

**ALEXANDRE MAITELLI**

**EFEITO DA TERAPIA HORMONAL SOBRE A RESPOSTA IMUNE NO  
CLIMATÉRIO**

**Orientador: Prof. Dr. Sebastião Freitas de Medeiros**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO  
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO - REPRODUÇÃO HUMANA E CLIMATÉRIO**

***CUIABÁ – MT***

***2009***

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO  
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO - REPRODUÇÃO HUMANA E CLIMATÉRIO**

**EFEITO DA TERAPIA HORMONAL SOBRE A RESPOSTA IMUNE NO  
CLIMATÉRIO**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde - Área de Concentração *Reprodução Humana e Climatério* - Linha de Pesquisa em *Endocrinologia Ginecológica e Climatério*.**

**ALEXANDRE MAITELLI**

**Cuiabá – MT**

**2009**

### FICHA CATALOGRÁFICA

M232e Maitelli, Alexandre  
Efeitos da terapia hormonal sobre a resposta imune no climatério / Alexandre Maitelli. – 2009.  
xv, 90 f. : il. ; color ; 30 cm.

“Orientador: Prof. Dr. Sebastião Freitas de Medeiros”.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Ciências Médicas, Pós-graduação em Ciências da Saúde, Área de Concentração: Reprodução Humana e Climatério, Linha de Pesquisa em Endocrinologia Ginecológica e Climatério, 2009.

Bibliografia: f. 65-74.

Inclui anexos.

1. Menopausa. 2. Climatério. 3. Climatério – Terapia hormonal. 4. Esteróides sexuais. I. Título.

CDU – 618.173

Ficha elaborada por: Rosângela Aparecida Vicente Söhn – CRB-1/931

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO  
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO - REPRODUÇÃO HUMANA E CLIMATÉRIO**

***Diretor da Faculdade de Ciências Médicas***

Prof. Dr. Antônio Amorim

***Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde***

Prof. Dr. Cór Jesus Fernandes Fontes

**Cuiabá/ MT**

**2009**

O presente estudo foi desenvolvido no Ambulatório de Climatério do Hospital Universitário Júlio Muller, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT) e Ambulatório de Ginecologia do Departamento de Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Cuiabá (UNIC) e recebeu apoio financeiro da Fundação do Amparo à Pesquisa de Mato Grosso (FAPEMAT).

**ALEXANDRE MAITELLI**

**EFEITO DA TERAPIA HORMONAL SOBRE A RESPOSTA IMUNE NO  
CLIMATÉRIO**

**Presidente da Banca**

Prof. Dr. Sebastião Freitas de Medeiros

**Banca Examinadora**

Prof<sup>a</sup>. Dra. Deijanira Alves de Albuquerque

Prof. Dr. Almir Urbanetz

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais Alcides e Gilda pelo exemplo de vida privada e profissional, dedicação à família e amor, e pelo apoio sempre em todas minhas realizações.

À minha esposa Daniela, meu grande amor, pela sua grandiosidade, compreensão, apoio, auxílio, paciência durante este período e sempre, em todos os momentos.

Aos meus amados filhos Ana Caroline e João Vitor, por pacientemente sempre aguardarem pela minha atenção.

Ao meu irmão André pelo seu exemplo e incentivo mesmo a distância.

À minha irmã Adriana pelo apoio, auxílio e incentivo.

Aos pacientes que participaram do estudo.

Ao Hospital Universitário Júlio Muller e Universidade Federal de Mato Grosso, berços da minha formação acadêmica.

Ao Hospital Geral Universitário presente em etapas da minha formação universitária e de especialização.

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Dr. Sebastião Freitas de Medeiros pelo apoio, colaboração e paciência na orientação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Cór Jesus Fernandes Fontes pelo seu apoio valioso no encaminhamento do estudo.

À Solange Prado e Claudia Piau pela paciência, empenho, colaboração e apoio.

Aos pacientes sem os quais não poderíamos avançar em nenhum campo da medicina.

Aos funcionários do HUJM e HGU pela colaboração.

Ao Laboratório Cedilab e Laboratório Álvaro pela realização de exames laboratoriais e pelo fornecimento de materiais científicos.

Ao Laboratório Bayer na pessoa do representante comercial Pona pelo apoio e incentivo ao fornecer as medicações utilizadas.

À Fapemat pelo apoio financeiro.

**SUMÁRIO**

Abreviatura e Siglas	x
<i>Lista de Figuras e Tabelas</i>	<i>xii</i>
I. Resumo	<i>xiii</i>
II. Abstract	<i>xiv</i>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
1.1 Interação dos sistemas imune e endócrino	17
1.2 Efeitos dos esteróides sexuais na resposta imunológica	20
1.3 Função imune durante o ciclo menstrual	23
1.4 Menopausa, hipoestrogenismo e sistema imune	23
1.5 Efeitos da terapia hormonal na resposta imune após a menopausa	25
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	<b>32</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>35</b>
3.1 Objetivo geral	35
3.2 Objetivos específicos	35
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>37</b>
4.1 Desenho do estudo e tamanho da amostra	37
4.2 Dados Epidemiológicos	37
4.3 Tratamento	38
4.4 Casuística	38
4.5 Critérios de inclusão e exclusão	38
4.6 Coleta e processamento das amostras de sangue	39
4.7 Testes cutâneos de hipersensibilidade	40
4.8 Contagem dos diferentes tipos de células sanguíneas	41
4.8.1 Contagem do total de células	41
4.8.2 Contagem dos subtipos de linfócitos T e B	41
4.9 Dosagem de imunoglobulinas	42

4.10 Dosagem de Interleucinas	42
4.11 Análise estatística	43
4.12 Considerações éticas	43
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>46</b>
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>54</b>
<b>7. CONCLUSÕES</b>	<b>63</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>65</b>
<b>9. APÊNDICES</b>	<b>75</b>
9.1 Apêndice 1	77
9.2 Apêndice 2	79
9.3 Apêndice 3	81
<b>10. ANEXOS</b>	<b>82</b>
10.1 Anexo 1	84
10.2 Anexo 2	86
10.3 Anexo 3	88
10.4 Anexo 4	90

**ABREVIATURAS E SIGLAS**

**IL** – Interleucinas

**IFN- $\alpha$**  – Interferon  $\alpha$

**NK** – células matadoras naturais (*natural Killer*)

**TNF** – Fator de necrose tumoral

**PRL** – Prolactina

**GnRH** – Hormônio liberador de gonadotrofinas

**DHEA** – Dehidroepiandrosterona

**DHEA-S** – Sulfato de dehidroepiandrosterona

**GM-CSF** – macrófagos granulócitos

**TE** – Terapia com estrogênio

**TH** – Terapia hormonal

**PCR** – Proteína C reativa

**SAA** – Proteína sérica amilóide A

**IgG** – Imunoglobulina G

**IgM** – Imunoglobulina M

**IgA** – Imunoglobulina A

**IgE** – Imunoglobulina E

**PBMC** – Células mononucleares de sangue periférico

**mRNA** – RNA mensageiro

**T** – Testosterona

**DHT** – Dihidrotestosterona

**ICAM-1** – Moléculas de adesão intracelular-1

**MPC-1** – Proteína quimioatrativa de monócitos-1

**IMC** – Índice de massa corpórea

**HLA-DR** – Antígeno leucocitário humano

## **LISTA DE FIGURAS E TABELAS**

<b>Figura 1.</b>	<b>47</b>
Distribuição da dimensão da induração produzida pela tuberculina antes e após terapia hormonal em mulheres na pós-menopausa.	
<b>Figura 2.</b>	<b>47</b>
Box-plot da distribuição da induração cutânea aos alérgenos asperginina (Painel A), E. coli (Painel B), candidina (Painel C) e tricofitina (Painel D) antes e após terapia hormonal em mulheres na pós-menopausa.	
<b>Figura 3.</b>	<b>49</b>
Distribuição dos leucócitos totais circulantes (Painel A), neutrófilos (Painel B) e linfócitos totais (Painel C) em mulheres pós-menopausa antes e após terapia hormonal combinada contínua.	
<b>Figura 4.</b>	<b>50</b>
Distribuição dos resultados de linfócitos CD3+ (Painel A), CD4+ (Painel B), CD8+ (Painel C) e CD19+ (Painel D) em mulheres pós-menopausa antes e após terapia hormonal.	
<b>Figura 5.</b>	<b>51</b>
Box-plot das medidas séricas de IgA (Painel A), IgE (Painel B), IgM (Painel C) e IgG (Painel D) em mulheres na pós-menopausa antes e após terapia hormonal combinada contínua.	
<b>Figura 6.</b>	<b>52</b>
Distribuição dos níveis séricos de IL-6 (painel A) e IL-10 (painel B) em mulheres na pós-menopausa antes e após terapia hormonal combinada contínua.	
<b>Tabela 1</b>	<b>48</b>
Características antropométricas e epidemiológicas das pacientes	
<b>Tabela 2</b>	<b>48</b>
Testes de hipersensibilidade cutânea a diferentes alérgenos em mm	

## RESUMO

**Objetivo:** Examinar o impacto da terapia estroprogestogênica sobre as respostas imunes celular e humoral em mulheres após a menopausa. **Métodos:** Estudo prospectivo, coorte, com intervenção. A resposta imune celular foi avaliada através de teste de hipersensibilidade cutânea tardia na menopausa empregando cinco alérgenos comuns antes e após três meses da terapia estroprogestogênica. Além disso, o número de cada tipo de leucócitos foi estimado antes e após a terapia hormonal. Os diferentes subtipos de linfócitos foram determinados por citometria de fluxo. A resposta imune humoral foi avaliada pela dosagem de imunoglobulinas e interleucinas 6 e 10. As imunoglobulinas G, A e M foram medidas por nefelometria e a IgG por eletroquimioluminescência. As concentrações séricas de IL-6 e IL-10 foram determinadas por quimioluminescência. **Resultados:** A TH induziu maior resposta ao antígeno tuberculina, mas não modificou o número total de leucócitos, eosinófilos, neutrófilos, linfócitos, linfócitos CD4+ e CD8+ e linfócitos B. Monócitos e a razão CD4+/CD8+ sofreram leve modificação ( $p=0,057$ ). Os níveis de IL-6 permaneceram estáveis e a concentração de IL-10 aumentou significativamente após a TH. **Conclusão:** Os resultados indicam uma melhora da resposta imune celular e humoral com a TH.

**Palavras-chaves:** Esteróides sexuais, terapia hormonal, menopausa, citocinas, resposta imune.

## ABSTRACT

**Objective:** To examine the impact of estrogen plus progestogen therapy on the immune responses of post-menopausal women. **Methods:** This prospective cohort study, with intervention, evaluated the cellular immune response by testing the delayed-type cell mediated hypersensitivity in post-menopausal women using five common allergens before and after three months of EPT. In addition, each type of leukocyte cells was counted before and after EPT. Different subtypes of lymphocytes were determined by flow cytometry. In regards to humoral response, immunoglobulins G, A, and M were measured by nephelometry and IgE by electrochemiluminescence. The concentrations of IL-6 and IL-10 were determined by chemiluminescence. **Results:** EPT induced higher response to tuberculin antigen but did not change the number of total leukocytes, eosinophils, neutrophils, lymphocytes, CD4+, and CD8+ B cells. Monocytes and CD4+/CD8+ ratio have suffered slight modification ( $p=0.057$ ). IL-6 levels remained stable and IL-10 concentrations increased significantly after EPT. **Conclusion:** The results indicate an improvement of cellular immune and humoral responses with EPT.

**Keywords:** Sexual steroids, hormone therapy, menopause, cytokines, immune response.

# **1. INTRODUÇÃO**

---

## 1. Introdução

Sintomas vasomotores, nervosismo, diminuição da memória e fadiga são as principais manifestações clínicas do climatério e acometem cerca de 60% das mulheres nesta fase<sup>1</sup>. A atrofia urogenital e a osteoporose surgem após alguns anos. A imunossenescência talvez reflita alterações celulares e humorais em todo o processo de gerar resposta específica a antígenos estranhos. As modificações da resposta imune humoral com a idade incluem (1) resposta prejudicada no reconhecimento de antígenos não-próprios, (2) aumento na produção de autoanticorpos e complexos imunocirculantes, (3) diminuição na produção de IL-4, (4) diminuição na síntese de imunoglobulinas<sup>2</sup> e (5) declínio na função dos linfócitos B<sup>4</sup>. A resposta imunocelular também declina com a idade e resulta em (1) reação retardada aos antígenos de memória<sup>3</sup> e (2) aumento na secreção de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )<sup>2</sup>. Tanto aumento como diminuição na relação CD4/CD8 foram descritos em seres humanos idosos. Parece não ocorrer nenhuma mudança nos macrófagos acessórios, células dendríticas ou antígeno para os quais os linfócitos B são específicos.

Além da idade, os esteróides sexuais também modulam a resposta imune. Enquanto estrogênios parecem estimular a resposta imune, androgênios e progestogênios mostram uma tendência oposta. Na verdade, os estrogênios tem efeitos tanto estimuladores (em doses baixas) como supressores (em altas doses) sobre a função imunológica. Receptores de estrogênio foram encontrados em certas sub-populações de linfócitos e, nestas células, este esteróide pode alterar a função, reduzir a produção de fatores imunorreguladores, limitar a expressão de antígenos e

diminuir a capacidade dos linfócitos de interagir com outras células<sup>5</sup>. Modificações no sistema imune em mulheres após a menopausa tem sido parcialmente atribuídas ao hipoestrogenismo. No entanto, a existência de associação ou não entre um determinado evento com um fator causal exige que se considere a plausibilidade biológica e a consistência clínica examinada por estudos clínico-epidemiológicos.

### **1.1 Interações dos sistemas imune e endócrino**

O sistema imune tem a capacidade de proteger o organismo contra agentes que possam causar dano tissular ou doença. Esta capacidade de defesa é operacionalizada pelos órgãos linfóides imunes primários, onde células especializadas em promover resposta imunológica na presença de antígenos não-próprios são desenvolvidas. O sistema imune também mantém a memória do primeiro contato, de tal modo que, numa segunda exposição ao mesmo agente externo, haja indução de uma resposta mais acentuada. A imunidade inata, responsável pela resposta imune inicial, envolve barreiras físicas, enzimas, complemento e citocinas em seu componente humoral, e neutrófilos, basófilos, eosinófilos, macrófagos e células matadoras naturais (NK) em seu componente celular. A resposta imune adaptativa humoral opera por anticorpos produzidos pelos linfócitos B e a imunidade adaptativa celular é mediada pelos linfócitos T. Células acessórias e efectoras (macrófagos) capazes de destruir agentes não-próprios também podem ser encontradas no sistema fagocítico mononuclear (macrófagos, monócitos) ou mesmo outras células do sistema imune<sup>6</sup>.

A existência de uma interação marcante entre os sistemas imune e endócrino está fundamentada na observação de que (1) as células de ambos os sistemas possuem receptores para citocinas, neurotransmissores e neuropeptídeos, (2) produtos imuno-neuroendócrinos são achados em ambos os tecidos, linfóide e endócrino, (3) mediadores endócrinos podem modular o sistema imune e (4) mediadores imunes podem afetar estruturas do sistema endócrino<sup>7</sup>. Sabe-se que receptores para diferentes hormônios não se manifestam do mesmo modo em todos os tipos de células do sistema imunológico e tanto o número como a atividade destes receptores são dependentes da ativação celular. Células do sistema imune, via receptores, podem ligar prolactina (PRL), hormônio de crescimento, corticosteróides, estradiol e testosterona. Por outro lado, receptores para os produtos imunoderivados também são expressos em glândulas endócrinas; assim, receptores para interleucinas são expressos na hipófise, adrenal, ovários, tireóide e pâncreas. Citocinas e pequenos hormônios peptídeos estão, em associação, envolvidos numa ampla variedade de processos imunoinflamatórios ligando os sistemas endócrino, imunológico e neurológico.

O eixo hipotálamo-hipófise-tireóide pode ser inibido pela IL-1, fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  e IL-6. O hormônio tireotrópico aumenta a produção de anticorpos. O hormônio de crescimento induz a proliferação dos linfócitos T e a produção de superóxido aniônico pelos macrófagos. A PRL estimula o sistema imunológico, mas a hiperprolactinemia inibe a função auto-imune. O papel da PRL no sistema imunológico pode ser concentração-dependente. Assim, um nível ótimo de PRL parece ser necessário para a função linfocítica adequada. Tanto os linfócitos T como os linfócitos B tem receptores para PRL e produzem substância semelhante à PRL, com possível envolvimento na imunomodulação<sup>8</sup>.

O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal pode influenciar a função imunológica. Em geral, o hormônio adrenocorticotrópico, os glicocorticóides e os androgênios deprimem a resposta imune in vitro. Por outro lado, as interleucinas podem estimular o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal<sup>7</sup>. O hormônio adrenocorticotrópico pode, por si, inibir a produção de anticorpos e a secreção de linfocinas ou IFN- $\gamma$  pelos linfócitos B e T, respectivamente. Além disso, sob estresse, os linfócitos perdem sua capacidade de responder aos agentes mitogênicos. O cortisol, em alta concentração, inibe a síntese de anticorpos, a produção de citocinas e a proliferação dos linfócitos. De uma maneira geral, os glicocorticóides suprimem a maturação, diferenciação e proliferação das células imunológicas, atenuando tanto a resposta imune inata como a adquirida<sup>9</sup>. Na resposta inata, os corticosteróides reduzem o número de monócitos circulantes, inibem a secreção de IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ , prejudicando o sistema colagenase, elastase e ativador do plasminogênio tissular. Em adição, glicocorticóides exercem duplo efeito sobre os neutrófilos: afetam a ativação/função e elevam o número total por diminuição da apoptose. Corticóides modificam o padrão da imunidade celular a favor da humoral. Ao diminuir a resposta imune celular, inibem a expressão dos agentes pró-inflamatórios IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\beta$ , prejudicando a diferenciação dos monócitos em macrófagos, células NK e células T CD8+, responsáveis pela fagocitose e destruição dos agentes estranhos, respectivamente. Ao estimular a resposta humoral o corticóide favorece a síntese de citocinas antiinflamatórias (IL-4, IL-10, IL-13), estimulando a diferenciação de eosinófilos, mastócitos e linfócitos B, importantes para a produção de anticorpos de defesa<sup>5</sup>.

O eixo hipotalámo-hipófise-ovariano também pode modular a função imune. O hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) parece estar implicado tanto no

desenvolvimento como na modulação deste sistema<sup>10</sup>. Por outro lado, receptores específicos do GnRH são expressos em monócitos e linfócitos T e B<sup>11</sup>. O papel fisiológico extra-hipofisário do GnRH no sistema imunológico é ainda pouco entendido. O uso de análogos do GnRH pode aumentar o número de células NK e a capacidade dos linfócitos T responderem aos mitógenos. Considerando como função recíproca, quando administrada centralmente a IL-1 diminui tanto a secreção de GnRH como a do hormônio luteinizante<sup>12</sup>. Tanto em animais de experimentação como em humanos, estradiol e testosterona atenuam a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ <sup>2</sup>.

## **1.2 Efeitos dos esteróides sexuais na resposta imunológica**

Risco maior de mulheres desenvolverem doenças auto-imunes sugere que estas doenças são de algum modo mediadas pelos esteróides sexuais. A influência destes esteróides no sistema imune é um processo genômico e exige a existência de receptores apropriados. Estes receptores podem ligar diferentes hormônios ovarianos e adrenais, mas não estão presentes em todos os tipos de células do sistema imunológico. Mulheres têm o timo mais desenvolvido, maiores níveis de imunoglobulinas e maior proporção de linfócitos T CD4/CD8 na circulação periférica<sup>13</sup>. Por outro lado, as células NK têm menor atividade citotóxica e menor citotoxicidade celular dependente de anticorpos<sup>14</sup>. Os esteróides gonadais podem regular o número de monócitos, sua produção de citocinas e a diferenciação destes monócitos em macrófagos, exercendo suas funções sobre o sistema imunológico por modificar a secreção das citocinas imunomoduladoras e regular a expressão de

receptores na superfície celular. Estes mecanismos influenciam tanto o número como a função celular.

O estrogênio não altera a atividade celular imunossupressora, mas concernente à imunidade humoral, em concentrações fisiológicas, estimula a produção de imunoglobulinas, possivelmente pela inibição dos linfócitos T supressores<sup>5</sup>. Há fortes evidências de que o estrogênio causa mudanças tanto no número total de linfócitos como nos seus diferentes subtipos. *In vitro*, os estrogênios promovem a proliferação dos linfócitos T, diferenciação, proliferação e sobrevivência dos linfócitos B e maior produção de imunoglobulinas IgG e IgM<sup>15</sup>. O estrogênio também pode suprimir a linfopoiese B, devido à existência de receptor específico nas células do estroma da medula óssea, e aumentar a produção de IgG e IgM nos linfócitos B em seres humanos, via maior produção de IL-10 nos monócitos<sup>15</sup>. Além do mais, estudos clínicos têm mostrado que o estrogênio deprime a imunidade celular, suprime a atividade das células NK<sup>15</sup>, diminui a produção de TNF- $\alpha$ <sup>16</sup>, aumenta a produção de anticorpos (IL-10) e ativa os macrófagos com maior produção de IL-1, IL-4, IL-6, IFN- $\alpha$  e TNF- $\alpha$ <sup>17</sup>. Nos monócitos humanos, o estradiol diminui os níveis de IL-6 e não altera os níveis de TNF- $\alpha$ <sup>18</sup>.

Os estrogênios facilitam a inibição da proliferação das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) em resposta a antígenos não-próprios<sup>19</sup>. O estradiol também aumenta os antígenos nas células epiteliais uterinas e as concentrações de IgA e IgG nas secreções deste órgão e estimula ainda o mRNA do IFN- $\gamma$  nos linfócitos e a expressão dos receptores desta citocina no endométrio.

A progesterona tem efeito imunossupressor sobre o sistema imunocelular e pode aumentar a atividade dos linfócitos supressores T (CD8). Em baixas

concentrações, estimula a secreção de IL-6; enquanto em níveis mais elevados, tem uma ação inibitória sobre esta interleucina. A progesterona, em níveis de até 5 ng/mL, aumenta a produção de TNF- $\alpha$  e, em concentrações maiores, inibe a produção desta citocina. Vários estudos demonstram que, durante a gravidez, ocorre supressão do sistema imunocelular para prevenir a rejeição materna fetal, pelo aumento nos níveis de estrogênio e/ou progesterona<sup>20</sup>. Apoio a este papel supressivo da progesterona é dado pelo conhecimento de que muitas doenças auto-imunes, como a artrite reumatóide e a esclerose múltipla, podem melhorar com a gravidez e piorar depois do parto. Nos monócitos humanos, a progesterona eleva a síntese das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-6<sup>18</sup>.

Os androgênios são principalmente supressores das imunidades celular e humoral, tendo a capacidade de modificar tanto as ações dos linfócitos T como dos linfócitos B, além de regular as funções imunocompetentes do linfócito T<sup>20</sup>. A testosterona não age nas células imunossupressoras. Receptores para a dehidroepiandrosterona (DHEA) foram identificados nos linfócitos T humanos, mas é possível que androgênios com fraca atividade biológica atuem apenas após conversão em androgênios ativos (T e DHT) ou em estrogênios (estrone, estradiol). Enzimas capazes desta conversão são expressas nos PBMC e macrófagos. A DHEA parece capaz de aumentar a secreção de IL-2<sup>21</sup>, ativar as células NK e inibir a liberação de IL-6 *in vitro*. No entanto, nenhum benefício sobre a resposta imune foi mostrado com seu uso clínico<sup>22</sup>. Os androgênios, como os estrogênios, podem ainda suprimir a linfopoiese B em consequência da presença de receptor específico antagonista androgênico na medula óssea. Via conversão metabólica a estrogênios, os androgênios podem também estimular a resposta imune-humoral<sup>20</sup>. Em

monócitos humanos, a testosterona estimula a síntese da citocina pró-inflamatória IL-6 e não modifica a produção de TNF- $\alpha$ <sup>18</sup>.

### **1.3 Função imune durante o ciclo menstrual**

Tanto a resposta imunológica celular como a humoral podem ser modificadas de acordo com as fases do ciclo menstrual<sup>23</sup>. A fase menstrual está associada com a supressão das células NK<sup>24</sup>. Na fase folicular, há um domínio da resposta imunocelular. Durante o período pré-ovulatório, há diminuição na atividade citolítica das células NK<sup>25</sup>; durante a fase lútea, há uma mudança da resposta imunocelular em direção à humoral. Na fase lútea média, a progesterona aumenta a produção de IL-1, diminui as concentrações de IL-6, não altera os níveis de IL-10 e diminui a capacidade das células secretoras de inibir o PBMC. Na fase lútea tardia, há também maior produção de IL-1 $\beta$  e IL-4 e aumento no número de granulócitos, monócitos, linfócitos e no número total de leucócitos circulantes<sup>23</sup>. Nesta fase, a progesterona induz diferenciação celular e modifica a composição/função das células imunes no endométrio. A ação citolítica dos linfócitos CD3+ CD8+ é suprimida na fase secretora pela ação da progesterona<sup>25</sup>. Não há nenhuma diferença na porcentagem de distribuição dos subtipos de linfócitos durante qualquer uma das fases do ciclo menstrual, favorecendo a síntese do fator bloqueador induzido pela progesterona<sup>26</sup>.

### **1.4 Menopausa, hipoestrogenismo e sistema imune**

O processo de envelhecimento está associado à diminuição da resistência às infecções, talvez em consequência do comprometimento do sistema imune resultante da própria idade. O declínio dos esteróides sexuais tem implicações também nos tecidos não reprodutivos. Logo, níveis baixos de estrogênio, observados em animais castrados ou em mulheres após a menopausa, têm mostrado atenuar a resposta imune e predispor o organismo à invasão microbiana e infecção<sup>27,28</sup>. Em estudos utilizando animais, a retirada dos hormônios sexuais por gonadectomia parece estimular a resposta imune celular e a reposição destes hormônios induz resposta contrária. Em macacas, o hipoestrogenismo reduz a atividade das células NK, eleva a produção de CD8+, células HLA-DR CD3+ e diminui a proporção de eosinófilos<sup>29</sup>. Mulheres na pós-menopausa têm menor número de células secretoras de citocinas do que na pré-menopausa<sup>30</sup>. A perda da função ovariana com a menopausa está associada ao aumento dos marcadores séricos pró-inflamatórios (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , selectina-E, moléculas de adesão intracelular ICAM-1) e hiperresponsividade das células do organismo a estas citocinas em consequência do aumento no número de receptores e cofatores facilitadores da ação das citocinas<sup>29</sup>. Um estudo de corte transversal relatou diminuição nos números de linfócitos CD4, linfócitos B e atividade citotóxica das células NK em mulheres após a menopausa<sup>31</sup>. As subpopulações de linfócitos T não diferem em mulheres pré e pós-menopausa<sup>32</sup>.

Níveis baixos de estrogênio e sulfato de Dehidroepiandrosterona (DHEA-S) em mulheres pós-menopausa resultam em diminuição do número de células secretoras de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , contribuindo com o declínio da reatividade

imunológica. Uma correlação positiva entre os níveis séricos de estrogênio e a relação CD4/CD8 foi constatada. Após ooforectomia, a porcentagem de linfócitos CD19, razão CD4/CD8 e níveis séricos de IL-4 e IFN- $\gamma$  diminuem<sup>33</sup>. As mulheres com falência ovariana prematura têm diminuição das células NK (CD3-/CD16+/CD56) e aumento tanto dos linfócitos B (CD19) como dos linfócitos T (CD8 HLA-DR)<sup>34</sup>. Um aumento significativo nas IL-1 e IL-6 foi também detectado após a menopausa. Na verdade, vários estudos observaram aumento nos níveis séricos de IL-6 e TNF- $\alpha$  após a menopausa, tanto natural como cirúrgica<sup>34,35</sup>. Um aumento nas citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  e na atividade do fator estimulante de colônias secretadas pelos macrófagos granulócitos (GM-CSF) foi detectado em cultura de monócitos circulantes, osso, macrófagos medulares e osteoblastos na deficiência estrogênica<sup>35</sup>. Estudos clínicos experimentais sugerem a existência de associação entre aumento das citocinas pró-inflamatórias e a perda óssea que segue a menopausa. De fato, a IL-6, forte fator de reabsorção óssea, aumenta após a menopausa<sup>36</sup>.

### **1.5 Efeitos da terapia hormonal na resposta imune após a menopausa**

A terapia com estrogênio (TE) em mulheres após a menopausa é eficiente na atenuação dos sintomas vasomotores, reversão da atrofia genital, inibição da perda da massa óssea e diminuição do risco de fraturas. Efeitos potencialmente benéficos da TE/TH em outros sistemas necessitam maior investigação. Estudos recentes indicam a ocorrência de várias mudanças na resposta imune, tanto após a retirada dos hormônios esteróides sexuais como após sua substituição<sup>37,38</sup>. O

hipoestrogenismo nas mulheres após a menopausa pode afetar a resposta imune<sup>35</sup>. Do mesmo modo que a retirada dos estrogênios pode aumentar a liberação das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , a administração de estrogênios pode inibir sua expressão e liberação<sup>39</sup>. Numerosos estudos demonstraram existir plausibilidade biológica entre o uso de esteróides sexuais e os mecanismos moduladores de defesa do organismo em mulheres após a menopausa; no entanto, a eficácia ou não da TH/TE em melhorar estes mecanismos necessita de mais informações clínicas e epidemiológicas.

O efeito da TH/TE sobre a resposta imunocelular em mulheres na pós-menopausa foi avaliado em alguns estudos. Em estudo caso controle recente, as usuárias de estrogênios conjugados mostraram elevação no número total de leucócitos em relação às não usuárias. No entanto, a contagem dos diferentes subtipos de leucócitos foi semelhante nos dois grupos<sup>40</sup>. Manyonda et al.<sup>41</sup> trataram 15 mulheres com um sistema adesivo contendo 100  $\mu$ g de estradiol, seguido por uma combinação de estrogênio e progestogênio, aplicado duas vezes por semana, como terapia de longo prazo. A combinação induziu mudanças significativas nos diferentes tipos de linfócitos e diminuição na hipersensibilidade, quando testada pelas provas de sensibilidade da pele e reação mista de linfócitos, mostrando que o estradiol atenua a resposta inflamatória celular em mulheres após a menopausa. O efeito da TH na imunidade celular foi também avaliado em mulheres na pós-menopausa, sedentárias ou fisicamente ativas, com o objetivo primário de avaliar a influência da atividade física sobre o sistema imunológico<sup>42</sup>. A reatividade mitogênica dos linfócitos no grupo recebendo TH foi menor que a observada no grupo não recebendo esta terapia. Houve também tendência para a reatividade linfocitária T ser maior nas mulheres ativas, quando comparadas com as sedentárias. Não houve

nenhuma mudança na atividade celular NK, representativa da imunidade inata do sistema imune. Concluiu-se que o efeito supressivo da TH na função dos linfócitos T em mulheres pós-menopausa pode ser minimizado pelo exercício físico. Estudo posterior observou que a diminuição dos linfócitos T (CD3, CD19) em mulheres pós-menopausa foi maior após a introdução de TH. No entanto, linfócitos T (CD3, CD25 e CD3 HLA-DR), com maiores concentrações em mulheres na pós-menopausa, não diminuíram após a TH. Pelo contrário, depois de seis meses de TH, a menor citotoxicidade NK vista em mulheres após a menopausa eleva-se a um valor semelhante ao observado na pré-menopausa<sup>32</sup>. Em um pequeno ensaio clínico controlado, a atividade lítica das células NK e a citotoxicidade celular anticorpo-dependente foram analisadas em mulheres pós-menopausa depois de tratamento com estradiol oral ou transdérmico<sup>43</sup>. As mulheres tratadas tiveram diminuição na atividade das células NK logo após três semanas do início do tratamento. Não obstante, as mulheres pós-menopausa ainda apresentaram atividade NK maior do que o grupo controle de mulheres na pré-menopausa. Não houve nenhuma diferença na toxicidade celular anticorpo-dependente entre mulheres pré-menopausa e as pacientes pós-menopausa usuárias de estradiol. Outro estudo controlado mostrou que a TH favorece a proliferação dos linfócitos e atenua a citotoxicidade natural mediada pelos leucócitos<sup>44</sup>. Em adição, a TH mostrou reversão nas alterações imunológicas associadas ao envelhecimento. Assim, a TH aumenta o número dos linfócitos B, a atividade mitótica dos linfócitos T e o TNF- $\alpha$ , com preservação ou melhora da função imunológica. Estudo mais recente confirmou diminuição da atividade citotóxica das células NK em mulheres em TH<sup>45</sup>. Como as células NK constituem primeira linha na defesa contra infecção viral e inibição de crescimento tumoral e os estudos sobre a TH e atividade das células NK são ainda

escassos ou inconsistentes, maiores ensaios clínicos são necessários para avaliar a possível repercussão negativa da TH/TE nestas duas condições clínicas.

Em síntese, 14 estudos, publicados entre 1992 e 2006, examinaram os efeitos da TH sobre a resposta imune celular em mulheres após a menopausa. Todos investigaram o efeito do estrogênio oral ou transdérmico associado ou não ao acetato de medroxiprogesterona ou noretisterona por tempo inferior a seis meses. Apenas um estudo incluiu usuárias de TH por mais de 12 meses<sup>46</sup> e três compararam TH com placebo<sup>43,44,46</sup>. A proliferação dos linfócitos, examinada em estudo isolado pela reação mista linfocitária e sensibilidade dérmica a múltiplos antígenos, foi precocemente atenuada com o uso de estradiol transdérmico<sup>41</sup>. Tanto diminuição<sup>41,44</sup> como elevação<sup>32,40</sup> ou nenhuma modificação do número total de leucócitos<sup>46</sup> ou da citotoxicidade das células NK foram documentadas após TH combinada. Quatro estudos demonstraram diminuição da produção das citocinas relacionadas à imunidade celular na resposta inflamatória (IL-2, INF- $\gamma$ )<sup>33,34,45,47</sup>. Elevação do IFN- $\alpha$  foi documentada em um único estudo<sup>46</sup>. No conjunto, estes estudos indicam que a TH melhora ou resgata a resposta imune celular afetada após a menopausa.

Modificações na imunidade humoral foram também observadas após a menopausa. O efeito da TH tem sido também estudado neste tipo de imunidade. Em resumo, 12 estudos, publicados entre 1989 e 2006, examinaram o efeito da TH sobre a resposta imune humoral em mulheres após a menopausa. Apenas um deles examinou o efeito da TH sobre os níveis das imunoglobulinas e complemento<sup>47</sup>. Todos os outros examinaram a imunidade humoral indiretamente pela dosagem das citocinas tipo II (IL-1b, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10) auxiliares no desenvolvimento e

manutenção da resposta imune humoral. Diminuição da IL-6 e nenhuma mudança significativa nos níveis de IL-4, IL-10 e INF- $\gamma$  foram inicialmente relatadas em estudo prospectivo após três meses de terapia estrogênica<sup>48</sup>. Elevação nos níveis de IL-6 foi observada com o uso de estrogênio após seis semanas ou terapia estroprogesterônica por um ano<sup>38,46</sup>. Tanto diminuição<sup>38,47,49</sup> como nenhuma alteração<sup>50</sup> na produção de IL-10 foram relatadas. Tanto na menopausa precoce quanto na oportuna, a TH mostrou-se capaz de aumentar os níveis de GM-CSF sem induzir mudanças nos níveis de TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-18. Em estudo de corte-transversal, foi mostrado que os níveis médios de C3 e C4 estão elevados nas usuárias de TH, seja em uso oral ou transdérmico<sup>51</sup>.

Os efeitos da TH sobre os marcadores de inflamação em mulheres pós-menopausa permanecem em intensa avaliação, principalmente no sistema cardiovascular. O estrogênio parece tanto estimular como inibir os processos inflamatórios. Por um lado, reduz os níveis plasmáticos das moléculas de adesão vascular solúveis (sICDM-1, sVCAM-1), selectina e proteína-1 quimioatrativa de monócitos (MPC-1), sugerindo uma ação anti-inflamatória na parede vascular<sup>52</sup>. Em adição, a TH inibe a produção de fatores pró-coagulantes nos monócitos circulantes. Por outro lado, o uso de TE mostrou-se capaz de aumentar os níveis de proteína C reativa (PCR) circulante, um componente da fase aguda da resposta inflamatória<sup>53</sup>. Efeito semelhante foi observado com o uso de estrogênios conjugados em outros estudos<sup>54</sup>. Em estudo clínico randomizado realizado em mulheres histerectomizadas, a elevação da PCR observada no início do tratamento sofreu reversão após 24 meses de uso, sugerindo a possibilidade de que o efeito pró-inflamatório seja temporário<sup>55</sup>. A via de administração do estrogênio parece exercer efeitos diferentes sobre as concentrações de PCR e proteína sérica amilóide A (SAA). A SAA tem

seus níveis reduzidos com a via transdérmica e elevados na oral. A elevação de PCR também ocorre principalmente com a via oral<sup>56</sup>. Embora os mecanismos não sejam claros, parece que a elevação da PCR e SAA com a via oral resulta da ativação da produção de IL-6 pró-inflamatória, via maior produção hepática. A maioria dos estudos observacionais e randomizados tem demonstrado que a TE transdérmica diminui ou não altera os níveis séricos de IL-1, IL-6, e TNF- $\alpha$ <sup>57</sup>. O tema foi recentemente explorado em estudo caso-controle (Estudo Observacional de Iniciativa de Saúde das Mulheres – WHOS), comparando os níveis de IL-6 em usuárias e não usuárias de TH. Neste estudo, os níveis de IL-6 foram semelhantes, ou ligeiramente menores, nas usuárias quando comparadas com as não usuárias, sugerindo que a TH inibe a resposta inflamatória<sup>57</sup>.

A administração combinada estroprogestogênica, atenuante da resposta inflamatória em estudos experimentais, parece não inibir as proteínas VCAM-1, ICAM-1 ou MPC-1 pró-inflamatórias em mulheres após a menopausa<sup>58</sup>. A adição de progesterona ou medroxiprogesterona não impede o efeito protetor do estradiol na diminuição destas proteínas e parece mesmo capaz de reduzi-las ainda mais<sup>59</sup>. Enquanto a TH associando estrogênio a acetato de medroxiprogesterona, diidroprogesterona ou noretisterona eleva a PCR, a associação estrogênio-acetato de norgestrel parece reduzir a síntese desta proteína<sup>60,61</sup>. Em adição, a associação da noretisterona ao estradiol nasal também não foi associada à elevação da PCR e manteve a diminuição das moléculas de adesão<sup>52</sup>. No conjunto, estes estudos sugerem que o tipo do progestogênio utilizado tem relevância na resposta imuno humoral. A proposta deste estudo é examinar uma nova associação estroprogestogênica sobre as imunidades celular e humoral em mulheres pós-menopausa.

## ***2. JUSTIFICATIVA***

---

## 2. JUSTIFICATIVA

O climatério é o período de transição entre a vida reprodutiva e a não reprodutiva da mulher, caracterizando-se por alterações funcionais, morfológicas e hormonais do seu organismo. Neste período ocorre a perda da atividade folicular ovariana levando a uma deficiência estrogênica e progesterônica com aparecimento de vários sintomas vasomotores e psicológicos, doenças crônico-degenerativas (osteoporose, doenças cardiovasculares, atrofia genitourinária) e demência. A expectativa de vida tem aumentado nos últimos anos na maioria dos países, de tal modo que a mulher vive mais de um terço da vida sob os efeitos indesejáveis do hipoestrogenismo. A importância de proporcionar uma melhor qualidade de vida no processo biológico de envelhecimento durante este período justifica o uso da terapia hormonal, não só para o alívio dos sintomas do climatério como também para prevenção de osteoporose, fraturas, atrofia genitourinária e câncer cólon-retal.

Tanto as repercussões para o organismo feminino como os benefícios e riscos da terapia hormonal são ainda muito discutidos. Sabe-se que a reposição destes hormônios pode alterar profundamente vários sistemas, entre eles o imunológico. Do mesmo modo não se discute que existe um declínio nas funções imunológicas com o próprio envelhecimento, resultando em maior susceptibilidade a certas doenças infecciosas, ao câncer e a doenças auto-imunes. Poucos são os estudos relacionando o uso da terapia hormonal com as respostas imunes. A importância de um estudo examinando estas respostas pelo uso da terapia hormonal durante o climatério é indiscutível. Daria suporte ao clínico na melhor orientação da mulher durante seu envelhecimento e traria informações aos gestores

da saúde acerca da real importância da terapia hormonal à população feminina nos anos pós-menopausa.

### **3. OBJETIVOS**

---

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral:**

Avaliar o impacto da terapia estrogênico-progestogênica sobre a resposta imune humoral e celular em mulheres após a menopausa.

#### **3.2 Objetivos Específicos:**

1. Avaliar a resposta imune celular através de testes de hipersensibilidade cutânea tardia.
2. Avaliar a variação do número total de leucócitos, linfócitos totais e subtipos, neutrófilos, monócitos e eosinófilos com a terapia hormonal.
3. Verificar a influência da terapia estroprogestogênica sobre a produção de citocinas e IgG, IgM, IgA, e IgE.
4. Correlacionar os subtipos de linfócitos T periféricos CD4+ e CD8+ com a reposição hormonal.
5. Estimar a razão CD4/CD8 antes e após a terapia hormonal.

## ***4. MATERIAL E MÉTODOS***

---

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Desenho do estudo e tamanho da amostra

Estudo prospectivo, coorte, com intervenção. Para a estimativa do tamanho da amostra foram considerados os achados prévios de *Eichler & Keiling*<sup>62</sup>, considerando a variância de 95,5% e erro padrão de 9,8 na determinação do número de linfócitos T durante o ciclo menstrual. Assumiu-se um erro tipo I de 5% e um poder de 80% para estudos prospectivos com intervenção, segundo a fórmula  $n=(Z\alpha + Z\beta)^2 \times 2 \times s^2/(d)^2$ , onde  $Z\alpha=1,96$ ;  $Z\beta=0,84$ ;  $S^2=95,5$ ;  $d=9,76$ <sup>63</sup>, cujo resultado foi de um valor para n de 16. Assim, tendo sido considerado inicialmente possível perda de 40%, 23 pacientes iniciaram o estudo.

### 4.2 Dados epidemiológicos

Foram colhidos dados epidemiológicos e de hábitos de vida das pacientes, sendo feita avaliação subjetiva de raça e considerado sedentárias aquelas sem atividade física regular, tabagistas as que consumissem ativamente qualquer quantidade de cigarro e etilistas sociais aquelas que consumissem bebidas alcoólicas de modo eventual e com freqüência de no máximo uma vez por semana. Os dados de peso e altura foram aferidos no momento da aplicação do questionário.

### **4.3 Tratamento**

A terapia hormonal combinada empregada foi constituída por comprimidos revestidos compostos contendo 1 mg de estradiol (correspondente a 1,033 mg de estradiol hemiidratado) associado a 2 mg de drospirenona (*Angeliq®*, Fabricado por Schering GmbH. Turingia/Weimar/Alemanha, Importado por Bayer Schering Pharma, São Paulo/SP), sendo mantida em tomada única diária até o término da coleta das amostras de sangue. A medicação foi fornecida gratuitamente pelo laboratório fabricante.

### **4.4 Casuística**

O estudo incluiu 23 pacientes na pós-menopausa, voluntárias, atendidas nos Ambulatórios de Climatério do Hospital Universitário Júlio Muller – UFMT e Hospital Geral Universitário – UNIC. No decorrer do acompanhamento, foram dispensadas 9 pacientes devido a ocorrências que contra-indicaram a manutenção do tratamento e não relacionadas a medicação.

### **4.5 Critérios de inclusão e exclusão**

Foram incluídas mulheres no climatério pós-menopausa, voluntárias, com idade entre 55 e 65 anos, sem terapia de reposição hormonal prévia por um período mínimo de 12 meses e que concordaram em assinar o termo de consentimento livre

e esclarecido (Apêndice 1). Excluíram-se aquelas que tivessem feito uso de estrogênios ou estrogênio com progestogênio nos últimos 12 meses, as usuárias de imunossupressores ou corticosteróides, hipertensas graves, diabéticas, mulheres com insuficiência hepática ou renal ou com antecedentes de doenças tromboembólicas, qualquer tipo de câncer, doenças autoimunes e processos alérgicos.

#### **4.6 Coleta e processamento das amostras de sangue**

As amostras de sangue foram colhidas, processadas e avaliadas para as variáveis de interesse logo após a inclusão da mulher no estudo antes do início da terapia hormonal e no terceiro mês após o início e manutenção da terapia estroprogestogênica diária. Foram coletados no total 10 ml de sangue periférico por punção de veia cubital a vácuo através de tubos Vacutainer® (*Becton Dickinson UK Ltd, Belliver Industrial State, Plymouth, PL6 7BP, England*) após jejum de 12 horas. Destes 10 ml de sangue, 5 ml foram coletados em tubos contendo o anticoagulante EDTA K3 para a contagem total de leucócitos, das células mononucleares e dos tipos e subtipos de linfócitos. Outros 5 ml de sangue foram coletados sem anticoagulante e com gel separador, para a dosagem de interleucinas e imunoglobulinas no soro e deixados por 60 minutos à temperatura ambiente para formação de coágulo estável. Em seguida os tubos foram centrifugados (CELM LS-3 Plus) a 3200 rpm durante 4 minutos. O soro foi aspirado com pipetas Pasteur. Todas as amostras foram adequadamente identificadas com tarjas contendo código de barras e nome da paciente. O sangue total destinado à contagem hematimétrica

e o soro para dosagem de IgE foram imediatamente processados pelo Laboratório Cedilab de Cuiabá/MT. O sangue total com anticoagulante destinado à contagem de linfócitos totais e subtipos e o soro para as dosagens de IgA, IgG e IgM foram mantidos à temperatura de 2 a 8°C, o primeiro sem ter contato direto com gelo, e encaminhados por via aérea para o Laboratório Álvaro de Cascavel/PR, onde as amostras foram processadas no dia seguinte ao envio. O soro destinado à dosagem das IL-6 e IL-10, foi estocado a menos 20°C e posteriormente encaminhado em gelo seco para o Laboratório Álvaro de Cascavel/PR onde foi processado.

#### **4.7 Testes cutâneos de hipersensibilidade tardia**

Este teste foi efetuado na inclusão e após três meses de reposição hormonal. Utilizou-se os antígenos tuberculínico, candidina, tricofitina, *Escherichia coli* e aspergilina (*FDA Allergenic Ltda, Teste Intradérmico, Extratos Alergenos, Rio de Janeiro-RJ*). Após assepsia com álcool a 70% de toda região, injeções intradérmicas de 0,1ml de cada alérgeno foram feitas na face anterior do antebraço esquerdo com distância entre si de cerca de 3,0 cm, na seguinte ordem: aspergilina, *Escherichia coli*, candidina, tricofitina e tuberculina. As reações foram lidas após 48 horas e a positividade dos testes foi determinada pela medida da induração, em milímetros. A avaliação da reatividade foi realizada por um único examinador, sendo procedida marcação da área alterada com caneta e feita medida do maior diâmetro apresentado com régua milimétrica. Foram consideradas reações positivas quando o diâmetro da induração foi maior que 2 mm.

## **4.8 Contagem dos diferentes tipos de células sanguíneas**

### **4.8.1 Contagem do total de células**

A contagem de leucócitos totais, linfócitos, eosinófilos e monócitos em sangue colhido com Vacutainer® (*Becton Dickinson UK Ltd, Belleriver Industrial State, Plymouth, England*) com o anticoagulante EDTA foi realizada em aparelho hematológico automatizado (*Analizador de Hematologia Automatizado Modelo XT 1800i, Sysmex Corporation, Japão*) no Laboratório Cedilab de Cuiabá/MT (Anexo 1).

### **4.8.2 Contagem dos subtipos de linfócitos T e B**

A identificação e estimativa do número total e do número das subpopulações de linfócitos T e B, em sangue total, foram realizadas por citometria de fluxo utilizando o BD FACSCalibur® *Flow Cytometry System*, (BD Biosciences, San Jose, California, USA) no Laboratório Álvaro – Cascavel/PR. O material foi acondicionado de forma a manter a temperatura ideal de 2º a 8ºC e encaminhado por via aérea até o laboratório executor. Ao material foi adicionado anticorpo monoclonal específico para identificação das células, procedida à limpeza do equipamento com 3,0ml da solução *FACS-Clean* a 10% associado à água, e feita calibração do mesmo com *Calibrate Beads*. A seguir, foram realizados ajustes no equipamento e posteriormente as células suspensas em solução fisiológica foram injetadas em sistema de fluídos de forma automatizada e expostas a jato de laser

para leitura da dispersão da luz e fluorescência por fotossensores. As informações provenientes dos diferentes sensores foram então agrupadas, expressando características de cada célula e sendo mostrada em histograma (Anexo 2).

#### **4.9 Dosagem de imunoglobulinas**

As imunoglobulinas A, M e G foram dosadas através de nefelometria automatizada com uso de Sistema BN2 (Dade Behring, Marburg, Germany) no Laboratório Álvaro de Cascavel/PR. Os resultados são apresentados em miligrama por decilitro (mg/dl). A Imunoglobulina E foi dosada no soro por eletroquimioluminescência utilizando a estação Cobas® 6000 Analyzer Series (*Roche Diagnostics North America, Indianapolis, USA*) no Laboratório Cedilab de Cuiabá/MT. Inicialmente foi realizada a calibração do aparelho com o reagente IgE total da Roche e analisado o controle, para posteriormente ser inserido o soro em teste no equipamento para processamento. A leitura foi feita após um período de 18 minutos de incubação de forma totalmente automatizada, e o resultado expresso em unidades internacionais por mililitro (UI/ml) (Anexo 3).

#### **4.10 Dosagem de interleucinas**

As concentrações de IL-6 e IL-10, foram determinadas no soro das pacientes por quimioluminescência utilizando o Immulite® 1000 Immunoassay

System (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield Road, USA) no Laboratório Álvaro de Cascavel/PR. As amostras de soro foram descongeladas e processadas de forma automatizada pelo equipamento e os resultados foram fornecidos em picogramas por mililitro (pg/ml). Detalhes da análise são mostrados no Anexo 4.

#### **4.11 Análise estatística**

A distribuição dos dados foi examinada pelo teste de Lilliefors. Variáveis com distribuição normal são apresentadas como média e desvio padrão. As variáveis com distribuição não paramétrica são descritas como mediana, com intervalo de confiança de 95%. Os resultados são mostrados em gráficos e tabelas. As comparações foram feitas pelo teste não paramétrico *Wilcoxon signed-rank test*, para amostras pareadas. Correlações entre variáveis com distribuição normal foram efetuadas pelo Coeficiente de Correlação de Pearson e examinadas pelo teste *t* de *Student*. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ .

#### **4.12 Considerações éticas**

As pacientes participantes tiveram toda a assistência médica necessária, de forma individualizada e sem qualquer custo financeiro, nos ambulatórios públicos do Hospital Universitário Júlio Muller – UFMT e Hospital Geral Universitário – HGU. O

medicamento utilizado é de uso corrente na terapia de reposição hormonal do climatério, disponível nas farmácias para comercialização, mas oferecido gratuitamente às pacientes. Na avaliação de indicação da terapia foram seguidos os mesmos usados na prática clínica diária, não sendo as pacientes submetidas a risco adicional algum. Possíveis efeitos colaterais da medicação foram informados às pacientes. O projeto foi analisado pelo Comitê de Ética do HUJM sendo aprovado sob o número 061 CEP HUJM – 2002.

## ***5. RESULTADOS***

---

## 5. RESULTADOS

Nove pacientes foram excluídas do estudo por intercorrências médicas que impossibilitaram a manutenção da terapia hormonal ou passíveis de interferir diretamente nos resultados dos testes de avaliação da resposta imune aplicados, ou por perda de seguimento. As 14 pacientes que concluíram o estudo tinham entre 57 e 65 anos, idade média de 60,5 anos (95% IC 58,2-62,0), pesavam em média 59,4 Kg (IC 95%; 53,9 a 64,7), com estatura média de 1,53m (IC 95%; 1,48 a 1,57) e índice de massa corporal média de 25,0 (IC 95%; 23,7 a 26,2). Todas eram sedentárias, 14,2% tabagistas e 14,2% etilistas sociais. Todas as características destas pacientes são mostradas na tabela 1.

Tabela 1 – Características antropométricas e epidemiológicas das pacientes

NOME	IDADE (anos)	RAÇA	PESO (Kg)	ALTURA (m)	IMC	TABAGISMO	ETILISMO	ATIVIDADE FÍSICA
D.A.S	61	BRANCA	68,0	1,63	25,59	NÃO	NÃO	NÃO
M.R.A.L	65	PARDA	46,0	1,40	23,47	NÃO	NÃO	NÃO
J.P.M	61	BRANCA	65,0	1,60	25,39	NÃO	NÃO	NÃO
D.T.F.L	60	PARDA	50,0	1,50	22,22	NÃO	NÃO	NÃO
H.M.C.L	59	PARDA	69,6	1,65	25,56	NÃO	NÃO	NÃO
J.F.M	64	BRANCA	40,0	1,40	20,41	NÃO	NÃO	NÃO
J.O.V	58	BRANCA	75,0	1,56	30,82	NÃO	NÃO	NÃO
A.J.A	63	BRANCA	65,0	1,62	24,77	SIM	SIM	NÃO
E.R.S	58	PARDA	63,0	1,53	26,91	NÃO	NÃO	NÃO
J.S.D	65	BRANCA	62,0	1,60	24,22	NÃO	NÃO	NÃO
I.M.S	58	BRANCA	58,0	1,49	26,12	NÃO	NÃO	NÃO
A.J.B	57	PARDA	55,0	1,48	25,11	NÃO	NÃO	NÃO
I.N.S	57	BRANCA	53,0	1,50	23,56	NÃO	NÃO	NÃO
T.H.P.S	62	BRANCA	63,0	1,55	26,22	SIM	SIM	NÃO

A verificação da resposta imune celular pelos testes de hipersensibilidade cutânea mostrou maior sensibilidade à tuberculina após a terapia hormonal (Figura 1;  $p=0,005$ ).

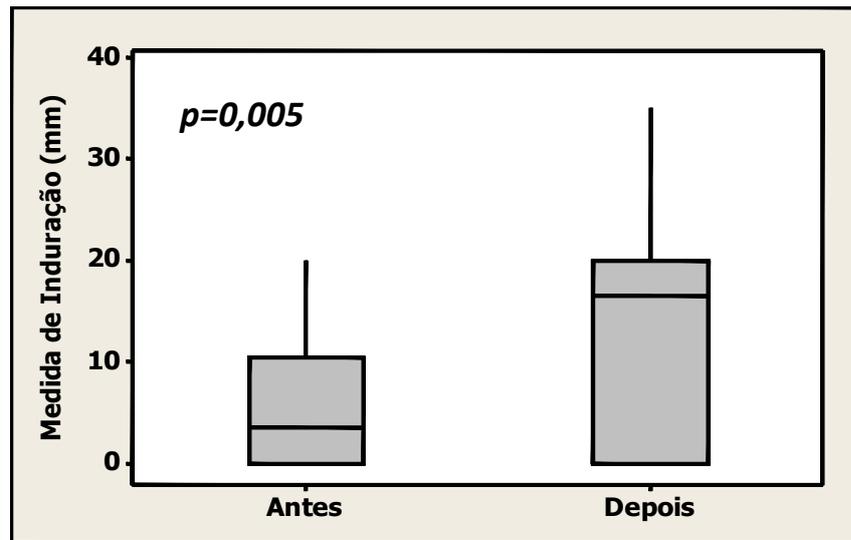


Figura 1. Distribuição da dimensão da induração produzida pela tuberculina antes e após terapia hormonal em mulheres na pós-menopausa

As respostas à tricofitina, candidina, asperginina e *Escherechia coli* permaneceram inalteradas (figura 2, painéis A, B, C, D). Todas as reações aos alérgenos testados são apresentadas na tabela 2.

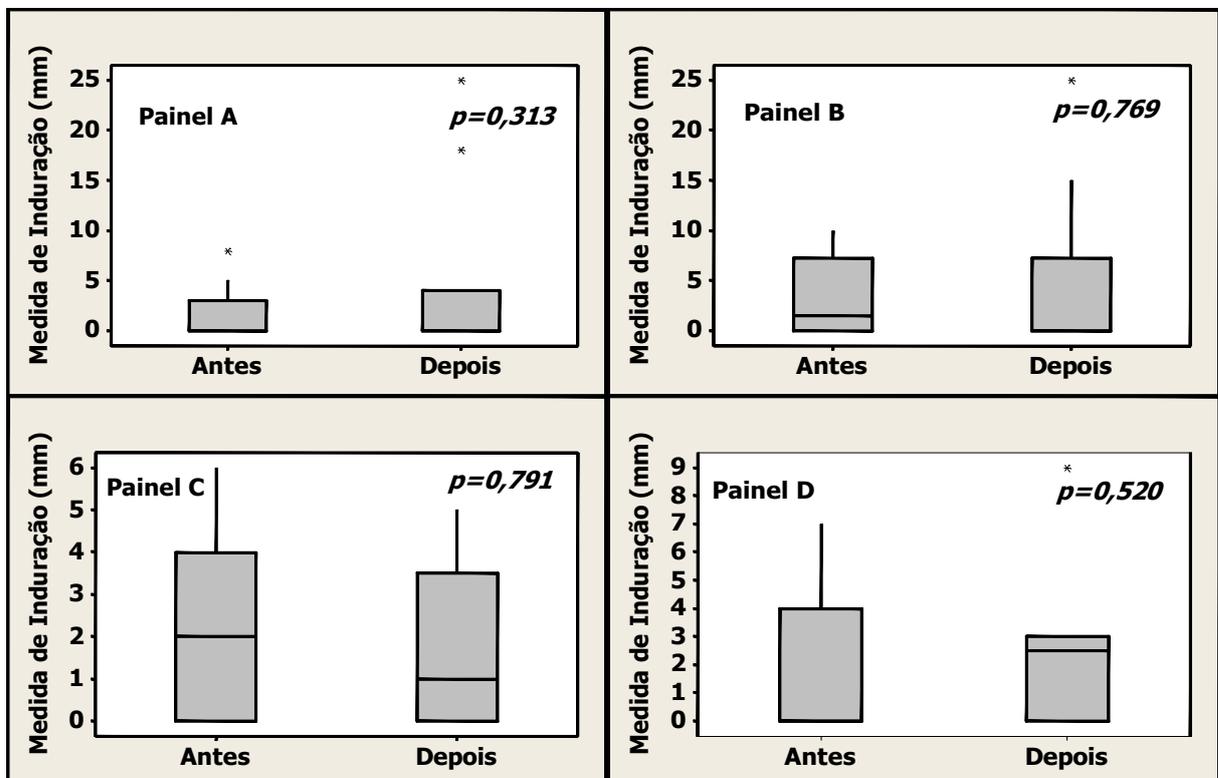


Figura 2. Box-plot da distribuição da induração cutânea aos alérgenos asperginina (Painel A), *E. coli* (Painel B), Candidina (Painel C) e tricofitina (Painel D) antes e após terapia hormonal em mulheres na pós-menopausa. \*Outlier

Tabela 2 – Testes de hipersensibilidade cutânea a diferentes alérgenos em mm

<b>PACIENTES</b>	<b>COLETA</b>	<b>ASPERGININA</b>	<b>E. COLI</b>	<b>CANDIDA</b>	<b>TRICOFITINA</b>	<b>PPD</b>
D.A.S	ANTES	8	0	0	0	0
	DEPOIS	18	0	0	3	0
M.R.A.L	ANTES	0	0	0	0	0
	DEPOIS	2	0	3	3	0
J.P.M	ANTES	3	3	2	0	10
	DEPOIS	0	15	0	0	18
D.T.F.L	ANTES	0	5	5	4	0
	DEPOIS	0	0	0	0	15
H.M.C.L	ANTES	0	0	0	0	3
	DEPOIS	0	7	5	3	4
J.F.M	ANTES	3	0	0	0	0
	DEPOIS	4	3	3	3	4
J.O.V	ANTES	5	7	4	0	0
	DEPOIS	0	0	5	0	20
A.J.A	ANTES	0	0	0	0	12
	DEPOIS	0	0	2	2	18
E.R.S	ANTES	0	10	2	0	8
	DEPOIS	0	0	0	3	20
J.S.D	ANTES	0	5	3	2	4
	DEPOIS	0	8	0	0	0
I.M.S	ANTES	3	0	6	7	17
	DEPOIS	4	0	5	9	20
A.J.B	ANTES	0	0	3	4	20
	DEPOIS	0	4	0	0	35
I.N.S	ANTES	0	10	0	0	0
	DEPOIS	4	0	0	0	0
T.H.P.S	ANTES	0	8	4	4	10
	DEPOIS	25	25	3	3	25

O número total de leucócitos antes ( $6142/\text{mm}^3$ , IC 95% 5395-7580) e depois ( $6086/\text{mm}^3$ , IC 95% 4360-7240) da terapia hormonal permaneceu inalterado ( $p=0,625$ ). Neutrófilos e linfócitos totais também não sofreram modificações com a terapia hormonal ( $p=0,669$  e  $p=0,855$ , respectivamente) (Figura 3) (Apêndice 2)

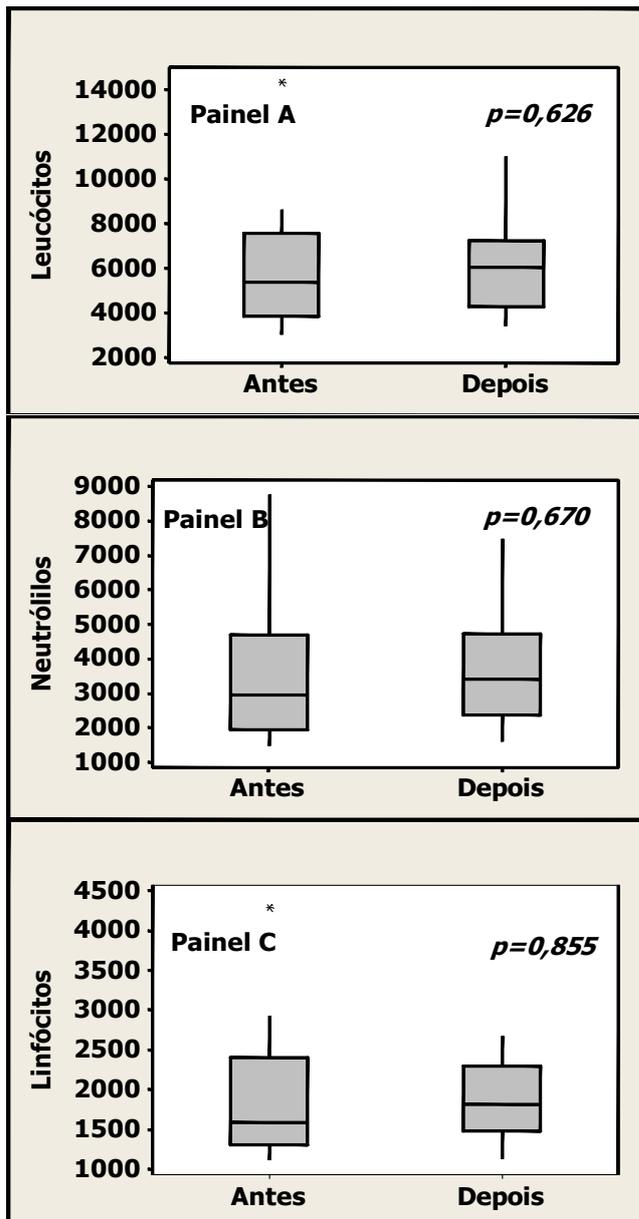


Figura 3. Distribuição dos leucócitos totais circulantes (Painel A), neutrófilos (Painel B) e linfócitos totais (Painel C) em mulheres pós-menopausa antes e após a terapia hormonal combinada contínua. \*Outlier

O número dos diferentes tipos de linfócitos T CD4+ e CD8+ e linfócitos B CD19+ não foi alterado ( $p > 0,05$ ) (Figura 4; Painéis A-D e Apêndice 3). A razão CD4/CD8 não mostrou diferença com significância estatística ( $p = 0,057$ ). Embora o número de eosinófilos não tenha sofrido qualquer alteração ( $p = 0,626$ ), o número dos monócitos mostrou tendência à diminuição com a associação estro-progestogênica ( $p = 0,057$  e Apêndice 2)

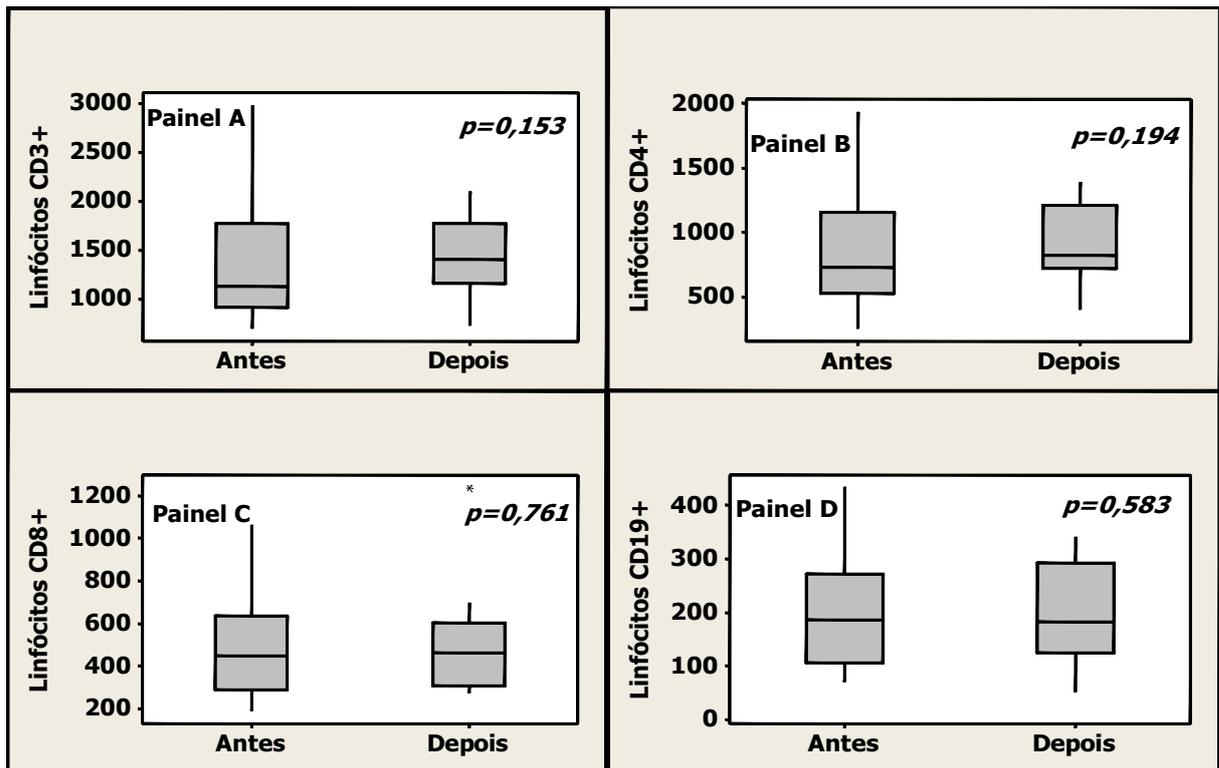


Figura 4. Distribuição dos resultados de linfócitos CD3+ (Painel A), CD4+ (Painel B), CD8+ (Painel C) e CD19+ (Painel D) em mulheres na pós-menopausa antes e após terapia hormonal. \*Outlier

Em relação à imunidade humoral, nas doses administradas a associação estradiol-drospirenona não imprimiu nenhuma modificação nas concentrações séricas de IgA ( $p=0,583$ ), IgE ( $p=0,426$ ) e IgM ( $p=0,391$ ). As concentrações de IgG reduziram-se de modo significativo quando observadas antes (1262 mg/dl, IC 95% 1106-1593;  $p=0,029$ ) e após (1141 mg/dl, IC 95% 1066-1447) a administração hormonal (figura 5, painéis A, B, C e D).

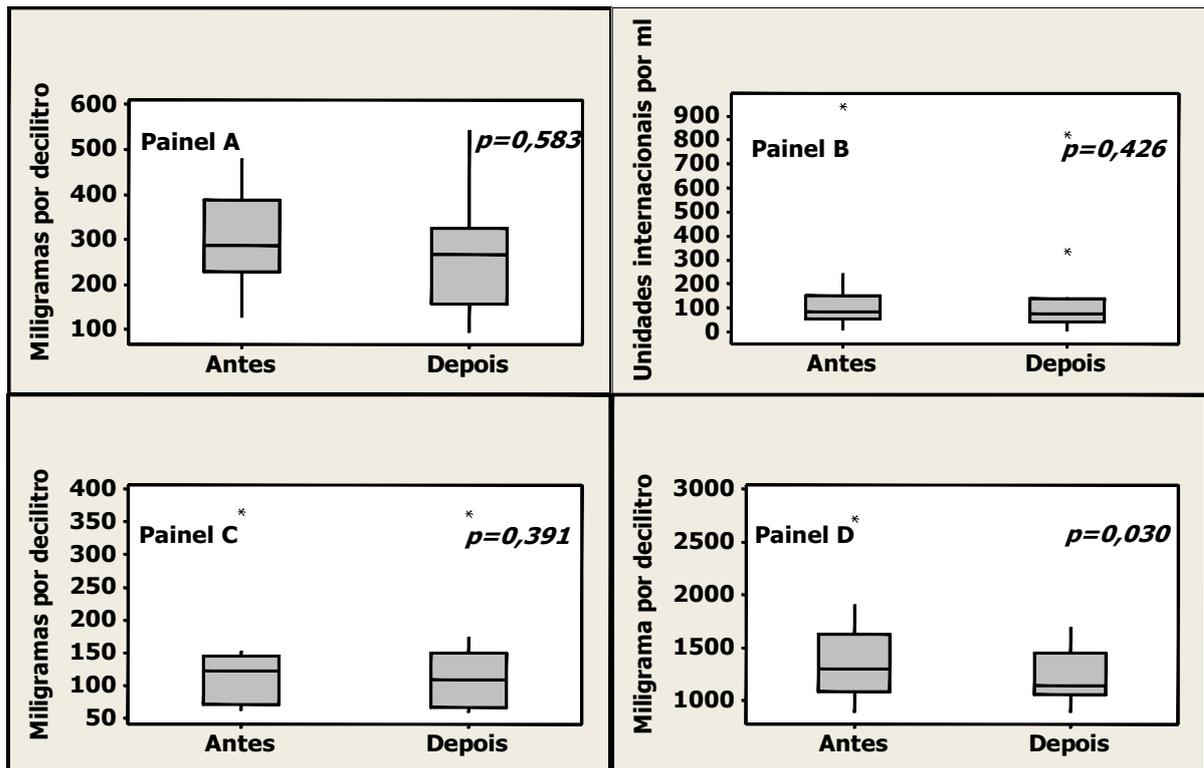


Figura 5. Box-plot das medidas séricas de IgA (Painel A), IgE (Painel B), IgM (Painel C) e IgG (Painel D) em mulheres na pós-menopausa antes e após terapia hormonal combinada contínua. \*Outlier

Os níveis de IL-6 permaneceram inalterados, antes e após a terapia hormonal ( $p=0,965$ ) (Figura 6, painel A), e não se correlacionaram com o índice de massa corporal nem antes ( $r=-0,181$ ;  $t=-0,551$ ;  $p=0,595$ ) nem após a terapia hormonal ( $r=0,432$ ;  $p=0,183$ ). As concentrações da IL-10, citocina capaz de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, elevaram-se de modo significativo após a terapia hormonal ( $p=0,032$ ) (figura 6, painel B). Os níveis séricos desta interleucina também não se correlacionou com o índice de massa corporal, nem antes ( $r=0,174$ ;  $t=0,532$ ;  $p=0,607$ ) nem após a terapia hormonal ( $r=0,305$ ;  $t=0,961$ ;  $p=0,362$ ).

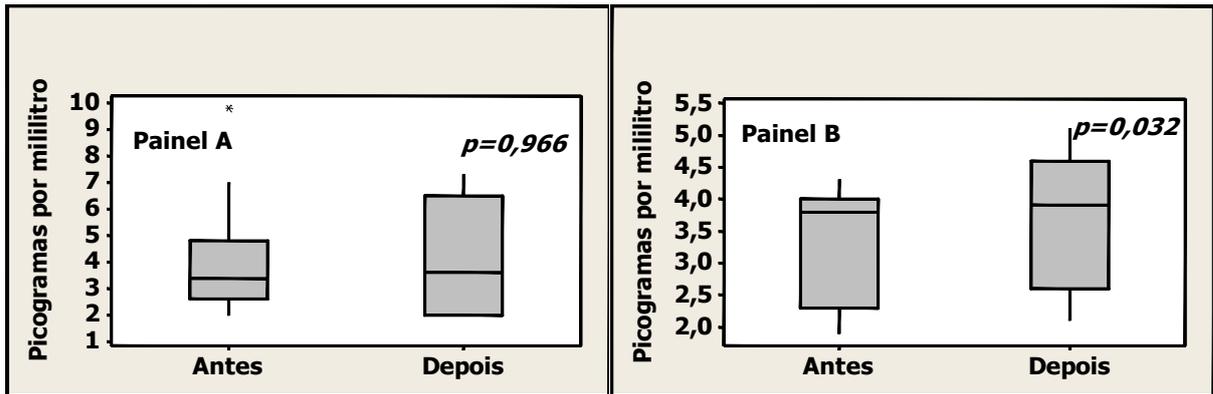


Figura 6. Distribuição dos níveis séricos de IL-6 (painel A) e IL-10 (painel B) em mulheres na pós-menopausa antes e após terapia hormonal combinada contínua. \*Outleir.

## **6. *DISCUSSÃO***

---

## 6. DISCUSSÃO

Em revisão da literatura específica, entende-se ser indiscutível o importante papel modulador exercido pelos hormônios esteróides sexuais nas funções imunes celular e humoral. No entanto, a maioria dos estudos está limitada a animais de experimentação, principalmente ratas, camundongas e macacas Rhesus. O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência de uma combinação de estradiol e drospirenona sobre as imunidades celular e humoral em mulheres na pós-menopausa. A produção dos diferentes tipos e subtipos de leucócitos e a reatividade cutânea a determinados alérgenos são explorados aqui na avaliação da resposta imune celular a esta combinação estroprogestogênica. Do mesmo modo, diferentes imunoglobulinas e as interleucinas 6 e 10 são estudadas, como instrumentos da avaliação da imunidade humoral.

Apesar do curto tempo de seguimento das pacientes, a perda de pacientes foi no limite do tolerável. Entre as pacientes que concluíram o estudo apenas uma tinha índice de massa corporal acima de 30. Estudos anteriores mostraram correlação positiva entre os níveis de IL-6 e o índice de massa corpórea (IMC) em pacientes na pós-menopausa antes da terapia hormonal<sup>37,64</sup>, sendo esta associação perdida com esta terapia<sup>37</sup>. No presente estudo, não houve correlação entre estas duas variáveis, nem antes e nem após a terapia hormonal, ainda que a população ora avaliada e aquela estudada em comparação tivessem IMC médio semelhante. Como o estradiol inibe a secreção de IL-6, mas os seus níveis permaneceram estáveis no presente estudo, pode-se especular pela possibilidade da dose e tempo terem interferido nestes resultados<sup>65</sup>.

Testes cutâneos, com múltiplos alérgenos, para verificação de sensibilidade celular tardia, não têm sido empregados na pós-menopausa com o intuito de avaliar esta resposta imune tanto no hipoestrogenismo como após a terapia de reposição hormonal. Um único estudo disponível para comparação dos achados do presente estudo mostrou resposta atenuada aos diferentes alérgenos em mulheres climatéricas<sup>41</sup>. No estudo atual, a terapia hormonal promoveu maior reatividade tardia à tuberculina, sugerindo que a combinação hormonal usada restaurou a reatividade da subpopulação de linfócitos T (Th e helper T cells, CD4+) de memória para este antígeno. Estes achados corroboram com aqueles de Orme<sup>66</sup>. No entanto, vale lembrar que a repetição de testes para tuberculina em curto espaço de tempo pode amplificar as reações subseqüentes (efeito booster), transformando em reatores fortes os indivíduos inicialmente pouco reatogênicos. A resposta aos alérgenos tricofitina, candidina, asperginina e E. coli não foi reativada/alterada pelo estradiol associado à drospirenona..

Ainda que o hipoestrogenismo atenua a resposta imune celular<sup>27</sup> e amplifique a resposta imune humoral<sup>29</sup>, a terapia de reposição hormonal não parece exercer qualquer impacto sobre o número de total de leucócitos, total de neutrófilos e eosinófilos totais no sangue periférico de mulheres climatéricas pós-menopausa<sup>42</sup>. Todavia, o número dos monócitos, capazes de se deslocarem para o local dos processos inflamatórios, tende a diminuir. Como os macrófagos se diferenciam a partir dos monócitos e são as células predominantes no mecanismo responsável pelo desenvolvimento da aterosclerose, este resultado reforça os benefícios da terapia hormonal na proteção sobre o sistema cardiovascular<sup>67</sup>.

A associação de estrogênios eqüinos conjugados e acetato de medroxiprogesterona, tanto em regime combinado contínuo como sequencial, parece estimular a proliferação dos linfócitos B e diminuir a citotoxicidade dos linfócitos T CD8+ e NK<sup>32,44,45</sup>, modificações capazes de prevenir processos patológicos comumente observados no envelhecimento. O subtipo de linfócitos CD3, marcador da população de linfócitos T auxiliares e de memória, pode permanecer inalterado ou sofrer pequena diminuição após a terapia hormonal<sup>29,42</sup>. O presente estudo não mostrou alteração dos linfócitos CD3. Elevação destas células com a terapia hormonal foi relatada anteriormente em pacientes fisicamente ativas, mas não nas sedentárias<sup>42</sup>, em população semelhante à do atual estudo. Foi observado ainda, em outros estudos, que a terapia hormonal suprime a expressão gênica e a ação citotóxica dos linfócitos T CD8+<sup>25,68</sup>.

O hipoestrogenismo diminui a população de linfócitos CD4, responsáveis pela deflagração da reação de hipersensibilidade cutânea tardia ao assistir à ação dos linfócitos B, linfócitos matadores naturais (NK) e macrófagos<sup>27,31</sup>. A reposição de estrogênios conjugados ou valerato de estradiol, associados à medroxiprogesterona, na pós-menopausa parece não modificar a atividade destes linfócitos<sup>32,42</sup>. No presente estudo, também não se observou modificação no número de células T CD4+ circulantes com a associação estradiol-drospirenona. Resultados semelhantes a estes foram observados ainda em outros estudos usando combinações estroprogestogênicas diferentes<sup>33,46</sup>. No seu conjunto, os resultados dos estudos ora disponíveis convergem no sentido de que a TH não modifica a quantidade de linfócitos CD4+ circulantes em mulheres saudáveis após a menopausa.

Com o hipoestrogenismo a população dos linfócitos CD8+ tem sido relatada como reduzida<sup>31</sup>, aumentada<sup>29</sup> ou inalterada<sup>32</sup>. Deve-se ter em consideração que essas células são essenciais na defesa do organismo contra infecções virais e células neoplásicas. Em adição, os estrogênios ainda atenuam a citotoxicidade natural contra estes agentes agressores. Em pacientes com menopausa precoce encontrou-se elevação dos linfócitos CD8<sup>69,70</sup>. Considerando o efeito da terapia hormonal sobre a citotoxicidade mediada pelos linfócitos CD8, os resultados ora publicados são escassos e inconsistentes. Tanto relatos de aumento na atividade CD8<sup>32</sup>, como na diminuição<sup>43</sup>, têm sido encontrados. Em relato recente, incluindo mulheres na pós-menopausa em uso de estrogênios conjugados associados a medroxiprogesterona, diminuição da citotoxicidade CD8+ não foi observada em praticamente todos os pacientes<sup>45</sup>. Embora não examine a atividade dos linfócitos CD8+, o presente estudo não encontrou modificações numéricas na população destes, sugerindo que a TH não estimula a proliferação dos linfócitos CD8+ *in vivo* ( $p=0,760$ ).

Tem sido mostrado que mulheres têm maior proporção de linfócitos CD4+ em relação aos linfócitos CD8+<sup>13</sup>, havendo correlação positiva entre os níveis de estrogênios e a razão de linfócitos auxiliares reguladores CD4+ e citotóxicos CD8+<sup>71</sup> sendo esta associação reduzida após ooforectomia<sup>71,72</sup>. No entanto, observa-se que a adição de estradiol em cultura de linfócitos diminui a razão CD4/CD8<sup>73</sup> e que a progesterona aumenta a atividade dos linfócitos CD8+. Em estudos clínicos, terapia hormonal em mulheres na pós menopausa não induz alteração significativa na razão CD4/CD8<sup>32</sup> mas a reposição transdérmica de estrogênio isolado tende a elevar esta proporção<sup>33</sup>, melhorando a tendência à imunodeficiência observada na pós-menopausa. Empregando três regimes diferentes Burleson et al<sup>74</sup>, pelo contrário,

mostraram diminuição da proporção CD4/CD8 após poucos anos de terapia hormonal combinada contínua. O presente estudo, também não observou tendência à diminuição na razão CD4/CD8 com a associação de um novo progestogênio. O significado clínico da tendência à elevação dos linfócitos citotóxicos com a TH não foi ainda explicado.

Há inconsistência em relação ao estado estrogênico e o número dos linfócitos B CD19+, podendo estar diminuídos<sup>75</sup> ou mesmo aumentados<sup>76</sup> em casos de falência ovariana prematura. Estes resultados distintos foram atribuídos a diferentes tempos pós-menopausa das mulheres estudadas nos dois estudos<sup>75,76</sup>. Este linfócito B precursor governa a ativação dos linfócitos B, atua primariamente como co-receptor e parece estar envolvido na ativação das fosfoquinases e amplificação da tirosina-fosforização de numerosas moléculas efetoras<sup>77,78</sup>, na produção de autoanticorpos e envolvimento na autoimunidade<sup>79</sup> e cicatrização de feridas<sup>80</sup>. Estes linfócitos CD19+ produzem anticorpos (imunoglobulinas) de todas as classes. No presente estudo, o número de células CD19+ não se modificou com a reposição hormonal ( $p=0,583$ ).

Em ratas ooforectomizadas o estradiol aumenta os níveis de IgA e IgG nas secreções uterinas<sup>81</sup>, sugerindo estimulação dos linfócitos B. Experimentalmente, em meninas, estrogênios aumentam as concentrações de IgG e IgM<sup>30</sup>. Em mulheres, estradiol estimula a produção de IgG e IgM no sangue periférico<sup>15</sup>, sendo esta resposta dose-dependente. Os níveis séricos das diferentes imunoglobulinas em mulheres na pós-menopausa e os efeitos da reposição hormonal sobre estes números têm sido pouco examinados. Elevação isolada de IgG foi previamente observada com a reposição estrogênica em mulheres com menopausa precoce

idiopática<sup>69</sup>. Em pacientes com lúpus o uso de estradiol elevou os níveis séricos de IgG e IgM<sup>82</sup>.

Em estudo anterior, incluindo mulheres com insuficiência renal e falência ovariana, o uso de estradiol associado a progesterona ou noretisterona, observou-se que os níveis de IgG, IgM e IgA não sofreram modificação, mesmo após seis meses de tratamento<sup>83</sup>. Em pacientes pós-menopausa com artrite reumatóide os níveis de IgM, IgG e IgA não se alteraram com a combinação estradiol-noretisterona<sup>84</sup>. Os níveis dessas imunoglobulinas parecem também permanecerem estáveis nas mulheres normais após a menopausa quando submetidas a terapia hormonal combinada<sup>85</sup>. Neste grupo de mulheres, a reposição transdérmica de estradiol ou oral de estrogênios conjugados associados a medroxiprogesterona em regime combinado contínuo durante 4-6 meses não mostrou alteração significativa nos níveis de IgG e IgM, a despeito da via de administração<sup>51</sup>. Diminuição nos níveis de imunoglobulinas séricas foram encontradas durante terapia hormonal à medida que aumentavam os níveis circulantes de estradiol<sup>86</sup>. Devido ao papel antimicrobiano destas proteínas, as concentrações de imunoglobulinas na saliva de mulheres climatéricas também foram estudadas<sup>87</sup>. A reposição com valerato da estradiol associado a levonorgestrel em mulheres climatéricas pré e pós menopausa imprimiu diminuição nos níveis salivares de IgA, IgG e IgM durante o tratamento, mas o significado clínico desta diminuição ainda deverá ser determinado. No presente estudo as imunoglobulinas M, A e E permaneceram inalteradas após a terapia hormonal, mas as imunoglobulinas G reduziram-se de modo significante.

As IL-6 e IL-10 são os mais potentes ativadores dos linfócitos B, induzindo tanto proliferação quanto maturação, resultando em maior secreção de IgG in vitro<sup>88</sup>. De fato vários estudos documentam a importância destas interleucinas para estímulo da secreção de imunoglobulinas. A interleucina-6, importante citocina pró-inflamatória quando elevada tem sido associada a maior risco de doenças cardiovasculares. Esta interleucina eleva-se na pós menopausa e tende a elevar-se com a idade<sup>89</sup>, estando negativamente correlacionada com os níveis de estradiol<sup>35</sup>. No presente estudo, os níveis de interleucina-6, além de não se correlacionarem com o IMC, permaneceram estáveis no curto intervalo de seguimento ( $p=0,966$ ). Em poucos relatos disponíveis a terapia hormonal tem sido associada tanto ao aumento<sup>90</sup> como à diminuição<sup>37</sup> dos níveis de interleucina-6, mas a maioria dos estudos tem mostrado que os níveis desta interleucina permanecem estáveis com o uso de diferentes regimes de terapia hormonal<sup>90,91,92</sup>. No conjunto, estes resultados além de inconsistentes, não compararam os efeitos de cada regime utilizado. A comparação direta entre o uso de estradiol e estradiol associado à medroxiprogesterona durante três meses não mostrou diferença nos níveis circulantes de interleucina-6<sup>90</sup>. Em estudo de base populacional incluindo 302 mulheres, os níveis de interleucina-6 foram mais elevados em não usuárias de hormônios do que naquelas que fizeram uso de estrogênios conjugados ou diferentes estrogênios associados a progesterona<sup>37</sup>. Estudo comparando o uso de estrogênios conjugados isolados ou associados à medroxiprogesterona nas doses de 2,5 mg ou 5 mg por dia mostrou elevação de 48% nos níveis de interleucina-6 no grupo que recebeu associação estroprogestogênica, independente da dose do progestogênio<sup>38</sup>. A associação diidroprogesterona ou noretisterona com estradiol, por outro lado, não modificou os níveis de interleucina-6<sup>61</sup>. No presente estudo a

associação de estradiol e drospirenona também não modificou os níveis séricos de IL-6. As diferenças entre estudos pode ser resultado tanto dos diferentes tipos de hormônios usados na terapia hormonal quanto da diferença no tempo de exposição aos esteróides sexuais nos demais estudos. Este aspecto não foi ainda examinado adequadamente e merece estudos em populações maiores, padronizando-se tempo de uso e esteróides empregados.

As concentrações de interleucina-10, potente citocina anti-inflamatória<sup>93</sup>, pareceu não sofrer modificações ao longo do período de transição da pré para a pós-menopausa<sup>34,35,88</sup>. O tratamento de mulheres pós-menopausa com estradiol transdérmico não modificou os níveis desta interleucina<sup>50</sup>. Em estudo utilizando a associação estrogênios conjugados e medroxiprogesterona, em regime combinado contínuo, observou-se diminuição dos níveis de interleucina-10, previamente elevados, em mulheres pós-menopausa<sup>47</sup>. No entanto, elevação de interleucina-10, induzindo maior síntese de IgG, tem sido relatada<sup>81</sup>, corroborando com os achados de altos níveis de IL-10 na gravidez<sup>94</sup>. O presente estudo mostrou resultados semelhantes aos observados por Folomeev et al<sup>81</sup> e Doria et al<sup>94</sup>, ainda que utilizando estradiol associado a drospirenona em curto intervalo de tempo.

Os resultados do presente estudo indicam maior reatividade cutânea à tuberculina, maior ativação dos linfócitos B com elevação na síntese de IgG e maior produção da interleucina-10 anti-inflamatória. Mesmo que tenha sido utilizado uma associação ainda não avaliada e durante curto intervalo de tempo, os resultados indicam melhora da resposta imune celular e humoral com a reposição estroprogestogênica.

## **7. CONCLUSÕES**

---

## CONCLUSÕES

### Geral

Houve melhora da resposta imune celular e humoral com a TH.

### Específicas

1. A resposta imune celular examinada pelo teste de hipersensibilidade tardia mostrou maior reatividade à tuberculina.
2. O número total de leucócitos, linfócitos, neutrófilos, eosinófilos e monócitos não sofreram modificação estatisticamente significantes com a terapia hormonal combinada contínua com estradiol e drospirinona.
3. A TH não impactou nem nos diferentes subtipos de linfócitos nem na razão CD4 auxiliar / CD8 citotóxico.
4. A terapia estroprogestogênica reduziu de modo significativo as concentrações de IgG.
5. A concentração de IL-10 anti-inflamatória elevou-se de modo significativo após o tratamento.

## ***8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

---

## 8. Referências Bibliográficas

1. Medeiros SF, Medeiros MMWY, Oliveira VN. Climacteric complaints among very low-income women from a tropical region of Brazil. *São Paulo Med J.* 2006;124(4):214-8.
2. Miller RA. The aging immune system: primer and prospectus. *Science.* 1996;273(5271):70-4.
3. Straub RH, Cutolo M, Zietz B, Scholmerich J. The process of aging changes the interplay of the immune, endocrine and nervous systems. *Mech Ageing Dev.* 2001;122(14):1591-611.
4. Kishimoto S, Tomino S, Mitsuya H, Nishimura H. Age-related decrease in frequencies of B-cell precursors and specific helper T cells involved in the IgG anti-tetanus toxoid antibody production in humans. *Clin Immunol Immunopathol.* 1982;25(1):1-10.
5. Grossman CJ, Rossele GA, Mendenhall CL. Sex steroid regulation of autoimmunity. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1994;40(4-6):649-59.
6. Beagley KW, Gockel CM. Regulation of innate and adaptive immunity by the female sex hormones oestradiol and progesterone. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2003;38(1):13-22.
7. Basedovsky HO, Del Rey A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr Rev.* 1996;17(1):64-102.
8. Russell DH. New aspects of prolactin and immunity: a lymphocyte-derived prolactin-like product and nuclear protein kinase C activation. *Trends Pharmacol Sci.* 1989;10(1):40-4.
9. Webster JI, Tonelli L, Sternberg EM. Neuroendocrine regulation of immunity. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:125-63.

10. Ho HN, Wu MY, Chen HF, Chao KH, Yang YS, Huang SC, et al. In vivo CD3+CD25+ lymphocyte subpopulation is down-regulated without increased serum-soluble interleukin-2 receptor (sIL-2R) by gonadotropin releasing hormone agonist (GnRH-a). *Am J Reprod Immunol*. 1995;33(1):134-9.
11. Silveira LF, Stewart PM, Thomas M, Clark DA, Bouloux PM, MacColl GS. Novel homozygous splice acceptor site GnRH receptor (GnRHR) mutation: human GnRHR knockout. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(6):2973-7.
12. Rivest S, Rivier C. The role of corticotropin-releasing factor and interleukin-1 in the regulation of neurons controlling reproductive function. *Endocr Rev*. 1995;16(2):177-99.
13. Amadori A, Zamarchi R, De Silvestro G, Forza G, Cavatton G, Danieli GA, et al. Genetic control of the CD4/CD8 T-cell ratio in humans. *Nat Med*. 1995;1(12):1279-83.
14. Pelfrey CM. Sexual dimorphism in autoimmunity: a focus on Th1/Th2 cytokines and multiple sclerosis. *Clin Appl Immunol Rev*. 2001;1(6):331-45.
15. Kanda N, Tamaki K. Estrogen enhances immunoglobulin production by human PBMCs. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;103(2 Pt 1):282-8.
16. Hong SC, Yoo SW, Cho GJ, Kim T, Hur JY, Park YK, et al. Correlation between estrogens and serum adipocytokines in premenopausal and postmenopausal women. *Menopause*. 2007;14(5):835-40.
17. DeLoia J, Stewart-Akers AM, Brekosky J, Kubik CJ. Effects of exogenous estrogen on uterine leukocyte recruitment. *Fertil Steril*. 2002;77(3):548-54.
18. Jain SK, Kannan K, Prouty L, Jain SK. Progesterone, but not 17 $\beta$ -estradiol, increases TNF- $\alpha$  secretion in U937 monocytes. *Cytokine*. 2004;26(3):102-5.
19. Prabhala RH, Fahey JV, Humphrey SL, Edkins RD, Stern JE, Wira CR. Regulation by human uterine cells of PBMC proliferation: influence of the phase of the menstrual cycle and menopause. *J Reprod Immunol*. 1998;40(1):25-45.

20. Grossman CJ. Regulation of the immune system by sex steroids. *Endocr Rev.* 1984;5(3):435-55.
21. Luchetti CG, Solano ME, Sander V, Arcos ML, Gonzalez C, Di Girolamo G, et al. Effects of dehydroepiandrosterone on ovarian cystogenesis and immune function. *J Reprod Immunol.* 2004;64(1-2):59-74.
22. Arlt W, Hewison M. Hormones and immune function: implications of aging. *Aging Cell.* 2004;3(4):209-16.
23. Faas M, Bouman A, Moes H, Heineman MJ, de Leij L, Schuiling G. The immune response during the luteal phase of the ovarian cycle: a Th2-type response? *Fertil Steril.* 2000;74(5):1008-13.
24. Shakhar K, Shakhar G, Rosenne E, Ben-Eliyahu S. Timing within the menstrual cycle, sex, and the use of oral contraceptives determine adrenergic suppression of NK cell activity. *Br J Cancer.* 2000;83(12):1630-6.
25. White HD, Crassi KM, Givan AL, Stern JE, Gonzalez JL, Memoli VA, et al. CD3+CD8+CTL activity within the human female reproductive tract: influence of stage of menstrual cycle and menopause. *J Immunol.* 1997;158(6):3017-27.
26. Szekeres-Bartho J, Wegmann TG. A progesterone-dependent immunomodulatory protein alters the Th1/Th2 balance. *J Reprod Immunol.* 1996;31(1):81-95.
27. Olsen NJ, Kovacs WJ. Gonadal steroids and immunity. *Endocr Rev.* 1996;17(4):369-84.
28. Medeiros SF, Oliveira VN, Yamamoto MMW. Epidemiologia clínica do climatério. *Reprod Clim.* 2003;18(1):79-86.
29. Keller ET, Zhang J, Yao Z, Qi Y. The impact of chronic estrogen deprivation on immunologic parameters in the ovariectomized rhesus monkey (*Macaca mulatta*) model of menopause. *J Reprod Immunol.* 2001;50(1):41-55.

30. Verthelyi D, Klinman DM. Sex hormone levels correlate with the activity of cytokine-secreting cells in vivo. *Immunology*. 2000;100(3):384-90.
31. Giglio T, Imro MA, Filaci G, Scudeletti M, Puppo F, De Cecco L, et al. Immune cell circulating subsets are affected by gonadal function. *Life Sci*. 1994;54(18):1305-12.
32. Yang JH, Chen CD, Wu MY, Chao KH, Yang YS, Ho HN. Hormone replacement therapy reverses the decrease in natural killer cytotoxicity but does not reverse the decreases in the T-cell subpopulation or interferon-gamma production in postmenopausal women. *Fertil Steril*. 2000;74(2):261-7.
33. Kumru S, Godekmerdan A, Yilmaz B. Immune effects of surgical menopause and estrogen replacement therapy in peri-menopausal women. *J Reprod Immunol*. 2004;63(1):31-8.
34. Kamada M, Irahara M, Maegawa M, Ohmoto Y, Takeji T, et al. Postmenopausal changes in serum cytokine levels and hormone replacement therapy. *Am J Obstet Gynecol*. 2001;184(3):309-14.
35. Yasui T, Maegawa M, Tomita J, Miyatani Y, Yamada M, Uemura H, et al. Changes in serum cytokine concentrations during the menopausal transition. *Maturitas*. 2007;56(4):396-403.
36. Pfeilschifter J, Koditz R, Pfohl M, Schatz H. Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. *Endocr Rev*. 2002;23(1):90-119.
37. Straub RH, Hense HW, Andus T, Scholmerich J, Riegger GA, Schunkert H. Hormone replacement therapy and interrelation between serum interleukin-6 and body mass index in postmenopausal women: a population-based study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(3):1340-4.
38. Brooks-Asplund EM, Tupper CE, Daun JM, Kenney WL, Cannon JG. Hormonal modulation of interleukin-6, tumor necrosis factor and associated receptor secretion in postmenopausal women. *Cytokine*. 2002;19(4):193-200.

39. Morishita M, Miyagi M, Iwamoto Y. Effects of sex hormones on production of interleukin-1 by human peripheral monocytes. *J Periodontol.* 1999;70(7):757-60.
40. Medeiros SF, Nince APB. Efeito da terapia de reposição hormonal sobre o sistema imune no climatério. *Anais do XII Encontro de Iniciação Científica da UFMT: 15-16 jul 2004 em Cuiabá; 2004;pp.269.*
41. Manyonda IT, Pereira RS, Makinde V, Brincat M, Varma RT. Effect of 17 $\beta$ -oestradiol on lymphocyte subpopulations, delayed cutaneous hypersensitivity responses and mixed lymphocyte reactions in post-menopausal women. *Maturitas.* 1992;14(3):201-10.
42. Hough HJ, Failla ML, Ludwig DA. Active lifestyle offsets HRT-induced suppression of T cell reactivity to mitogens. *Maturitas.* 1999;33(3):211-8.
43. Albrecht AE, Hartmann BW, Scholten C, Huber JC, Kalinowska W, Zielinski CC. Effect of estrogen replacement therapy on natural killer cell activity in postmenopausal women. *Maturitas.* 1996;25(3):217-22.
44. Fahlman MM, Boardley D, Flynn MG, Bouillon LE, Lambert CP, Braun WA. Effects of hormone replacement therapy on selected indices of immune function in postmenopausal women. *Gynecol Obstet Invest.* 2000;50(3):189-93.
45. Stopinska-Gluszak U, Waligóra J, Grzela T, Gluszak M, Jozwiak J, Radomski D, et al. Effect of estrogen/progesterone hormone replacement therapy on natural killer cell cytotoxicity and immunoregulatory cytokine release by peripheral blood mononuclear cells of postmenopausal women. *J Reprod Immunol.* 2006;69(1):65-75.
46. Porter VR, Greendale GA, Schocken M, Zhu X, Effros RB. Immune effects of hormone replacement therapy in post-menopausal women. *Exp Gerontol.* 2001;36(2):311-26.
47. Deguchi K, Kamada M, Irahara M, Maegawa M, Yamamoto S, Ohmoto Y, et al. Postmenopausal changes in production of type 1 and type 2 cytokines and the effects of hormone replacement therapy. *Menopause.* 2001;8(4):266-73.

48. Reuben DB, Palla SL, Hu P, Reboussin BA, Crandall C, Herrington DM, et al. Progestins affect mechanism of estrogen-induced C-reactive protein stimulation. *Am J Med.* 2006;119(2):167.e1-8.
49. Rogers A, Eastell R. Effects of estrogen therapy of postmenopausal women on cytokines measured in peripheral blood. *J Bone Mineral Res.* 1998;13(10):1577-86.
50. Berg G, Ekerfelt C, Hammar M, Lindgren R, Matthiesen L, Ernerudh J. Cytokine changes in postmenopausal women treated with estrogens: a placebo-controlled study. *Am J Reprod Immunol.* 2002;48(2):63-9.
51. Yilmazer M, Fenkci V, Fenkci S, Aktepe O, Sonmezer M, Kurtay G. Association of serum complement (C3, C4) and immunoglobulin (IgG, IgM) levels with hormone replacement therapy in healthy post-menopausal women. *Hum Reprod.* 2003;18(7):1531-5.
52. Christodoulakos GE, Lambrinoudaki IV, Economou EV, Papadias C, Vitoratos N, Panoulis CP, et al. Circulating chemoattractants RANTES, negatively related to endogenous androgens, and MCP-1 are differentially suppressed by hormone therapy and raloxifene. *Atherosclerosis.* 2007;193(1):142-50.
53. Stanczyk FZ. Parenteral versus oral treatment of postmenopausal women with estrogen. *Menopause.* 2007;16(6):968-70
54. Hu P, Greendale GA, Palla SL, Reboussin BA, Herrington DM, Barrett-Connor E, et al. The effects of hormone therapy on the markers of inflammation and endothelial function and plasma matrix metalloproteinase-9 level in postmenopausal women: the postmenopausal estrogen progestin intervention (PEPI) trial. *Atherosclerosis.* 2006;185(2):347-52.
55. de Valk-de Roo GW, Stehouwer CD, Meijer P, Mijatovic V, Kluft C, Kenemans P, et al. Both raloxifene and estrogen reduce major cardiovascular risk factors in healthy postmenopausal women: a 2-years, placebo-controlled study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19(12):2993-3000.
56. Abbas A, Fadel PJ, Wang Z, Arbique D, Jialal I, Vongpatanasin W. Contrasting effects of oral versus transdermal estrogen on serum amyloid A (SAA) and high-

density lipoproteins: SAA in postmenopausal women. *Arterioscler Tromb Vasc Biol.* 2004;24(10):e164-7.

57. Pradhan AD, Manson JE, Rossouw JE, Siscovick DS, Mouton CP, Rifai N, et al. Inflammatory biomarkers, hormone replacement therapy, and incident coronary heart disease: prospective analysis from the Womens Health Initiative Observational Study. *JAMA.* 2002;288(8):980-7.

58. Wakatsuki A, Okatani Y, Ikenoue N, Fukaya T. Effect of medroxyprogesterone acetate on vascular inflammatory markers in postmenopausal women receiving estrogen. *Circulation.* 2002;105(12):1436-9.

59. Menon DV, Vongpatanasin W. Effects of transdermal estrogen replacement therapy on cardiovascular risk factors. *Treat Endocrinol.* 2006;5(1):37-51.

60. Gol M, Akan P, Dogan E, Karas C, Saygili U, Posaci C. Effects of estrogen, raloxifene, and hormone replacement therapy on serum C-reactive protein and homocysteine levels. *Maturitas.* 2006;53(3):252-9.

61. Kwok S, Charlton-Menys V, Pemberton P, McElduff P, Durrington PN. Effects of dydrogesterone and norethisterone, in combination with oestradiol, on lipoproteins and inflammatory markers in postmenopausal women. *Maturitas.* 2006;53(4):439-46.

62. Eichler F, Keiling R. Variations in the percentages of lymphocyte subtypes during the menstrual cycle in women. *Biomed Pharmacother.* 1988;42(4):285-7.

63. Katz DL. *Epidemiology, biostatistics and preventive medicine review.* W B Saunders Company. Philadelphia. 1997;97-105

64. Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, Klein S, Coppel SW. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor- $\alpha$ , in vivo. *J Clin Endocrin Metabolism.* 1997;82(12):4196-200

65. Kassem M, Harris SA, Spelsberg TC, Riggs BL. Estrogen inhibits interleukin-6 production and gene expression in a human osteoblastic cell line with high levels of estrogen receptors. *J Bone Miner Res.* 1996;11(2):193-9

66. Orme IM. Characteristics and specificity of acquired immunologic memory to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol.* 1988;140(10):3589-93.
67. Xing D, Nozell S, Chen YF, Hage F, Oparil S. Estrogen and mechanisms of vascular protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(3):289-95.
68. Ku LT, Gercel-Taylor C, Nakajima ST, Douglas D Taylor. Alterations of T cell activation signalling and cytokine production by postmenopausal estrogen levels. *Immun Ageing.* 2009; 6:1.
69. Pekonen F, Siegberg R, Makinen T, Miettinen A, Yli-Korkala O. Immunological disturbances in patients with premature ovarian failure. *Clin Endocrinol.* 1986;25(1):1-6.
70. Ho PC, Tang GW, Lawton JWM. Lymphocyte subsets and serum immunoglobulins in patients with premature ovarian failure before and after estrogen replacement. *Hum Reprod.* 1993;8(5):714-6.
71. Ho PC, Tang GW, Lawton JW. Lymphocyte subsets in patients with oestrogen deficiency. *Reprod Immunol.* 1991;20(1):85-91.
72. Ho PC, Tang GWK, Fu KH, Fan MC, Lawton JWM. Immunologic studies in patients with premature ovarian failure. *Obst Gynecol.* 1988;71(4):622-6.
73. Athreya BH, Pletcher J, Zulian F, Weiner DB and Williams WV. Subset-Specific Effects of Sex Hormones and Pituitary Gonadotropins on Human Lymphocyte Proliferation in Vitro. *Clin Immunol and Immunopat.* 1993;66(3):201-11.
74. Burlison MH, Malarkey WB, Cacioppo JT, Poehlmann KM, Kiecolt-Glaser JK, Berntson GG, Glaser R. Postmenopausal hormone replacement: effects on autonomic, neuroendocrine, and immune. *Psychosomatic Med.* 1998;60(1):17-25.
75. Chernyshov VP, Radysh TV, Gura IV, Tatarchuk TP, Khominskaya KB. Immune disorders in women with premature ovarian failure in initial period. *Am J Rep Immunol.* 2001;46(3):220-5.

76. Hoek A, van Kasteren Y, de Haan-Meulman M, Schoemaker J, Drexhage HA. Dysfunction of monocytes and dendritic cells in patients with premature ovarian failure. *Am J Reprod Immunol*. 1993;30(4):207-17.
77. Fujimoto M, Poe JC, Inaoki M, Tedder TF. CD19 regulates B lymphocyte responses to transmembrane signals. *Sem Immunol*. 1998;10(4):267-77.
78. Fujimoto M, Poe JC, Hasegawa M, Tedder TF. CD19 regulates intrinsic B lymphocyte signal transduction and activation through a novel mechanism of processive amplification. *Immunol Res*. 2000;22(2-3):281-98.
79. Poe JC, Hasegawa M, Tedder TF. CD19, CD21, and CD22: multifaceted response regulators of B lymphocyte signal transduction. *Intern Rev Immunol*. 2001;20(6):739-62.
80. Iwata Y, Yoshizaki A, Komura K, Shimizu K, Ogawa F, Hara T et al. CD19, a response regulator of B lymphocytes, regulates wound healing through hyaluronan-induced TLR4 signaling. *Am J Pathol*. 2009;175:649-60.
81. Wira CR, Sandoe CP. Sex steroid hormone regulation of IgA and IgG in rat uterine secretions. *Nature*. 1977;268:534-6.
82. Folomeev M, Dougados M, Beaune J, Kouyoumdjian JC, Nahoul K, Amor B, Alekberova Z. Plasma sex hormones and aromatase activity in tissues of patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 1992;1:191-5.
83. Dogan E, Erkoc R, Demir C, Sayarlioglu H, Dilek I, Sayarlioglu M. Effect of hormone replacement therapy on CD4+ and CD8+ numbers, CD4+/CD8+ ratio, and immunoglobulin levels in hemodialysis patients. *Renal Failure*. 2005; 27(4):421-4.
84. D'Elia HF, Carlsten H. The impact of hormone replacement therapy on humoral and cell-mediated immune responses in vivo in post-menopausal women with rheumatoid arthritis. *Scan J Immunol*. 2008;68(6):661-7.

85. Athanassiou E, Praidou A, Tzafetas I. Ophthalmic effects of menopause and the role of hormone replacement therapy. *Eur Clin Obstet Gynaecol*. 2007;3:63-6.
86. Blum M, Zacharovich D, Pery J, Kitai E. Lowering effect of estrogen replacement treatment on immunoglobulins in menopausal women. *Rev Fr Gynecol Obstet*. 1990;85:207-9.
87. Leimola-Virtanen R, Helenius H, Laine M. Hormone replacement therapy and some salivary antimicrobial factors in post- and perimenopausal women. *Maturitas*. 1997;27:145-51.
88. Verthelyi D. Sex hormones as immunomodulators in health and disease. *Internat Immunopharmacol*. 2001;1(6):983-93.
89. Cioffi M, Esposito K, Vietri MT, Gaggero P, D'Auria A, et al. Cytokine pattern in postmenopause. *Maturitas*. 2002;41(3):187-92.
90. Edwards KM, Mills PJ. Effects of estrogen versus estrogen and progesterone on cortisol and interleukin-6. *Maturitas*. 2008;61:330-3.
91. Eilertsen AL, Hoibraaten E, Os I, Andersen TO, Sandvik L, et al. The effects of oral and transdermal hormone replacement therapy on C-reactive protein levels and other inflammatory markers in women with high risk of thrombosis. *Maturitas*. 2002;52:111-8.
92. Lakoski SG, Herrington DM. Effects of hormone therapy on C-reactive protein and IL-6 in postmenopausal women: a review article. *Climacteric*. 2005;8:317-26.
93. Borish L. IL-10: Evolving concepts. *J Allergy Clin Immunol*. 1998;101(3):293-7.
94. Doria A, Ghirardello A, Iaccarino L, Zampieri S, Punzi L, Tarricone E. Pregnancy, cytokines, and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthr Rheumat*. 2004;51(6):989-95.

## **9. APÊNDICES**

---

## **9.1 APÊNDICE 1**

---

## **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**PROJETO:** Efeito da Terapia de Reposição Hormonal sobre o Sistema Imune no Climatério.

**PESQUISADORES:** Prof. Dr. Sebastião Freitas de Medeiros (Orientador)

Alexandre Maitelli (Mestrando)

**INSTITUIÇÃO:** Hospital Universitário Júlio Müller – UFMT e Hospital Geral Universitário/UNIC

**OBJETIVO PRINCIPAL:** Avaliar o impacto da terapia de reposição hormonal nas respostas imunes durante o climatério.

**PROCEDIMENTOS:** Serão avaliadas laboratorialmente as respostas imunes antes e após reposição estrogênica e progestogênica.

**POSSÍVEIS RISCOS E DESCONFORTOS:** Aqueles relacionados à punção venosa e testes intradérmicos.

**BENEFÍCIOS PREVISTOS:** Melhoria na qualidade de vida em virtude de melhor resposta imunológica no combate às infecções.

Eu, \_\_\_\_\_, fui informada (o) dos objetivos, procedimentos, riscos e benefícios deste estudo.

Entendendo que terei garantia de confidencialidade, ou seja, que apenas dados consolidados serão divulgados e ninguém além dos pesquisadores terá acesso aos nomes dos participantes desta pesquisa. Entendo também, que tenho direito a receber informações adicionais sobre o estudo a qualquer momento, mantendo contato com o pesquisador principal. Fui informada ainda, que a minha participação é voluntária e que se preferir não participar ou deixar de participar deste estudo em qualquer momento, isso não me acarretará qualquer tipo de penalidade.

Compreendendo tudo o que me foi explicado sobre o estudo a que se refere este documento, concordo em participar do mesmo.

---

**Participante**

---

**Pesquisador Principal**

Cuiabá, \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2009.

## **9.2 APÊNDICE 2**

---

PACIENTES		LEUCÓCITOS	NEUTROFILOS	EOSINÓFILOS	LINFÓCITOS	MONÓCITOS
D.A.S	ANTES	3050	1494	122	1128	305
	DEPOIS	3450	1898	104	1138	310
M.R.A.L	ANTES	7580	4169	152	2577	682
	DEPOIS	6750	4792	68	1552	338
J.P.M	ANTES	5390	3126	216	1617	431
	DEPOIS	4670	2709	140	1494	327
D.T.F.L	ANTES	7170	5019	72	1577	502
	DEPOIS	7240	4706	290	1665	579
H.M.C.L	ANTES	3700	1887	37	1480	296
	DEPOIS	5590	3130	112	2012	335
J.F.M	ANTES	4060	2477	81	1218	284
	DEPOIS	4360	2354	131	1657	218
J.O.V	ANTES	14340	8747	143	4302	1147
	DEPOIS	11000	7480	110	2640	770
A.J.A	ANTES	6650	3790	200	2128	532
	DEPOIS	6900	4347	138	2001	414
E.R.S	ANTES	8610	4908	172	2927	603
	DEPOIS	8380	5112	168	2682	419
J.S.D	ANTES	3910	1994	196	1447	274
	DEPOIS	4110	2384	82	1397	247
I.M.S	ANTES	7600	4636	76	2356	532
	DEPOIS	7370	4569	147	2285	368
A.J.B	ANTES	5160	2786	671	1342	361
	DEPOIS	5460	2512	601	1966	382
I.N.S	ANTES	3370	1786	101	1213	270
	DEPOIS	3430	1612	103	1475	240
T.H.P.S	ANTES	5400	2646	108	2346	270
	DEPOIS	6500	3705	130	2340	325

## **9.3 APÊNDICE 3**

---

PACIENTES	COLETA	LINFÓCITOS B CD19	LINFÓCITOS T CD3	LINFÓCITOS T CD4	LINFÓCITOS T CD8	CD4/CD8
D.A.S	ANTES	267	708	390	313	1,25
	DEPOIS	163	732	411	281	1,46
M.R.A.L	ANTES	109	2214	1133	1062	1,07
	DEPOIS	178	1252	765	478	1,60
J.P.M	ANTES	184	1182	763	286	2,66
	DEPOIS	128	1184	826	274	3,01
D.T.F.L	ANTES	189	1070	705	301	2,35
	DEPOIS	283	1183	820	359	2,28
H.M.C.L	ANTES	74	1076	261	757	0,35
	DEPOIS	52	1744	440	1235	0,35
J.F.M	ANTES	70	838	542	227	1,96
	DEPOIS	115	1329	871	453	1,92
J.O.V	ANTES	434	2973	1935	1018	1,90
	DEPOIS	324	2098	1372	689	1,99
A.J.A	ANTES	213	1439	770	595	1,29
	DEPOIS	232	1486	754	698	1,08
E.R.S	ANTES	231	1780	1229	544	2,26
	DEPOIS	340	1895	1396	506	2,75
J.S.D	ANTES	112	922	515	290	1,77
	DEPOIS	107	1030	631	354	1,78
I.M.S	ANTES	327	1778	1321	454	2,90
	DEPOIS	342	1760	1253	475	2,63
A.J.B	ANTES	148	890	693	193	3,59
	DEPOIS	186	1550	1198	306	3,91
I.N.S	ANTES	100	1045	612	445	1,37
	DEPOIS	129	1084	776	308	2,51
T.H.P.S	ANTES	285	1678	1062	575	1,85
	DEPOIS	273	1808	1195	577	2,07

## **10. ANEXOS**

---

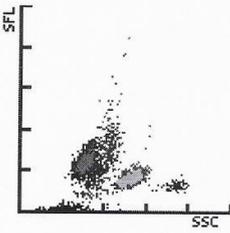
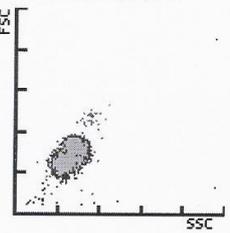
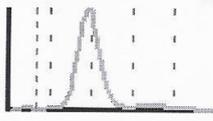
## ***10.1 ANEXO 1***

---

# Anexo 1

Sample No.: 002138451002	Rack: 3	Tube: 9 05/12/2009 09:31:34
Patient ID: 4036	Ward:	Dr.:
Name: BEATRIZ		Birth: 19/09/1980 Sex: Female
Comments:		Inst.ID: XT-1800i-1

<p><b>Positive</b></p> <p>Count</p> <table border="0" style="width: 100%;"> <tr><td>WBC</td><td>6.70 *</td><td>[10<sup>3</sup>/uL]</td><td></td></tr> <tr><td>RBC</td><td>4.25</td><td>[10<sup>6</sup>/uL]</td><td></td></tr> <tr><td>HGB</td><td>13.1</td><td>[g/dL]</td><td></td></tr> <tr><td>HCT</td><td>39.6</td><td>[%]</td><td></td></tr> <tr><td>MCV</td><td>93.2</td><td>[fL]</td><td></td></tr> <tr><td>MCH</td><td>30.8</td><td>[pg]</td><td></td></tr> <tr><td>MCHC</td><td>33.1</td><td>[%]</td><td></td></tr> <tr><td>PLT</td><td>258 *</td><td>[10<sup>3</sup>/uL]</td><td></td></tr> <tr><td>RDW-SD</td><td></td><td>[fL]</td><td></td></tr> <tr><td>RDW-CV</td><td>12.4</td><td>[%]</td><td></td></tr> <tr><td>MPV</td><td></td><td>[fL]</td><td></td></tr> <tr><td>NEUT</td><td>3.39 *</td><td>[10<sup>3</sup>/uL]</td><td>50.6 * [%]</td></tr> <tr><td>LYMPH</td><td>2.66 *</td><td>[10<sup>3</sup>/uL]</td><td>39.7 * [%]</td></tr> <tr><td>MONO</td><td>0.48 *</td><td>[10<sup>3</sup>/uL]</td><td>7.2 * [%]</td></tr> <tr><td>EO</td><td>0.14 *</td><td>[10<sup>3</sup>/uL]</td><td>2.1 * [%]</td></tr> <tr><td>BASO</td><td>0.03 *</td><td>[10<sup>3</sup>/uL]</td><td>0.4 * [%]</td></tr> </table>	WBC	6.70 *	[10 <sup>3</sup> /uL]		RBC	4.25	[10 <sup>6</sup> /uL]		HGB	13.1	[g/dL]		HCT	39.6	[%]		MCV	93.2	[fL]		MCH	30.8	[pg]		MCHC	33.1	[%]		PLT	258 *	[10 <sup>3</sup> /uL]		RDW-SD		[fL]		RDW-CV	12.4	[%]		MPV		[fL]		NEUT	3.39 *	[10 <sup>3</sup> /uL]	50.6 * [%]	LYMPH	2.66 *	[10 <sup>3</sup> /uL]	39.7 * [%]	MONO	0.48 *	[10 <sup>3</sup> /uL]	7.2 * [%]	EO	0.14 *	[10 <sup>3</sup> /uL]	2.1 * [%]	BASO	0.03 *	[10 <sup>3</sup> /uL]	0.4 * [%]	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p><b>DIFF</b></p>  </div> <div style="text-align: center;"> <p><b>WBC/BASO</b></p>  </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p><b>RBC</b></p>  </div> <div style="text-align: center;"> <p><b>PLT</b></p>  </div> </div>
WBC	6.70 *	[10 <sup>3</sup> /uL]																																																															
RBC	4.25	[10 <sup>6</sup> /uL]																																																															
HGB	13.1	[g/dL]																																																															
HCT	39.6	[%]																																																															
MCV	93.2	[fL]																																																															
MCH	30.8	[pg]																																																															
MCHC	33.1	[%]																																																															
PLT	258 *	[10 <sup>3</sup> /uL]																																																															
RDW-SD		[fL]																																																															
RDW-CV	12.4	[%]																																																															
MPV		[fL]																																																															
NEUT	3.39 *	[10 <sup>3</sup> /uL]	50.6 * [%]																																																														
LYMPH	2.66 *	[10 <sup>3</sup> /uL]	39.7 * [%]																																																														
MONO	0.48 *	[10 <sup>3</sup> /uL]	7.2 * [%]																																																														
EO	0.14 *	[10 <sup>3</sup> /uL]	2.1 * [%]																																																														
BASO	0.03 *	[10 <sup>3</sup> /uL]	0.4 * [%]																																																														

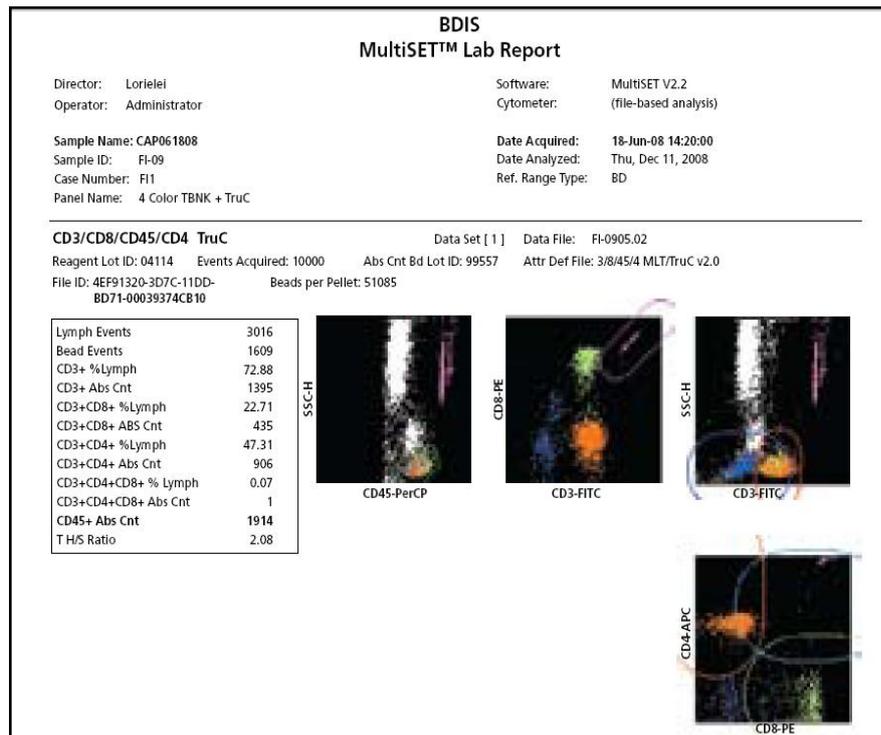
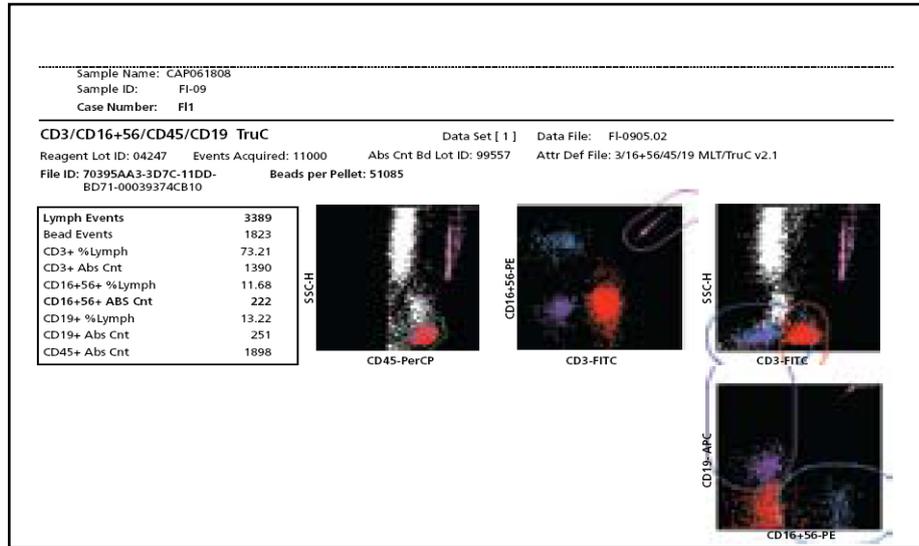
  

WBC IP Message(s)	RBC IP Message(s)	PLT IP Message(s)
		PLT Clumps?

## ***10.2 ANEXO 2***

---

## Anexo 2



## ***10.3 ANEXO 3***

---

## Anexo 3

### **Cobas® IgE II**

**Imunoensaio** para a determinação quantitativa in vitro de imunoglobulina E em soro e plasma humanos.

#### **Princípio do teste**

#### **Técnica de sandwich.**

Duração total do ensaio: 18 minutos

- 1ª Incubação: IgE de uma amostra de 10 µL, um anticorpo monoclonal biotilnado específico anti-IgE e um anticorpo monoclonal específico anti-IgE marcado com complexo de rutenio<sup>a</sup> reagem entre si e formam em complexo sandwich.
- 2ª Incubação: Após a incorporação das micropartículas revestidas da estreptavidina, o complexo formado liga-se à fase sólida pela interação da biotina e da estreptavidina.
- A mistura de reação é aspirada para a célula de leitura, onde as micropartículas são fixadas magneticamente à superfície do eletrodo. Os elementos não ligados são então removidos com ProCell. A aplicação de uma corrente elétrica ao eletrodo induz uma emissão quimioluminescente que é medida por um fotomultiplicador
- Os resultados são determinados com base numa curva de calibração gerada especificamente pelo analisador, através de uma calibração de 2 pontos, e numa curva principal incluída no código de barras do reagente.

**Ensaio:** Eleve a temperatura dos reagentes refrigerados até aproximadamente 20° C e coloque-os no disco dos reagentes do analisador. Siga o manual do operador do aparelho.

**Calibração:** Este método foi padronizado contra o “2nd IRP Reference Standard 75/502” da OMS. Freqüência das calibrações: uma por lote de reagentes utilizando reagente recém colocado.

**Cálculo dos resultados:** O analisador calcula automaticamente a concentração do analito de cada amostra.

**Intervalo de medição:** 0,100 a 2500UI/ml ou 0,240 a 6000ng/ml.

**Precisão:** A reprodutibilidade foi determinada com reagentes Elecsys, um pool de soros humanos e controles conforme protocolo modificado (EP5-A) do NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards).

**Sensibilidade analítica:** limite de detecção inferior de 0,10UI/ml (0,24ng/ml).

**Especificidade analítica:** os anticorpos utilizados são altamente específicos para IgE. Não foram detectadas quaisquer reatividades cruzadas com IgG, IgA e IgM.

**Sensibilidade funcional:** 0,50UI/mL (1,20ng/mL)

## ***10.4 ANEXO 4***

---

## Anexo

## 4

### Princípio do Procedimento IL-10

**IMMULITE 1000 IL-10** é um ensaio imunométrico de fase sólida por quimioluminescência.

**Ciclos de incubação:** 1 x 60 minutos.

#### Colheita

Plasma colhido com EDTA não é recomendável como amostra no ensaio da IMMULITE IL-10.

Recomenda-se o uso de uma ultra centrífuga para clarear as amostras lipêmicas. Amostras lipêmicas, hemolisadas ou totalmente contaminadas podem causar resultados errôneos.

A centrifugação de amostras antes da formação completa do coágulo pode resultar na presença de fibrina.

**Volume da amostra:** 100 µL de soro ou plasma heparinizado. A cuvete da amostra deve conter no mínimo 250 µL mais do que o total do volume requerido.

**Armazenagem:** 6 horas a 2-8° C ou até 6 meses a -20° C.

#### Características do ensaio

**Calibração:** até 1.000 pg/mL

**Sensibilidade Analítica:** 1 pg/mL

**Efeito Hook de Alta Dose:** nenhum até 102.300 pg/mL

**Especificidade:** o ensaio é altamente específico para IL-10

**Linearidade:** As amostras foram doseadas sob várias diluições.

**Bilirrubina:** A presença de bilirrubina até concentrações de 200 mg/mL não tem efeito no procedimento dentro da precisão do ensaio.

**Hemólise:** Amostras fortemente hemolizadas podem apresentar ligeiros acréscimos na concentração de IL-10.

**Lipemia:** A presença de triglicerídeos em concentrações até 2.000 mg/dL não tem efeito nos resultados, dentro da precisão do ensaio.

**Comparação de Métodos:** O procedimento IMMULITE IL-10 foi comparado com um ensaio para IL-10 disponível comercialmente. O material de calibração do IMMULITE IL-10 foi comparado com o material de referência da OMS para IL-10.

### Princípios do Procedimento IL-6

**IMMULITE 1000 IL-6** é um ensaio imunométrico seqüencial de fase sólida, de enzimas químico-luminosas.

**Ciclos de incubação:** 2 x 30 minutos

#### Colheita

Recomenda-se o uso de uma ultra centrífuga para clarear as amostras lipêmicas.

Amostras hemolisadas podem indicar tratamento incorreto de uma amostra antes do envio para o laboratório, portanto seus resultados devem ser interpretados com cuidado.

A centrifugação de amostras antes da formação completa do coágulo pode resultar na presença de fibrina.

**Volume da amostra:** 100 µL de soro ou plasma heparinizado. A cuvete da amostra deve conter no mínimo 250 µL mais do que o total do volume requerido.

**Estabilidade:** 1 dia a 2-8° C ou 6 meses a -20° C

#### Características do ensaio

**Calibração:** até 1.000 pg/mL

**Sensibilidade Analítica:** 2 pg/mL

**Efeito Hook de Alta Dose:** nenhum até 60.000 pg/mL

**Especificidade:** o ensaio é altamente específico para IL-6

**Linearidade:** As amostras foram doseadas sob várias diluições.

**Bilirrubina:** A presença de bilirrubina até concentrações de 200 mg/mL não tem efeito no procedimento dentro da precisão do ensaio.

**Hemólise:** A presença de hemoglobina até 550 pg/mL não tem efeito no procedimento dentro da precisão do ensaio.

**Lipemia:** A presença de triglicerídeos em concentrações até 3.000 mg/dL não tem efeito nos resultados, dentro da precisão do ensaio.

**Comparação de Métodos:** O procedimento IMMULITE IL-6 foi comparado com um ensaio para IL-6 disponível comercialmente. O doseamento foi comparado com a versão anterior do IMMULITE 2000 IL-6 em 150 amostras de doentes.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)