

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA
TOXICOLÓGICA**

**INFLUÊNCIA DA TERAPIA DE REPOSIÇÃO
HORMONAL SOBRE A ATIVIDADE DE ENZIMAS
ANTIOXIDANTES, NÍVEIS DE ESTRÔNCIO E FERRO,
E METABOLISMO ÓSSEO EM MULHERES.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Taís Cristina Unfer

Santa Maria, RS, Brasil

2006

**INFLUÊNCIA DA TERAPIA DE REPOSIÇÃO HORMONAL
SOBRE A ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES,
NÍVEIS DE ESTRÔNCIO E FERRO, E METABOLISMO
ÓSSEO EM MULHERES.**

por

Taís Cristina Unfer

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Bioquímica Toxicológica, Área de Concentração
bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de
Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para
obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica.

Orientador: Prof. Dra. Tatiana Emanuelli

Santa Maria, RS, Brasil

2006

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**INFLUÊNCIA DA TERAPIA DE REPOSIÇÃO HORMONAL
SOBRE A ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES, NÍVEIS DE
ESTRÔNIO E FERRO, E METABOLISMO ÓSSEO EM MULHERES.**

elaborada por
Taís Cristina Unfer

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA:

Tatiana Emanuelli, Dra.
(Presidente/Orientador)

Érico Marlon de Moraes Flores, Dr.
(Co-orientador)

Susana Francisca Llesuy, Dra. (UFSM)

Maria Rosa Chitolina Schetinger, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 31 de maio de 2006.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,
Délcio e Dóris por todo o amor,
compreensão, amizade, confiança, força e tempo
que sempre me dedicaram.
Além da educação moral e intelectual
a mim proporcionada.
Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, pela vida e pela oportunidade de evoluir e conviver com pessoas tão maravilhosas.

Agradeço aos meus pais que dedicaram sua vida a minha educação e minha felicidade, sempre me dando muito amor, confiança e força.

A Tatiana (Tati) pela oportunidade, confiança e por todos os ensinamentos a mim passados. Ao pessoal do NIDAL, “a grande família”, é impossível citar a contribuição de cada um de vocês, pois o espaço é restrito e as contribuições são muitas, mas meu coração sabe o quanto deve a cada um.

Aos professores da pós-graduação e a Angélica, secretária do curso, pelo excelente atendimento e auxílio prestados.

As minhas amigas Val, Paula, Fernanda, Bina, Tiane e Lú Patias por todo o carinho dedicado e pela amizade sempre. E também as pessoas especiais que passaram por minha vida durante esta fase e deixaram uma marca particular e inesquecível. Aos meus familiares, em especial minha bisavó (a Mota) que sempre me apoiou e ao Cláudio Unfer pela grande ajuda na formatação.

Não posso esquecer de fazer um agradecimento especial a Greicy, minha única “IC”, que com uma paciência admirável, dedicou-se a me ajudar. A Marla, a Clarissa e é claro as mulheres que confiaram em mim e se dispuseram a participar deste projeto.

A Marta e ao *Labimed*, pela ajuda nas análises hormonais. Ao Dr. João Carlos e ao *Osteolab*, pela ajuda médica e analítica neste trabalho. Estendo esse agradecimento a todos os funcionários do HUSM que sempre ajudaram quando possível e em especial a Ione (do LAC), pela coleta do material biológico.

Ao Érico, Valderi, Júlio e o Edson, do Setor de Química Ambiental (DQ) pela ajuda na análise dos metais e pela troca de conhecimentos.

A CAPES pelo apoio financeiro e a UFSM, por tornar possível o sonho de todos nós e promover o desenvolvimento intelectual e científico do Brasil.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

Influência da terapia de reposição hormonal sobre a atividade de enzimas antioxidantes, níveis de estrôncio e ferro, e metabolismo ósseo em mulheres.

Autora: Taís Cristina Unfer
Orientadora: Tatiana Emanuelli
Co-orientador: Érico Marlon de Moraes Flores
Data e Local: Santa Maria, 31 de maio de 2006

A redução natural nos níveis de estrogênio, que ocorre na menopausa pode contribuir para vários problemas de saúde muitos deles também possivelmente relacionados ao estresse oxidativo. A diminuição dos níveis circulantes de estrogênio e o aumento de hormônio folículo estimulante (FSH) em mulheres na menopausa estão sendo associados à perda óssea. A terapia de reposição hormonal (TRH) é o tratamento mais comum para atenuar os distúrbios menopáusicos e, as concentrações sanguíneas de estrôncio (Sr) e ferro (Fe) têm mostrado influenciar no metabolismo ósseo. Os objetivos deste estudo foram avaliar a influência da TRH na atividade de enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx) e lipoperoxidação (TBARS); e determinar os níveis de Sr e Fe e sua relação com a densidade mineral óssea (DMO) e parâmetros bioquímicos em mulheres na pré e pós menopausa com e sem TRH. As atividades das enzimas antioxidantes foram determinadas no sangue total de mulheres na pré-menopausa (n= 18) e na pós-menopausa sem (n= 21) e com TRH (n= 19); a idade média dos grupos foi de 47, 59 e 57 anos, respectivamente. As concentrações de Sr e Fe foram avaliadas por espectrofotometria (espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente - ICP-MS e espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente - ICP-OES, respectivamente), no sangue de mulheres na pré-menopausa (n= 17) e na pós-menopausa sem (n= 20) e com TRH (n= 19), com idade média de 47, 60 e 57 anos, respectivamente. A DMO foi determinada na lombar (L1-L4) e no colo do fêmur por absorciometria de duplo feixe de raios-X (DEXA). Em nosso estudo TBARS, CAT e GPx não foram significativamente diferentes entre os grupos. No entanto, a atividade da SOD foi significativamente menor em mulheres na pós-menopausa sem TRH ($0,68 \pm 0,04$ U/mg Hb) quando comparado com os grupos pós-menopausa com TRH ($0,89 \pm 0,07$ U/mg Hb) e na pré-menopausa ($0,91 \pm 0,04$ U/mg Hb). A atividade da SOD também apresentou correlação positiva com o tempo de TRH ($r=0,33$; $p<0,05$) nas mulheres menopausadas. As concentrações de Sr e Fe não diferiram entre as mulheres não menopausadas ($33,66 \pm 3,57 \mu\text{g L}^{-1}$ e $502,09 \pm 19,90 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente) e aquelas na pós-menopausa sem ($31,47 \pm 2,58 \mu\text{g L}^{-1}$ e $523,65 \pm 9,91 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente) ou com TRH ($29,74 \pm 3,02 \mu\text{g L}^{-1}$ e $540,30 \pm 20,24 \text{ mg L}^{-1}$,

respectivamente). A DMO da L1-L4 e fêmur foi maior nas mulheres que não estavam na menopausa ($1,05 \pm 0,23$ e $0,84 \pm 0,02$ g/cm², respectivamente) quando comparado com os grupos de mulheres na pós-menopausa sem ($0,90 \pm 0,37$ e $0,75 \pm 0,02$ g/cm², respectivamente) e com TRH ($0,94 \pm 0,04$ e $0,74 \pm 0,02$ g/cm², respectivamente). No entanto, a DMO não apresentou correlação com as concentrações de metais encontradas. A DMO foi negativamente influenciada pelos níveis de FSH ($\beta = -0,47$, $p < 0,01$ para DMO L1-L4 e $\beta = -0,42$, $p < 0,01$ para DMO fêmur), e pela idade ($r = -0,48$, $p < 0,01$ para DMO L1-L4 e $r = -0,38$, $p < 0,01$ para DMO fêmur). Concluiu-se que a TRH antagoniza a diminuição da atividade antioxidante da SOD que ocorre após a menopausa, sugerindo o papel protetor da terapia contra o estresse oxidativo. Também demonstramos que as concentrações sanguíneas de Sr e Fe encontradas não exerceram efeito significativo na DMO e outros parâmetros bioquímicos e não foram influenciadas pela menopausa ou pela TRH em mulheres na pré e pós-menopausa. A diminuição na DMO observada foi em decorrência do aumento nos níveis circulantes de FSH e do processo de envelhecimento.

Palavras-chave: Terapia de reposição hormonal, menopausa, enzimas antioxidantes, estrôncio, ferro, densidade mineral óssea.

ABSTRACT

Master Dissertation
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

Influence of hormone replacement therapy in antioxidant enzymes activity, strontium and iron levels, and bone metabolism in women.

Author: Taís Cristina Unfer
Adviser: Tatiana Emanuelli
Co-adviser: Érico Marlon de Moraes Flores
Date and Place of the defense: Santa Maria, May 31, 2006

Natural loss of estrogen occurring in menopausal process may contribute to various health problems many of them possibly related to oxidative stress. Decrease in circulating estrogen levels and increase in follicle stimulating hormone levels (FSH) in menopausal status are related with decrease in bone mineral density. Hormone replacement therapy (HRT) is the most common treatment to attenuate menopausal disturbances and strontium (Sr) and iron (Fe) have been suggested to influence to bone metabolism. The objectives of this study was to evaluate the influence of HRT on the activity of antioxidant enzymes (SOD, CAT, and GPx) and lipid peroxidation (TBARS) in menopausal women and to determine blood strontium and iron levels and their relationship with bone mineral density and biochemical parameters in pre and postmenopausal women with or without HRT. Blood antioxidant enzyme activities were determined in premenopausal (n=18) and in postmenopausal healthy women without (n=21) or with HRT (n=19) (mean ages: 47, 59, and 57, respectively). Whole blood Sr and Fe levels were determined by spectrometric methods (inductively coupled plasma mass spectrometry - ICP-MS and inductively coupled plasma optical emission spectrometry - ICP-OES, respectively) in premenopausal (n=17) and postmenopausal women without (n=20) or with HRT (n=19) (mean ages: 47, 60 and 57 years, respectively). Bone mineral density (BMD) was evaluated at the lumbar spine (BMD L1-L4) and femoral neck (BMD femur) by dual energy X-ray absorptiometry (DEXA). TBARS, CAT, and GPx activity were not significantly different among the groups of study. However, SOD activity was significantly lower in postmenopausal women without HRT (0.68 ± 0.04 U/mg Hb) when compared both to premenopausal women (0.91 ± 0.04 U/mg Hb) and to postmenopausal women with HRT (0.89 ± 0.07 U/mg Hb). SOD activity was positively correlated to the duration of HRT in the postmenopausal groups ($r=0.33$, $p<0.05$). Blood Sr and Fe levels in premenopausal ($33.66 \pm 3.57 \mu\text{g L}^{-1}$ and $502.09 \pm 19.90 \text{ mg L}^{-1}$, respectively) and postmenopausal women without ($31.47 \pm 2.58 \mu\text{g L}^{-1}$ and $523.65 \pm 9.91 \text{ mg L}^{-1}$, respectively) or with HRT ($29.74 \pm 3.02 \mu\text{g L}^{-1}$ and $540.30 \pm 20.24 \text{ mg L}^{-1}$, respectively) were not significantly different among study groups. BMD L1-L4 and BMD femur were significantly higher in premenopausal women (1.05 ± 0.23 and $0.84 \pm 0.02 \text{ g/cm}^2$, respectively) when compared both to postmenopausal women without (0.90 ± 0.37 and $0.75 \pm 0.02 \text{ g/cm}^2$, respectively) and to postmenopausal women with HRT (0.94 ± 0.04 and $0.74 \pm 0.02 \text{ g/cm}^2$, respectively). However, BMD had no relationship

with blood metal levels, but was negatively influenced by FSH levels ($\beta=-0.47$, $p<0.01$ for BMD L1-L4 and $\beta=-0.42$, $p<0.01$ for BMD femur) and age ($r=-0.48$, $p<0.01$ for BMD L1-L4 and $r=-0.38$, $p<0.01$ for BMD femur). We concluded that HRT antagonizes the decrease of SOD activity that occurs after menopause, suggesting that HRT may play a beneficial role in the protection against oxidative stress. It was also shown that the physiologic whole blood Sr and Fe levels had no significant effect in BMD or other biochemical parameters in pre and postmenopausal women. BMD decreased with the increased in FSH levels and with aging.

Keywords: Hormonal replacement therapy, menopause, antioxidant enzymes, strontium, iron, bone mineral density.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Formação das espécies reativas de oxigênio, a partir do oxigênio molecular, com sucessivas transferências de elétrons (Nordberg & Arnér, 2001). ...	23
FIGURA 2 - Esquema simplificado não estequiométrico dos sistemas oxidante e antioxidante nas células (Nordberg & Arnér, 2001).....	24
FIGURA 3 - Estrutura química do estradiol.....	25
QUADRO 1 – Critério para o diagnóstico de osteoporose segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 1994).	28
FIGURA 4 - Mecanismo de ação do estrôncio nas células ósseas (Marie <i>et al.</i> , 2001)	33

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1 – TABLE 1 – Characteristics of the study groups (means \pm S.E.M.).....	39
ARTIGO 1 – TABLE 2 – Biochemical parameters of the three study groups (means \pm S.E.M.)	39
ARTIGO 1 – TABLE 3 – Activity of antioxidant of the three study groups (means \pm S.E.M.)	40
ARTIGO 2 – TABLE 1 – Characteristics of the study groups (means \pm S.E.M.).....	56
ARTIGO 2 – TABLE 2 – Biochemical analyses (means \pm S.E.M.).....	57
ARTIGO 2 – TABLE 3 – Blood metal levels and BMD of the three study groups (means \pm S.E.M.).	58
ARTIGO 2 – TABLE 4 – The independent contribution of each individual variable to blood iron levels by multivariate linear regression analyses.....	59
ARTIGO 2 – TABLE 5 – The independent contribution of each individual variable to BMD L1-L4 and BMD femur by multivariate linear regression analyses.....	60

LISTA DE ANEXOS

- ANEXO 1** – Roteiro para autores / Guia para a redação e edição de artigo científico a ser submetido à Revista Maturitas.78
- ANEXO 2** – Questionário aplicado às mulheres participantes deste estudo80

LISTA DE ABREVIACOES

FSH – Hormônio folículo estimulante

E₂ – 17β-estradiol

TRH – Terapia de reposição hormonal

SOD – Superóxido dismutase

GPx – Glutathiona peroxidase

CAT – Catalase

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

ICP-OES – Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente

ICP-MS – Espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente

DEXA – Absorciometria de duplo feixe de raios-X

DMO – Densidade mineral óssea

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	3
AGRADECIMENTOS	4
RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	8
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	10
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ANEXOS.....	12
LISTA DE ABREVIações.....	12
APRESENTAÇÃO	15
1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 A menopausa	19
2.2 Estrogênio e hormônio folículo estimulante	20
2.3 A terapia de reposição hormonal	22
2.4 Estresse oxidativo e menopausa	23
2.5 Metabolismo ósseo e menopausa.....	26
2.6 O Estrôncio (Sr)	30
2.6.1 O estrôncio e o metabolismo ósseo	32
3 ARTIGOS CIENTÍFICOS	35
3.1 Artigo 1	36
3.2 Artigo 2	42
4 DISCUSSÃO	61
5 CONCLUSÕES	66
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
7 ANEXOS	77

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação são apresentados sob a forma de artigos, os quais se encontram no item ARTIGOS CIENTÍFICOS. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprios artigos e representam na íntegra este estudo.

Os itens DISCUSSÃO E CONCLUSÃO, dispostos após os artigos, contém interpretações e comentários gerais referentes ao presente estudo e relacionados aos artigos científicos deste trabalho.

As REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS são relacionadas às citações que aparecem nos itens INTRODUÇÃO, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA e DISCUSSÃO desta dissertação.

1 INTRODUÇÃO

A menopausa sinaliza o fim da habilidade reprodutiva feminina, em decorrência da diminuição da função folicular ovariana. Alterações hormonais típicas do envelhecimento reprodutivo ocorrem após a menopausa, como a diminuição dos níveis circulantes de 17β -estradiol (E_2) e aumento dos níveis de hormônio folículo estimulante (FSH). O corpo sofre mudanças e a mulher passa a apresentar sinais e sintomas característicos da diminuição na produção de estrogênios, como ondas de calor e disfunções urogenitais, podendo ocorrer o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, osteoporose, Alzheimer e depressão (Sowers, 1998; Greendale *et al.*, 1999). Além disso, tem sido sugerido que a redução da síntese de estrogênio poderia ser responsável pelo aumento do estresse oxidativo em mulheres na menopausa (Gura, 1995; Trevisan *et al.*, 2001; Ke *et al.*, 2003; Bednarek-Tupikowaska *et al.*, 2004).

O estresse oxidativo é o desequilíbrio entre fatores pró e antioxidantes que pode ocorrer por aumento dos fatores pró-oxidantes e/ou uma redução das defesas antioxidantes. Diversos estudos têm relacionado o aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) com o envelhecimento (Nohl, 1993; Finkel & Holbrook, 2000; Ínal *et al.*, 2001; Kasapoglu & Özden, 2001) e com o desenvolvimento de doenças como a aterosclerose (Ross, 1993; Harrison, 1997) e, mais recentemente, a osteoporose (Basu *et al.*, 2001). A terapia de reposição hormonal (TRH) pode ser considerada o mais efetivo tratamento para solucionar os problemas de saúde associados à menopausa. De fato, autores sugerem que os estrogênios atenuam os sintomas da menopausa e previnem doenças coronarianas e a osteoporose. No entanto, ainda existem contradições em relação ao seu efeito pró e antioxidante (Liehr, 1996; Markides *et al.*, 1998; Nathan & Chaudhuri, 1998; Timbodeau *et al.*, 2002). As enzimas antioxidantes tais como catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD) protegem os organismos aeróbicos de injúrias oxidativas causadas por EROs. Alterações na atividade destas enzimas poderiam ocorrer em decorrência da menopausa e, a TRH estaria associada ao aumento na

atividade antioxidante da GPx e CAT, em mulheres na pós-menopausa (Özden *et al.*, 2001; Naziroglu *et al.*, 2004).

A osteoporose é uma das mais sérias conseqüências fisiológicas da menopausa, pois fraturas osteoporóticas frequentemente resultam em morbidez e até mesmo em morte. Estima-se que 30% das mulheres acima de 50 anos poderão sofrer algum tipo de fratura por osteoporose (Pinto Neto *et al.*, 2002). Com base nisso, tem crescido o interesse científico por novas formas de tratamento e maior compreensão dos mecanismos hormonais e bioquímicos do metabolismo ósseo.

O estrôncio (Sr) é um metal não essencial, que compartilha com o cálcio (Ca) de propriedades químicas e fisiológicas similares (Delmas, 1992; Devine *et al.*, 1993) e está localizado em maior concentração nos ossos (Shoroeder *et al.*, 1972), podendo exercer um papel importante no metabolismo deste tecido (Venugopal *et al.*, 1978; Marie, 2006). A incorporação do Sr nos ossos está diretamente relacionada aos seus níveis plasmáticos, ao tempo de exposição e a renovação óssea e se dá por troca superficial ou substituição iônica (Linkins *et al.*, 1959; Johnson *et al.*, 1968; Dahl *et al.*, 2001). O tratamento com Sr foi associado a um aumento da densidade mineral óssea (DMO) da espinha lombar e da coluna vertebral de mulheres na menopausa e pacientes osteoporóticos, respectivamente (McCastin & Janes, 1959; Meunier *et al.*, 2002). No entanto, pouco se sabe a respeito do papel de concentrações fisiológicas de Sr no metabolismo ósseo.

Além do desequilíbrio entre formação e reabsorção óssea, em virtude da deficiência de hormônios ovarianos, a osteoporose na menopausa está associada à menor absorção gastrointestinal de Ca. Estudos observaram que a TRH aumenta a absorção de Ca (Heaney *et al.*, 1978;1997). No entanto, o tratamento a curto prazo com estradiol não influenciou a absorção de Sr, quando este foi utilizado em testes para avaliar a absorção de Ca em mulheres na pós-menopausa (Bolscher *et al.*, 1999; 2000). Os níveis corpóreos de ferro (Fe) podem aumentar na menopausa e, estudos sugerem que o Fe poderia exercer efeitos negativos ou positivos na DMO de animais e humanos (Harris *et al.*, 2003; Isomura *et al.*, 2004; Maurer *et al.*, 2005).

Não foram encontrados estudos avaliando os níveis normais de Sr em diferentes fases da vida reprodutiva da mulher, ou sua relação com o estado hormonal e com a densidade mineral óssea. Também são escassos os estudos da influência da terapia de reposição hormonal sobre o estado oxidativo.

Assim, o presente estudo teve por objetivo avaliar a relação da menopausa e da terapia de reposição hormonal com as defesas antioxidantes naturais, os níveis sanguíneos de estrôncio e ferro, e o metabolismo ósseo em mulheres na pré e pós-menopausa. Nessa perspectiva, os objetivos específicos foram:

→ Avaliar a influência da menopausa e da terapia de reposição hormonal sobre a atividade das enzimas antioxidantes glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase, e os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

→ Determinar os níveis sanguíneos de estrôncio e ferro e investigar a sua relação com a densidade mineral óssea e parâmetros bioquímicos do metabolismo ósseo, função renal e hepática.

→ Investigar a influência da idade, tempo de menopausa, níveis de estradiol e hormônio folículo estimulante, terapia de reposição hormonal, número de partos, tempo de aleitamento, ingestão de cálcio, atividade física, hematócrito e o índice de massa corporal, sobre os níveis sanguíneos de estrôncio e ferro em mulheres.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A menopausa

A menopausa é uma condição fisiológica definida como o término permanente da menstruação, devido à perda da função folicular ovariana. Clinicamente a menopausa é diagnosticada após doze meses de amenorréia. A determinação da idade de menopausa é difícil devido à variabilidade individual e populacional. Contudo, estima-se que ocorra em média aos 51 anos de idade (Greendale *et al.*, 1999; Miquel *et al.*, 2006).

O ciclo menstrual raramente cessa de forma abrupta, sendo a transição menopáusica (perimenopausa) o período durante o qual ocorre ampla flutuação nos perfis hormonais marcando a transição da fase reprodutiva para a não reprodutiva (Greendale *et al.*, 1999; Miller & Franklin, 1999). Tendências teóricas destacam que a perimenopausa precede a menopausa em dois a oito anos. As representações, fisiológica e clínica da perimenopausa, não estão completamente compreendidas. Estudos propõem que ela iniciaria quando os sistemas neurohormonais que modulam a ovulação tornam-se desregulados e que subsequentemente ocorreriam alterações nos ciclos menstruais (Greendale *et al.*, 1999).

Na bioquímica clínica as alterações hormonais típicas que acontecem após a menopausa, em comparação com mulheres que ainda ovulam, são as reduções dos níveis séricos de 17- β -estradiol (E_2), comumente referido como estrogênio ou estrógeno, e aumento dos níveis séricos do hormônio folículo estimulante (FSH) (Burtis & Ashwood, 1996).

Certos parâmetros bioquímicos também se encontram alterados na menopausa. Estudos mostram que os níveis de ferro (Fe) no corpo aumentam na pós-menopausa (Berge *et al.*, 1994; Naimark *et al.*, 1996), existindo uma associação positiva entre o índice de massa corporal (IMC) e os estoques de Fe (Milman & Kirchoff, 1999; Kim *et al.*, 2000; Milman *et al.*, 2000), bem como entre o IMC

(Beksinska *et al.*, 2005) e o Fe (Harris *et al.*, 2003; Maurer *et al.*, 2005), com a densidade mineral óssea (DMO) em mulheres. Contudo, os níveis corpóreos de Fe podem diminuir, não só devido à má alimentação (Cook, 1990), mas também em decorrência de atividade física intensa (Naimark *et al.*, 1996) e do processo menstrual induzido (Penchkofer & Schwertz, 2000). McPherson *et al.* (1978), avaliando o efeito da idade, sexo e outros fatores em parâmetros bioquímicos no sangue humano, observaram que os níveis de creatinina tendem a aumentar com o envelhecimento, enquanto o cálcio e a albumina tendem a diminuir progressivamente. Algumas dessas alterações ocorrem em mulheres, aproximadamente aos 50 anos, podendo ser atribuídas às alterações hormonais.

2.2 Estrogênio e hormônio folículo estimulante

Estrogênios incluem vários grupos de compostos que diferem na estrutura química e propriedades em geral, mas tem em comum sua função biológica: estimulação do desenvolvimento e manutenção de características sexuais femininas (Miller & Franklin, 1999). Junto com a progesterona (uma progestina), participam da regulação do ciclo menstrual e da manutenção da gravidez (Burtis & Ashwood, 1996). Os receptores para estrogênio são abundantes em todo o corpo (Cecil, 1997), e os compostos com atividade estrogênica também exercem efeitos extragenitais como na distribuição da gordura corporal, síntese hepática de algumas proteínas (proteínas plasmáticas e efeito anabolizante geral), no metabolismo mineral, etc. (Burtis & Ashwood, 1996; Silva, 1998). Nos ossos, os efeitos dos estrogênios são benéficos, pois diminuem a reabsorção e aumentam a formação óssea na puberdade (Burtis & Ashwood, 1996).

Segundo Miller & Franklin (1999), os estrogênios podem ser classificados de acordo com sua estrutura química (esteroidal ou não esteroideal) ou ocorrência (natural ou sintético). Estrogênios esteróides naturais são o 17 β -estradiol, estrona e estriol; e ainda os estrogênios eqüinos que incluem equilino e equilinino; alguns dos metabólitos desses estrogênios são chamados de estrogênios conjugados. Os estrogênios sintéticos incluem esteroidais como o diacetato de 16- α -hidroxiesterona, etinil-estradiol e metoxi-etinil-estradiol (mestranol). Estrogênios sintéticos não

esteroidais incluem diestilbestrol, hexestrol, dinestrol, estilbenos e alguns outros agentes terapêuticos, que podem exibir capacidade estrogênica sob certas circunstâncias, como os glicosídeos cardíacos (Silva, 1998). O estradiol é o mais potente estrogênio de ocorrência natural. Derivado quase que exclusivamente dos ovários, sua dosagem no soro ou no plasma, é considerada suficiente para a avaliação da função ovariana (Burtis & Ashwood, 1996). Ademais, tanto o estradiol quanto qualquer outro estrogênio tem a capacidade de se ligar ao receptor no citosol da célula-alvo. Por isso, freqüentemente, o termo estrogênios ou estrógenos é genericamente utilizado para referi-los (Silva, 1998).

Devido a funções regulatórias do estrogênio em vários órgãos e sistemas, o déficit deste hormônio provoca reações fisiopatológicas responsáveis pelos sintomas característicos da menopausa como ondas de calor, disfunções urogenitais, atrofia e secura vaginal, perda da libido e depressão; bem como o aumento no risco de desenvolvimento de doenças crônicas como as cardiopatias e a osteoporose (Greendale *et al.*, 1999). Estudos sugerem, ainda, que a diminuição dos níveis circulantes de estrogênio poderia ser a responsável pelo aumento do estresse oxidativo em mulheres na menopausa (Gura, 1995; Trevisan *et al.*, 2001; Ke *et al.*, 2003; Bednarek-Tupikowaska *et al.*, 2004).

O hormônio folículo estimulante (FSH) é secretado pelas células gonadotróficas do lobo anterior da hipófise, com a função de controlar a atividade das gônadas. Este hormônio estimula o crescimento dos folículos ovarianos e, na presença do hormônio luteinizante, promove a secreção de estrogênios pelos folículos maduros e a ovulação. Na menopausa os níveis de FSH encontram-se mais elevados, pois a falência da produção de estrogênio elimina o efeito retroativo negativo sobre a hipófise (Burtis & Ashwood, 1996). Na perimenopausa, as concentrações de FSH podem ser altas, como na pós-menopausa, mas retornam as concentrações baixas, características da pré-menopausa, em ciclos ovulatórios subseqüentes. Assim, a dosagem de FSH no sangue não pode ser utilizada como diagnóstico de menopausa em mulheres que ainda menstruam (Greendale *et al.*, 1999). Recentemente, tem sido apontada uma correlação negativa entre os níveis de FSH e a densidade DMO em mulheres na pré (Sowers *et al.*, 2003) e perimenopausa (Sowers *et al.*, 2003; Khan & Syed, 2004; Beksinska *et al.*, 2005).

2.3 A terapia de reposição hormonal

A terapia de reposição hormonal (TRH) consiste na administração exógena de hormônios sexuais femininos, sendo efetiva para compensar os efeitos da queda na produção de estrogênios após a menopausa. A terapia hormonal é uma intervenção complexa, que pode provocar efeitos positivos e alguns efeitos prejudiciais à saúde, e ainda controversos, como a hiperplasia e desenvolvimento de câncer endometrial e câncer de mamas (Greendale, *et al.*, 1999).

As terapias de reposição hormonal podem ser prescritas como terapia de reposição de estrogênios (TER) ou uma combinação de estrogênio com uma ou várias progestinas (Miller & Franklin, 1999), entretanto, são genericamente chamadas de TRH. Os esquemas de administração da TRH são: seqüencial e continuado, sendo este último o mais utilizado, já que mimetiza o ciclo menstrual natural. As vias de administração são variadas, por via oral, transdérmica, cutânea e intravenosa dependendo da natureza do estrogênio na composição (Silva, 1998). As doses e o rumo da terapia hormonal variam de paciente para paciente. Comumente, as doses de estrogênios prescritas em associação com progesterona visam a prevenção de hiperplasia endometrial (Greendale, *et al.*, 1999).

Estudos têm demonstrado que a terapia com estrogênios ou estrogênio mais progesterona previne a osteoporose e reduz o índice de fraturas (WGWHII, 2002; Cauley *et al.*, 2003). Contudo, um estudo não observou diferença significativa no efeito da TRH, com estrogênio mais progesterona sobre a DMO em mulheres (PEPI, 1996). Segundo Liu & Muse (2005), o estrogênio seria o principal agente de atividade óssea na TRH e as progestinas teriam um efeito secundário. O tempo a partir do qual a terapia hormonal começa a proteger os ossos do risco de fraturas ainda não está determinado (Greendale, *et al.*, 1999). O estrogênio também se mostrou eficiente no alívio de sintomas urogenitais em mulheres recebendo terapia hormonal per cutânea e oral, sem exercer, no entanto, nenhum efeito detectável na função hepática (Dupont *et al.*, 1991). Em adição, estudos são contraditórios em relação à proteção exercida pelo uso de TRH contra o estresse oxidativo em mulheres menopausadas (Gurdol *et al.*, 1997; Özben *et al.*, 2001; Bureau *et al.*, 2002; Bednarek-Tupikowaska *et al.*, 2004; Naziroglu *et al.*, 2004; Signorelli *et al.*, 2005).

Baseado em estudos de observação populacional, mulheres na pós-menopausa, que utilizam terapia com hormônios, apresentam uma redução de 30-50% nas causas de mortalidade em relação as que não usam TRH. No entanto, é importante considerar as diferenças individuais (Greendale *et al.*, 1999).

2.4 Estresse oxidativo e menopausa

O estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio entre fatores oxidantes e antioxidantes, a favor dos oxidantes, prejudicando a integridade celular (Sies, 1985; 2000). A utilização do oxigênio pelos organismos aeróbios gera metabólitos reativos, mesmo em condições fisiológicas normais. Espécies reativas de oxigênio (EROs) são formadas e degradadas por organismos aeróbicos, sendo sua formação conduzida a concentrações fisiológicas, requeridas para a função celular normal, ou quantidades excessivas que levam ao aumento do estresse oxidativo (Nordberg & Arnér, 2001). As EROs incluem um grande número de moléculas quimicamente reativas e derivadas do oxigênio, como exemplo o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil ($\cdot OH$). As moléculas anteriormente citadas e seu mecanismo de formação estão ilustrados na Figura 1.

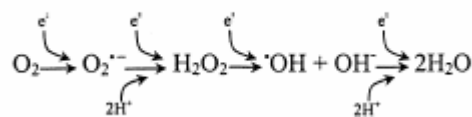


Figura 1 - Formação das espécies reativas de oxigênio, a partir do oxigênio molecular, com sucessivas transferências de elétrons (Nordberg & Arnér, 2001).

A produção das estruturas químicas intermediárias no metabolismo do oxigênio ameaça a integridade de várias biomoléculas como proteínas (Stadtman & Levine, 2000), lipídios e lipoproteínas (Ames *et al.*, 1993; Ylä-Herttuala, 1999), e ácido desoxirribonucleico (DNA) (Ames *et al.*, 1993; Marnett, 2000). Propõe-se que o estresse oxidativo esteja envolvido no processo de envelhecimento, tanto por induzir danos no DNA mitocondrial (Ames *et al.*, 1993; Cadenas & Davies, 2000; Finkel & Holbrook, 2000), quanto por outros mecanismos como influência na atividade antioxidante celular natural (Kasapoglu & Özben, 2001; Ánal *et al.*, 2001). Estudos

também sugerem o envolvimento de EROs, no desenvolvimento de doenças como aterosclerose (Ross, 1993; Darley-Usmar *et al.*, 1997) e mais recentemente na osteoporose (Basu *et al.*, 2001).

As enzimas antioxidantes protegem as células aeróbicas e demais estruturas corporais de injúrias oxidativas causadas por EROs, geradas durante o metabolismo normal (Fridovich, 1978). Dentre elas estão superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GPx). A SOD exerce efeito protetor por detoxificar o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), num processo de dismutação, produzindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que pode ser reduzido por ação das enzimas CAT e GPx, formando água e liberando oxigênio (Ames *et al.*, 1993; Nordberg & Arner, 2001) (Figura 2).

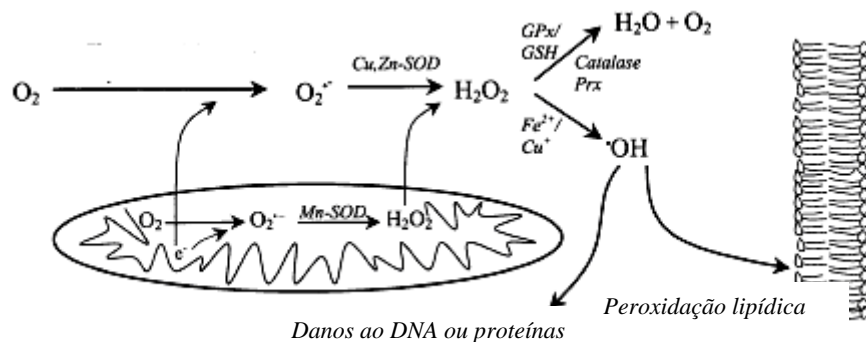


Figura 2 - Esquema simplificado não estequiométrico dos sistemas oxidante e antioxidante nas células (Nordberg & Arnér, 2001).

Estudos observaram uma diminuição nas atividades da SOD (Ínal *et al.*, 2001) e da GPx, e um aumento na peroxidação lipídica (Kasapoglu & Özben, 2001) em decorrência do envelhecimento humano. O desequilíbrio entre fatores pró e antioxidantes também tem sido envolvido nas mudanças fisiológicas subsequentes à menopausa, sendo observado nesta fase maiores danos oxidativos e alterações nas atividades das enzimas antioxidantes naturais (Gurdol *et al.*, 1997; Bednarek-Tupikowaska *et al.*, 2001; Özben *et al.*, 2001; Bednarek-Tupikowaska *et al.*, 2004; Signorelli *et al.*, 2005). Sugere-se que a diminuição na síntese de estrogênio poderia ser a responsável pelo aumento no estresse oxidativo em mulheres na pós-menopausa (Gura, 1995; Trevisan *et al.*, 2001; Ke *et al.*, 2003; Bednarek-Tupikowaska *et al.*, 2004). Em virtude disto, tem sido observado um efeito protetor

da TRH contra o estresse oxidativo em mulheres menopausadas (Özben *et al.*, 2001; Bednarek-Tupikowaska *et al.*, 2004; Naziroglu *et al.*, 2004).

O estrogênio (Figura 3) contém um grupo fenol que pode ser efetivo na remoção de radicais hidroxil, resultando em produtos hidroxilados (Haliwell & Grootveld, 1987). Além do mais, evidências consideráveis têm mostrado que o estrogênio diminui a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e o estresse oxidativo *in vitro* e *in vivo* (Huber *et al.*, 1989; Subbiah *et al.*, 1993; Ayers *et al.*, 1998; Thibodeau *et al.*, 2002; Bednarek-Tupikowaska *et al.*, 2004). Contudo, existem relatos de desenvolvimento de carcinomas, estimulado pelo estrogênio, e esse efeito genotóxico poderia estar relacionado à geração de radicais livres durante sua metabolização até catecol estrogênios e, subseqüentemente, até quinonas (Liehr, 1990; Toniolo *et al.*, 1995; Cao *et al.*, 1998).

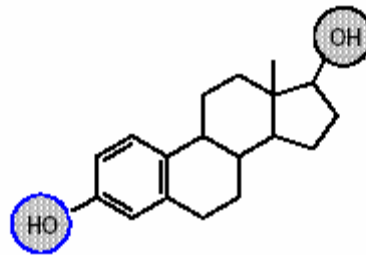


Figura 3: Estrutura química do estradiol.

Estudos avaliando a influência da TRH na atividade das enzimas antioxidantes em mulheres na menopausa ainda são limitados, principalmente no que se refere à metodologia, população e o tempo de terapia. Bednarek-Tupikowaska *et al.* (2004), detectaram que existe uma correlação negativa entre o estradiol endógeno e a formação de lipoperóxidos (LPO) no soro e, uma associação positiva entre a concentração deste hormônio e a atividade da GPx no eritrócito de mulheres na pré-menopausa em comparação com mulheres na pós-menopausa. Sugerindo a hipótese de que o estradiol exerce ação antioxidante, não apenas por sua estrutura química, mas provavelmente devido a sua influência na atividade das enzimas antioxidantes naturais das células. Outros estudos também observaram diminuição nos níveis, plasmático e eritrocitário, de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e, um aumento nos níveis de glutatona reduzida (GSH), e da

atividade eritrocitária e plasmática da GPx (Özben *et al.*, 2001; Naziroglu *et al.*, 2004) e da CAT (Naziroglu *et al.*, 2004) em mulheres na pós menopausa com TRH. Contrariando os trabalhos anteriores, Bureau *et al.* (2002) não apontaram diferença na atividade eritrocitária da GPx e da SOD entre mulheres na pós menopausa com e sem TRH.

Strehlow *et al.* (2003), constataram que o estradiol aumentou a expressão da SOD *in vitro* e *in vivo*, aparentemente devido à ativação do receptor de estradiol. Eles também demonstraram que esse efeito do estradiol é seletivo para a SOD, sem mudanças na expressão da GPx e CAT. Suportando essa proposta, um estudo recente demonstrou que o estradiol antagoniza a redução da atividade da SOD mitocondrial em ratas ooforectomizadas (Feng & Zhang, 2005). Com relação a progesterona, hormônio utilizado na TRH combinada, estudos demonstraram que esse hormônio aumentou a atividade da SOD no endométrio humano, enquanto que o estrogênio teve um efeito brando (Sugino *et al.*, 2002).

Ainda que a suplementação com estrogênio possa atenuar os sintomas da menopausa e executar função na prevenção de doenças coronarianas e da osteoporose (Miller & Franklin, 1999), existem controvérsias quanto a seu efeito pró ou antioxidante (Huber *et al.*, 1989; Liehr, 1990; Subbiah *et al.*, 1993; Toniolo *et al.*, 1995; Ayers *et al.*, 1998; Cao *et al.*, 1998; Bednarek-Tupikowaska *et al.*, 2004).

2.5 Metabolismo ósseo e menopausa

O tecido ósseo é composto basicamente de células: os osteoblastos (responsáveis pela formação óssea) e os osteoclastos (responsáveis pela degradação óssea); e pela matriz extracelular, que é estruturada em uma porção mineral (cálcio e fosfato formando os cristais de hidroxiapatita) e matriz orgânica (colágeno tipo I). Embora as células ósseas representem uma fração de menor importância quanto ao volume dos ossos, elas regulam a distribuição dos componentes inorgânicos (homeostasia mineral) e a reabsorção e a formação contínua da matriz óssea (homeostasia esquelética) (Burtis & Ashwood, 1996). O equilíbrio entre a reabsorção e a formação óssea é mantido por mecanismos regulatórios complexos envolvendo fatores locais e sistêmicos que atuam sob as

células ósseas, como hormônios reguladores do cálcio (Ca), hormônios sexuais, fatores de crescimento e citocinas (associadas ao sistema imune). A habilidade e o número de células ósseas ativas determinam a produção de proteínas da matriz óssea, enquanto outros mecanismos intrínsecos e ainda não completamente esclarecidos determinam a mineralização e formação da microestrutura (Akesson, 2003).

O Ca é encontrado em três compartimentos corporais principais: ossos, tecidos moles e líquido extracelular. No sangue, virtualmente, todo o Ca está no plasma, na forma livre (50%), ligado a proteínas (40%, sendo que destes 80% ligado à albumina e os 20 % restantes a globulinas) e complexado (10%). O Ca plasmático origina-se tanto da absorção no intestino delgado quanto da reabsorção dos ossos, sendo mantido sempre sobre um controle homeostático (Cohen & Roe, 2000). Os métodos utilizados para a dosagem de cálcio dosam o Ca livre (ionizado) ou total. A fosfatase alcalina (ALP) é frequentemente utilizada como um marcador sérico da formação óssea (Burtis & Ashwood, 1996).

A densidade mineral óssea (DMO) está relacionada à resistência óssea (Mazess, 1982), e pode ser medida por sistemas comerciais de absorciometria de duplo feixe de raios-X (DEXA). A densitometria óssea permite precisar a avaliação da mineralização dos ossos e é útil para diagnosticar a osteoporose e monitorar o tratamento (Burtis & Ashwood, 1996). As imperfeições na microestrutura e diminuição na massa óssea são características da osteoporose que é uma doença universal e mais acentuada em mulheres (Hich & Kerstetter, 2000). A apresentação clínica mais comum da osteoporose é a fratura por esmagamento dos corpos vertebrais, fratura do quadril ou do antebraço (Burtis & Ashwood, 1996), determinantes para a morbidez, desintegração social e até mesmo a morte. A diminuição na massa óssea é um importante fator de risco para ocorrência de fraturas ósseas após um leve traumatismo. Para diagnosticar o grau de dano ósseo com a utilização da densidade óssea, faz-se uma comparação entre a medida da DMO do paciente com o pico de massa óssea estimado para um adulto jovem (20 a 30 anos) e saudável, de mesmo sexo e etnicidade. Com isso, se estabelece o escore-T, mais detalhado no Quadro 1 (WHO, 1994).

Categoria	Critério (expresso como escore-T)
<i>Normal</i>	DMO de até 1 desvio-padrão abaixo da média do pico de DMO de um adulto jovem (escore-T, 0 a -1)
<i>Osteopenia Sem risco de fraturas</i>	DMO entre 1 e 2,5 desvios-padrão abaixo da média do pico de DMO de um adulto jovem (escore-T, -1 a -2,5)
<i>Osteoporose Com risco de fraturas</i>	DMO \geq 2,5 desvios-padrão abaixo da média do pico de DMO de um adulto jovem (escore-T, \geq -2,5)

Quadro 1. Critério para o diagnóstico de osteoporose segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 1994). DMO = Densidade mineral óssea.

A etiologia patológica da osteoporose é multifatorial, relacionada com a idade, sexo, genética e fatores ambientais e sócio-econômicos (Akesson, 2003). Os fatores genéticos são muito relevantes na patogênese da osteoporose, pois são considerados os determinantes da massa óssea (Ralston, 1997). O pico da massa óssea atingido na maturidade esquelética (em média 30 anos de idade) também pode sofrer influência hormonal da ingestão de Ca (Hich & Kerstetter, 2000). A deficiência de estrogênios na menopausa e o processo de envelhecimento são considerados fatores de risco para a osteoporose (Seeman *et al.*, 1989; Minisola, *et al.*, 1998; Miller & Franklin, 1999). A relação existente entre a menopausa e a osteoporose é baseada no número de fraturas após a menopausa, na diminuição da densidade mineral óssea, e na redução de fraturas em mulheres que fazem uso de terapias com hormônios na menopausa (Greendale, *et al.*, 1999). Outros fatores, quando associados, também podem contribuir para a perda óssea. Dentre eles destacam-se a mobilidade física muito intensa ou imobilização, o tempo de menopausa e a multiparidade (Cohen & Roe, 2000; Reginster, 2004).

Durante a formação dos ossos, os estrogênios promovem o aumento da matriz proteica e a incorporação de cálcio e fósforo. Os efeitos dos estrogênios dão-se diretamente nos ossos, por meio de receptor no citosol e dos efeitos na rede de colágeno, bem como efeito indireto através da oposição aos efeitos reabsortivos do hormônio paratireóide (PTH). Em razão disto, a queda acelerada na massa óssea, devido ao hipoestrogenismo, é mediada por diversos mecanismos. E pode-se dizer que a causa principal é a reabsorção óssea aumentada (atividade osteoclástica) que ultrapassa os limites e fica em desequilíbrio com a osteogênese (atividade osteoblástica) (Turner *et al.*, 1994). Estudos demonstram que a ação do estrogênio

seria mediada por um receptor de estrogênio presente nas células ósseas, implicando na sua função no metabolismo ósseo (Mano *et al.*, 1996; Mitra *et al.*, 2006). Existem evidências da presença de receptores de estrogênio ligados ao transporte do Ca no intestino humano (Arjmandi *et al.*, 1993). Destaca-se que a menor absorção do Ca, em decorrência do processo menopausal, é mais um agravante para a perda óssea, pois resulta no balanço negativo de Ca, levando a retirada deste mineral do osso para manter a homeostase sanguínea (Gallagher *et al.*, 1979; 1980).

Viu-se que os níveis de FSH aumentam na menopausa, uma vez que não se tem o efeito retroativo do estrogênio. Estudos observaram que os níveis circulatórios de FSH ($\geq 25,8$ mIU/mL) estavam associados com uma diminuição progressiva na DMO (Beksinka *et al.*, 2005) e com o aumento de marcadores da atividade de renovação óssea em mulheres na perimenopausa (Khan & Syed, 2004).

Tem sido demonstrado que o Fe é um importante mineral para as células, incluindo os osteoblastos (Pareiman *et al.*, 2006). O Fe é um dos elementos traços mais abundantes no corpo humano (Linder, 1991) e o término dos processos menstruais pode promover o aumento nos estoques de Fe (ferritina) (Berge *et al.*, 1994; Naimark *et al.*, 1996). Estudos verificaram que o excesso de Fe na dieta acumularia nos osso e poderia estar envolvido na patogênese da osteoporose em ratas na pós-menopausa (Isomura *et al.*, 2004). No entanto, um aumento na ingestão de Fe (>20 mg) foi associado a uma melhora na DMO em mulheres com uma ingestão de Ca de 800-1200 mg/dia e em mulheres com uso de TRH (Harris *et al.*, 2003; Maurer *et al.*, 2005).

No momento atual, não é possível reverter à osteoporose estabelecida. Entretanto, a intervenção precoce consegue evitar o seu desenvolvimento e a intervenção tardia pode deter a progressão do distúrbio uma vez desenvolvido, evitando o risco de fraturas. Em geral, os agentes farmacológicos diminuem a reabsorção óssea promovendo secundariamente o ganho de massa óssea ou são de efeito anabólico e produzem aumento direto na massa óssea. Atualmente, os tratamentos para osteoporose incluem a suplementação da dieta com cálcio e vitamina D, os tratamentos adicionais com estrogênios (TRH), calcitonina, bisfosfonatos, fluoretos, moduladores seletivos de estrogênio e mais recentemente o Ranelato de Estrôncio (Protelos[®]) (Akesson, 2003; Marie, 2006). A maioria dos estudos sobre o efeito da TRH (estrogênio ou estrogênio mais progesterona)

demonstraram aumento na DMO dos ossos do quadril e espinha dorsal de 1-4% (Greendale *et al.*, 1999). O ranelato de estrôncio é um sal de ácido ranéico divalente, contendo dois átomos de estrôncio estável por molécula, agindo simultaneamente na inibição da reabsorção e na estimulação da formação óssea (Meunier, 2001).

2.6 O Estrôncio (Sr)

Os elementos traço podem estar envolvidos no metabolismo humano e tem crescido o interesse por seus papéis nos processos fisiológicos. Em biologia e patologia humana o Sr tem chamado menos atenção que outros dois importantes metais divalentes, ou seja, Ca e magnésio (Mg), sendo mais um objeto de estudo acadêmico do que de interesse clínico. Embora isso seja verdade, o interesse no papel biológico do Sr aumentou após o desenvolvimento da droga ranelato de estrôncio como agente antiosteoporótico (Nielsen, 2004).

O Sr é um metal alcalino terroso, utilizado industrialmente em tubos de raios catódicos de televisores em cores, pirotecnia, no refinamento do zinco, dessulfurização do aço, cerâmicas, pigmentos para pintura, lâmpadas fluorescentes, radiologia e medicamentos (ATSDR, 2004).

A população em geral está exposta ao Sr através do ar, água e alimentos. A Agência de Proteção Ambiental norte americana (Environmental Protection Agency – EPA) estabelece uma dose de 0,6 mg Sr/ kg de peso corporal/dia (que equivale a 42 mg de Sr por dia para uma pessoa de aproximadamente 70 kg), como sendo a quantidade de Sr estável que pode ser ingerida diariamente sem causar efeitos prejudiciais à saúde de adultos e crianças (ATSDR, 2004). A ingestão de Sr por humanos, via alimentos e água, caracteriza a presença natural de pequenas quantidades fisiológicas deste elemento nos tecidos moles, sangue e ossos (ATSDR, 2004). Uma dieta normal pode conter de 2 a 4 mg Sr/dia, na maioria derivado de alimentos vegetais (Nielsen, 2004). Comar *et al.* (1964 apud NIELSEN, 2004, p. 584), observaram que a razão Ca/Sr nos tecidos e fluidos corporais reflete a razão Ca/Sr da dieta e estudos demonstram que a concentração de Sr no sangue humano pode estar na faixa de 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Burguera *et al.*, 1999; Azparren *et al.*, 2000).

O Sr, o Ca e o Mg, formam cátions divalentes nos fluidos biológicos e tem diversos graus de ligação a proteínas plasmáticas, observando-se que o Sr e o Ca competem pela ligação às proteínas no soro ou no plasma (Walser, 1969, apud NIELSEN, 2004, p. 583) e compartilham de propriedades químicas e fisiológicas similares (Delmas, 1992; Devine *et al.*, 1993). Torna-se aparente por estudos em animais que o Sr pode substituir o Ca em muitos processos biológicos como a contração muscular e coagulação sanguínea, que são promovidos tanto pelo Ca quanto pelo Sr, mas no caso deste último em menor grau (Nielsen, 2004).

Considerado um metal traço no corpo humano, o Sr está distribuído no plasma, fluído extracelular e tecidos moles (El Solh & Rousselet, 1981), mas a maior parte do Sr do corpo está localizada nos ossos (Shoroeder *et al.*, 1972). Em animais, a incorporação do Sr nos ossos é diretamente relacionada à dose administrada, aos níveis plasmáticos de Sr, ao tempo de exposição e a renovação óssea (Dahl *et al.*, 2001).

Normalmente a discriminação entre o Ca e o Sr, ocorre em condições fisiológicas, na absorção gastrintestinal, excreção renal, transferência placentária e na secreção mamária (Comar *et al.*, 1969, apud NIELSEN, 2004, p. 584). Geralmente, o Sr é menos absorvido que o Ca no trato gastrintestinal, o que pode ser atribuído ao menor peso molecular do Ca (Waserman *et al.*, 1961, apud NIELSEN, 2004, p. 585). Sabe-se também que a vitamina D aumenta a absorção intestinal de Sr e que o excesso de Ca, em relação ao Sr ingerido, pode inibir a absorção do Sr. Além do mais, a absorção intestinal de Sr em ratos, teve uma correlação negativa com a idade (Marcus & Lengermann, 1962, apud NIELSEN, 2004, p. 585). Entretanto, não se tem conhecimento de estudos desse efeito em humanos. Ao contrário do Ca, o Sr não está sobre controle homeostático, e a quantidade total de Sr no corpo e no sangue é constantemente controlada por um mecanismo de retrocontrole (*feedback*). No entanto, isso não exclui a possibilidade de que os níveis de Sr possam ser influenciados pelo Ca e por hormônios (Nielsen, 2004).

O Sr (200 mL de solução teste com 2,5 e 5,0 mmol SrCl₂), tem sido utilizado para avaliar a absorção intestinal de Ca em mulheres recebendo estradiol (2 mg/dia), devido a possível estimulação do transporte ativo de Sr pelo hormônio (Bolsher *et al.*, 1999; 2000). De fato, estudos demonstram que a TRH aumenta a absorção gastrintestinal de Ca (Heaney *et al.*, 1978; 1997). No entanto, Bolsher *et al.* (1999;

2000) não observaram efeito do estradiol (2 mg/dia, doses maiores que a fisiológica), na absorção intestinal de Ca avaliada pelo teste de absorção com Sr, em mulheres na pós-menopausa.

Não há relatos de toxicidade por superdose de Sr em humanos (Nielsen, 2004), entretanto, foi observado hipocalcemia, por aumento da excreção renal de Ca em ratos (Skoryna *et al.*, 1985; Morohashi *et al.*, 1994).

2.6.1 O estrôncio e o metabolismo ósseo

O Sr pode exercer um importante papel no metabolismo ósseo (Dow & Stanbury, 1960; Marie, 2006), devido sua grande afinidade e incorporação nos ossos por troca superficial ou substituição iônica (Likins *et al.*, 1959). Estudos com animais têm demonstrado, efeitos positivos e negativos do Sr sobre o metabolismo ósseo, sendo estes dependentes da dose utilizada, do cálcio da dieta, da função renal, da espécie animal utilizada, do sexo e da parte do esqueleto analisada no experimento (Dahl *et al.*, 2001; Marie *et al.*, 2001).

Estudos avaliando os efeitos do Sr nas células ósseas *in vitro*, sugerem que este elemento inibe diretamente o recrutamento e a atividade dos osteoclastos, reduzindo a reabsorção; e aumenta a replicação pré-osteoblástica e a síntese de colágeno, fornecendo um mecanismo para o aumento na formação óssea (Marie *et al.*, 2001) (Figura 4). Existem evidências experimentais *in vivo* de que a administração de Sr em doses baixas (4 nmol/kg/dia) reduz a reabsorção e estimula a formação óssea (Matsumoto, 1976; Ferraro *et al.*, 1983; Reinholt *et al.*, 1984; Canalis *et al.*, 1996), resultando no aumento da massa óssea sem causar danos a mineralização dos ossos de animais (Marie *et al.* 1985; Marie & Hott, 1986; Grynepas & Marie, 1990; Grynepas *et al.*, 1996) e sugerindo o efeito benéfico do Sr no tratamento da osteoporose. Confirmando tais hipóteses, estudos em mulheres brancas e menopausadas, tratadas com ranelato de estrôncio (517 mg Sr²⁺/dia) (Meunier *et al.*, 2002) e em pacientes osteoporóticos (McCaslin & Janes, 1959), constataram um aumento na densidade mineral óssea da espinha lombar e coluna vertebral, respectivamente. Em análises de parâmetros bioquímicos em animais com osteopenia, o ranelato de Sr aumentou a atividade da fosfatase alcalina, refletindo uma maior formação óssea (Marie *et al.*, 2001). Estudos demonstraram que o lactato

de Sr (Shorr & Carter; 1952 apud MARIE *et al.*, 2001, p. 124) aumentou a retenção de cálcio nos ossos e houve uma redução na incidência de fraturas em pacientes osteoporóticos, recebendo o ranelato de estrôncio (Meunier *et al.*, 2004), o que poderia ser uma explicação plausível à hipótese de que uma deficiência de Sr poderia estar relacionada a fraturas por osteoporose. Contudo, estudos ósseos, avaliando os efeitos do Sr em pacientes não osteoporóticos ainda são escassos. (Nielsen, 2004).

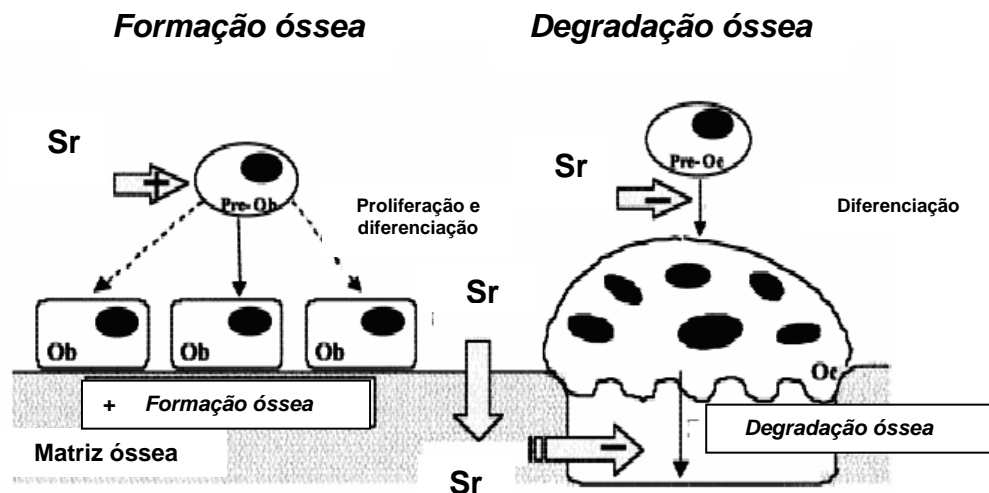


Figura 4 - Mecanismo de ação do estrôncio nas células ósseas. O estrôncio estimula a replicação pré-osteoblástica, levando a um aumento na síntese da matriz óssea. Por outro lado, o estrôncio inibe a diferenciação e a atividade osteoclástica. Pré-Ob: pré-osteoblastos; Ob: osteoblastos; Pré-Oc: pré-osteoclastos; Oc: osteoclastos; +: efeito estimulatório; -: efeito inibitório. (Marie *et al.*, 2001).

Altas doses de Sr (maiores que 4 nmol/kg/dia) podem prejudicar o metabolismo ósseo, e os efeitos prejudiciais do Sr na mineralização óssea podem ser devido à redução na absorção intestinal do Ca (Neufeld & Boskey, 1994) ou a substituição do Ca pelo Sr na apatita (Grynpas & Marie, 1990; Grynpas *et al.*, 1996), bem como a alterações na matriz cartilaginosa (Reinholt *et al.*, 1985). Foi observada uma redução de 13% do Ca no soro de ratas, jovens recebendo uma dose oral alta de carbonato de Sr (Morohashi *et al.*, 1994).

Em ratos de ambos os sexos recebendo 110 mg de cloridrato de Sr/dia, observou-se um aumento no número de eritrócitos (ATSDR, 2004). A mineralização óssea em ratos com falência renal crônica foi prejudicada pela administração de Sr (200 mg/kg/dia) (Oste *et al.*, 2005), sugerindo que a diminuição na função renal em mulheres na pós-menopausa poderia aumentar a concentração de Sr nos ossos e promover osteomalácias. Não foram localizados estudos avaliando os efeitos

hepáticos e renais do Sr em humanos. Adicionalmente, tem sido sugerido que o excesso do Sr nos ossos, devido à falência renal crônica, pode ser em parte responsável por prejuízos na mineralização óssea, observados nesses pacientes (Blumenthal & Posner, 1984; appud MARIE *et al.*, 2001, p. 125).

Ainda existe uma necessidade de maiores informações sobre a relação entre o Sr e o metabolismo ósseo, bem como sobre a renovação do Sr nos ossos em diferentes fases da vida e a relação entre variações nos níveis sanguíneos deste metal e as alterações no metabolismo ósseo em populações não expostas ou tratadas.

3 ARTIGOS CIENTÍFICOS

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigos científicos, os quais se encontram aqui organizados. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprios artigos. As apresentações dos artigos estão baseadas na versão final de impressão (**Artigo 1**) e na versão para submissão (**Artigo 2**). Em anexo (**Anexo 1**) encontra-se o roteiro para a edição do artigo número dois, que será submetido à publicação na Revista Maturitas.

3.1 Artigo 1

INFLUENCE OF HORMONE REPLACEMENT THERAPY ON BLOOD ANTIOXIDANT ENZYMES IN MENOPAUSAL WOMEN

Artigo no prelo na Revista *Clinica Chimica Acta*

Available online at www.sciencedirect.com

Clinica Chimica Acta xx (2006) xxx – xxx

www.elsevier.com/locate/clinchim

Influence of hormone replacement therapy on blood antioxidant enzymes in menopausal women

Taís C. Unfer^a, Greicy M.M. Conterato^a, João C.N. da Silva^b,
Marta M.M.F. Duarte^a, Tatiana Emanuelli^{c,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

^b Departamento de Clínica Médica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

^c Núcleo Integrado de Desenvolvimento em Análises Laboratoriais (NIDAL), Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

Received 30 November 2005; received in revised form 9 January 2006; accepted 11 January 2006

Abstract

Background: Natural loss of estrogen occurring in menopausal process may contribute to various health problems many of them possibly related to oxidative stress. Hormone replacement therapy (HRT) is the most common treatment to attenuate menopausal disturbances. This study was aimed at evaluating the influence of HRT on the activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, SOD; catalase, CAT; and glutathione peroxidase, GPx) and lipid peroxidation (thiobarbituric acid reactive substances, TBARS) in menopausal women.

Methods: Blood antioxidant enzyme activities were determined in premenopausal ($n=18$) and in postmenopausal healthy women without ($n=21$) or with ($n=19$) HRT (mean ages: 47, 59, and 57 years, respectively).

Results: TBARS, CAT, and GPx activity were not significantly different among the groups of study. However, SOD activity was significantly lower in postmenopausal women without HRT (0.68 ± 0.04 U/mg Hb) when compared both to premenopausal women (0.91 ± 0.04 U/mg Hb) and to postmenopausal women with HRT (0.89 ± 0.07 U/mg Hb). SOD activity was positively correlated to the duration of HRT in the postmenopausal groups ($r=0.33$, $p<0.05$).

Conclusions: HRT antagonizes the decrease of SOD activity that occurs after menopause, suggesting that HRT may play a beneficial role in the protection against oxidative stress.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Menopause; Hormone replacement therapy; Catalase; Glutathione peroxidase; Superoxide dismutase; Thiobarbituric acid reactive substances

1. Introduction

Menopause is a physiological process that occurs in healthy women usually between 50 and 55 years old [1]. This process is associated with a decrease in circulating

estrogen levels (E_2), an increase in follicle stimulating hormone levels (FSH) and interruption of ovarian function and menstrual bleeding. Some studies indicate that the natural loss of estrogen may contribute to an increased risk of cardiovascular disease after menopause, and increasing health problems such as osteoporosis, hot flashes, depression, and neurodegenerative diseases such as Alzheimer [2,3]. Among the therapeutic agents available to attenuate some health problems mentioned above, hormone replacement therapy (HRT) is the most commonly used [3,4].

Although estrogens may attenuate menopausal symptoms and play a major role in the prevention of osteoporosis and coronary heart disease, there is controversy concerning

Abbreviations: ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BMI, body mass index; CAT, catalase; E_2 , 17 β -estradiol; FSH, follicle-stimulating hormone; GPx, glutathione peroxidase; Hct, hematocrit; HRT, hormone replacement therapy; MDA, malondialdehyde; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced; SOD, superoxide dismutase; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances.

* Corresponding author. Tel.: +55 55 3220 8547; fax: +55 55 3220 8353.

E-mail address: tati@ccr.ufsm.br (T. Emanuelli).

0009-8981/\$ - see front matter © 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.cca.2006.01.006

their pro- and antioxidant effects [5–8]. Estrogen contains a phenol ring that can effectively scavenge hydroxyl radicals, giving rise to hydroxylated products [9]. Besides, considerable evidence have shown that estrogen decreases the production of reactive oxygen species (ROS) and oxidative stress both in vitro and in vivo [10–13]. Hence, the decrease in estrogen synthesis in postmenopausal women is thought to be responsible for enhanced oxidative stress [13–16]. However, there is a known relationship between endometrial adenocarcinoma and the chronic presence of an estrogenic stimulus that is not balanced by progesterone secretion [17]. The genotoxic effect of estrogen has been related to the generation of free radicals during its metabolism to catechol estrogens and subsequently to quinones [18,19].

Antioxidant enzymes protect aerobic cells against the oxidative injury caused by ROS that are generated during normal metabolism [20]. Either an overproduction of ROS or a deficiency in enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems may result in oxidative stress, which is considered responsible for a number of pathological conditions in humans and also for the aging process [21,22]. Oxidative stress has also been implicated in physiological changes occurring after menopause, as increased oxidative damage and changes in antioxidant enzymes have been observed in this phase [13,23–25]. However, studies evaluating the influence of HRT on antioxidant enzyme activities in postmenopausal women are limited (GPx [26], SOD and GPx [27], CAT and GPx [28]), and one of these studies [28] refers to a small period of HRT (6 weeks). In order to determine if HRT influences blood antioxidant enzymes and lipid peroxidation we evaluated the activity of superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPx), and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in the blood of premenopausal and postmenopausal healthy women without or with HRT.

2. Materials and methods

2.1. Human subjects

Subjects were recruited among women patients of Rheumatology Ambulatory from Santa Maria University Hospital. This study was approved by the local Ethics Committee (CEP/CCS/UFMS no. 152/2004) and all the women gave their informed consent prior to the inclusion in the study. Subjects were given a short questionnaire to obtain information about race, age, menopause state, smoking, alcohol consumption, physical exercise, HRT, and diagnosed diseases. Women with case history of alcoholism, smoking, diabetes, and thyroid chronic disease are excluded. Fifty-eight women were included in the study and divided into 3 groups: premenopausal women ($n=18$), postmenopausal women without HRT ($n=21$) and postmenopausal women with HRT ($n=19$). Premenopausal

women were those with regular menses, while postmenopausal women were those >12 months of amenorrhea. Women under HRT were taking conjugated estrogens (13), estradiol (1), or estrogen plus progestin (5).

2.2. Sample collection

Blood samples were taken from the cubical vein after overnight fasting. Heparinized blood was immediately used for aspartate and alanine aminotransferases (AST and ALT), creatinine, hemoglobin (Hb), and hematocrit (Hct) analysis, and the remaining blood was stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for no more than 1 week for analyses of antioxidant enzymes activity. Non-heparinized blood samples were centrifuged and the serum obtained was used for analyses of hormone and TBARS levels.

2.3. Biochemical and hematological parameters

AST, ALT, creatinine, and Hb were determined by routine kits (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Hct was also determined.

2.4. Hormone assays

Serum E_2 and FSH levels were determined by immunoassay with Immulite® Estradiol and Immulite® 2000 FSH kits (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA). The limits of quantification for the E_2 and FSH assays were 20 pg/ml and 0.10 mIU/ml, respectively.

2.5. Activity of blood antioxidant enzymes and TBARS

GPx activity was determined using glutathione reductase and NADPH. The method is based on the oxidation of NADPH, which is indicated by the decrease in absorbance at 340 nm [29]. SOD activity was determined spectrophotometrically [30] based on the ability of SOD to inhibit the autooxidation of adrenalin to adrenochrome at alkaline pH. Catalase activity was measured spectrophotometrically [31] using hydrogen peroxide as substrate. Serum TBARS levels were measured spectrophotometrically [32]. Absorbance of the supernatant was measured at 535 nm and TBARS concentration was calculated using a molar absorption coefficient of $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

2.6. Statistical analysis

Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Duncan's test when appropriate. Results are expressed as means \pm standard error (S.E.M.). The association between biochemical parameters, activity of antioxidant enzymes and characteristics of the three study groups were evaluated by Pearson's correlation for variables that had a normal distribution and by Spearman's rank order correlation for variables that did not exhibit a normal

ARTICLE IN PRESS

T.C. Unfer et al. / Clinica Chimica Acta xx (2006) xxx–xxx

3

Table 1
Characteristics of the study groups (means ± S.E.M.)

	Premenopausal women (n=18)	Postmenopausal women without HRT (n=21)	Postmenopausal women with HRT (n=19)
Age (years)	47.1 ± 1.1 ^a	59.7 ± 1.1 ^b	57.5 ± 1.1 ^b
Duration of menopause (months)	0 ^a	174 ± 19 ^b	143 ± 13 ^b
Duration of HRT (months)	0 ^a	0 ^a	83.0 ± 15.8 ^b
BMI	26.1 ± 0.9	26.0 ± 0.9	25.4 ± 1.1

Different letters within the line indicate significant differences among groups ($p < 0.05$).

distribution. SOD activities of estrogen-alone group and estrogen plus progesterone group were compared using Mann–Whitney test. Data were analyzed using the Statistica® 6.0 software system (Statsoft Inc., 2001).

3. Results

Characteristics of the study subjects are shown in Table 1. The mean age of premenopausal group was significantly lower than mean age of postmenopausal groups, but no difference was observed between both postmenopausal groups. The state in menopause and HRT were used to classify the patients. No significant difference was observed in the duration of menopause of both postmenopausal groups. Women of the HRT group had an average of 83 months of hormone therapy. No significant difference in the body mass index (BMI) was observed among groups.

As expected, serum E₂ levels were significantly higher in premenopausal than in postmenopausal groups, while FSH levels were lower (Table 2). However, no significant difference was observed between both postmenopausal groups. AST, ALT, creatinine, and Hct, which are indicators of hepatic, renal, and blood disturbances, were within the normal range and were not significantly different among the three groups of study (Table 2).

Blood activity of antioxidant enzymes and serum TBARS levels of the studied groups are shown in Table 3. TBARS levels, CAT, and GPx activities were not significantly different among the groups of study. However, SOD activity was significantly lower in postmenopausal women without HRT when compared both to premenopausal women and to postmenopausal women with HRT. Some studies revealed that activity of antioxidant enzymes may be affected by aging [33,34]. Considering that the mean age of premenopausal group was significantly lower than those of

postmenopausal groups (Table 1) and that blood SOD activity was negatively correlated with age ($r = -0.42$, $p < 0.01$), we also evaluated the differences of SOD activity among groups by analysis of covariance, using age as a covariate. This statistical analysis revealed the same result at $p < 0.1$.

In the postmenopausal groups duration of HRT was positively correlated with SOD activity ($r = 0.33$, $p < 0.05$), but not with GPx or CAT activities. However, no significant correlation was found between SOD and either E₂ or FSH levels. Interestingly, there was a tendency (Mann–Whitney test, $p = 0.104$) of higher SOD activity in women that used estrogen plus progesterone (1.06 ± 0.14 U/mg Hb, $n = 5$) when compared to those that used only estrogen (0.83 ± 0.08 U/mg Hb, $n = 13$). Duration of menopause was not correlated with any blood antioxidant enzyme activity.

4. Discussion

In this study we evaluated if HRT could influence the antioxidant status of postmenopausal women by affecting enzymatic antioxidant defenses. We observed no differences in blood GPx or CAT activities due to menopause. These data are in agreement with previous findings for CAT activity [23], but contrasts with studies that found lower plasma GPx activity in postmenopausal women [23,25]. Erythrocyte GPx activity was demonstrated to be reduced with aging [34]. The age difference between pre and postmenopausal groups of our study (47 vs. 59) was smaller than that found in those studies (41 vs. 64 and 32 vs. 52, respectively), which may have accounted for the discrepancies in the results.

İnal et al. [33] found a reduction of SOD activity with aging. In the present study we found a significant reduction of SOD activity due to menopause that was not related to

Table 2
Biochemical parameters of the three study groups (means ± S.E.M.)

	Premenopausal women (n=18)	Postmenopausal women without HRT (n=21)	Postmenopausal women with HRT (n=19)
E ₂ (pg/ml)	71.0 ± 17.3 ^a	23.5 ± 2.5 ^b	30.5 ± 3.7 ^b
FSH (mIU/ml)	18.9 ± 6.5 ^a	75.9 ± 8.3 ^b	64.3 ± 6.1 ^b
AST (IU/l)	20.0 ± 2.2	18.9 ± 1.0	23.3 ± 2.4
ALT (IU/l)	22.6 ± 4.9	17.2 ± 1.4	23.8 ± 3.4
Creatinine (mg/ml)	0.79 ± 0.03	0.89 ± 0.04	0.81 ± 0.02
Hct (%)	39.6 ± 0.5	38.8 ± 0.7	40.0 ± 0.6

Different letters within the line indicate significant differences among groups ($p < 0.05$).

ARTICLE IN PRESS

4

T.C. Unfer et al. / *Clinica Chimica Acta* xx (2006) xxx–xxx

Table 3
Activity of antioxidant enzymes of the three study groups (means ± S.E.M.)

	Premenopausal women (n = 18)	Postmenopausal women without HRT (n = 21)	Postmenopausal women with HRT (n = 19)
SOD (U/mg Hb)	0.91 ± 0.04 ^a	0.68 ± 0.04 ^b	0.89 ± 0.07 ^a
CAT (mg H ₂ O ₂ /min/g Hb)	3.65 ± 0.24	3.69 ± 0.22	3.63 ± 0.25
GPx (μmol NADPH/min/g Hb)	22.0 ± 1.6	20.8 ± 1.6	20.8 ± 1.5
TBARS (μmol MDA/l serum)	6.04 ± 0.22	5.85 ± 0.23	5.87 ± 0.22

Different letters within the line indicate significant differences among groups ($p < 0.05$). HRT: hormone replacement therapy. SOD: superoxide dismutase. CAT: catalase. GPx: glutathione peroxidase. TBARS: thiobarbituric acid reactive substances. MDA: malondialdehyde.

the aging process. SOD catalysis the dismutation of superoxide radical into hydrogen peroxide and plays a key role in the protection against oxidative stress [35]. Three isoforms of the SOD have been identified, the cytosolic Cu–Zn SOD, the mitochondrial Mn SOD, and the extracellular SOD [36]. An explanation for the decreased SOD activity could be Cu or Zn deficiencies that are not unusual in the menopause [37,38].

GPx and CAT activities also did not differ in postmenopausal women with and without HRT. These results are in agreement with data from Bureau et al. [27] for GPx and Naziroğlu et al. [28] for CAT and GPx. In contrast, Özden et al. [26] found significantly higher erythrocyte GPx activity in postmenopausal women under HRT.

We observed that HRT antagonizes the decrease of SOD activity that occurs after menopause. Accordingly, lower lipid peroxidation, and higher erythrocyte reduced glutathione (GSH) were found in postmenopausal women with HRT when compared to those without HRT [13,26,28], suggesting that HRT is beneficial in the protection against oxidative stress. However, in the present study a protective effect of HRT on lipid peroxidation could not be observed, since we found no increase in lipid peroxidation of postmenopausal women without HRT when compared to the premenopausal group.

Strehlow et al. [39] observed that E₂ increases the expression of SOD both in vitro and in vivo apparently due to estrogen receptor activation. They also demonstrated that this effect of E₂ is selective for SOD, with no changes in GPx or CAT. This mechanism could explain the higher blood SOD activity observed in women with HRT in the present study. Supporting this proposal, a recent study demonstrated that E₂ antagonizes the reduction of mitochondrial SOD activity observed in ovariectomized rats [40].

In the present study women under HRT were taking either estrogen (n = 13) or estrogen plus progestin (n = 5). However, no correlation was found between SOD and E₂ levels. Hence, we cannot rule out the involvement of mechanisms other than estrogen in the effect of HRT on SOD. In fact, in human endometrium, progesterone was demonstrated to increase SOD activity, while estrogen had weak effects [41]. In the present study there was a tendency of higher SOD activity in the estrogen plus progesterone group when compared to the estrogen alone group. Hence, future research could be aimed at clarifying

the effect of the different hormones used in HRT on SOD activity.

Acknowledgements

Work supported by CNPq (Grant No. 470582/2004-9 to T. Emanuelli). T. C. Unfer is the recipient of CAPES Fellowship, G. M. M. Conterato is the recipient of CNPq Scientific Initiation Fellowship, and T. Emanuelli is the recipient of CNPq research Fellowship (proc. 304257/2004-4). The authors thank to the Laboratory of Clinical Analysis of the Santa Maria University Hospital for collecting blood samples and performing biochemical and hematological assays.

References

- [1] Bhavnani BR. Pharmacology of hormonal therapeutic agents. In: Eskin BA, editor. *The Menopause Comprehensive Management*. New York: The Parthenon Publishing Group; 2000. p. 229–56.
- [2] Sowers JR. Diabetes mellitus and cardiovascular disease in women. *Arch Intern Med* 1998;158:617–21.
- [3] Greendale GA, Lee NP, Arriola ER. The menopause. *Lancet* 1999; 353:571–80.
- [4] Stampfer MJ, Willet WC, Colditz JA, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH. A prospective study of postmenopausal estrogen therapy and coronary heart disease. *N Engl J Med* 1985;313:1044–9.
- [5] Liehr JG. Antioxidant and pro-oxidant actions of estrogens. *J Lab Clin Med* 1996;128:344–5.
- [6] Markides CS, Roy D, Liehr JG. Concentration dependence of pro-oxidant and antioxidant properties of catecholestrogens. *Arch Biochem Biophys* 1998;360:105–12.
- [7] Nathan L, Chaudhuri G. Antioxidant and pro-oxidant actions of estrogens: potential physiological and clinical implications. *Semin Reprod Endocrinol* 1998;16:309–14.
- [8] Thibodeau PA, Kachadourian R, Lemay R, Bisson M, Day B, Paquette B. In vitro pro- and antioxidant properties of estrogens. *J Steroid Biochem* 2002;81:227–36.
- [9] Halliwell B, Grootveld M. The measurement of free radical reactions in humans. Some thoughts for future experimentation. *FEBS Lett* 1987;213:9–16.
- [10] Huber LA, Sheffler E, Poll T, Ziegler R, Dresel HA. 17β-estradiol inhibits LDL oxidation and cholesteryl macrophages. *Free Radic Res Commun* 1989;8:167–73.
- [11] Ayers S, Abplanalp W, Lui JH, Subbiah TR. Mechanism involved in the protective effect of estradiol-17β on lipid peroxidation and DNA damage. *Am J Physiol* 1998;274(E):1002–8.
- [12] Subbiah MTR, Kessel B, Agrawal M, Rajan R, Abplanalp W, Rymaszewski Z. Antioxidant potential of specific estrogens on lipid peroxidation. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:1095–7.

ARTICLE IN PRESS

TC. Ünfer et al. / *Clinica Chimica Acta* xx (2006) xxx–xxx

5

- [13] Bednarek-Tupikowaska G, Tupikowski K, Bidzinka B, et al. Serum lipid peroxides and total antioxidant status in postmenopausal women on hormone replacement therapy. *Gynecol Endocrinol* 2004;19:57–63.
- [14] Gura T. Estrogen: key player in heart disease among women. *Science* 1995;269:771–3.
- [15] Trevisan M, Browne R, Ram M, et al. Correlates of markers of oxidative status in the general population. *Am J Epidemiol* 2001;154:348–56.
- [16] Ke RW, Pace DT, Ahpkas RA. Effect of hormone therapy on oxidative stress and endothelial function in African American and Caucasian postmenopausal women. *Fertil Steril* 2003;79:1118–22.
- [17] Toniolo PG, Levitz M, Zeleniuch-Jacquotte A, et al. A prospective study of endogenous estrogens and breast cancer in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:190–7.
- [18] Cao K, Devanesan PD, Ramanathan R, Gross ML, Rogan EG, Cavalieri EL. Covalent binding of catechol estrogens to glutathione catalyzed by horseradish peroxidase, lactoperoxidase, or rat liver microsomes. *Chem Res Toxicol* 1998;11:917–24.
- [19] Licher JG. Genotoxic effects of estrogens. *Mutat Res* 1990;238:269–76.
- [20] Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science* 1978;201:875–80.
- [21] Nohl H. Involvement of free radicals in aging. *Br Med Bull* 1993;49:653–67.
- [22] Sies H, editor. *Antioxidants in Diseases Mechanisms and Therapy*. San Diego: Academic Press; 1997.
- [23] Gurdol F, OnerYyidoan Y, Yalcyn O, Genc S, Buyru F. Change in enzymatic antioxidant defense system in blood and endometrial tissue of women after menopause. *Res Commun Mol Pathol* 1997;97:38–46.
- [24] Bednarek-Tupikowaska G, Bohdanowicz-Pawlak A, Bidzinska B, Milewicz A, Antonowicz-Juchniewicz J, Andrzejak R. Serum lipid peroxide levels and erythrocyte glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity in premenopausal and postmenopausal women. *Gynecol Endocrinol* 2001;15:298–303.
- [25] Signorelli S.S., Neri S., Sciacchitano S., et al. Behaviour of some indicators of oxidative stress in postmenopausal and fertile women. *Maturitas* 2006;53:77–82.
- [26] Özden S, Dildar K, Kadir YH, Gülizar K. The effects of hormone replacement therapy on lipid peroxidation and antioxidant status. *Maturitas* 2001;38:165–70.
- [27] Bureau I, Anderson RA, Arnaud J, Raysiguier Y, Favier AE, Roussel AM. Trace mineral status in postmenopausal women: impact of hormonal replacement therapy. *J Trace Elem Med Biol* 2002;16:9–13.
- [28] Naziroğlu M, Simsek M, Simsek H, Aydılek N, Özcan Z, Atılğan R. The effects of hormone replacement therapy combined with vitamins C and E on antioxidant levels and lipid profiles in postmenopausal women with Type 2 diabetes. *Clin Chim Acta* 2004;344:63–71.
- [29] Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;70:158–69.
- [30] McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte protein (hemocoupein). *J Biol Chem* 1969;244:6049–55.
- [31] Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;105:121–6.
- [32] Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978;52:302–9.
- [33] İnal ME, Kanbak G, Sunal E. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging. *Clin Chim Acta* 2001;305:75–80.
- [34] Kasapoglu M, Özben T. Alterations of antioxidant enzymes and oxidative stress markers in aging. *Exp Gerontol* 2001;36:209–20.
- [35] Salo DC, Pacifini RE, Davies KJN. Superoxide dismutase is preferentially degraded by a proteolytic system from red blood cells following oxidative modification by hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med* 1988;5:335–9.
- [36] Landis GN, Tower J. Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mech Ageing Dev* 2005;126:365–79.
- [37] Strain JJ. A reassessment of diet and osteoporosis – possible role for copper. *Med Hypotheses* 1988;27:333–8.
- [38] Lowe NM, Fraser WD, Jackson MJ. Is there a potential therapeutic value of copper and zinc for osteoporosis? *Proc Nutr Soc* 2002;61:181–5.
- [39] Strehlow K, Rotter S, Wassmann S, et al. Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. *Circ Res* 2003;93:170–7.
- [40] Feng Z, Zhang J. Long-term melatonin or 17 β -estradiol supplementation alleviates oxidative stress in ovariectomized adult rats. *Free Radic Biol Med* 2005;39:195–204.
- [41] Sugino N, Karube-Harada A, Kashiba S, Takiguchi S, Kato H. Differential regulation of copper–zinc superoxide dismutase and manganese superoxide dismutase by progesterone withdrawal in human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod* 2002;8:68–74.

3.2 Artigo 2

Sr AND Fe RELATIONSHIP WITH HORMONE REPLACEMENT THERAPY AND BONE MINERAL DENSITY

Artigo em fase final de revisão pelos autores para ser submetido à Revista *Maturitas*

Sr and Fe relationship with hormone replacement therapy and bone mineral density

Taís C. Unfer^a, Edson I. Müller^b, Érico M. de Moraes Flores^b, Valderi L. Dressler^b, João C. N. da Silva^c, Marta M. M. F. Duarte^a, Tatiana Emanuelli^{d,*}

^a*Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil;*

^b*Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil;*

^c*Departamento de Clínica Médica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil;*

^d*Núcleo Integrado de Desenvolvimento em Análises Laboratoriais (NIDAL), Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.*

Acknowledgements

Work supported by CNPq (grant 470582/2004-9 to T. Emanuelli). T.C. Unfer is the recipient of CAPES Fellowship and T.E. is the recipient of CNPq research Fellowship (proc. 304257/2004-4). The authors thank: Laboratory of Clinical Analysis from Santa Maria University Hospital for collecting blood samples and performing biochemical and hematological assays; Labmed Laboratory for performing hormonal assays; and Osteolab Clinic for measurements of bone mineral density.

*Corresponding author: Tel.: +55 55 3220 8547; fax: +55 55 3220 8353.

E-mail address: tatiemanuelli@smail.ufsm.br (T. Emanuelli).

Abstract

Objectives: The objectives of this study was to determine blood strontium and iron levels and their relationship with bone mineral density (BMD) and some biochemical parameters in premenopausal and postmenopausal women without or with hormone replacement therapy (HRT).

Methods: Whole blood strontium (Sr) and iron (Fe) levels, bone mineral density, follicle stimulating hormone (FSH), 17β - estradiol (E_2), creatinine, albumin, hematocrit, blood calcium, aspartate and alanine aminotransferases and alkaline phosphatase activity were determined in premenopausal ($n=17$) and postmenopausal women without ($n=20$) or with ($n=19$) HRT (mean ages: 47, 60, and 57 years, respectively).

Results: Blood Sr ($\mu\text{g L}^{-1}$) and Fe (mg L^{-1}) levels in premenopausal (33.66 ± 3.57 and 502.09 ± 19.90) and postmenopausal women without (31.47 ± 2.58 and 523.65 ± 9.91) or with (29.74 ± 3.02 and 540.30 ± 20.24) HRT were not significantly different among the studied groups. BMD L1-L4 and BMD femur (g/cm^2) were significantly higher in premenopausal women (1.05 ± 0.23 and 0.84 ± 0.02) when compared both to postmenopausal women without (0.90 ± 0.37 and 0.75 ± 0.02) and to postmenopausal women with (0.94 ± 0.04 and 0.74 ± 0.02) HRT. However BMD had not relationship with blood metal levels. E_2 levels were lower in postmenopausal women without HRT, while FSH levels were higher in both postmenopausal groups ($p<0.05$).

Conclusions: Physiologic whole blood Sr and Fe levels had no significant effect in BMD and other biochemical parameters in pre and postmenopausal women. However, BMD was negatively influenced by FSH levels and associated with age.

Keywords: Menopause; Follicle stimulating hormone; Blood strontium; Blood iron; Estrogen.

1. Introduction

Menopause is defined as the permanent loss of menstruation after a period of amenorrhea lasting over 1 year. It starts between 40 and 55 years of age, with 50 years being the mean age of initiation [1]. This process is associated with decreased circulating estrogen and increased follicle stimulating hormone levels (FSH) [2]. Estrogen deficiency causes an imbalance between bone resorption and formation and possibly also impairs intestinal absorption of calcium [3,4]. This hormonal change underlies the increased prevalence of osteoporosis in postmenopausal women, which is characterized by low bone mass, enhanced bone fragility, and fracture risk.

Iron (Fe) is the most abundant trace element in the human body and the cessation of menstruation leads to increased iron body stores [5]. Some studies revealed that dietary iron overloaded is accumulated in bone and could be involved in the pathogenesis of metabolic bone diseases such as osteoporosis in rats and low bone density in humans [6-8].

Strontium (Sr) is found nearly everywhere in small amounts, and humans can be exposed to low levels of this metal by air breathing, food intake, and water drinking [9]. Sr is a bone-seeking trace element that has various effects on bone metabolism depending on the dose [10]. The intestinal absorption, bone deposition, intestinal and renal elimination of Sr are similar to those calcium (Ca) and the major body Sr concentration is found in the bone [11,12]. Sr incorporation in bone is directly related to its plasma levels, the time of exposition and the remodeling activity of the bone [13]. There is experimental evidence that administration of a low Sr dose reduces bone resorption and increases bone formation, resulting in increased bone mass in normal animals and osteoporotic postmenopausal patients [14-16]. In contrast, a high dietary intake of Sr may disturb mineralization and induce bone abnormalities [17].

Estrogen replacement therapy increases Ca absorption efficiency [18] due to the presence of estrogen receptors in intestinal mucosa cells [19]. However, there are few studies on the effects of hormone replacement therapy (HRT) on intestinal absorption of Sr [20,21] and no study on its effect on blood Sr levels. It has been demonstrated that postmenopausal women with HRT had better iron status

parameters (iron, total iron-binding capacity, and ferritin) than postmenopausal women without HRT [22]. In addition, some authors showed that dietary iron at physiological levels can positively influence bone mineral density in postmenopausal women on HRT [23,24]. But, these studies have not evaluated the total blood iron levels or their correlation with bone mineral density in pre and postmenopausal women. The objective of this study was to determine blood strontium and iron levels and their relationship with bone mineral density and some biochemical parameters in premenopausal and postmenopausal women without or with HRT.

2. Methods

2.1. Human subjects

Subjects were recruited among women patients of Rheumatology Ambulatory from Santa Maria University Hospital. This study was approved by the local Ethics Committee (CEP/CCS/UFSM n° 152/2004) and all the women gave their informed consent prior to the inclusion in the study. Subjects were given a short questionnaire to obtain information about race, age, menopause state, smoking, alcohol consumption, physical exercise, HRT, parity, duration of lactation, Ca supplementation, Ca food intake (7 days record) and diagnosed diseases. Women with case history of alcoholism, smoking, diabetes, cardiovascular disease, and thyroid chronic disease were excluded. Fifty-six healthy women were included in the study and divided into three groups: premenopausal women (n=17), postmenopausal women without HRT (n =20), and postmenopausal women with HRT (n=19). Premenopausal women were those with regular menses, while postmenopausal women were those >12 months of amenorrhea. Women under HRT were taking conjugated estrogens (13), estradiol (2), or estrogen plus progestin (4). Premenopausal and postmenopausal group with HRT had 6 and 15 women with osteopenia, respectively; while postmenopausal group without HRT had 6 women with osteoporosis and 10 with osteopenia.

2.2. Bone mineral density

Measurements of bone mineral density were taken at the lumbar spine (L1 to L4 a.p.) and femoral neck by dual energy X-ray absorptiometry. Bone disease status was determined following World Health Organization (WHO) guidelines. Osteopenia is defined as a T score between -1 and -2.5 and osteoporosis as a T score less than -2.5, where T score is the number of standard deviations below the mean peak bone mass of young sex-matched healthy adults.

2.3. Sample collection

Blood samples were taken from the cubical vein after overnight fasting. Heparinized blood was immediately used for analyses of aspartate and alanine aminotransferases (AST and ALT), creatinine, albumin, hematocrit (Hct), blood calcium, and alkaline phosphatase (ALP) activity, and the remaining blood was stored at -20°C for analyses of Sr and Fe levels. Non heparinized blood samples were centrifuged and the serum obtained was used for analyses of hormone levels.

2.4. Biochemical assays

ALP, albumin, creatinine, AST, ALT, and total calcium were analyzed by a routine kits (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Hematocrit was analyzed in COULTER® STKS™ Hematology Flow Cytometer by hematology analyzer. Serum E₂ and FSH levels were determined by immunoassay with IMMULITE® Estradiol and IMMULITE® 2000 FSH kits (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA). The limit of quantification for the E₂ and FSH assays were 20 pg/mL and 0.10 mIU/mL, respectively.

2.5. Blood Sr and Fe levels

Frozen blood samples were thawed at room temperature (25°C) and homogenized using an ultrasound bath. Subsequently 250 µL of homogenized samples were transferred to quartz vessels of a high pressure microwave digestion system (Model Multiwave 3000, Anton Paar, Austria), concentrated nitric acid (6 mL) was added, vessels were closed and the follow program was carried out: 20 min at

1400 W and 20 min at 0 W for cooling. After, the samples were diluted to 25 mL with water. Sr was determined using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS, Model ELAN DRC II, Perkin Elmer, USA) equipped with a cyclonic spray chamber, with nebulizer gas flow set at 1.11 L min^{-1} , radiofrequency power of 1300 W and mass charge ratio (m/z) of 88. Fe was determined using inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES, Model OPTIMA 4300 DV, Perkin Elmer, USA) equipped with a cyclonic spray chamber, with nebulizer gas flow set at 1.50 L min^{-1} , radiofrequency power of 1450 W, axial view and wavelength of 238.204 nm. Calibration was performed from standard analytical curve using a multi-elementar reference solution from 50 to 1000 ng L^{-1} for Sr and from 0.5 to 5.0 mg L^{-1} for Fe. Spiked samples (containing 200 ng L^{-1}) were used for accuracy check.

2.6. Statistical analysis

Data were analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Duncan's test when appropriate. Data that did not follow normal distribution were analyzed by Kruskal-Wallis test, followed by a post-hoc test when appropriate. Results were expressed as means \pm standard error of mean (SEM). The association between biochemical parameters, and characteristics of the three study groups were evaluated by Pearson's correlation for variables that had a normal distribution and by Spearman rank order correlation for variables that did not exhibit a normal distribution. A multivariate linear regression analysis was also employed to estimate the independent contribution of each individual variable to metal levels and BMD. The selection of predictors was based on (1) whether the variable was statistically significant at the $p < 0.05$ level and (2) whether the inclusion of that variable increased the percentage of variance explained. Data were analyzed using Statistica® 6.0 software system (Statsoft Inc., 2001).

2. Results

Characteristics of the study subjects are shown in Table 1. The mean age of premenopausal group was significantly lower than mean age of postmenopausal groups, but no difference was observed between both postmenopausal groups. The

state in menopause and HRT were used to classify the patients. No significant difference was observed in the duration of menopause of both postmenopausal groups. Women of the HRT group had an average of 83 months of hormone therapy. No significant difference in time of nurse, parity (children's number), duration of Ca supplementation, Ca food intake, or bone mass index (BMI) was observed among groups. Race and physical exercise were not significantly different among the three groups of study (data not shown).

As expected, serum E₂ levels were significantly higher in premenopausal than in postmenopausal women without HRT, while postmenopausal women with HRT had intermediate E₂ levels. FSH levels were significantly lower in premenopausal than in postmenopausal groups (Table 2). However, no significant difference was observed in FSH levels between both postmenopausal groups. In a previous study in this population we showed that AST, ALT, creatinine, and Hct that are indicators of hepatic, renal and blood disturbances were within the normal range and were not significantly different among the three groups of study (data not shown) [25]. ALP, albumin, and total Ca were also similar among the three groups.

No significant differences were observed in whole blood Sr and Fe levels among the three study groups (Table 3). Blood Sr and Fe levels had no significant correlation with BMD, race, time of nurse, parity, physical exercise, AST, ALT, creatinine, duration of HRT, Ca food intake, duration of Ca supplementation, or biochemical parameters of bone metabolism (blood Ca and ALP activity) (data not shown). In table 4 a significant model was generated by multivariate linear regression analysis for blood Fe levels. Hct% and BMI were significant predictors of blood Fe levels, explaining 51% and 24% of the variance respectively. However, no significant model could be generated for blood Sr levels using the variables studied (data not shown).

The mean BMD L1-L4 and BMD femur were significantly higher in premenopausal women (Table 3). No significant difference was observed in BMDs between both postmenopausal groups. Considering that the mean age was significantly different among the three study groups (Table 1) and that BMD L1-L4 and BMD femur were negatively correlated with age ($r = -0.48$, $p < 0.01$ and $r = -0.38$, $p < 0.01$, respectively), we also evaluated the differences of BMD among groups by analyses of covariance, using age as a covariate. This statistical analyses revealed

that age is a determinant in the difference of BMD L1-L4 among the groups at $p < 0.05$. Table 5 shows the independent contribution of individual variables to bone density using multivariate linear regression analyses fitted to data. Significant models were generated for BMD L1-L4 and BMD femur. FSH was the only significant predictor for BMD L1-L4, explaining 47% of the variance, while FSH and BMI were significant predictors for femoral BMD, explaining 42% and 27% of variance, respectively.

3. Discussion

Considering a need for assessment of the role of Sr in health and disease and increased knowledge on strontium concentrations in different biological samples and populations, in this study we evaluated whole blood Sr levels and its relationship with BMD in pre and postmenopausal women without or with HRT. Sr levels found are in agreement with values previously reported for humans (around $30 \mu\text{g L}^{-1}$) [26,27]. However, these studies did not specify the characteristics of the studied subjects.

In contrast to Ca, Sr is not under homeostatic control in the sense that its total amount in the body and its level in biological fluids, for example, the blood is not kept strictly constant by an accurate feedback mechanism [28]. This does not exclude the possibility that Sr levels could be influenced by Ca or hormones.

The intestinal absorption of Sr has been studied as a marker of Ca absorption in postmenopausal women [20,21]. These studies evaluated the influence of short-term HRT on the absorption of a single Sr dose and observed no effect of HRT on metal absorption. However, to our knowledge no previous study evaluated physiological blood Sr levels in different stages of the reproductive life of women, or the effects of a long term HRT on Sr levels. We observed no difference in blood Sr and Ca levels due to menopause or HRT.

Considering that Sr is very similar to Ca in its physiological behavior and some competition between both metals could occur, we evaluated the relationship between blood Sr levels and Ca intake (diet or calcium supplementation). We observed no significant relationship between these variables in the present study. Also, no difference on Ca intake was observed among the study groups. The intestinal Sr

absorption in rats decreases with age, but this case with humans is unknown [28]. In the present study we observed no significant relationship between blood Sr levels and age.

Beneficial effect of low doses of stable strontium in the treatment of osteoporosis was reported almost half a century ago [29]. Studies have shown that strontium as a stable element exerts opposite effects on bone formation and resorption when administered to both animals and human subjects [14,15]. However, in the present study we found no relationship between blood Sr levels and bone mineral density (BMD) in pre and postmenopausal women, with or without HRT. Our study groups received no Sr supplementation and were exposed only to background levels of this metal. Thus, we suggest that physiological levels of Sr apparently do not influence bone metabolism.

We observed no significant difference in whole blood Fe levels due to menopause or HRT. Most previous studies evaluated Fe-ferritin blood levels and we found no other studies that evaluated whole Fe blood levels in the group of population evaluated in the present study. However, a previous study found similar whole blood Fe levels in women post parturition (477 mg L^{-1}) [30]. It is known that in addition to diet, iron stores also vary by sex, physiologic demands such as growth and pregnancy [5,31,32], loss of iron due natural or hormone-induced menstruation [22] and accretion of iron body stores due to menopause [5]. Multivariate linear regression analysis for blood Fe levels (Table 4) showed that Hct% and BMI were significant predictors of blood Fe levels. In fact, other authors had already reported a positive association between BMI and Fe stores [33,31]. It has been demonstrated that increased levels of iron intake ($>20 \text{ mg}$) were associated with greater BMD at several bone sites among women with a greater Ca intake (800-1200 mg/d) [23]. However, in our study whole blood Fe levels were not associated with BMD or calcium intake in pre and postmenopausal women, with or without HRT. Similarly, Michaelsson et al. [34] also found no association between Fe intake and BMD in women.

We found significant differences in BMD between pre and postmenopausal women, which were related to differences in age. In fact, aging is associated with gradual reductions in bone mineral density [35]. Using multivariate linear regression analyses FSH was found to be a negative significant predictor for BMD L1-L4 and

BMD femur, while BMI a positive significant predictor for femoral BMD. Elevations of FSH levels is associated with progressive bone loss in pre and perimenopausal women, supporting the hypothesis that alterations in hormone concentration may promote bone loss before that final menstrual periods [36,37]. This relation may be more important than age, as raised FSH is an indicator for menopause [37]. In addition we found that BMI is also a significant predictor for femoral BMD. These data is in agreement with a recent study showing that the loss in BMD for an increase in FSH levels was greater for women of lower BMI than for their counterparts with relatively higher BMI [37]. In fact, body weight has been consistently linked to postmenopausal bone loss, with less bone loss associated with more weight gain [38]. No study was found evaluating the effects of Sr in the liver or kidney and we found no relationship between physiologic Sr levels and indicators of hepatic and renal function like AST, ALT and creatinine levels.

Our study showed no difference in the physiological whole blood levels of Sr and Fe among pre and postmenopausal women without or with HRT. Also, no significant relationship was observed between blood Sr or Fe levels and BMD or the other biochemical parameters analyzed.

4. References

- [1] Greendale GA, Lee NP, Arriola ER. The menopause. *Lancet* 1999;353:571-80.
- [2] Prince, R.L. Counterpoint: Estrogen effects on calcitropic hormones and calcium homeostasis. *Endocr Rev* 1994;15:301-9.
- [3] Heaney RP, Recker RR, Saville PD. Menopausal changes in calcium balance performance. *J Lab Clin Med* 1978;92:953-63.
- [4] Gallagher JC, Riggs BL, DeLuca HF. Effects of estrogen on calcium absorption and serum vitamin D metabolites in postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1980;51:1359-64.
- [5] Berge LN, Bona KH, Nordoy A. Serum ferritin, sex hormones, and cardiovascular risk factors in healthy women. *Arterioscler Thromb* 1994;14:857-61.

- [6] Diamond T, Pojer R, Stiel D, et al. Does iron affect osteoblast function? Studies in vitro and in patients with chronic liver disease. *Calcified Tissue Int* 1989;48:373-9.
- [7] Schnitzler CM, Macphail AP, Shires R, et al. Osteoporosis in African hemosiderosis: role of alcohol and iron. *J Bone Miner Res* 1994;9:1865-73.
- [8] Isomura H, Fujie K, Shibata K, et al. Bone metabolism and oxidative stress in postmenopausal rats with iron overload. *Toxicology* 2004;197:93-100.
- [9] Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). *Toxicological Profile for Strontium*. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, 2004.
- [10] Grynepas MD, Hamilton E, Cheung R, et al. Strontium increases vertebral bone volume in rats at a low dose that does not induce detectable mineralization defect. *Bone* 1996;18:253-9.
- [11] Shroeder HA, Tipton IH, Nason AP. Trace metals in man: strontium and barium. *J Chron Dis* 1972;25:491-517.
- [12] Delmas PD. Clinical use of biochemical markers of bone remodeling in osteoporosis. *Bone* 1992;13:S17-21.
- [13] Dahl SG, Allain P, Marie PJ, et al. Incorporation and distribution of strontium in bone. *Bone* 2001;28:446-53.
- [14] Marie PJ, Ammann P, Boivin G, et al. Mechanisms of action and therapeutic potential of strontium in bone. *Calcified Tissue Int* 2001;69:121-9.
- [15] Marie PJ. Strontium ranelate: A physiological approach for optimizing bone formation and resorption. *Bone* 2006;38:S10-4.
- [16] Meunier PJ, Roux C, Seeman E, et al. The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis. *New Engl J Med* 2004;350:459-68.
- [17] Neufeld EB, Boskey AL. Strontium alters the complexed acidic phospholipid content of mineralized tissues. *Bone* 1994;15:425-30.
- [18] Heaney RP, Draper MW. Raloxifene and estrogen: comparative bone-remodeling kinetics. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3435-9.
- [19] Arjmandi BH, Hollis BW, Kalu DN. In vivo effect of 17 β -estradiol on intestinal calcium absorption in rats. *Bone Miner* 1994;26:181-9.

- [20] Bolscher ten M, de Valk-de Roo GW, Barto R, et al. Oestrogen has no short term effect on intestinal strontium absorption in healthy postmenopausal women. *Clin Endocrinol* 1999;50:387-92.
- [21] Bolsher MDT, Neele SJM, Barto R, et al. Effect of estrogen on intestinal strontium absorption in postmenopausal women. *Maturitas* 2000;36:195-201.
- [22] Penchkofer S, Schwertz D. Improved iron status parameters may be a benefit of hormone replacement therapy. *J Women Health Gen-B* 2000;9:141-51.
- [23] Harris MM, Houtkooper LB, Stanford VA, et al. Dietary iron is associated with bone mineral density in healthy postmenopausal women. *Am Soc Nut Sci* 2003;3:598-602.
- [24] Maurer J, Harris MM, Stanford VA, et al. Dietary iron positively influences bone mineral density in postmenopausal women on hormone replacement therapy. *J Nutr* 2005;135:863-9.
- [25] Unfer TC, Conterato, GMM, da Silva JCN, Duarte, MMMF, Emanuelli T. Influence of hormone replacement therapy on blood antioxidant enzymes in menopausal women. *Clin Chim Acta* 2006; in press.
- [26] Burguera M, Burguera JL, Rondón C, et al. Appraisal of different electrothermal atomic absorption spectrometric methods for the determination of strontium in biological samples. *Spectrochim Acta* 1999;54(B):805-18.
- [27] Azparren JE, Ortega A, Bueno H, et al. Blood strontium concentration related to the length of the agonal period in seawater drowning cases. *Forensic Sci Int* 2000;108:51-60.
- [28] Nielsen SP. The biological role of strontium. *Bone* 2004;35:583-8.
- [29] Boivin G, Deloffre P, Perrat B, et al. Strontium distribution and interactions with bone mineral in monkey iliac bone after strontium salt (S12911) administration. *J Bone Miner Res* 1996;11:1302-11.
- [30] Shang S, Hong W. Flame atomic absorption spectrometry using a microvolume injection technique for the determination of Cu, Zn, Ca, Mg and Fe in whole blood from healthy infant and mother ears. *Fresen J Anal Chem* 1997;357:997-9.
- [31] Milman N, Byg KE, Ovesen L. Iron status in Danes 1994. II: Prevalence of iron deficiency and iron overload in 1319 Danish women aged 40-70 years. Influence of

blood donation, alcohol intake and iron supplementation. *Ann Hematol* 2000;79:612-21.

[32] Zacharsky LR, Ornstein DL, Woloshin S, et al. Association of age, sex, and race with body iron stores in adults: analyses of NHANES III data. *Am Heart J* 2000;140:98-104.

[33] Milman N, Kirchhoff M. Relationship between serum ferritin and risk factors for ischaemic heart disease in 2235 Danes aged 30-60 years. *J Intern Med* 1999;245:423-33.

[34] Michaelsson K, Homberg L, Mallmin H, et al. Diet, bone mass, and osteocalcin: a cross-sectional study. *Calcified Tissue Int* 1995;57:86-93.

[35] Wahner HW, Dunn WL, Roggs BL. Noninvasive bone mineral measurements. *Semin Nucl Med* 1983;13:282-9.

[36] Sowers MR, Finkelstein JS, Ettinger B, et al. The association of endogenous hormone concentration and bone mineral density measures in pre- and perimenopausal women of four ethnic groups: SWAN. *Osteoporosis Int* 2003;14:44-52.

[37] Beksinska ME, Smit JA, Kleinschmidt I, et al. Bone mineral density in women aged 40-49 years using depot-medroxyprogesterone acetate, norethisterone enanthate or combined oral contraceptives for contraception. *Contraception* 2005;71:170-5.

[38] Nguyen TV, Sambrook PN, Eisman JA. Bone loss, physical activity, and weight change in elderly women: the Dubbo Osteoporosis Epidemiology Study. *J Bone Min Res* 1998;13:1458-67.

Table 1Characteristics of the study groups (means \pm S.E.M.)

	Premenopausal women (n = 17)	Postmenopausal women without HRT (n = 20)	Postmenopausal women with HRT (n = 19)
Age (years)	46.94 \pm 1.15 ^a	59.80 \pm 1.10 ^b	57.53 \pm 1.08 ^b
Duration of menopause (months)	0 ^a	177.00 \pm 20.08 ^b	143.47 \pm 12.98 ^b
Duration of HRT (months)	0 ^a	0 ^a	83.00 \pm 15.80 ^b
Time of nurse (months)	9.35 \pm 3.14	21.66 \pm 12.53	15.76 \pm 4.88
Parity (children's number)	1.47 \pm 0.30	2.6 \pm 0.34	2.37 \pm 0.45
Ca supplementation (months)	0.35 \pm 0.35	0.37 \pm 0.30	4.10 \pm 2.24
Ca food intake (portions per week)*	36.31 \pm 10.16	47.25 \pm 11.17	35.05 \pm 7.00
BMI (Kg/m ²)	26.33 \pm 0.95	25.97 \pm 0.92	25.45 \pm 1.08

Values within the same line that have no common superscript are significantly different ($p < 0.01$). HRT: hormone replacement therapy. BMI: body mass index.

*Portions of Ca-rich food consumed per week.

Table 2Biochemical analyses (means \pm S.E.M.)

	Premenopausal women (n = 17)	Postmenopausal women without HRT (n = 20)	Postmenopausal women with HRT (n = 19)
E ₂ (pg dL ⁻¹)	68.15 \pm 18.09 ^a	23.69 \pm 2.65 ^b	30.50 \pm 3.68 ^{a,b}
FSH (mIU mL ⁻¹)	19.06 \pm 6.93 ^a	77.47 \pm 8.59 ^b	64.33 \pm 6.14 ^b
Blood Ca (mg dL ⁻¹)	9.46 \pm 0.10	9.66 \pm 0.12	9.21 \pm 0.18
Albumin (g dL ⁻¹)	4.42 \pm 0.10	4.39 \pm 0.09	4.26 \pm 0.07
Alkaline phosphatase (UI L ⁻¹)	64.76 \pm 4.93	72.10 \pm 4.11	65.21 \pm 3.20

Values within the same line that have no common superscript are significantly different (p<0.05).

AST: aspartate aminotransferase; ALT: , alanine aminotransferase; Hct: hematocrit; E₂: 17 β - estradiol; FSH: follicle stimulating hormone.

Table 3Blood metal levels and BMD of the three study groups (means \pm S.E.M.)

	Premenopausa I women (n = 17)	Postmenopausal women without HRT (n = 20)	Postmenopausal women with HRT (n = 19)
Fe (mg L ⁻¹)	502.09 \pm 19.90	523.65 \pm 9.91	540.30 \pm 20.24
Sr (μ g L ⁻¹)	33.66 \pm 3.57	31.47 \pm 2.58	29.74 \pm 3.02
BMD L1-L4 (g/cm ²)	1.05 \pm 0.23 ^a	0.90 \pm 0.37 ^b	0.94 \pm 0.04 ^b
BMD femur (g/cm ²)	0.84 \pm 0.02 ^a	0.75 \pm 0.02 ^b	0.74 \pm 0.02 ^b

Different letters within the same line indicate significant differences among groups (p<0.01).

Table 4

The independent contribution of each individual variable to blood iron levels by multivariate linear regression analyses

	β	Student's t-test	<i>p</i> -value
Fe			
Hct%	0.51	4.49	0.00004
BMI (Kg/m ²)	0.24	2.14	0.037

Table 5

The independent contribution of each individual variable to BMD L1-L4 and BMD femur by multivariate linear regression analyses

	β	Student's t-test	<i>p</i> -value
BMD L1-L4 (g/cm ²)			
FSH (mIU mL ⁻¹)	-0.47	-3.97	0.0002
ALP (UI L ⁻¹)	-0.17	-1.39	0.17
Sr (µg L ⁻¹)	0.13	1.09	0.28
BMD femur (g/cm ²)			
FSH (mIU mL ⁻¹)	-0.42	-3.52	0.0009
BMI (Kg/m ²)	0.27	2.26	0.028

4 DISCUSSÃO

A diminuição na produção de estrogênio, ocorrida na menopausa, está associada ao aumento do estresse oxidativo (Gura, 1995; Trevisan *et al.*, 2001; Ke *et al.*, 2003; Bednarek-Tupikowaska *et al.*, 2004) e ao desenvolvimento de doenças como a osteoporose (Sowers, 1998; Greendale *et al.*, 1999). Evidências sugerem que o estrogênio reduz a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e o estresse oxidativo *in vivo* e *in vitro* (Huber *et al.*, 1989; Subbiah *et al.*, 1993; Ayers *et al.*, 1998; Bednarek-Tupikowaska *et al.*, 2004). No entanto, o seu papel como anti ou pró-oxidante ainda é controverso (Huber *et al.*, 1989; Liehr, 1990; Subbiah *et al.*, 1993; Toniolo *et al.*, 1995; Ayers *et al.*, 1998; Cao *et al.*, 1998; Bednarek-Tupikowaska *et al.*, 2004). No presente estudo observou-se que a menopausa não exerceu influência nas atividades da glutathiona peroxidase (GPx) e da catalase (CAT). Esse resultado está de acordo com Gurdol *et al.* (1997), que não observaram diferença na atividade antioxidante da CAT no sangue de mulheres na pré e pós-menopausa. Entretanto, em outros estudos observou-se menor atividade plasmática da GPx em mulheres na pós-menopausa (Gurdol *et al.*, 1997; Signorelli *et al.*, 2005). Também, tem sido observada redução na atividade eritrocitária da GPx com o envelhecimento (Kasapoglu & Özben, 2001). A diferença de idade entre os grupos do presente estudo foi menor (47 vs. 59 anos para mulheres na pré e pós-menopausa) do que nos outros estudos citados (41 vs. 64 e 32 vs. 52, respectivamente), o que pode ter contribuído para a discrepância nos resultados.

Ínal *et al.* (2001) propõem que a atividade da superóxido dismutase (SOD) diminui com o processo de envelhecimento. De fato, foi observada uma significativa redução na atividade da SOD devido à menopausa. Entretanto, esta redução não foi relacionada com o processo de envelhecimento. Sabe-se que a SOD catalisa a dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio e executa um papel chave na proteção contra o estresse oxidativo (Salo *et al.*, 1988). Existem três isoformas da SOD, a Cu-Zn SOD citosólica, a Mn SOD mitocondrial, e a SOD

extracelular (Landis & Tower, 2005). A deficiência de Cu ou Zn são comuns na menopausa e poderiam ser uma explicação para a diminuição na atividade antioxidante da SOD (Strain, 1988; Lowe *et al.*, 2002).

As atividades antioxidantes da GPx e da CAT não foram influenciadas pela terapia de reposição hormonal (TRH) em mulheres na pós-menopausa. O que está em acordo com o resultado obtido por Boreau *et al.* (2002) para a GPx e com Naziroglu *et al.* (2004) para a CAT e GPx. Entretanto, Özben *et al.* (2001) encontraram um aumento significativo na atividade da GPx eritrocitária em mulheres na pós-menopausa recebendo TRH, em relação às que não recebiam a reposição.

A TRH reverteu a diminuição na atividade da SOD ocorrida após a menopausa, sugerindo que esta terapia seja benéfica na proteção contra o estresse oxidativo. Estes resultados estão de acordo com outros estudos, onde foi encontrada menor peroxidação lipídica, e maior quantidade de glutathiona reduzida eritrocitária (GSH) em mulheres na pós-menopausa com TRH quando comparado com mulheres sem a TRH (Özben *et al.*, 2001; Bednarek-Tupikowaska *et al.*, 2004; Naziroglu *et al.*, 2004). Contudo, no presente estudo a TRH não interferiu na peroxidação lipídica, e não foi observado aumento neste parâmetro nas mulheres na pós-menopausa sem TRH, quando comparadas com o grupo de mulheres na pré-menopausa.

O estradiol aumenta a expressão da SOD tanto *in vitro* quanto *in vivo*, aparentemente devido à ativação de receptor para estrogênio, e esse efeito do estradiol é seletivo para a SOD, sem influenciar na atividade da GPx ou CAT (Strehlow *et al.*, 2003). Este mecanismo poderia explicar a maior atividade antioxidante da SOD observada nas mulheres que fazem uso da TRH após a menopausa. Sustentando esta proposta, um estudo recente, mostrou que o estradiol impediu a redução na atividade da SOD mitocondrial em ratas ooforectomizadas (Sugino *et al.*, 2002).

As formas de TRH utilizadas pelas mulheres no estudo foram estrogênios conjugados (13), estradiol (1), ou estrogênio mais progesterona (5). Não foi observada correlação entre os níveis de estradiol e a atividade da SOD no presente estudo. Assim, não se pode descartar o envolvimento de outros mecanismos, além do estrogênio, no efeito da TRH na atividade antioxidante da SOD. De fato, estudos demonstraram que a progesterona aumenta a atividade da SOD no endométrio humano, enquanto o estrogênio tem pouco efeito (Sugino *et al.*, 2002). No presente trabalho foi observado uma tendência de maior atividade da SOD nas pacientes que

tomavam estrogênio mais progesterona, quando comparado com o grupo que utilizava apenas estrogênio.

Estudos mostram que a terapia de reposição com estrogênios (TER) previne a osteoporose e reduz o índice de fraturas (WGWHII, 2002; Cauley *et al.*, 2003) e que o estrôncio (Sr) (Janes & MacCaslin, 1959; Munier *et al.*, 2002) e o ferro (Fe) (Harris *et al.*, 2003; Maurer *et al.*, 2005) estariam relacionados com melhoras na densidade mineral óssea (DMO). Não foram encontrados na literatura estudos avaliando os níveis totais de Sr e Fe no sangue de mulheres na pré e pós-menopausa, com e sem TRH.

O nível total de Sr foi de $33,66 \mu\text{g L}^{-1}$ em mulheres não menopausadas, e de $30,60 \mu\text{g L}^{-1}$ em mulheres na pós-menopausa. É importante salientar que os níveis de Sr encontrados referem-se aos valores basais da população em estudo, já que não foi administrado Sr, e as pacientes não apresentam histórico de exposição a níveis de Sr superiores aos ambientais. De fato, a população em geral está exposta ao Sr através do ar, água, solo e alimentação (ATSDR, 2004), e os suplementos de cálcio (Ca) comercializados no Brasil apresentam níveis consideráveis de Sr ($\sim 427 \mu\text{g}/\text{unidade de comprimido}$) (Frizzo *et al.*, 2004). Os níveis sanguíneos de Sr observados estão de acordo com estudos prévios que encontraram em torno de $30 \mu\text{g L}^{-1}$ de Sr no sangue humano (Burguera *et al.*, 1999; Azparren *et al.*, 2000). No entanto, esses estudos não especificaram o grupo populacional avaliado.

Estudos demonstraram a existência de receptores para estrogênio no intestino (Arjmandi *et al.*, 1993) e que a administração de 17β -estradiol estaria associada ao aumento na absorção de Ca em ratos (Arjmandi *et al.*, 1994). Considerando que o Sr apresenta propriedades similares ao Ca e que o estrogênio pode afetar a absorção de Ca, poderia existir uma relação entre os níveis de estrogênio e a absorção de Ca e Sr em mulheres na pós-menopausa. Contudo, no presente estudo os níveis sanguíneos de Sr e de Ca não foram influenciados pela menopausa e TRH, e não houve correlação entre os níveis de estradiol e a concentração de Sr e Ca no sangue das mulheres. Bolscher *et al.* (2000), também não encontraram efeito modulador de estrogênios na absorção gastrintestinal de Ca, avaliada por teste de absorção com Sr, em mulheres na pós-menopausa e não osteoporóticas. O Ca inibe a absorção de Sr (Nielsen *et al.*, 2004), e a preferência na absorção do Ca pode ser atribuída ao seu menor peso molecular (Waserman *et al.*, 1961, apud NIELSEN, 2004, p. 585) e ao fato de que a absorção do Sr, em ratos,

diminui com a idade (Nielsen *et al.*, 2004). No entanto, não existem trabalhos avaliando o efeito da idade na absorção de Sr em humanos. No presente estudo, não foi observada relação significativa entre a idade e os níveis sanguíneos de Sr. A ingestão de Ca na dieta e a suplementação com Ca, não influenciaram nos níveis sanguíneos de Ca ou Sr das mulheres estudadas. Ao contrário do Ca, o Sr não está sobre controle homeostático, verificando-se que a quantidade total de Sr no corpo e os níveis em fluidos biológicos, como o sangue, estão em manutenção constante por retrocontrole (Nielsen *et al.*, 2004).

O ranelato de Sr aumentou a DMO da lombar e da coluna vertebral em mulheres menopausadas e pacientes osteoporóticos (McCaslin & Janes, 1959; Meunier *et al.*, 2002). Não foram encontrados na literatura, estudos avaliando a influência das concentrações fisiológicas de Sr na DMO de mulheres. Os efeitos positivos do Sr nos ossos se devem simultaneamente a estimulação da formação e inibição da reabsorção óssea (Marie *et al.*, 2006). Contudo não houve relação entre os níveis de Sr e a atividade sanguínea da fosfatase alcalina, que é um marcador de formação óssea, confirmando que em concentrações fisiológicas de aproximadamente $32 \mu\text{g L}^{-1}$, o Sr não interfere no metabolismo ósseo de mulheres.

Os estoques de Fe aumentam na menopausa (Berge *et al.*, 1994; Naimark *et al.*, 1996) e estudos mostram que o aumento da ingestão de Fe está associado a um aumento na DMO em mulheres (Harris *et al.*, 2003; Maurer *et al.*, 2005). Não foram encontrados estudos avaliando os níveis totais de Fe no sangue de mulheres na pré e pós-menopausa. Assim, os níveis totais de Fe encontrados no presente estudo foram mais altos do que o observado por Shang & Hong (1997) em mulheres no estado pós-parto (477 mg L^{-1}). Os níveis de Fe encontrados não foram influenciados pela menopausa e TRH, e não interferiram na DMO da população estudada. Michaelson *et al.* (1995), também não encontraram relação entre Fe e DMO em mulheres. A análise de regressão multivariada mostrou que o hematócrito e o índice de massa corporal (IMC) foram indicativos para os níveis de Fe.

Embora não se tenha observado influência dos níveis de Sr e Fe no metabolismo ósseo, as mulheres na pré-menopausa tinham uma DMO maior que as mulheres na pós-menopausa. Essa maior DMO estava relacionada à menor média de idade dos indivíduos desse grupo, não sendo atribuído nenhum efeito da TRH na DMO. De fato, o envelhecimento está associado à redução gradual na DMO (Wahner *et al.*, 1983). Foi observada neste estudo uma correlação positiva entre os

níveis de estradiol e a DMO (lombar e colo do fêmur), confirmando o fato de que a diminuição dos níveis de estradiol poderia estar relacionada à perda óssea em mulheres na menopausa (Greendale *et al.*, 1999). Além disso, verificou-se no que a DMO diminuiu com o tempo de menopausa. Por análise de regressão múltipla observou-se que os níveis sanguíneos do hormônio folículo estimulante (FSH) podem ser utilizados para prever a DMO tanto na lombar (L1-L4) quanto no colo do fêmur. Também foi observado que a diminuição na DMO do fêmur pelo aumento do FSH foi maior em mulheres com menor IMC. Confirmando a hipótese de que o aumento progressivo nas concentrações séricas de FSH está associado com a perda óssea em mulheres (Sowers *et al.*, 2003; Khan & Sued, 2004; Beksinska *et al.*, 2005) e que a diminuição na DMO em relação ao aumento de FSH é maior em mulheres com menor IMC (Beksinska *et al.*, 2005).

5 CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho indicam que:

→ A menopausa e a terapia de reposição hormonal (TRH) não afetaram a atividade da catalase nem da glutathione peroxidase.

→ TRH impediu a diminuição da atividade da superóxido dismutase (SOD) em mulheres na pós-menopausa, sugerindo que a TRH poderia ter um papel benéfico na proteção contra o estresse oxidativo.

→ Os níveis sanguíneos de Sr e Fe, em mulheres no climatério, não influenciaram a densidade mineral óssea, parâmetros do metabolismo ósseo, nem a função renal ou hepática.

→ Parâmetros como idade, tempo de menopausa, níveis circulantes de estradiol (E_2) e hormônio folículo estimulante (FSH), TRH, tempo de aleitamento, ingestão de cálcio, atividade física, hematócrito e índice de massa corporal (IMC), não influenciaram os níveis sanguíneos de Sr em mulheres; ao passo que, o hematócrito e o IMC foram indicadores dos níveis sanguíneos de Fe.

→ A diferença na DMO observada nas regiões, lombar (L1-L4) e colo do fêmur, em virtude da menopausa deveu-se, principalmente, a diferença de idade entre os grupos.

→ Altos níveis de hormônio folículo estimulante (FSH) estavam associados à perda óssea da lombar (L1-L4) e do colo do fêmur em mulheres, e a diminuição na densidade mineral óssea do colo do fêmur foi maior em mulheres com menor índice de massa corporal.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKESSON, K. New approaches to pharmacological treatment of osteoporosis. **Bulletin of the World Health Organization**. v. 81, n. 9, p. 657-664, 2003.

AMES, B.N.; SHIGENAGA, M.K.; HAGEN, T.M. Oxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 90, p. 7915-7922, 1993.

ARJMANDI, B.H. et al. Evidence for estrogen receptor-linked calcium transport in the intestine. **Bone and Mineral**. v. 21, n. 1, p. 63-74, 1993.

ARJMANDI, B.H.; HOLLIS, B.W.; KALU, D.N. In vivo effect of 17 β -estradiol on intestinal calcium-absorption in rats. **Bone and Mineral**. v. 26, n. 2, p. 181-189, 1994.

ASTDR. **Toxicological Profile for Strontium**. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2004.

AZPARREN, J.E. et al. Blood strontium concentration related to the length of the agonal period in seawater drowning cases. **Forensic Science International**. v. 108, p. 51-60, 2000.

AYERS, S. et al. Mechanism involved in the protective effect of Estradiol-17 β on lipid peroxidation and DNA damage. **American Journal of Physiology**. v. 274, E, p. 1002-1008, 1998.

BASU, S. et al. Association between oxidative stress and bone mineral density. **Biochemical Biophysical Research Communication**. v. 288, p. 275-279, 2001.

BEDNAREK-TUPIKOWASKA, G. et al. Serum lipid peroxide levels and erythrocyte glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity in premenopausal and postmenopausal women. **Gynecological Endocrinology**. v. 15, p. 298-303, 2001.

BEDNAREK-TUPIKOWASKA, G. et al. Serum lipid peroxides and total antioxidant status in postmenopausal women on hormone replacement therapy. **Gynecological Endocrinology**. v. 19, p. 57-63, 2004.

BEKSINSKA, M.E. et al. Bone mineral density in women aged 40-49 years using depot-medroxyprogesterone acetate, norethisterone enanthate or combined oral contraceptives for contraception. **Contraception**. v. 71, p. 170-5, 2005.

BERGE, L.N.; BONAA, K.H.; NORDOY, A. Serum ferritin, sex hormones, and cardiovascular risk factors in healthy women. **Arteriosclerosis and Thrombosis**. v. 14, p. 857-861, 1994.

BOLSCHER TEN M. et al. Oestrogen has no short term effect on intestinal strontium absorption in healthy postmenopausal women. **Clinical Endocrinology**. v. 50, p. 387-392, 1999.

BOLSCHER, M.D. et al. Effect of estrogen on intestinal strontium absorption in postmenopausal women. **Maturitas**. v. 36, p. 195-201, 2000.

BUREAU, I. et al. Trace mineral status in postmenopausal women: impact of hormonal replacement therapy. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**. v. 16, p. 9-13, 2002.

BURGUERA, M. et al. Appraisal of different electrothermal atomic absorption spectrometric methods for the determination of strontium in biological samples. **Spectrochimica Acta**. v. 54, B, p. 805-818, 1999.

BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R. **Fundamentos de Química Clínica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. cap. 34, p. 597-662; cap. 35, p.664-679.

CADENAS, E.; DAVIES, K.J.A. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 29, n. 3/4, p. 222-230, 2000.

CANALIS, E. et al. The divalent strontium salt (S 12911) enhances bone cell replication and bone formation in-vitro. **Bone**. v. 18, 517-523, 1996.

CAO, K. et al. Covalent binding of catechol estrogens to glutathione catalyzed by horseradish peroxidase, lactoperoxidase, or rat liver microsomes. **Chemical Research in Toxicology**. v. 11, p. 917-924, 1998.

CAULEY, J.A. et al. Effects of estrogen plus progestin on risk of fracture and bone mineral density. **JAMA-Journal of the American Medical Association**. v. 290, p. 1729-38, 2003.

CECIL; RUSSELL, L. **Tratado de medicina interna**. ed. 20. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 1515-1529.

COHEN, A.J.; ROE, F.J.C. Review of risk factors for osteoporosis with particular reference to a possible etiological role of dietary salt. **Food and Chemical Toxicology**. v. 38, p. 237-253, 2000.

COOK JD. Adaptation in iron metabolism. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 51, p. 301-308, 1990.

DAHL, S.G. et al. Incorporation and distribution of strontium in bone. **Bone**. v. 28, p. 446-453, 2001.

DARLEY-USMAR, V.M. et al. Nitric oxide, free radicals and cell signaling in cardiovascular disease. **Biochemistry Society Hematology**. v. 25, p. 925-929, 1997.

DELMAS, P.D. Clinical use of biochemical markers of bone remodeling in osteoporosis. **Bone**. v. 13, p. S17-S21, 1992.

DEVINE, A. et al. Correlates of intestinal calcium absorption in women 10 years past the menopause. **Calcified Tissue International**. v. 52, p. 358-360, 1993.

DOW, E.; STANBURY, J.B. **Strontium and calcium metabolism in metabolic bone diseases**. Medical Services of the Massachusetts General Hospital and Department of Medicine of the Harvard Medical School, Boston, Mass. p. 885-903, 1960.

DUPONT, A. et al. Comparative endocrinological and clinical effects of percutaneous estradiol and oral conjugates estrogen as replacement therapy in menopausal women. **Maturitas**. v. 13, n. 4, p. 297-311, 1991.

EL SOLH, N.; ROUSSELET, F. Effects of stable strontium administration on calcium metabolism with particular reference to low-calcium diet. In: Skorya, S.C. **Handbook of stable strontium**. New York: Ed. Plenum Press, 1981. p. 515-544.

FENG, Z.; ZHANG, J. Long-term melatonin or 17 β -estradiol supplementation alleviates oxidative stress in ovariectomized adult rats. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 39, p. 195-204, 2005.

FERRARO, E.F.; CARR, R.; ZIMMERMAN, K. A comparison of the effects of strontium chloride and calcium chloride on alveolar bone. **Calcified Tissue International**. v. 35, p. 258-260, 1983.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of aging. **Nature**. v. 408, p. 239-247, 2000.

FRIDOVICH, I. The biology of oxygen radicals. **Science**. v. 201, p. 875-880, 1978.

FRIZZO, C.; HAHN, M.; CONTERATO, G.M.M; EMANUELLI, T.; FLORES, E.M.M.; DRESSLER, V.L.; MATTOS, J.C.P. **Determinação de Ca, Sr e Pb em suplementos de cálcio no Brasil**. Sociedade Brasileira de Química (SBQ) e Federación Latinoamericana de Asociaciones Químicas (FLAQ). 27^o Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química e XXVI Congresso Latino-americano de Química. 2004

GALLAGHER, J.C. et al. Intestinal calcium absorption and serum vitamin D metabolites in normal subjects and osteoporotic patients. **Journal of Clinical Investigation**. v. 64, p. 719-736, 1979.

GALLAGHER, J.C.; RIGGS B.L.; DeLUCA, H.F. Effect of estrogen on calcium absorption and serum vitamin D metabolites in postmenopausal osteoporosis. **Journal of clinical Endocrinology and Metabolism**. v. 51, p. 1359-1364, 1980.

GREENDALE, G.A.; LEE, N.P.; ARRIOLA, E.R. The menopause. **The Lancet**. v. 353, p. 571-580, 1999.

GRYNPAS, M.; MARIE, P.J. Effects of low doses of strontium and bone quality and quality in rats. **Bone**. v. 11, p. 313-319, 1990.

GRYNPAS, M.D.; HAMILTON, E.; CHEUNG, R.; et al. Strontium increases vertebral bone volume in rats a low dose that does not induce mineralization defect. **Bone**. v. 18, p. 253-359, 1996.

GURA, T. Estrogen: key player in heart disease among women. **Science**. v. 269, p. 771-773, 1995.

GURDOL, F. et al. Change in enzymatic antioxidant defense system in blood and endometrial tissue of women after menopause. **Research Communications In Molecular Pathology And Pharmacology**. v. 97, p. 38-46, 1997.

HALIWELL, B.; GROOTVELD, M. The measurement of free radical reactions in humans. Some thoughts for future experimentation. **FEBS Letters**. v. 213, p. 9-16, 1987.

HARRIS, M.M. et al. Dietary iron is associated with bone mineral density in healthy postmenopausal women. **Journal of Nutrition**. v. 133, p. 3598-3602, 2003.

HEANEY, R.P.; RECKER, R.R.; SAVILLE, P.D. Menopausal changes in calcium balance performance. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**. v. 92, p. 953-963, 1978.

HEANEY, R.P.; DRAPER, M.W. Raloxifene and estrogen: comparative bone-remodeling kinetics. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. v. 82, p. 3425-3429, 1997.

HICH, J.Z.; KERSTETTER, J.E. Nutrition in bone health revisited: A story beyond calcium. **Journal of the American College of Nutrition**. v. 19, n. 6, p. 715-737, 2000.

HUBER, L.A. et al. 17 β -estradiol inhibits LDL oxidation and cholesteryl macrophages. **Free Radical Research Communication**. v. 8, p. 167-173, 1989.

ÍNAL, M.E.; KANBAK, G.; SUNAL, E. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging. **Clinica Chimica Acta**. v. 305, p. 75– 80, 2001.

ISOMURA, H. et al. Bone metabolism and oxidative stress in postmenopausal rats with iron overload. **Toxicology**. v. 197, p. 93-100, 2004.

JOHNSON, A.R.; ARMSTRONG, W.D.; SINGER, L. The incorporation and removal of large amounts of strontium by physiologic mechanisms in mineralized tissues of the rat. **Calcified Tissue Research**. v. 2, p. 242-252, 1968.

KASAPOGLU, M.; ÖZDEN, T. Alterations of antioxidant enzymes and oxidative stress markers in aging. **Experimental Gerontology**. v. 36, p. 209-220, 2001.

KE, R.W.; PACE, D.T.; AHPKAS, R.A. Effect of hormone therapy on oxidative stress and endothelial function in African American and Caucasian postmenopausal women. **Fertility and Sterility**. v. 79, p. 1118-1122, 2003.

KHAN, A.A.; SYED, Z. Bone densitometry in premenopausal women – Synthesis and review. **Journal of Clinical and Densitometry**. v. 7, n. 1, p. 85-92, 2004.

KIM, N.H. et al. Serum ferritin in healthy subjects and type 2 diabetic patients. **Yonsei Medicine**. v. 41, p. 387-92, 2000.

LANDIS, G.N.; TOWER, J. Superoxide dismutase evolution and life span regulation. **Mechanisms of Ageing and Development**. v. 126, p. 365-379, 2005.

LIEHR, J.G. Genotoxic effects of estrogens. **Mutation Research**. v. 238, p. 269-276, 1990.

LIEHR, J.G. Antioxidant and pro-oxidant actions of estrogens. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**. v. 128, p. 344-345, 1996.

LIKINS, R.C. et al. Comparative metabolism of calcium and strontium in the rat. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 83, p. 472-481, 1959.

LINDER, M.C. Nutrition and metabolism of the trace elements. In: **Nutritional Biochemistry and Metabolism with Clinical Applications**, 2nd ed, New York: Elsevier, 1991, p. 217.

LIU, J.H.; MUSE, K.N. The effects of progestins on bone density and bone metabolism in postmenopausal women: A randomized controlled trial. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. v. 192, p. 1316-1324, 2005.

LOWE, N.M.; FRASER, W.D.; JACKSON, M.J. Is there a potential therapeutic value of copper and zinc for osteoporosis? **Proceedings of The Nutrition Society**. v. 61, p. 181-185, 2002.

MANO, H. et al. Mammalian mature osteoclasts as estrogen target cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 223, p. 637-642, 1996.

MARIE, P.J. et al. Effect of low doses of stable strontium on bone metabolism in rats. **Mineral and Electrolyte Metabolism**. v. 11, p. 5-13, 1985.

MARIE, P.J.; HOTT, M. Short-term effects of fluoride and strontium on bone formation and resorption in the mouse. **Metabolism-Clinical and Experimental**. v. 35, p. 547-551, 1986.

- MARIE, P.J. et al. Mechanisms of action and Therapeutic potential of strontium in bone. **Calcified Tissue International**. v. 69, p. 121-129, 2001.
- MARIE, P.J. Strontium ranelate: A physiological approach for optimizing bone formation and resorption. **Bone**. v. 38, p. S10-S14, 2006.
- MARKIDES, C.S.; ROY, D.; LIEHE, J.G. Concentration dependence of pro-oxidant and antioxidant properties of catecholestrogens. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 360, p. 105-112, 1998.
- MARNETT, L.J. Oxyradicals and DNA damage. **Carcinogenesis**. v. 21, n. 3, p. 361-370, 2000.
- MATSUMOTO, A. Effect of strontium on the epiphyseal cartilage plate of rat tibiae – histological and radiographic studies. **Japanese Journal of Pharmacology**. v. 26, p. 675-681, 1976.
- MAURER, J. et al. Dietary iron positively influences bone mineral density in postmenopausal women on hormone replacement therapy. **Journal of Nutrition**. v. 35, n. 4, p. 863-869, 2005.
- McCASLIN, F.E.; JANES, H.M. The effect of strontium lactate in the treatment of osteoporosis. **Mayo Clinic Proceedings**. v. 34, p. 329-334, 1959.
- McPHERSON, K. et al. The effect of age, sex and other factors on blood chemistry in health. **Clinica Chimica Acta**. v. 84, n. 3, p. 373-397, 1978.
- MAZESS, R.B. On aging bone loss. **Clinical Orthopaedics and Related Research**. v. 165, p. 239–252, 1982.
- MEUNIER, P.J. Anabolic agents for treating postmenopausal osteoporosis. **Joint Bone Spine**. v. 68, p. 576-581, 2001.
- MEUNIER, P.J. et al. Strontium ranelate: New efficient anti-osteoporotic agent for treatment of vertebral osteoporosis in postmenopausal women. **Osteoporosis International**. v. 13, p. S34-S34, 2002.
- MEUNIER, P.J. et al. The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis. **New England Journal of Medicine**. v. 68, p. 350-459, 2004.
- MICHAELSSON, K. et al. Diet, bone mass, and osteocalcin: a cross-sectional study. **Calcified Tissue International**. v. 57, p. 86-93, 1995.
- MILLER, M.M.; FRANKLIN, K.B.J. Theoretical basis for the benefit of postmenopausal estrogen substitution. **Experimental Gerontology**. v. 34, p. 587-604, 1999.
- MILMAN, N.; KIRCHOFF, M. Relationship between serum ferritin and risk factors for ischemic heart disease in 235 Danes aged 30-60 years. **Journal International of Medicine**. v. 245, p. 423-33, 1999.

MILMAN, N.; BYG, K.E.; OVESEN, L. Iron status in Danes 1994. II: Prevalence of iron deficiency and iron overload in 1319 Danish women aged 40-70 years. Influence of blood donation, alcohol intake and iron supplementation. **Annals of Hematology**. v. 79, p. 612-21, 2000.

MINISOLA, S. et al. Bone turnover and its relationship with bone mineral density in pré- and postmenopausal women with or without fractures. **Maturitas**. v. 29, p. 265-270, 1998.

MIQUEL, J. et al. Menopause: A review on the role of oxygen stress and favorable effects of dietary antioxidants. **Archives of Gerontology and Geriatrics**. v. 42, p. 289-306, 2006.

MITRA, S.; DESAI, M.; KHATKHATAY, M.I. Association of estrogen receptor α gene polymorphisms with bone mineral density in postmenopausal Indian women. **Molecular Genetics and Metabolism**. v. 87, p. 80-87, 2006.

MOROHASHI, T.; SANO, T.; YAMADA, S. Effects of strontium on calcium metabolism in rats: I. A distinction between the pharmacological and toxic doses. **Japanese Journal of Pharmacology**. v. 64, p.155-162, 1994.

NAIMARK, B.J. et al. Serum ferritin and heart disease: the effect of moderate exercise on stored iron levels in postmenopausal women. **Canadian Journal of Cardiology**. v. 12, p. 1253-1257, 1996.

NATHAN, L.; CHAUDHURI, G. Antioxidant and pro-oxidant actions of estrogens: potential physiological and clinical implications. **Seminars in Reproductive Endocrinology**. v. 16, p. 309-314, 1998.

NAZIROGLU, M. et al. The effects of hormone replacement therapy combined with vitamins C and E on antioxidant levels and lipid profiles in postmenopausal women with Type 2 diabetes. **Clinica Chimica Acta**. v. 344, p. 63-67, 2004.

NEUFELD, E.B.; BOSKEY, A.L. Strontium alters the complexed acidic phospholipids content of mineralized tissue. **Bone**. v. 15, p. 425-430, 1994.

NIELSEN, S.P. The biological role of strontium. **Bone**. v. 35, p. 583-588, 2004.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.

NOHL, H. Involvement of free radicals in aging. **British Medical Bulletin**. v. 49, p. 653-667, 1993.

OSTE, I. et al. Time-evolution and reversibility of strontium-induced osteomalacias in chronic renal failure rats. **Kidney International**. v. 67, p. 920-930, 2005.

ÖZDEN, S. et al. The effects of hormone replacement therapy on lipid peroxidation and antioxidant status. **Maturitas**. v. 38, p. 165-170, 2001.

PARELMAN, M. et al. Iron restriction negatively affects bone in female rats and mineralization of hFOB osteoblast cells. **Experimental Biology and Medicine**. v. 231, n. 4, p. 378-86, 2006.

PENCHKOFER, S.; SCHWERTZ, D. Improved iron status parameters may be a benefit of hormone replacement therapy. **Journal of Women Health & Gender Based Medicine**. v. 9, p. 141-51, 2000.

PEPI. The Writing Group for the PEPI Trial. Effects of hormone therapy on bone mineral density: results from the Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) trial. **JAMA- Journal of the American Medical Association**. v. 276, p. 1389-1396, 1996.

PINTO NETO, A.M.; SOARES, A.; URBANETZ, A.A. Consenso brasileiro de osteoporose 2002. **Revista Brasileira de Reumatologia**. v. 46, p. 343-354, 2002.

RALSTON, S.H. Osteoporosis. **British Medical Journal**. v. 315, p. 469-472, 1997.

REGINSTER, J.-Y. Prevention of postmenopausal osteoporosis with pharmacological therapy: practice and possibilities. **Journal of Internal Medicine**. v. 255, p. 615-628, 2004.

REINHOLT, F. et al. Stereological studies on the epiphyseal growth plate in strontium-induced rickets. **Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume**. v. 66, n. A, p. 1274-1280, 1984.

REINHOLT, F.P. et al. Proteoglycans and glycosaminoglycans of normal and strontium rachitic epiphyseal cartilage. **Collagen and Related Research**. v. 5, p. 41-53, 1985.

ROSS, R. The pathogenesis of atherosclerosis – A perspective for the 1990s. **Nature**. v. 362, n. 6423, p. 801-809, 1993.

SALO, D.C.; PACIFINI, R.E.; DAVIES, K.J.N. Superoxide dismutase is preferentially degraded by a proteolytic system from red blood cells following oxidative modification by hydrogen peroxide. **Free Radical in Biology and Medicine**. v. 5, p. 335-339, 1988.

SEEMAN, E. et al. Reduced bone mass in daughters of women with osteoporosis. **New England Journal of Medicine**. v. 320, p. 554-558, 1989.

SHANG, S.; HONG, W. Flame atomic absorption spectrometry using a microvolume injection technique for the determination of Cu, Zn, Ca, Mg e Fe in whole blood from healthy infant and mother ears. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**. v. 357, p. 997-999, 1997.

SHOROEDER, H.A.; TRIPTON, I.L.; NASON, A.P. Trace metals in man: strontium and barium. **Journal of Chronic Diseases**. v. 25, p. 491-517, 1972.

SKORYNA, S.C.; FUSKOVA, M. In: SKORYNA SC editor. **Handbook of stable strontium**. New York: Plenum; 1985. p. 593-617.

SIES, H. Oxidative stress: introductory remarks. In: Sies, H., ed. **Oxidative stress**. London: Academic Press, 1985. p. 1-8.

SIES, H. What is oxidative stress? In: Keaney, J. F. Jr., ed. **Oxidative stress and vascular disease**. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 1-8.

SIGNORELLI, S.S.; NERI, S.; SCIACCHITANO, S. et al. Behavior of some indicators of oxidative stress in postmenopausal and fertile women. **Maturitas**. 'in press', 2005.

SILVA, P. Farmacologia. 5° ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan S.A., 1998. p. 776-784.

SOWERS, J.R. Diabetes mellitus and cardiovascular disease in women. **Archives Internal Medicine**. v. 158, p. 617-621, 1998.

SOWERS, M.R. et al. The association of endogenous hormone concentrations and bone mineral density measures in pre- and perimenopausal women of four ethnic groups: SWAN. **Osteoporosis International**. v. 14, p. 44-52, 2003.

STADTMAN, E.R.; LEVINE, R.L. Protein oxidation. Reactive oxygen species: From radiation to molecular biology. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 899, p. 191-208, 2000.

STRAIN, J.J. A reassessment of diet and osteoporosis – possible role for copper. **Medical Hypotheses**. v. 27, p. 333–338, 1988.

STREHLOW, K. et al. Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. **Circulation Research**. v. 93, p. 170-177, 2003.

SUBBIAH, M.T.R. et al. Antioxidant potential of specific estrogens on lipid peroxidation. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. v. 77, p. 1095-1097, 1993.

SUGINO, N. et al. Differential regulation of copper-zinc superoxide dismutase and manganese superoxide dismutase by progesterone withdrawal in human endometrial stromal cells. **Molecular Human Reproduction**. v. 8, p. 68- 74, 2002.

THIBODEAU, P.A. et al. In vitro pro- and antioxidant properties of estrogens. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**. v. 81, p. 227-236, 2002.

TONIOLO, P.G. et al. A prospective study of endogenous estrogens and breast cancer in postmenopausal women. **Journal of The National Cancer Institute**. v. 87, p. 190-197, 1995.

TREVISAN, M. et al. Correlates of markers of oxidative status in the general population. **American Journal of Epidemiology**. v. 154, p. 348-356, 2001.

TURNER, R.T.; ROGGS, B.L.; SPELSBERG, T.C. Skeletal effects of estrogen. **Endocrine Reviews**. v. 15, p. 275-300.

WAHNER, H.W.; DUNN, W.L.; RIGGS, B.L. Noninvasive bone mineral measurements. **Seminars in Nuclear Medicine**. V. 13, p. 282-289, 1983.

WHO. World Health Organization. **Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis**. Technical Report Series 843. Geneva: WHO, 1994.

Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators (WGWHIII). Risk and benefits of estrogen plus progesterone in healthy postmenopausal women. **JAMA-Journal of the American Medical Association**. v. 288, p. 321-33, 2002.

YLÄ-HERTTUALA, S. Oxidized LDL and atherogenesis. **Heart in Stress Annals of The New York Academy of Sciences**. v. 874, p. 134-137, 1999.

7 ANEXOS

7.1 ANEXO 1

Roteiro para autores

Guia para a redação e edição de artigo científico a ser submetido à Revista Maturitas

MATURITAS

The European Menopause Journal
The Official Journal of the European Menopause and Andropause Society (EMAS)

Guide for Authors

Submission of manuscripts proceeds entirely online

For full instructions, please visit <http://www.authors.elsevier.com/issn/03785122>

Submission of a paper to *Maturitas* is understood to imply that it is not being considered for publication elsewhere and that the Author(s) permission to publish his/her article(s) in this journal implies the exclusive authorization of the publisher to deal with all issues concerning the copyright therein. Submission of multi-authored manuscripts to this journal implies the consent of *each* of the authors. The Publisher will assume that the senior or corresponding author has specifically obtained the approval of all other co-authors to submit the manuscript to this journal.

Papers should be submitted online via <http://www.authors.elsevier.com/issn/03785122>. Authors may send queries concerning the submission process, manuscript status, or journal procedures to the *Maturitas* Editorial Office at maturitas@marktwo.nl. Once the uploading is done, the system automatically generates an electronic (PDF) proof, which is then used for reviewing. All correspondence, including the Editor's decision and request for revisions, will be by e-mail.

Manuscripts in English (British or American spelling should be complete in all respects

Title should be informative but should not exceed 85 characters, including spaces.

Abstracts should be limited to 250 words and structured in all full length papers and review articles. Structure as follows: Objectives; Methods; Results; Conclusions.

Artwork, including figures, tables, multi-media and annex material, should be submitted online at <http://www.authors.elsevier.com/issn/03785122>. This site shows how to prepare your artwork for electronic submission and includes information on common problems, suggestions on how to ensure the best results can be gained plus image creation guides for popular applications. See the links under Application Guidelines for details about using specific artwork software for Windows and

Macintosh platforms.

References in the text should be referred to by a number in brackets, e.g. [2,12-14]. Authors are advised to re-check references in the text against the reference list after revision of their manuscript.

List of references at the end of the paper should give the following; for journals: name(s) of author(s) and initials, full title of the article, abbreviated name of journal, year of publication, volume number and the first and (abbreviated) last page numbers; for a chapter in a book: name(s) of authors and initials, full title of article, name(s) of editor(s) and initials preceded by 'In:' and followed by 'ed(s).', title of book, city of publication, publisher, year of publication, first and (abbreviated) last page numbers; and for books: name(s) of author(s) and initials, title of book, city of publication, publisher and year of publication. List all authors when six or less; when seven or more, list first three and add 'et al.'. Articles which are at submitted stage, or personal communications maybe mentioned in parentheses in the text but should not be included in the reference list. References should accord with the system used in Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals (JAMA 1993 May 5; 269: 2282-6). Examples:

[1] Borglin N-E, Staland B. Oral treatment of menopausal symptoms with natural oestrogens. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1975; 43: 117-23.

[2] Copinschi G, Desir D, Fang VS et al. Hormonal changes as a consequence of jet lag: corticotropic axis. In: De Wied D, Van Keep PA, eds. *Hormones and the Brain*. Lancaster: MTP Press, 1980; 285-92.

[3] Van Keep PA, Haspels AA. *Oestrogen Therapy - During the Climacteric and Afterwards*, 2nd edn, Amsterdam: Excerpta Medica, 1980

Authors in Japan please note. Upon request, Elsevier Japan will provide authors with a list of people who can check and improve the English of their paper (*before submission*). Please contact our Tokyo office: Elsevier Japan, Editorial Service, 1-9-15 Higashi Azabu, Minato-ku, Tokyo 106, Japan; Tel: +81-3-5561-5032; Fax: +81-3-5561-5045; E-mail: info@elsevier.co.jp

Proofreading. One set of proofs will be sent to the author to be checked for printer's errors; *no changes in or additions to the edited manuscripts will be allowed at this stage*. The corrected proof should be returned to the Publisher within 3 days of receipt.

Reprints may be ordered by filling in and returning to the Publisher, the order form sent to the authors upon acceptance of their papers. Twenty-five free reprints per contribution will be made available.

Book reviews will be published as space permits. Books within the scope of the journal should be sent to the Publisher at the following address: The Publisher, Maturitas, Elsevier, PO Box , Amsterdam, The Netherlands.

7.2 ANEXO 2

Questionário aplicado às mulheres participantes deste estudo

Este questionário foi aplicado por um pesquisador treinado que explicava às pacientes cada uma das questões.

FICHA DA PACIENTE

CÓDIGO DE IDENTIFICAÇÃO: _____

Nome: _____

Endereço: _____

Cidade: _____

Estado: _____ **CEP:** _____

Telefone: _____

1. Data de nascimento: _____

2. Raça: () negra () branca () amarela

3. Menstruação: () normal () irregular () menopausa – Há quanto tempo? _____

4. Histórico obstétrico (filhos): _____

5. Tempo de aleitamento: _____

6. Pressão arterial: _____

7. Fumante: () Sim () Não nº de cigarros por dia? _____

8. Consumo de bebida alcoólica: () Sim () Não nº de doses por semana? _____

9. Prática de exercício físico: () Não Faz () Leve () Moderado () Intenso

10. Doenças diagnosticadas: () já tratadas () em tratamento

() diabetes. Qual? _____

() doenças endócrinas (Tireóide). Qual (s)? _____

() doenças renais. Qual (s)? _____

() doenças da medula óssea. Qual (s)? _____

() doenças cardíacas /ou vasculares (varizes). Qual (s)? _____

() doenças pulmonares. Qual (s)? _____

() outras doenças. Qual (s)? _____

11. Medicações em uso :

12. Terapia de Reposição com Hormônios: () Sim () Não

Há quanto tempo? _____

Tipos de Hormônios usados (TRH):

() estrogênios conjugados

() estradiol

() estradiol + Progesterona

() outro e/ou nome comercial do medicamento usado na terapia hormonal _____

13. Usa Cálcio (suplemento): () Sim () Não Quanto tempo? _____

Tipos de Cálcio:

() industrializado

() industrializado com vitamina D

() manipulado

() manipulado com vitamina D

14. Usa ou usou Corticóides: () Sim () Não Quanto tempo? _____

15. Após os 45 anos já sofreu algum tipo de fratura em algum dos locais abaixo citados:

() quadril () coluna vertebral () fêmur () punho

16. Consome regularmente algum (s) desses alimentos abaixo citados? Com que frequência?

- () Leite (n° copos por dia): _____
- () Leite em pó (n° de colheres por dia): _____
- () Iogurte (unidades por dia): _____
- () Queijo (n° fatias por dia): _____
- () Peixes (sardinha, linguado...) (porções por semana): _____
- () Vegetais verdes escuros (porções por dia): _____
- () Amêndoas (unidades por semana): _____
- () Soja (porções por semana): _____
- () Melado (n° colheres por dia): _____

Avaliações antropométricas (para cálculo do índice de massa corporal – IMC):

17. Peso: _____

18. Altura: _____