

Lídia Lima Aragão Sampaio

**CONCENTRAÇÃO DE COLÁGENO NA PELE FACIAL DE
MULHERES NA PÓS-MENOPAUSA APÓS TRATAMENTO COM
ESTRADIOL E GENISTEÍNA TÓPICOS: UM ESTUDO RANDOMIZADO
DUPLO CEGO**

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo – Escola Paulista de
Medicina, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

São Paulo
2016

Lídia Lima Aragão Sampaio

**CONCENTRAÇÃO DE COLÁGENO NA PELE FACIAL DE
MULHERES NA PÓS-MENOPAUSA APÓS TRATAMENTO COM
ESTRADIOL E GENISTEÍNA TÓPICOS: UM ESTUDO RANDOMIZADO
DUPLO CEGO**

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo – Escola Paulista de
Medicina, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

Orientadora:

Prof. Dra. Marisa Teresinha Patriarca

Coorientador:

Prof. Dr. Manoel de Jesus Simões

São Paulo

2016

Sampaio, Lúcia Lima Aragão

Concentração de colágeno na pele facial de mulheres na pós menopausa após tratamento com estradiol e genisteína tópicos: um estudo randomizado duplo cego. Lúcia Lima Aragão Sampaio – São Paulo, 2016

xii, 26f

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Ginecologia

Título em Inglês: Collagen concentration on the facial skin of postmenopausal women after topical treatment with estradiol and genistein: a randomized double-blind study

1. Colágeno. 2. Estrogênios. 3. Fitoestrógenos. 4. Genisteína. 5. Menopausa. 6. Terapia de Reposição Hormonal.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GINECOLOGIA

Chefe do Departamento: Prof. Dr. Manoel João Batista Castelo Girão

Coordenador do curso de pós-graduação: Prof. Dr. Rodrigo Aquino de Castro

Lídia Lima Aragão Sampaio

**CONCENTRAÇÃO DE COLÁGENO NA PELE FACIAL DE
MULHERES NA PÓS-MENOPAUSA APÓS TRATAMENTO COM
ESTRADIOL E GENISTEÍNA TÓPICOS: UM ESTUDO RANDOMIZADO
DUPLO CEGO**

Presidente da Banca:

Prof. Dra. Marisa Teresinha Patriarca

Banca examinadora

Prof. Dr. Claudio Emílio Bonduki

Prof. Dr. José Maria Soares Júnior

Prof. Dr. Manoel de Jesus Simões

Prof. Dr. Luciano de Melo Pompei

Dedicatória

Este Trabalho é dedicado

À minha família, Vilma, Eduardo, Claudia e Márcio pelo amor puro, dedicação e por ter me proporcionado a base moral através de valores sólidos e ensinamentos que levarei por toda a vida.

À Dra. Marisa Teresinha Patriarca, pela paciência, dedicação, orientações e pelo saber compartilhado que tanto me ajudaram na pesquisa e finalização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Mauro Abi Haidar, pela cordialidade, carinho e recepção no ambulatório e estímulo à pesquisa.

Ao Prof. Dr. José Maria Soares Júnior, pelas horas de apoio, amizade e incentivo na profissão.

Agradecimentos

Os nossos mais sinceros agradecimentos a todos que nos auxiliaram e apoiaram na elaboração e execução deste trabalho:

À prof. Dra. Marcia Gaspar Nunes, pelos ensinamentos em relação ao amor a profissão e ao ensino.

Ao Prof. Dr. Ivaldo da Silva, por sua acolhida e amizade.

Ao Prof. Dr. Manuel de Jesus Simões, pela orientação e incentivo para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Claudio Emilio Bonduki, por sua cordialidade e ensinamentos nos ambulatórios.

Ao Dr. Vamberto Maia Filho pelo carinho, paciência e otimismo.

À Dra. Eline Maria Stafuzza, por sua alegria e conselhos.

À Dra. Tereza Embiruçu, pela companhia, amizade e apoio.

À Dra. Emily Izumi, pela paciência e auxílio.

À Colega Túlia Kleveston pela parceria.

À Adriana Aparecida Ferraz Carbonel, pela amizade, dedicação e perseverança em concluir este trabalho.

Aos meus queridos residentes e acadêmicos minha eterna gratidão, carinho e admiração pela cooperação neste trabalho, em especial a Livia Cisneiros, Winnie Bastos, Maiara Santos Timbó e Eveline Xavier Pereira de Souza.

Aos funcionários do ambulatório de Ginecologia Endócrina e do Departamento de Ginecologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, pela Colaboração.

Às pacientes, o meu muito obrigada por permitir que este trabalho pudesse ser executado.

Sumário

Dedicatória	iv
Agradecimentos	v
Lista de Figuras	viii
Lista de Siglas	ix
Resumo	x
Abstract	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	5
3. MÉTODOS	6
3.1 Intervenção	7
3.2 Grupos	8
3.3 Determinação de colágeno	8
3.4 Análise imuno-histoquímica	9
3.5 Análise estatística	10
4. RESULTADOS	11
4.1 Análise morfológica	11
4.2 Quantificação do colágeno	11
5. DISCUSSÃO	16
6. CONCLUSÃO	20
7. REFERÊNCIAS	21
Anexos	24

Lista de Figuras

Figura 1. Cortes histológicos para quantificação de colágeno em lâmina própria da pele através de software específico com ampliação de 100x	8
Figura 2. Cortes histológicos da pele utilizando imuno-histoquímica para colágeno tipo I	9
Figura 3. Cortes histológicos da pele utilizando imuno-histoquímica para colágeno tipo III	10
Figura 4. Avaliação semi-quantitativa da concentração de colágeno tipo I por grupos de tratamento e respectivos controles.....	11
Figura 5. Médias das análises quantitativas da imuno-histoquímica do colágeno tipo I, em μm^2	12
Figura 6. Avaliação semi-quantitativa da concentração de colágeno tipo I por grupos de tratamento e respectivos controles.....	13
Figura 7. Médias das análises quantitativas da imuno-histoquímica do colágeno tipo III, em μm^2	13
Figura 8. Médias das análises quantitativas da imuno-histoquímica do colágeno total, em μm^2	14

Lista de Siglas

CTR	Controle
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
ES	Estrogênio
FSH	Hormônio folículo estimulante
ISO	Isoflavonas
IMC	Índice de massa corporal
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
RNA	Ácido ribonucleico
SERM	Modulador do receptor de estrogênio seletivo
TRAT	Tratamento
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo

Resumo

Objetivo: Comparar os efeitos já conhecidos do estrogênio com a genisteína sobre o colágeno da pele facial de mulheres na pós menopausa sem terapia hormonal. **Métodos:** Tratou-se de um ensaio clínico randomizado, duplo-cego com estrogênio e isoflavona, onde foram recrutadas 30 voluntárias na pós-menopausa visando quantificar, por meio de imuno-histoquímica, a concentração facial de colágeno antes e após o uso tópico facial de estrogênios e de isoflavonas (genisteína) por um período de 24 semanas. **Resultados:** Houve aumento da quantidade de colágeno tipo I e tipo III ao final de ambos os tratamentos, porém o estrogênio mostrou-se superior ao fitoestrógeno, com significância estatística. **Conclusão:** O tratamento com estrogênio tópico é superior ao fitoestrógeno, mas ambos demonstraram aumento do colágeno da pele facial. O que ainda não está claro é se o uso tópico prolongado de tais substâncias pode causar repercussões sistêmicas, sendo necessários mais estudos para esclarecer tal questionamento.

Abstract

Objective: To compare the known effects of estrogen with genistein on the facial skin collagen of postmenopausal women without hormone therapy. **Methods:** This is a clinical, cross over trial with randomized and blinded convenience sample with estrogen and isoflavones, which 30 volunteer postmenopausal women were recruited to quantify facial collagen concentration before and after topical use of estrogen and isoflavones for 24 weeks. **Results:** The amount of both types I and III collagen increased at the end of both treatments, but estrogen was superior to the phytoestrogen, with statistical significance. **Conclusion:** Treatment with topical estrogen is superior to phytoestrogen, but both showed an increase in facial skin collagen, with statistical significance. What is not yet clear is whether prolonged topical use of such substances can cause systemic effects, thus, more research is needed to clarify this question.

1. INTRODUÇÃO

O envelhecimento da população é um fenômeno mundial responsável por conhecidas mudanças estruturais e funcionais nos mais diversos sistemas orgânicos. As alterações da pele relacionadas com a idade incluem diminuição da sua espessura devido à atrofia da epiderme, derme e gordura subcutânea, ressecamento e rugas, além do aumento da incidência de lesões proliferativas. Especificamente na epiderme, o envelhecimento provoca redução da espessura, achatamento da papila dérmica, diminuição da densidade de melanócitos e células de Langerhans. Além disso, no interior da derme, há diminuição da atividade do fibroblasto, o que conduz a um teor reduzido de ácido hialurônico e colágeno, fragmentação das fibras de elastina e vascularização diminuída (Zouboulis *et al.*, 2011). Estudos demonstram que a menopausa acelera tais alterações cutâneas, uma vez que não há níveis de estrogênio adequados para prover o controle da integridade estrutural e funcional da pele (Verdier-Sévrain *et al.*, 2006). A associação entre a menopausa e a aceleração do envelhecimento da pele sugere a deficiência de estrogênio como catalisador deste fenômeno, afetando significativamente a autoestima das mulheres.

A redução da espessura, da celularidade e da quantidade de colágeno cutâneos são as principais mudanças que ocorrem ao longo da vida. Tais fenômenos iniciam-se em torno dos 30 anos de idade e intensificam-se entre a quarta e a quinta décadas de vida, coincidindo com a instalação da menopausa (Brincat *et al.*, 1987; Castelo-Branco *et al.*, 1992; Varila *et al.*, 1995).

A pele é o maior e um dos mais complexos órgãos do corpo, recebe cerca de 9% do débito cardíaco, está envolvida na absorção de diversas substâncias e possui funções bioquímicas, tal como o metabolismo de hormônios esteroides. É composta de uma porção epitelial de origem ectodérmica, a epiderme, e uma porção de origem mesodérmica, a derme. A epiderme contém queratinócitos, que formam um epitélio escamoso estratificado queratinizado. Muitos tipos de células especiais estão presentes na pele, tais como melanócitos, os quais produzem o pigmento melanina, células de Langerhans, que são parte do sistema imunológico, e células Merckel, que representam receptores mecânicos. A derme contém uma camada papilar,

formada por tecido conjuntivo frouxo, e uma camada reticular, formada por tecido conjuntivo denso.

A pele também possui um espaço extracelular que é preenchido por um complexo de componentes que constituem a matriz extracelular. Morfologicamente, a matriz extracelular contém um grande número de proteínas e glicosaminoglicanos, que se organizam para formar um líquido. As variações na qualidade e quantidade celular da matriz, assim como a sua organização, são responsáveis pela diversidade morfológica, funcional e patológica da pele. O colágeno e a elastina são responsáveis pelas qualidades estruturais e elásticas deste órgão. O colágeno representa 70 a 80% do peso seco da pele humana, sendo o maior componente dérmico, e representa 30% do teor total de proteínas no corpo humano. Um grande número de tipos de colágeno já foi descrito até a presente data; entretanto, os tipos mais abundantes e bem estudados são os tipos I e III, que constituem cerca de 90% do total do colágeno cutâneo (Azulay, 2013).

Os fibroblastos, células secretoras do colágeno, apresentam receptores para estrogênios e androgênios. A diminuição nos níveis de estrogênios afeta a sua polimerização, o que pode corroborar com a diminuição da produção dessa proteína. A deficiência estrínica também acelera a degeneração e a fragmentação das fibras de elastina e a diminuição significativa do número de pequenos vasos arteriais da microcirculação dérmica. Como consequência, ocorre adelgaçamento da camada epidérmica e retificação das cristas interpapilares da junção derme-epiderme, que são marcadores do envelhecimento cutâneo (Verdier-Sévrain *et al.*, 2006).

O tratamento corrente com estrogênios naturais resulta em alterações morfológicas da pele envelhecida, caracterizadas principalmente por aumento no número de fibroblastos e glicosaminoglicanos (Moraes *et al.*, 2009; Patriarca *et al.*, 2013). Há mudanças quantitativas de colágeno com a idade com redução progressiva de cerca de 1% ao ano em mulheres adultas, podendo chegar a 2% durante os primeiros cinco anos após a menopausa, com uma perda de até 30% neste período (Brincat *et al.*, 1987).

Vários autores já relataram que as alterações da pele na pós-menopausa podem ser mitigadas ou mesmo revertidas por terapia com estrogênio, que parece agir sobre a atividade e a proliferação de fibroblastos aumentando o colágeno e a espessura da pele. Eles sugerem que o estrogênio poderia abrandar a degradação

do colágeno dérmico, já que existem receptores de estrogênio em todos os componentes cutâneos, mormente nos fibroblastos. (Brincat *et al.*, 1987; Moraes *et al.*, 2009; Patriarca *et al.*, 2013).

Sabe-se ainda que espécies reativas de oxigênio (radicais livres) causam graves danos à matriz extracelular e à estrutura molecular do DNA, proteínas e lipídios. O acúmulo destas alterações moleculares aparentemente constitui a base de envelhecimento celular. Diversos estudos têm demonstrado que tratamentos com estrogênio interferem positivamente na produção de colágeno e ácido hialurônico e sugerem defesa da pele contra o dano oxidativo. (Skosey *et al.*, 1973; Brincat *et al.*, 1983; Punnonen *et al.*, 1984; Callens *et al.*, 1996; Patriarca *et al.*, 2007, Phillips *et al.*, 2008; Moraes *et al.*, 2009).

Estudo experimental que cultivou fibroblastos em condições oxidativas, mostrou que a presença de 17-beta-estradiol protegia as células da pele contra os malefícios causados por radicais livres e que a redução drástica dos níveis de estrogênio tornava a pele mais susceptível a tal dano (Bottai *et al.*, 2013).

No entanto, devido aos efeitos colaterais associados ao uso em longo prazo de estrogênio e aos perfis de risco de algumas mulheres, abordagens terapêuticas alternativas que atuem especificamente nas alterações da pele típicas da menopausa têm sido consideradas. Nas últimas décadas, os moduladores seletivos do receptor de estrogênio (SERM), como o raloxifeno, foram desenvolvidos na tentativa de conseguir os efeitos benéficos do estrogênio, enquanto minimiza os efeitos secundários prejudiciais em tecidos-alvo através de interações com receptor de estrogênio específico (Verdier-Sévrain *et al.* 2006); no entanto, até a presente data, as evidências sobre o efeito de SERMs sobre a pele são muito limitadas. Em asiáticos, que consomem altos níveis de isoflavonas em sua dieta, notam-se diferentes danos à pele em comparação aos caucasianos (Goh *et al.*, 1990). Diversos estudos já concluíram que a isoflavona de soja isolada ou em combinação com outros agentes mostraram efeitos positivos sobre a aparência e composição cutânea, com aumento da síntese e redução da degradação do colágeno dérmico (Kuiper *et al.*, 1998; Gruber *et al.*, 2002; Sator *et al.*, 2004; Polito *et al.* 2012).

A genisteína, uma isoflavona encontrada em baixas concentrações na soja e em quantidades aumentadas em determinados alimentos de soja fermentados, foi considerada um SERM natural ideal e que poderia desempenhar um papel

preventivo em alterações da pele relacionadas com a idade, e que são aceleradas pela menopausa, sem os efeitos colaterais estrogênicos nocivos sobre o organismo (Cassidy *et al.*, 2006). Tal fitoestrógeno parece ser eficaz em minimizar a perda do colágeno cutâneo em condições de privação de estrogênio, e seus cremes cosméticos são bastante utilizados para melhorar a secura da pele e atenuar rugas, sem aparentes efeitos sistêmicos (Rona *et al.*, 2004), provavelmente por sua maior afinidade para o receptor β de estrogênio, que é mais frequente na pele, ossos e sistema cardiovascular.

Os estrogênios e isoflavonas, bem como os seus derivados, têm sido utilizados topicamente com o objetivo de prevenir e tratar o envelhecimento da pele após a menopausa sem evidência científica consistente (Sator *et al.*, 2004), adicionalmente, a falta de estudos clínicos que comparem a eficácia e a segurança desses dois ativos, é o que motivou o presente estudo.

2. OBJETIVO

Comparar os efeitos do estrogênio com a genisteína sobre a concentração de colágeno tipo I e III na pele facial de mulheres na pós-menopausa.

3. MÉTODOS

Trata-se ensaio clínico randomizado, duplo-cego com estrogênio e isoflavona, aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa local (386/2004, anexo I), visando quantificar a concentração facial de colágeno após uso tópico de estrogênios e de isoflavonas durante 24 semanas. Foram recrutadas 30 voluntárias na pós-menopausa a partir do setor de Ginecologia Endocrinológica do departamento de Ginecologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Na fase de pré-seleção foram avaliadas mulheres após a menopausa, com queixa de ressecamento cutâneo progressivo, por meio de anamnese e de exame físico geral e ginecológico. Foram, a seguir, realizados exames complementares da rotina do setor, além da colpocitologia hormonal, dosagem de estradiol sérico e ultrassonografia pélvica e transvaginal.

As pacientes foram divididas em dois grupos: (1) Grupo ES – aplicação de gel com estradiol a 0,01% e (2) Grupo ISO – aplicação de gel com isoflavona de soja a 40% (genisteína 4%).

A avaliação de todas as pacientes consistiu de história detalhada, exame físico e exames laboratoriais. Os critérios de elegibilidade para inclusão no estudo foram: idades entre 45-55 anos; dois a cinco anos de pós-menopausa; FSH > 40 mU/mL; níveis de estrogênio < 20 pg/ml; exame físico normal e índice de massa corporal (IMC) < 30 kg/m²; nenhum tratamento com estrogênio ou derivados da soja nos 12 meses anteriores; não usuárias de tabaco; colpocitologia revelando padrão atrófico, com ausência de células superficiais. Mulheres que apresentavam contraindicação para a terapia hormonal ou que vinham utilizando estrogênios, retinóides à base de plantas ou de soja, e aquelas que apresentavam histórico de doenças do colágeno não foram incluídas. Os critérios de exclusão foram: hipersensibilidade conhecida aos estrogênios, doenças estrogênio-dependentes conhecidas ou suspeitas, incluindo as neoplásicas e não neoplásicas, evidência de alterações malignas em mamografia pré-estudo ou qualquer contraindicação para estrogenerapia, fotossensibilidade cutânea, vegetarianos estritos, consumo regular de suplementação mineral de vitamina E maior que o recomendado, tratamento com antibióticos, história de doenças crônicas, incluindo as endócrinas, ginecológicas ou neoplásicas, além do uso regular de medicação conhecida por

interferir com o desfecho do estudo. Também foram excluídas as pacientes com citologia cérvico-vaginal alterada. As participantes com hipertensão não poderiam estar em uso de duas ou mais drogas anti-hipertensivas para serem incluídas.

O protocolo do estudo foi aprovado pela Escola UNIFESP, pelo Comitê de Investigação da Medicina Humana (número de comissão de ética 386/2004), e cada participante recebeu e assinou um consentimento informado (anexo II) por escrito antes da sua inscrição.

3.1 Intervenção

Farmacêuticos dispensaram recipientes de igual aparência e cor contendo isoflavona ou estrogênio, de acordo com uma lista gerada pelo computador por meio de randomização. Os pesquisadores responsáveis alocavam as pacientes de acordo com o próximo número disponível da lista de randomização, e cada uma recolheu seus recipientes diretamente do departamento de farmácia. O código foi revelado aos pesquisadores uma vez que o recrutamento, a coleta de dados e análises histológicas foram completadas. Em caso de problema de saúde, um médico não participante do estudo, sem a informação sobre o conteúdo do recipiente, examinaria a paciente. Se necessário, este médico prescreveria os exames laboratoriais para a exclusão de quaisquer efeitos colaterais sistêmicos possivelmente graves. Antes do início da terapia foi efetuada biópsia de pele da região pré-auricular e após 24 semanas foi realizada nova biópsia contralateral.

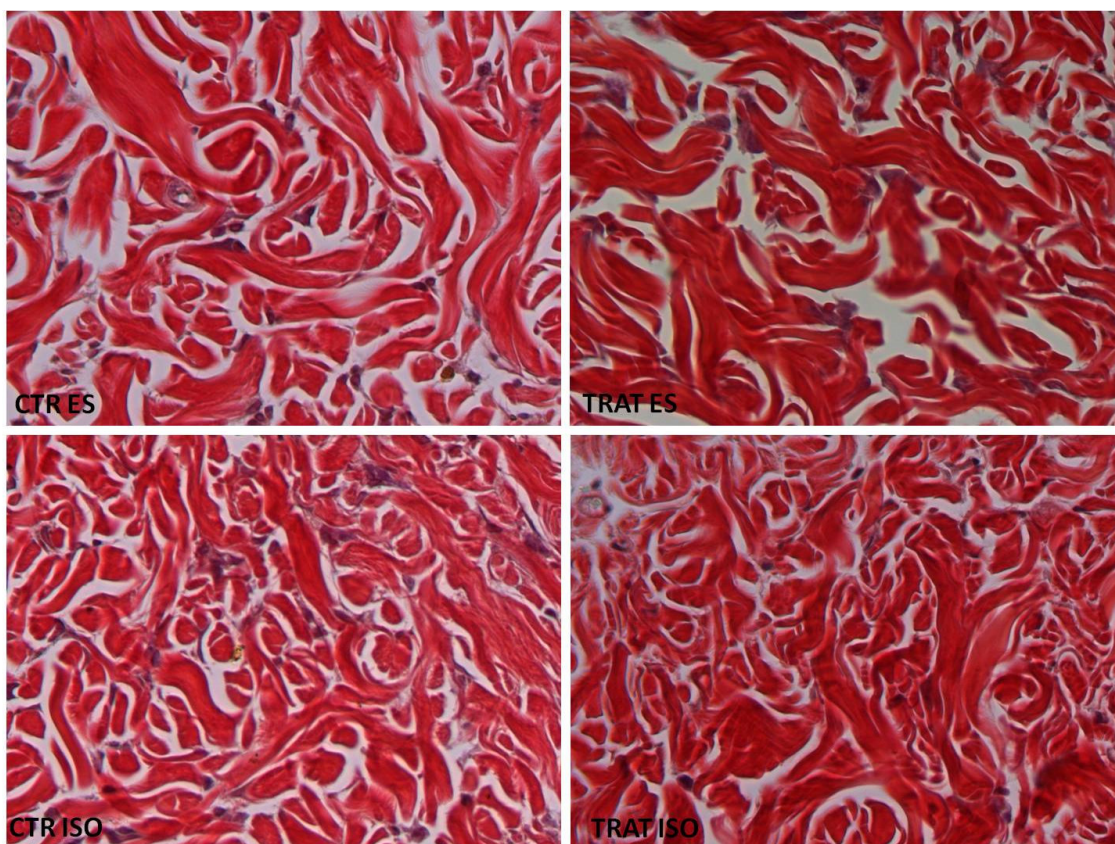
As pacientes realizavam aplicação diária de gel (0,5 g - graduado por meio de aplicador específico) na pele da face, principalmente na região pré-auricular, durante a noite, e pela manhã. Elas utilizavam apenas um protetor solar em gel que foi distribuído uniformemente para todas as pacientes do estudo, e foram aconselhadas a não utilizar qualquer outro cosmético. Para avaliar os possíveis efeitos hormonais sistêmicos, amostras de citologia vaginal foram colhidas em todas as visitas (início e após 06,12,18 e 24 semanas de tratamento), e amostras de sangue venoso foram coletadas antes e após 12 e 24 semanas de tratamento para a mensuração do 17-beta-estradiol, determinado por ensaios químicos diretos (ADVIA Centaur CP, Nova Iorque, EUA)

3.2 Grupos

Após o final do estudo, a etiqueta foi aberta e os grupos de tratamento apresentavam o mesmo número e foram classificadas em: G1 (Grupo ES) - gel com 17-beta-estradiol 0,01% (n = 15); G2 (Grupo ISO) - gel com genisteína 4% (n = 15).

3.3 Determinação de colágeno

Para a quantificação do conteúdo de colágeno na lâmina própria da pele, foi utilizado um software para processamento e análise de imagem (Imagelab®, Softium Informatics Ltd., Brasil). Quatro áreas diferentes da lâmina própria foram selecionadas, distribuídas homogeneamente ao longo do maior eixo da pele, totalizando 80 áreas por grupo, sob a ampliação de 100x. Para a análise estatística, foram utilizados os meios de quatro áreas por corte histológico (Figura 1).

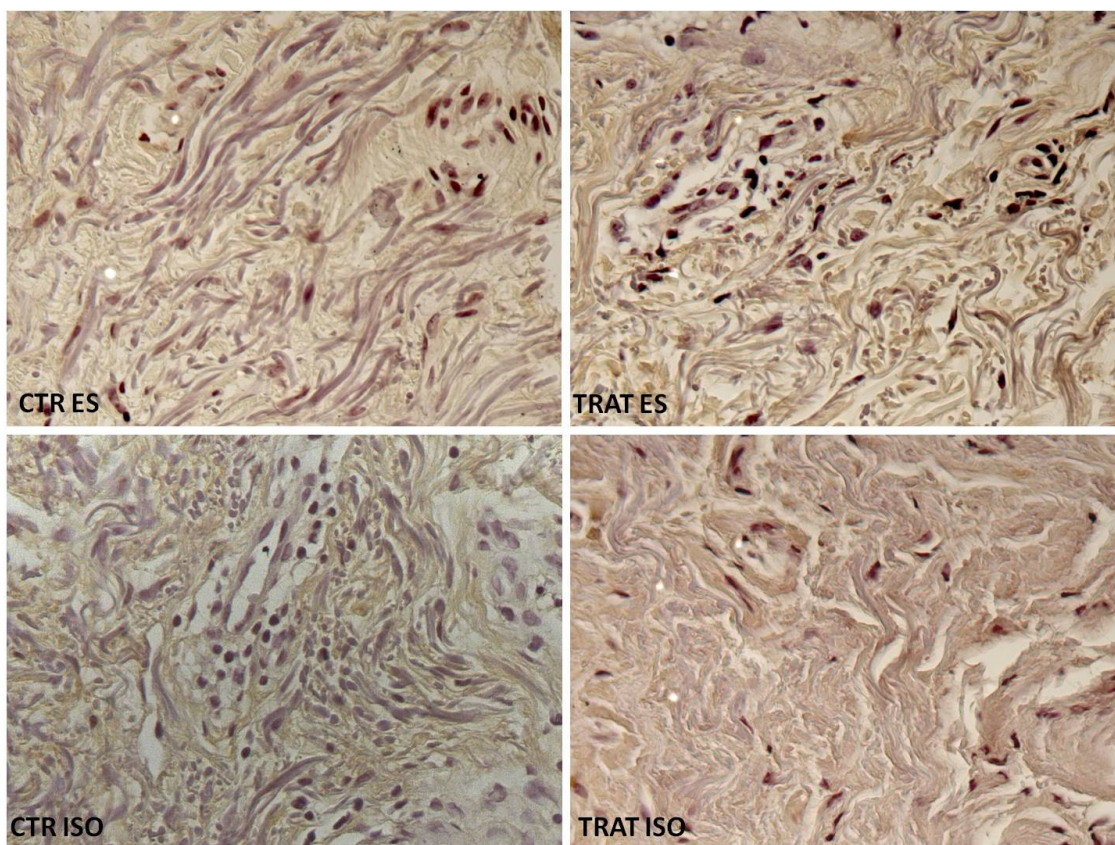


Legenda: CTR: controle; TRAT-ES: tratamento com estrogênio; CTR: Controle; TRAT-ISO: tratamento com isoflavonas.

Figura 1 – Cortes histológicos para quantificação de colágeno em lâmina própria da pele através de software específico com ampliação de 100x.

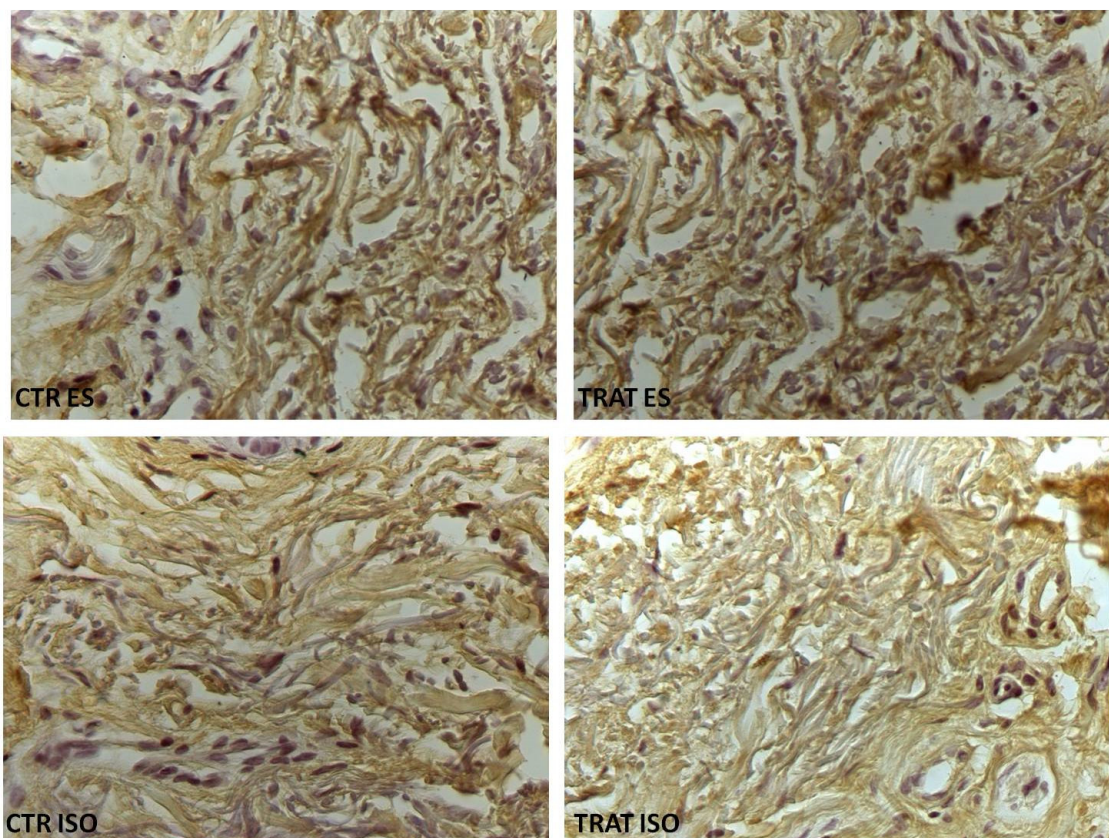
3.4 Análise imuno-histoquímica

A fim de determinar o índice de proliferação das células da pele, as secções foram coradas por meio de técnica de imuno-histoquímica para colágeno tipo I, utilizando anticorpos de coelho Anti-Ac Policlonais Collageno I ABBiotech®. Para a avaliação do colágeno tipo III, utilizaram-se anticorpos de coelho Anti-Ac Policlonais Collageno III Serotec®. As imagens foram então capturadas por microscópio de luz AxionVision Rel 4,6 (Carl Zeiss) acoplado a um MRC AxioCam (Carl Zeiss) e câmera de vídeo de alta resolução (Carl Zeiss). Um software de análise de imagem (AxionVision REL 4.6 - Carl Zeiss) também foi utilizado (Figura 2 e 3).



Legenda: CTR: controle; TRAT-ES: tratamento com estrogênio; CTR: Controle; TRAT-ISO: tratamento com isoflavonas. Escala = 20µm

Figura 2 – Cortes histológicos da pele utilizando imuno-histoquímica para colágeno tipo I.



Legenda: CTR: controle; TRAT-ES: tratamento com estrogênio; CTR: Controle; TRAT-ISO: tratamento com isoflavonas. Escala = 20 μ m

Figura 3 – Cortes histológicos da pele utilizando imuno-histoquímica para colágeno tipo III.

3.5 Análise estatística

Os valores obtidos foram expressos como média $\pm$ desvio padrão ($M \pm DP$). As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software GraphPadPrism 5.0® (GraphPad Software Inc.). O teste utilizado foi One-way ANOVA seguido do teste de Tukey. Foram considerados estatisticamente significativos os experimentos cujo valor de p foi menor que 0,05 ($\alpha < 5\%$) (Tabelas 1 a 3).

4. RESULTADOS

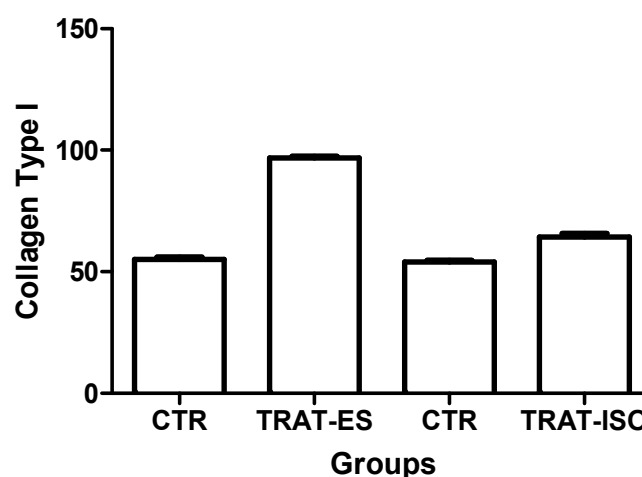
Todas as 30 participantes incluídas no presente estudo concluíram o ensaio clínico, bem como todas as avaliações foram feitas de maneira sistemática.

4.1 Análise Morfológica

A análise morfológica, conforme apresentado na figura 1, mostra que houve aumento da concentração de colágeno para ambos os grupos (ES e ISO) quando comparados aos seus controles (CTR-ES e CTR-ISO).

4.2 Quantificação do Colágeno

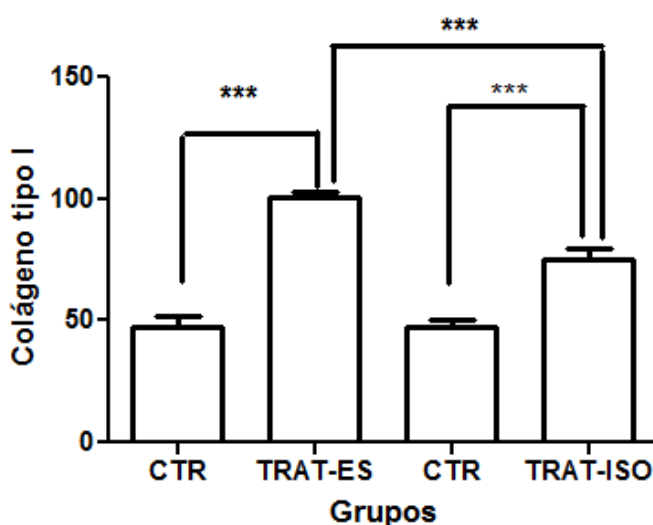
Os resultados foram obtidos a partir de análise imuno-histoquímica das amostras de pele, antes e depois do tratamento tópico com estrógeno ou isoflavona. Foram avaliadas individualmente a quantidade de colágeno tipo I e colágeno tipo III. A figura 4 apresenta em suas colunas a concentração de colágeno tipo I nas amostras controles (antes do tratamento) e nas amostras obtidas ao final da terapia com o 17-beta-estradiol 0,01% e com a genisteína, observadas por meio de preparos histológicos.



Legenda: CTR: controle; TRAT-ES: tratamento com estrogênio; CTR: Controle; TRAT-ISO: tratamento com isoflavonas.

Figura 4 – Avaliação semi-quantitativa da concentração de colágeno tipo I por grupos de tratamento e respectivos controles.

Observamos na Figura 5 e Tabela 1, por meio da imuno-histoquímica, aumento significativo da produção de colágeno tipo I quando comparado o grupo que fez uso do estrógeno, em relação ao controle. De forma semelhante, quando comparadas as amostras submetidas ao tratamento com a isoflavona em relação ao controle, também nota-se acréscimo na quantidade de colágeno tipo I, estatisticamente significativo. Na comparação entre os tratamentos tópicos com estrógeno versus isoflavona, o primeiro mostrou-se superior com significância estatística.



Legenda: CTR: controle; TRAT-ES: tratamento com estrogênio; CTR: Controle; TRAT-ISO: tratamento com isoflavonas. *** p < 0,001

Figura 5 – Médias das análises quantitativas da imuno-histoquímica do colágeno tipo I, em μm^2 .

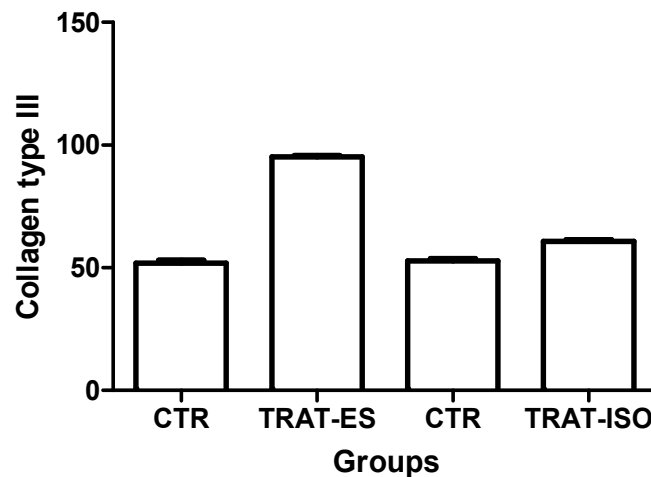
Tabela 1 – Médias e desvio padrão (DP) dos resultados da análise quantitativa da imuno-histoquímica para o colágeno tipo I.

Grupos	Colágeno tipo I			
	CTR-ES	TRAT-ES	CTR-ISO	TART-ISO
Média (μm^2)	47,50 ^a	100,50 ^b	47,50 ^c	75,17 ^d
DP	±1,09	±2,07	±2,22	±1,02

Legenda: CTR-ES: controle do grupo com estrogênio; TRAT-ES: tratamento com estrogênio; CTR-ISO: controle do grupo com isoflavonas; TRAT-ISO: tratamento com isoflavonas.

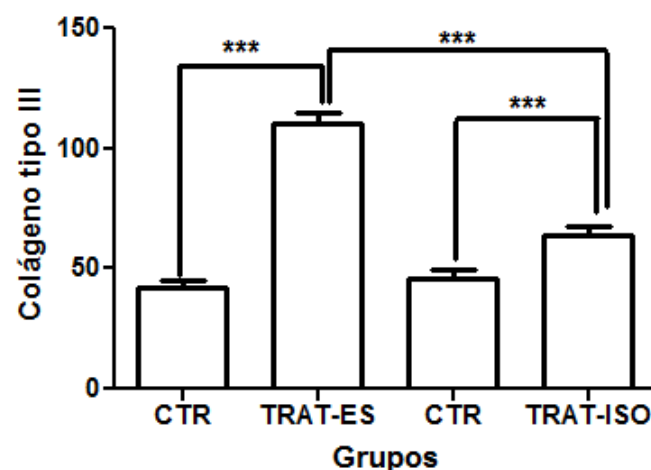
* a<b: p<0,001; c<d : p<0,001; e b>d: p<0,001

Houve aumento do colágeno tipo III, observado por meio de preparo histológico (Figura 6) e imuno-histoquímica (Figura 7 e Tabela 2), após o tratamento com estrogênio tópico e após o uso da isoflavona, comparados aos seus respectivos grupos controles, com diferença estatisticamente significativa. Nessa análise, o estrógeno também se mostrou superior ao fitoestrógeno.



Legenda: CTR: controle; TRAT-ES: tratamento com estrogênio; CTR: Controle; TRAT-ISO: tratamento com isoflavonas.

Figura 6 – Avaliação semi-quantitativa da concentração de Colágeno tipo III por grupos de tratamento e respectivos controles.



Legenda: CTR: controle; TRAT-ES: tratamento com estrogênio; CTR: Controle; TRAT-ISO: tratamento com isoflavonas. *** p < 0,001

Figura 7- Médias das análises quantitativas da imuno-histoquímica do colágeno tipo III.

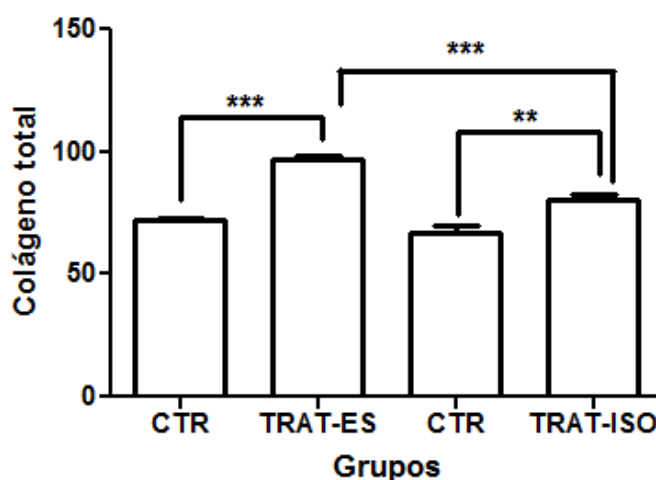
Tabela 2 – Médias e desvio padrão (DP) dos resultados da análise quantitativa da imuno-histoquímica para o colágeno tipo III.

Grupos	Colágeno tipo III			
	CTR-ES	TRAT-ES	CTR-ISO	TART-ISO
Média (μm^2)	41,83 ^a	110,30 ^b	45,50 ^c	63,83 ^d
DP	$\pm 1,60$	$\pm 1,08$	$\pm 1,26$	$\pm 1,08$

Legenda: CTR-ES: controle do grupo com estrogênio; TRAT-ES: tratamento com estrogênio; CTR-ISO: controle do grupo com isoflavonas; TRAT-ISO: tratamento com isoflavonas.

* a<b: p<0,001; c<d : p<0,001; e b>d: p<0,001* a<b: p<0,001; c<d : p<0,001; e b>a: p<0,001

Em relação à concentração total de colágeno, em ambos os tipos I e III, observamos aumento significativo após o tratamento com estrogênio e isoflavonas, quando comparado com o controle, e resultados superiores com estrogênio tópico, com diferença estatisticamente significativa (Figura 8 e Tabela 3)



Legenda: CTR: controle; TRAT-ES: tratamento com estrogênio; CTR: Controle; TRAT-ISO: tratamento com isoflavonas. *** p < 0,001

Figura 8 - Média das análises quantitativas da imuno-histoquímica do colágeno total (correspondente à Tabela 3).

Tabela 3 – Médias e desvio padrão (DP) dos resultados da análise quantitativa da imuno-histoquímica para o colágeno total.

Colágeno total				
Grupos	CTR-ES	TRAT-ES	CTR-ISSO	TART-ISO
Média (μm^2)	71,83 ^a	97,17 ^b	64,67 ^c	80,67 ^d
DP	$\pm 1,32$	$\pm 1,42$	$\pm 1,23$	$\pm 1,18$

CTR-ES: controle do grupo com estrogênio; TRAT-ES: tratamento com estrogênio; CTR-ISO: controle do grupo com isoflavonas; TRAT-ISO: tratamento com isoflavonas. * a<b: p<0,001; c<d : p<0,001; e b>d: p<0,001

5. DISCUSSÃO

A possibilidade de absorção sistêmica, com o uso tópico de estrogênio foi uma das questões levantadas, e, com o objetivo de esclarecer tal questão, foram utilizados esfregaços vaginais, ultrassonografia transvaginal para a medição da espessura do endométrio, e a dosagem de estradiol no soro, antes e depois das 24 semanas de tratamento. Todas as mulheres selecionadas apresentavam antes do tratamento, esfregaço vaginal atrófico, atrofia do endométrio e níveis de estradiol no soro inferior a 20 pg/mL, os quais não foram alterados após a sua conclusão. Pode-se inferir a partir destes resultados que a terapia de estrogênio tópico não produz efeitos sistêmicos significativos, talvez devido à pequena área de aplicação e/ou pelo curto período de observação. O tratamento com genisteína também não alterou tais marcadores. O resultado concorda com relatórios anteriores que mostraram que as mulheres que receberam a substância por via tópica não mostraram nenhuma mudança no trofismo vaginal (Kaari *et al.*, 2006; Patriarca *et al.*, 2013).

Isoladamente ou em combinação com outros agentes, as isoflavonas de soja têm muitos efeitos benéficos sobre o aspecto e estrutura da pele. Accorsi Neto *et al.* relataram uma epiderme mais espessa, aumento do teor de colágeno e elastina, além do aumento significativo da quantidade de vasos sanguíneos dérmicos em 30 mulheres menopausadas que utilizaram uma dieta rica em isoflavona de soja por seis meses. Entre os fitoestrógenos, a genisteína, que tem uma estrutura molecular muito semelhante à do estradiol, apresenta os efeitos mais expressivos, pois pode facilmente ligar-se a receptores de estrogênio.

O papel da deficiência de estrogênio nas mudanças de pele relacionadas à idade – integridade estrutural e capacidade funcional – são bem definidas, porém a diminuição na espessura e conteúdo de colágeno na pele foi mais correlacionada ao período de deficiência estrínica do que à idade em mulheres mais velhas, ocorrendo ainda rápido declínio após ausência do estrogênio (Thornton, 2016). Mudanças significativas foram observadas em até 24 semanas, entretanto, ainda não está definido se tais mudanças decorrem de resposta imediata ao rápido declínio nos níveis de estrogênio (Töz *et al.*, 2016).

Ao longo das últimas décadas, moduladores seletivos do receptor de estrogênio (SERMs), tais como o raloxifeno, têm sido desenvolvidos a fim de

alcançarem os mesmos efeitos benéficos do estrogênio, com mínimos efeitos secundários prejudiciais em tecidos-alvo através de interações dos receptores de estrogênio específicos. Marini *et al.*, 2010, revelaram que tanto o estradiol quanto a genisteína são mais eficazes do que o raloxifeno para melhorar os danos da pele na vigência de hipoestrogenismo. Observaram ainda que, surpreendentemente, uma menor dose de genisteína foi mais eficaz para restabelecer as propriedades da pele do que o raloxifeno ou o estradiol, o que foi reforçado pela descoberta de que a genisteína pode aumentar a migração celular, a inflamação, a síntese da matriz provisória, a deposição de colágeno, angiogênese e reepitelização, todos os quais são processos importantes na reparação da pele. Curiosamente, os dados experimentais também sinalizam que a administração sistêmica de genisteína na mesma dose que a utilizada em mulheres na pós-menopausa tem efeitos positivos sobre alterações da pele induzida pela ooforectomia (Polito *et al.*, 2012).

As isoflavonas e os seus derivados têm sido utilizados topicamente para prevenir e tratar o envelhecimento da pele após a menopausa, sem evidência científica consistente até a presente data. Patriarca *et al.*, 2013, em estudo utilizando a mesma população do presente ensaio, analisaram a concentração de ácido hialurônico na derme após tratamento com estrogênio e genisteína tópicos, e demonstraram aumento da concentração deste glicosaminoglicano, bem como de fibroblastos, com ambas as terapias, sugerindo provável acréscimo de diversos componentes da derme secretados por estas células, entre eles, o colágeno. Embora existam numerosos estudos que mostram aumento somente no colágeno dérmico tipo III com o uso tópico de estradiol, sem aumento significativo no colágeno do tipo I, que é o mais abundante na pele, nosso estudo evidenciou incremento na concentração de colágeno total, bem como quando analisados isoladamente os tipos I e tipo III, após o uso de estradiol ou genisteína tópicos, com significância estatística. Tal achado está de acordo com Sator *et al.*, 2004, que demonstraram resultados semelhantes.

A eficácia do tratamento com estradiol tópico foi superior ao uso do fitoestrógeno, o que também concorda com os estudos já citados (Sator *et al.*, 2004; Patriarca *et al.*, 2013). Nossos resultados são importantes porque muitas mulheres desistem da terapia hormonal na pós-menopausa pelo receio dos efeitos colaterais,

principalmente pelo medo do câncer de mama. Diante disto, a opção de drogas alternativas com efeitos similares ao estradiol torna-se extremamente oportuna.

O mecanismo pelo qual as isoflavonas levaram a um aumento na concentração do colágeno na derme ainda não está esclarecido. Sugere-se que esta ação não seja mediada diretamente por fibroblastos, mas pelo efeito inibidor já conhecido destas drogas sobre a enzima tirosina-quinase, a qual impede a expressão do mRNA que, como é bem conhecido, codifica metaloproteinases (colagenases e as elastases), dificultando a degradação dos componentes da matriz extracelular. Ao que parece, a ação das isoflavonas de soja não somente se relaciona com o receptor de estrogênio, mas também com os seus efeitos antioxidantes e, por conseguinte, protetor de ambos os envelhecimentos – o intrínseco ou cronológico da pele, bem como o extrínseco, que é determinado principalmente por radiação ultravioleta (Wei *et al.*, 2003).

Os efeitos do uso de estrogênio tópico em relação à concentração de colágeno na pele de mulheres na pós-menopausa ainda são controversos na literatura. Yoon *et al.*, 2014 (Coreia), em estudo prospectivo randomizado e duplo cego, investigaram se a terapia tópica com estrogênio poderia melhorar a pele facial envelhecida pelos efeitos da radiação ultravioleta, particularmente no que diz respeito à severidade das rugas e elasticidade da pele, quantificando objetivamente a expressão de pró-colágeno e de metaloproteinase-1 (colagenase). Tal estudo revelou que após 24 meses de terapia tópica de estrogênio não houve diferença estatisticamente significativa em relação às rugas faciais, à elasticidade da pele ou à produção de pró-colágeno nas amostras obtidas. Além disso houve aumento na expressão da metaloproteinase-1, proteína que regula a degradação do colágeno. Vale ressaltar que tal estudo avaliou os efeitos da terapia estrogênica sobre a pele exposta ao sol e o estrogênio utilizado foi a estrona, limitações relevantes, mas que não diminuem a importância dos resultados. Chama à atenção o fato de ainda não estar totalmente elucidado o mecanismo pelo qual o estrogênio pode regular a produção de colágeno na pele humana e se tal mecanismo se dá de forma diferente quando há exposição à radiação ultravioleta, que sabidamente aumenta as metaloproteinases que degradam o colágeno.

Estudos futuros comparando o efeito do estrogênio e das isoflavonas em pacientes com e sem exposição solar seriam certamente esclarecedores.

Quanto às repercussões sistêmicas, não está claro se podem estar presentes com o uso prolongado desses medicamentos em uma área maior do que a facial. Novas pesquisas com o objetivo de buscar esta resposta são necessárias.

6 CONCLUSÃO

Os dados deste estudo sugerem que ambas as terapias estudadas podem aumentar tanto o colágeno do tipo I quanto o tipo III da pele facial pós-menopausa, sendo que a ação da genisteína foi inferior à do estrogênio.

7 REFERÊNCIAS

Accorsi-Neto A, Haidar M, Simões R, Simões M, Soares-Jr J, Baracat E. Effects of isoflavones on the skin of postmenopausal women: a pilot study. *Clinics*. 2009;64(6):505-10.

Azulay RD, Azulay DR. *Dermatologia*. 6ª. edição. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan; 2013.

Bottai G., Mancina R., Muratori M., Di Gennaro P., Lotti T. 17 β -estradiol protects human skin fibroblasts and keratinocytes against oxidative damage. *J. Eur. Acad. Dermatol Venereol*. 2013;27(10):1236-43.

Brincat M, Moniz CF, Studd JW, Darby AJ, Magos A, Cooper D. Sex hormones and skin collagen content in postmenopausal women. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1983;287(6402):1337-8.

Brincat M, Versi E, Moniz CF, Magos A, de Trafford J, Studd JW. Skin collagen changes in postmenopausal women receiving different regimens of estrogen therapy. *Obstet Gynecol*. 1987;70(1):123-7.

Callens A, Vaillant L, Lecomte P, Berson M, Gall Y, Lorette G. Does hormonal skin aging exist? A study of the influence of different hormone therapy regimens on the skin of postmenopausal women using non-invasive measurement techniques. *Dermatology*. 1996;193(4):289-94.

Cassidy A. Factors affecting the bioavailability of soy isoflavones in humans. *J AOAC Int*. 2006;89(4):1182-8.

Castelo-Branco C, Duran M, González-Merlo J. Skin collagen changes related to age and hormone replacement therapy. *Maturitas*. 1992;15(2):113-9.

Goh CL. *Occupational skin diseases*. Singapore: PG Publishing, 1990.

Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC. Production and actions of estrogens. *N Engl J Med*. 2002;346(5):340-52.

Kaari C, Haidar MA, Soares Jr JM, Nunes MG, Quadros LG, Kemp C, Stavale JN, Baracat EC. Randomized clinical trial comparing conjugated equine estrogens and isoflavones in postmenopausal women: a pilot study. *Maturitas*. 2006;53(1):49-58.

Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, et al. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*. 1998;139(10):4252-63.

Marini H, Polito F, Altavilla D, Irrera N, Minutoli L, Calò M, et al. Genistein aglycone improves skin repair in an incisional model of wound healing: a comparison with

raloxifene and oestradiol in ovariectomized rats. *Br J Pharmacol*. 2010;160(5):1185–94

Moraes AB, Haidar MA, Soares Júnior JM, Simões MJ, Baracat EC, Patriarca MT. The effects of topical isoflavones on postmenopausal skin: double-blind and randomized clinical trial of efficacy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2009;146(2):188-92.

Patriarca MT, Goldman KZ, Dos Santos JM, Petri V, Simões RS, Soares JM Jr, et al. Effects of topical estradiol on the facial skin collagen of postmenopausal women under oral hormone therapy: a pilot study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2007;130(2):202-5.

Patriarca MT, Moraes AR, Nader HB, Petri V, Martins JR, Gomes RC, et al. Hyaluronic acid concentration in postmenopausal facial skin after topical estradiol and genistein treatment: a double-blind, randomized clinical trial of efficacy. *Menopause*. 2013;20(3):336-341.

Phillips TJ, Symons J, Menon S, HT Study Group. Does hormone therapy improve age-related skin changes in postmenopausal women? A randomized, double-blind, double-dummy, placebo-controlled multicenter study assessing the effects of norethindrone acetate and ethinyl estradiol in the improvement of mild to moderate age-related skin changes in postmenopausal women. *J Am Acad Dermatol*. 2008;59(3):397-404.

Polito F, Marini H, Bitto A, Irrera N, Vaccaro M, Adamo EB, et al. Genistein aglycone, a soy-derived isoflavone, improves skin changes induced by ovariectomy in rats. *Br J Pharmacol*. 2012;165(4):994-1005.

Punnonen R, Vilska S, Rauramo L. Skinfold thickness and long-term postmenopausal hormone therapy. *Maturitas*. 1984;5(4):259-62.

Rona C, Vailati F, Berardesca E. The cosmetic treatment of wrinkles. *J Cosmet Dermatol*. 2004;3(1):26-34.

Sator PG, Schmidt JB, Rabe T, Zouboulis CC. Skin aging and sex hormones in women clinical perspectives for intervention by hormone replacement therapy. *Exp Dermatol*. 2004;13 Suppl 4:36-40.

Skosey JL, Damgaard E. Effect of estradiol benzoate on the degradation of insoluble collagen of rat skin. *Endocrinology*. 1973;93(2):311-5.

Thornton MJ. Human skin: a mirror for estrogen action? *Menopause*. 2016;23(2):119-20.

Töz E, Özcan A, Balsak D, Avc ME, Eraslan AG, Balcı DD. Potential adverse effects of prophylactic bilateral salpingo-oophorectomy on skin aging in premenopausal women undergoing hysterectomy for benign conditions. *Menopause* 2016;23:138-142.

Varila E, Rantala I, Oikarinen A, Risteli J, Reunala T, Oksanen H, et al. The effect of topical oestradiol on skin collagen of postmenopausal women. *Br J Obstet Gynaecol*. 1995;102(12):985-9.

Verdier-Sévrain S, Bonté F, Gilchrest B. Biology of estrogens in skin: implications for skin aging. *Exp Dermatol*. 2006;15(20):83-94.

Wei H, Saladi R, Lu Y, Wang Y, Palep SR, Moore J, et al. Isoflavone genistein: photoprotection and clinical implications in dermatology. *J Nutr*. 2003;133(11 Suppl 1):3811S-3819S.

Yoon HS, Lee SR, Chung JH. Long-term topical oestrogen treatment of sun-exposed facial skin in post-menopausal women does not improve facial wrinkles or skin elasticity, but induces matrix metalloproteinase-1 expression. *Acta Derm Venereol*. 2014;94(1):4-8.

Zouboulis CC, Makrantonaki E. Clinical aspects and molecular diagnostics of skin aging. *Clin Dermatol*. 2011;29(1):3-14.

Anexos

Anexo 1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 30 de abril de 2004.
CEP 0386/04

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) ANDREA REGINA BARBOSA DE MORAES
Disciplina/Departamento: Endocrinologia/Medicina da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: "Análise crítica do uso tópico de estrogênios e isoflavonas sobre o colágeno e glicosaminoglicanos dérmicos".

Prezado(a) Pesquisador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU e APROVOU o projeto de pesquisa acima referenciado.

Conforme resolução 195/96 do Conselho Nacional de Saúde são deveres do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. Apresentar primeiro relatório parcial em 27/outubro/2004.
5. Apresentar segundo relatório parcial em 25/abril/2005.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

"Ressaltamos que é de essencial importância que seja verificado, antes da divulgação dos processos e/ou resultados obtidos nesta pesquisa, se os mesmos são potencialmente patentáveis ou passíveis de outras formas de proteção intelectual/industrial. A proteção por meio do depósito de patente, ou de outras formas de proteção da propriedade intelectual, evita a ação indevida de terceiros e confere maior segurança quando da publicação dos resultados da pesquisa."

Anexo 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Análise Crítica do Uso Tópico de Estrogênios e Isoflavonas sobre o Colágeno e Glicosaminoglicanos Dérmicos.

Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa avaliar os efeitos dos estrogênios e isoflavonas de uso tópico na pele facial durante 24 semanas.

Será avaliado no sangue o hormônio estradiol, através de coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço, ou seja, será retirada quantidade de sangue equivalente a duas colheres de sopa, para saber se existe absorção no sangue do creme usado na face, previamente ao tratamento e ao final deste.

O estudo avalia o envelhecimento da pele e a sua relação com os hormônios da mulher na menopausa, assim decidimos por estudar a pele da face por ter este sentido mais estético, e ser área mais exposta ao sol, tendo assim características diferentes de áreas não expostas, devido a agressão que o sol causa na pele.

Deste modo, será realizada uma biópsia, que é retirada de pequeno pedaço da pele, na face, na frente da orelha, com instrumento tipo agulha com corte menor do que a cabeça de um alfinete, antes e depois do tratamento. Antes será feito anestesia no local, com uma agulha bem pequena e quase nenhum desconforto nem sangramento. Não precisa tomar pontos depois, apenas um discreto curativo, sem qualquer prejuízo às atividades do dia a dia, sem precisar de repouso.

O estudo irá avaliar se existe ou não melhora do tônus, hidratação e cicatrização da pele, por conseguinte com melhora da proteção ao organismo, como têm sido descritos em trabalhos experimentais e clínicos, porém estes pouco controlados.

As pacientes serão divididas em dois grupos de 20, um receberá estrogênio, outro isoflavona, a distribuição será aos acasos, o médico e a paciente não saberão o tipo do creme que estará sendo usado, sem qualquer prejuízo às mesmas.

Em qualquer etapa do estudo, o paciente terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas.

O principal investigador é a Dra. Andrea Moraes, que pode ser encontrada na rua Embaú, 66, tel: 11- 5549-6174, Vila Clementino. Se tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)- rua Botucatu, 572-primeiro andar, cj 14, tel: 11- 55711062, FAX: 11-5539-7162, Email: cepunifesp@epm.br

É ainda garantida a liberdade de retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na instituição.

São ainda, direitos do paciente:

- Confidencialidade: as informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente:

- Ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

- Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada

à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa;

-Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (anexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

O pesquisador compromete-se a utilizar os dados e material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou foram lidas para mim, descrevendo o estudo- Efeitos histomorfológicos, imuno-histoquímicos e clínicos dos estrogênios e isoflavonas de uso tópico na pele facial de mulheres na pós menopausa. Discuti com a Dra. Andrea Moraes sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidade ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

Assinatura do paciente/ representante legal

data: __/__/__

Assinatura da testemunha

data: __/__/__

Assinatura do responsável pelo estudo

data: __/__/__

Anexo 3 - Citologia hormonal vaginal antes e após três e seis meses de tratamento nas 30 pacientes estudadas.

Paciente Nº	Pré-tratamento	3 meses de tratamento	Pós-tratamento
1	90/10/00	90/10/00	100/00/00
2	80/20/00	70/30/00	70/30/00
3	100/00/00	90/10/00	90/10/00
4	100/00/00	100/00/00	100/00/00
5	90/10/00	90/10/00	80/20/00
6	90/10/00	90/10/00	90/10/00
7	100/00/00	100/00/00	100/00/00
8	100/00/00	90/10/00	90/10/00
9	80/20/00	80/20/00	90/10/00
10	80/20/00	80/20/00	80/20/00
11	80/20/00	90/10/00	100/00/00
12	90/10/00	100/00/00	100/00/00
13	90/10/00	80/20/00	80/20/00
14	100/00/00	90/10/00	90/10/00
15	80/20/00	80/20/00	80/20/00
16	80/20/00	100/00/00	100/00/00
17	100/00/00	100/00/00	90/10/00
18	90/10/00	90/10/00	90/10/00
19	100/00/00	90/10/00	90/10/00
20	100/00/00	100/00/00	100/00/00
21	100/00/00	100/00/00	100/00/00
22	80/20/00	80/20/00	90/10/00
23	100/00/00	90/10/00	90/10/00
24	90/10/00	80/20/00	80/20/00
25	80/20/00	80/20/00	90/10/00
26	100/00/00	100/00/00	90/10/00
27	100/00/00	100/00/00	80/20/00
28	80/20/00	100/00/00	100/00/00
29	100/00/00	100/00/00	100/00/00
30	90/10/00	90/10/00	100/00/00

Anexo 4 – Nível sérico de estradiol antes e após três e seis meses de tratamento nas 30 pacientes estudadas.

Paciente Nº	Pré-tratamento	3 meses de tratamento	Pós-tratamento
1	<20	<20	<20
2	<20	<20	<20
3	<20	<20	<20
4	<20	<20	<20
5	<20	<20	<20
6	<20	<20	<20
7	<20	<20	<20
8	<20	<20	<20
9	<20	<20	<20
10	<20	<20	<20
11	<20	<20	<20
12	<20	<20	<20
13	<20	<20	<20
14	<20	<20	<20
15	<20	<20	<20
16	<20	<20	<20
17	<20	<20	<20
18	<20	<20	<20
19	<20	<20	<20
20	<20	<20	<20
21	<20	<20	<20
22	<20	<20	<20
23	<20	<20	<20
24	<20	<20	<20
25	<20	<20	<20
26	<20	<20	<20
27	<20	<20	<20
28	<20	<20	<20
29	<20	<20	<20
30	<20	<20	<20