâmetro, por meio da média aritmética das três medidas (figura 10) e as velocidades de fluxo máximo e médio da artéria braquial.

As medidas da velocidade do fluxo e do diâmetro da artéria braquial (figura 11) foram realizadas quinze minutos após o repouso, cinco minutos após a indução da isquemia (leitura imediata e com 15 e 90 segundos), dez minutos após (leitura tardia) e, finalmente, cinco minutos após o uso de isordil sub-lingual.

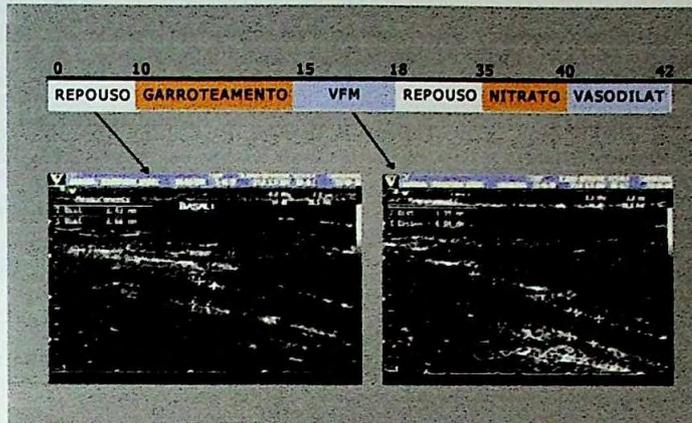


Figura 10 – Representação da vasodilatação endotélio dependente. O procedimento iniciou-se com a medida do diâmetro da artéria braquial em diástole (repouso) e repetida após garroteamento por cinco minutos a 250 mmHG (VFM).

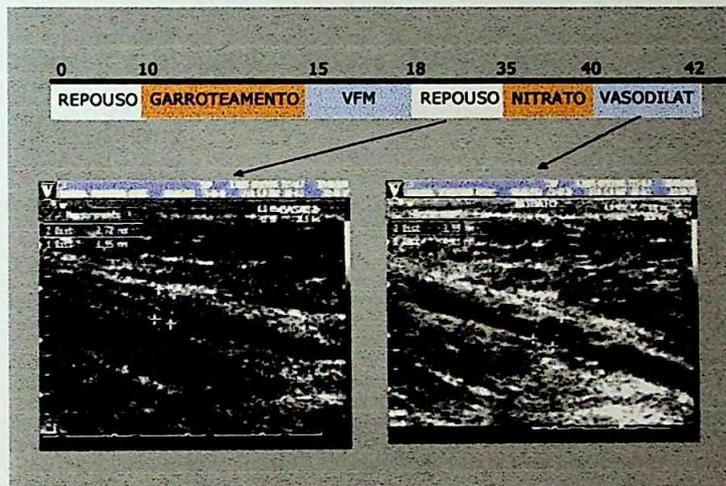


Figura 11 – Representação da vasodilatação endotélio independente. Realizou-se a medida do diâmetro da artéria braquial em diástole após 15 minutos de repouso e repetiu-se as medida após 5 mg de isordil sublingual.

3.5. Análise estatística

Os dados são apresentados como média \pm erro padrão. A comparação entre as medidas Placebo e Tratamento foi feita considerando os grupos envolvidos através da técnica estatística de Análise de variância com medidas repetidas (NETER, 1996) e complementada, quando necessário, com as múltiplas de Bonferroni (NETER, 1996). A comparação das diferenças entre as medidas Placebo e Tratamento, considerando os grupos foi feita através da análise de variância com um fator fixo e das comparação de Bonferroni. (NETER, 1996). O software estatístico utilizado para esta análise foi SPSS versão 10.0. Os resultados da reatividade vascular foram confirmados utilizando o teste t de Student pareado e o programa Oringin 5.0. As correlações lineares foram feitas utilizando-se o programa SigmaStat 1.0, através da estimação do coeficiente de correlação linear de Pearson. O nível de significância (p) adotado foi de $p < 0,05$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

Concluíram o estudo 20 pacientes do grupo I, 17 pacientes do grupo E e 18 pacientes do grupo E+P.

No nosso estudo utilizou-se uma dose total de isoflavonas de 60 mg (conforme laudo do fornecedor do produto). Entretanto, após análise realizada em nosso laboratório, a dose real encontrada foi de 36,64 mg de isoflavona total, sendo que as agliconas (após hidrólise) foram encontradas nas seguintes concentrações: daidzeína 10,48 mg, genisteína 4,52 mg e gliciteína 21,64 mg.

A tabela 2 mostra as principais características iniciais dos grupos estudados.

Tabela 2 – Características iniciais de idade, tempo de menopausa, índice de massa corporal (IMC) dos grupos estudados.

Características/Grupo	I (n=20)	E (n=17)	E + P (n=18)
Idade (anos)	56,9	57,3	57,2
Tempo de Menopausa (anos)	8,3	8,8	7,1
IMC	25,9	30,8	26,8

A figura 12 mostra as concentrações plasmáticas das isoflavonas das mulheres do grupo I, após o uso de germen de soja por 3 meses. Isoflavonas não foram detectadas com o uso do placebo ou dos outros tratamentos. A figura 13 mostra as concentrações de estradiol dos 3 grupos estudados. Verifica-se que somente os grupos tratados com 17 β -estradiol tiveram as concentrações plasmáticas de estradiol aumentadas. O uso de isoflavonas não alterou as concentrações plasmáticas de estradiol.

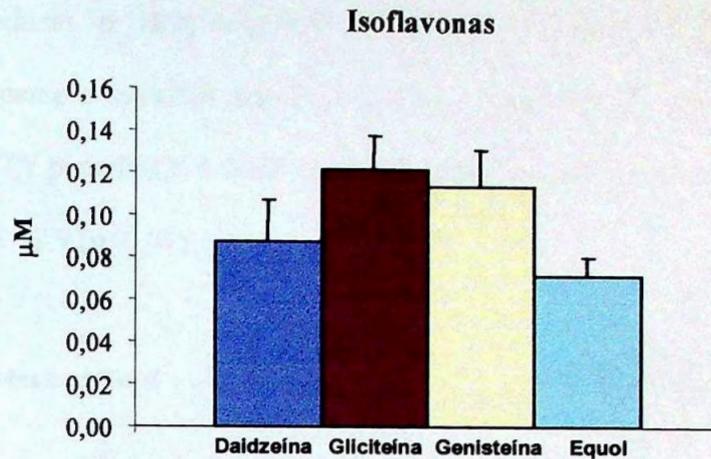


Figura 12 – Concentração plasmática de isoflavonas após tratamento com isoflavonas (I). Os valores são apresentados como média \pm desvio padrão.

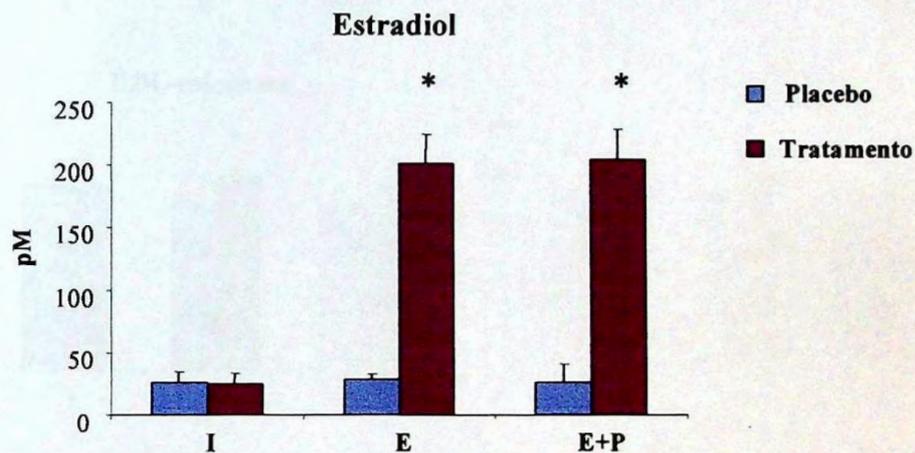


Figura 13 – Comparação da concentração de estradiol obtida após o uso de placebo e após tratamento com isoflavonas (I), 17β-estradiol (E) ou 17β-estradiol + acetato de noretisterona (E+P). Os valores são apresentados como o média \pm erro padrão (* $p < 0,001$).

A figura 14 mostra as concentrações de colesterol plasmático total, LDL-colesterol, HDL-colesterol e triglicérides das pacientes após o uso de placebo e o tratamento especificado. O uso de isoflavonas não alterou o perfil lipídico. A terapia de reposição hormonal reduziu o colesterol total e o LDL-colesterol. A reposição estrogênica isolada aumentou HDL-colesterol. A associação de estrogênio com o

progestógeno reduziu o HDL-colesterol. Não houve alterações significativas de triglicérides. Somente o estradiol isolado aumentou a concentração plasmática de apo A1 de $146,6 \pm 17,7$ para $163,8 \pm 26,04$ mg/dL ($p=0,012$) e reduziu apo B de $146,73 \pm 23,5$ para $125,6 \pm 12,9$ ($p<0,01$).

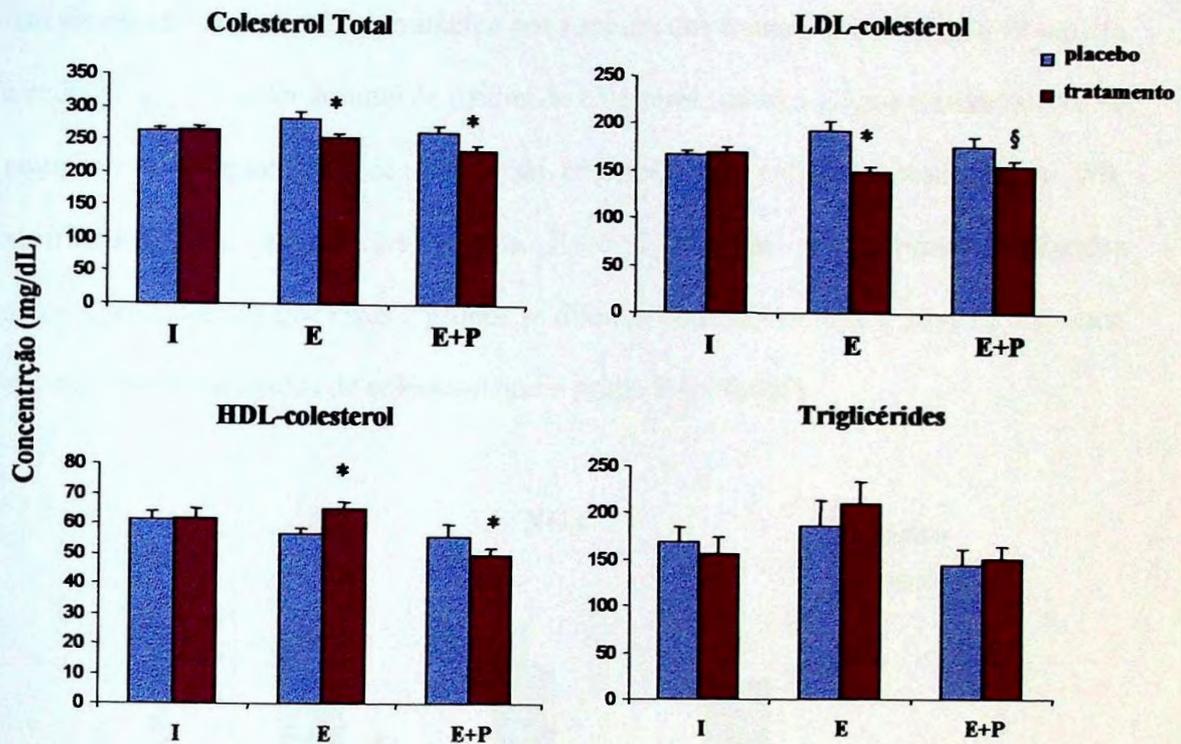


Figura 14 – Comparação da concentração de colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol e triglicérides obtidos após o uso de placebo e após tratamento com isoflavonas (I), 17β-estradiol (E) ou 17β-estradiol + acetato de noretisterona (E+P). Os valores são apresentados como média ± erro padrão (* $p<0,001$, § $p<0,05$).

As figuras 15 e 16 mostram a redução significativa de NOx nos três grupos estudados concomitante com o aumento de S-nitrosotióis. A figura 17 mostra a redução de nitrotirosina pelo grupo I. A concentração plasmática de gliciteína correlacionou-se positivamente com a redução de nitrotirosina (diferença entre tratamento e placebo, $r=0,568$, $p=0,04$), sugerindo que quanto maior a concentração de gliciteína, maior a

redução de nitrotirosina. A figura 18 mostra que os três tratamentos reduziram as concentrações de 7 α -hidroxicolesterol e α -epoxicolesterol. As concentrações de 7 β -hidroxicolesterol foram reduzidas pelo tratamento com fitoestrogênios e estradiol sozinho, mas não pela associação com o progestógeno. O β -epoxicolesterol foi reduzido apenas pelos fitoestrogênios. A somatória de 7-ceto/25-OH e colestanoetriol não foram alteradas significativamente por nenhum dos tratamentos. A figura 19 mostra a redução significativa do total de óxidos de colesterol nos três grupos estudados. Ao se comparar a relação: total de óxidos de colesterol por colesterol total (figura 20), verificou-se que apenas os grupos E e I tiveram seus valores reduzidos significativamente e que estes 2 grupos se diferem entre si, ou seja, o grupo I teve uma redução maior de óxidos de colesterol que o grupo E ($p=0,005$).

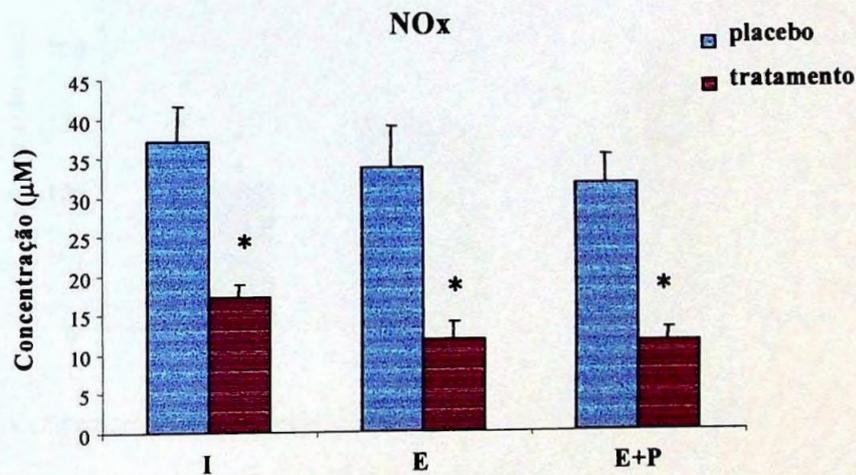


Figura 15 – Comparação da concentração de derivados do óxido nítrico (NOx) obtidos após o uso de placebo e após tratamento com isoflavonas (I), 17 β -estradiol (E) ou 17 β -estradiol + acetato de noretisterona (E+P). Os valores são apresentados como média \pm erro padrão (* $p<0,001$).

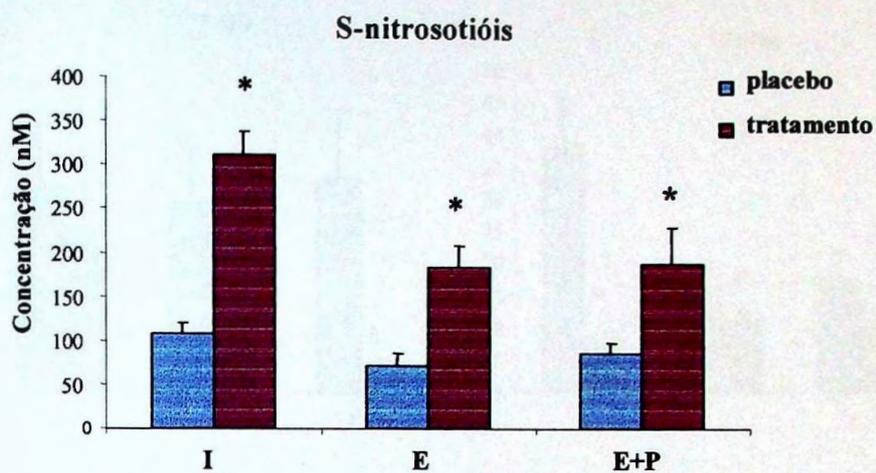


Figura 16 – Comparação da concentração de S-nitrosotióis obtidos após o uso de placebo e após tratamento com isoflavonas (I), 17 β -estradiol (E) ou 17 β -estradiol + acetato de noretisterona (E+P). Os valores são apresentados como média \pm erro padrão (* $p < 0,001$).

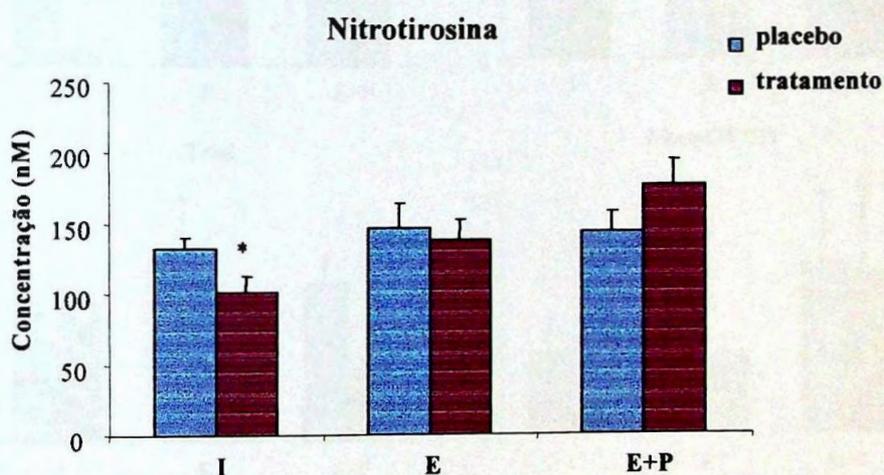


Figura 17 – Comparação da concentração de equivalentes de nitroalbumina obtida após o uso de placebo e após tratamento com isoflavonas (I), 17 β -estradiol (E) ou 17 β -estradiol + acetato de noretisterona (E+P). Os valores são apresentados como média \pm erro padrão (* $p < 0,05$).

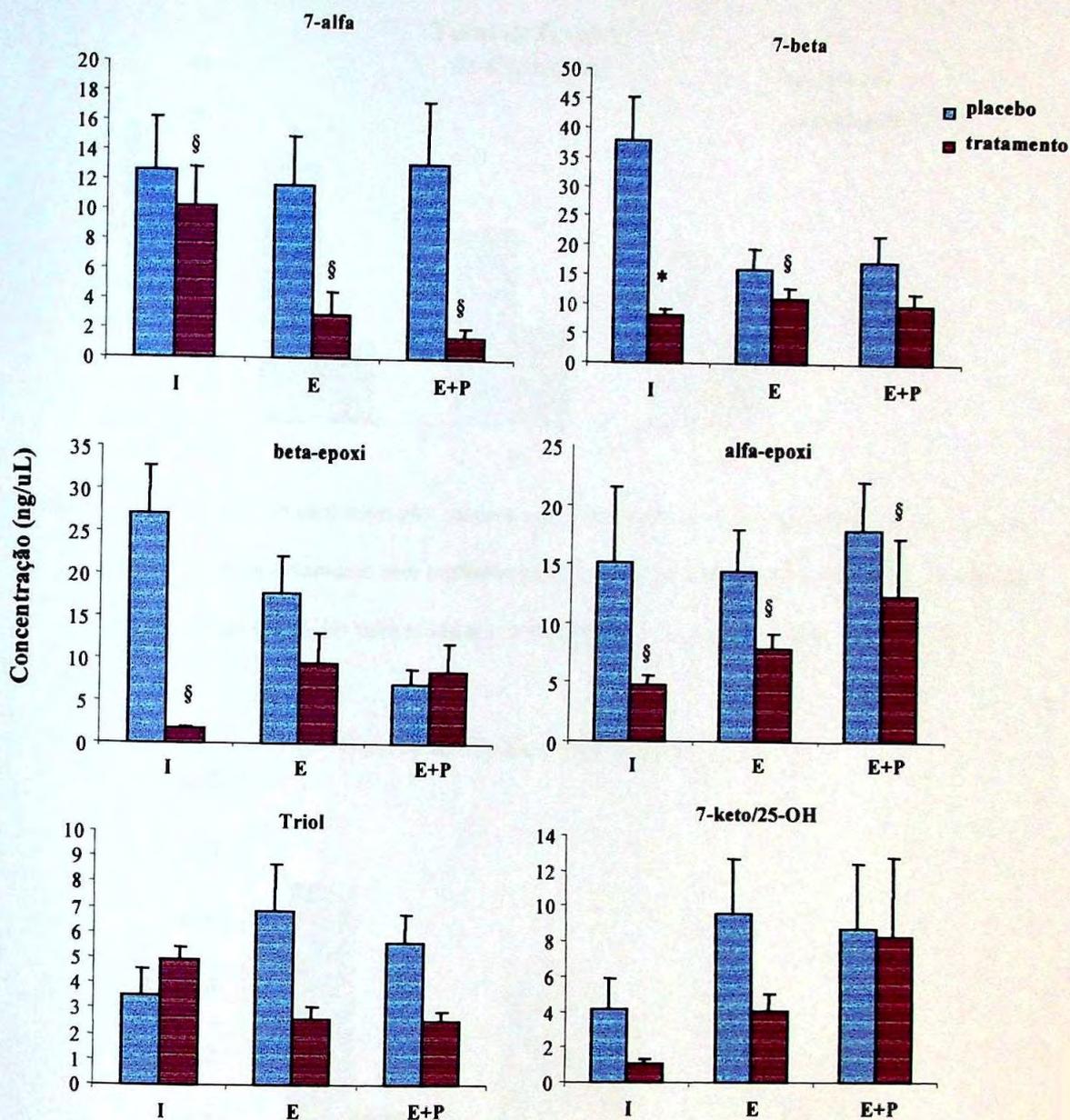


Figura 18 – Comparação das concentrações de óxidos de colesterol: 7 α -hidroxicholesterol (7-alfa), 7 β -hidroxicholesterol (7-beta), cholestan-5 α ,6 α -epoxy-3 β -ol (alfa-epoxi), cholestan-5 α ,6 β -epoxy-3 β -ol (beta-epoxi), cholestan-3 β ,5 α ,6 β -triol (Triol), 5-cholesten-3 β -ol-7-one (7-keto) e 5-cholesten-3 β ,25-diol (25-OH) obtidas após o uso de placebo e após tratamento com isoflavonas (I), 17 β -estradiol (E) ou 17 β -estradiol + acetato de noretisterona (E+P). Os valores são apresentados como média \pm erro padrão (* $p < 0,001$, $^{\$}p < 0,05$).

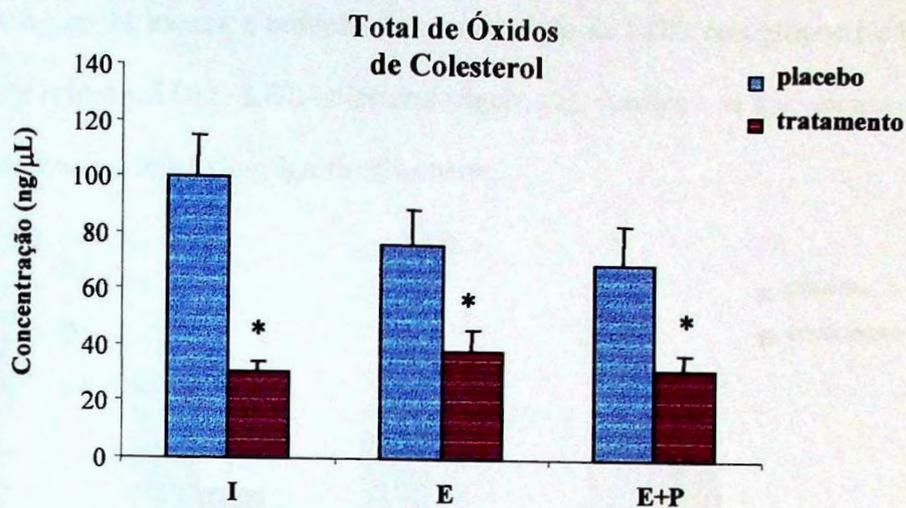


Figura 19 – Comparação do somatório das concentrações de óxidos de colesterol obtidas após o uso de placebo e após tratamento com isoflavonas (I), 17β-estradiol (E) ou 17β-estradiol + acetato de noretisterona (E+P). Os valores são apresentados como média ± erro padrão (*p<0,001).

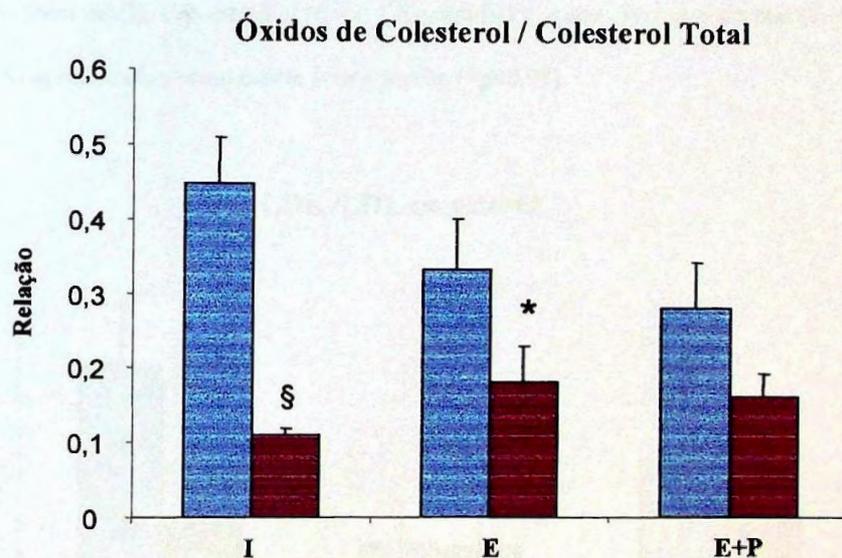


Figura 20 – Comparação do somatório das concentrações de óxidos de colesterol dividido pelos valores de colesterol total obtidos após o uso de placebo e após tratamento com isoflavonas (I), 17β-estradiol (E) ou 17β-estradiol + acetato de noretisterona (E+P). Os valores são apresentados como média ± erro padrão (*p<0,05, §p<0,001).

A figura 21 mostra a redução da concentração de LDL⁻ nos grupos I e E. Ao se comparar a relação: LDL⁻ / LDL-colesterol (figura 22), verificou-se que apenas o grupos I teve seus valores reduzidos significativamente.

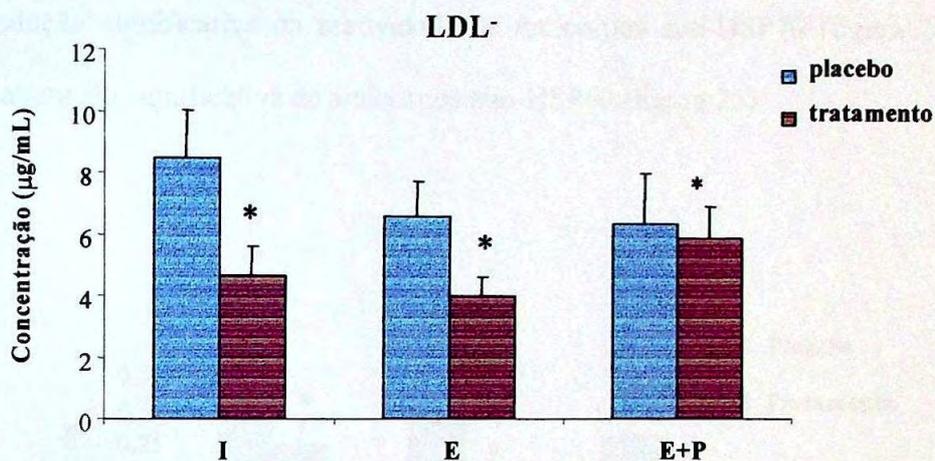


Figura 21 – Comparação da concentração de LDL⁻ obtida após o uso de placebo e após tratamento com isoflavonas (I), 17β-estradiol (E) ou 17β-estradiol + acetato de noretisterona (E+P). Os valores são apresentados como média ± erro padrão (*p<0,05).

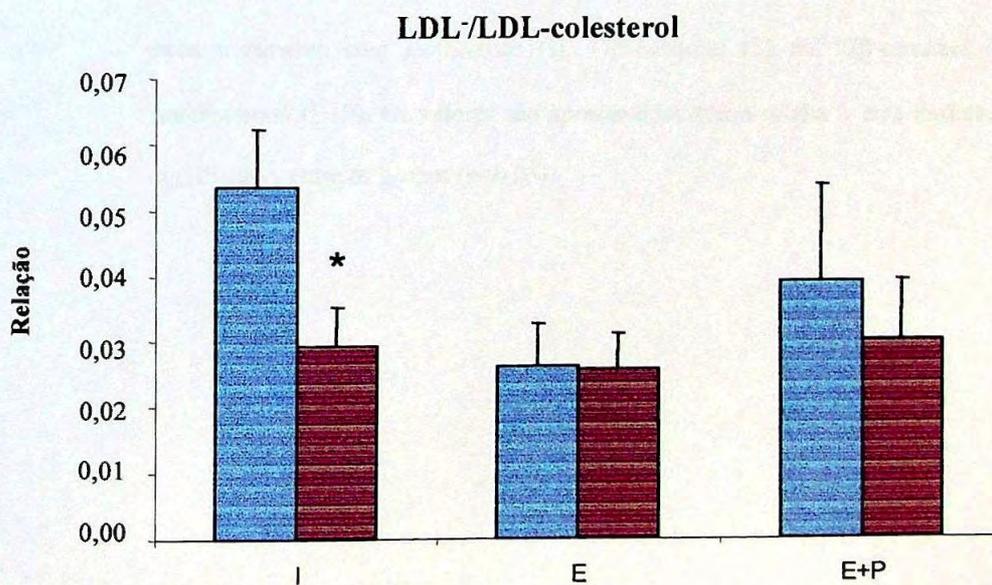


Figura 22 – Comparação da concentração de LDL⁻ dividida pela concentração de LDL-colesterol obtida após o uso de placebo e após tratamento com isoflavonas (I), 17β-estradiol (E) ou 17β-estradiol + acetato de noretisterona (E+P). Os valores são apresentados como média ± erro padrão (*p<0,05).

As figuras 23, 24 e 25 mostram a reatividade de anticorpos anti-proteínas de choque térmico (HSC70, HSP70 e HSP60, respectivamente). Os três grupos mostraram uma redução significativa de anticorpos anti-HSC70 (figura 23). Apenas o grupo I teve uma redução significativa da reatividade de anticorpos anti-HSP70 (figura 24). Não houve alteração significativa de anticorpos anti-HSP60 (figura 25).

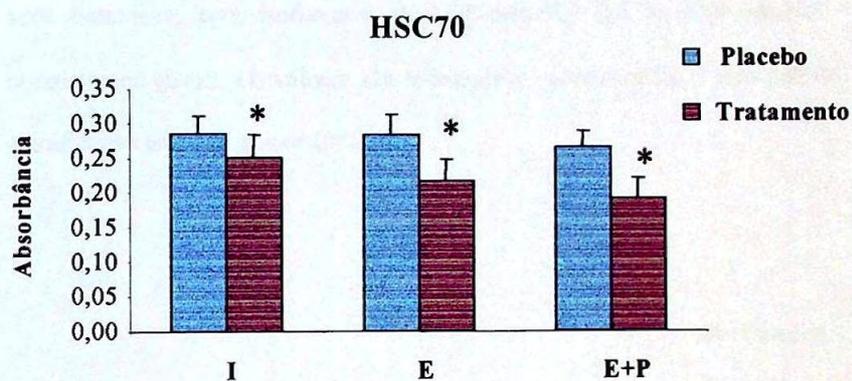


Figura 23 – Comparação da reatividade de anticorpos anti-HSC70 encontrada após o uso de placebo e após tratamento com isoflavonas (I), 17 β -estradiol (E) ou 17 β -estradiol + acetato de noretisterona (E+P). Os valores são apresentados como média \pm erro padrão. * Diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

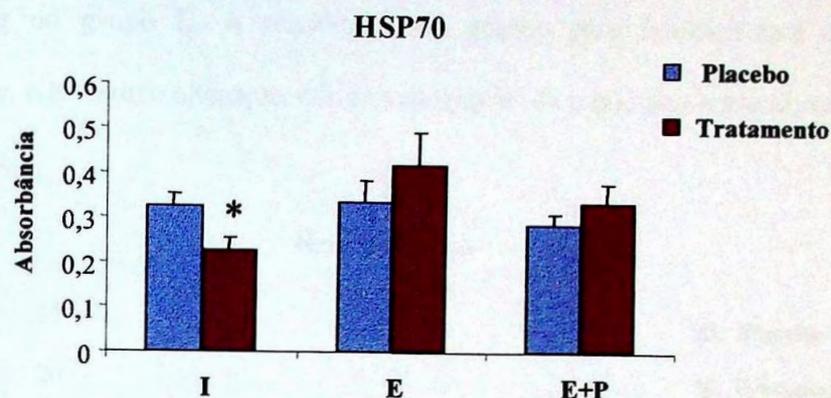


Figura 24 – Comparação da reatividade de anticorpos anti-HSP70 encontrada após o uso de placebo e após tratamento com isoflavonas (I), 17 β -estradiol (E) ou 17 β -estradiol + acetato de noretisterona (E+P). Os valores são apresentados como média \pm erro padrão. * Diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

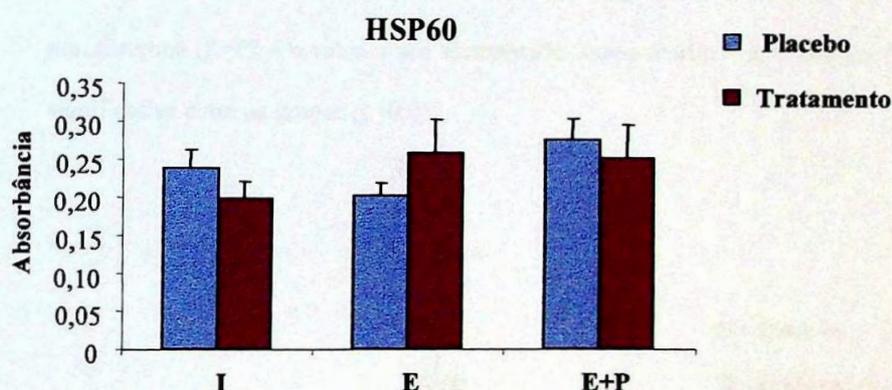


Figura 25 – Comparação da reatividade de anticorpos anti-HSP60 encontrada após o uso de placebo e após tratamento com isoflavonas (I), 17 β -estradiol (E) ou 17 β -estradiol + acetato de noretisterona (E+P). Os valores são apresentados como média \pm erro padrão. * Diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

As figuras 26, 27, 28 e 29 mostram a concentração de tióis (homocisteína, metionina, cisteína e glutatona), respectivamente após placebo e tratamento. Não houve diferença estatística significativa para homocisteína. Houve um aumento significativo

de cisteína no grupo E. A tendência dos grupos para homocisteína e cisteína é semelhante. Não houve alteração das concentrações de metionina e glutatona.

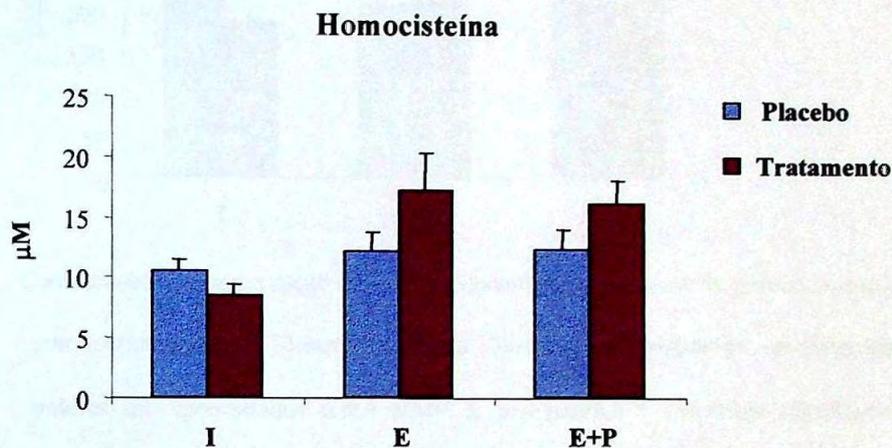


Figura 26 – Comparação da concentração de Homocisteína encontrada após o uso de placebo e após tratamento com isoflavonas (I), 17β-estradiol (E) ou 17β-estradiol + acetato de noretisterona (E+P). Os valores são apresentados como média ± erro padrão. * Diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

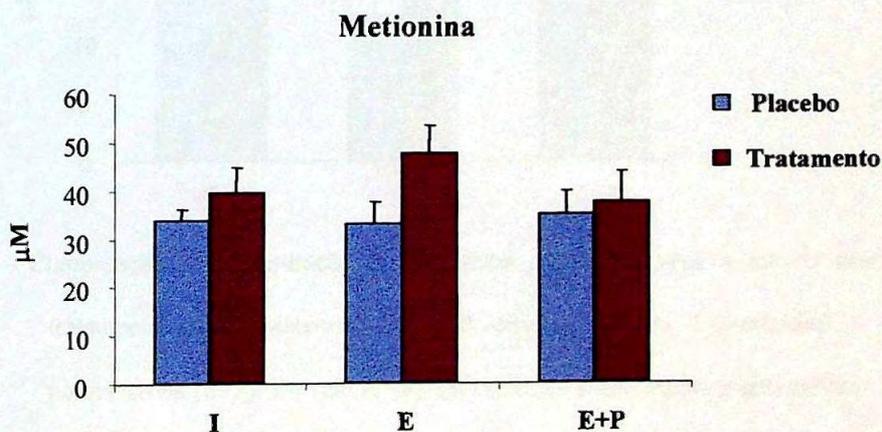


Figura 27 – Comparação da concentração de Metionina encontrada após o uso de placebo e após tratamento com isoflavonas (I), 17β-estradiol (E) ou 17β-estradiol + acetato de noretisterona (E+P). Os valores são apresentados como média ± erro padrão. * Diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

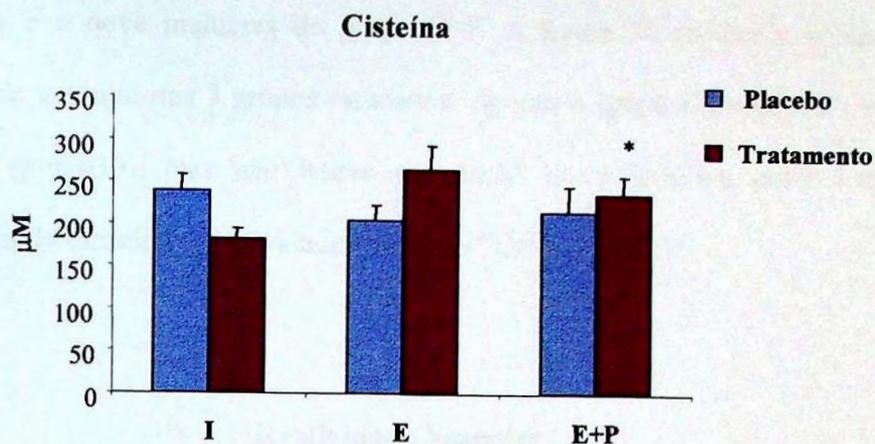


Figura 28 – Comparação da concentração de Cisteína encontrada após o uso de placebo e após tratamento com isoflavonas (I), 17β-estradiol (E) ou 17β-estradiol + acetato de noretisterona (E+P). Os valores são apresentados como média ± erro padrão. * Diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

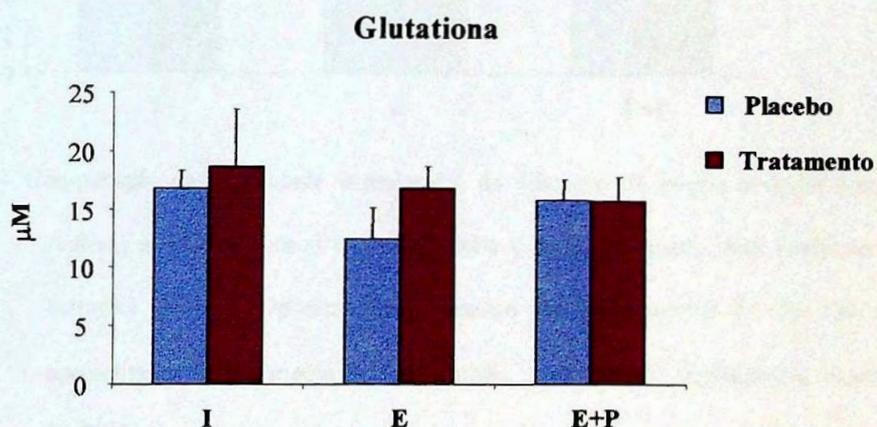


Figura 29 – Comparação da concentração de Glutathiona encontrada após o uso de placebo e após tratamento com isoflavonas (I), 17β-estradiol (E) ou 17β-estradiol + acetato de noretisterona (E+P). Os valores são apresentados como média ± erro padrão. * Diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Dentre as 55 pacientes que concluíram o estudo, 27 (49%) foram randomizadas e submetidas a análise de reatividade vascular antes e ao término de cada período de tratamento instituído. Participaram desta análise oito mulheres do grupo I, dez mulheres

do grupo E e nove mulheres do grupo E+P. A figura 30 mostra a comparação da reatividade vascular dos 3 grupos estudados. Apenas o grupo E melhorou a reatividade vascular ($p=0,039$), mas não houve correlação linear positiva entre concentração plasmática de estradiol e reatividade vascular (figuras 31 e 32).

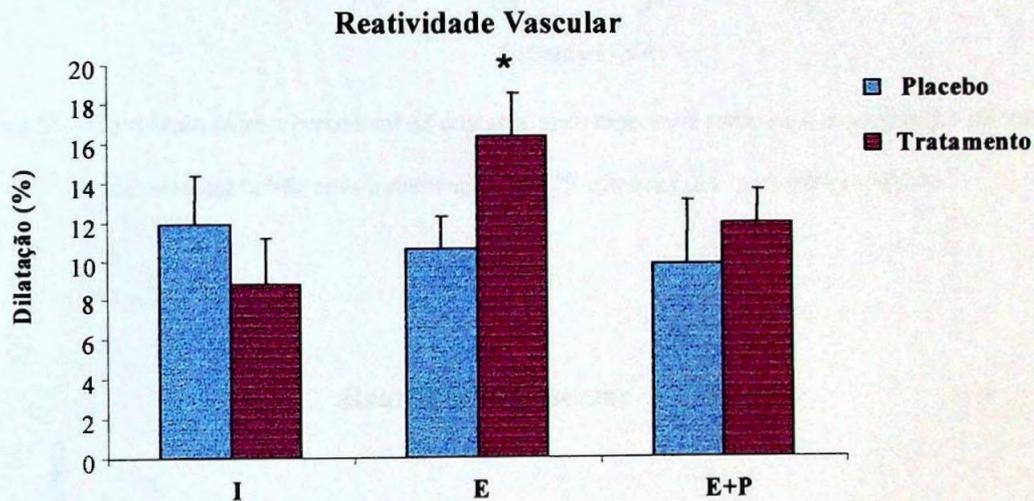


Figura 30 – Comparação da reatividade vascular (% de dilatação da artéria braquial após hiperemia reativa) analisada após o uso de placebo e após tratamento com isoflavonas (I), 17β -estradiol (E) ou 17β -estradiol + acetato de noretisterona (E+P). Os valores são apresentados como média \pm erro padrão. * Diferença significativa entre os grupos ($p<0,05$).

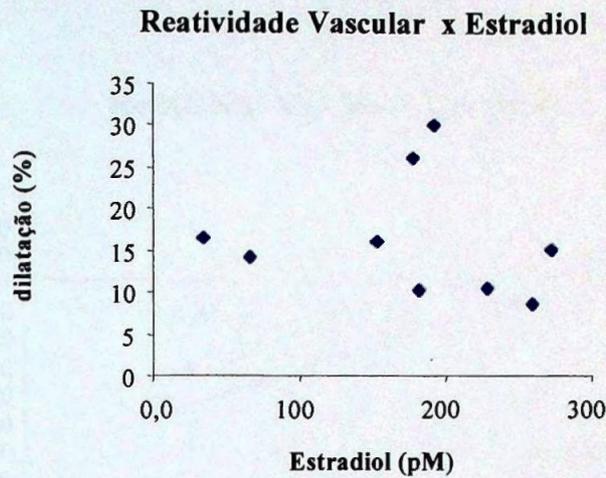


Figura 31 – Correlação entre o percentual de dilatação após hiperemia reativa e a concentração plasmática de estradiol obtida após tratamento com 17 β -estradiol (E). $p= 0,707$, $r= -0,146$

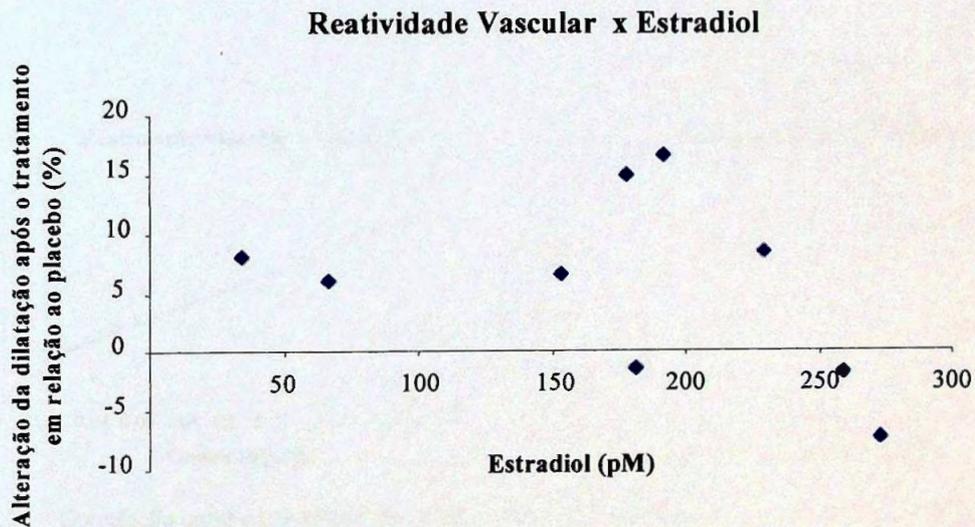


Figura 32 – Correlação entre o percentual de dilatação após hiperemia reativa e a concentração plasmática de estradiol obtida após tratamento com 17 β -estradiol (E) em relação ao placebo. $p= 0,305$, $r=-0,386$

Apesar de não ter havido melhora da reatividade vascular com o uso de isoflavonas, foram encontradas correlações positivas significativas obtidas entre a concentração plasmática de isoflavonas e a reatividade vascular (figuras 33 e 34).

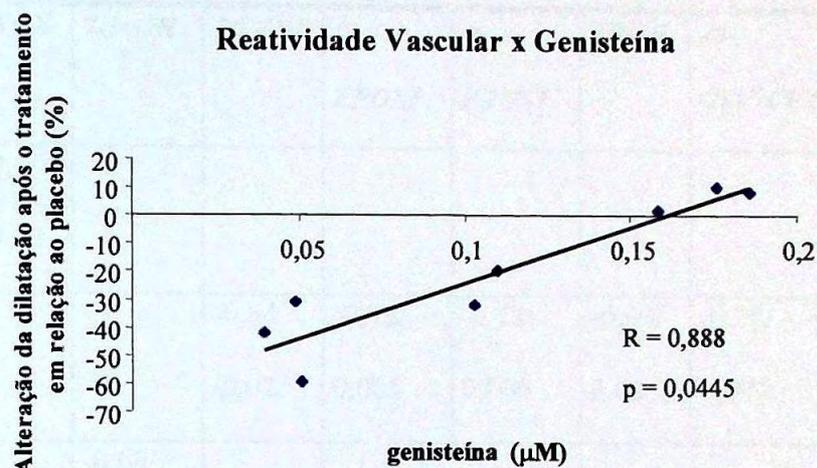


Figura 33 – Correlação entre o percentual de dilatação após hiperemia reativa e a concentração plasmática de genisteína obtida após tratamento com isoflavonas (I) em relação ao placebo. $p=0,045$; $r=0,88$

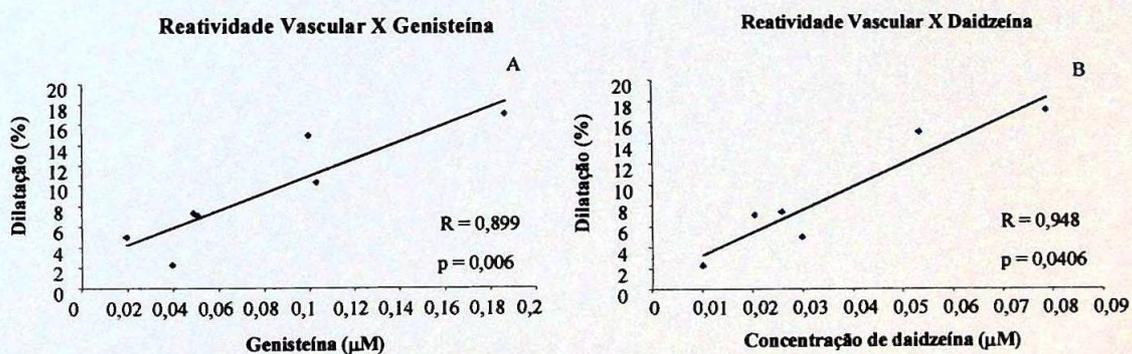


Figura 34 – Correlação entre o percentual de dilatação após hiperemia reativa obtida após tratamento com isoflavonas (I) com a concentração plasmática de genisteína (A) e com a concentração plasmática de daidzeína (B).

A tabela 3 mostra as correlações encontradas entre as concentrações de Apo B e NOx e entre estradiol e óxidos de colesterol.

Tabela 3 – Coeficientes de correlação (r) e valor de p entre algumas variáveis.

<i>R/P</i>	<i>NOX</i>	<i>7α-OH</i>	<i>7β-OH</i>	<i>β- EPOXI</i>	<i>α- EPOXI</i>	<i>TRIOL</i>	<i>25- OH/7CETO</i>	<i>TOTAL COX</i>
<i>Apo B</i>	0,3/ 0,03							
<i>Estradiol</i>			-0,64 /0,02	-0,72/ 0,005	-0,72/ 0,006	-0,60/ 0,03	-0,75/ 0,003	-0,79/ 0,001
<i>Equol</i>		-0,69/ 0,01						

Segurança

Os fármacos e suplemento empregados no nosso estudo foram bem tolerados. Apesar de infreqüente, os efeitos adversos mais comuns entre as que receberam TRH foram a mastalgia, leucorréia, cólicas abdominais e sangramentos genitais. A mastalgia e as cólicas abdominais foram de leve a moderada intensidade e de caráter transitório.

Tabela 4 – principais eventos adversos nos diferentes grupos de tratamento

	E(N=17)		E+P(N=18)		I (N=20)	
	N	%	N	%	N	%
Mastalgia	8	47,1	13	72,2	1	5
Leucorréia	4	23,5	4	22,2		
Sangramento genital	3	17,6				
Cólica	1	5,9	2	11,1		

Quanto ao perfil de segurança, nenhuma paciente apresentou elevação de ALT e/ou AST acima de três vezes e da CK acima de 10 vezes do limite superior da normalidade.

DISCUSSÃO

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho comparamos o efeito da terapia de reposição hormonal simples (17 β -estradiol) ou combinada (17 β -estradiol + acetato de noretisterona) com o uso de isoflavonas do gérmen de soja, como uma alternativa à terapia de reposição hormonal sobre fatores de risco para aterosclerose. Verificamos que alguns fatores analisados podem ter sido afetados igualmente pelos tratamentos, enquanto outros não.

As isoflavonas presentes no gérmen de soja mostraram-se biodisponíveis, sendo detectadas no plasma das pacientes. Estudos realizados em humanos mostram que ocorre variação individual considerável no metabolismo das isoflavonas, o que poderia estar relacionado às diferenças na resposta da flora bacteriana intestinal à dieta (Xu *et al.*, 1995; Lampe *et al.*, 1998). Alguns indivíduos não são capazes de excretar quantidades significativas de equol, não havendo relação entre a excreção de equol e O-DMA (Rowland *et al.*, 2000). O consumo de lipídeos parece diminuir a capacidade da flora bacteriana intestinal de sintetizar equol (Rowland *et al.*, 2000). No nosso estudo não foi detectado equol em seis mulheres após 1 mês de tratamento e em duas, após 3 meses (resultados não mostrados).

Morito *et al.* (2001) analisaram a atividade estrogênica das isoflavonas de soja após digestão com bactérias entéricas, tendo obtido resultados interessantes. As isoflavonas glicosídicas ligam-se fracamente a ambos os receptores estrogênicos. As afinidades de ligação da genisteína, dihidrogenisteína e equol ao receptor beta são comparáveis à afinidade de ligação do 17 beta-estradiol. Apesar disso, a concentração mínima de isoflavonas requerida para a indução da expressão gênica é muito maior que a necessária para a ligação aos receptores alfa e beta. O equol é especialmente potente em induzir a transcrição em resposta à ligação aos receptores alfa. A genisteína liga-se

ao receptor beta com a mesma eficiência que o 17 beta-estradiol, mas a concentração requerida para induzir a transcrição é 10^4 vezes maior.

Em nosso estudo foi utilizada uma dose de 36,6 mg de isoflavonas por dia, que foi suficiente para permitir uma concentração plasmática de isoflavonas da ordem de 100 nM de cada isoflavona analisada mesmo após 12 horas de jejum. Se compararmos com a concentração de estradiol detectada nas pacientes, mesmo as que fizeram reposição de estrógeno, verificamos uma diferença de concentração entre 10^3 e 10^4 vezes. Portanto, extrapolando os resultados do estudo *in vitro* de Morito *et al.* (2001) e comparando-os ao nosso estudo, poderíamos dizer que a concentração plasmática de isoflavonas detectadas no plasma das pacientes poderiam ser capazes de exercer algum efeito estrogênico.

Alguns estudos têm relatado que o consumo de isoflavonas reduz a concentração sérica de estradiol por regulação retroativa (Lu *et al.*, 1996; Mousavi *et al.*, 1993). Nagata *et al.* (2000) encontraram uma correlação negativa significativa entre o consumo de produtos de soja e as concentrações plasmáticas de estradiol em homens japoneses. Um outro estudo de Han *et al.* (2002) verificou que o uso de 100 mg de isoflavonas por dia durante 4 meses, por mulheres na menopausa, resultou em aumento da concentração plasmática de estradiol. Entretanto, o nosso estudo não mostrou nenhuma alteração da concentração de estradiol após 3 meses de tratamento com o gérmen de soja. Maskarinec *et al.* (2002) e Atkinson *et al.* (2004) não detectaram qualquer alteração de estradiol em mulheres pré-menopausa após o uso de 100 e 40 mg de isoflavonas, respectivamente por 1 ano.

Após a terapia de reposição hormonal simples ou combinada, observou-se uma redução do colesterol total e LDL-colesterol (figura 14). A associação do acetato de noretisterona ao 17 β -estradiol anulou o efeito da terapia simples em aumentar o HDL-

colesterol (figura 14). As isoflavonas presentes no gérmen de soja não modificaram o perfil lipídico em 3 meses de tratamento. Alguns trabalhos têm demonstrado redução de LDL-colesterol e aumento de HDL-colesterol após tratamento com isoflavonas de soja (Anthony *et al.*, 1996 e Crouse *et al.* 1999), enquanto outros não mostram alterações no perfil lipídico com o uso de isoflavonas (Greaves *et al.* 1999; Nestel *et al.* 1997). Esse efeito hipocolesterolêmico pode ser dependente do tempo de tratamento, das diferenças na composição de isoflavonas dos produtos e das doses utilizadas. A proteína da soja tem comprovada ação hipocolesterolêmica (FDA, 1999). As isoflavonas associadas a proteína da soja parecem ter uma efeito dose-dependente sobre os lipídeos plasmáticos (Fuhrman *et al.*, 1997), porém quando administradas de forma isolada parecem não ter efeito significativo (Greaves *et al.* 1999). Estudos recentes têm demonstrado que as isoflavonas inibem a HMG-CoA redutase *in vitro*, mas a concentração necessária para este efeito é elevada (maior que 27 μ M) (Sung *et al.*, 2004a; Sung *et al.*, 2004b).

A hipercolesterolemia está associada com uma produção aumentada de \cdot NO, radical superóxido ($O_2\cdot^-$) e peroxinitrito (Pereira *et al.*, 2003; Eid *et al.*, 2002). No plasma, a reação de \cdot NO com oxigênio gera nitrito, que rapidamente é oxidado a nitrato (Ignarro *et al.*, 1993). Assim, concentrações séricas de nitrato e nitrito (NO_x) são usadas como marcadores para a síntese de \cdot NO. Houve redução da concentração de óxidos de nitrogênio (NO_x) nos três grupos estudados após o tratamento. Barbacanne *et al.* (1999) encontraram aumento da atividade do \cdot NO, induzida pelos estrogênios, mas não observaram mudanças na expressão do gene da eNOS, ou da atividade dessa enzima, embora detectassem menor produção do radical superóxido. A diminuição da geração de superóxido derivado do endotélio, em resposta aos estrogênios, poderia aumentar a bioatividade do óxido nítrico por diminuir a sua inativação pela formação de peroxinitrito. Hayashi *et al.* (1997) verificaram que o 17 β -estradiol aumenta a atividade

da eNOS, mediada por receptor, sendo que altas concentrações de 17 β -estradiol tenderam a inibir a atividade da eNOS por uma via independente de receptor. Observou-se, ainda, que o 17 β -estradiol diminuiu a liberação de óxidos de nitrogênio (NOx) produzidos pela óxido nítrico sintase indutível (iNOS), em cultura de macrófagos. Neste estudo foi encontrada uma correlação positiva de entre concentrações de apo B e NOx (tabela 3), sugerindo que um controle das concentrações de LDL associado a redução da concentração de NOx na hipercolesterolemia pode ser benéfica, significando uma reversão do estresse oxidativo envolvido no aumento de sua produção.

A administração das isoflavonas reduziu significativamente a concentração plasmática dos derivados do óxido nítrico (NOx). As isoflavonas, em especial a genisteína, inibem a síntese de óxido nítrico por inibição das proteína tirosina quinases (Sargeant *et al.*, 1993, Orlicek *et al.*, 1996). Resultado semelhante foi encontrado após suplementação de coelhos machos hipercolesterolêmicos com isoflavonas da soja (Pereira, 2000), indicando que esse efeito pode ser independente do efeito estrogênico das isoflavonas. Estes achados estão de acordo com os de Yen & Lai (2003-a) mostrando que a administração oral de isoflavonas e extratos de produtos de soja reduz significativamente nitrito e nitrato em ratos tratados com LPS.

Apesar de reduzir a concentração plasmática de NOx, os 3 grupos tiveram um aumento da concentração de S-nitrosotióis. Isso demonstra que o óxido nítrico estaria mais biodisponível para formação de S-nitrosotióis, ao invés de ser degradado rapidamente. A alteração da atividade vasodilatadora na pós-menopausa pode resultar da degradação acelerada do $\cdot\text{NO}$ e/ou da sua menor conversão a RSNO's. As terapias de reposição hormonal estudadas tiveram efeitos semelhantes aos das isoflavonas sobre o aumento de S-nitrosotióis.

O 17 beta-estradiol bloqueia a indução da formação do peroxinitrito em cultura de células (Wang *et al.*, 2001), o que poderia estar relacionado ao aumento da concentração de nitrato e de nitrotirosina nas mulheres pós-menopausa em relação a pré-menopausa (Pereira *et al.*, 2003). A formação de peroxinitrito pode estar associada ao estradiol em outras condições patológicas. Maior incidência de câncer de mama está associada com a exposição a estrogênios (Henderson *et al.*, 1982; Bernstein, 1993). O metabolismo dos estrogênios está alterado na maioria dos tumores de câncer de mama. Estas alterações levam primariamente à formação de catecóis, que podem gerar superóxido (Paquette *et al.*, 2001). No câncer de mama, a atividade da *NO sintase está aumentada, resultando em aumento da produção de óxido nítrico, conseqüentemente, de peroxinitrito e de seus produtos de decomposição, que podem estar relacionados à lesão do DNA no câncer de mama (Paquette *et al.*, 2001). Por outro lado, não está claro o efeito da administração de estrogênios sobre a inativação do *NO . O tamoxifeno inibe a atividade da *NO sintase e a formação de nitrotirosina no cérebro de ratos (Osuka *et al.*, 2001).

No nosso trabalho apenas o grupo I teve a concentração de nitrotirosina reduzida. Além disso a concentração plasmática de gliciteína correlacionou-se positivamente com a redução de nitrotirosina (diferença entre tratamento e placebo, $r=0,568$, $p=0,04$), sugerindo que quanto maior a concentração de gliciteína, maior a redução de nitrotirosina. As propriedades antioxidantes das isoflavonas estão relacionadas com sua estrutura e aumentam em função do número de grupos hidroxila e da capacidade de doação de átomos de hidrogênio (Cao *et al.*, 1997). Compostos fenólicos podem inibir a nitração da tirosina por nitração preferencial, ou, atuar como doadores de elétrons (Pannala *et al.*, 1998). Isoflavonas têm similaridades estruturais com a tirosina em um dos seus anéis fenólicos e modificações de resíduos tirosina por

oxidantes gerados na inflamação, tais como ácido hipocloroso (HClO) e peroxinitrito (ONOO⁻), têm sido descritas recentemente. As isoflavonas genisteína, daidzeína e biocanina A podem ser cloradas e nitradas por esses oxidantes (Boersma *et al.* 1999). Recentes estudos têm demonstrado que a atividade antioxidante das isoflavonas podem prover proteção contra lesão do DNA mediada por óxido nítrico ou peroxinitrito em células e em plasmídeos (Yen & Lai, 2003-b) e podem também proteger contra a oxidação da LDL induzida por peroxinitrito (Lai & Yen, 2001). Considerando-se que as terapias de reposição hormonal não reduziram a formação de nitrotirosina, são necessários estudos adicionais para esclarecer o efeito da terapia de reposição hormonal sobre a inativação do ^{*}NO, pois o efeito das isoflavonas em reduzir a nitrotirosina parece ser independente da sua atividade estrogênica.

A figura 19 mostra que todas as terapias levaram a uma redução da concentração total dos óxidos analisados. Podemos verificar (figura 18) uma redução significativa de 7 alfa-hidroxicolesterol, 7 beta-hidroxicolesterol, beta-epoxicolesterol e alfa-epoxicolesterol após o tratamento com gérmen de soja. Os grupos E e E+P tiveram uma redução de 7 alfa-hidroxicolesterol, 7 beta-hidroxicolesterol e de alfa-epoxicolesterol. Salonen *et al.* (1997) verificaram que a concentração elevada de 7 beta-hidroxicolesterol foi um forte preditor de aumento do espessamento da carótida, avaliado por 3 anos, em pacientes com aterosclerose. O α -epoxicolesterol possui ação citotóxica sobre as células endoteliais (Lizard *et al.* 1997; Sevanian *et al.* 1995). Tanto na LDL nativa como na LDL⁻, o 7 ceto-olesterol é o principal óxido encontrado, seguido pelo epoxicolesterol e 7-hidroxicolesterol. O 7 beta-hidroxicolesterol mostrou uma grande diferença entre as subfrações, sendo 9 vezes mais elevado na LDL⁻ que na LDL nativa (Sevanian *et al.* 1997). No nosso trabalho, os principais óxidos encontrados nas mulheres pós-menopausa foram o 7 beta-hidroxicolesterol, beta-epoxicolesterol e alfa-epoxi-

colesterol, que também foram os mais reduzidos pelas isoflavonas. Foram encontradas baixas concentrações plasmáticas de 7 ceto-colesterol. Ao se analisar os dados de óxidos de colesterol relacionando-os ao colesterol total (figura 20), verifica-se que o progestógeno utilizado anula o efeito redutor do estradiol e que as isoflavonas são mais potentes que o estradiol em reduzir óxidos de colesterol. A correlação encontrada entre a concentração de equol e a concentração de 7 alfa-hidroxicolesterol (tabela 3) confirma o efeito antioxidante desta isoflavona.

Houve uma redução significativa da LDL⁻ nos 3 grupos, embora menos intensa com o uso do progestógeno (figura 21). Tikkanen *et al.* (1998) estudaram o efeito da proteína isolada da soja contendo 60 mg de isoflavonas por dia na oxidação da LDL em um grupo de seis voluntários saudáveis. Após duas semanas de consumo da soja verificou-se um aumento de 20 min no tempo de indução da oxidação da LDL. Scheiber *et al.*, 2000 também verificaram um aumento de 9,9 % no tempo de indução da oxidação *in vitro* da LDL humana, após suplementação com proteína da soja contendo 60-70 mg de isoflavonas. Um outro estudo comparou a cinética de oxidação da LDL isolada de pessoas que consumiram tofu e carne e também verificaram um aumento do tempo de indução para os que consumiram tofu, além de significativa diminuição de colesterol e triglicerídeos totais (Ashton *et al.* 2000). Estes estudos mostram que a ação antioxidante é um dos mecanismos que determinam o efeito antiaterogênico das isoflavonas. A figura 22 mostra que após correção dos dados de LDL⁻ por concentração de LDL-colesterol, apenas as isoflavonas reduzem significativamente LDL⁻.

Vários estudos têm mostrado a ação antioxidante dos estrogênios *in vitro* e *in vivo*. A adição de estrogênios a um sistema de oxidação da LDL, mediado por cobre, mostrou aumento do tempo de iniciação da oxidação da LDL (Zhu *et al.*, 1999). Vários trabalhos têm demonstrado o efeito da administração de estrogênios sobre a oxidação da

LDL humana (Brussard *et al.*, 1997; McManus *et al.*, 1997; McKinney *et al.*, 1997). Alguns estudos verificaram que os progestógenos podem inibir o efeito antioxidante dos estrogênios (Zhu *et al.*, 2000; McManus *et al.*, 1997). No nosso trabalho encontramos uma correlação negativa entre concentração plasmática de estradiol e diversos óxidos de colesterol no grupo E (tabela 3). Correlação similar não foi encontrada no grupo E+P, indicando uma interferência do progestógeno sobre o efeito antioxidante do estradiol. Estudos *in vitro* demonstram que o estradiol é mais efetivo que o alfa-tocoferol ou o beta-caroteno em inibir a formação de óxidos de colesterol (Ayres *et al.*, 1996). A LDL⁻ é uma partícula rica em óxidos de colesterol e em PAF-AH. No nosso trabalho o estradiol reduziu as concentrações absolutas de LDL⁻. Yoshimura *et al.*, 1999 reportou que a terapia de reposição hormonal reduz a atividade plasmática de PAF-AH. Para redução da toxicidade da LDL⁻ este efeito é benéfico, mas a redução da atividade da PAF-AH pode facilitar a agregação plaquetária estando relacionada aos efeitos pró-trombogênicos do estradiol, opondo-se aos seus efeitos protetores. Não há trabalhos na literatura avaliando o efeito das isoflavonas sobre a atividade desta enzima, embora se saiba que isoflavonas possuem atividade anti-plaquetária (Williams e Clarkson, 1998).

Apesar de não ter havido redução de colesterol total e LDL-colesterol com o uso do gérmen a soja, as isoflavonas se mostraram mais eficientes que a terapia de reposição hormonal na redução da LDL⁻ e de óxidos de colesterol, pois além dos efeitos estrogênico e antioxidante, nesse trabalho foi mostrado uma sequência de efeitos que pode ter potencializado a sua ação sobre a redução do estresse oxidativo. Hwang *et al.* (2003) verificaram que o equol inibe a produção de superóxido em cultura de células endoteliais, inibindo a oxidação da LDL *in vitro*. Genisteína e derivados lipofílicos da genisteína acumulam-se nas partículas de lipoproteínas (Kaamanen *et al.* 2003). Estes derivados lipofílicos seriam monoésteres de ácidos graxos que se incorporam à LDL e

HDL aumentando a sua resistência à oxidação, semelhante ao que ocorre com o metabolismo do estradiol (Helisten *et al.* 2001). Yamakoshi *et al.* (2000) verificaram que o aumento da proteção antioxidante da LDL e o efeito ateroprotetor das isoflavonas é independente do perfil lipídico plasmático, resultado semelhante ao que nós encontramos.

Alguns estudos demonstram que após seis meses de terapia de reposição hormonal, ocorre uma redução da concentração de homocisteína (Hak *et al.* 2000; Man *et al.* 2001). Em contraste, os resultados mostrados neste trabalho não indicaram uma redução de homocisteína pelas terapias de reposição hormonal utilizadas. A exposição das células endoteliais à homocisteína por períodos longos (>3h) diminui a liberação de NO , enquanto que a exposição aguda (<15 min) induz um aumento na liberação de NO . A explicação para esse fato é que no primeiro momento ocorre a formação de S-NO-homocisteína. Paralelamente, ocorre a liberação de H_2O_2 que degrada a S-NO-homocisteína, gerando a tiolactona da homocisteína, produto tóxico para o endotélio (Stamler *et al.*, 1995). A degradação da S-NO-homocisteína também resulta na formação de nitrato.

Os *et al.* (2002) verificaram que a terapia de reposição hormonal não altera as concentrações plasmáticas de homocisteína em mulheres com doença cardiovascular estabelecida. Este não é o caso do nosso estudo, porém as mulheres estudadas eram hipertensas, o que pode ter influenciado o resultado. Hiperhomocisteinemia limita a biodisponibilidade do óxido nítrico, aumenta o estresse oxidativo, estimula a proliferação de células do músculo liso vascular e altera as propriedades elásticas da parede vascular, estando portanto, relacionada à hipertensão (Rodrigo *et al.*, 2003).

Com a redução de NO_x , óxidos de colesterol, LDL e aumento de S-nitrosotíóis, seria esperada uma melhora da reatividade vascular nos 3 grupos estudados. Apenas o

grupo E mostrou melhora significativa da reatividade vascular, a associação com o progestógeno impediu esse efeito. A terapia de reposição hormonal não melhora a reatividade vascular em mulheres na menopausa com angina pectoris (Haines *et al.* 2001), mas melhora em mulheres saudáveis (Yim *et al.* 1998). A hipertensão arterial poderia ser aqui um fator limitante para o nosso estudo. A reatividade vascular está reduzida em pacientes hipertensos (Gokce *et al.* 2001). Os medicamentos anti-hipertensivos (inibidores da ECA) utilizados pelas pacientes também poderiam influenciar nos resultados, porém as pacientes foram controle delas mesmas e durante todo o estudo a medicação anti-hipertensiva não foi alterada. Estudos recentes mostram que inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA) não alteram a reatividade vascular (Ghiadoni *et al.* 2003; Gokce *et al.* 2002).

As isoflavonas não melhoraram a reatividade vascular. Estes resultados são concordantes com os de Hale *et al.* (2002) que utilizaram 80 mg de isoflavonas em mulheres na menopausa por 2 semanas e não obtiveram melhora da reatividade vascular. Squadrito *et al.* (Squadrito *et al.* 2003; Squadrito *et al.* 2002) encontraram uma melhora da reatividade vascular após 6 meses (2002) e 1 ano (2003) de uso de genisteína purificada (50 mg). Neste caso, três fatores devem ser levados em consideração:

- 1) A dose utilizada de genisteína; a genisteína é a isoflavona mais estudada e a maioria dos efeitos biológicos atribuídos às isoflavonas são devidos à genisteína. A genisteína é inibidora de proteína tirosina quinases (Sargeant *et al.*, 1993). Dentre as isoflavonas, a genisteína é a que tem um maior potencial estrogênico e efeito seletivo em receptores beta-estrogênicos (Kuiper *et al.*, 1998). Havia sido demonstrada anteriormente ação vasodilatadora da genisteína em macacos (Honoré *et al.*, 1997). No nosso estudo utilizou-se uma dose total de isoflavonas de 36,64

mg, sendo 4,52 mg de genisteína e 21,64 mg de gliciteína. A dose utilizada por Squadrito *et al.* (2002 e 2003) resultou em uma concentração plasmática de genisteína de 1,4 uM, aproximadamente 10 vezes maior que a encontrada em nosso estudo.

- 2) O tempo de tratamento. No nosso estudo o tempo de tratamento foi de 3 meses, nos estudos de Squadrito, 6 meses (2002) e 1 ano (2003). Estudos com resultados mais consistentes têm utilizado um tempo mínimo de 6 meses para efeitos mais eficazes das isoflavonas (Foth *et al.*, 2000). Isso talvez seja necessário para uma adaptação do organismo ou a uma adaptação da própria flora bacteriana intestinal para o metabolismo das isoflavonas (Xu *et al.*, 1995; Friend *et al.*, 1984).
- 3) No nosso estudo utilizamos mulheres com fatores de risco para doença cardiovascular (hipercolesterolemia e hipertensão), que já possuem uma deficiência da reatividade vascular. Portanto, o resultado encontrado relativo à reatividade vascular poderia estar relacionado ao fato de que não verificamos redução da hipercolesterolemia durante o tratamento. Os estudos de Squadrito *et al.* verificaram melhora da reatividade vascular em mulheres isentas de fatores de risco para doença cardiovascular.

Embora não tenhamos encontrado uma melhora significativa da reatividade vascular, foi verificada uma correlação positiva das concentrações de genisteína e daidzeína com a reatividade vascular após o tratamento (figuras 33 e 34), sugerindo que, possivelmente, maiores concentrações plasmáticas de isoflavonas poderiam melhorar a reatividade vascular. A administração de daidzeína em ratos aumenta a produção de óxido nítrico e melhora a vasodilatação induzida por acetilcolina (Sobey *et al.*, 2004). Estudos *in vitro* têm mostrado que genisteína exerce efeito bifásico no crescimento de células de câncer de mama, estimulando o crescimento em baixas concentrações (<10

mM) e inibindo em altas concentrações (>10 μ M) (Magee *et al.* 2004a; Magee *et al.* 2004b). Não há estudos que correlacionem concentração plasmática de isoflavonas com reatividade vascular, mas seria importante avaliar se este efeito bifásico também ocorre sobre fatores relacionados a vasodilatação. Diante destes resultados, acreditamos que os fatores dose, tempo de tratamento e composição das isoflavonas são fatores importantes que afetaram este trabalho.

Não foram encontradas alterações significativas de anticorpos anti-HSP60 neste estudo. Apenas o tratamento com isoflavonas reduziu anticorpos anti-HSP70. Os 3 tratamentos levaram a redução de anticorpos anti-HSC70. Pereira (2000) encontrou uma redução tanto da expressão de HSP60, HSC70 e HSP70 na aorta de coelhos machos alimentados com uma dieta aterogênica suplementada de isoflavonas como de anticorpos anti-HSP60, HSC70 e HSP70 no soro e na aorta dos coelhos. Este resultado foi atribuído à atividade antioxidante das isoflavonas e à inibição de proteína tirosina-quinases pela genisteína. No presente estudo, o tempo de tratamento pode ter sido muito curto para alterar a resposta anticórpica das pacientes. Além disso, a dose baixa de genisteína pode ter sido um fator importante para o resultado obtido. Estudos têm demonstrado uma relação mais estreita de anticorpos anti-HSP60 com risco de aterosclerose. Uint *et al.* (2003) observaram um aumento de anticorpos anti-HSP60 após terapia de reposição hormonal por 3 meses. Porém, neste estudo foram utilizados estrogênios equinos conjugados e acetato de medroxiprogesterona. Vários estudos têm demonstrado que estrogênios equinos conjugados (Decensi *et al.* 2002; Manson *et al.* 2003) aumentam o risco de doença cardiovascular em relação ao 17 beta-estradiol. Estrogênios regulam a expressão de HSP (70 e 90) no endométrio humano e em várias linhagens celulares humanas (Papaconstantinou *et al.* 2003; Tang *et al.* 1995). Coração de ratas têm 2 vezes mais HSP72 (HSC70) que de ratos e 17 β -estradiol aumenta a

concentração de HSP72, mas não de HSP60 em miócitos cardíacos (Voss *et al.* 2003). Portanto, é possível que a terapia hormonal altere a resposta autoimune a essas proteínas, porém são necessários mais estudos para avaliar o papel do estradiol sobre a formação de anticorpos anti-HSPs e sua relação com a aterogênese na menopausa.

A redução da formação de óxidos de nitrogênio, o conseqüente aumento da formação de S-nitrosotióis, a redução de óxidos de colesterol e LDL⁻ pela terapia de reposição hormonal e isoflavonas da soja são fatores que poderiam ter efeitos benéficos sobre a vasodilatação e o desenvolvimento da aterosclerose na mulher pós-menopausa, em especial nos grupos com fatores de risco para essa doença. Os efeitos das isoflavonas parecem ser mediados pela inibição das proteína tirosina quinases e pelo efeito estrogênico e esses resultados abrem novas perspectivas para futuras pesquisas, em relação à eficiência do uso de fitoestrogênios como uma alternativa de reposição hormonal, sobre a função endotelial e a prevenção da aterosclerose em mulheres pós-menopausa.

Um conhecimento mais específico da atuação dos estrogênios nos ER- α e ER- β e suas ações diretas e indiretas traz a possibilidade de no futuro surgirem terapias hormonais específicas para o tratamento de doenças cardiovasculares, como por exemplo um modulador seletivo de receptores de estrogênio. Estas perspectivas têm dado espaço a pesquisas em relação a atuação de fitoestrogênios como alternativas para terapia de reposição hormonal na prevenção de doenças cardiovasculares.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÕES

1- O tratamento com 2 g de gérmen de soja contendo 36,6 mg de isoflavonas por dia não alterou as concentrações plasmáticas de estradiol nem o perfil lipídico.

2- A terapia de reposição hormonal com 17 β -estradiol e sua associação com acetato de noretisterona reduziu colesterol plasmático e da LDL, mas apenas o 17 β -estradiol isolado aumentou o HDL-colesterol. A associação com o acetato de noretisterona reverteu o benefício do estradiol isolado sobre o HDL-colesterol.

3- O gérmen de soja e as terapias de reposição hormonal utilizadas neste estudo reduziram as concentrações plasmáticas dos derivados do óxido nítrico (NOx, nitrito/nitrato) e aumentaram a concentração plasmática de S-nitrosotióis, podendo significar uma melhora da biodisponibilidade do óxido nítrico. Dos três tratamentos propostos, somente o gérmen de soja reduziu as concentrações plasmáticas de nitrotirosina.

4- Os três tratamentos reduziram o perfil de oxidação de lipoproteínas (óxidos de colesterol e LDL), sendo que com o gérmen de soja este efeito foi mais pronunciado.

5- Os três tratamentos reduziram a reatividade de anticorpos anti-HSC70, mas somente o gérmen de soja reduziu a reatividade de anticorpos anti-HSP70. Não houve alteração da reatividade de anticorpos anti-HSP60 e das concentrações de homocisteína e outros tióis relacionados ao seu metabolismo (metionina e cisteína) por nenhum dos tratamentos.

6- O tratamento com estradiol isolado teve um efeito benéfico sobre a reatividade vascular. Os benefícios obtidos na reatividade vascular com o estradiol foram abolidos pela associação com a noretisterona. Embora não tenha havido uma melhora da reatividade vascular com o uso do gérmen de soja, os resultados mostraram uma correlação positiva das concentrações plasmáticas de genisteína e daidzeína com a reatividade vascular.

RESUMO E ABSTRACT

7. RESUMO

A interrupção da produção ovariana do estrogênio ocorrida na menopausa aumenta o risco de doença cardiovascular. Pelo fato da reposição de estrogênios induzir proliferação endometrial e aumentar o risco de câncer de mama e de doenças cardiovasculares, tem-se pesquisado alternativas para a terapia de reposição hormonal. Os fitoestrogênios são compostos fenólicos de origem vegetal, que possuem similaridade estrutural com os estrogênios. As isoflavonas genisteína, daidzeína e gliciteína, presentes na soja, têm se destacado por seus efeitos estrogênico, antioxidante e de inibição da agregação plaquetária. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito dos fitoestrogênios da soja e da terapia de reposição hormonal sobre a reatividade vascular, formação de derivados do óxido nítrico, oxidação de lipoproteínas e anticorpos anti-proteínas de choque térmico (HSPs) em mulheres pós-menopausa hipercolesterolêmicas. As mulheres foram tratadas com gérmen de soja (I, n=20); 17 beta-estradiol (E, n=17) ou 17 beta-estradiol + acetato de noretisterona (E+P, n=18), por 3 meses, após 1 mês de placebo. Foram avaliadas as concentrações plasmáticas de NOx (nitrito + nitrato) e S-nitrosotióis por quimioluminescência em fase gasosa; a nitrotirosina, os anticorpos anti-HSP (HSP60, HSP70 e HSC70), a LDL eletronegativa (LDL⁻) e o estradiol por determinados por ELISA; a quantificação dos óxidos de colesterol (COx) e das isoflavonas foi realizada, respectivamente, por cromatografia gasosa e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A análise da reatividade vascular foi feita por ultrassonografia de alta resolução. Os resultados demonstraram redução das concentrações de NOx, LDL⁻, COx e dos anticorpos anti-HSC70 e um aumento dos S-nitrosotióis, nos três grupos estudados, após o tratamento em relação ao placebo. As concentrações de nitrotirosina e a reatividade anti-HSP70 foram reduzidas

somente no grupo que recebeu os fitoestrogênios (grupo I). Houve melhora da reatividade vascular somente no grupo E, porém no grupo I foi encontrada uma correlação positiva entre a concentração plasmática de isoflavonas e a reatividade vascular. Conclusão: Os fitoestrógenos do germen de soja e a terapia de reposição hormonal têm importantes efeitos sobre a biodisponibilidade do óxido nítrico (reduzindo os NOx e aumentando os S-nitrosotióis), na redução da oxidação de lipoproteínas (COx e LDL-) e na resposta autoimune à HSC70. Embora apenas a terapia com estradiol isolado tenha melhorado a reatividade vascular, houve uma correlação positiva entre as concentrações plasmáticas de isoflavonas e a reatividade vascular.

8. ABSTRACT

The interruption of the ovarian production of the estrogen occurred in the menopause increases the risk of cardiovascular disease. Because the replacement of estrogen induces endometrial proliferation and increases the risk of breast cancer and cardiovascular disease, alternatives for the hormonal replacement therapy have been searched. The phytoestrogens are phenolic compounds from plants that possess structural similarity with estrogens. The soy isoflavones genistein, daidzein and glycitein have been notable for their estrogenic, antioxidant and platelet aggregation inhibition effects. The objective of this work was to evaluate the effect of the soy phytoestrogens and the hormonal replacement therapy on vascular reactivity, formation of nitric oxide derivates, lipoprotein oxidation and antibodies anti-heat shock proteins (HSPs) in hypercholesterolemic postmenopausal women. The women were treated with soy germ (I, n=20); 17 beta-estradiol (E, n=17) or 17 beta-estradiol + noretisterone acetate (E+P, n=18) for 3 months after 1 month of placebo. The plasmatic concentrations of NOx (nitrite + nitrate) and S-nitrosothiols were evaluated by chemiluminescence in gaseous phase; nitrotyrosine, antibodies anti-HSPs (HSP60, HSP70 and HSC70), electronegative LDL (LDL⁻) and estradiol by ELISA; cholesterol oxides (COx) and isoflavones were determined by gas chromatography and high performance liquid chromatography (HPLC), respectively. The analysis of the vascular reactivity was done by high resolution ultrasonography. Data showed a reduction of NOx, LDL⁻, COx, antibodies anti-HSC70 and an increase of S-nitrosothiols after the treatment in the 3 groups evaluated in relation to the placebo. The concentrations of nitrotyrosine and reactivity anti-HSP70 were reduced only in group I. There was an improvement of the vascular reactivity only in group E, however, it was found a positive correlation between

plasmatic concentrations of isoflavones and vascular reactivity in group I. Conclusion: The phytoestrogens of the soy germ and the hormonal replacement therapy have important effects on the bioavailability of nitric oxide (reducing NOx and increasing S-nitrosothiols); in the reduction of the oxidation of lipoproteins (COx and LDL) and on the autoimmune response anti-HSC70. Although only the isolated therapy with estradiol improved the vascular reactivity, there was a positive correlation between plasmatic concentrations of isoflavones and vascular reactivity.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACS, N.; SZEKAES, B.; NADASY, G.L.; VARBIRO, S.; MIKLOS, Z.; SZENTIVANYI Jr., M.; MONOS, E. Effects of combined sex hormone replacement therapy on small artery biomechanics in pharmacologically ovariectomized rats. *Maturitas*, Amsterdam, v.34, n.1, p.83-92, 2000.
- ADAMS, M.R.; CLARKSON, T.B.; KORITNIK, P.R.; NASH, H.A. Contraceptive esterooids and coronary artery atherosclerosis in cynomologus macaques. *Fertil. Steril.*, Birmingham, v.47, p.1010-1018, 1987.
- ADAMS, M.R.; KAPLAN, J.R.; MANUCK, S.B.; KORITNIK, D.R., PARKS, M.S.; WOLF, M.S.; CLARKSON, T.B. Inhibition of coronary artery atherosclerosis by 17-beta estradiol in ovariectomized monkeys. *Arteriosclerosis*, Amsterdam, v.10, p.1051-1057, 1990.
- ADAMS, M.R.; REGISTER, T.C.; GOLDEN, D.L.; WAGNER, J.D.; WILLIAMS, J.K. Medroxioprogesteroni acetate antagonizes inhibitory effects of conjugated equine estrogens on coronary artery atherosclerosis. *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.*, Hagerstown, v.17, p.217-221, 1997.
- ADLERCREUTZ, H. Phytoestrogens: epidemiology and possible role in cancer protection. *Environ. Health Perspect.*, Cary, v.103, p.103-112, 1995.
- AFEK, A.; GEORGE, J.; GILBURD, B.; RAUOVA, L.; GOLDBERG, I.; KOPOLOVIC, J.; HARATS, D.; SHOENFELD, Y. Immunization of Low-density Lipoprotein Receptor Deficient (LDL-RD) Mice with Heat Shock Protein 65 (HSP-65) promotes early atherosclerosis. *J. Autoimmun.*, Amsterdam, v.14, p.115-121, 2000.
- AL-KHALILI, F.; ERIKSSON, M.; LANDGREN, B.M.; SCHENCK-GUSTAFSSON, K. Effect of conjugated estrogen on peripheral flow-mediated vasodilatation in postmenopausal women. *Am. J. Cardiol.*, Philadelphia, v.82, n.2, p.215-218, 1998.
- ANDERSON, G.L.; LIMACHER, M.; ASSAF, A.R.; BASSFORD, T.; BERESFORD, S.A.; BLACK, H.; BONDS, D.; BRUNNER, R.; BRZYSKI, R.; CAAN, B.; CHLEBOWSKI, R.; CURB, D.; GASS, M.; HAYS, J.; HEISS, G.; HENDRIX, S.; HOWARD, B.V.; HSIA, J.; HUBBELL, A.; JACKSON, R.; JOHNSON, K.C.; JUDD, H.; KOTCHEN, J.M.; KULLER, L.; LACROIX, A.Z.; LANE, D.; LANGER, R.D.; LASSER, N.; LEWIS, C.E.; MANSON, J.; MARGOLIS, K.; OCKENE, J.; O'SULLIVAN, M.J.; PHILLIPS, L.; PRENTICE, R.L.; RITENBAUGH, C.; ROBBINS, J.; ROSSOUW, J.E.; SARTO, G.; STEFANICK, M.L.; VAN HORN, L.; WACTAWSKI-WENDE, J.; WALLACE, R.; WASSERTHEIL-SMOLLER, S.; WOMEN'S HEALTH INITIATIVE STEERING COMMITTEE. Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the women's health initiative randomized controlled trial. *JAMA, J. Am. Med. Assoc.*, Chicago, v.291, n.14, p.1701-1712, 2004.
- ANTHONY, M.S.; CLARKSON, T.B.; HUGLES, C.L.; MORGAN, T.M.; BURKE, G.L. Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive sistem of peripubertal rhesus monkeys. *J. Nutr.*, Bethesda, v.126, p.43-50, 1996.

- ARORA, A.; NAIR, M.G.; STRASBURG, G.M. Antioxidant activities of isoflavones and their biological metabolites in a liposomal system. *Arch. Biochem. Biophys.*, New York, v.356, n.2, p.133-141, 1998.
- ASHTON, E.L.; DALAIS, F.S.; BALL, M.J. Effect of meat replacement by tofu on CHD risk factors including copper induced LDL oxidation. *J. Am. Coll. Nutr.*, Denville, v.19, n.6, p.761-767, 2000.
- ATKINSON, C.; WARREN, R.M.; SALA, E.; DOWSETT, M.; DUNNING, A.M.; HEALEY, C.S.; RUNSWICK, S.; DAY, N.E.; BINGHAM, S.A. Red-clover-derived isoflavones and mammographic breast density: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Breast Cancer Res.*, London, v.6, n.3, p.R170-R179, 2004.
- AVIRAM, M. Modified forms of low density lipoprotein and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, Amsterdam, v.98, n.1, p.1-9, 1993.
- AVOGARO, P.; BITTOLO-BON, G. CAZZOLATO, G. Isolation and partial characterization of an oxidized LDL in humans. *Basic Life Sci.*, New York, v.49, p.391-396, 1988.
- AVOGARO, P.; CAZZOLATO, G.; BITTOLO-BOM, G. Some questions concerning a small, more electronegative LDL circulating in human plasma. *Atherosclerosis*, Amsterdam, v.91, n.1/2, p.163-171, 1991.
- AYRES, S.; TANG, M.; SUBBIAH, M.T. Estradiol-17beta as an antioxidant: some distinct features when compared with common fat-soluble antioxidants. *J. Lab. Clin. Med.*, Orlando, v.128, n.4, p.367-375, 1996.
- BACHE, R.; PFENNING, N. Selective isoflation of *Acetobacterium woodii* on methoxylated aromatic acids and determination of growth yields. *Arch. Microbiol.*, Heidelberg, v.130, p.255-261, 1981.
- BARBACANNE, M.A.; RAMI, J.; MICHEL, J.B.; SOUCHARD, J.P.; PHILIPPE, M.; BESOMBES, J.P.; BAYARD, F.; ARNAL, J.F. Estradiol increases rat aorta endothelium-derived relaxing factor (EDRF) activity without changes in endothelial NO synthase gene expression: possible role of decreased endothelium-derived superoxide anion production. *Cardiovasc. Res.*, Amsterdam, v.41, n.3, p.672-681, 1999.
- BARRETT-CONNOR, E.; GRADY, D. Hormone replacement therapy, heart disease, and other considerations. *Annu. Rev. Public Health*, Palo Alto, v.19, p.55-72, 1998.
- BECKMAN, J.S.; YE, Y.Z.; ANDERSON, P.G.; CHEN, J.; ACCAVITTI, M.A.; TARPEY, M.M.; WHITE, C.R. Extensive nitration of phenolics by peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.*, New York, v.288, p.438-444, 1992.
- BELLMANN, K.; BURKART, V.; BRUCKHOFF, J.; KOLB, H.; LANDRY, J. p38-dependent enhancement of cytokine-induced nitric-oxide synthase gene expression by heat shock protein 70. *J. Biol. Chem.*, Birmingham, v.275, n.24, p.18172-18179, 2000.
- BERNSTEIN, L.; ROSS, R.K. Endogenous hormones and breast cancer risk. *Epidemiol. Rev.*, Baltimore, v.15, p.48-65, 1993.
- BIST, A.; FIELDING, P.E.; FIELDING, C.J. Two sterol regulatory element-like sequences mediate up-regulation of caveolin gene transcription in response to low density lipoprotein free cholesterol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Saint Louis, v.94, n.20, p.10693-10698, 1997.

- BOERSMA, B.J.; PATEL, R.P.; KIRK, M.; JACKSON, P.L.; MUCCIO, D.; DARLEY-USMAR, V.M.; BARNES, S. Chlorination and nitration of soy isoflavones. *Arch. Biochem. Biophys.*, New York, v.368, n.2, p.265-275, 1999.
- BOJE, K.M.; FUNG, H.L. Endothelial nitric oxide generating enzyme(s) in the bovine aorta: subcellular location and metabolic characterization. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Bethesda, v.253, n.1, p.20-26, 1990.
- BOSTOM, A.G.; LATHROP, L. Hyperhomocysteinemia in end-stage renal disease: prevalence, etiology, and potential relationship to arteriosclerotic outcomes. *Kidney Int.*, Malden, v.52, n.1, p.10-20, 1997.
- BRUSSARD, H.E.; GEVERS LEUVEN, J.A.; KLUFT, C.; KRANS, H.M.; VAN DUYNENVOORDE, W.; BUYTENHEK, R.; VAN DER LAARSE, A.; PRINCEN, H.M. Effect of 17beta-estradiol on plasma lipids and LDL oxidation in postmenopausal woman with tipe II diabetes mellitus. *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.*, Hagerstown, v.17, p.324-339, 1997.
- BUCKLEY AR, BUCKLEY DJ, GOUT PW, LIANG H, RAO YP, BLAKE MJ. Inhibition by genistein of prolactin-induced Nb2 lymphoma cell mitogenesis. *Mol Cell Endocrinol*, v. 98, n.1, p.17-25, 1993.
- CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R.L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biol. Med.*, Orlando, v.22, n.5, p.749-760, 1997.
- CHEN, W.; SYLDATH, U.; BELLMANN, K.; BURKART, V.; KOLB, H. Human 60-kDa heat-shock protein: a danger signal to the innate immune system. *J. Immunol.*, Bethesda, v.162, p.3212-3219, 1999.
- COLLINS, P.; ROSANO, G.M.C.; SARREL, P.M. 17 beta-estradiol attenuates acetylcholine-induced coronary arterial constriction in women but not men with coronary heart disease. *Circulation*, Hagerstown, v.92, p.24-30, 1995.
- CROUSE, J.R.; MORGAN, T.M.; TERRY, J.G.; ELLIS, J.; VITOLINS, M.; BURKE, G.L. A randomized trial comparing the effect of casein with that of soy protein containing varying amounts of isoflavones on plasma concentrations of lipids and lipoproteins. *Arch. Intern. Med.*, Chicago, v.159, p.2070-2076, 1999.
- DAMASCENO, N.R.T. *Influência das isoflavonas extraídas da soja na hipercolesterolemia e na aterosclerose experimental induzida pela caseína*. São Paulo, 2001. 119p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
- DARLEY-USMAR, V.M.; HOGG, N.; O'LEARY, V.J.; MONCADA, S. The simultaneous generation of superoxide and nitric oxide can initiate lipid peroxidation in human low density lipoprotein. *Free Radical Res. Commun.*, New York, v.17, p.9-20, 1992.
- DAY, A.J.; DUPONT, M.S.; RIDLEY, S.; RHODES, M.; RHODES, M.J.; MORGAN, M.R.; WILLIAMSON, G. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. *FEBS Lett.*, Amsterdam, v.436, n.1, p.71-75, 1998.
- DE CASTELLARNAU, C.; SANCHEZ-QUESADA, J.L.; BENITEZ, S.; ROSA, R.; CAVEDA, L.; VILA, L.; ORDONEZ-LLANOS, J. Electronegative LDL from normolipemic subjects induces IL-8 and monocyte chemotactic protein secretion by human endothelial cells. *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.*, Hagerstown, v.20, n.10, p.2281-2287, 2000.

- DECENSI, A.; OMODEI, U.; ROBERTSON, C.; BONANNI, B.; GUERRIERI-GONZAGA, A.; RAMAZZOTTO, F.; JOHANSSON, H.; MORA, S.; SANDRI, M.T.; CAZZANIGA, M.; FRANCHI, M.; PECORELLI, S. Effect of transdermal estradiol and oral conjugated estrogen on C-reactive protein in retinoid-placebo trial in healthy women. *Circulation*, Hagerstown, v.106, n.10, p.1224-1228, 2002.
- DECKERT, V.; BRUNET, A.; LANTOINE, F.; LIZARD, G.; MILLANVOYE-VAN BRUSSEL, E.; MONIER, S.; LAGROST, L.; DAVID-DUFILHO, M.; GAMBERT, P.; DEVYNCK, M.A. Inhibition by cholesterol oxides of NO release from human vascular endothelial cells. *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.*, Hagerstown, v.18, n.7, p.1054-1060, 1998.
- DREXER, H.; ZEIHNER, A.M. Endothelial function in human coronary arteries *in vivo*: focus on hypercholesterolemia. *Hypertension*, Hagerstown, v.18, suppl.2, p.90-99, 1991.
- EGGERTH, A.H. The gram-positive non-spore-bearing anaerobic bacilli of human feces. *J. Bacteriol.*, Washington, v.30, p.277-299, 1935.
- EID, H.M.; LYBERG, T.; LARSEN, J.; ARNESEN, H.; SELJEFLOT, I. Reactive oxygen species generation by leukocytes in populations at risk for atherosclerotic disease. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, Oslo, v.62, p.431-439, 2002.
- EISERICH, J.P.; PATEL, R.P.; O'DONNELL, V.B. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. *Mol. Aspects Med.*, Amsterdam, v.19, n.4/5, p.221-357, 1998.
- FARHAT, M.Y.; LAVIGNE, M.C.; RAMWELL, P.W. The vascular protective effects of estrogen. *FASEB J.*, Bethesda, v.10, n.5, p.615-624, 1996.
- FIELDING, C.J. Caveolae and signaling. *Curr. Opin. Lipidol.*, Hagerstown, v.12, n.3, p.281-287, 2001.
- FIELDING, C.J.; BIST, A.; FIELDING, P.E. Caveolin mRNA levels are up-regulated by free cholesterol and down-regulated by oxysterols in fibroblast monolayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Saint Louis, v.94, n.8, p.3753-3758, 1997.
- FOTH, D.; CLINE, J.M.; ROMER, T. Effect of isoflavones on mammary gland and endometrium of postmenopausal macaques. *Zentralbl. Gynaekol.*, Stuttgart, v.122, p.96-102, 2000.
- FREIMAN, P.C.; MITCHELL, G.C.; HEISTAD, D.D.; ARMSTRONG, M.L.; HARRISON, D.G. Atherosclerosis impairs endothelium-dependent vascular relaxation to acetylcholine and thrombin in primates. *Circ. Res.*, Hagerstown, v.58, p.783-789, 1986.
- FREYSCHUSS, A.; XIU, R.J.; BENTHIN, G.; HENRIKSSON, P.; BJORKHEM, I.; WENNMALM, A. Dietary cholesterol induces transient changes in plasma nitrate levels in rabbits that are correlated to microcirculatory changes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Orlando, v.221, n.1, p.107-110, 1996.
- FRIEDEWALD, W.T.; LEVY, R.I.; FREDRICKSON, D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.*, Washington, v.18, p.499-502, 1972.
- FRIEND, D.R.; CHANG, G.W. A colon-specific drug-delivery system based on drug glycosides and the glycosidases of colonic bacteria. *J. Med. Chem.*, Columbus, v.27, n.3, p.261-266, 1984.

- FRIES, D.M.; PENHA, R.G.; D'AMICO, E.A.; ABDALLA, D.S.P.; MONTEIRO, H.P. Oxized low density lipoprotein stimulates nitric oxide release by rabbit aortic endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Orlando, v.207, n.1, p.231-237, 1995.
- FROSTEGARD, J.; KJELLMAN, B.; GIDLUND, M.; ANDERSON, B.; JINDAL, S.; KIESSLING, R. Induction of hest shok protein in monocytic cells by oxized low density lipoprotein. *Atherosclerosis*, Amsterdam, v.121, p.93-103, 1996.
- FUHRMAN, B.; BUCH, S.; VAYA, J.; BERLYNK, P.A.; COLEMAN, R.; HAYEK, T.; AVIRAM, M. Licorice extract and its major polyphenol glabridin protect low-density lipoprotein against lipid peroxidation: *in vitro* and ex vivo studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v.66, n.2, p.267-275, 1997.
- FURMAN, M.I.; GRIGORYEV, D.; BRAY, P.F.; DISE, K.R.; GOLDSCHMIDT-CLERMONT, P.J. Platelet tyrosine kinases and fibrinogen receptor activation. *Circ. Res.*, Hagerstown, v.75, n.1, p.172-180, 1994.
- GESQUIERE, L.; LOREAU, N.; BLACHE, D. Impaired cellular cholesterol efflux by oxysterol-enriched high density lipoproteins. *Free Radical Biol. Med.*, Orlando, v.23, n.4, p.541-547, 1997.
- GHIADONI, L.; MAGAGNA, A.; VERSARI, D.; KARDASZ, I.; HUANG, Y.; TADDEI, S.; SALVETTI, A. Different effect of antihypertensive drugs on conduit artery endothelial function. *Hypertension*, Hagerstown, v.41, n.6, p.1281-1286, 2003.
- GLUECK, C.J.; WANG, P.; FONTAINE, R.N.; SIEVE-SMITH, L.; LANG, J.E. Interaction of estrogen replacement therapy with the thrombophilic 20210 G/A prothrombin gene mutation for atherothrombotic vascular disease: a cross-sectional study of 275 hyperlipidemic women. *Metabolism*, Philadelphia, v.50, n.3, p.360-365, 2001.
- GOKCE, N.; DUFFY, S.J.; HUNTER, L.M.; KEANEY, J.F.; VITA, J.A. Acute hypertriglyceridemia is associated with peripheral vasodilation and increased basal flow in healthy young adults. *Am. J. Cardiol.*, Philadelphia, v.88, n.2, p.153-159, 2001.
- GOKCE, N.; HOLBROOK, M.; HUNTER, L.M.; PALMISANO, J.; VIGALOK, E.; KEANEY Jr., J.F.; VITA, J.A. Acute effects of vasoactive drug treatment on brachial artery reactivity. *J. Am. Coll. Cardiol.*, New York, v.40, n.4, p.761-765, 2002.
- GOLIGORSKY, M.S.; LI, H.; BRODSKY, S.; CHEN, J. Relationships between caveolae and eNOS: everything in proximity and the proximity of everything. *Am. J. Physiol.: Renal Physiol.*, Bethesda, v.283, n.1, p.F1-F10, 2002.
- GREAVES, D.R.; CHANNON, K.M. Inflammation and immune responses in atherosclerosis. *Trends Immunol.*, Amsterdam, v.23, n.11, p.535-541, 2002.
- GREAVES, K.A.; WILSON, M.D.; RUDEL, L.L.; WILLIAMS, J.K.; WAGNER, J.D. Intact dietary soy protein, but not adding an isoflavone-rich soy extract to casein, improves plasma lipids in ovariectomized cynomolgus monkeys. *J. Nutr.*, Bethesda, v.129, n.8, p.1585-1592, 1999.
- GRIFFITHS, L.A.; BARROW, A. Metabolism of flavonoid compounds in germ-free rats. *Biochem. J.*, Colchester, v.130, p.1161-1162, 1972.
- GRUBER, C.J.; TSCHUGGUEL, W.; SCHNEEBERGER, C.; HUBER, J.C. Mechanosms of disease: production and actions of estrogens. *N. Engl. J. Med.*, Waltham, v.346, n.5, p.340-352, 2002.

- HAARBO, J.; LETH-ESPENCEN, P.; STENDER, S.; CHRISTIANSEN, C. Estrogen monotherapy and combined estrogen-progestin replacement therapy attenuate aortic accumulation of cholesterol in ovariectomized cholesterol fed rabbits. *J. Clin. Invest.*, Ann Arbor, v.87, p.1274-1279, 1991.
- HAARBO, J.; SVENDSEN, O.L.; CHRISTIANSEN, C. Progestogens do not affect aortic accumulation of cholesterol in ovariectomized cholesterol fed rabbits. *Circ. Res.*, Hagerstown, v.70, n.6, p.1198-1202, 1992.
- HAINES, C.J.; YIM, S.F.; SANDERSON, J.E. The effect of continuous combined hormone replacement therapy on arterial reactivity in postmenopausal women with established angina pectoris. *Atherosclerosis*, Amsterdam, v.159, n.2, p.467-470, 2001.
- HAK, A.E.; POLDERMAN, K.H.; WESTENDORP, I.C.; JAKOBS, C.; HOFMAN, A.; WITTEMAN, J.C.; STEHOUWER, C.D. Increased plasma homocysteine after menopause. *Atherosclerosis*, Amsterdam, v.149, n.1, p.163-168, 2000.
- HALE, G.; PAUL-LABRADOR, M.; DWYER, J.H.; MERZ, C.N. Isoflavone supplementation and endothelial function in menopausal women. *Clin. Endocrinol.*, Oxford, v.56, n.6, p.693-701, 2002.
- HAN, K.K.; SOARES Jr., J.M.; HAIDAR, M.A.; DE LIMA, G.R.; BARACAT, E.C. Benefits of soy isoflavone therapeutic regimen on menopausal symptoms. *Obstet. Gynecol.*, Hagerstown, v.99, n.3, p.389-394, 2002.
- HANKE, H.; HANKE, S.P.; BRUCK, B. Inhibition of the protective effect of estrogen by progesterone experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis*, Amsterdam, v.121, p.129-138, 1996.
- HAYASHI, T.; YAMADA, K.; ESAKI, T.; MUTOH, E.; IGUCHI, A. Effect of estrogen on isoforms of nitric oxide synthase: possible mechanism of anti-atherosclerotic effect of estrogen. *Gerontology*, Basel, v.43, p.24-34, 1997.
- HELISTEN, H.; HOCKERSTEDT, A.; WAHALA, K.; TIITINEN, A.; ADLERCREUTZ, H.; JAUHAINEN, M.; TIKKANEN, M.J. Accumulation of high-density lipoprotein-derived estradiol-17beta fatty acid esters in low-density lipoprotein particles. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, Chevy Chase, v.86, n.3, p.1294-1300, 2001.
- HENDERSON, B.E.; ROSS, R.K.; PIKE, M.C.; CASAGRANDE, J.T. Endogenous hormones as a major factor in human cancer. *Cancer Res.*, Birmingham, v.42, p.3232-3239, 1982.
- HERRINGTON, D.M.; REBOUSSIN, D.M.; BROSNIHAN, K.B.; SHARP, P.C.; SHUMAKER, S.A.; SNYDER, T.E.; FURBERG, C.D.; KOWALCHUK, G.J.; STUCKEY, T.D.; ROGERS, W.J.; GIVENS, D.H.; WATERS, D. Effects of estrogen replacement on the progression of coronary-artery atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.*, Waltham, v.343, n.8, p.522-529, 2000.
- HIRATA, K.; MIKI, N.; KURODA, Y.; SAKODA, T.; KAWASHIMA, S.; YOKOYAMA, M. Low concentration of oxidized low-density lipoprotein and lysophosphatidylcholine upregulate constitutive nitric oxide synthase mRNA expression in bovine aortic endothelial cells. *Circ. Res.*, Hagerstown, v.76, n.6, p.958-962, 1995.
- HIRVONEN, M.R.; BRUNE, B.; LAPETINA, E.G.; Heat shock proteins and macrophage resistance to the toxic effects of nitric oxide. *Biochem. J.*, Colchester, v.315, p.845-849, 1996.

- HISHIKAWA, K.; NAKAKI, T.; MARUMO, H.; SUZUKI, H.; KATO, R.; SARUTA, T. Up-regulation of nitric oxide synthase by estradiol in human aortic endothelial cells. *FEBS Lett.*, Amsterdam, v.360, p.291-293, 1995.
- HODIS, H.N.; KRAMSCH, D.M.; AVOGARO, P.; BITTOLO-BOM, G.; CAZZOLATO, G.; HWANG, J.; PETERSON, H.; SEVANIAN, A. Biochemical and cytotoxic characteristics of an *in vivo* circulating oxidized low density lipoprotein (LDL-). *J. Lipid Res.*, Birmingham, v.35, n.4, p.669-677, 1994.
- HOL, T.; COX, M.B.; BRYANT, H.U.; DRAPER, M.W. Selective estrogen receptor modulators and postmenopausal women's health. *J. Womens Health*, Larchmont, v.6, n.5, p.523-531, 1997.
- HONORÉ, E.K.; WILLIAMS, J.K.; ANTONY, M.S.; CLARKSON, T.B. Soy isoflavones enhance coronary vascular reactivity in atherosclerotic female macaques. *Fertil. Steril.*, Birmingham, v.67, p.148-154, 1997.
- HSU, J.T.; YING, C.; CHEN, C.J. Regulation of inducible nitric oxide synthase by dietary phytoestrogen in MCF-7 human mammary cancer cells. *Reprod., Nutr., Dev.*, Les Ulis, v.40, n.1, p.11-18, 2000.
- HULLEY, S.; GRADY, D.; BUSH, T.; FURBERG, C.; HERRINGTON, D.; RIGGS, B.; VITTINGHOFF, E. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *JAMA, J. Am. Med. Assoc.*, Chicago, v.280, n.7, p.605-613, 1998.
- HUR, H.G.; RAFII, F. Biotransformation of the isoflavonoids biochanin A, formononetin, and glycitein by *Eubacterium limosum*. *FEMS Microbiol. Lett.*, Amsterdam, v.192, p.21-25, 2000.
- HUTCHINS, A.M.; SLAVIN, J.L.; LAMPE, J.W. Urinary isoflavonoid phytoestrogen and lignan excretion after consumption of fermented and unfermented soy products. *J. Am. Diet. Assoc.*, Chicago, v.95, p.545-551, 1995.
- HWANG, J.; WANG, J.; MORAZZONI, P.; HODIS, H.N.; SEVANIAN, A. The phytoestrogen equol increases nitric oxide availability by inhibiting superoxide production: an antioxidant mechanism for cell-mediated LDL modification. *Free Radical Biol. Med.*, Orlando, v.34, n.10, p.1271-1282, 2003.
- HWANG, P.L.; MATIN, A. Interactions of sterols with antiestrogen-binding sites: structural requirements for high-affinity binding. *J. Lipid Res.*, Birmingham, v.30, n.2, p.239-245, 1989.
- IAFRATI, M.D.; KARAS, R.H.; ARONOVITZ, M.; KIM, S.; SULLIVAN Jr., T.R.; LUBAHN, D.B.; O'DONNELL Jr., T.F.; KORACH, K.S.; MENDELSON, M.E. Estrogen inhibits the vascular injury response in estrogen receptor alpha-deficient mice. *Nat. Med.*, New York, v.3, n.5, p.545-548, 1997.
- IGNARRO, L.J.; FUKUTO, J.M.; GRISCAVAGE, J.M.; ROGERS, N.E.; BYRNS, R.E. Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Saint Louis, v.90, p.8103-8107, 1993.
- IMTHURN, B.; ROSSELLI, M.; JAEGER, A.W.; KELLER, P.J.; DUBEY, R.K. Differential effects of hormone-replacement therapy on endogenous nitric oxide (nitrite/nitrate) levels in postmenopausal women substituted with 17beta-estradiol valerate and cyproterone acetate or medroxyprogesterone acetate. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, Chevy Chase, v.82, p.388-394, 1997.
- INGRAM, D.; SANDERS, K.; KOLYBABA, M.; LOPEZ, D. Case-control study of phyto-estrogens and breast cancer. *Lancet*, London, v.350, n.9083, p.990-994, 1997.

- JOANNOU, G.E.; KELLI, G.E.; REEDER, A.Y.; WARING, M.A.; NELSON, C. A urinary profile study of dietary phytoestrogens: the identification and mode of metabolism of new isoflavonoids. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, Amsterdam, v.54, p.167-184, 1995.
- JOHNSON, A.D.; BERBERIAN, P.A.; TYTELL, M.; BOND, M.G. Differential distribution of 70-KD heat shock protein in atherosclerosis. *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.*, Hagerstown, v.15, p.27-36, 1995.
- KAAMANEN, M.; ADLERCREUTZ, H.; JAUHAINEN, M.; TIKKANEN, M.J. Accumulation of genistein and lipophilic genistein derivatives in lipoproteins during incubation with human plasma *in vitro*. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, v.1631, n.2, p.147-152, 2003.
- KANNEL, W.B.; HJORTHLAND, M.C.; McNAMARA, P.M.; GORDON, T. Menopause and risk of cardiovascular disease: the Framingham study. *Ann. Intern. Med.*, Philadelphia, v.85, p.447-452, 1976.
- KAPIOTIS S, HERMANN M, HELD I, SEELOS C, EHRINGER H, GMEINER BM. Genistein, the dietary-derived angiogenesis inhibitor, prevents LDL oxidation and protects endothelial cells from damage by atherogenic LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, Hagerstown, v.17, n.11, p.2868-74, 1997.
- KARAS, R.H.; HODGIN, J.B.; KWOUN, M.; KREGE, J.H.; ARONOVITZ, M.; MACKEY, W.; GUSTAFSSON, J.A.; KORACH, K.S.; SMITHIES, O.; MENDELSON, M.E. Estrogen inhibits the vascular injury response in estrogen receptor beta-deficient female mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Saint Louis, v.96, n.26, p.15133-15136, 1999.
- KAUFFMANN, R.F.; BRYANT, H.U. Selective estrogen receptor modulators. *Drug News Perspect.*, Barcelona, v.8, p.531-539, 1995.
- KAUFMANN, S.H.E. Heat shock proteins and the immune response. *Immunol. Today*, Amsterdam, v.11, p.129-136, 1990.
- 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*, Amsterdam, v.223, p.9-22, 1993.
- KIANG JG. Genistein inhibits herbimycin A-induced over-expression of inducible heat shock protein 70 kDa. *Mol Cell Biochem*, Dordrecht, v. 245, n.1-2, p.191-9, 2003.
- KING, R.A.; BROADBENT, J.L.; HEAD, R.J. Absorption and excretion of the soy isoflavone genistein in rats. *J. Nutr.*, Bethesda, v.126, p.176-182, 1996.
- KINJO, J.; TSUCHIHASHI, R.; MORITO, K.; HIROSE, T.; AOMORI, T.; NAGAO, T.; OKABE, H.; NOHARA, T.; MASAMUNE, Y. Interactions of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta (III). Estrogenic activities of soy isoflavone aglycones and their metabolites isolated from human urine. *Biol. Pharm. Bull.*, Tokyo, v.27, n.2, p.185-188, 2004.
- KOH, K.K.; BLUM, A.; HATHAWAY, L.; MINCEMOYER, R.; CSAKO, G.; WACLAWIN, M.A.; PANZA, J.A.; CANNON III, R.O. Vascular effects of estrogen and vitamin E therapies in postmenopausal women. *Circulation*, Hagerstown, v.100, n.18, p.1851-1857, 1999.
- KOH, K.K.; MINCEMOYER, R.; BUI, M.N.; CSAKO, G.; PUCINO, F.; GUETTA, V.; WACLAWIW, M.; CANNON III, R.O. Effects of hormone-replacement therapy on fibrinolysis in postmenopausal women. *N. Engl. J. Med.*, Waltham, v.336, n.10, p.683-690, 1997.

- KREGE, J.H.; HODGIN, J.B.; COUSE, J.F.; ENMARK, E.; WARNER, M.; MAHLER, J.F.; SAR, M.; KORACH, K.S.; GUSTAFSSON, J.A.; SMITHIES, O. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Saint Louis, v.95, n.26, p.15677-15682, 1998.
- KUIPER, G.G.; ENMARK, E.; PELTO-HUIKKO, M.; NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J.A. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Saint Louis, v.93, p.5925-5930, 1996.
- KUIPER, G.G.; LEMMEN, J.G.; CARLSSON, B.; CORTON, J.C.; SAFE, S.H.; VAN DER SAAG, P.T.; VAN DER BURG, B.; GUSTAFSSON, J. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*, Chevy Chase, v.139, p.4252-4263, 1998.
- LAI, H.H.; YEN, G.C. Inhibitory effect of isoflavones on peroxynitrite-mediated low-density lipoprotein oxidation. *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, Tokyo, v.66, p.22-28, 2001.
- LAMPE, J.W.; KARR, S.C.; HUTCHINS, A.M.; SLAVIN, J.L. Urinary equol excretion with a soy challenge: influence of habitual diet. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, Malden, v.217, n.3, p.335-339, 1998.
- LANCASTER Jr., J., ed. *Nitric oxide: principles and actions*. San Diego: Academic Press, 1996. pag 20
Imprenta San Diego : Academic Press, c1996 Descr Fis xv, 355 p.
- LANGER, T.; NEUPERT, W. Heat shock proteins hsp60 e hsp70: their roles in folding, assembly and membrane translocation of proteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, Berlin, v.167, p.3-30, 1991.
- LASZLO, A. Regulation of the synthesis of heat-shock proteins in heat-resistant variants of Chinese hamster fibroblasts. *Radiat. Res.*, Lawrence, v.116, p.427-441, 1988.
- LEINONEN, M.; SAIKKU, P. Evidence for infectious agents in cardiovascular disease and atherosclerosis. *Lancet Infect. Dis.*, London, v.2, n.1, p.11-17, 2002.
- LIMA, E.S.; DI MASCIO, P.; ABDALLA, D.S. Cholesteryl nitrolinoleate, a nitrated lipid present in human blood plasma and lipoproteins. *J. Lipid Res.*, Birmingham, v.44, n.9, p.1660-1666, 2003.
- LIMA, E.S.; DI MASCIO, P.; RUBBO, H.; ABDALLA, D.S. Characterization of linoleic acid nitration in human blood plasma by mass spectrometry. *Biochemistry*, Columbus, v.41, n.34, p.10717-10722, 2002.
- LIZARD, G.; GUELDRY, S.; DECKERT, V.; GAMBERT, P.; LAGROST, L. Evaluation of the cytotoxic effects of some oxysterols and of cholesterol on endothelial cell growth: methodological aspects. *Pathol. Biol.*, Paris, v.45, n.4, p.281-290, 1997.
- LOSORDO, D.W.; KEARNEY, M.; KIM, E.A.; JEKANOWSKI, J.; ISNER, J.M. Variable expression of the estrogen receptor in normal and atherosclerotic coronary arteries of premenopausal women. *Circulation*, Hagerstown, v.89, n.4, p.1501-1510, 1994.
- LU, L.J.; ANDERSON, K.E.; GRADY, J.J.; NAGAMANI, M. Effects of soya consumption for one month on steroid hormones in premenopausal women: implications for breast cancer risk reduction. *Cancer Epidemiol., Biomarkers Prev.*, Birmingham, v.5, n.1, p.63-70, 1996.
- LUSCHER, T.F.; NOLL, G. The pathogenesis of cardiovascular disease: role of the endothelium as a target and mediator. *Atherosclerosis*, Amsterdam, v.118, suppl.S, p.81-90, 1995.

- MAGEE, P.J.; MCGLYNN, H.; ROWLAND, I.R. Differential effects of isoflavones and lignans on invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells *in vitro*. *Cancer Lett.*, Amsterdam, v.208, n.1, p.35-41, 2004a.
- MAGEE, P.J.; ROWLAND, I.R. Phyto-oestrogens, their mechanism of action: current evidence for a role in breast and prostate cancer. *Br. J. Nutr.*, Wallingford, v.91, n.4, p.513-531, 2004b.
- MALYSHEV, I.Y.U.; MALUGIN, A.V.; GOLUBEVA, L.Y.U.; ZENINA, T.A.; MANUKHINA, E.B.; MIKOYAN, V.D.; VANIN, A.F. Nitric oxide donor induces HSP70 accumulation in the heart and in cultured cells. *FEBS Lett.*, Amsterdam, v.391, p.21-23, 1996.
- MAN, R.Y.K.; TING, L.K.F.; FAN, S.; LAU, M.M.H.; SIOW, Y.L.; CHUNG, Y.H, Karmin O. Effect of postmenopausal hormone replacement therapy on lipoprotein and homocysteine levels in Chinese women. *Mol. Cell. Biochem.*, Dordrecht, v.225, n.1, p.129-134, 2001.
- MANDAL, K.; JAHANGIRI, M.; XU, Q. Autoimmunity to heat shock proteins in atherosclerosis. *Autoimmun. Rev.*, Amsterdam, v.3, n.2, p.31-37, 2004.
- MANSON, J.E.; HSIA, J.; JOHNSON, K.C.; ROSSOUW, J.E.; ASSAF, A.R.; LASSER, N.L.; TREVISAN, M.; BLACK, H.R.; HECKBERT, S.R.; DETRANO, R.; STRICKLAND, O.L.; WONG, N.D.; CROUSE, J.R.; STEIN, E.; CUSHMAN, M. Women's Health Initiative Investigators. Estrogen plus progestin and the risk of coronary heart disease. *N. Engl. J. Med.*, Waltham, v.349, n.6, p.523-534, 2003.
- MARKIEWICZ, L.; GAREY, J.; ADLERCREUTZ, H.; GURPIDE, E. *In vitro* bioassays of non-steroidal phytoestrogens. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, Oxford, v.45, n.5, p.399-405, 1993.
- MARLEY, R.; FEELISCH, M.; HOLT, S.; MOORE, K. A chemiluminescence-based assay for S-nitrosoalbumin and other plasma S-nitrosothiols. *Free Radical Res.*, Basingstoke, v.32, n.1, p.1-9, 2000.
- MARLEY, R.; PATEL, R.P.; ORIE, N.; CEASER, E.; DARLEY-USMAR, V.; MOORE, K. Formation of nanomolar concentrations of S-nitroso-albumin in human plasma by nitric oxide. *Free Radical Biol. Med.*, Orlando, v.31, n.5, p.688-696, 2001.
- MASERI, A. Spasm and dynamic coronary stenosis. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, Hagerstown, v.6, n.4, p.S683-S690, 1984.
- MASKARINEC, G.; WILLIAMS, A.E.; INOUYE, J.S.; STANCZYK, F.Z.; FRANKE, A.A. A randomized isoflavone intervention among premenopausal women. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, Birmingham, v.11, n.2, p.195-201, 2002.
- MATSUBARA, T.; ZIFF, M. Superoxide anion release by human endothelial cells: synergism between a phorbol ester and a calcium ionophore. *J. Cell. Physiol.*, Hoboken, v.127, p.207-210, 1986.
- McKINNEY, K.A.; DUELL, P.B.; WHEATON, D.L.; HESS, D.L.; PATTON, P.E.; SPIES, H.G.; BURRY, K.A. Differential effects of subcutaneous estrogen and progesterone on low-density lipoprotein size and susceptibility to oxidation in postmenopausal rhesus monkeys. *Fertil. Steril.*, Birmingham, v.68, n.3, p.525-530, 1997.
- McMANUS, J.M.; ENENY J.M.; THOMPSON, W.; YOUNG, I.S. The effect of hormone replacement therapy on the oxidation of low-density lipoprotein in postmenopausal woman. *Atherosclerosis*, Amsterdam, v.135, p.73-81, 1997.

- MENDELSON, M.E. Protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *Am. J. Cardiol.*, Philadelphia, v.89, suppl.S, n.12A, disc.7E-8E, p.12E-17E, 2002.
- MENDELSON, M.E.; KARAS, R.H. Estrogen and the blood vessel wall. *Curr. Opin. Cardiol.*, London, v.9, n.5, p.619-626, 1994.
- MENDELSON, M.E.; KARAS, R.H. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N. Engl. J. Med.*, Waltham, v.340, n.23, p.1801-1811, 1999.
- MESSINA, M. Soy intake and cancer risk: a review of the *in vitro* and *in vivo* data. *Nutr. Cancer*, Mahwah, v.21, p.113-131, 1994.
- MINOR, R.L.; MYERS, P.R.; GUERRA, R.; BATES, J.N.; HARRISON, D.G. Diet-induced atherosclerosis increases the release of nitrogen oxides from rabbit aorta. *J. Clin. Invest.*, Ann Arbor, v.86, p.2109-2116, 1990.
- MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, Bethesda, v.43, p.109-142, 1991.
- MORITO, K.; HIROSE, T.; KINJO, J.; HIRAKAWA, T.; OKAWA, M.; NOHARA, T.; OGAWA, S.; INOUE, S.; MURAMATSU, M.; MASAMUNE, Y. Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta. *Biol. Pharm. Bull.*, Tokyo, v.24, n.4, p.351-356, 2001.
- MOUSAVI, Y.; ADLERCREUTZ, H. Genistein is an effective stimulator of sex hormone-binding globulin production in hepatocarcinoma human liver cancer cells and suppresses proliferation of these cells in culture. *Steroids*, Amsterdam, v.58, n.7, p.301-304, 1993.
- MUGGE, A.; ELWELL, J.H.; PETERSON, T.E.; HOFMEYER, T.G.; HEISTAD, D.D.; HARRISON, D.G. Chronic treatment with polyethylene-glicolated superoxide dismutase partially restores endothelium-dependent vascular relations in cholesterol-fed rabbits. *Circ. Res.*, Hagerstown, v.69, p.1293-1300, 1991.
- MURPHY, P.A.; BARUA, K.; HAUCK, C.C. Solvent extraction selection in the determination of isoflavones in soy foods. *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, Amsterdam, v.777, p.129-138, 2002.
- MURPHY, P.R.; BRECKENRIDGE, W.C.; LAZIER, C.B. Binding of oxygenated cholesterol metabolites to antiestrogen binding sites from chicken liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Orlando, v.127, p.786-792, 1985.
- MYERS, P.R.; WRIGHT, T.F.; TANNER, M.A.; OSTLUND Jr., R.E. The effects of native LDL and oxidized LDL on EDRF bioactivity and nitric oxide production in vascular endothelium. *J. Lab. Clin. Med.*, Orlando, v.124, n.5, p.672-683, 1994.
- NAGATA, C.; INABA, S.; KAWAKAMI, N.; KAKIZOE, T.; SHIMIZU, H. Inverse association of soy product intake with serum androgen and estrogen concentrations in Japanese men. *Nutr. Cancer*, Mahwah, v.36, n.1, p.14-18, 2000.
- NESTEL, P.J.; YAMASHITA, T.; SASAHARA, T.; POMEROY, S.; DART, A.; KOMESAROFF, P.; OWEN, A.; ABBEY, M. Soy isoflavones improve systemic arterial compliance but not plasma lipids in menopausal and perimenopausal women. *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.*, Hagerstown, v.17, n.12, p.3392-3398, 1997.

- O'DONNELL, V.B.; EISERICH, J.P.; CHUMLEY, P.H.; JABLONSKY, M.J.; KRISHNA, N.R.; KIRK, M.; BARNES, S.; DARLEY-USMAR, V.M.; FREEMAN, B.A. Nitration of unsaturated fatty acids by nitric oxide-derived reactive nitrogen species peroxynitrite, nitrous acid, nitrogen dioxide, and nitronium ion. *Chem. Res. Toxicol.*, Columbus, v.12, n.1, p.83-92, 1999.
- OHARA Y, PETERSON TE, HARRISON DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest*, Ann Arbor, v.91, n. 6, p. 2546-51, 1993.
- ORLICEK, S.L.; MEALS, E.; ENGLISH, B.K. Differential effects of tyrosine kinase inhibitors on tumor necrosis factor and nitric oxide production by murine macrophages. *J. Infect Dis.*, Chicago, v.174, n.3, p.638-642, 1996.
- OS, I.; OS, A.; SANDSET, P.M.; BOLLING, S.; SELJEFLOT, I.; DJUROVIC, S.; WESTHEIM, A. Hormone replacement therapy does not affect plasma homocysteine in postmenopausal women with coronary artery disease. Free tissue factor pathway inhibitor antigen, a circulating anticoagulant, is related to plasma homocysteine. *Cardiology*, Basel, v.98, n.1/2, p.6-12, 2002.
- OSUKA, K.; FEUSTEL, P.J.; MONGIN, A.A.; TRANMER, B.I.; KIMELBERG, H.K. Tamoxifen inhibits nitrotyrosine formation after reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. *J. Neurochem.*, Oxford, v.76, p.1842-1850, 2001.
- PAGANINI-HILL, A.; DWORSKY, R.; KRAUSS, R.M. Hormone replacement therapy, hormone levels, and lipoprotein cholesterol concentrations in elderly women. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, Orlando, v.174, n.3, p.897-902, 1996.
- PANNALA, A.S.; RAZA, Q.R.; HALLIWELL, B.; SINGH, S.; RICE-EVANS, C.A. Inhibition of peroxynitrite dependent tyrosine nitration by hydroxycinnamates: nitration or electron donation? *Free Radical Biol. Med.*, Orlando, v.24, n.4, p.594-606, 1998.
- PANZA, J.A.; GARCÍA, C.E.; KILCOYNE, C.M.; QUYYUMI, A.A.; CANNON III, R.O. Impaired endothelium-dependent vasodilatation in patients with essential hypertension. *Circulation*, Hagerstown, v.91, p.1732-1738, 1995.
- PAPACONSTANTINO, A.D.; GOERING, P.L.; UMBREIT, T.H.; BROWN, K.M. Regulation of uterine hsp90alpha, hsp72 and HSF-1 transcription in B6C3F1 mice by beta-estradiol and bisphenol A: involvement of the estrogen receptor and protein kinase C. *Toxicol. Lett.*, Amsterdam, v.144, n.2, p.257-270, 2003.
- PAQUETTE, B.; CANTIN, A.M.; KOCSIS-BEDARD, S.; BARRY, S.; LEMAY, R.; JAY-GERIN, J.P. *In vitro* generation of peroxynitrite by 2- and 4-hydroxyestrogens in the presence of nitric oxide. *Chem. Res. Toxicol.*, Columbus, v.14, p.547-554, 2001.
- PEREIRA IRO, DAMASCENO NRT, PEREIRA EC, TAVARES LC, ABDALLA DSP. Avaliação das concentrações plasmática e urinária de isoflavonas purificadas de soja. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, São Paulo, v.38, p.291-303, 2002.
- PEREIRA, I.R.O. *Influência das isoflavonas da soja na produção de proteínas de choque térmico e óxido nítrico na aterosclerose experimental induzida pela dieta*. São Paulo, 2000. 125p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

- PEREIRA, I.R.O.; BERTOLAMI, M.C.; FALUDI, A.A.; CAMPOS, M.F.; FERDERBAR, S.; LIMA, E.S.; ALDRIGHI, J.M.; ABDALLA, D.S. Lipid peroxidation and nitric oxide inactivation in postmenopausal women. *Arq. Bras. Cardiol.*, Rio de Janeiro, v.80, p.415-423, 2003.
- PIERSEN, C.E. Phytoestrogens in botanical dietary supplements: implications for cancer. *Integr. Cancer Ther.*, Thousand Oaks, v.2, n.2, p.120-138, 2003.
- POCKLEY, A.G. Heat shock proteins, inflammation, and cardiovascular disease. *Circulation*, Hagerstown, v.105, n.8, p.1012-1017, 2002.
- PORTIG, I.; PANKUWEIT, S.; MAISCH, B. Antibodies against stress proteins in sera of patients with dilated cardiomyopathy. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, Amsterdam, v.29, n.8, p.2245-2251, 1997.
- POWER, R.F.; MANI, S.K.; CODINA, J.; CONNEELY, O.M.; O'MALLEY, B.W. Dopaminergic and ligand-independent activation of steroid hormone receptors. *Science*, Washington, v.254, n.5038, p.1636-1639, 1991.
- PRUMMEL, M.F.; VAN PARENREN, Y.; BAKKER, O.; WIERSINGA, W.M. Anti-heat shock protein (hsp)72 antibodies are present in patients with Graves' disease (GD) and in smoking control subjects. *Clin. Exp. Immunol.*, Oxford, v.110, n.2, p.292-295, 1997.
- PSATY, B.M.; SMITH, N.L.; LEMAITRE, R.N.; VOS, H.L.; HECKBERT, S.R.; LACROIX, A.Z.; ROSENDAAL, F.R. Hormone replacement therapy, prothrombotic mutations, and the risk of incident nonfatal myocardial infarction in postmenopausal women. *JAMA, J. Am. Med. Assoc.*, Chicago, v.285, n.7, p.906-913, 2001.
- RADI, R.; BECKMAN, J.S.; BUSH, K.M.; FREEMAN, B.A. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.*, New York, v.288, p.481-487, 1991.
- RAINES, E.W.; ROSS, R. Biology of atherosclerotic plaque formation: possible role of growth factors in lesion development and potential impact of soy. *J. Nutr.*, Bethesda, v.125, n.3, suppl., p.624S-630S, 1995.
- REDEGELD, F.A.; HEIJDR, B.; KNIPPELS, M.C.; GARSSSEN, J.; NIJKAMP, F.P. Nitric oxide production by macrophages stimulated by antigen-binding T-cell factors. *Immunol. Lett.*, Amsterdam, v.57, n.1/3, p.147-149, 1997.
- RODRIGO, R.; PASSALACQUA, W.; ARAYA, J.; ORELLANA, M.; RIVERA, G. Implications of oxidative stress and homocysteine in the pathophysiology of essential hypertension. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, Hagerstown, v.42, n.4, p.453-461, 2003.
- ROSSOUW, J.E.; ANDERSON, G.L.; PRENTICE, R.L.; LACROIX, A.Z.; KOOPERBERG, C.; STEFANICK, M.L.; JACKSON, R.D.; BERESFORD, S.A.; HOWARD, B.V.; JOHNSON, K.C.; KOTCHEN, J.M.; OCKENE, J.; WRITING GROUP FOR THE WOMEN'S HEALTH INITIATIVE INVESTIGATORS. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA, J. Am. Med. Assoc.*, Chicago, v.288, n.3, p.321-333, 2002.
- ROWLAND, I.R.; WISEMAN, H.; SANDERS, T.A.; ADLERCREUTZ, H.; BOWEY, E.A. Interindividual variation in metabolism of soy isoflavones and lignans: influence of habitual diet on equol production by the gut microflora. *Nutr. Cancer*, Mahwah, v.36, n.1, p.27-32, 2000.

- RUETTEN, H.; THIEMERMANN, C.; PERRETTI, M. Upregulation of ICAM-1 expression on J774.2 macrophages by endotoxin involves activation of NF-kappaB but not protein tyrosine kinase: comparison to induction of iNOS. *Mediators Inflammation*, Basingstoke, v.8, n.2, p.77-84, 1999.
- RUETTEN, H.; THIERMERMANN, C. Effects of tyrphostins and genistein on the circulatory failure and organ dysfunction caused by endotoxin in the rat: a possible role for protein tyrosine kinase. *Br. J. Pharmacol.*, Basingstoke, v.122, p.59-70, 1997.
- RUIZ-LARREA, M.B.; MOHAN, A.R.; PAGANGA, G.; MILLER, N.J.; BOLWELL, G.P.; RICE-EVANS, C.A. Antioxidante Activity of Phytoestrogenic Isoflavones. *Free Radical Res.*, Basingstoke, v.26, p.63-70, 1997.
- SAKAMOTO, LC & HALBE, HW. Epidemiologia da Menopausa. Em: PINOTTI, JÁ; HALBE, HW; HEGG, R. *Menopausa*. Roca, São Paulo, p.1-2, 1995.
- SACK, M.N.; RADER, R.J.; CANNON III, R.O. Oestrogen and inhibition of oxidation of low-density lipoproteins in postmenopausal woman. *Lancet*, London, v.343, p.269-270, 1994.
- SACKS, M.F.; WALSH, B.W. Sex hormones and lipoprotein metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.*, Hagerstown, v.5, p.236-240, 1994.
- SALONEN, J.T.; NYSSONEN, K.; SALONEN, R.; PORKKALA-SARATAHO, E.; TUOMAINEN, T.P.; DICZFALUSY, U.; BJORKHEM, I. Lipoprotein oxidation and progression of carotid atherosclerosis. *Circulation*, Hagerstown, v.95, n.4, p.840-845, 1997.
- SANCHEZ-QUESADA JL, BENITEZ S, ORDONEZ-LLANOS J. Electronegative low-density lipoprotein. *Curr Opin Lipidol*, Hagerstown, v.15, n.3, p.329-35, 2004.
- SANCHEZ-QUESADA, J.L.; PEREZ, A.; CAIXAS, A.; ORDONMEZ-LLANOS, J.; CARRERAS, G.; PAYES, A.; GONZALEZ-SASTRE, F.; DE LEIVA, A. Electronegative low density lipoprotein subform is increased in patients with short-duration IDDM and is closely related to glycaemic control. *Diabetologia*, Berlin, v.39, n.12, p.1469-1476, 1996.
- SARGEANT, P.; FARNDAL, R.W.; SAGE, S.O. ADP- and thapsigargin-evoked Ca²⁺ entry and protein-tyrosine phosphorylation are inhibited by the tyrosine kinase inhibitors genistein and methyl-2,5-dihydroxycinnamate in fura-2-loaded human platelets. *J. Biol. Chem.*, Birmingham v.268, n.24, p.18151-18156, 1993.
- SCARABIN, P.Y.; OGER, E.; PLU-BUREAU, G. Differential association of oral and transdermal oestrogen-replacement therapy with venous thromboembolism risk. *Lancet*, London, v.362, n.9382, p.428-432, 2003.
- SCHEIBER, M.D.; LIU, J.H.; SUBBIAH, M.T.R.; REBAR, R.W.; SETCHELL, K.D.R. Dietary soy isoflavones favorably influence lipids and bone turnover in healthy postmenopausal women. oral presentation abstracts. *J. Nutr.*, Bethesda, v.130, p.665S-678S, 2000.
- SCHMITT, D.; SHEN, Z.; ZHANG, R.; COLLES, S.M.; WU, W.; SALOMON, R.G.; CHEN, Y.; CHISOLM, G.M.; HAZEN, S.L. Leukocytes utilize myeloperoxidase-generated nitrating intermediates as physiological catalysts for the generation of biologically active oxidized lipids and sterols in serum. *Biochemistry*, Columbus, v.38, n.51, p.16904-16915, 1999.

- SEILER, C.; HESS, O.M.; BUECHI, M. Influence of serum cholesterol and other coronary risk factors on vasomotion of angiographically normal coronary arteries. *Circulation*, Hagerstown, v.88, n.1, p.2139-2148, 1991.
- SEVANIAN, A.; BITTOLO-BOM, G.; CAZZOLATO, G.; HODIS, H.; HWANG, J.; ZAMBURLINI, A.; MAIORINO, M.; URSINI, F. LDL- is a lipid hydroperoxide-enriched circulating lipoprotein. *J. Lipid Res.*, Birmingham, v.38, n.3, p.419-428, 1997.
- SEVANIAN, A.; HODIS, H.N.; HWANG, J.; MCLEOD, L.L.; PETERSON, H. Characterization of endothelial cell injury by cholesterol oxidation products found in oxidized LDL. *J. Lipid Res.*, Birmingham, v.36, n.9, p.1971-1986, 1995.
- SHIBATA, H.; SPENCER, T.E.; ONATE, S.A.; JENSTER, G.; TSAI, S.Y.; TSAI, M.J.; O'MALLEY, B.W. Role of co-activators and co-repressors in the mechanism of steroid/thyroid receptor action. *Recent Prog. Horm. Res.*, Chevy Chase, v.52, disc.p.64-65, p.141-164, 1997.
- SOBEY, C.G.; WEILER, J.M.; BOUJAOUDE, M.; WOODMAN, O.L. Effect of short-term phytoestrogen treatment in male rats on nitric oxide-mediated responses of carotid and cerebral arteries: comparison with 17beta-estradiol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Bethesda, v.310, n.1, p.135-140, 2004.
- SONG, T.T.; HENDRICH, S.; MURPHY, P.A. Estrogenic activity of glycitein, a soy isoflavone. *J. Agric. Food Chem.*, Columbus, v.47, n.4, p.1607-1610, 1999.
- SQUADRITO, F.; ALTAVILLA, D.; CRISAFULLI, A.; SAITTA, A.; CUCINOTTA, D.; MORABITO, N.; D'ANNA, R.; CORRADO, F.; RUGGERI, P.; FRISINA, N.; SQUADRITO, G. Effect of genistein on endothelial function in postmenopausal women: a randomized, double-blind, controlled study. *Am. J. Med.*, Orlando, v.114, n.6, p.470-476, 2003.
- SQUADRITO, F.; ALTAVILLA, D.; MORABITO, N.; CRISAFULLI, A.; D'ANNA, R.; CORRADO, F.; RUGGERI, P.; CAMPO, G.M.; CALAPAI, G.; CAPUTI, A.P.; SQUADRITO, G. The effect of the phytoestrogen genistein on plasma nitric oxide concentrations, endothelin-1 levels and endothelium dependent vasodilation in postmenopausal women. *Atherosclerosis*, Amsterdam, v.163, n.2, p.339-347, 2002.
- STAMLER, J.S. S-nitrosothiols and the bioregulatory actions of nitrogen oxides through reactions with thiol groups. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, Berlin, v.196, p.19-36, 1995.
- STAMLER, J.S.; SINGEL, D.J.; LOSCALZO, J. Biochemistry of oxide nitric and its redox-activated forms. *Science*, Washington, v.258, n.5090, p.1898-1902, 1992.
- STAMPFER, M.J.; COLDITZ, B.A. Estrogen replacement therapy and coronary heart disease: a quantitative assessment of epidemiologic evidence. *Prev. Med.*, New York, v.20, p.47-63, 1991.
- STARKEBAUM, G.; HARLAN, J.M. Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. *J. Clin. Invest.*, Ann Arbor, v.77, n.4, p.1370-1376, 1986.
- STEINBERG, D.; PARTHASARATHY, S.; CAREW, T.E.; KHOO, J.C.; WITZTUM, J.L. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.*, Waltham, v.320, n.14, p.915-924, 1989.

- SUNG, J.H.; CHOI, S.J.; LEE, S.W.; PARK, K.H.; MOON, T.W. Isoflavones found in Korean soybean paste as 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, Tokyo, v.68, n.5, p.1051-1058, 2004a.
- SUNG, J.H.; LEE, S.J.; PARK, K.H.; MOON, T.W. Isoflavones inhibit 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase *in vitro*. *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, Tokyo, v.68, n.2, p.428-432, 2004b.
- TANG, M.; ABPLANALP, W.; AYRES, S.; SUBBLIAH, M.T. Superior and distinct antioxidant effects of selected estrogen metabolites on lipid peroxidation. *Metabolism*, Philadelphia, v.45, n.4, p.411-414, 1996.
- TANG, P.Z.; GANNON, M.J.; ANDREW, A.; MILLER, D. Evidence for oestrogenic regulation of heat shock protein expression in human endometrium and steroid-responsive cell lines. *Eur. J. Endocrinol.*, Colchester, v.133, n.5, p.598-605, 1995.
- TERTOV, V.V.; SOBENIN, I.A.; OREKHOV, A.N.; JAAKKOLA, O.; SOLAKIVI, T.; NIKKARI, T. Characteristics of low density lipoprotein isolated from circulating immune complexes. *Atherosclerosis*, Amsterdam, v.122, n.2, p.191-199, 1996.
- TIKKANEN MJ, ADLERCREUTZ H. Dietary soy-derived isoflavone phytoestrogens. Could they have a role in coronary heart disease prevention? *Biochem Pharmacol*, v.60, n.1, p.1-5, 2000.
- TIKKANEN, M.J.; WAHALA, K.; OJALA, S.; VIHMA, V.; ADLERCREUTZ, H. Effect of soybean phytoestrogen intake on low density lipoprotein oxidation resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Saint Louis, v.95, n.6, p.3106-3110, 1998.
- 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*, São Paulo, v.36, n.4, p.491-4, 2003.
- VALLANCE, P.; MONCADA, S. Role of endogenous nitric oxide in septic shock. *New Horiz.*, Baltimore, v.1, n.1, p.77-86, 1993.
- VAYA, J.; AVIRAM, M.; MAHMOOD, S.; HAYEK, T.; GRENADIR, E.; HOFFMAN, A.; MILO, S. Selective distribution of oxysterols in atherosclerotic lesions and human plasma lipoproteins. *Free Radical Res.*, Basingstoke, v.34, n.5, p.485-497, 2001.
- VECCHIONE, G.; MARGAGLIONE, M.; GRANDONE, E.; COLAIZZO, D.; CAPPUCCI, G.; FERMO, I.; D'ANGELO, A.; DI MINNO, G. Determining sulfur-containing amino acids by capillary electrophoresis: a fast novel method for total homocyst(e)ine human plasma. *Electrophoresis*, Weinheim, v.20, n.3, p.569-574, 1999.
- VERGNANI, L.; HATRIK, S.; RICCI, F.; PASSARO, A.; MANZOLI, N.; ZULIANI, G.; BROVKOVYCH, V.; FELLIN, R.; MALINSKI, T. Effect of native and oxidized low-density lipoprotein on endothelial nitric oxide and superoxide production. *Circulation*, Hagerstown, v.101, p.1261-1266, 2000.
- VOSS, M.R.; STALLONE, J.N.; LI M.; CORNELUSSEN, R.N.; KNUEFERMANN, P.; KNOWLTON, A.A. Gender differences in the expression of heat shock proteins: the effect of estrogen. *Am. J. Physiol.: Heart Circ. Physiol.*, Bethesda, v.285, n.2, p.H687-H692, 2003.

- WAGNER, J.D. Rationale for hormone preplacement therapy in atherosclerosis prevention. *J. Reprod. Med.*, Saint Louis, v.45, p.245-258, 2000.
- WALSH, K.R.; ZHANG, Y.C.; VODOVOTZ, Y.; SCHWARTZ, S.J.; FAILLA, M.L. Stability and bioaccessibility of isoflavones from soy bread during *in vitro* digestion. *J. Agric. Food Chem.*, Columbus, v.51, n.16, p.4603-4609, 2003.
- WAN, G.; OHNOMI, S.; KATO, N. Increased hepatic activity of inducible nitric oxide synthase in rats fed on a high-fat diet. *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, Tokyo, v.64, n.3, p.555-561, 2000.
- WANG, J.; GREEN, P.S.; SIMPKINS, J.W. Estradiol protects against ATP depletion, mitochondrial membrane potential decline and the generation of reactive oxygen species induced by 3-nitropropionic acid in SK-N-SH human neuroblastoma. *J. Neurochem.*, Oxford, v.77, n.3, p.804-811, 2001.
- WANG, T.T.Y.; SATHYAMOORTHY, N.; PHANG, J.M. Molecular effects of genistein on estrogen receptor mediated pathways. *Carcinogenesis*, Oxford, v.17, p.271-275, 1996.
- WASHBURN, S.; BURKE, G.L.; MORGAN, T.; ANTHONY, M. Effect of soy protein supplementation on serum lipoproteins, blood pressure, and menopausal symptoms in perimenopausal women. *Menopause*, New York, v.6, n.1, p.7-13, 1999.
- WEI, H.; WEI, L.; FRENKEL, K.; BOWEN, R.; BARNES, S. Inhibition of tumor promoter-induced hydrogen peroxide formation *in vitro* and *in vivo* by genistein. *Nutr. Cancer*, Mahwah, v.20, n.1, p.1-12, 1993.
- WICK, G. Atherosclerosis: an autoimmune disease due to an immune reaction against heat-shock protein 60. *Herz*, Munchen, v.25, n.2, p.87-90, 2000.
- WICK, G.; SCHETT, G.; AMBERGER, A.; KLEINDIENST R.; XU, Q. Is atherosclerosis an immunologically mediated disease? *Immunol. Today*, Amsterdam, v.16, n.1, p.27-33, 1995.
- WILLIAMS, J.K.; CLARKSON, T.B. Dietary soy isoflavones inhibit *in-vivo* constrictor responses of coronary arteries to collagen-induced platelet activation. *Coron. Artery Dis.*, Philadelphia, v.9, n.11, p.759-764, 1998.
- WILLIAMS, J.K.; DELANSORNE, R.; PARIS, J. Estrogens, progestatins, and coronary artery reactivity in atherosclerotic monkeys. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, Amsterdam, v.65, n.1/6, p.219-224, 1998.
- WISEMAN, H.; O'REILLY, J.; LIM, P.; GARNETT, A.P.; HUANG, W.-C. Antioxidant properties of the isoflavones phytoestrogen functional ingredient in soya products. In: SADLER, M.J. and SALTMEERSH, M., eds. *Functional foods: the consumer, the products and the evidence*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1998. p.80-86. Special publications, n.215) (Proceeding of a joint conference held by the British Nutrition Foundation and the Food Chemistry Group of Royal Society of Chemistry on 2-4 April 1997 at Wye College, University of London, Kent, UK-Cambridge, UK, 1997).
- XU, Q. Role of heat shock proteins in atherosclerosis. *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.*, Hagerstown, v.22, n.10, p.1547-1559, 2002.
- XU, Q.; HU, Y.; KLEINDIENST, R.; WICK, G. Nitric oxide induces heat-shock protein 70 expression in vascular smooth muscle cells via activation of heat shock factor 1. *J. Clin. Invest.*, Ann Arbor, v.100, n.5, p.1089-1097, 1997.

- XU, Q.; KIECHL, S.; MAYR, M.; METZLER, B.; EGGER, G.; OBERHOLLENZER, F.; WILLEIT, J.; WICK, G. Association of serum antibodies to heat-shock protein 65 with carotid atherosclerosis. *Circulation*, Hagerstown, v.100, p.1169-1174, 1999.
- XU, Q.; WILLEIT, J.; MAROSI, M.; KLEINDIENST, R.; OBERHOLLENZER, F.; KIECHL, S.; STULNIG, T.; LUEF, G.; WICK, G. Association of serum antibodies to heat-shock protein 65 with carotid atherosclerosis. *Lancet*, London, v.341, n.8840, p.255-259, 1993.
- XU, X.; HARRIS, K.S.; WANG, H.J.; MURPHY, P.A.; HENDRICH, S. Bioavailability of soybean isoflavones depends upon gut microflora in women. *J. Nutr.*, Bethesda, v.125, n.9, p.2307-2315, 1995.
- YAMAKOSHI, J.; PISKULA, M.K.; IZUMI, T.; TOBE, K.; SAITO, M.; KATAOKA, S.; OBATA, A.; KIKUCHI, M. Isoflavone aglycone-rich extract without soy protein attenuates atherosclerosis development in cholesterol-fed rabbits. *J. Nutr.*, Bethesda, v.130, n.8, p.1887-1893, 2000.
- YEN, G.C.; LAI, H.H. Inhibition of reactive nitrogen species effects in vitro and in vivo by isoflavones and soy-based food extracts. *J. Agric. Food Chem.*, Columbus, v.51, n.27, p.7892-7900, 2003a.
- YEN, G.C.; LAI, H.H. Inhibitory effects of isoflavones on nitric oxide- or peroxynitrite-mediated DNA damage in RAW 264.7 cells and X174 DNA. *Food Chem. Toxicol.*, London, v.40, p.1433-1440, 2003b.
- YIM, S.F.; LAU, T.K.; SAHOTA, D.S.; CHUNG, T.K.; CHANG, A.M.; HAINES, C.J. Prospective randomized study of the effect of "add-back" hormone replacement on vascular function during treatment with gonadotropin-releasing hormone agonists. *Circulation*, Hagerstown, v.98, n.16, p.1631-1635, 1998.
- YLIKORKALA, O. HRT as secondary prevention of cardiovascular disease. *Maturitas*, Amsterdam, v.47, n.4, p.315-318, 2004.
- YOSHIMURA, T.; OHSHIGE, A.; MAEDA, T.; ITO, M.; OKAMURA, H. Estrogen replacement therapy decreases platelet-activating factor-acetylhydrolase activity in post-menopausal women. *Maturitas*, Amsterdam, v.31, n.3, p.249-253, 1999.
- YOUNG, R.A.; ELLIOTT, T.J. Stress proteins, infection, and immune surveillance. *Cell*, Cambridge, v.59, p.5-8, 1989.
- ZHU, J.; KATZ, R.J.; QUYYUMI, A.A.; CANOS, D.A.; ROTT, D.; CSAKO, G.; ZALLES-GANLEY, A.; OGUNMAKINWA, J.; WASSERMAN, A.G.; EPSTEIN, S.E. Association of serum antibodies to heat-shock protein 65 with coronary calcification levels: suggestion of pathogen-triggered autoimmunity in early atherosclerosis. *Circulation*, Hagerstown, v.109, p.36-41, 2004.
- ZHU, W.M.; ROMA, P.; PIRILLO, A.; PELLEGATTA, F.; CATAPANO, A.L. Oxidized LDL induce hsp70 expression in human smooth muscle cells. *FEBS Lett.*, Amsterdam, v.372, p.1-5, 1995.
- ZHU, X.; BONET, B.; GILLENWATER, H.; KNOPP, R.H. Opposing effects of estrogen and progestins on LDL oxidation and vascular wall cytotoxicity: implications for atherogenesis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, Malden, v.222, p.214-221, 1999.
- ZHU, X.D.; BONET, B.; KNOPP, R.H. Estradiol 17 β inhibition of LDL oxidation and endothelial cell cytotoxicity is opposed by progestins to different degrees. *Atherosclerosis*, Amsterdam, v.148, p.31-41, 2000.