



Universidade Federal do Maranhão
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação e Inovação
Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto
Mestrado Acadêmico



**ENVOLVIMENTO DAS METALOPROTEINASES E SINTOMAS DA
MENOPAUSA: UMA ABORDAGEM EXPERIMENTAL**

LENISE JOSY COSTA MENDES

São Luís

2019

LENISE JOSY COSTA MENDES

**ENVOLVIMENTO DAS METALOPROTEINASES E SINTOMAS DA MENOPAUSA:
UMA ABORDAGEM EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do Grau de Mestre em Saúde do Adulto.

Área de Concentração: Saúde e Metabolismo Humano

Linha de Pesquisa: Climatério

Orientador: Dr^a Luciane Maria Oliveira Brito

Co-orientador: Dr^a Haissa Oliveira Brito

Coordenadora do Programa: Dr^a Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento.

São Luís

2019

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Costa Mendes, Lenise Josy.

Envolvimento das metaloproteinases e sintomas da
menopausa: Uma abordagem experimental / Lenise Josy Costa
Mendes. - 2019.

80 f.

Coorientador(a): Haissa Oliveira Brito.

Orientador(a): Luciane Maria Oliveira Brito Oliveira
Brito.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Saúde do Adulto/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
São Luís-MA, 2019.

1. Doxíciclina. 2. Menopausa. 3. Metaloproteinase.
I. Oliveira Brito, Haissa. II. Oliveira Brito, Luciane
Maria Oliveira Brito. III. Título.

LENISE JOSY COSTA MENDES

**ENVOLVIMENTO DAS METALOPROTEINASES E SINTOMAS DA
MENOPAUSA: UMA ABORDAGEM EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do Grau de Mestre em Saúde do Adulto.

A Banca Examinadora da Defesa de Mestrado, apresentada em sessão pública, considerou a candidata aprovada em: ____/____/____.

(Orientadora) Prof^a. Dr^a Luciane Maria Oliveira Brito
Universidade Federal do Maranhão-UFMA

(Coorientadora) Prof^a. Dr^a Haissa Oliveira Brito
Universidade Federal do Maranhão-UFMA

Prof. Dr^a. Débora Luana Ribeiro Pessoa
Universidade Federal do Maranhão-UFMA

Prof^a. Dr^a. Rita da Graça Carvalho Frazão Corrêa
Universidade Federal do Maranhão-UFMA

Prof^a. Dr. Rui Miguel Gil da Costa Oliveira
Universidade Federal do Maranhão- UFMA

Prof^a. Dr^a. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento
(Suplente) Universidade Federal do Maranhão- UFMA

DEDICATÓRIA

Primeiramente a Deus pelas bênçãos e oportunidades que surgiram em minha vida, a minha família, em especial, minha mãe, minhas irmãs e noivo, aos amigos que estiveram ao meu lado durante minha trajetória acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelas oportunidades e bênçãos que têm surgido em minha vida, pelos caminhos traçados em direção ao meu propósito de vida, com o qual posso manter-me conectada em ajudar cada vez mais as pessoas que eu amo, assim como também aos que mais precisam, e assim, sigo, caminhando, perante aos meus sonhos. Gostaria de destacar o maior agradecimento a minha mãe, Lineth Moreno Costa, pois é o meu maior exemplo de vida, pois me ensinou sempre a batalhar desde cedo pelo que eu queria, que mesmo na luta diária em criar as 3 filhas sozinhas, mostrou sua força diante de qualquer obstáculo, e assim pude atravessar situações complicadas, porém com muito aprendizado. Obrigada mãe por tudo na vida, eu te amo muito!

Ressalto também a minha irmã gêmea Letícia Josy Costa Mendes pelos puxões de orelha, pela força que sempre me deu durante toda a minha vida e principalmente a não desistir de nada, a minha irmã mais nova Layse Vitória Costa Mendes, que apesar de um pouco de distância, sempre quando precisei, estava comigo, me apoiando e dando carinho. Ao meu noivo Edson Gustavo Lima Portela, por aguentar todas as minhas situações caóticas e angustiantes, assim como também, por me proporcionar um outro caminho com mais sentido na vida, felicidade, amor e oportunidades de cursos, congressos, eventos, viagens etc., ou seja, pela maioria das coisas que sempre sonhei.

À Prof^ª Haissa Oliveira Brito pelos puxões de orelha, pelo incentivo maior em não desistir e pelos conselhos confortadores em cada situação de medo e angústia, pelas orientações, paciência ao longo de todas as etapas neste mestrado. Agradeço a Deus pela sua ajuda, aprendizados e por ter estado ao meu lado e acreditado em mim. À Prof^ª Luciane Maria Oliveira Brito pela oportunidade, confiança e acolhimento ao longo dessa trajetória.

Agradeço a Deus infinitamente por terem colocado anjos na minha vida durante o projeto, especialmente a Prof Marilene, ao Carlos, Sara, Ana Paula Costa, muito obrigada pela ajuda que me deram perante as dificuldades.

Agradeço à Fernanda, por ter me ajudado em um dos piores momentos da minha vida, em que mais precisei, nunca poderia imaginar uma pessoa de enorme coração e paciência igual a você, por ter estado ao meu lado, me apoiando, incentivando e como se tudo não passasse de algo passageiro e logo iria rir de tudo que haveria passado. Muito obrigada por tudo e tenho certeza que você apareceu na minha vida como meu suporte para um degrau de um dos meus sonhos, não tenho mais palavras para descrever o quanto sou grata, inclusive por ter colocado sua irmã Verônica para me ajudar na loucura desta etapa final.

Agradeço a Deus por tudo conquistado até agora e pelas pessoas que passaram e me ajudaram pela minha vida.

Agradeço aos professores que contribuíram com essa pesquisa, em especial a Prof Dra Haissa Oliveira Brito, prof Dr. Ruy e professores do Laboratório em Pesquisa e Pós-Graduação em Farmacologia (LPPF-UFMA).

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) pelo apoio financeiro no projeto de pesquisa.

RESUMO

Introdução: A menopausa está relacionada pela diversidade de sintomas físicos e psíquicos devido ao declínio hormonal. Nesta fase, há uma propensão a desenvolvimento patológico devido a desestruturação da matriz extracelular, com os quais levam a danos e alterações funcionais no organismo. Novos alvos farmacológicos precisam ser estudados para que possa haver tratamento de maneira a tratar essas pacientes nessa fase da vida. **Objetivo:** Esse estudo buscou avaliar os efeitos das metaloproteinases nos sintomas da menopausa. **Materiais e Métodos:** Foram utilizadas ratas Wistar e camundongos Swiss, com o qual foram submetidos a cirurgias de Falso-operado (SHAM) e ovariectomia (OVX), em seguida foram divididas em 6 grupos: Grupo 1: SHAM tratado com salina, grupo 2: SHAM e tratado com doxiciclina (gavagem), grupo 3: OVX e tratado com salina, grupo 4: OVX e tratado com doxiciclina, grupo 5: OVX e tratado com estro-progestativo (subcutânea), e grupo 6: OVX e tratado com doxiciclina e estro-progestativo. Os animais foram tratados durante 1 mês e foram investigados os seguintes parâmetros: peso corporal, consumo alimentar, peso tecido adiposo total e uterino, níveis séricos de cálcio, magnésio, fosfatase alcalina, proteínas totais, colesterol total, triglicerídeos, uréia, creatinina, transaminase oxaloacética (TGO) e transaminase pirúvica (TGP), além disso, investigou-se fogachos induzido por exercício físico através da esteira e acompanhamento do ciclo estral. A análise estatística foi realizada utilizando os testes de Bonferroni através do programa *GraphPad Prism version 6.00 for Windows*. Um valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo em todas as análises. **Resultados:** Os animais tratados com Doxiciclina em associação com estro-progestativos apresentaram um aumento nos níveis de fosfatase alcalina, magnésio, colesterol total, creatinina e peso do tecido adiposo e uterino. Nesse mesmo grupo também foi observado uma redução da variação da temperatura corporal cutânea e um aumento na frequência da fase diestro. Entretanto, não foi verificada nenhuma diferença estatística significativa no que diz respeito aos níveis de proteínas totais séricas, uréia, triglicerídeos, TGO, TGP, peso corporal e consumo de ração. **Conclusão:** Conclui-se que as metaloproteinases possuem um papel relevante de maneira seletiva em alguns sintomas da menopausa, em especial, quando há associação de sub-dose da doxiciclina com terapia estro-progestativa. Em especial, esse grupo de enzimas pode participar parcialmente na melhora das funções renal, hepática, óssea e também da obesidade, atrofia uterina e vaginal e fogachos.

Palavras-chave: Doxiciclina, Menopausa, Metaloproteinases.

ABSTRACT

Introduction: Menopause is related to the diversity of physical and psychic symptoms due to hormonal decline. At this stage, there is a propensity to pathological development due to the disruption of the extracellular matrix, with which they lead to damage and functional alterations in the organism. New pharmacological targets need to be studied so that there may be treatment in order to treat these patients at this stage of life. **Objective:** This study aimed to evaluate the effects of metalloproteinases on menopausal symptoms. **Materials and methods:** Wistar rats and Swiss mice were used, with whom they underwent false-operated (SHAM) and ovariectomy (OVX) surgeries, and were then divided into 6 groups: Group 1: SHAM treated with saline, Group 2: SHAM and treated with Doxycycline (gavage), Group 3: OVX and treated with saline, Group 4: OVX and treated with doxycycline, Group 5: OVX and treated with estrus-progestative (subcutaneous), and Group 6: OVX and treated with doxycycline and Estrus-progestative. The animals were treated for 1 month and the following parameters were investigated: body weight, food intake, total and uterine adipose tissue weight, serum levels of calcium, magnesium, alkaline phosphatase, total proteins, total cholesterol, Triglycerides, urea, creatinine, oxaloacetic transaminase (TGO) and Pyruvic transaminase (TGP), in addition, the hot flashes induced by physical exercise were investigated through the treadmill and follow-up of the estrous cycle. Statistical analysis was performed using Bonferroni tests using GraphPad Prism version 6.00 for Windows. A P value <0.05 was considered statistically significant in all analyzes. **Results:** The animals treated with doxycycline in combination with Estrus-progestatives showed an increase in the levels of alkaline phosphatase, magnesium, cholesterol Total, creatinine and weight of the adipose and uterine tissues. In the same group, we also observed a reduction in the variation of the cutaneous body temperature and an increase in the frequency of the diestrus phase. However, no statistically significant difference was observed with regard to the levels of total serum proteins, urea, triglycerides, TGO, TGP, body weight and feed intake. **Conclusion:** It is concluded that metalloproteinases have a relevant role selectively in some menopausal symptoms, especially when there is an association of doxycycline Sub-dose with Estrus-progestative therapy. In particular, this group of enzymes can partially participate in the improvement of renal, hepatic, bone and also obesity, uterine and vaginal atrophy and hot flashes.

Key words: doxycycline, menopause, metalloproteinases

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais sintomas da menopausa e os órgãos afetados.....	18
Figura 2. Esquema da fisiologia hormonal na menopausa.....	19
Figura 3. Sintoma da ação de metaloproteinases associadas ao ciclo da menopausa.....	26
Figura 4. Fluxograma de treinamento dos animais para condicionamento de exercício de esteira forçado.....	38
Figura 5. Efeito do tratamento com estroprogestativos e doxiciclina em relação ao acompanhamento corporal e peso corporal total.....	40
Figura 6. Efeito do tratamento com estroprogestativo, doxiciclina e ambos fármacos simultâneos em ratas com e sem ovariectomia sobre acompanhamento de consumo de ração de ratas e o consumo total.....	41
Figura 7. Efeito do tratamento com estroprogestativo, doxiciclina e ambos fármacos simultâneos em ratas com e sem ovariectomia sobre o peso do tecido adiposo e do útero.....	42
Figura 8. Efeito do tratamento com estroprogestativos, doxiciclina e ambos fármacos em ratas com e sem ovariectomia sobre a concentração plasmática de cálcio e magnésio.....	43
Figura 8. Efeito do tratamento com estroprogestativos, doxiciclina e ambos fármacos em ratas com e sem ovariectomia sobre a concentração plasmática de cálcio e magnésio.....	43
Figura 9. Efeito do tratamento com estroprogestativos, doxiciclina e ambos fármacos em ratas com e sem ovariectomia sobre a concentração plasmática de fosfatase alcalina e proteínas totais.....	44
Figura 10. Efeito do tratamento com estroprogestativos, doxiciclina e ambos fármacos em ratas com e sem ovariectomia sobre a concentração plasmática de colesterol e triglicérides.....	45

Figura 11. Efeito do tratamento com estroprogestativos, doxiciclina e ambos fármacos em ratas com e sem ovariectomia sobre a concentração plasmática de ureia e creatinina.....	46
Figura 12. Efeito do tratamento com Estroprogestativos, doxiciclina e ambos fármacos em ratas com e sem ovariectomia sobre a concentração plasmática de transaminase oxalacética (TGO) e transaminase pirúvica (TGP).....	47
Figura 13. Efeito do tratamento com Estroprogestativos, doxiciclina e ambos os fármacos em ratas com e sem ovariectomia sobre o modelo de fogachos induzido através de exercício forçado na esteira.....	48
Figura 14. Termogramas representativos da temperatura da pele da cauda logo após a indução dos fogachos através do exercício forçado na esteira.....	49
Figura 15. Efeito do tratamento com Estroprogestativos, doxiciclina e ambos os fármacos em ratas com e sem ovariectomia sobre a ciclicidade estral.....	49
Figura 16. Representação de cada fase do ciclo estral de cada grupo.....	50

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Relação entre os inibidores teciduais e enzimas alvo de degradação.....	25
Quadro 2. Tratamento de reposição hormonal, com destaques para as vias de aplicação e os efeitos benéficos e maléficos.....	27

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADAMs.- A Disintegrin And Metaloproteinase
DHEA-S - Sulfato de desidroepiandrosterona
DHGNA- Doença hepática gordurosa não alcoólica
DNA- Deoxyribonucleic acid
DVC - doença cardiovascular
E1 - Estrona
E2 - Estradiol
E3 - Estriol
ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EP - Estroprogestativo
ER- α - Receptores estrogênicos subtipo α
ER- β - Receptores estrogênicos subtipo β
FDA - Food and Drug Administration
FSH – Hormônio folículo-estimulante
GhRH- Hormônio liberador do hormônio do crescimento
HOMA-IR - Homeostatic Model Assessment
IGF-1- Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
LDL - Lipoproteína de baixa densidade
LH – Hormônio luteinizante
LIBBS S/A – Indústria farma
LOX - Enzimas lipooxigenase
MAPK - Mitogen Activated Protein Kinases
MEC – Matriz Extracelular
mRNA- RNA mensageiro
mTOR- Mechanistic target of rapamycin
OVX – Ovariectomizados
SHBG - Globulina de Ligação
SM - Síndrome metabólica
STRAW - Stages of Reproductive Aging Workshop
TIMPs - Inibidores Teciduais das Metaloproteinases
TRH - Terapia de Reposição Hormonal
TSH - Thyroid-stimulating hormone
VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1 Menopausa	16
2.2 Enzimas Metaloproteinases	23
2.3 Tratamentos farmacológicos e naturais utilizados para o controle da menopausa.....	26
2.4 Relação da Doxíciclina em Dosagem Baixa no efeito em Menopausa e Metaloproteinase	31
3. OBJETIVOS	33
3.1 Geral	33
3.2. Específicos.....	33
4. METODOLOGIA	34
4.1 Animais	34
4.2 Cirurgias de Falso-Operado (Sham) e Ovariectomia.....	35
4.3 Determinação do ciclo estral em ratas.....	35
4.4 Drogas Utilizadas	36
4.5 Determinação do consumo de ração dos animais.....	36
4.6 Determinação do peso corporal dos animais.....	37
4.7 Coleta de sangue para dosagem bioquímica em ratas.....	37
4.8 Determinação do Tecido Adiposo e Peso Uterino das Ratas	37
4.9 Indução de fogacho em camundongos.....	37.
4.10 Análise Estatística	38
5. RESULTADOS	39
5.1 Efeito do tratamento com estroprogestativo e doxíciclina em relação ao acompanhamento corporal e peso corporal total.....	39

5.2 Efeito do tratamento com estroprogestativos e doxiciclina em relação ao acompanhamento do consumo de ração de ratas e o consumo de ração total	40
5.3 Efeito do tratamento com estroprogestativo, doxiciclina e ambos fármacos simultâneos em ratas com e sem ovariectomia sobre o peso do tecido adiposo e do útero	41
5.4 Efeito do tratamento com estroprogestativos, doxiciclina e ambos fármacos simultâneos em ratas com e sem ovariectomia sobre a concentração plasmática de cálcio e magnésio	42
5.5 Efeito do tratamento com estroprogestativos, doxiciclina e ambos fármacos simultâneos em ratas com e sem ovariectomia sobre a concentração plasmática de fosfatase alcalina e proteínas totais	43
5.6 Efeito do tratamento com estroprogestativo, doxiciclina e ambos fármacos simultâneos em ratas com e sem ovariectomia sobre concentração plasmática de colesterol e triglicérides.....	45
5.7 Efeito do tratamento com estroprogestativos, doxiciclina e ambos fármacos simultâneos em ratas com e sem ovariectomia sobre a concentração plasmática de ureia e creatinina:	45
5.8 Efeito do tratamento com estroprogestativos, doxiciclina e ambos fármacos simultâneos em ratas com e sem ovariectomia sobre a concentração plasmática de ureia e creatinina.....	47
5.9 Efeito do tratamento com estroprogestativos, doxiciclina e ambos fármacos simultâneos em ratas com e sem ovariectomia sobre a concentração plasmática de TGO e TGP.....	47
5.10 Efeito do tratamento com estroprogestativo, doxiciclina e ambos fármacos simultâneos em ratas com e sem ovariectomia sobre ciclicidade estral.....	49
6. DISCUSSÃO.....	51
7. CONCLUSÃO	59
8.REFERÊNCIAS	60
ANEXO – A.....	80

1. INTRODUÇÃO

A menopausa é caracterizada como o término permanente dos períodos menstruais, decorrente da falência ovariana fisiológica, com declínio da secreção dos hormônios estrogênio e progesterona, a diminuição fisiológica da atividade ovariana causa mudanças desfavoráveis no metabolismo da mulher, incluindo alteração no metabolismo dos lipídios, da glicose e insulina e na distribuição da composição corporal, ondas de calor, tonturas e palpitações, depressão e irritabilidade, diminuição da libido e maior chance de surgimento de osteoporose (WHO, 1996; LINDAHL, 2014; MOREIRA et al, 2014).

Como diminuição da secreção do estrógeno na menopausa é fator determinante e responsável pela gênese da osteoporose após a menopausa, com a redução do hormônio conseqüentemente ocorre maior atividade de metabólica óssea, assim sendo, maior ritmo na remodelação óssea (BANDEIRA, 2000).

Diversos receptores responsáveis pelos efeitos atribuídos na menopausa estão ancorados na matriz extracelular (MEC). A matriz extracelular encontra-se presente em todos os tecidos, com o qual é um conjunto de agregados supramoleculares constituído por colágenos, proteoglicanos e glicoproteínas (GPs), que mantêm as células associadas possibilitando a organização dos tecidos e a sobrevivência celular (AOUDJIT; VUORI, 2001). Seu equilíbrio entre degradação e remodelamento se dá através de diversas substâncias, mas principalmente um determinado grupo de enzimas denominado Metaloproteinases (MMPs) e Desintegrina A e metaloproteinase (ADAMs).

Normalmente, as MMPs encontram-se em estado latente, porém uma vez ativadas, por exemplo, durante um processo neuroinflamatório, passam por uma série de etapas como transcrição, translação, ativação e inibição, o que as torna extremamente desreguladas e destrutivas para o tecido cerebral. Em contrapartida, outras substâncias são liberadas na tentativa de conter e equilibrar sua atividade denominadas de Inibidores Teciduais das Metaloproteinases (TIMPs). Esse balanço entre produção, ativação e inibição previne que haja uma proteólise ou inibição excessiva. Quando a atividade proteolítica é maior que a inibição pelas TIMPs, a MEC

é totalmente degradada. Já o contrário, quando há excesso de TIMPS, os elementos da MEC, como o colágeno, se acumulam, formando fibrose (ROSENBERG, 2002).

Alguns poucos estudos sugerem uma relação muito íntima entre a regulação hormonal e as metaloproteinases. Elas parecem estar envolvidas na regulação da menstruação pois estão expressas de maneira alterada no endométrio de mulheres com endometriose e isso parece estar associado à uma sensibilidade reduzida à progesterona (OSTEEN et al., 2003).

Também foi verificado que em mulheres na menopausa que praticam pouco exercício físico, apresentam um aumento nos níveis de MMP-8 e TIMP-1. Essa elevação estaria associada à diversas patologias relacionadas com a senescência (MIECZKOWSKA *et al.*, 2016). Dentre essas patologias associadas à senescência, encontra-se a aterosclerose. Esse processo de acúmulo de gordura no vaso recruta MMP-2 e 9 durante seu desenvolvimento. Muzzio e colaboradores (2012) observaram um aumento dessas metaloproteinases em pacientes na menopausa, que é considerado um estado de processo inflamatório basal, principalmente devido ao hipoestrogenismo.

Entretanto, há estudos em que mostram que essas enzimas na menopausa estejam aumentadas, porém não há um aprofundamento fisiopatológico bem elucidado na literatura sobre mecanismos específicos em relação a própria fisiologia hormonal feminina. Caso seja verificado um envolvimento desse grupo de enzimas na regulação hormonal feminina, novos estudos podem direcionar para quais aspectos devemos focar e possivelmente, considerar ou não, as enzimas, como um novo alvo terapêutico.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Menopausa

A menopausa para muitas mulheres é percebida diante de vários sintomas que afetam a sua qualidade de vida, ou seja, caracterizada por mudanças fisiológicas, geralmente apresentam-se como queixas os sintomas vasomotores,

musculoesqueléticos, distúrbios no humor, urogenitais, distúrbios cognitivos, distúrbios do sono, ganho de peso, entre outras queixas (TSEROTAS K.; BLUMEL J. E, 2015; MONTELEONE *et al.*, 2018).

De acordo com World Population Aging Report (2013), a população idosa será predominantemente feminina, pois as mulheres possuem maior expectativa de vida e o número de idosos com 60 anos ou mais aumentou de 9,2% em 1990 para 11,7% em 2013 e gradualmente aumentará até 21,1% até 2050. A exemplo disso, em 2013, haviam 85 homens por 100 mulheres na faixa etária de 60 anos ou mais e 61 homens por 100 mulheres na faixa etária de 80 anos ou mais.

Em países desenvolvidos, Zuo *et al.* (2009) descreve que a idade mediana das mulheres aumentará constantemente e poderá atingir faixa etária de 82 anos em 2025, conseqüentemente aumentará a ocorrência de doenças cardiometabólicas, obesidade, síndrome metabólica e diabetes tipo 2.

Harlow *et al.* (2012) cita que em 2011, o grupo de Oficina de Estágios do Envelhecimento Reprodutivo (STRAW) desenvolveu um sistema de estadiamento mais abrangente, o STRAW + 10, que dividiu a vida feminina adulta em três fases: reprodutiva, durante o período da menopausa e pós-menopausa. Esta divisão foi feita com base em critérios como principais as características do ciclo menstrual, os critérios de suporte como biomarcadores endócrinos e contagem de folículos antrais (AFC), bem como características descritivas dos sintomas vasomotores. No entanto, Okeke *et al.* (2013) relata que não só o aumento do Hormônio folículo estimulante (FSH), bem como, estudos recentes indicam que o hormônio anti-muleriano (marcador precoce do envelhecimento ovariano) e a inibina B, com o qual encontram-se diminuídos são os biomarcadores mais fidedignos para detecção da menopausa.

Esta fase é designada também por declínios nos níveis de progesterona, aumento nos níveis de estradiol, Hormonio Foliculo Estimulante (FSH), Hormonio Luteinizante (LH) entre outros, que levam à inúmeras manifestações de sintomas desagradáveis, sendo que, alguns órgãos também são afetados, como útero, vagina, mama, cérebro, tecido adiposo e osso. (RIO *et al*; 2018). A figura 1, retrata os principais sintomas da menopausa e os órgãos afetados.

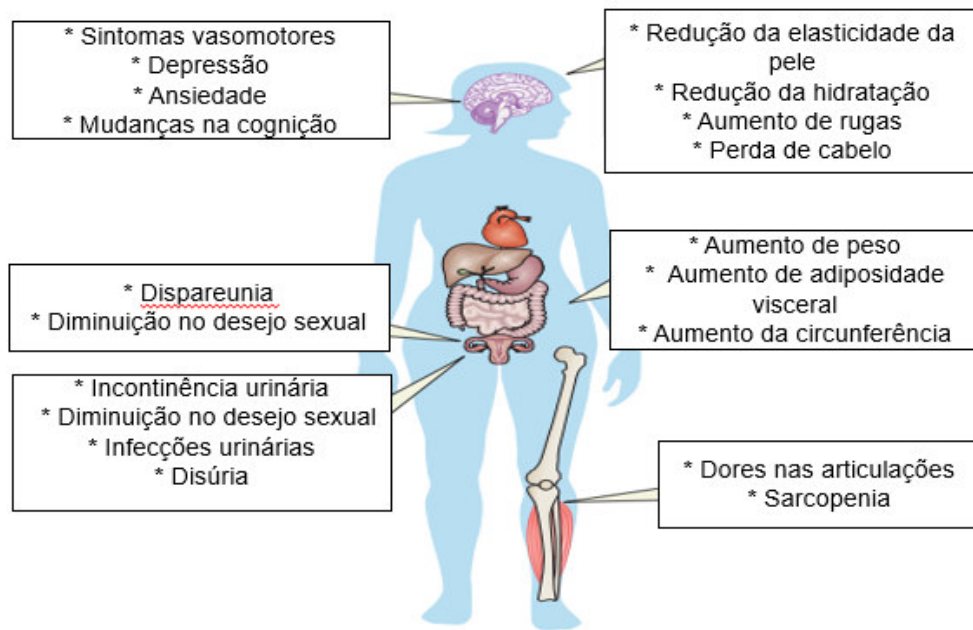


Figura 1. Sintomas da menopausa- Prevalência global, fisiologia e implicações
Fonte: Adaptado de Monteleone *et al.*, 2018

A menopausa natural que corresponde ao último ciclo menstrual, somente reconhecido depois de passados 12 meses da sua ocorrência e acontece geralmente em torno dos 50 anos de idade. Além da forma natural de manifestação da menopausa, a mesma pode ocorrer através de intervenção cirúrgica, na qual ocorre a interrupção prematura da exposição a hormônios sexuais femininos. (HARLOW *et al.*, 2012).

Recentemente esta diferença tornou-se mais evidenciada, devido a probabilidade maior do risco de déficit cognitivo e doença de Alzheimer para quem teve a menopausa cirúrgica, ou seja, há mais predisposição a patologias as mulheres que entraram precocemente na menopausa (GEOGARKIS M.K. *et al*, 2019).

Diante disso, as consequências do declínio hormonal, principalmente na produção do estrogênio, podem influenciar em algumas patologias como doenças cardíacas, osteoporose, câncer, diabetes, hipertensão arterial e obesidade. Este hormônio tem diversas funções regulatórias no organismo, entre elas, o desenvolvimento e manutenção dos tecidos femininos (SAMAR R. *et al.*, 2018; PELTONEN H., 2019; MANCUSO *et al.*, 2019; POTTER *et al.*, 2018; MONTEOLE *et al.*, 2018)

A figura 2, representa o esquema de fisiologia hormonal da fase da menopausa, em que é possível observar os hormônios que aumentam sua concentração e os que diminuem, e que conseqüentemente trazem associado a esses fluxos vários sintomas indesejáveis.

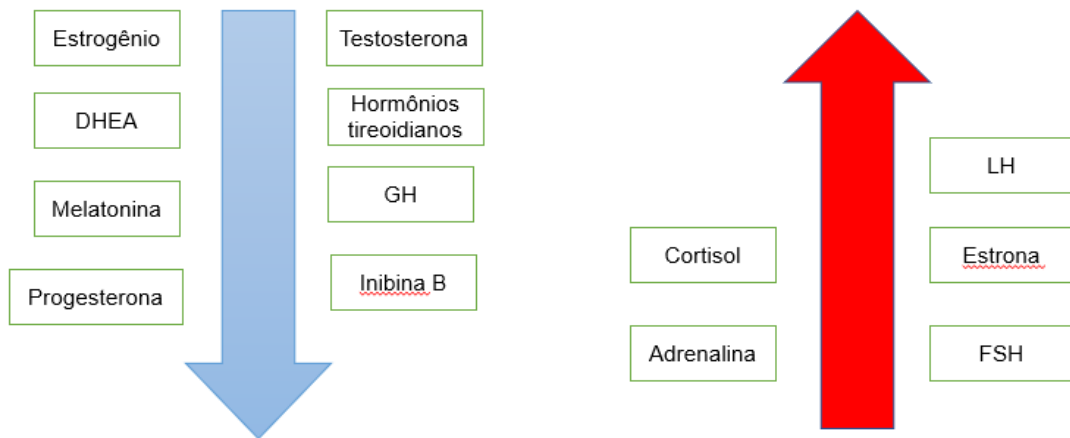


Figura 2. Esquema da fisiologia hormonal na menopausa.

Fonte: Adaptado de Monteleone *et al.*, 2018; Toffol *et al.*, 2014; Antunes *et al.*, (2003).

O estradiol geralmente refere-se ao isômero 17- β -estradiol e significa o principal e mais importante hormônio esteroide estrogênico endógeno. Sua produção ocorre pelos ovários. Essa produção ovariana encontra-se reduzida após a menopausa. Os estrogênios neste período são originados durante a aromatização de andrógenos da adrenal, especificamente androstenediona para estrona, que por sua vez, tenta induzir ou ser convertida em 17- β -estradiol. Entretanto, essa situação pode ocorrer principalmente nas células adiposas, além disso a concentração de estrógenos circulantes encontra-se mais em mulheres em pós-menopausa com sobrepeso (LEVY e AGUIAR, 2018)

O mecanismo da função estrogênica em sua maioria envolve os receptores estrogênicos α e β (ER- α e ER- β , respectivamente) com o qual, estimula ou impede a transcrição de genes dependentes de estrogênio, além disso, desempenha um papel central na regulação de muitos processos vitais, incluindo desenvolvimento, reprodução e fisiologia normal (GUSTAFSON *et al.*, 2000)

Para isso, nos tecidos há presença destes receptores e são determinados para a ação tecido-alvo e quando há ação do estrogênio, ER α é expresso em vários

tecidos como, útero, próstata (estroma), ovário, testículos, ossos, mama, tecido adiposo branco, fígado e músculo, e ER β é expresso em cólon, próstata (epitélio), testículos, glândula salivar, medula óssea e endotélio vascular (GUSTAFSON *et al.*, 2000; COUSIN *et al.*, 1999; KUIPER *et al.*, 1997; DAHLMAN W.K *et al.*, 2006), porém na menopausa, como exemplo, é mais notável os sinais de atrofia no epitélio da parede anterior da vagina, podendo ter como uma das causas, a incontinência urinária (GODLEWSKA *et al.*, 2018). Seus efeitos fisiológicos são baseados na sua ligação a receptores estrogênicos e à subsequente biossíntese de proteínas específicas.

Liedtke *et al.*, (2012) menciona que, quando o ovário interrompe a produção e o feedback do ovário é perdido, o tecido adiposo serve como fonte de produção de estrogênio, isto é, ocorrendo aromatização, com o qual é convertida em androstenediona e testosterona em estrona (E1) e estradiol (E2), concomitantemente. Diante disso, observa-se que há maior concentração de E1 e E2, sulfato de estrona do que em mulheres não obesas após a menopausa. Há estudos em que analisaram a correlação entre síndrome metabólica e menopausa nos últimos anos (MEIRELLES 2014; PU D. *et al.*, 2017), bem como a análise do equilíbrio hormonal, como 17 β -estradiol, estradiol livre, estrona e indicadores androgênicos, ou seja, testosterona total, testosterona livre, hormônio sexual, globulina de ligação (SHBG) ou sulfato de desidroepiandrosterona (DHEA-S) (GOMEZ-SANTOS *et al.*, 2012; AMBIKAIIRAIJAH *et al.*, 2019)

Há correlações clínicas patológicas entre a diminuição dos níveis hormonais e o processo de senescência. Essa associação, relaciona-se ao DHEA (dehidroepiandrosterona), na sua forma ativa é um hormônio que provém do metabolismo da pregnenolona, que por sua vez é ocasionado através do metabolismo do colesterol. Seu declínio tem sido correlacionado com diferentes doenças degenerativas crônicas, os quais podem ser doenças cardiovasculares, alterações na cognição, doenças articulares, resistência insulínica, diabetes entre outras (VILLAREAL D.T *et al.*, 2004; DHATARIYA K *et al.*, 2005; GIANINNI A *et al.*, 2019)

Em relação a melatonina, hormônio produzido na glândula pineal, é sintetizado a partir da serotonina, além disso a síntese e produção são parcialmente influenciadas pelo estrogênio e progesterona. Em sua maior proporção é ativada durante a noite e durante o dia, as quantidades são pequenas, diante disso, com o passar dos anos, há um declínio significativo durante a menopausa, com isso, na

maioria dessas mulheres nesta fase tem menos sono reparador e conseqüentemente o mais afetado é a neurocognição, distúrbios no sono, sintomas vasomotores, até mesmo risco de câncer (TOFFOL E *et al.*, 2014; CHU L. W. *et al.*, 2018)

Através do eixo hipotalâmico hipofisário é liberado o GhRH, com o qual é o hormônio liberador do hormônio do crescimento, sua atuação ocorre no fígado, que por sua vez, irá aumentar a liberação de IGF-1 (hormônio do crescimento análogo a insulina), isto é, forma ativa do hormônio de crescimento, seu declínio durante o envelhecimento, tem-se relacionado a sarcopenia, síndrome astênica, fadiga, perda de massa muscular (AGUIAR O.M.H *et al.*, 2017)

A progesterona é o primeiro hormônio que declina na mulher, cerca de 40 anos de idade. Sua utilização é mais empregada para tentar preservar o útero, proteção óssea por estimular a atividade dos osteoblastos, modulação de estado de humor, entre outros, assim como também, a progesterona impede o crescimento induzido por estrogênio no endométrio e a ação diminuída da progesterona aumenta o risco de câncer no endométrio (O'CONNOR K.A *et al.*, 2009)

Existem três tipos de hormônios estrogênicos: estrona (E1), estradiol (E2), e estriol (E3). O estradiol é o hormônio mais abundante no sexo feminino durante a época da fertilidade cerca de 80% de sua concentração. Em relação a estrona, este hormônio encontra-se em maior abundância durante a menopausa, acumula-se muito no tecido adiposo. O estriol é o hormônio menos agressivo e considerado o mais seguro para ser utilizado, é mais abundante durante a gravidez, correspondendo cerca de 90% dos estrogênios. Esses processos são influenciados de maneira importante hipostrogenismo, por exemplo, em ratos, a ovariectomia aumenta a infiltração de células imunes no tecido adiposo, aumenta a resistência à insulina, aumenta as adipocinas, assim como também contribuem para o risco de doença cardiometabólica (ROGERS *et al.*, 2009; POTTER *et al.*, 2012), há correlação com ingestão calórica, distribuição de adiposidade central, entre inúmeras situações devido a essa falência ovariana (POLOTSKY E POLOTSKY, 2010; LEENERS B *et al.*, 2017).

Testosterona nesta fase da menopausa também ocorre um declínio, o primeiro marco deste declínio geralmente encontra-se cerca dos 35 anos de idade, posteriormente mais perda em 45 anos de idade e assim sucessivamente até obter uma concentração relativamente baixa. Os níveis de testosterona nas mulheres diminuem na quarta década de vida e antes da abordagem da menopausa, 50% dos

observados na terceira década (ZUMOFF B. *et al.*, 1995), diante disso, ocasiona a diminuição do estímulo da libido sexual, da massa muscular, fraqueza muscular, cognição, entre outros fatores (HORSTMAN A.M. *et al.*, 2012)

Em relação aos hormônios tireoidianos, há pouco estudo correlacionando a menopausa, com isso, em um estudo recente e prospectivo com 540 mulheres, observou-se hipotireoidismo subclínico subindo de 23,82% na idade de cerca de 40 anos para 62,5% na idade de cerca de 70 anos, assim como também, em alguns pacientes com hipotireoidismo aumentou de 1% para 26,8% na faixa etária de 70-80 anos (PANDA S. *et al.*, 2018). Diante disso, o estrogênio é considerado um hormônio que aumenta a função da tireóide, quando estão baixos, conseqüentemente a função tireoidiana também diminui. A sintomatologia inclui depressão, perda de memória, comprometimento cognitivo, queixas neuromusculares. O hormônio tireoidiano (TSH) encontra-se geralmente elevado em idosos, principalmente em mulheres, podendo ser fisiológico ou patológico (VALENCIA H. *et al.*, 2008; SHAIKH S. *et al.*, 2017; JOSHI S.A *et al.*, 2011)

O aumento do FSH (folículo-estimulante), é produzido pela hipófise e é uma das gonadotrofinas, juntamente com o LH. Uma das suas principais funções é o estímulo de estrogênio, porém, na menopausa o FSH encontra-se aumentado, com o qual corresponde a falência ovariana, que resta nos ovários responde mal aos estímulos das gonadotrofinas hipofisárias (FSH e LH) e com produção irregular de inibina leva ao aparecimento de ciclos anovulatórios (ANTUNES S. *et al.*, 2003)

O hormônio cortisol no sangue é regulado pela hipófise hipotalâmica adrenal (HPA), com o qual é influenciado pelo estresse agudo, tanto fisiológico quanto psicológico, como consequência aumenta a secreção de cortisol (ADAM E. K, 2009; HANNIBAL K.E *et al.*, 2014). Existem dados em que os níveis de cortisol aumentam com a idade, principalmente mais mulheres que em homens (CAUTER E.V. *et al.*, 1997; YEN S.S. *et al.*, 2017). Em um estudo evidenciou-se que os níveis de cortisol estavam mais altos durante a fase da transição da menopausa e, posteriormente retornam ao nível anterior quando as mulheres atingem um estado pós-menopausa (WOODS N.F. *et al.*, 2006).

2.2 Enzimas Metaloproteinases

As enzimas metaloproteinases (MMPs) foram descobertas pela primeira vez em 1962 pelos cientistas Gross e Lapiere e constituem uma família de 24 proteínas extracelulares, desde então, observou-se a importância destas enzimas em relação a remodelação tecidual, processos fisiológicos e patológicos (PAGE-MCCAW *et al.*, 2009; HANSEN H. *et al.*, 1993).

Essas enzimas são uma família de 25 enzimas que são dependentes de zinco, com o qual degrada os componentes da matriz extracelular (MEC). A matriz extracelular atua sobre as células com as quais possuem contato, entre as atividades designadas são, a forma, migração, divisão e diferenciação, ou seja, o remodelamento tecidual na matriz extracelular (MEC) é importante no desenvolvimento embrionário, angiogênese, morfogênese e construção de cartilagens (CURRY *et al.*, 2003). Entre os componentes que atuam em estimular a conexão entre as células são, o colágeno, proteoglicanos, glicoproteínas e integrinas, dos quais têm como resultado fisiológico, o desenvolvimento de tecidos e órgãos (RAMIREZ *et al.*, 2003)

A reestruturação da MEC possui uma regulação realizada pela ação de enzimas metaloproteinases de matriz (MMPS), que por sua vez são comandadas em conjunto de seus inibidores, chamados de Inibidores de Tecidos de Metaloproteinases (TIMPS), entre eles, encontramos de TIMP-1, 2, 3 e 4 e são ativadas de acordo com determinada ação de cada metaloproteinase específica (CURRY *et al.*, 2001). O turnover e reestruturação tecidual possuem ação regulada por hormônios, fatores de crescimento e citocinas inflamatórias. (MOTT *et al.*, 2004; CURRY *et al.*, 2003). O TIMP-1 está relacionado a MMP-9, TIMP-2 interliga-se a MMP-2, TIMP-3 corresponde a matriz extracelular e o TIMP-4 possui atividade similar ao TIMP-2 (LI *et al.*, 2009; LECO *et al.*, 1997)

Existem dois sistemas proteolíticos, como exemplo, os sistemas fibrinolíticos (plasminogênio / plasmina) com o qual degradam laminina e fibronectina e exercem também importância na ativação de enzimas das metaloproteinases e estas degradam colágeno e elastina que, quando unidas atuam na clivagem da matriz extracelular (MEC) (LIJNEN, 2001; GALIS, 2002)

A divisão de metaloproteinasas situam-se em grupos como: colagenases (MMPs 1, 8, 13 e 18), gelatinases (MMP-2, MMP-9), estromelinas (MMPs 3, 7, 10, 11, 19, 20), matrilisinas (7 e 16) e metaloproteinase tipo membrana (MMPs 14,15, 16, 17, 24 e 25) (NAGASE *et al.*, 1999) . A maioria das MMPs é secretada como pró-enzimas latentes inativas e requer um processo proteolítico para tornarem ativos, esta atividade proteolítica pode ser estimulada pelo controle da expressão gênica como regulação da transcrição, ativação das pró-enzimas, inibição por inibidores teciduais de metaloproteinasas (TIMPs) ou outros inibidores como a α 2-macroglobulina. Cada família de metaloproteinase atua em algum determinado substrato em ação, como exemplo MMP-2 possuem ações nos substratos fibronectina, laminina, plasminogênio, colágeno IV, V, VII, X e XII, já as MMP-9 degradam as colágeno I V, V, XIV, fibronectina e plasminogênio (SMITH *et al.*, 2002)

A falta de equilíbrio entre MMPs e TIMPs, são capazes de ativar processos patológicos, isto é, podendo ocasionar acumulação ou degradação desordenada na matriz extracelular (THOMPSON e LOFTUS, 2002). Essa estrutura é ativada por um sinal peptídico, domínio pro-peptídeo e um domínio catalítico para ligação de zinco, assim como também, domínio para afinidade por hemopexina (CURRY *et al.*, 2003), além disso, há quatro inibidores TIMPS relacionados a essa ordenação e organização, como TIMP-1, 2, 3 e 4, com o qual possuem afinidades diferentes para cada metaloproteinase (CURRY *et al.*, 2001).

O funcionamento dessas enzimas é sintetizado como pro-MMP e ativados após a exposição do domínio catalítico e ativadas por um íon zinco em seu local ativo e são capazes de interagir com receptores celulares específicos. A mobilização de proteases também é influenciada por reações de glutationilação, nitrosilação e fosforilação (HANSSON *et al.*, 2011; VIAPPIANI *et al.*, 2009). Na tabela 1 abaixo, estão descritos os inibidores e a ação de inibição.

Quadro 1. Relação entre inibidores teciduais e enzimas alvo de degradação

INIBIDORES TECIDUAIS ENDÓGENOS	ENZIMAS ALVO DE DEGRADAÇÃO
TIMP-1 (Inibidor Tecidual de metaloproteinase tipo 1)	MMP-1, MMP-3, MMP-7 e MMP-9
TIMP-2 (Inibidor Tecidual de metaloproteinase tipo 2)	MMP-2
TIMP-3 (Inibidor Tecidual de metaloproteinase tipo 3)	MMP-2 e MMP-9
TIMP-4 (Inibidor Tecidual de metaloproteinase tipo 4)	MMP-2

Fonte: Brew et al. (2010)

Nos últimos anos, alguns pesquisadores relataram propensão a desenvolvimento patológico devido à desestruturação da matriz extracelular, pois levam-se a danos e alterações funcionais no organismo, a exemplo disso, envolve a relação com câncer endometrial, câncer de mama, câncer de tireóide, síndrome metabólica, obesidade, prolapso uterino, estresse oxidativo, vulnerabilidade à aterosclerose e inclusive pode ser indicado como possível biomarcador cardiovascular (HANSSON *et al.*, 2011; RAFFETTO *et al.*, 2008; HOPPS *et al.*, 2013; KUFAISHI *et al.*, 2016). Na figura 3, estão esquematizadas alguns dos sintomas que estão associados à ação das metaloproteinases.

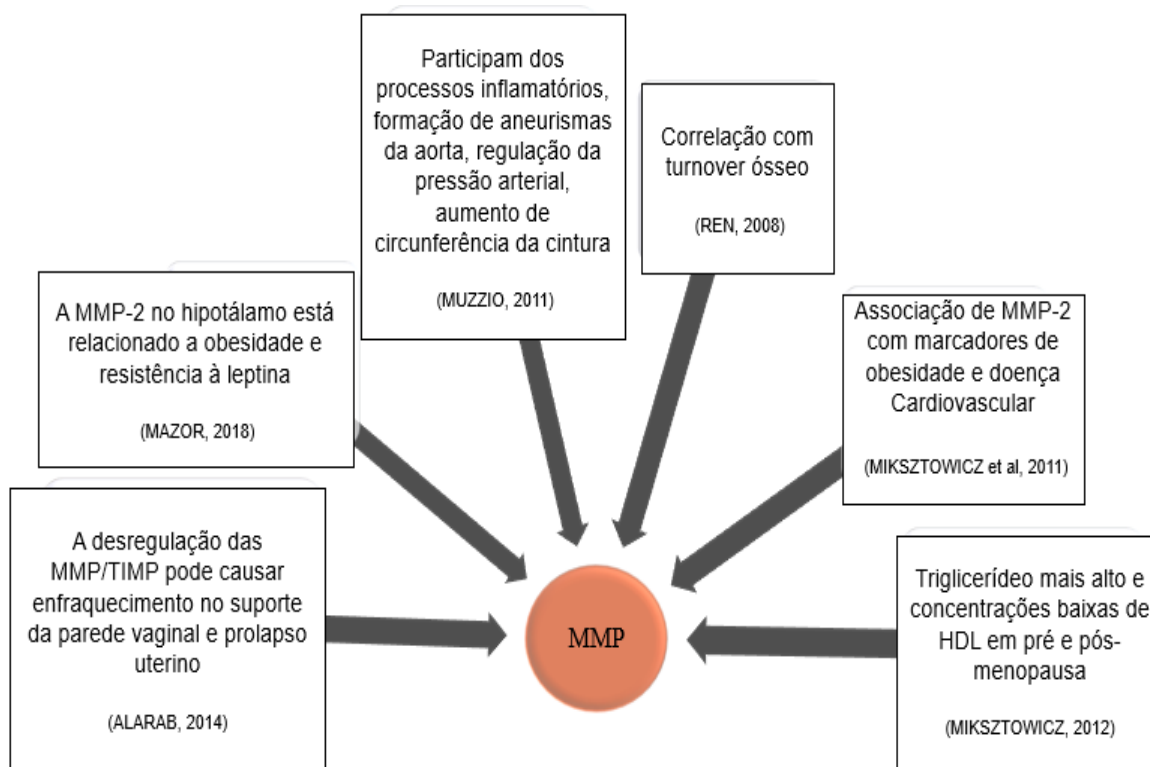


Figura 3. Reação entre metaloproteínas e os sintomas da menopausa

Diante do exposto, torna-se imprescindível a regulação da homeostase das enzimas metaloproteínas e seus respectivos inibidores teciduais, entretanto, essas enzimas possuem habilidade de degradar, renovar e remodelar a matriz extracelular (GODOY-SANTOS *et al.*, 2014).

2.3 Tratamentos farmacológicos e naturais utilizados para o controle da menopausa

O tema sobre modulação hormonal é estudado nos meios científicos desde os anos 60. Esse assunto ganhou relevância devido o bem-estar físico e emocional, além disso, foi analisado um aumento da expectativa de vida das mulheres. A intenção dos benefícios relacionados ao controle dos sintomas da menopausa, deve-se ao fato de haver inúmeras situações que afetam a qualidade de vida nesta fase do envelhecimento, diante disso, pesquisadores investigam a possibilidade de auxiliar no alívio dos sintomas vasomotores, geniturinários, densidade mineral óssea, efeito cardioprotetor, distúrbios no sistema nervoso central, ocorrência de câncer de mama e endométrio, assim como também, casos de tromboembolismo, podendo ser através

de terapia com estrogênio e progesterona combinados, hormônios bioidênticos, fitoestrógenos, ou doxiciclina em dosagem baixa, entre outros estudos em análises inconclusivas (MOREIRA *et al.*, 2014; GRINGS *et al.*, 2009; SCARPELLINI *et al.*, 1994)

Outro fator importante para analisar eficácia do tratamento hormonal, é a quantidade e especificidade dos receptores destes hormônios nos tecidos-alvos. Em um estudo por Maxson *et al.*, (1989) aonde verificaram que o tratamento hormonal com mulheres na menopausa que apresentaram sintomas vasomotores e atrofia vaginal, foi observado que os hormônios bioidênticos estradiol combinado com progesterona tiveram melhores resultados e menos efeitos indesejáveis, assim como também, uma melhora nos sintomas vasomotores em comparação com estrógenos conjugados com medroxiprogesterona. Atualmente existem uma série de tratamentos de reposição com substâncias hormonais que possuem exatamente a mesma estrutura química e molecular encontrada nos hormônios produzidos no corpo humano. Conforme a tabela 2 abaixo, mostram alguns exemplos.

Quadro 2. Tratamento de reposição hormonal, com destaques para as vias de aplicação e os efeitos benéficos e maléficos.

HORMÔNIOS BIOIDÊNTICOS

Ação benéfica: Mais ativo nos efeitos vasomotores e geniturinários, exerce papel no controle lipídico, doenças cardiovasculares e ação contra osteoporose, porém está implicado no desenvolvimento no câncer de mama e endométrio.

Estradiol (E2) **Ação indesejável:** Está relacionado ao desenvolvimento de câncer de mama e endométrio

Forma oral: propicia um perfil lipoprotéico menos aterogênico, mas a metabolização do

estradiol hepático, de primeira passagem, pode aumentar riscos indesejáveis

Forma tópica: Eficaz no alívio dos sintomas vasomotores e urogenitais e na redução de absorção óssea. Há maior redução de risco carcinogênico, considerado a via mais segura.

Forma vaginal: Seguro e eficaz, controla atrofia vaginal e baixo efeito indesejável

Ação benéfica: Eficaz no controle dos efeitos vasomotores, geniturinários, proteção contra doenças cardiovasculares e osteoporose.

Ação indesejável: Menos potente que estradiol, assim como também, há maior propensão ao desenvolvimento de câncer

Estrona (E1)

Forma oral: Metabolização hepática de primeira passagem, pode aumentar o risco de efeitos indesejáveis

Forma tópica: Mais indicada e para redução do risco de câncer

Forma vaginal: Mais indicada e para redução do risco de câncer

Ação benéfica: Eficaz no controle dos efeitos vasomotores, geniturinários, corrige atrofia vaginal. Tem-se mostrado seguro quanto ao risco de desenvolvimento de câncer de mama ou endométrio.

Estriol (E3)

Ação indesejável: É um estrógeno de curta duração, depende da via e da frequência em que é administrada, não demonstrou efeitos na densidade mineral óssea e doenças

cardiovasculares, por isso, deve ser administrado com estradiol.

Forma oral: Em associação com o estradiol e em dose certa, pode produzir efeito estrogênico adequado no órgão-alvo.

Forma tópica: Menos absorvido pela pele em comparação com estradiol e estrona.

Forma vaginal: Mais indicado em casos de atrofia vaginal

Ação benéfica: Atividade antiestrogênica, antiandrogênica e antimineralocorticóide

Ação indesejável: Tontura, sonolência, os quais podem ser minimizados no período noturno

Progesterona

Forma oral: Baixa biodisponibilidade

Forma tópica: Melhor absorção e menor toxicidade hepática

Forma vaginal: Menor incidência de efeitos psicológicos, mais indicado quando há predisposição a problemas emocionais.

Testosterona

Ação benéfica: Sensação de bem-estar, desejo sexual, redução da ansiedade e depressão. Está mais associado a aliviar sintomas físicos e psicológicos, após menopausa cirúrgica e menopausa precoce.

Ação indesejável: A dose e a via de administração exercem influência nos efeitos indesejados, é preferencialmente doses mais baixas.

Forma oral: Baixa biodisponibilidade, porém é bem absorvida em forma de pastilhas ou gotas sublinguais.

Forma tópica: Melhora a biodisponibilidade

Forma vaginal: Interessante quando é desejado rápidos efeitos sobre a sexualidade das mulheres.

Fonte: Adaptado de Levy e Aguiar (2018).

Estudos observados através de metanálise, evidenciaram que, após 15 anos de uso de terapia de reposição hormonal, obteve aumento de 30% no risco de desenvolver câncer de mama, assim como também pacientes que possuíam histórico familiar relacionado ao câncer de mama, possuíam o dobro do risco de desenvolver a doença (PRENTICE *et al.*, 2009). Em congruência com um outro estudo, apresentaram resultados em que as mulheres que utilizavam terapia de reposição hormonal apresentaram risco de 50% maior de morte de câncer de ovário, além disso o uso de algum estrógeno por mais de dez anos na pós-menopausa aumenta consideravelmente o risco de câncer de ovário e persiste até 29 anos após suspensão do uso desta terapia hormonal (MACLENNAN *et al.*, 2001)

Devido os efeitos adversos da terapia de reposição hormonal, buscaram analisar mais terapias alternativas que amenizem os sintomas e melhora na qualidade de vida dessas mulheres. Nos últimos anos, aumentaram o interesse pela ação dos fitoestrógenos para o controle dos sintomas da menopausa, pois eles são substâncias químicas pertencentes ao grupo de flavonoides similares aos estrógenos, em função desta estrutura química, isto é semelhante ao 17- β -estradiol, em alguns estudos demonstraram que os fitoestrógenos interagem mais com receptores estrogênicos comparado a outros receptores (GRINGS *et al.*, 2009)

A dúvida maior desses pesquisadores seriam a relação com possível propensão a indução de proliferações pré-malignas e correlação com aumento do risco com o câncer de mama, ou seja, o tempo em que houver exposição seria

determinante para este possível efeito, a exemplo disso seria o caso da isoflavona de soja (PIOVESAN *et al.*, 2005), com isso, os três maiores grupos de fitoestrógenos são: flavonas, isoflavonas, cumestranos e o poder estrogênico pode variar entre essas substâncias, ou seja, o grupo das isoflavonas tem mais afinidade pelos receptores estrogênicos, assim como também maior atividade estrogênica.

Os produtos naturais destacam-se também em outros estudos em casos de contraindicação do uso de estrógenos bioidênticos e para melhorar a qualidade de vida, como exemplo o *Agnus castus*, com o qual interferem no FSH e LH (MORENO *et al.*, 2017). *Cimicifuga racemosa*, pelos efeitos positivos no metabolismo ósseo, por estimular a atividade de osteoblastos e anti-hiperlipemia (MIAO *et al.*, 2019). A cúrcuma, liga-se aos receptores do estradiol e da progesterona, porém com ação estrogênica fraca. As isoflavonas da soja, apresentam maior afinidade por receptores- β nos tecidos alvos, com isso, observou-se maior efeito positivo no sistema nervoso central, sistema vascular e tecido ósseo em comparação aos outros tecidos-alvo como mamas e endométrio (ABDELRAZEK *et al.*, 2019). A *red clover*, com o qual possuem a presença de isoflavona, há estudos relatando os benefícios em ajudar na redução de sintomas vasomotores em mulheres na menopausa, assim como também em dispareunia e saúde vaginal (DIZAVANDI *et al.*, 2019; GHAZANFARPOUR *et al.*, 2016).

2.4 Relação da Doxíciclina em Dosagem Baixa no efeito em Menopausa e Metaloproteinase

A doxíciclina pertence a uma classe de tetraciclina, dos quais são antimicrobianos com ação em bactérias gram-positivas e gram-negativas, isto é, inibindo a síntese de proteínas em células bacterianas. Um estudo da doxíciclina em dosagem baixa, chamado de subantimicrobiano, começou em 1994, com ensaio clínico em trinta e sete mulheres na pós-menopausa precoce, foi observado com a dosagem de 100 mg por dia por 3 meses pode ser um possível tratamento no metabolismo mineral ósseo e este mecanismo de ação é discutido mediante a inibição das metaloproteinases de matriz com o qual estão envolvidos na remodelação óssea na pós-menopausa e conseqüentemente poderia ser interessante o uso perante o estágio inicial na pós-menopausa (SCARPELLINI *et al.*, 1994)

Outros dados de ensaio clínico foram correlacionados a análises feitas por patologias periodontais e com inclusão da ação das metaloproteinases de matriz e a discussão sobre a ação da capacidade da tetraciclina como inibição dessas enzimas independentemente de sua ação antimicrobiana (GREENSTEIN, 1999; GOLUB *et al.*, 1998), e também em atuação relacionado a proteção contra doenças cardiovasculares (PALLASCH, 2004), este medicamento é considerado como inibidor mais potente e não seletivo de MMP (GOLUB *et al.*, 1991), apesar disso, a utilização da doxiciclina para esta inibição não está muito elucidado pela literatura. Entretanto, JIU e KHALIL., (2017) descrevem que a doxiciclina liga-se próximo ao Zn^{2+} e consequentemente rompe a ligação entre o cálcio e com o qual, reduz a degradação das MMPs.

Este medicamento é considerado o único inibidor das metaloproteinase com o qual foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos e usado para tratamento de sepse e doenças periodontais (BEZERRA *et al.*, 2002; GOLUB *et al.*, 1998; NOVAK *et al.*, 2002; LEE *et al.*, 2004), assim como também, há estudos e seus efeitos em aneurisma aórtico abdominal, infarto agudo e câncer colorretal, hipertensão (THOMPSON *et al.*, 1999; VILARREAL *et al.*, 2003; ONODA *et al.*, 2004; CASTRO *et al.*, 2008)

Em um ensaio clínico randomizado, verificou-se a ação da doxiciclina subantimicrobiana em mulheres na pós-menopausa, com o qual houve redução na gravidade da osteoporose, pois foi observado a normalização da atividade colagenase patologicamente excessiva, ou seja, a metaloproteinase 2 e metaloproteinase 9, além disso, essas mulheres exibiram redução nos biomarcadores da inflamação, destruição do colágeno e reabsorção óssea (GOLUB *et al.*, 2008). Em um outro estudo corroborando com este assunto analisou-se um tempo de tratamento por seis meses, diminuiu biomarcadores de inflamação, como proteína C-reativa em indivíduos com doença cardiovascular (DVC) (BROWN *et al.*, 2004)

Em estudo experimental foi observado que a doxiciclina pode ocasionar efeito antioxidante através do aumento na produção de enzimas antioxidantes no cérebro, isto é, como tratamento para neuroinflamação sob ação em relação a enzima metaloproteinase 9 (DIK *et al.*, 2019). Contudo, outros estudos com os quais obtiveram uma investigação sobre o efeito da doxiciclina, também está associado a diminuição de úlceras gástricas em animais, na remodelação em hipertensão e inibição de células

cancerígenas em carcinoma biliar (SINGH *et al.*,2011; NASCIMENTO *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2017).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o envolvimento das metaloproteinases nos sintomas da menopausa em modelo animal.

3.2. Específicos

- Investigar o efeito das metaloproteinases no peso corporal e consumo de ração de animais falso-operado e ovariectomizados tratados com inibidores seletivos de metaloproteinases;
- Analisar o peso uterino e do tecido adiposo total de animais ovariectomizados ou não tratados com estroprogestativos e inibidores de metaloproteinases;
- Avaliar o perfil bioquímico (cálcio sérico, magnésio sérico, ureia, creatinina, colesterol total, triglicérides, proteínas totais, fosfatase alcalina, transaminase oxalacética e transaminase pirúvica) no sangue de animais falso-operados e ovariectomizados tratados com inibidores de metaloproteinases;
- Observar os efeitos de animais falso-operados e ovariectomizados tratados com inibidores de metaloproteinases em um modelo de fogachos induzido por exercício forçado;
- Examinar o efeito de animais falso-operados e ovariectomizados tratados com inibidores de metaloproteinases em sua ciclicidade estral.

4. METODOLOGIA

4.1 Animais

Foram utilizadas ratas fêmeas da linhagem Wistar com espécie *Rattus norvegicus* e camundongos Swiss com espécie *Mus musculus*, provenientes do Biotério Central da UFMA, com pesos variando entre 250 e 300 gramas e 25 e 35 gramas, respectivamente. Os animais foram mantidos à água e ração controlada e, mantidas em ciclos alternados de luminosidade de 12 horas, com temperatura de 20 a 25° C durante 4 semanas. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as orientações para o cuidado com animais de laboratório e com as considerações éticas descritas nos protocolos experimentais aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal do Maranhão e pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), certificado de aprovação nº 23115.014442/2017-06 (anexo 1).

Os animais estavam distribuídos em 6 grupos conforme descrição a seguir: *Grupo 1 – Falso operado (sham operated) e tratado com solução salina (veículo):* Constituído por ratas submetidas a uma falsa cirurgia tratadas com solução salina (veículo) com solução salina 0,9% que foi o veículo utilizado para a solubilização e diluição dos hormônios (efeito placebo), em volume de 0,1 ml/ 100g de peso dos animais. *Grupo 2 – Falso operado (sham operated) e tratado com doxiciclina:* Constituído por ratas submetidas a uma falsa cirurgia tratadas com um inibidor inespecífico de metaloproteinases via gavagem. *Grupo 3 – Ooforectomizado e tratado com solução salina (veículo):* Os animais foram administrados por via gavagem o veículo utilizado para a solubilização e diluição dos hormônios (efeito placebo), em volume de 0,1 ml/ 100g de peso dos animais. *Grupo 4 – Ovariectomia e tratado com doxiciclina:* Os animais foram administrados com doxiciclina, por via gavagem. *Grupo 5 – Ovariectomia e tratado com estrogênio conjugado associado com acetato de medroxiprogesterona (estro-progestativos):* Após 21 dias da ooforectomia as ratas foram administrados via gavagem, com o hormônio na dose de 20µg/Kg de peso do animal. *Grupo 6 – Ovariectomia e tratado com doxiciclina e estrogênio conjugado associado com acetato de medroxiprogesterona (estro-progestativos):* Após 21 dias da ovariectomia, os tratamentos foram administrados nas ratas diariamente via

gavagem a doxiciclina na dose de 20 mg/ kg e com o hormônio na dose de 20 μ g/Kg de peso do animal respectivamente, assim como também em camundongos foram administrados via gavagem a doxiciclina na dose de 20 mg/kg de peso do animal e via subcutânea o hormônio na dose de 20 μ g /Kg. Ambos os tratamentos foram feitos no período de 1 mês.

4.2 Cirurgias de Falso-Operado (Sham) e Ovariectomia

Neste procedimento, as ratas foram submetidas e mantidas com anestesia por cetamina/xilazina (60/7,5 mg/kg, intraperitoneal) durante todo o período cirúrgico, após isso, foi realizada a assepsia da região ventral dos animais (supra-púbica) para posterior laparotomia de aproximadamente 2 cm na linha mediana para a retirada dos ovários e as trompas identificadas. As trompas foram ligadas com fio de sutura e os ovários isolados e retirados após a ligadura. Posteriormente fez-se novamente uma sutura. Os animais falso-operados (sham) foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, porém os ovários e as trompas permaneceram intactos (KHAJURIA et al., 2012).

4.3 Determinação do ciclo estral em ratas

O ciclo estral foi realizado após 21 dias da ovariectomia através da análise do esfregaço vaginal coletado três vezes na semana no período de um mês. A coleta do material vaginal foi realizada sempre entre 10 e 11 horas da manhã (DIEL; VOLLMER; SCHMIDT, 2002). Foi coletado da secreção vaginal com o auxílio de uma cureta que foi introduzida na vagina dos animais em uma profundidade de aproximadamente 0,5 cm de introito vaginal (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002). Após isso, foi colhido o material e colocado em lâmina de vidro na forma de camada fina e corado com a coloração de papanicolau para ser visualizado em microscópio óptico, onde foram observadas as características citológicas para a identificação das fases do ciclo estral (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002).

Foram analisadas as seguintes fases do ciclo estral:

a) *Diestro*: Caracterizada pela presença, em campo microscópico, de abundantes leucócitos e escassas células epiteliais basais.

b) *Proestro*: Fase que apresenta escassos leucócitos, abundantes células epiteliais de núcleo redondo e volumoso e citoplasma basófilo; escassas células cornificadas do extrato superior. Esta fase na rata dura aproximadamente 12 horas.

c) *Estro*: Nesta fase ocorre a atividade estrogênica máxima e, microscopicamente, observam-se escassos leucócitos e células epiteliais e, aumento no número de células cornificadas, que apresentam núcleos picnóticos e citoplasma eosinófilo.

d) *Metaestro*: Esta fase se inicia com a regressão do epitélio vaginal. Gradativamente vão desaparecendo as células cornificadas e aumentando o número de leucócitos e de células epiteliais basais.

4.4 Drogas Utilizadas

Foram utilizados o estrogênio conjugado 0,45 mg associado com acetato de medroxiprogesterona 1,5 mg, em forma de comprimido com o nome comercial *Selecta* fornecido gratuitamente pelo laboratório LIBBS S/A. A doxiciclina foi obtida na forma de comprimido, com o nome comercial *doxifin tabs* na concentração de 200 mg. Para as ratas, diluiu-se um comprimido de 200 mg em 20 ml de soro fisiológico, em relação aos camundongos foi feita a diluição de um comprimido de 200 mg em 20 ml de soro fisiológico, após isso, utilizou-se 10 ml desta solução e diluiu-se mais em 10 ml de soro fisiológico para obtenção da concentração final.

4.5 Determinação do consumo de ração dos animais

Durante todo o período do experimento, foi realizado a gestão do consumo de ração das ratas. A ingesta de ração dos animais foi determinada em dias alternados na semana, sendo ofertada 300g de ração durante três vezes na semana. As sobras de ração foram pesadas e subtraídas pela quantidade total ofertada e divididas pela quantidade de ratas em cada gaiola e pelo número de dias em que foi consumida. Diante deste cálculo, foi determinado o consumo de ração diária por rata em cada gaiola.

4.6 Determinação do peso corporal dos animais

Durante todo o período de tratamento realizou-se o controle de peso corporal, ingestão alimentar das ratas e camundongos durante 3 vezes na semana. Os animais foram pesados diariamente para a determinação do volume das drogas que foram administradas.

4.7 Coleta de sangue para dosagem bioquímica em ratas

Amostras de sangue foram coletadas a partir da veia cava posterior utilizando seringas heparinizadas e o plasma foi imediatamente separado por centrifugação a 2000 g, a temperatura ambiente durante 20 minutos. As dosagens quantitativas foram realizadas utilizando-se o espectrofotômetro para a determinação dos seguintes parâmetros bioquímicos: Cálcio, Colesterol total, Creatinina, Fosfatase Alcalina, Proteínas Totais, Transaminase Oxalacética, Transaminase Pirúvica, Triglicerídeos e Ureia; utilizando-se a técnica, comprimento de onda e referências de acordo com o elemento dosado e orientação do fabricante dos reagentes (BIOCLIN).

4.8 Determinação do Tecido Adiposo e Peso Uterino das Ratas

Após a retirada do sangue das ratas, o intestino foi rebatido para melhor exposição do tecido adiposo e dos cornos uterinos que foram isolados em conjunto e retirados em toda a sua extensão para a determinação do peso úmido com a utilização da balança analítica.

4.9 Indução de fogacho em camundongos

Exercício forçado para indução de fogachos/ondas de calor: Primeiramente, os animais foram condicionados durante 3 semanas na esteira com velocidade ascendente (Fig.1) após a ovariectomia. Durante o condicionamento, após a corrida, os animais foram acomodados em um contensor aonde permaneceram durante cinco minutos (basal). No dia do experimento, os animais foram forçados a correr e após isso foram contidos durante 5 minutos somente para a medida da temperatura da temperatura caudal. A temperatura da cauda foi comparada com a média da temperatura da cauda medida de acordo com a essa equação:

$$\Delta TST (\Delta TST = (\text{temperatura da cauda}) - (\text{média da temperatura basal})).$$

Registro da temperatura caudal e processamento da imagem (termo-camera): A temperatura da pele da cauda foi medida através do equipamento Thermal Imager TH9260 através de luz infravermelha com lentes de vidro (NEC San-ei Instruments Limited, Japan). A distância óptica para uma medida térmica adequada foi estabelecido para ser entre 16-25 cm. Os animais foram mantidos em contenção, com prévia ambientação dos mesmos, em um contensor LE5014. Durante os experimentos, as imagens térmicas foram tiradas no começo do experimento (tempo 0) e no final de 5 minutos de cada medida (tempos). Todas as medidas de temperatura caudal foram realizadas entre 08:00 a 18:00. Para o processamento da imagem, o software Reporter Generator Lite foi utilizado (NEC San-ei Instruments Limited, Japan). Nos experimentos de temperatura, foi medido 0.8 cm da base da cauda como uma temperatura média em uma área de 0.25 x 0.25 cm.

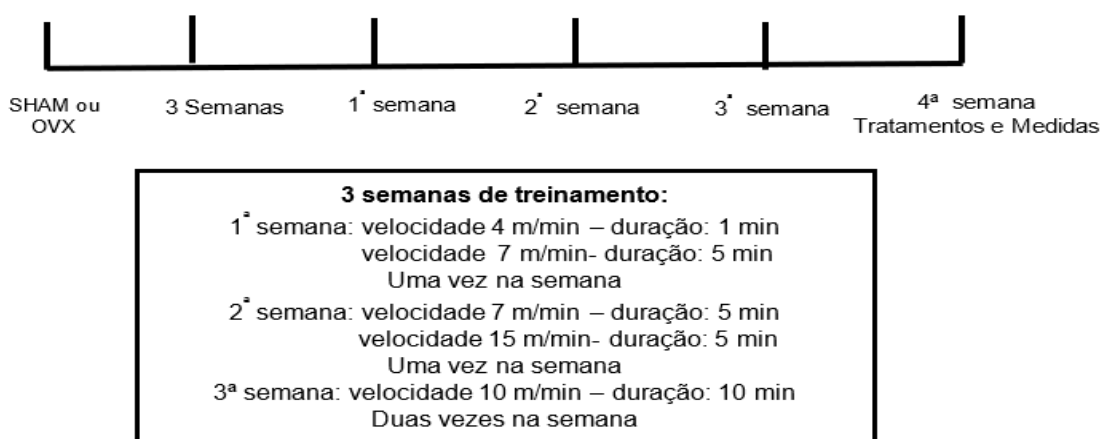


Figura 4: Fluxograma de treinamento dos animais para condicionamento de exercício de esteira forçada.

4.10 Análise Estatística

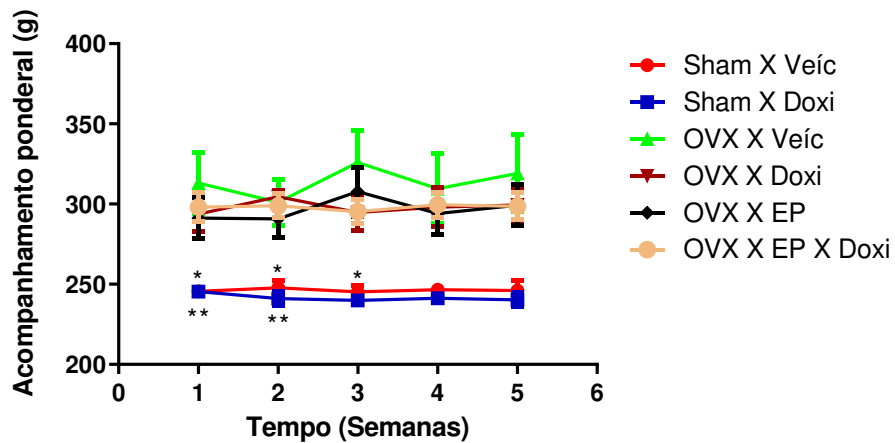
Todos os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de duas vias (Two-way) para medidas repetidas, seguida do teste de Bonferroni, para comparações múltiplas. O nível de significância adotado foi de 5% ($\alpha=0,05$). Todos os cálculos estatísticos foram realizados utilizando o programa estatístico *GraphPad Prism version 6.00 for Windows*, San Diego, California, E.U.A.

5. RESULTADOS

5.1 Efeito do tratamento com estroprogestativos e doxíciclina em relação ao acompanhamento corporal e peso corporal total:

Os animais falso-operados não aumentaram seu peso corporal independente do tratamento. Como esperado, a ovariectomia (OVX) promoveu um importante aumento na massa corporal em comparação aos grupos SHAM. O tratamento de animais ovariectomizados com solução salina apresentaram significância estatística quando comparados ao grupo SHAM tratado com solução salina conforme a figura b.

a)



b)

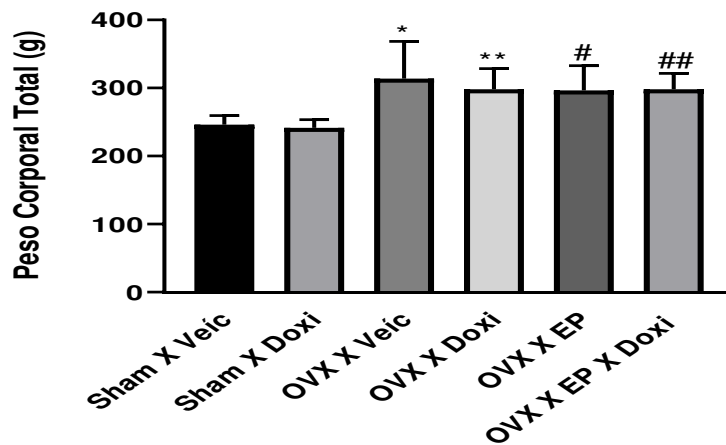
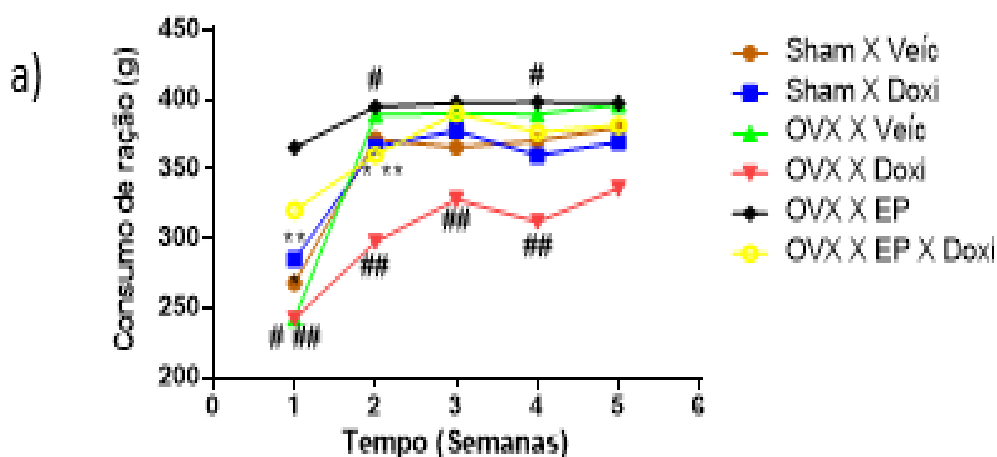


Figura 5. Acompanhamento ponderal em semanas e peso corporal de ratas Wistar do grupo Falso-operado (SHAM) que receberam solução NaCl 0,9%; SHAM administradas com doxiciclina, ovariectomizadas que receberam NaCl 0,9%; ovariectomizadas tratadas com doxiciclina (DOXI, 20 mg/Kg, via gavagem); ovariectomizadas com Estroprogestativo (EP, 20 µg/Kg, via gavagem), ovariectomizadas tratadas com doxiciclina (DOXI, 20 mg/Kg, via gavagem) e com Estroprogestativo (EP, 20 µg/Kg, via gavagem). Cada linha e símbolo e colunas e barras verticais respectivamente, representam a média \pm erro padrão das médias (n=5). a) Acompanhamento ponderal em semanas: *quando comparado com OVX Veíc/OVX Doxi/OVX EP/ OVX X EP X Doxi ** quando comparado com OVX Veíc/OVX Doxi/OVX EP/ OVX X EP X Doxi. b) Peso Corporal Total: * quando comparado com Sham X Veíc/Sham X Doxi ** quando comparado com Sham X Veíc/Sham X Doxi # quando comparado com Sham X Veíc/Sham X Doxi ## quando comparado com Sham X Veíc/Sham X Doxi.

5.2 Efeito do tratamento com estroprogestativos e doxiciclina em relação ao acompanhamento do consumo de ração de ratas e o consumo de ração total

Em relação ao consumo de ração conforme as figuras a e b, houve significância estatística em relação a redução do consumo de ração do grupo OVX tratado com DOXI em relação ao grupo OVX tratado com EP, ou seja, evidenciando que os animais ovariectomizados apresentam maior hiperfagia em comparação aos grupos SHAM, porém, quando tratado com doxiciclina, observou-se que houve menor consumo, mas sem alteração no peso.



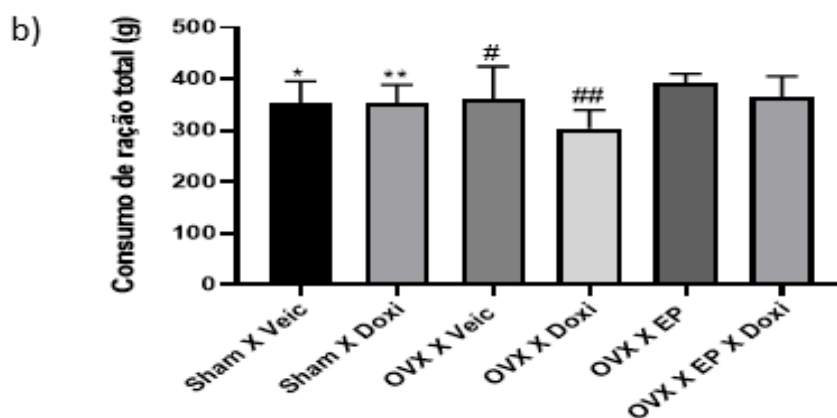


Figura 06. Acompanhamento do consumo de ração em 4 semanas, cada linha e símbolo representam a média \pm erro padrão das médias ($n=5-6$). Os valores foram considerados diferentes com $##p < 0,001$ em relação ao grupo OVX tratado com EP (one-way ANOVA, Bonferroni). Consumo de ração total por grupo de ratas Wistar do grupo Falso- operado (SHAM) que receberam NaCl 0,9%; SHAM administradas com doxiciclina, ovariectomizadas que receberam NaCl 0,9%; ovariectomizadas tratadas com doxiciclina (DOXI, 20 mg/Kg, via gavagem); ovariectomizadas com Estroprogestativo (EP, 20 μ g/Kg, via gavagem), ovariectomizadas tratadas com doxiciclina (DOXI, 20 mg/Kg, via gavagem) e com Estroprogestativo (EP, 20 μ g/Kg, via gavagem). Cada linha e símbolo representam a média \pm erro padrão das médias ($n=5$). a) Consumo de ração por semanas: *quando comparado com OVX X EP ** quando comparado com OVX X EP #quando comparado com OVX X EP ## quando comparado com OVX X EP. b) Consumo de ração total: *quando comparado com OVX X Doxi **quando comparado com OVX X Doxi #quando comparado com OVX X Doxi ## quando comparado com OVX X EP.

5.3 Efeito do tratamento com estroprogestativo, doxiciclina e ambos fármacos simultâneos em ratas com e sem ovariectomia sobre o peso do tecido adiposo e do útero

Os animais submetidos a ovariectomia (OVX, EP e DOXI) apresentaram significância estatística com percentuais de tecido adiposo aumentados em comparação ao grupo SHAM tratado com salina conforme a figura a. Em relação ao peso do útero, houve significância estatística e verificou-se que a ovariectomia induziu a diminuição do órgão, sendo que, esta redução é mais evidenciada pelo peso do útero no grupo OVX tratado com DOXI comparado ao grupo SHAM tratado com DOXI conforme a figura b.

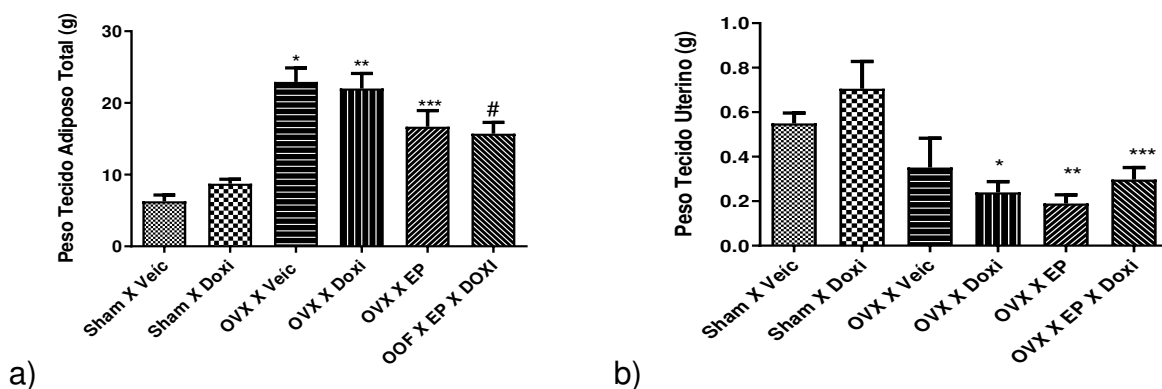


Figura 07. Efeito do tratamento de 4 semanas na determinação do tecido adiposo e peso uterino de ratas Wistar do grupo Falso- operado (SHAM) que receberam NaCl 0,9%, SHAM tratados com doxiciclina (DOXI, 20 mg/Kg, via gavagem), ovariectomizadas (OVX) administradas com NaCl 0,9%, ovariectomizadas tratadas com Estroprogestativo (EP, 20 µg/Kg, via gavagem), ovariectomizadas tratadas com Doxiciclina (DOXI, 20 mg/Kg, via gavagem) e ovariectomizadas tratadas com Doxiciclina (DOXI, 20 mg/Kg, via gavagem) e com Estroprogestativo (EP, 20 µg/Kg, via gavagem). As colunas e barras verticais representam, respectivamente, as médias \pm erro padrão das médias (n=5). a) Peso tecido Adiposo Total: * quando comparado com Sham X Veic e ShamX Doxi ** quando comparado com Sham X veic e Sham X Doxi ***quando comparado com Sham X Veic e Sham X Doxi #quando comparado com Sham X Veic e Sham X Doxi. b) Peso Tecido Uterino: *quando comparado com Sham X veic. **quando comparado com OVX X EP. *** quando comparado com Sham X Doxi.

5.4 Efeito do tratamento com estroprogestativos, doxiciclina e ambos fármacos em ratas com e sem ovariectomia sobre a concentração plasmática de cálcio e magnésio

Os níveis séricos de cálcio dos animais submetidos aos tratamentos propostos no presente estudo, não apresentaram diferença estatística significativa. Os níveis séricos de magnésio dos animais submetidos aos tratamentos propostos no presente estudo, apresentaram diferença estatística significativa, pois os níveis de magnésio estavam aumentados no grupo ovariectomizados (OVX) tratados com DOXI em comparação ao grupo SHAM tratado com veículo conforme a figura b.

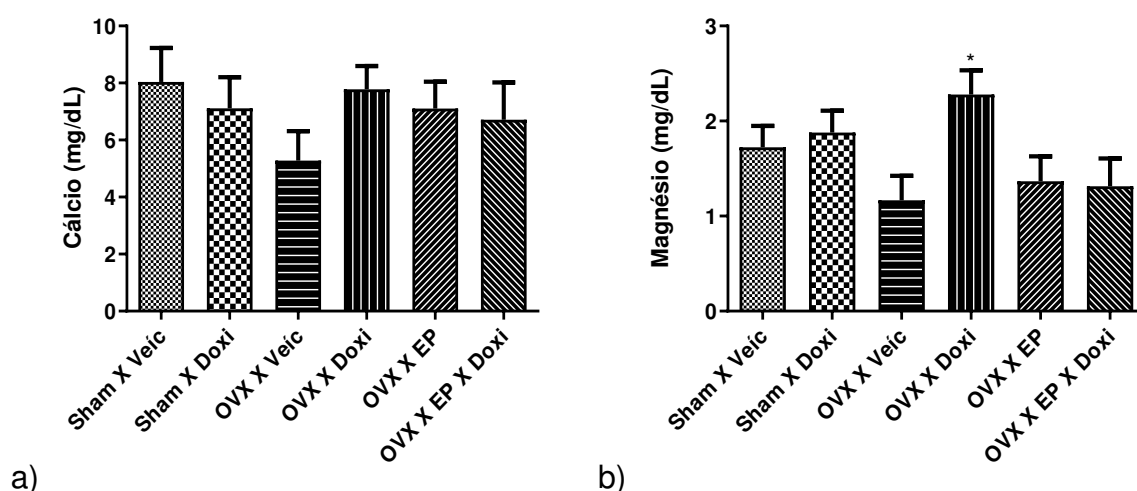


Figura 08. Efeito do tratamento de 4 semanas na determinação dos níveis de cálcio e magnésio de ratas Wistar do grupo Falso-operado (SHAM) que receberam NaCl 0,9%, SHAM tratados com doxiciclina (DOXI, 20 mg/Kg, via gavagem), ovariectomizadas (OVX) administradas com NaCl 0,9%, ovariectomizadas tratadas com Estroprogestativo (EP, 20 µg/Kg, via gavagem), ovariectomizadas tratadas com Doxiciclina (DOXI, 20 mg/Kg, via gavagem) e ovariectomizadas tratadas com Doxiciclina (DOXI, 20 mg/Kg, via gavagem) e com Estroprogestativo (EP, 20 µg/Kg, via gavagem). As colunas e barras verticais representam, respectivamente, as médias \pm erro padrão das médias (n=7-9). b) níveis de magnésio: *quando comparado com OVX X Veic. (* p<0,005 ANOVA/Bonferroni)

5.5 Efeito do tratamento com estroprogestativos, doxiciclina e ambos fármacos em ratas com e sem ovariectomia sobre a concentração plasmática de fosfatase alcalina e proteínas totais

De acordo com a figura a, os níveis séricos de fosfatase alcalina estavam aumentados nos animais submetidos a cirurgia de ovariectomia, no entanto, apresentaram diferença estatística significativa em relação aos grupos SHAM tratados com (Veí e DOXI) e OVX tratado com DOXI. Conforme a figura b, em relação as proteínas totais dos animais não apresentaram diferença estatística significativa, porém, analisou-se que havia uma redução discreta do grupo OVX tratado com DOXI quanto tratado com EP em comparação aos outros grupos.

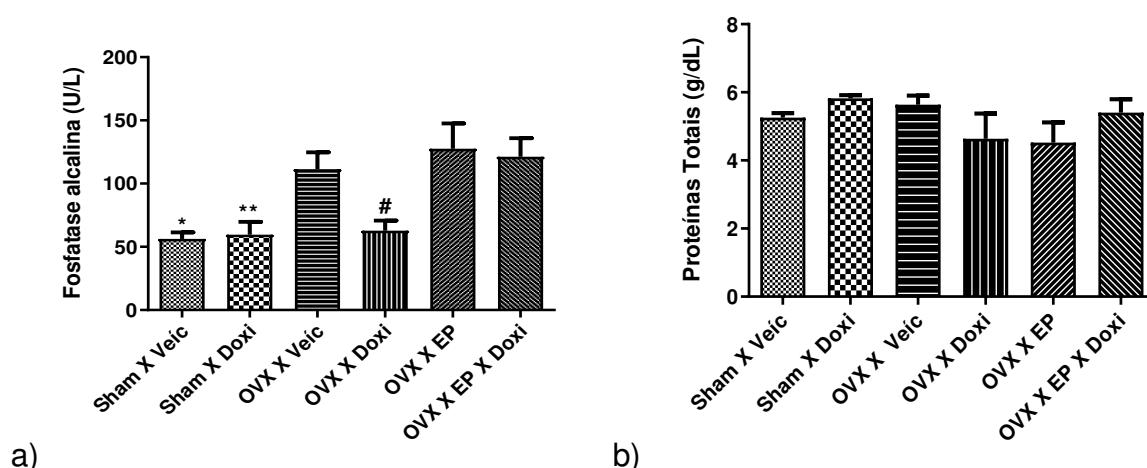


Figura 09. Efeito do tratamento de 4 semanas na determinação dos níveis de fosfatase alcalina e proteínas totais de ratas Wistar do grupo Falso- operado (SHAM) que receberam NaCl 0,9%, SHAM tratados com doxiciclina (DOXI, 20 mg/Kg, via gavagem), ovariectomizadas (OVX) administradas com NaCl 0,9%, ovariectomizadas tratadas com Estroprogestativo (EP, 20 µg/Kg, via gavagem), ovariectomizadas tratadas com Doxiciclina (DOXI, 20 mg/Kg, via gavagem) e ovariectomizadas tratadas com Doxiciclina (DOXI, 200 mg/Kg, via gavagem) e com Estroprogestativo (EP, 20 µg/Kg, via gavagem). As colunas e barras verticais representam, respectivamente, as médias \pm erro padrão das médias (n=5). a) Níveis de fosfatase alcalina: * diferença em relação ao grupo OVX tratado com EP (* $p < 0,0001$ ANOVA/ Bonferroni); ** diferença em relação ao grupo OVX tratado com EP (** $p < 0,0001$ ANOVA/ Bonferroni); # diferença em relação ao grupo OVX tratado com EP (# $p < 0,0001$ ANOVA/ Bonferroni);

5.6 Efeito do tratamento com estroprogestativos, doxiciclina e ambos fármacos em ratas com e sem ovariectomia sobre a concentração plasmática de colesterol e triglicérides

Os níveis séricos de colesterol apresentaram diferença estatisticamente significativa, pois o grupo OOF tratado com EP e DOXI estavam aumentados em comparação ao grupo SHAM tratado com salina conforme a figura a. Em relação aos triglicérides, apesar de não apresentar diferença estatística significativa entre os animais, observou-se que o grupo OVX tratado com DOXI estava aumentado em comparação ao grupo OVX tratado com EP e DOXI conforme a figura b.

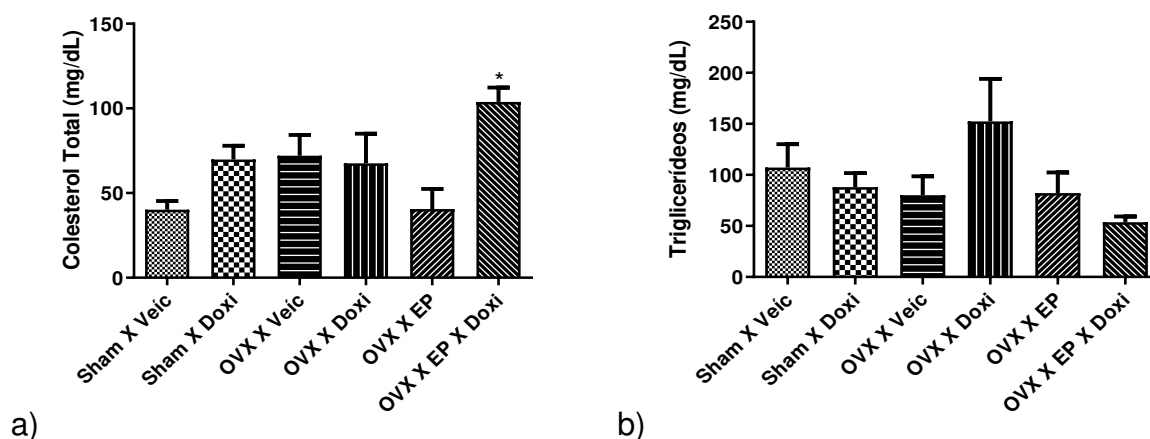


Figura 10. Efeito do tratamento de 4 semanas na determinação dos níveis de colesterol total e triglicérideo em ratas Wistar do grupo Falso- operado (SHAM) que receberam NaCl 0,9%, SHAM tratados com doxiciclina (DOXI, 20 mg/Kg, via gavagem), ovariectomizadas (OVX) administradas com NaCl 0,9%, ovariectomizadas tratadas com Estroprogestativo (EP, 20 µg/Kg, via gavagem), ovariectomizadas tratadas com Doxiciclina (DOXI, 20 mg/Kg, via gavagem) e com Estroprogestativo (EP, 20 µg/Kg, via gavagem). As colunas e barras verticais representam, respectivamente, as médias \pm erro padrão das médias (n=5). a) Níveis de colesterol total: * diferença em relação ao grupo SHAM tratado com salina; (* $p < 0,04$ Tukey; ANOVA/Bonferroni).

5.7 Efeito do tratamento com estroprogestativos, doxiciclina e ambos fármacos em ratas com e sem ovariectomia sobre a concentração plasmática de ureia e creatinina:

Conforme a figura a, os níveis séricos de ureia não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os animais, porém, analisou-se que o grupo OVX tratado com salina estavam diminuídos em comparação aos outros grupos. Em relação a figura b, os níveis de creatinina, houve diferença estatisticamente significativa, pois o grupo OVX tratados com (EP; EP e DOXI) estavam com níveis maiores em comparação ao grupo OVX tratado com DOXI.

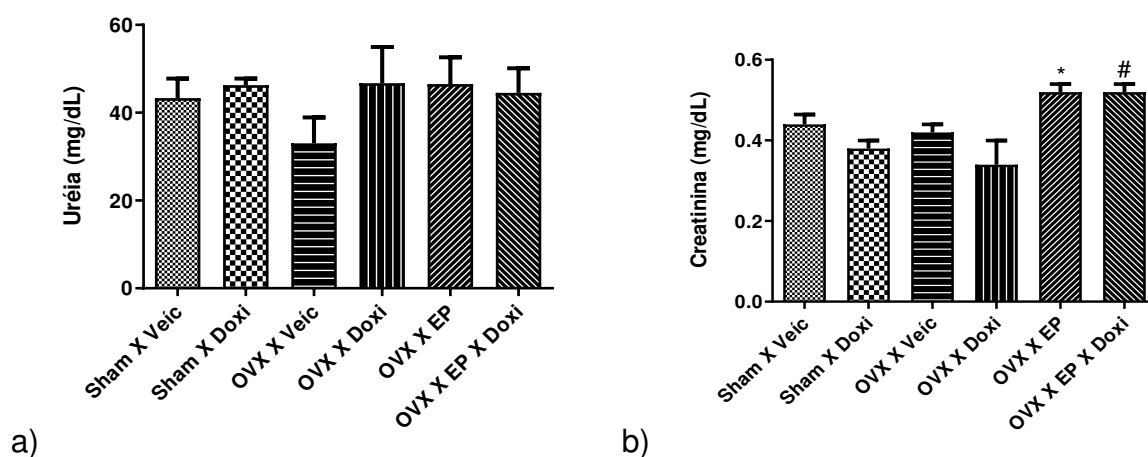


Figura 11. Efeito do tratamento de 4 semanas na determinação dos níveis plasmáticos de ureia e creatinina em ratas Wistar do grupo Falso- operado (SHAM) que receberam NaCl 0,9%, SHAM tratados com doxiciclina (DOXI, 200 mg/Kg, via gavagem), ovariectomizadas (OVX) administradas com NaCl 0,9%, ovariectomizadas tratadas com Estroprogestativo (EP, 20 µg/Kg, via gavagem), ovariectomizadas tratadas com Doxiciclina (DOXI, 20 mg/Kg, via gavagem) e ovariectomizadas tratadas com Doxiciclina (DOXI, 20 mg/Kg, via gavagem) e com Estroprogestativo (EP, 20 µg/Kg, via gavagem). As colunas e barras verticais representam, respectivamente, as médias \pm erro padrão das médias (n=5). b) Níveis de creatinina: * diferença em relação ao grupo OVX tratado com DOXI (*p<0,004 ANOVA/ Bonferroni).; # diferença em relação ao OVX tratado com DOXI (#p<0,004 ANOVA/ Bonferroni).

5.8 Efeito do tratamento com Estroprogestativos, doxiciclina e ambos fármacos em ratas com e sem ovariectomia sobre a concentração plasmática de transaminase oxalacética (TGO) e transaminase pirúvica (TGP)

De acordo com a figura a, os níveis séricos de transaminase oxalacética (TGO) não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os animais, porém, analisou-se que os grupos SHAM e OVX tratados com DOXI estavam maiores em comparação aos outros grupos. Conforme a figura b, em relação a transaminase pirúvica (TGP), apesar de não apresentarem diferença estatística significante, observou-se que o grupo SHAM tratado com DOXI quanto o OVX tratados com EP estavam com concentrações mais aumentadas em comparação aos outros grupos.

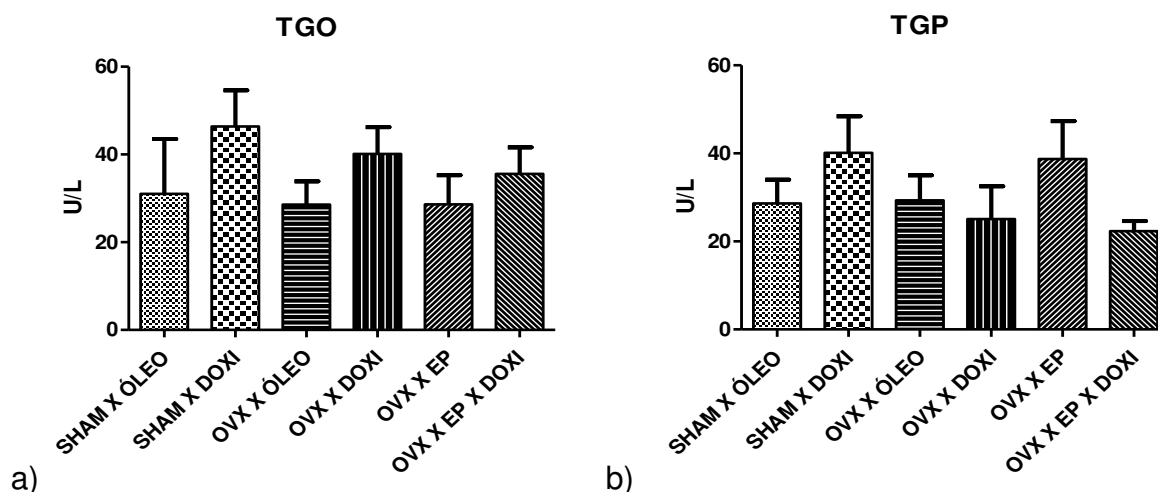


Figura 12. Efeito do tratamento de 4 semanas na determinação dos níveis plasmáticos de TGO (transaminase oxaloacética) e TGP (transaminase pirúvica) em ratas Wistar do grupo Falso- operado (SHAM) que receberam NaCl 0,9%, SHAM tratados com doxiciclina (DOXI, 20 mg/Kg, via gavagem), ovariectomizadas (OVX) administradas com NaCl 0,9%, ovariectomizadas tratadas com Estroprogestativo (EP, 20 µg/Kg, via gavagem), ovariectomizadas tratadas com Doxiciclina (DOXI, 20 mg/Kg, via gavagem) e ovariectomizadas tratadas com Doxiciclina (DOXI, 20 mg/Kg, via gavagem) e com Estroprogestativo (EP, 20 µg/Kg, via gavagem). As colunas e barras verticais representam, respectivamente, as médias \pm erro padrão das médias (n=5). ($p > 0,05$ ANOVA/ Bonferroni).

5.9 Efeito do tratamento com Estroprogestativos, doxiciclina e ambos os fármacos em ratas com e sem ovariectomia sobre o modelo de fogachos induzido através de exercício forçado na esteira

Os animais ovariectomizados (OVX) tratados com salina apresentaram um aumento na variação da temperatura cutânea quando comparado com animais falso-operados, independente do tratamento. O tratamento com estro-progestativos reduziu esse aumento. Já os animais tratados com estro-progestativos em associação com doxiciclina apresentaram uma redução ainda maior da variação da temperatura cutânea da cauda após a indução de exercício forçado.

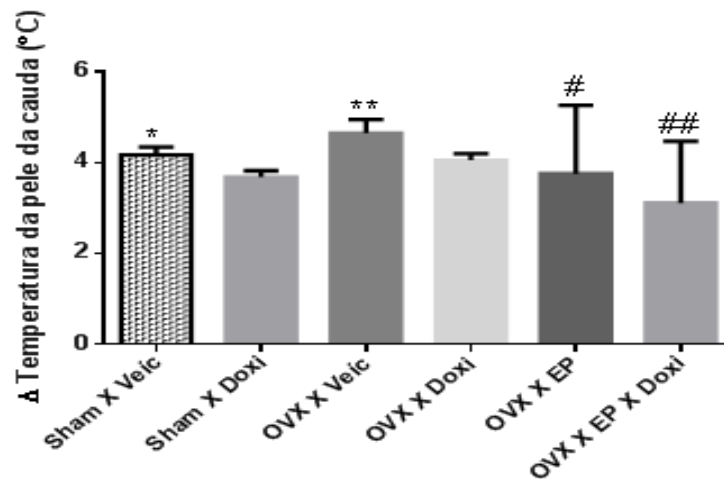


Figura 13. Aumento da temperatura cutânea induzida pelo exercício forçado para indução de fogacho em ovariectomizados e camundongos submetidos à cirurgia simulada. A mudança de temperatura foi calculada subtraindo a temperatura basal da pele da temperatura observada após o exercício forçado para indução de fogacho. Os resultados são exibidos como médias \pm erro padrão das médias. * quando comparado com OVX X EPXDoxi. ** quando comparado com Sham X Doxi, # quando comparado com OVX X Veic, ## quando comparado com OVX X Veic, ## quando comparado com OVX X veic e OVX X Doxi.

As imagens de termograma representam de maneira esquemática as mudanças nas temperaturas no primeiro minuto após a retiradas dos animais após o exercício forçado na esteira. Pode verificar que os animais falso-operados apresentaram uma redução na temperatura caudal cutânea no primeiro minuto em relação à todos os animais sem ovários, independente do tratamento.

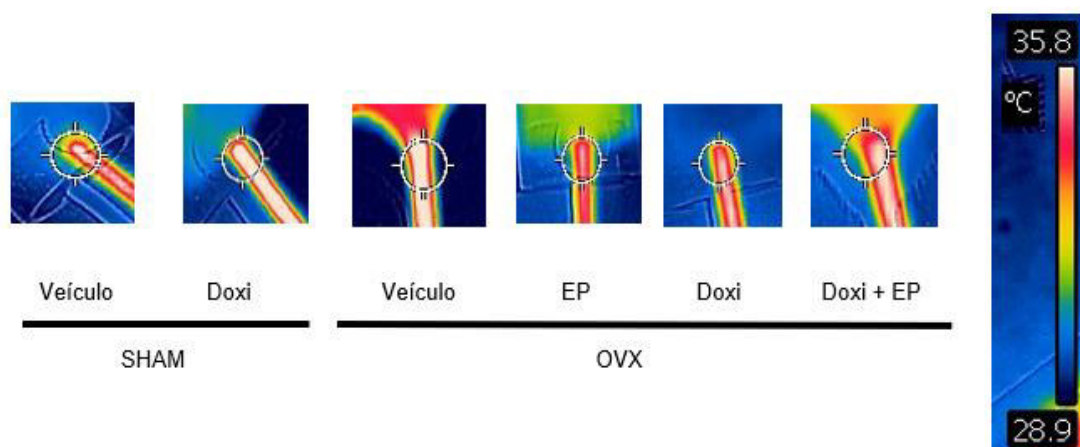


Figura 14. Termogramas representativos da temperatura da pele da cauda logo após a indução dos fogachos através do exercício forçado na esteira.

5.10. Efeito do tratamento com Estroprogestativos, doxiciclina e ambos os fármacos em ratas com e sem ovariectomia sobre a ciclicidade estral

Foi observado que os animais falso-operados, independente do tratamento, aumentaram a frequência na fase estro. Já nos animais ovariectomizados em todos os grupos foi verificado um aumento na permanência da fase diestro, em especial, os animais tratados somente com Doxiciclina (Fig.15).

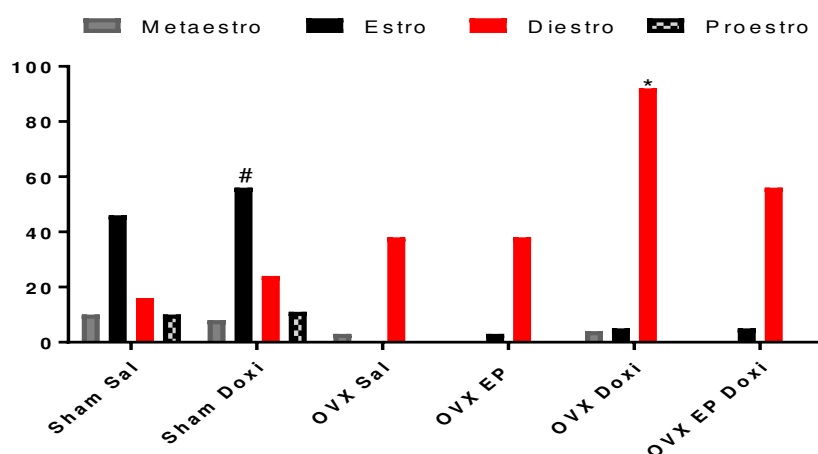


Figura 15. Análise de ciclo estral em ratas Wistar do grupo Falso-operadas (SHAM) que receberam NaCl 0,9%, (SHAM) tratado com doxiciclina (DOXI, 200 mg/kg, via gavagem), ooforectomizadas (OOF) administradas com NaCl 0,9%, ooforectomizadas tratadas com estroprogestativo (EP, 20 µg/Kg, via gavagem) e ooforectomizadas tratadas com doxiciclina (DOXI, 200 mg/kg via gavagem). As colunas e barras verticais representam, respectivamente, as médias \pm erro padrão das médias (n=05-06). *diferença em relação ao grupo sham (sal), sham (doxi), ovx (sal), ovx (ep) ($p < 0,05$ ANOVA/ Bonferroni) e # em relação a todos os OVX ($p > 0,05$ ANOVA/ Bonferroni).

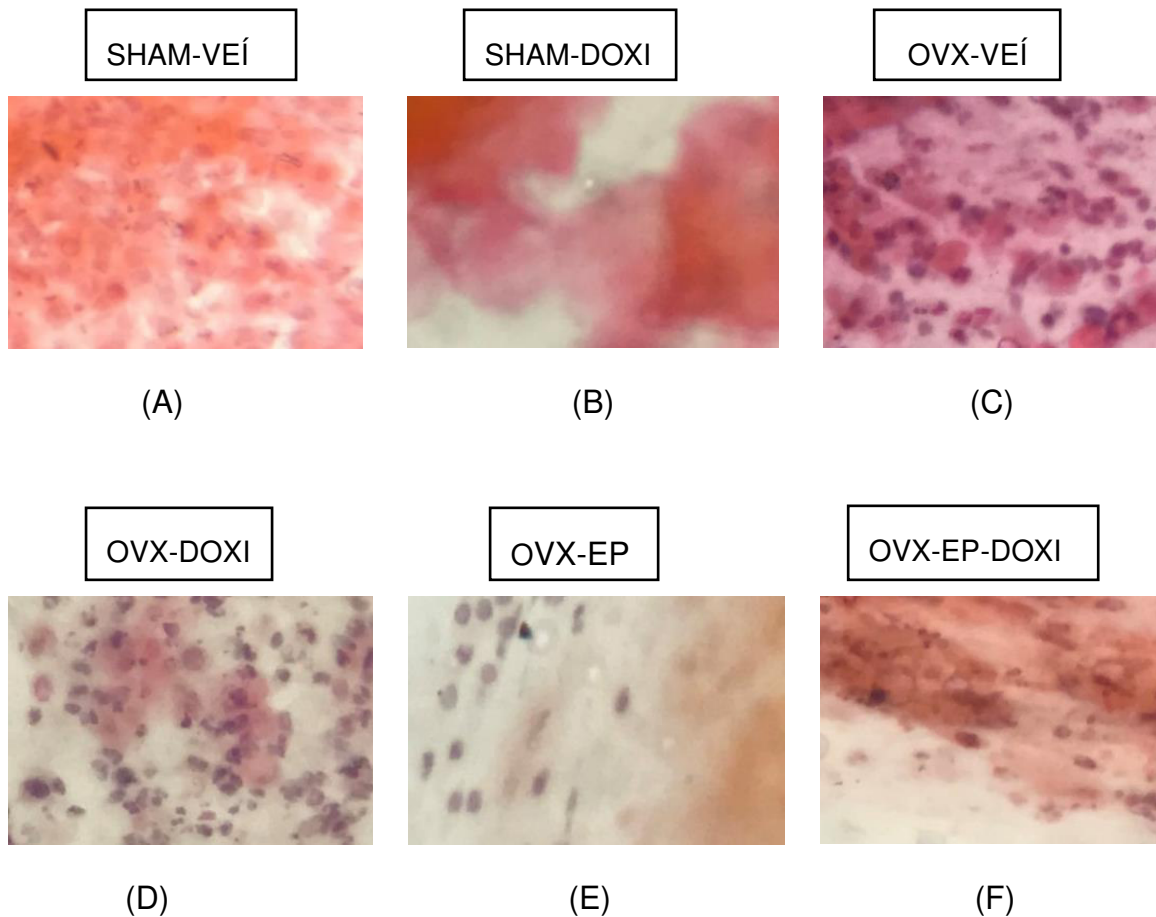


Figura 16. Representação de cada fase do ciclo estral de cada grupo. A- animal controle tratado com solução salina em NaCl 0,9%, coloração positiva para fase metaestro com leucócitos, células epiteliais nucleadas e cornificadas. B- animal sham tratado com doxiciclina, coloração positiva para fase estro com células cornificadas anucleadas. C- animal ovariectomizado tratado com solução salina em NaCl 0,9%, coloração positiva para fase diestro com predominância de leucócitos. D- animal ovariectomizado tratado com doxiciclina, coloração positiva para diestro com predominância de leucócitos E- animal ovariectomizado tratado com estrogênio e progesterona, coloração positiva para fase diestro com predominância de leucócitos. F- Animal ovariectomizado tratado com estrogênio e progesterona e doxiciclina, coloração positiva para fase diestro com predominância de leucócitos.

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho analisou-se a avaliação do acompanhamento ponderal ao longo de semanas e o total do peso durante todo o tratamento. Verificamos que os animais falso-operados não aumentaram seu peso corporal independente do tratamento. Entretanto, verificamos que animais ovariectomizados aumentaram seu peso corporal em relação à esses animais, conforme esperado. Com ou sem as metaloproteinases, este parâmetro não parece ser influenciado. Segundo Andersen *et al.*, (2004) e Larco *et al.*, (2012) a cirurgia para ovariectomia em animais funciona como modelo para estudo de obesidade e menopausa, por induzir o aumento de peso e diminuição de secreção hormonal, assim como também, relatam que ratas OVX predispõe a maior consumo de ração e maior peso. Jellenick *et al.*, (2013) citam que isso ocorre devido a deficiência estrogênica logo após a retirada dos ovários. Diante disso, há menor ação deste hormônio em relação ao funcionamento sobre o controle do consumo de alimentos pelo hipotálamo, acúmulo maior de gordura e maior inflamação.

No presente estudo, os animais tratados somente com doxiciclina consumiram menos ração quando comparado com os demais grupos, sendo eles falso-operados ou ovariectomizados. Santollo *et al.*, (2011) menciona que o hipoestrogenismo induz a obesidade devido uma falha no controle do apetite através do hipotálamo. Já animais ovariectomizados tratados com EP conseguiram reduzir o peso (Silva *et al.*, 2012). Diversas metaloproteinases e TIMPs estão expressas no tecido adiposo e estão envolvidas no desenvolvimento da obesidade e suas acomplicações associadas. Em especial, a TIMP-1 tem sido relatada como uma adipocitocina que aumenta diferenciação dos pré-adipócitos e acúmulo de gordura e pode ser utilizada como um preditor de obesidade (Kralish *et al.*, 2007).

Em relação ao peso uterino, animais falso-operados apresentaram um aumento no peso enquanto animais ovariectomizados apresentaram uma redução. Porém animais tratados com doxiciclina em associação com estro-progestativo reverteram essa redução. Carmo *et al.* (2018) também observaram que no grupo OVX havia menor peso uterino em comparação ao SHAM e Giordano *et al.* (2015) relata que os hormônios estrogênio e progesterona controlam o peso uterino. Entretanto,

Maioral et al (2016) em seu estudo analisaram que a terapia de reposição hormonal com estrogênio afetou o endométrio destes animais.

Rossouw *et al.*, (2001) e Wakatsuki *et al.*, (2003) e Gellersen *et al.*, (2010) em seus estudos relataram que nas células do estroma endometrial, as enzimas MMP-2 e MMP-9 encontravam-se aumentadas em resposta ao tratamento estroprogestativo. Xiaomei *et al.*, (2012) com sua pesquisa feita com ratas ooforectomizadas, constataram que o estrogênio (17 β -estradiol) restaurou o peso uterino normal cerca de 4,5 vezes o peso uterino.

Foi verificado em estudo por Helvering *et al.*, (2005) que houve redução da MMP-2 em ratas com ovário, já as ooforectomizadas e após 5 semanas de tratamento com estradiol, observou-se que a atividade de MMP-2 estava significamente aumentada nos tecidos uterinos, o que não pode ser verificado na MMP-9. Hendrix e McNeeley, (2001) sugerem que as metaloproteinases estariam envolvidas na remodelação da matriz extracelular podendo estar relacionadas à patologias que possam enfraquecer a estrutural normal e suporte do sistema genitourinário como prolapso de órgãos pélvicos e incontinência urinária.

Em relação ao peso do tecido adiposo total, verificamos que os animais falso-operados tratados com salina ou doxiciclina apresentaram redução no tecido adiposo total quando comparado com animais ovariectomizados tratados com salina e doxiciclina isolada. Esse aumento foi revertido com o uso de estroprogestativo de maneira isolada ou associado ao inibidor de metaloproteinases.

Silva *et al.*, (2012) demonstraram que ratas OVX apresentaram maior acúmulo de gordura em comparação ao grupo SHAM e também analisou que o tecido adiposo dos animais OVX tratados com EP estavam diminuídos. Cooke *et al.*, (2004) e Heine *et al.*, (2000), enfatizam que o estrogênio é responsável pela regulação do tecido adiposo. Segundo Benoit *et al.*, (2004), este fator é importante devido a secreção da leptina, isto é, um mecanismo que exerce a função de saciedade a nível hipotalâmico e como consequência o controle do peso corporal. Nos achados encontrados na literatura como estudos de (MAZOR, 2018; MIKSTOWICZ *et al.*, 2017), as metaloproteinases (MMP) são sintetizadas no tecido adiposo, porém ainda tem resultados controversos, no entanto, em estudo por Berg *et al.*, (2019) a MMP-2 pode estar associado com marcadores de obesidade, assim como também pode correlacionar uma ligação entre tecido adiposo e o risco de doença cardiovascular.

Vieira *et al.*, (2012) relata que o hipoestrogenismo está relacionado a um aumento da inflamação no tecido adiposo. Diante disso, alguns estudos sugerem que os níveis de ER α dentro das células regulam a obesidade em mulheres, sendo assim, o ER α específica do adipócito pode regular o peso corporal, a inflamação dos adipócitos, a fibrose, assim como também os níveis de glicemia. De acordo com os autores Davis *et al.*, (2013) e Ribas *et al.*, (2011) demonstram que a eliminação da expressão de receptores ER α em macrófagos associa-se a obesidade e complicações metabólicas em camundongos fêmeas.

Segundo Stefanska *et al.*, (2015) a prevalência de síndrome metabólica (SM) na pós-menopausa deve-se à perda do papel protetor dos estrogênios e ao aumento dos andrógenos circulantes, resultando em alterações na distribuição da gordura corporal e no desenvolvimento da obesidade abdominal. O excesso de tecido adiposo visceral desempenha um papel importante devido à síntese e secreção de substâncias bioativas, como adipocitocinas, citocinas pró-inflamatórias, espécies reativas de oxigênio, fatores pró-trombóticos e vasoconstritores. A SM também pode afetar a avaliação de risco de câncer de mama, osteoporose e doença renal crônica, e qualidade de vida durante a transição da menopausa.

Em relação aos níveis séricos de cálcio (Ca), apesar de não apresentarem diferença estatística significativa, pode ser verificado uma tendência na redução dos níveis no grupo de animais ovariectomizados tratados com salina quando comparado com animais falso-operados tratados em ambos os grupos quanto em animais OVX tratados com doxiciclina ou estro-progestativos. Segundo Xu *et al.*, (2018), a ooforectomia pode ser considerado uma estratégia para indução de osteoporose, pois analisaram também que os níveis de cálcio encontravam-se diminuídos nesta fase. Diante disso, Bedell *et al.*, 2013 aponta que a TRH é indicada para ajudar na prevenção de osteoporose. Wang *et al.*, (2005) enfatizam a sua importância para modular os receptores de estrogênio e consequentemente agir como modulador de receptores de estrogênicos (ER), isto é, obter ligação aos ER nas células ósseas, e inibir a absorção óssea, aumentar a densidade óssea e reduzir o risco de fratura vertebral.

Segundo Scarpellini *et al.*, (1994), mostraram que a doxiciclina inibe metaloproteinases da matriz óssea e a reabsorção óssea e consequentemente

poderiam ser benéficas em mulheres após a menopausa. Estes dados sugerem uma possível ação da doxiciclina no metabolismo mineral ósseo.

O mecanismo descrito por Scarpellini *et al.*, (1994), considera que a resposta pode estar relacionada aos metabólitos dependentes de minerais e não com via hormonal, isto é, há inibição de MMPs, com o qual estão envolvidos na remodelação óssea durante este período. Sugerem que o tratamento com doxiciclina pode ser benéfico na melhoria da perda óssea de cálcio, particularmente durante o estágio inicial da pós-menopausa.

Um estudo de Reinhardt *et al.*, (2007) com mulheres na pós- menopausa, analisaram a eficácia da dose sub-antimicrobiana da doxiciclina por 2 anos, pode ser benéfico na redução da perda de inserção progressiva em mulheres na pós-menopausa. Zhao *et al.*, (2009) em seu estudo notaram uma redução na atividade de MMP administração de doxiciclina, porém há dados inconclusivos devido a amostra pequena do estudo, então permanecem as dúvidas quanto aos resultados de doxiciclina e metaloproteinase, com ou sem associação de terapia de reposição hormonal.

No presente estudo, verificamos que os níveis de fosfatase alcalina estavam reduzidos em animais falso-operados em ambos os grupos tratados. Já os animais OVX tratados com salina apresentaram um aumento em seus níveis que quando comparado com estes animais. A hormonioterapia aumentou seus níveis e o tratamento somente com Doxiciclina os reduziu. Entretanto a associação dos dois tratamentos, aumentou seus níveis séricos.

Mukaivama *et al.*, (2015) descreve que a fosfatase alcalina pode ser encontrado como marcadores de metabólitos ósseos e hepáticos, além disso, analisou em 626 mulheres na pós menopausa e identificou que os níveis de fosfatase alcalina estavam aumentadas na faixa etária de 80 anos em comparação aos de 60 anos e este nível aumentado relaciona-se a alta renovação óssea, isto é, pela remodelação óssea. Além disso, a fosfatase alcalina é um parâmetro bastante inespecífico sendo encontrada em diversos órgãos como cérebro, osso, pâncreas, intestino, rins e fígado.

A TRH em alguns estudos, está correlacionada com a prevenção do desenvolvimento de osteoporose na menopausa. Alguns estudos sugerem que a TRH

pode melhorar a integridade estrutural do tecido pélvico e ter efeitos benéficos na incontinência urinária (Moehrer *et al.*, 2003). Em contrapartida, Grady *et al.*, (2001) e Hendrix *et al.*, (2005) sugerem que a terapia com estrogênio pode piorar o nível urinário incontinência em mulheres na pós-menopausa, assim como também, predispor a um maior risco de câncer de mama e endométrio, sangramento vaginal, doença coronariana, acidente vascular cerebral e tromboembolismo venoso. O desenvolvimento destes parâmetros estaria associado ao aumento das MMP-2 e 9.

Contudo, em uma revisão sistemática e meta-análise o autor Magliano *et al.*, (2005) enfatiza que não há indícios dos benefícios em relação a redução do risco e prevenção de doenças cardiovasculares, porém Salpeter *et al.*, (2006) relata que pode indicar e pode haver efeito preventivo, caso tenha este tratamento somente antes do início do desenvolvimento da aterosclerose.

Os níveis de magnésio (Mg) sérico dos animais com ovários preservados, independente do tratamento, aumentaram os níveis quando comparados com animais ovariectomizados tratados com salina. Quando os animais foram tratados com TRH e associado com Doxiciclina, os níveis foram discretamente aumentados. Já o tratamento isolado com Doxiciclina elevou os níveis de magnésio quando comparado com os demais grupos. A formação óssea está associada à uma matriz protéica orgânica, constituída em maioria de fibras de colágeno tipo I e apenas 5% de proteoglicanos e proteínas não colagenosas.

O magnésio atua como catalisador para inúmeras enzimas, além de fornecer estrutura específica as mesmas. É fundamental para a função normal das glândulas paratireoides e para o metabolismo da vitamina D; sua deficiência está associada com a hipertensão, arritmia cardíaca, infarto do miocárdio, hipocalcemia e hipocalcemia. Sonu *et al.*, 2016 em seu estudo menciona que os níveis séricos de magnésio na urina estavam mais exacerbados em mulheres pós-menopausadas em relação a mulheres pré-menopausadas.

Em estudo com camundongos realizado por Paginas *et al.* (2003), foi observado que a deficiência de magnésio pode estar relacionada com a parede da aorta mais fina que nos grupos controles e estas alterações foram correlacionadas com a expressão de MMP-2 e 9.

No entanto, foi sugerido por Yue *et al.*, (2003) que a MMP-2 pode desencadear uma ação na formação e progressão da lesão aterosclerótica. A suplementação de magnésio poderia reduzir os níveis de MMP-2, revertendo desta forma a lesão.

No que diz respeito à quantificação de proteínas totais séricas, verificamos que não houve alteração nos níveis globais independente do grupo. Podemos sugerir então que nenhum tratamento alterou as proteínas totais de cada órgão ou vaso e com isso nenhuma toxicidade foi observada.

Em relação aos níveis de colesterol sérico, verificou-se um aumento nos animais tratados com doxiciclina associado a estro-progestativos quando comparado com os animais falso-operado. Já o contrário pode ser evidenciado no que diz respeito aos níveis de triglicérides, aonde este mesmo grupo apresentou seus níveis reduzidos quando comparados com grupos falso-operados.

Segundo Berg *et al.*, (2019), o acúmulo de gordura visceral está relacionado a maior concentração de triglicérides e menor quantidade de colesterol HDL em mulheres pré e pós-menopausa. O nível elevado do colesterol lipoproteína de baixa densidade (LDL) é o principal fator de o risco cardiometabólico após a menopausa. Pedersen *et al.*, (1996), analisou que os hormônios sexuais endógenos têm demonstrado estar associados com o perfil lipídico em mulheres durante e após a menopausa. Estrogênio e receptores androgênicos são expressos em adipócitos viscerais e subcutâneos, com o qual podem afetar o metabolismo dos lipídios no tecido adiposo de mulheres em menopausa. Entretanto, a autora Shelley *et al.*, (1998), mostra que os estrogênios são associados a um perfil lipídico favorável e andrógenos estão relacionados a um perfil lipídico aterogênico.

Diante disso, o risco maior de obesidade em mulheres na menopausa, está relacionado a adiponectina diminuída. Segundo Haffner *et al.*, (2005), a adiponectina pode induzir o aumento dos inibidores teciduais de metaloproteinase (TIMPs). Freise *et al.*, (2009) explica que o acúmulo de tecido adiposo visceral está correlacionado a triglicérides mais altas e menores concentrações de colesterol HDL em mulheres pré e pós-menopausa. Já Eva *et al.*, (2016) sugere que deve haver associações diretas entre a MMP-2 e o perfil de lipoproteína aterogênica.

Estudos mostram que os triglicérides aumentam mediante o envelhecimento (Anagnostis *et al.*, 2015; Dallongevile *et al.*, 1995). Além disso,

demonstram que alguns tipos de metaloproteinases como as ADAMS estão relacionadas com síndrome metabólica e dislipidemia (Weerasekera et al., 2017).

Em relação à função renal dos animais, verificamos que os níveis de ureia os animais ovariectomizados tratados com veículo estavam com níveis reduzidos quando comparado com os demais grupos, porém sem diferença estatística. Já em relação aos níveis séricos de creatinina, verificamos um aumento nos níveis plasmáticos em animais ovariectomizados tratados com estro-progestativos isoladamente ou em associação com inibidores de metaloproteinases quando comparados aos animais ovariectomizados tratados com veículo ou somente doxiciclina.

Tazeen *et al.*, (2003) em uma meta-análise sobre mulheres na pós-menopausa constatou que acontece um declínio da função renal em mulheres em comparação aos homens. Diante disso, houve convergência com o atual estudo, mas ressalta-se que há mais elevação da creatinina nos grupos tratados com estro-progestativos e também em associação a doxiciclina.

Xiaomei *et al.*, (2012) relatam que apesar da restauração uterina com o estrogênio, verificaram aumento no peso do rim, albuminúria e aumento na concentração dos níveis de creatinina no plasma. Zhao *et al.*, (2013) e Han *et al.*, (2008) demonstraram que as metaloproteinases estão envolvidas na lesão renal aguda e crônica ao longo do espectro de danos na membrana basal, na atrofia tubular, na fibrose e na insuficiência renal direta. Michael *et al.*, (2016) em seu estudo verificou que a utilização da doxiciclina, podem ser úteis na redução da quantidade de lesões por preservação nos rins transplantados. Parrish (2017) analisou estudos sugerindo que MMPs e TIMPs podem ser biomarcadores de disfunção renal e alcançar possivelmente novos alvos terapêuticos para amenizar a doença renal.

As MMPs e TIMPs podem ser potenciais biomarcadores para doença renal. O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) induz a secreção de MMP-9, além disso, Kuwabara *et al.*, (2009) sugerem que mediadores pró-inflamatórios equilibram a expressão de MMP-2 e -9 no rim, isto é, as MMPs podem regular a expressão de mediadores inflamatórios e como consequência ocasionar desequilíbrio. Em relação a intervenção farmacológica como doxiciclina, Aggarval *et al.*, (2010) observou em seu estudo que este fármaco diminuiu proteinúria em nefropatia diabética durante um tratamento de 3 meses.

Sobre os níveis plasmáticos de TGO e TGP, embora não tenha sido evidenciado diferença estatística, foi observado que tanto o SHAM e OVX tratados com DOXI encontravam-se aumentados. Já a TGP, os grupos SHAM com DOXI e OVX com EP apresentaram concentrações mais aumentadas.

Gutierrez-Grobe *et al.*, 2010 evidenciam que mulheres pós-menopausa tiveram uma alta prevalência de doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) em comparação com mulheres antes de entrarem na menopausa, além disso, quando há diminuição do estradiol, pode acarretar um aumento no acúmulo de gordura no fígado. Matsui *et al.*, (2016) relataram que um aumento dos níveis de TGP pode estar estimulado indiretamente pelo aumento triglicérides e diretamente pela diminuição do estradiol. As alterações nestas enzimas podem estar associadas com ocorrência de síndrome metabólica e DHGNA a longo prazo. Durante a transição da menopausa, foram relacionadas a correlação entre triglicérido e enzimas hepáticas, principalmente a transaminase pirúvica (TGP) e a divisão entre transaminase oxalacética (TGO) sobre transaminase pirúvica (TGP).

Em relação à outro sintoma da menopausa, os fogachos, verificamos que os animais ovariectomizados tratados com salina apresentaram um aumento na variação da temperatura cutânea caudal quando comparado com animais falso-operados independente do tratamento, logo em seguida após a exposição ao exercício forçado na esteira, mimetizando uma onda de calor, que pode ser visualizado nos termogramas representativos. A reposição hormonal reduz essa variação na temperatura cutânea e a associação com doxiciclina reduz mais ainda, sugerindo que as metaloproteinases podem estar envolvidas nesse processo.

Há poucos dados na literatura em relação a fisiopatologia sobre sintomas vasomotores. Gallichio *et al.*, (2010) mencionam em seu estudo em que as ondas de calor não estão significativamente associadas à pressão arterial durante a meia-idade. Thurston *et al.*,(2011) ressaltam a importância de considerar como a idade e a raça podem modificar as relações entre obesidade e ondas de calor. Já em outro estudo de Huang *et al.*, (2011), destacam-se que entre as mulheres que estavam com sobrepeso ou obesas e apresentavam maiores queixas, uma intervenção intensiva de perda de peso resultou em melhora no rubor em relação ao controle. Kaunitz *et al.*, (2015) mencionam que a terapia de reposição hormonal representa maior efeito nos sintomas vasomotores.

Diante dos parâmetros discutidos anteriormente, um dos sintomas da menopausa que mais afligem mulheres na menopausa seria a secura vaginal. O mesmo pode ser investigado através do esfregaço vaginal e ciclicidade estral. Observamos que os animais com ovários preservados permaneceram mais tempo na fase de estro, o que pode ser evidenciado pelas fotos exemplificadas. Já os animais tratados isoladamente com doxiciclina permaneceram mais tempo na fase de diestro quando comparado com outros grupos. Em outro modelo animais em cobaias, foi verificado que as MMP-2 e 9 estão altamente expressas nas células da granulosa e tecais de folículos atróficos ovarianos durante o proestro e estão expressas no corpo lúteo durante o metaestro, sugerindo que essas enzimas auxiliam na regulação da ciclicidade estral nesse animal. (Li & Shen, 2015). Acreditamos que nos modelos de ratas utilizado em nosso estudo, as funções devem ser similares.

7. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados permitem sugerir que as metaloproteinases possuem um papel relevante de maneira seletiva em alguns sintomas da menopausa, em especial, quando há associação de sub-dose da doxiciclina com terapia estro-progestativa, ou seja, pode participar parcialmente na melhora do fogacho, útero, peso e tecido adiposo, porém com aumento nos níveis de colesterol. Além disso, observou-se que os animais na menopausa quando tratados somente com doxiciclina, obteve-se aumento nos níveis de magnésio, redução de fosfatase alcalina, creatinina, assim como também no consumo de ração. Diante disso, esse grupo de enzimas pode participar parcialmente na melhora das funções renal, hepática, óssea e também da obesidade, atrofia uterina e vaginal e fogachos.

Pesquisas adicionais são necessárias para explorar os mecanismos subjacentes a esses achados, que podem tem implicações na saúde pública para estratégias de prevenção e tratamento para menopausa. Portanto, determinar se essa via das enzimas metaloproteinases deve ser investigada para futuro alvo farmacológico no tratamento da menopausa.

8.REFERÊNCIAS

ABDELRAZEK H.M.A, MAHMOUDE M.M.A, TAG H.M, GREISH S.M. Soy Isoflavones Improves Ovariectomy Metabolic and Immune Changes in Female Wistar Rats: Antioxidant Potential and Estrogen Saving. **Oxid Med Cell Longev**. 2019 10 de janeiro de 2019: 5713606.

ANAGNOSTIS P, STEVENSON J.C, CROOK D., JOHNSTON D.G, GODSLAND I.F. Effects of menopause, gender and age on lipids and high-density lipoprotein cholesterol subfractions, **Maturitas** 81 (2015) 62–68.

AGGARWAL HK, JAIN D, TALAPATRA P, YADAV RJ, GUPTA T, KATHURIA KL. Evaluation of role of doxycycline (a matrix metalloproteinase inhibitor) on renal functions in patients of diabetic nephropathy. **Ren Fail**. 2010;32:941–946.

AMADEI, S. U.; SILVEIRA, V. A. S.; PEREIRA, A. C. et al. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. **J Bras Patol Med Lab**; 2006; 42 (1): 5-12

AMALINEI C, CARUNTU ID, BALAN RA. Biology of metalloproteinases. Rom J **Morphol Embryol** 2007; 48: 323-334.

Ambikairajah A , Walsh E , Tabatabaei-Jafari H , Cherbuin N . Fat mass changes during menopause: a meta-analysis. **Am J Obstet Gynecol**. 2019 26 de abril. Pii: S0002-9378 (19) 30588-5.

AVIS NE, CRAWFORD SL, GREEN R. Vasomotor symptoms during the menopausal transition: differences among women. **Obstet Gynecol Clin North Am**. 2018 Dec; 45 (4): 629-640

ADAMIAK-GODLEWSKA A, TARKOWSKI R, WINKLER I, ROMANEK-PIVA K, SKORUPSKA K, JAKIMIUK AJ, RECHBERGER T. Women with stress urinary incontinence, influence of age and hormonal status on estrogen alpha and beta receptor gene expression and protein immunorexpression in paraurethral tissues. **J Physiol Pharmacol**. 2018 Feb; 69 (1): 53-59.

ASTRID M. HORSTMAN , E. LICHAR DILLON , RANDALL J. URBAN e Melinda Sheffield-Moore. The Role of Androgens and Estrogens in Healthy Aging and Longevity. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci** . 2012 nov; 67 (11): 1140-1152.

ASAHI M, ET AL. Effects of matrix metalloproteinase-9 knockout on the proteolysis of the blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia. **J Neurosci**. 2001; 21: 7724-7732

AMBIKAIRAJAH A, WALSH E, TABATABAEI-JAFARI H, CHERBUIN N. Changes in fat mass during menopause: a meta-analysis. **Am J Obstet Gynecol**. 2019 April 26. Pii: S0002-9378 (19) 30588-5

BAGAVANDOSS P. Differential distribution of gelatinases and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in the rat ovar y. **J Endocrinol** 1998; 158:221–228.

BEZERRA, M.M.; BRITO, G.A.; RIBEIRO, R.A.; ROCHA, F.A. (2002) Lowdose doxycycline prevents inflammatory bone resorption in rats. **Braz J Med Biol Res**. May;35(5):613-6.

BENOIT S.C, CLEGG D.J, SEELEY R.J, WOODS S.C . Insulin and leptin as adiposity signals. **Rec Prog Horm Res** 59 (2004) 267–285

BIRKEDAL-HANSEN H, et al. Metaloproteinases de matriz: uma revisão. **Crit Rev Oral Biol Med**. 1993; 4: 197-250.

BREW K, DINAKARPANDIAN D, NAGASE H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function **Biochim Biophys Acta**. 7 de março de 2000; 1477 (1-2): 267-83.

BOURBOLIA D, STETLER-STEVENSON WG. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. **Sem Cancer Biol** 2010; 20: 161-168

BISWAS C., ZHANG Y., DECASTRO R., GUO H., NAKAMURA T., KATAOKA H., NABESHIMA K. The human tumor cell-derived collagenase stimulator y factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily. **Cancer Res** 1995; 55:434 – 439.

BORKAKOTI N. Structural studies of matrix metalloproteinases. **J Mol Med** 2000; 78:261–268.

CUI R, ZHOU L, LI Z, LI Q, QI Z, ZHANG J. Assessment risk of osteoporosis in Chinese people: relationship among body mass index, serum lipid profiles, blood glucose, and bone mineral density. **Clin Interv Aging**, 2016 11:887–895

CASTRO MM, RIZZI E, FIGUEIREDO-LOPES L, FERNANDES K, BENDHACK LM, PITOL DL, et al. Metalloproteinase inhibition ameliorates hypertension and prevents vascular dysfunction and remodeling in renovascular hypertensive rats. **Atherosclerosis**. 2008;198(2):320-31.

CARMO J.M, SILVA A.A, MOAK A.P, BROWNING R.J, DAI X., HALL J.E. Increased sleep time and reduced energy expenditure contribute to obesity after ovariectomy and a high fat diet. **Life Sciences**. 212 (2018) 119-128

CLARK I.M., SWINGLER T.E., SAMPIERI C.L., EDWARDS D.R. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. **Int J Biochem Cell Biol** 2008; 40: 1362–1378.

COOKE R.G., NOTHNICK W.B., KOMAR C., BURNS P.D., CURRY T.E. JR. Collagenase and gelatinase messenger ribonucleic acid expression and activity during follicular development in the rat ovary. **Biol Reprod** 1999; 61: 1309 –1316

COLNOT C, THOMPSON Z, MICLAU T, WERB Z, HELMS JA. Altered fracture repair in the absence of MMP9. **Development**. 2003; 130: 4123-4133.

CHERIF R , MAHJOUR F , SAHLI H , CHEOUR E , SAKLY M , ATTIA N . Clinical and body composition predictors of bone turnover and mineral content in obese postmenopausal women. **Clin Rheumatol**. 2019 Mar; 38 (3): 739-747

CURRY JR T.E., OSTEEN K.G. Cyclic Changes in the Matrix Metalloproteinase System in the Ovary and Uterus. **Biol Reprod** 2001; 64: 1285–1296.

CURRY JR T.E., OSTEEN K.G. The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. **Endocr Rev** 2003 24: 428 – 465.

CURRY T.E. JR, DEAN D.D., WOESSNER J.F. JR, LEMAIRE W.J. The extraction of a tissue collagenase associated with ovulation in the rat. **Biol Reprod** 1985; 33: 981–991.

CHO NY, KIM S, NOWAKOWSKI S, CINNAMON C, SUH S. SLEEP disorder in women who undergo surgical menopause compared to women suffering from natural menopause. **Menopause**. 2019 abr; 26 (4): 357-364

DAHLMAN-WRIGHT K, CAVAILLES V, FUQUA SA, ET AL. International Union of Pharmacology. LXIV Estrogen receptors. **Pharmacol Rev**. 2006; 58 (4): 773-781.

DAVID L. Brown et al. Clinical and Biochemical Results of the Metalloproteinase Inhibition with Subantimicrobial Doses of Doxycycline to Prevent Acute Coronary Syndromes (MIDAS) Pilot Trial. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 2004;24:733-738.

DELGADO BJ , LOPEZ-OJEDA W Estrogen StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): **Publication StatPearls**; 2019 March 13

D. Vaidya, A. Dobs, S.M. Gapstur, S.H. Golden, A. Hankinson, K. Liu, et al., The association of endogenous sex hormones with lipoprotein subfraction profile in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis, **Metabolism** 57 (2008) 782–790.

DIZAYANDI FR, GHAZANFARPOUR H, ROOZBEH N, KARGARFARD L, KHADIVZADEH T, DASHTI S. An overview of the effect of phytoestrogen on vaginal health and dyspareunia in peri and postmenopausal women. **Post Reprod Health**. 2019 Mar; 25 (1): 11-20.

DALLONGEVILLE J., N. MARECAUX, D. ISOREZ, G. ZYLBERGEBERG, J.C. FRUCHART, P. AMOUYEL. Multiple coronary heart disease risk factors are associated with menopause and influenced by substitutive hormonal therapy in a cohort of French women. **Atherosclerosis** 118 (1995) 123–133

DUCHARME A, ET AL. Directed deletion of matrix-9 metalloproteinase attenuates the increase in left ventricular volume and collagen accumulation after experimental myocardial infarction. **J Clin Invest**. 2000; 106: 55-62

D.O. LARCO, D.F. CRUTHIRDS, M.J. WEISER, R.J. HANDA, Wu TJ. The effect of chronic immobilization stress on leptin signaling in the ovariectomized (OVX) rat. **Endocrine**; 42 (2012) 717–725.

DOUCHI T, KUWAHATA R, MATSUO T ET AL (2003) Relative contribution of lean and fat mass component to bone mineral density in males. **J Bone Miner Metab** 21:17e21

DALLONGEVILLE, N. MARECAUX, D. ISOREZ, G. ZYLBERGBERG, J.C. FRUCHART, P. AMOUYEL, Multiple coronary heart disease risk factors are associated with menopause and influenced by substitutive hormonal therapy in a cohort of French women, **Atherosclerosis** 118 (1995) 123–133

ESPARZA J, KRUSE M, J LEE, MICHAUD M, MADRID JA. Null mice for MMP-2 exhibit early onset and severe experimental autoimmune encephalomyelitis due to an increase in MMP-9 expression and activity. **FASEB J.** 2004; 18: 1682-1691.

ENDO N (2007) A definition and diagnostic criteria for osteoporosis lino S (1995) Biochemical test including isoenzymes, alkaline phosphatase (ALP). **Nippon-Rinsho** 53: 276–279

E.K. ADAM, M. KUMARI, Assessing salivary cortisol in large-scale, epidemiological research, **Psychoneuroendocrinology** 34 (2009) 1423–1436.

F. SCARPELLINI, L. SCARPELLINI, S. ANDREASSI, AND E. V. COSMI. Doxycycline May Inhibit Postmenopausal Bone Damage Preliminary Observations. **Ann NY Acad Sci.** 6 de setembro de 1994; 732: 493-4.

G.C.C.C. MAIORAL, R.C.T. GOMES, C. VERNA., M.J. SIMÕES, H.B. NADER, R. S.SIMÕES. ET AL. Concentration of glycosaminoglycan in ovariectomized mice uterus after treatment with ovarian steroids. **Gynecological Endocrinology** 13(2016) 1-5

GALLICCHIO L., MILLER S.R, ZACUR H., FLHAS J.A. Hot flashes and blood pressure in aging women. **Maturitas** 2010 jan; 65 (1): 69.

GARCIA RA, PANTAZATOS DP, GESSNER CR, GO KV, WOODS VL JR, VILLAREAL FJ. Molecular interactions between matrilysin and the matrix metalloproteinase inhibitor doxycycline investigated by deuterium exchange mass spectrometry. **Mol Pharmacol.** 2005;67(4):1128-36.

GEORGAKIS MK ,T BESKOU-KONTOU , THEODORIDIS I , SKALKIDOU A , PETRIDOU ET . Surgical menopause in association with cognitive function and risk of dementia: A systematic review and meta-analysis. **Psychoneuroendocrinology.** 2019 Ago; 106: 9-19

GHAZANFARPOUR M., SADEGHI R., ROUDSARI R.L, KHORSAND L, KHADIVZADEH T, MUOIO B. Red clover for treatment of hot flashes and menopausal

symptoms: a systematic review and meta-analysis. **J Obstet Gynaecol.** 2016; 36 (3): 301-11.

GOLUB LM, LEE HM, RYAN ME, GIANOBILLE WV, PAYNE J, SORSA T. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial mechanisms. **Adv Dent Res.** 1998;12(2):12-26

GRADY, D., BROWN, J.S., VITTINGHOFF, E., APPLGATE, W., VARNER, E., SNYDER, T. Postmenopausal hormones and incontinence: the Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study. **Obstet. Gynecol.** 2001. 97, 116–120

GADES DR., STERN JS, VAN GOOR H, NGUYEN D, JOHNSON PR, KAYSEN GA. Estrogen accelerates the development of kidney disease in obese female Zucker rats. **Rim Internacional** 1998; 53 (1): 130-135.

GÓMEZ-SANTOS C , HERNÁNDEZ-MORANTE JJ , TÉBAR FJ , GRANERO E , GARAULET M. Differential effect of oral dehydroepiandrosterone sulfate on the characteristics of metabolic syndrome in pre and postmenopausal obese women. **Clin Endocrinol (Oxf).** Out 2012; 77 (4): 548-54

GREENSTEIN G. The role of Periostat in the management of periodontitis in adults: a critical evaluation. **Compend Contin Educ Dent.** 1999 Jul; 20 (7): 664-8, 670, 672

GALIS ZS; KHATRI JJ. Metaloproteinases de matriz no remodelamento vascular e aterogênese: o bom, o ruim e o feio **Circ Res** 2002, 90, 251-262

GREENE J . HRT has an uncertainty problem. Does composition make it worse? **Manag Care.** 2019 Feb; 28 (2): 32-35

GUSTAFSSON, MD, PHD. New aspects of estrogenic action. **Journal of the Gynecological Research Society**, 2000, Volume: 7 edition: 1_suppl, page (s): S8-S9.

HAN WK, SS WALKAR, JOHNSON A, RA BETENSKY, DENT CL, DEVARAJAN P, ET AL. Urinary biomarkers in early diagnosis of acute kidney injury.. **Rim Int** 2008; 73 (7): 863-9.

HAFFNER D, HOCHER B, MULLER D ET AL. Systemic cardiovascular disease in uremic rats induced by 1,25(OH)2D3. **J Hypertens** 2005; 23: 1067–1075

HANDSLEY MM, EDWARDS DR. Metalloproteinases and their inhibitors in tumor angiogenesis. **Int J Cancer**. 2005. 115:849 – 860

K.E. HANNIBAL, M.D. Bishop, Chronic stress, cortisol dysfunction, and pain: a psychoneuroendocrine rationale for stress management in pain rehabilitation, **Phys. Ther.** 94 (2014) 1816–1825

HENDRIX, S.L., COCHRANE, B.B., NYGAARD, I.E., HANDA, V.L., BARNABEI, V.M., IGLESIA, C., ARAGAKI, A., NAUGHTON, M.J., WALLACE, R.B., MCNEELEY, S.G. Effects of estrogen with and without progestin on urinary incontinence. **JAMA**. 2005. 293, 935–948.

H.D. SESSO, L. WANG, J.E. BURING, P.M. RIDKER, J.M. GAZIANO, Comparison of interleukin-6 and C-reactive protein for the risk of developing hypertension in women, **Hypertension** 49 (2007) 304–310.

HENDRIX, S.L., MCNEELEY, S.G. Effect of selective estrogen receptor modulators on reproductive tissues other than the endometrium. **Ann NY Acad Sci**. 2001 Dec. 949: 243-50.

HERNÁNDEZ VALENCIA M, CÓRDOVA PÉREZ N, ZÁRATE A, L BASURTO, MANUEL APOLINAR L, RUIZ M, ET AL. Hipotireoidismo associado aos sintomas da menopausa agravando a mudança com a terapia de substituição da tireoide. **Ginecol Obstet Mex**. 2008; 76: 571-5.

HOPPS E, LO PRESTI R, MONTANA M, NOTO D, AVERNA MR, CAIMI G. Gelatinases and their tissue inhibitors in a group of subjects with metabolic syndrome. **J Investig Med** 2013; 61: 978-983.

HUANG A.J, SUBAK L.L, WING R., WEST D.S, HERNANDEZ A.L, et al. Intensive behavioral intervention for weight loss and hot flashes in women. **Arch Intern. Med**. 12 de julho de 2010; 170 (13): 1161-1167.

H. ZUO, Z. SHI, X. HU, M. WU, Z. GUO, A. HUSSAIN, Prevalence of metabolic syndrome and factors associated with its components in Chinese adults, **Metabolism** 58 (2009) 1102–1108.

HANSSON J, VASAN RS, ANLOV J, INGELSSON E, LIND L, LARSSON A, MICHAELSSON K, SUNDSTROM J. Biomarkers of extracellular matrix metabolism

(MMP-9 and TIMP-1) and risk of stroke, myocardial Infarction, and cause-specific mortality: Cohort Study. **PLoS ONE** 2011; 6: e16185.

HOLMBECK K, ET AL. Camundongos com deficiência de MT1-MMP desenvolvem nanismo, osteopenia, artrite e doença do tecido conjuntivo devido à renovação inadequada do colágeno. **Célula**. 1999; 99: 81-92.

ITOH T, ET AL. Unchanged secretion of β -amyloid precursor protein in gelatinase A (matrix metalloproteinase 2) deficient mice. **J Biol Chem**. 1997; 272 : 22389-22392.

ITOH, T. ET AL. O papel da metaloproteinase de matriz 2 e da metaloproteinase de matriz 9 na artrite induzida por anticorpos. **J. Immunol**. **169**, 2643-2647 (2002).

JELENIK. J., RODEN M. How estrogens prevent from lipid-induced insulin resistance. **Endocrinology** 154 (2013) 989-992.

JAISWAL A, CHHABRA A, MALHOTRA U, KOHLI S, RANI V. Comparative analysis of human matrix metalloproteinases: Emerging therapeutic ta Menopause research in Latin America. **Bioinformação**. 2 de março de 2011; 6 (1): 23-30.

JAYASENA CN , ALKAABI FM , LIEBERS CS , HANDLEY T , FRANKS S , DHILLO WS . A systematic review of randomized controlled trials investigating the efficacy and safety of testosterone therapy for female sexual dysfunction in postmenopausal women. **Clin Endocrinol (Oxf)**. 2019 Mar; 90 (3): 391-414

KAR S, SUBBARAM S, CARRICO PM, MELENDEZ JA. A critical link between free radicals, matrix remodeling and degenerative disease. *Respir Physiol Neurobiol* 2010; 174: 299-306.

KUWABARA T, MORI K, MUKOYAMA M, ET AL. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels reflect damage to glomeruli, proximal tubules, and distal nephrons. **Kidney Int**. 2009; 75:285–294.

K.E. DAVIS, D.M. NEINAST, K. SUN, M.W. SKILES, D.J. BILLS, A.J. ZEHR, ET AL., The sexually dimorphic role of adipose and adipocyte estrogen receptors in modulating adipose tissue expansion, inflammation, and fibrosis, **Mol. Metab**. 2 (2013) 227–242.

KRALISCH S., et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 predicts adiposity in humans. **Eur J Endocrinol**. Fevereiro de 2007; 156 (2): 257-61.

K.A. MATTHEWS, S.L. CRAWFORD, C.U. CHAE, S.A. EVERSON-ROSE, M.F. SOWERS, B. STERNFELD, ET AL., Are changes in cardiovascular disease risk factors in midlife women due to chronological aging or to the menopausal transition, *J. Am. Coll. Cardiol.* 54 (2009) 2366–2373.

K.A. MATTHEWS, L.H. KULLER, K. SUTTON-TYRRELL, Y.F. CHANG, Changes in cardiovascular risk factors during the perimenopause and postmenopause and carotid artery atherosclerosis in healthy women, *Stroke* 32 (2001) 1104–1111.

KLEIN S.L. Os efeitos dos hormônios nas diferenças sexuais na infecção: dos genes ao comportamento. *Neurosci. Biobehav. R* , 24 (2000) , pp. 627 - 638

LANONE S, ET AL. Overlap and specific contribution of matrix metalloproteinases enzymes 9 and 12 in IL-13-induced inflammation and remodeling. *J Clin Invest.* 2002; 110: 463-474.

LEE HM, CIANCIO SG, TUTER G, RYAN ME, KOMAROFF E, GOLUB LM. Subantimicrobial dose doxycycline efficacy as a matrix metalloproteinase inhibitor in chronic periodontitis patients is enhanced when combined with a non-steroidal antiinflammatory drug. *J Periodontol.* 2004;75(3):453-63.

Li L, WANG Z. Ovarian Aging and Osteoporosis. *Adv Exp Med Biol.*1086 (2018) 199-215.

LI J.R, SHEN T. Expression characteristics of MMP-2 and MMP-9 in guinea pig ovaries during the estrous cycle. *Genet Mol Res.* 2015 Dec 21;14(4):17329-40

LI Z, LI L, ZIELKE R, ET AL. Increased expression of 72-kd type IV collagenase (MMP-2) in human aortic atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 1996; 148:121/8.

LI, W., LI, N., SONG, D., RONG, J., QIAN, A., LI, X. "A metformina inibe a migração de células progenitoras endoteliais diminuindo as metaloproteinases de matriz, MMP-2 e MMP-9, via o caminho da AMPK / mTOR / autofagia ". *Revista Internacional de Medicina Molecular* 39.5 (2017): 1262-1268

LITWAK S.A, WILSON J.L, CHEN W., GARCIA-RUDAZ C., KHAKSARI M., COWLEY M.C, ET AL. Estradiol prevents fat accumulation and overcomes leptin resistance in female high-fat diet mice. *Endocrinology.*155 (2014) 4447-4460

LIJNEN RH. Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. **Thromb Haemost** 2001, 86, 24-33

LEVY N., AGUIAR R.R. Terapia de modulação hormonal bioidêntica (THMB). 3ª Ed. Cap.12. São Paulo: Editora Fapes Books, 2018

LOFTUS IM, NAYLOR AR, BELL PRF, THOMSON MM. Plasma MMP-9—a marker of carotid plaque instability. **Eur J Vasc Endovasc Surg** 21: 2001. 17–21

LEENERS B , GEARY N , TOBLER PN , ASARIAN L . Ovarian hormones and obesity. **Hum Reprod Update**. 2017 May 1; 23 (3): 300-321

M. CANONICO, G. PLU-BUREAU, G.D. LOWE, P.Y. SCARABIN, Hormone replacement therapy and risk of venous thromboembolism in postmenopausal women: systematic review and meta-analysis, **BMJ** 336 (2008) 1227–1231.

MAKI PM , GIRARD LM E MANSON JE Hormone therapy in menopause and cognition. **BMJ**. 2019 Mar 6 and 364: 1877

MEIRELLES RM. [Menopause and metabolic syndrome]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**. Mar 2014; 58 (2): 91-6.

MICHAEL AJ MOSER , STEVE ARCAND , HAN-BIN LIN , CHRIS WOJNAROWICZ , JOLANTA SAWICKA , TAMALINA BANERJEE , YIGANG LUO, GAVIN R. BECK , PATRICK P. LUCAS , E GRZEGORZ SAWICKI Protection of Transplanted Kidney from Preservation Injury by Inhibition of Matrix Metalloproteinases. **PLoS One** . 2016; 11 (6): e0157508

MIKSZTOWICZ V , MORALES C , BARCHUK M , LÓPEZ G , PÓVEDA R , GELPI R , SCHREIER L , RUBIO M , BERG G. Metalloproteinase 2 and 9 Increased activity in epicardial adipose tissue in patients with coronary artery disease. **Curr Vasc Pharmacol**. 2017; 15 (2): 135-143

MANCUSO P , BOUCHARD B. The impact of aging on adipose function and adipokine synthesis. **Front Endocrinol (Lausanne)**. 2019 March 11 10: 137

M.V. GIORDANO, L.A. GIORDANO, R.C. GOMES, R.S. SIMÕES, H.B. NADER, M.G. GIORDANO. et al. The evaluation of endometrial sulfate glycosaminoglycans in women with polycystic ovary syndrome. **Gynecol Endocrinol** 31 (2015) 278–281. 45.

MASSOUDI MS, MEILAHN EN, ORCHARD TJ, FOLEY TP, JR., KULLER LH, COSTANTINO JP, ET AL. Prevalence of thyroid antibodies among healthy middle-aged women. Findings from thyroid study in healthy women. *Ann Epidemiol.* 1995; 5: 229-33

MIAO L.Y, CHU T.T.H, LI P., JIANG Y., LI H.J. Cimicifuga heracleifolia is therapeutically similar to black cohosh in relieving menopausal symptoms: evidence from pharmacological and metabolomic studies. *Chin J Nat Med.* 2019 Jun; 17 (6): 435-445.

MOEHRER, B., HEXTALL, A., JACKSON, S., 2003. Oestrogens for urinary incontinence in women. *Cochrane Database Syst. Rev.*, CD001405

MIYAUCHI Y , SATO Y , T KOBAYASHI , YOSHIDA S , T MORI , KANAGAWA H , E KATSUYAMA , FUJIE A , HAO W , K MIYAMOTO , TANDO T , H MORIOKA , MATSUMOTO M , CHAMBON P , JOHNSON RS , KATO S , TOYAMA Y , MIYAMOTO T. HIF1 α is required for the activation of osteoclasts by estrogen deficiency in postmenopausal osteoporosis. *Proc Natl Acad Sci EUA A.* 8 de outubro de 2013; 110 (41): 16568-73

M.V. GIORDANO, L.A. GIORDANO, R.C. GOMES, R.S. SIMÕES, H.B. NADER, M.G. GIORDANO. ET AL. The evaluation of endometrial sulfate glycosaminoglycans in women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol* 31 (2015) 278–281.

MARTIGNETTI JA, ET AL. Mutation of matrix 2 metalloproteinase gene (MMP2) causes multicentric osteolysis and arthritis syndrome. *Nature Genet.* 2001; 28: 261-265

MOEHRER, B., HEXTALL, A., JACKSON, S. Oestrogens for urinary incontinence in women. *Cochrane Database Syst.* 2003. Rev., CD001405

MORENO F.N, CAMPOS-SHIMADA L.B, et al. Vitex agnus - castus L. (Verbenaceae) Improves Liver Lipid Metabolism and Redox Status of Ovariectomized Mice. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015; 2015: 212378.

MUKAIYAMA K , KAMIMURA H , UCHIYAMA S , IKEGAMI S , NAKAMURA Y , KATO H . Elevated serum alkaline phosphatase (ALP) levels in postmenopausal women are caused by high bone turnover. *Envelhecimento Clin Exp Res.* 2015 ago; 27 (4): 413-8

MOHAN R, ET AL. Matriz de metaloproteinase gelatinase B (MMP-9) coordena e efetua a regeneração epitelial. **J Biol Chem**. 2002; 277: 2065-2072.

NAGASE H., BREW K. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity. **Biochim Biophys Acta** 2010; 1803: 55-71

NOVAK MJ, JOHNS LP, MILLER RC, BRADSHAW MH. Adjunctive benefits of subantimicrobial dose doxycycline in the management of severe, generalized, chronic periodontitis. **J Periodontol**. 2002;73(7):762-9.

N PÁGINAS , GOGLY B , GODEAU L , IGONDJO-TCHEN S , MAUROIS P , DURLACH J. , BAC P . Structural changes of the vascular wall in magnesium deficient mice. A possible role of gelatinases A (MMP-2) and B (MMP-9). **Magnes Res**. 2003 Mar; 16 (1): 43-8.

ONODA T, ONO T, DHAR DK, YAMANOI A, FUJII T, NAGASUE N. Doxycycline inhibits cell proliferation and invasive potential: combination therapy with cyclooxygenase-2 inhibitor in human colorectal cancer cells. **J Lab Clin Med**. 2004;143(4):207-16

PYO R ET AL. Disruption of matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B) target genes suppresses the development of experimental abdominal aortic aneurysms. **J Clin Invest**. 2000; 105: 1641-1649.

P.S. COOKE, A. NAAZ. Role of Estrogens in Adipocyte Development and Function. **Experimental Biology and Medicine** 229 (2004) 1127-1135.

PANDA S , DAS A . Analyzing Thyroid Dysfunction in Climatério. **J Midlife Health**. 2018 Jul-Sep; 9 (3): 113-116

PALLASCH T. Subantimicrobial doses of tetracycline. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. September 2004; 24 (9): e163

PAGE-MCCAW A, EWALD AJ, WERB Z. Matrix metalloproteinases and regulation of tissue remodeling. **Nat Rev Mol Cell Biol**. 2007; 8 (3): 221-233. doi: 10.1038/nrm2125

PIMENTA F , LEAL I , MAROCO J , RAMOS C . Symptoms of Menopause: Do Life Events Predict Severity of Symptoms in the Peri and Postmenopause?.

Maturitas 2012 ago; 72 (4): 324-31

POTTER B, SCHRAGER S, DALBY J, TORELL E, HAMPTON U. **Menopause**. Prim Care. 2018 ten; 45 (4): 625-641

PEDERSEN S.B, FUGLSIG S., SJØGREN P., RICHELSEN B. Identification of steroid receptors in human adipose tissue, **Eur. J. Clin. Invest.** 26 (1996) 1051–1056.

P. HOEGH-ANDERSEN, L.B. TANKO, T.L. ANDERSEN, C.V. LUNDBERG, Mo JA, A.M. 74 Heegaard, et al. Ovariectomized rats as a model of postmenopausal osteoarthritis: Validation and application. **Arthr Res Ther** (2004) R169–R180.

PLANAS AM, SOLE S, JUSTICIA C. Expression and activation of matrix metalloproteinase-2 and -9 in rat brain after focal cerebral ischemia. **Neurobiol Dis** 8: (2001) 834 – 846

Pu D , Tan R , Yu Q , Wu J. Menopausal metabolic syndrome and associated factors: a meta-analysis. **Climateric**. 2017 dez; 20 (6): 583-591.

ROSSOUW, J.E., 2001. Early risk of cardiovascular events after commencing hormone replacement therapy. **Curr. Opin. Lipidol.** 12, 371–375.

R.K. RUDE, F.R. SINGER, H.E. GRUBER. Skeletal and hormonal effects of magnesium deficiency. **J Am Coll Nutr** 28 (2009) 131-141.

ROSSOW J.E, ANDERSEN G.L, PRENTICE R.L, LACROIX A.Z, KOOPERBERG C., STEFANICK M.L, et al., Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the So Mee Kim et al. 281 Women's Health Initiative randomized controlled trial. **Jama** 288 (2002) 321-333

RAFFETTO JD, KHALIL RA. Matrix metalloproteinases and their Inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. **Biochem Pharmacol** 2008; 75: 346-359

REINHARDT RA, STONER JA, GOLUB LM, WOLFF MS, LEE H-M, MEINBERG TA, LYNCH JC, RYAN ME, SORSA T, PAYNE JB. Efficacy of sub-antimicrobial dose doxycycline in postmenopausal women: clinical outcomes. **J Clin Periodontol** 2007; 34: 768–775. doi: 10.1111/j.1600-051X.2007.01114.x.

REID IR, AMES R, EVANS MC ET AL. Determinants of total body and regional bone mineral density in normal postmenopausal women a key role for fat mass. **J Clin Endocrinol Metab** 1992, 75:45e51

REID IR, EVANS MC, AMES RW. Volumetric bone density of the lumbar spine is related to fat mass but not lean mass in normal postmenopausal women. **Osteoporos**, 1994. Int 4:362e367

RIBAS V, DREW B.G, LE J.A, SOLEYMANI T., DARAEI T, SITZ D., ET AL., Myeloid-specific estrogen receptor alpha deficiency impairs metabolic homeostasis and accelerates atherosclerotic lesion development. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 108 (2011) 16457–16462.

RUDOLPH-OWEN LA, HULBOY DL, WILSON CL, MUDGETT J, MATRISIAN LM. Coordinated expression of members of the matrix metalloproteinase family in the womb of normal, matrilysin-deficient and stromelysin-1 mice. **Endocrinology**. 1997; 138: 4902-4911

RYU KJ , PARQUE H , KIM YJ , YI KW , SHIN JH , HUR JY , KIM T . Moderate to severe vasomotor symptoms are risk factors for non-alcoholic fatty liver disease in postmenopausal women. **Maturitas** 2018 Nov; 117: 22-28

SHAIKH S, NOOR F, AZLI S, SAJJAD S. Rastreio do Hipotireoidismo em mulheres na menopausa. **Pak J Med Health Sci**. 2017; 11: 14-7

SARREL PM. A call to increase the use of hormone therapy to prevent diseases in symptomatic postmenopausal women. **Menopause**. 2019 Mar 18

S.B. Pedersen, S. Fuglsig, P. Sjøgren, B. Richelsen, Identification of steroid receptors in human adipose tissue, **Eur. J. Clin. Invest.** 26 (1996) 1051–1056.

S.N. SILVA. Atividade estrogênica de Morus Nigra, Moraceae em ratas ovariectomizadas. Tese (Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia, Ponto Focal) Universidade Federal do Maranhão. Maranhão. (2012) 101-109.

SRIVARATHARAJAH K , ABRAMSON BL. Hypertension in menopausal women: the effect and role of estrogen. **Menopause**. 2019 abr; 26 (4): 428-430

SHELLEY J.M, GREEN A, SMITH A.M, DUDLEY E., DENNERSTEIN L., HOPPER J., ET AL., Relationship of endogenous sex hormones to lipids and blood pressure in mid-aged women. **Ann. Epidemiol.** 8 (1998) 39–45.

STERNLICHT MD, LOCHTER A, SYMPSON CJ, HUEY B, JP ROUGIER, JW GRAY, D PINKEL, BISSELL MJ, WERB Z. Stromal proteinase MMP3 / stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. **Célula.** 1999; 98: 137–146.

S.D. HARLOW, M. GASS, J.E. HALL, R. LOBO, P. MAKI, R.W. REBAR, ET AL. Executive summary of the stages of reproductive aging workshop+ 10: addressing the unfinished agenda of staging reproductive aging, **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 97 (2012) 1159–1168.

SILVA S.N. Atividade estrogênica de *Morus Nigra*, Moraceae em ratas ovariectomizadas. Tese (Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia, Ponto Focal) Universidade Federal do Maranhão. Maranhão. (2012) 101-109.

S. DEVARAJ, D.Y. XU, I. JIALAL, C-reactive protein increases plasminogen activator inhibitor-1 expression and activity in human aortic endothelial cells: implications for the metabolic syndrome and atherothrombosis, **Circulation** 107 (2003) 398–404

SANTOLLO J, TORREGROSSA A.M, ECKEL LA. Estradiol acts in the medial preoptic area, arcuate nucleus, and dorsal raphe nucleus to reduce food intake in ovariectomized rats. **Horm Behav** 60 (2011) 86-93.

SALPETER S.A, WALSH J.M, GREYBER E., SALPETER E.E. Coronary heart disease events associated with hormone therapy in younger and older women, a meta-analysis, **J. Gen. Intern. Med.** 21 (2006) 363–366.

S. LIEDTKE, M.E. SCHMIDT, A. VRIELING, A. LUKANOVA, S. BECKER, R. KAAKS, ET AL., Postmenopausal sex hormones in relation to body fat distribution, **Obesity** (Silver Spring) 20 (2012) 1088–1095.

STEFANSKA A., PONIKOWSKA I., SYPNIEWSKA G., A-FABP concentration is more strongly associated with cardiometabolic risk factors and the occurrence of metabolic syndrome in premenopausal than in postmenopausal middle-aged women, **BioMed Res. Int.** 2014 (2014) 645762

STEFANSKA A , BERGMANN K , SYPNIEWSKA G . Metabolic and Menopause Syndrome: Pathophysiology, Clinical and Diagnostic Significance. **Adv Clin Chem.** 2015; 72: 1-75

SONU Y, AVINASH S.S, SREEKANTHA, KUAR K.A, MALATHI M., SHIVASHANKARA A.R. Effect of Oestrogen on Altering the Serum and Urinary Levels of Calcium, Phosphate and Magnesium in Hysterectomised Women Compared to Natural Menopausal South Indian Women: A Case Control Study. **Ind J Clin Biochem** 31 (2016) 326–331.

S. OZDEMIR, C. CELIK, H. GORKEMLI, A. KIYICI, B. KAYA, Compared effects of surgical € and natural menopause on climacteric symptoms, osteoporosis, and metabolic syndrome, **Int. J. Gynaecol. Obstet.** 106 (2009) 57–61

SAKAMURI S.S.V.P, WATTS R., TAKAWALE U, et al. Lack of tissue metalloproteinase-4 inhibitor (TIMP4) improves high fat diet-induced obesity in mice due to defective lipid absorption. **Sci Rep.** 2017 24 de julho; 7 (1): 6210.

SHWEIKI D, ITIN A, SOFFER D, KESHET E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. **Nature** 359: 1992. 843– 845

SOTTRUP-JENSEN L, BIRKEDAL-HANSEN H. Interactions between collagenase-a-macroglobulin from human fibroblasts. Localization of cleavage sites in the bait regions of five mammalian α -macroglobulins. **J Biol Chem.** 1989; 264: 393-401

STERNLICHT MD, LOCHTER A, SYMPSON CJ, HUEY B, JP ROUGIER, JW GRAY, D PINKEL, BISSELL MJ, WERB Z. A proteinase estromal MMP3 / estromelisina-1 promove carcinogênese mamária. **Célula.** 1999; 98: 137–146.

STEVENSON FT, WHEELDON CM, MD GADES, KAYSEN GA, STERN JS, VAN GOOR H. O estrogênio piora a lesão glomerular hipertrigliceridêmica incipiente no rato Zucker obeso. **Rim Internacional** 2000; 57(5): 1927-1935.

SONU Y, S.S. AVINASH, SREEKANTHA, K.A KUMAR, M. MALATHI, A.R. SHIVASHANKARA. Effect of Oestrogen on Altering the Serum and Urinary Levels of Calcium, Phosphate and Magnesium in Hysterectomised Women Compared to Natural Menopausal South Indian Women: A Case Control Study. **Ind J Clin Biochem** 31 (2016) 326–331

THOMPSON RW, BAXTER BT. MMP inhibition in abdominal aortic aneurysms. Rationale for a prospective randomized clinical trial. **Ann N Y Acad Sci.** 1999; 878:159-78.

THURSTON R.C, SANTORO N., MATTHEWS K.A. Adiposidade e ondas de calor em mulheres da meia-idade: um papel modificador da idade. **J Clin Endocrinol Metab** . 2011 de outubro; 96 (10): E1588-E1595.

TSEROTAS & J. E. BLÜMEL. To cite this article: K. Tserotas & J. E. Blümel (2018): Menopause research in Latin America, **Climacteric**, 2019 Feb; 22 (1): 17-21.

T.C. OKEKE, U.B. ANYAEHIE, C.C. EZENYEAKU, Premature menopause, **Ann. Med. Health Sci. Res.** 3 (2013) 90–95.

TOFFOL E, KALLEINEN N, HAUKKA J, VAKKURI, PARTONEN, POLO-KANTOLA P. Melatonin in perimenopausal and postmenopausal women: associations with mood, sleep, climacteric symptoms and quality of life. **Menopause.** 2014 May; 21 (5): 493-500

THE KHOUDARY SR, THURSTON RC. Cardiovascular Implications of the Menopause Transition: Endogenous Sexual Hormones and Vasomotor Symptoms. **Obstet Gynecol Clin North Am.** 2018 Dec; 45 (4): 641-661

United Nations, World Population Ageing 2013, UN Department of Economic and Social Affairs, Population Division, New York, NY, 2013. ST/ESA/SER.A/348.

VILLAREAL FJ, GRIFFIN M, OMENS J, DILLMANN W, NGYEN J, COVELL J. Early short-term treatment with doxycycline modulates postinfarction left ventricular remodeling. **Circulation.** 2003;108(12):1487-92.

VILLAREAL DT, HOLLOSZY JO. Effect of DHEA on abdominal fat and insulin action in elderly women and men: a randomized controlled trial. **JAMA.** 2004; 292:2243–2248

V.J. VIEIRA POTTER, K.J. STRISSEL, C. XIE, E. CHANG, G. BENNETT, J. DEFURIA, ET AL., Adipose tissue inflammation and reduced insulin sensitivity in ovariectomized mice occurs in the absence of increased adiposity. **Endocrinology** 153 (2012) 4266–4277.

V.J. VIEIRA POTTER, K.J. STRISSEL, C. XIE, E. CHANG, G. BENNETT, J. DEFURIA, ET AL., Adipose tissue inflammation and reduced insulin sensitivity in

ovariectomized mice occurs in the absence of increased adiposity, **Endocrinology** 153 (2012) 4266–4277.

VIAPPANI S, NICOLESCU AC, HOLT A, SAWICKI G, CRAWFORD BD, LEÓN H, VAN MULLIGEN T, SCHULZ R. Activation and modulation of 72kDa matrix metalloproteinase-2 by peroxynitrite and glutathione. **Biochem Pharmacol** 2009; 77: 826-834

XIAOMEI MENG , XIANGGUO DAI , TANG-DONG LIAO , MARTIN D'AMBROSIO , WANG FANGFEI , JAMES J. YANG , E XIAO-PING YANG. Dose-dependent toxic effects of high doses of estrogen on renal and cardiac injury in surgically postmenopausal mice. **Life Sci.** 17 de janeiro de 2011; 88 (3-4): 178-186.

XU X, YIN D, LIU T, CHEN F., CHENG Y., WANG X., et al. Tea polysaccharide inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis in RAW264.7 cells and ameliorates ovariectomy-induced osteoporosis in rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy** 102 (2018) 539–548.

YUANKUI CAO , SHAOFEN ZHANG , * SHIEN ZOU , XIAN XIA. The relationship between endogenous androgens and body fat distribution in premenopausal and late postmenopausal women. **PLoS One.** 2013; 8 (3): e58448

YAO WJ, WU CH, WANG ST, CHANG CJ, CHIU NT, YU CY (2001) Differential changes in regional bone mineral density in healthy Chinese: age-related and sex dependent. **Calcified Tissue Int** 68(6):330–336

WAKATSUKI, A., IKENOUE, N., SHINOHARA, K., WATANABE, K., FUKAYA, T., Different effects of oral and transdermal estrogen replacement therapy on matrix metalloproteinase and their inhibitor in postmenopausal women. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** 2003. 23, 1948–1949

WANG H, KEISER JA. Vascular endothelial growth factor upregulates the expression of matrix metalloproteinases in vascular smooth muscle cells: role of flt-1. **Circ Res.** 1998. 83:832– 884

WANG MC, BACHRACH LK, VAN LOAN M ET AL. The relative contributions of lean tissue mass and fat mass to bone density in young women. **Bone**, 2005, 37:474e481

WELGUS HG, KOBAYASHI DK, JEFFREY JJ. Collagen substrate specificity of rat uterine collagenase. **J Biol Chem.** 1983; 258: 14162-14165

WEERASEKERA L, RUDNICKA C, SANG Q.X et al. ADAM19: A new target for metabolic syndrome in humans and mice. **Mediadores Inflamm.** 2017; 2017: 7281986.

WHO. Research on the menopause in the 1990s - Introduction. Research on the Menopause in the 1990s: report of a WHO scientific group 866 (1996) 1-107.

WINGROVE CS, GARR E, GODSLAND IF, STEVENSON JC 17-Estradiol enhances release of matrix metalloproteinase-2 from human vascular smooth muscle cells. **Biochim Biophys Acta.** 1998. 1406:169 –174

WISEMAN BS, ET AL. Atividades indutivas e inibitórias específicas de sítios de MMP-2 e MMP-3 orquestram a morfogênese das ramificações da glândula mamária. **J Cell Biol.** 2003; 162: 1123–1133.

WOESSNER JFNH. Inhibition of the MMPs. In: Oxford University Press, editor. Matrix metalloproteinases and TIMPs. **1st ed. Oxford: Oxford University Press;** 2000. p. 109–25.

ZANGER, D., YANG, B.K., ARDANS, J., WACLAWIW, M.A., CSAKO, G., WAHL, L.M., CANNON III, R.O. Divergent effects of hormone therapy on serum markers of inflammation in postmenopausal women with coronary artery disease on appropriate medical management. **J. Am. Coll. Cardiol.** 2000. 36, 1797–1802

ZHAN E, KEIMIG T, XU J, PETERSON E, DING J, WANG F, YANG XP. Efeito cardíaco dose-dependente de reposição estrogênica em infarto pós-miocárdio de camundongos. **Fisiologia Experimental.** 2008; 93(8): 982-993.

ZHANG, P., ZHONG, M., 2001. Effects of 17beta-estradiol and progesterone on the expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in rat osteoblasts. **Di Yi. Jun. Yi. Da. Xue. Xue. Bao.** 21, 929–931.

ZHANG, Y., STEWART, K.G., DAVIDGE, S.T., 2000. Estrogen replacement reduces age-associated remodeling in rat mesenteric arteries. **Hypertension** 36, 970–974.

ZHAO H, DONG Y, TIAN X, TK TAN, LIU Z, ZHAO Y, ET AL. Matrix metalloproteinases contribute to renal fibrosis in chronic kidney disease. **Mundo J Nephrol** 2013. agosto; 2 (3): 84-9. 10.5527 / wjn. v2.i3.84

ZHAO S, CHOKSUCHAT C, ZHAO Y, BALLAGH SA, KOVALEVSKY GA, ARCHER DF. Effects of doxycycline on serum and endometrial levels of MMP-2, MMP-9 and TIMP-1 in women using a levonorgestrel-releasing subcutaneous implant. **Contraception** 2009; 79:469–78.

ZUMOFF B, STRAIN GW, MILLER LK, ROSNER W. The mean twenty-four-hour plasma concentration of testosterone decreases with age in normal premenopausal women. **J Clin Endocrinol Metab.** 1995; 80 (4): 1429-1430.

ANEXO – A



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-CEUA

CIAEP: 01.0341.2014



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **"ENVOLVIMENTO DAS METALOPROTEINASES NOS SINTOMAS DA MENOPAUSA: UMA ABORDAGEM EXPERIMENTAL."** registrada com o nº 23115.014442/2017-06, sob a responsabilidade de **Haissa Oliveira Brito**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi considerado **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFMA) da Universidade Federal do Maranhão.

FINALIDADE	() ENSINO (X) PESQUISA () EXTENSÃO
Vigência da autorização	12/06/2018 à 12/05/2019
Espécie/linhagem/raça	Camundongos (Swiss) e Ratos (Wistar)
Nº de animais	Ratos: 48 Camundongos: 70
Peso/Idade	Ratos: 8 semanas/200-220g Camundongos: 60 dias/25-30g
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central - UFMA

Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho
Presidente da Comissão de Ética no uso de Animais - CEUA/UFMA