



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

ANA ELISA RIBEIRO

EFEITO DA ISOFLAVONA ASSOCIADA OU NÃO AO PROBIÓTICO COMPARADO
A TERAPIA HORMONAL NOS SINTOMAS UROGENITAIS DA MENOPAUSA:
ENSAIO CLÍNICO CONTROLADO RANDOMIZADO

*EFFECT OF ISOFLAVONE ASSOCIATED WITH OR WITHOUT THE USE OF
PROBIOTICS COMPARED TO HORMONAL THERAPY IN UROGENITAL
SYMPTOMS OF MENOPAUSE: RANDOMIZED CONTROLLED CLINICAL TRIAL*

CAMPINAS
2018

ANA ELISA RIBEIRO

EFEITO DA ISOFLAVONA ASSOCIADA OU NÃO AO PROBIÓTICO COMPARADO
A TERAPIA HORMONAL NOS SINTOMAS UROGENITAIS DA MENOPAUSA:
ENSAIO CLÍNICO CONTROLADO RANDOMIZADO

*EFFECT OF ISOFLAVONE ASSOCIATED WITH OR WITHOUT THE USE OF
PROBIOTICS COMPARED TO HORMONAL THERAPY IN UROGENITAL
SYMPTOMS OF MENOPAUSE: RANDOMIZED CONTROLLED CLINICAL TRIAL*

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências da Saúde, na Área de Concentração Fisiopatologia Ginecológica.

Master's Dissertation presented to the Obstetrics and Gynecology Graduate Program of the School of Medical Sciences at the University of Campinas, to obtain the MSc grade in Health Science in Gynecological Fisiopathology concentration area.

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. ADRIANA ORCESI PEDRO CAMPANA

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA ANA ELISA RIBEIRO E ORIENTADA PELA
PROF^a. DR^a. ADRIANA ORCESI PEDRO CAMPANA

CAMPINAS

2018

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

R354e Ribeiro, Ana Elisa, 1984-
Efeito da isoflavona associada ou não ao probiótico comparado a terapia hormonal nos sintomas urogenitais da menopausa : ensaio clínico controlado randomizado / Ana Elisa Ribeiro. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Adriana Orcesi Pedro Campana.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Menopausa. 2. Sistema urogenital. 3. Fitoestrógenos. 4. Equol. 5. Isoflavonas. I. Pedro, Adriana Orcesi, 1966-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Effect of isoflavone associated with ou without the use of probiotic compared to hormone therapy in urogenital symptoms of menopause : randomized controlled clinical trial

Palavras-chave em inglês:

Menopause

Urogenital system

Phytoestrogens

Equol

Isoflavones

Área de concentração: Fisiopatologia Ginecológica

Titulação: Mestra em Ciências da Saúde

Banca examinadora:

Adriana Orcesi Pedro Campana [Orientador]

Cristina Laguna Benetti Pinto

Luciano de Melo Pompei

Data de defesa: 27-08-2018

Programa de Pós-Graduação: Tocoginecologia

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

ANA ELISA RIBEIRO

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. ADRIANA ORCESI PEDRO CAMPANA

MEMBROS:

1. PROF^a. DR^a. ADRIANA ORCESI PEDRO CAMPANA

2. PROF^a. DR^a. CRISTINA LAGUNA BENETTI PINTO

3. PROF. DR. LUCIANO DE MELO POMPEI

Programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

DATA DA DEFESA: 27/08/2018

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Jêsus e Maria que são meu alicerce, me ensinaram os valores éticos e fizeram de tudo para que a faculdade de medicina se tornasse um sonho possível.

Ao meu irmão Jerônimo pelo apoio e incentivo.

Ao meu namorado Flávio, companheiro de todas as horas, sempre me apoiando, incentivando e socorrendo nos momentos de angústia e dificuldade.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me guiar, iluminar e dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as intempéries da vida.

A minha orientadora, Profa. Dra. Adriana Orcesi Pedro Campana, por acreditar na minha capacidade de realizar esse estudo, além de ser um exemplo e inspiração de médica e pesquisadora.

A Profa. Dra. Lucia Helena Costa Paiva pelo apoio e por fazer parte da minha trajetória.

A Profa. Dra. Cristina Laguna Benetti Pinto, por fazer parte da minha história na UNICAMP, pois o meu primeiro contato com o CAISM foi realizado através dela no ambulatório de ginecologia endócrina.

Ao Prof. Dr. Luiz Francisco Cintra Baccaro, por ter realizado com grande dedicação a revisão deste estudo.

Ao Prof. Dr. Luciano de Melo Pompei, por fazer da conclusão desse estudo.

A Naice Eleidiane Santana Monteiro, grande companheira na realização desse estudo, pela ajuda na realização desse trabalho.

As auxiliares de enfermagem do ambulatório de ginecologia, em especial, a Conceição, pela grande ajuda e carinho.

Aos funcionários do serviço de Citopatologia do Caism pela dedicação.

Aos funcionários do serviço de Densitometria Óssea do Hospital de Clínicas da Unicamp pela paciência e ajuda.

Ao estatístico Helymar pela dedicação.

Aos colegas de mestrado que vivenciaram momentos de estudo e tensão no decorrer desta jornada.

Em especial, as mulheres que participaram deste estudo, meu sincero agradecimento e respeito.

RESUMO

Objetivo: Avaliar a resposta terapêutica da isoflavona associada ou não ao probiótico e comparar seu efeito à terapia hormonal nos sintomas da síndrome genitourinária da menopausa e associar a resposta clínica à produção de S-equol. **Métodos:** Ensaio clínico randomizado com 60 mulheres na pós-menopausa com idade entre 40 a 60 anos. As participantes foram randomizadas em três grupos: grupo isoflavona (60 mg de isoflavonas); grupo isoflavona (60 mg de isoflavonas) associado ao probiótico (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*) e grupo terapia hormonal (1mg de estradiol associado ao acetato de noretisterona 0,5mg) durante 16 semanas. A subescala urogenital da *Menopause Rating Scale* e o Questionário Internacional de Incontinência urinária-forma curta (International Consultation on Incontinence Questionnaire – Short Form) foram utilizados para avaliar os sintomas genitourinários no início e após 16 semanas de tratamento. A maturação vaginal, score de saúde vaginal, flora vaginal e pH foram utilizadas para avaliar a atrofia vaginal na primeira consulta e após 16 semanas de tratamento. As concentrações das isoflavonas e seus metabólitos foram analisados na urina através da técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e a espessura endometrial foi avaliada através no ultrassom transvaginal na primeira consulta e após 16 semanas de tratamento. **Resultados:** Após 16 semanas de tratamento, houve melhora dos sintomas genitourinários, maturação vaginal, flora vaginal e pH apenas no grupo que utilizou terapia hormonal. O grupo isoflavona e o grupo que utilizou a terapia hormonal apresentaram melhora no escore de saúde vaginal. No grupo da isoflavona associado ao probiótico foi observado aumento dos metabólitos das isoflavonas, mas não houve melhora nos sintomas genitourinários e na atrofia vaginal. Não houve alteração urinária e da espessura endometrial nos três grupos de tratamento. Os efeitos adversos de mastalgia e sangramento genital foram mais prevalentes no grupo que utilizou terapia hormonal. **Conclusão:** O uso da terapia hormonal foi eficaz para promover melhora dos sintomas urogenitais e da atrofia vaginal em mulheres na pós-menopausa. O uso do probiótico associado à isoflavona foi capaz de aumentar metabolização das isoflavonas, mas sem promover melhora dos sintomas urogenitais e da atrofia vaginal.

Palavras – chave: menopausa, síndrome genitourinária da menopausa, atrofia vaginal, saúde vaginal, fitoestrógeno, soja, equol, terapia hormonal, endométrio.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the clinical effects of isoflavone associated with or without the use of probiotics compared to hormonal therapy in urogenital symptom of genitourinary syndrome of menopause and associate the clinical effects S-equol production.

Methods: A randomized clinical trial with 60 postmenopausal women between 40- 60 years, were recruited and randomly assigned to three groups: Isoflavone (60 mg of isoflavones); isoflavone (60 mg of isoflavones) plus probiotic (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, and *Bifidobacterium lactis*) group and hormone therapy group (1mg estradiol and 0.5mg norethisterone acetate). The participants were followed for 16 weeks. The urogenital subscale of the Menopause Rating Scale and the International Consultation on Incontinence Questionnaire - Short Form were used to assess genitourinary symptoms at baseline and after 16 weeks of treatment. Vaginal maturation, vaginal health score, vaginal flora, vaginal pH were used to assess vaginal atrophy at the first visit and after 16 weeks of treatment. The concentrations of isoflavones and their metabolites was analyzed in the urine by gas chromatography coupled to mass spectrometry and the endometrial thickness was assessed through transvaginal ultrasound at the baseline and after 16 weeks of treatment. **Results:** After 16 weeks of treatment, there was improvement of genitourinary symptoms, vaginal maturation, vaginal flora and pH in the hormone therapy group. The isoflavone and hormone therapy groups showed improvement in vaginal health score. In the isoflavone plus probiotic group an increase in the metabolites of isoflavones was observed, but there was no improvement in genitourinary symptoms and vaginal atrophy. There were no urinary changes and endometrial thickness in the three treatment groups. The adverse effects of mastalgia and vaginal bleeding were more prevalent in the group that used hormonal therapy. **Conclusion:** The use of hormone therapy was effective to promote improvement of urogenital symptoms and vaginal atrophy in postmenopausal women. The use of the isoflavone plus probiotic was able to increase metabolism of isoflavones, but without improving urogenital symptoms and vaginal atrophy.

Keywords: menopause, genitourinary syndrome of menopause, vaginal atrophy, vaginal health, phytoestrogen, soy, equol, hormone therapy, endometrium.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	– Análise de variância
ANVISA	– Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAISM	– Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
CÉLULAS I	– Células intermediárias
CÉLULAS P	– Células parabasais
CÉLULAS S	– Células superficiais
CEP	– Comitê de Ética e Pesquisa
CFU	– Colony forming unit
CONSORT	– Consolidated Standards of reporting Trials
DHEA	– Desidroepiandrosterona
ER	– Estrogen Receptor
ERα	– Estrogen Receptor Alfa
ERβ	– Estrogen Receptor Beta
Et al	– E colaboradores
FSH	– Hormônio Folículo Estimulante
GC-MS	– Espectrometria de Massas
GMS	– Genitourinary Syndrome of Menopause
HT	– Hormone Therapy
IBGE	– Instituto Nacional de geografia e Estatística
ICIQ-SF	– International Consultaion on Incontinence Questionnaire – Short Form
IM	– Índice de Maturação
ITU	– Infecção do Trato Urinário
MRS	– Menopause Rating Scale

NAMS	– <i>North American Menopause Society</i>
O-DMA	– O- Dimetilangolensina
pH	– Potencial Hidrogênio
ReBEC	– Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos
SERMs	– Modulador Seletivo dos Receptores e Estrogênicos
SGM	– Síndrome Genitourinária da Menopausa
SOGESP	– Associação de Obstetrícia e Ginecologia do Estado de São Paulo
SWAN	– The Study of Women's Health Across the Nation
TCLE	– Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TH	– Terapia Hormonal
UFC	– Unidade Formadora de Colônia
UNICAMP	– Universidade Estadual de Campinas
UTI	– Urinary Tract Infection
VHM	– Vaginal Health Score Index
VIVA	– Vaginal Health: Insights, Views & Attitudes
VIVA-LATAM	– Vaginal Health: Insights, Views & Attitudes (VIVA-LATAM): results from a survey in Latin America
VM	– Valor de maturação
WHI	– Women Health Initiative

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	22
2.1. Objetivo geral	22
2.2. Objetivos específicos	22
3. METODOLOGIA	23
3.1. Tipo de estudo	23
3.2. Participantes do estudo.....	23
3.3. Tamanho amostral	24
3.4. Randomização	24
3.5. Intervenção	25
3.6. Procedimentos	26
3.7. Análise estatística	30
3.8. Considerações éticas.....	30
4. RESULTADOS	32
5. DISCUSSÃO GERAL.....	64
6. CONCLUSÃO	69
7. REFERÊNCIAS	70
8. ANEXOS.....	78
Anexo 1 - Randomização Aleatorizada	78
Anexo 2 - Ficha de coleta de dados.....	79
Anexo 3 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	91
Anexo 4 - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp.....	96

1. INTRODUÇÃO

A expectativa de vida está aumentando em todo o mundo. No Brasil, a esperança de vida para a população foi de 69.8 anos no ano de 2000 passando para 75.9 em 2017. Em 2017, a expectativa de vida da população feminina brasileira foi de 73.8 anos em 2017. Em contrapartida, os homens apresentaram 1.4 anos a menos (1). Esse aumento da expectativa de vida e as consequências na qualidade de vida das mulheres climatéricas elevou o interesse no estudo do climatério em relação aos seus efeitos na saúde feminina (2).

Menopausa significa a última menstruação da mulher, podendo ser decorrente de um processo fisiológico, cirúrgico (menopausa cirúrgica) ou devido a algum tratamento médico que leve a perda da função ovariana (3,4). A menopausa fisiológica é consequência da atresia dos folículos primordiais, que já começam a diminuir ao redor dos 37-38 anos de idade, levando a um estado de hipoestrogenismo, ocorrendo usualmente entre 40 a 55 anos de idade, fazendo com que a mulher viva um terço de sua vida em hipoestrogenismo (3,4). O seu diagnóstico é feito pela história clínica caracterizada pela ausência de menstruação por pelo menos um ano, além da presença dos sintomas (vulvovaginais e extragenitais) decorrentes da queda do estrogênio. A confirmação diagnóstica pode ser realizada pela dosagem sérica do hormônio folículo estimulante (FSH), quando este está acima de 40 mUI /mL (5). Por ser um evento fisiológico da mulher, muitas passam sem sintomas e sem necessidade de tratamento farmacológico (6). Em 2005, Nelson e colaboradores publicaram uma metanálise analisando estudos de coorte e corte transversal para avaliar os sintomas climatéricos e sua influência na qualidade de vida da mulher na pós-menopausa. Os pesquisadores encontraram divergências nestes resultados, pois alguns estudos demonstraram redução drástica da qualidade de vida enquanto outros não evidenciaram alteração (7,9).

A queda dos hormônios sexuais leva ao aparecimento de sintomas vasomotores (fogachos e sudorese noturna), sintomas urogenitais, além de efeitos psicoemocionais como insônia, cefaleia, alteração do humor como a irritabilidade, nervosismo, podendo ocorrer até depressão (4). Além disso, pode levar a dificuldade de concentração, perda da memória, alteração do perfil lipídico e da pressão arterial, resultando em um aumento de doenças cardiovasculares, perda da elasticidade e da

espessura da pele, e diminuição da massa óssea, determinando quadro de osteopenia ou osteoporose (4).

Os sintomas vasomotores ocorrem em aproximadamente 70% das mulheres da Europa, América do Norte e Brasil (6, 7). Já nos países asiáticos como a China, Japão e Índia, tais sintomas não são comuns. Esse fato, provavelmente, decorre da dieta rica em fitoestrógeno e da cultura destes povos, onde a menopausa é vista como um evento normal na vida da mulher (6, 7).

Avis e colaboradores, em 2015, realizaram um estudo observacional, multicêntrico e multirracial nos Estados Unidos comparando a duração dos sintomas vasomotores em relação à transição perimenopausa. Esta comparação foi realizada através da análise do estudo *Study of Women's Health Across the Nation (SWAN)* que avaliou as mudanças psicossociais e biológicas que ocorrem durante a transição perimenopausal. Foram realizadas análises de 1449 mulheres que apresentavam sintomas vasomotores frequentes e chegaram à conclusão de que os sintomas ocorrem por cerca de 7.4 anos na pré-menopausa e persistem por até 4.5 anos após a menopausa. No entanto, características individuais estão relacionadas com o tempo de duração dos sintomas (8). Os sintomas vasomotores comumente melhoram com o tempo e pode não haver necessidade de tratamento. Já os sintomas urogenitais são progressivos e é menos provável que haja melhora sem tratamento (9).

O termo atrofia vulvovaginal utilizado até pouco tempo atrás para caracterizar as alterações vulvovaginais decorrentes do hipoestrogenismo nas mulheres na pós-menopausa foi atualizado para síndrome genitourinária da menopausa (SGM) (10).

A síndrome genitourinária da menopausa é definida pela presença de sinais e sintomas associados à diminuição do estrogênio e outros hormônios sexuais, acarretando alterações nos grandes e pequenos lábios, vestíbulo, clítoris, intróito vaginal, vagina, uretra e bexiga. Pode ocorrer sintoma de ressecamento, irritação e queimação na região vaginal, sintomas sexuais como dispareunia, diminuição da lubrificação vaginal e desconforto durante a relação sexual, além de sintomas decorrentes do trato urinário inferior como urgência miccional, disúria e infecção urinária de repetição (10). Além disso, produz grande impacto na vida das mulheres causando redução da qualidade de vida (11,12). É uma doença crônica e progressiva

que afeta aproximadamente 25% a 50% das mulheres na pós-menopausa, e apesar disto, menos de 10% das mulheres recebem algum tipo de tratamento (10,13).

A vagina é composta por epitélio escamoso estratificado, camada muscular e camada fibrosa, e sua fisiologia é regulada pelos receptores de estrogênio. Existem dois subtipos de receptores de estrogênio (ER) na parede vaginal, o receptor alfa (ER α) e o receptor beta (ER β). A presença do estrogênio mantém a vagina vascularizada e com mucosa espessa, rugosa e lubrificada. O ER α está presente no epitélio vaginal em mulheres na pré e pós-menopausa. No entanto, o ER β é afetado pelo estado menopausal, pois sua expressão na pós-menopausa está diminuída ou ausente, podendo diminuir a eficácia da utilização de reposição hormonal à base de estrogênio (14).

Os sintomas da SGM também decorrem da redução do fluxo sanguíneo local e inclui ressecamento, palidez, diminuição da espessura da mucosa vaginal, além de dispareunia, irritação, prurido, podendo ocorrer até sinusorragia. Além disso, há perda do tecido adiposo dos grandes e pequenos lábios, tornando estas estruturas progressivamente indistinguíveis, podendo ocorrer perda da definição entre elas nos casos de atrofia importante. Ocorre também perda da elasticidade, distensibilidade e rugosidade da vagina, além da atrofia do intróito vaginal (7,8).

Existe uma relação estreita entre estrogênio e flora vaginal, pois a microbiota vaginal é importante para prevenir a colonização por bactérias patogênicas. O epitélio vaginal, em resposta ao estrogênio, produz glicogênio que será transformado em ácido láctico pelos *Lactobaccillus doderlein*, mantendo o pH vaginal ácido, ou seja, pH $\leq$ 4,5 (varia entre 3.8 - 4.5). Na menopausa, o hipoestrogenismo provoca uma alcalinização do pH vaginal (pH $>$ 5) devido à queda na produção de ácido láctico decorrente da ausência dos *Lactobaccillus* e proliferação de bactérias patogênicas (5). Brotman e colaboradores realizaram um estudo com 87 mulheres, entre 35 a 60 anos de idade, as quais foram classificadas como pré-menopausa (n=30), perimenopausa (n=29) ou pós-menopausa (n=28) com o objetivo de comparar a microbiota vaginal, estado menopausal e sinais de atrofia vulvovaginal. Concluiu-se que existem diferenças entre comunidades bacterianas na pré-menopausa, perimenopausa e pós-menopausa e que microorganismos anaeróbicos podem desempenhar um papel nos sinais e sintomas da atrofia vulvovaginal (15).

Panda e colaboradores, em 2014, publicaram uma pesquisa sobre o pH vaginal como um marcador da menopausa. Foram incluídas no estudo 173 mulheres, entre 31 a 60 anos de idade, na pós-menopausa e sintomáticas. Foi realizada dosagem do FSH sérico e análise do pH vaginal através da fita de pH. O resultado evidenciou sensibilidade de 84.9% para o pH>4.5 e de 77.4% para o FSH>40 mIU/L. Este estudo concluiu que a verificação do pH vaginal é simples, precisa e pode ser uma alternativa para o diagnóstico da menopausa (5).

Em relação à citologia vaginal, na pré-menopausa ocorre um predomínio das células superficiais e intermediárias, além de poucas células parabasais. Já na pós-menopausa, as células superficiais estão ausentes ou diminuídas, enquanto as células parabasais e, às vezes, as intermediárias estão aumentadas devido à redução dos receptores estrogênicos e ao hipoestrogenismo (9).

Os sintomas urinários também estão relacionados com os níveis de estrogênio endógeno. Isto pode ser observado pela presença de receptores de estrogênio no trígono vesical, porção anterior e posterior da uretra promovendo aumento da maturação celular da uretra, trígono vesical e bexiga, aumentando o fluxo sanguíneo e a pressão de fechamento da uretra (16,17). Os sintomas mais frequentes são incontinência urinária, que ocorre em cerca de 40% das mulheres na pós-menopausa, infecção do trato urinário (ITU), urgência miccional. Pode ocorrer também cistocele, sendo este um fator de risco para a ITU de repetição. No entanto, sabe-se que outros fatores também estão envolvidos nos sintomas urinários como paridade, diabetes, obesidade e uso de medicamentos (16-18). O ganho de peso e o diabetes são os fatores de risco importantes de incontinência urinária nas mulheres na pós-menopausa (19).

A terapia hormonal sistêmica (TH) é o tratamento de primeira escolha para os sintomas do climatério, sendo indicado para mulheres sintomáticas e que não apresentam contraindicações (20,21).

O estudo *Women Health Initiative* (WHI) mostrou, em 2002, os riscos e benefícios da terapia hormonal combinada na pós-menopausa, e evidenciou aumento no risco de doenças cardiovasculares como acidente cerebrovascular, embolia pulmonar, além de aumentar o risco de câncer de mama. Em contrapartida, evidenciou redução no risco de fraturas de quadril e de câncer colorretal (21). A extensa divulgação dos resultados WHI na mídia, em 2002, trouxe grande repercussão entre

médicos e pacientes provocando uma drástica redução da prescrição de terapia hormonal e um aumento da procura e prescrição de tratamentos não hormonais para alívio dos sintomas da climatéricos (22).

Grady e colaboradores realizaram, nos Estados Unidos, um estudo longitudinal sobre a menopausa e encontraram um aumento no uso de terapias não hormonais para alívio dos sintomas climatéricos, passando de 48.5% para 51% em 2002, 52.7% em 2005 e 2007, e 80% em 2008 após a publicação do WHI (23).

No Brasil houve uma diminuição de 49% no uso da TH, tanto por receio dos médicos em prescrever, quanto das pacientes com grande recusa a TH por temerem os riscos. Lazar e colaboradores, em 2005, realizaram uma pesquisa com 6000 médicos ginecologistas, membros da Associação de Obstetrícia e Ginecologia do Estado de São Paulo (Sogesp), para avaliar o impacto na prescrição de TH após três anos da divulgação do WHI. Os médicos tiveram que responder um questionário que continha 19 perguntas, dentre as quais estava à questão sobre o conhecimento do estudo WHI. Este estudo evidenciou que 51.5% dos médicos diminuíram a prescrição da TH e 46.3% começaram a prescrever terapias não hormonais, como os inibidores da receptação de serotonina, bifosfonados, isoflavona e chás devido ao receio dos riscos evidenciados no WHI e também pelo medo das pacientes (24).

Em 2015, a *North American Menopause Society* (NAMS) publicou um estudo a cerca do uso da terapia não hormonal para sintomas vasomotores, após realizar uma pesquisa em cinco bancos de dados. Algumas terapias não hormonais citadas são os exercícios físicos (yoga), hipnose, acupuntura, uso dos inibidores da receptação de serotonina e de noradrenalina, gabapentina e clonidina, além do uso da isoflavona (25). Dentre as terapias não hormonais, houve um aumento no número de estudos avaliando a isoflavona no alívio dos sintomas vasomotores (26). Já em 2018, NAMS juntamente com a *The International Society for the Study of Women's Sexual Health* publicou um consenso sobre o tratamento da SGM em mulheres portadoras ou com alto risco de câncer de mama. Foram descritos como terapia alternativa o uso de hidratantes vaginais, lubrificantes vaginais durante a relação sexual e fisioterapia do assoalho pélvico (27).

Fitoestrógenos

Bennetts e colaboradores, em 1946, foram os primeiros pesquisadores a perceberem que alguns compostos derivados de plantas poderiam ter efeito estrogênico (28). Eles notaram que ovelhas que pastavam em campos que continham trevo vermelho tinham problemas de fertilidade. Já Rossiter and Beck, em 1966, evidenciaram que os trevos destas pastagens continham grandes quantidades de isoflavonas, sendo uns dos primeiros fitoestrógenos descobertos (29).

O nome fitoestrógenos vem do grego phyto = planta e estrogênio, o hormônio que dá fertilidade aos mamíferos femininos. Também chamados de "estrogênios alimentares", eles são um grupo diversificado de compostos polifenólicos encontrados em plantas que, devido à sua similaridade estrutural com o estradiol (17- β -estradiol), têm a capacidade de causar efeitos estrogênicos e / ou antiestrogênicos (29). Em 1999, Moosmann and Bhel mostraram que os efeitos estrogênicos são realizados por uma família de proteínas chamadas receptores de estrogênios, ativadas por sua associação com o estrogênio. Por outro lado, a atividade antioxidante demonstrada pelos fitoestrogênios é independente de suas propriedades estrogênicas (30). Em 2004, Mueller e colaboradores descobriram que os fitoestrógenos podem agir como estrogênio em doses baixas (31).

Existem cinco famílias diferentes de compostos fenólicos que são consideradas fitoestrógenos, sendo classificados em dois grupos. O primeiro grupo são os da família dos flavonóides, que inclui a isoflavona, lignanos e elagitaninos que são metabolizados pela microbiota intestinal. O segundo grupo são da família dos estilbenos e coumestanos que não sofrem metabolização pelas bactérias intestinais (29).

As isoflavonas da soja, também conhecida como *Glycine max* são compostos bioativos de natureza não esteroide e fenólica que estão presentes em leguminosas como soja, trevo vermelho, feijão, broto de feijão, feijão branco, araruta japonesa, mas é encontrado mais abundantemente na soja (32). De particular interesse em relação à saúde humana, esses compostos são conhecidos como os fitoestrógenos devido à sua atividade estrogênica (33).

A soja contém três grupos de isoflavonas em quatro formas químicas: glicosídeos (genistina, daidzina e glicitina), agliconas (genisteína, daidzeína e

gliciteína), acetilglicosídeos (acetilgenistina, acetildaidzina e acetilglicitina) e malonilglicosídeos (malonilgenistina, malonildaizina e malonilglicitina) (32).

As principais isoflavonas da soja são as formas livre e conjugada de genisteína e daidzeína, que perfazem 60% e 30% do total de isoflavonas, respectivamente. O grupo gliciteína é um componente menor (10%) no total das isoflavonas de soja (32).

A farmacocinética das isoflavonas em humanos foi exaustivamente definida (32). Nos alimentos, as isoflavonas são encontradas na forma de glicosídeo, pois estão conjugadas a vários açúcares, sendo esta forma não absorvida pelo organismo. Os glicosídeos (daidzina, genistina e glicitina) sofrem hidrólise pela família de enzimas β glicosidase, produzidas pelas bactérias presentes no trato intestinal principalmente no jejuno, ocorrendo à liberação do glucosídeo da sua forma conjugada, dando origem às agliconas (genisteína, daidzeína e gliciteína). Um terço destas agliconas será absorvido por difusão passiva no intestino delgado, e então, irão se ligar aos receptores de estrôgeno. A genisteína não absorvida continuará sendo metabolizada pela microbiota intestinal dando origem a p-etilfenol, enquanto a daidzeína será metabolizada em S-equol, seu metabólito ativo, e O-dimetilangolensina (O-DMA), seu metabólito inativo. Estes compostos irão ser absorvidos e o equol irá se ligar aos receptores de estrôgeno (34-36). De acordo com a literatura, vários microrganismos estão associados ao metabolismo das isoflavonas agliconas. As bactérias do ácido láctico e *Bifidobacterium* são as cepas que têm forte atividade na enzima β -glicosidase. Espécies como o *Lactobacillus acidophilus*, o *Lactobacillus casei*, o *Lactobacillus fermentum*, o *Lactobacillus rhamnosus*, o *Lactobacillus plantarum*, o *Lactobacillus bulgaricus*, o *Bifidobacterium breve* e o *Bifidobacterium bifidum* provaram ser excelentes cepas para utilização na fermentação da soja porque são capazes de melhorar a biodisponibilidade e taxa de conversão das isoflavonas pela ação da β -glicosidase (37).

Uma metanálise realizada por Chen e colaboradores, publicada em 2015, comparou 15 estudos com o objetivo de avaliar a eficácia do fitoestrógeno comparado ao placebo no alívio dos sintomas climatéricos (fogachos, insônia, alteração do humor, tontura, mialgia, artralgia, cefaleia, palpitação e formigamento), e concluiu-se que o fitoestrógeno produz alívio dos fogachos quando comparado ao placebo, porém não houve melhora dos outros sintomas (38).

Ghazanfarpour e colaboradores, em 2015, realizaram uma revisão sistemática utilizando ensaios clínicos randomizados com o objetivo de evidenciar melhora na atrofia vaginal com o uso da isoflavona da soja. O resultado da revisão está descrito a seguir. Eles utilizaram três estudos envolvendo um total de 162 participantes para investigar o efeito da isoflavona da soja sobre a dispareunia. Hanachi e colaboradores, em 2008, compararam três grupos (leite de soja, exercício e placebo) e encontraram uma redução da dispareunia em 62% e 45% com leite de soja e exercício, respectivamente. O ensaio de Carmignani e colaboradores, em 2010, comparou três grupos (isoflavona, placebo e TH). Os grupos TH e isoflavonas mostraram 25% e 20% de alívio nos sintomas sexuais, respectivamente. Por outro lado, o grupo placebo mostrou um aumento de 15% nos sintomas sexuais. Em contraste com os dois estudos acima, em 2000, Kotsopoulos e colaboradores, mostraram um aumento na gravidade da dispareunia em relação ao grupo placebo. Já em relação ao ressecamento vaginal foram utilizados apenas dois ensaios (Colacurci et al. 2004; Kotsopoulos et al. 2000), pois apenas estes estudos continham informações suficientes. O ressecamento vaginal foi menor em pacientes tratados com soja, em comparação com os grupos de controle. Para avaliar o índice de maturação (IM), foram utilizados três estudos que envolveram um total de 143 participantes e investigaram os efeitos da isoflavona da soja no IM. O estudo de Uesugi e colaboradores, em 2003, mostraram uma queda estatisticamente significativa nas células parabasais e um aumento significativo nas células intermediárias no grupo de soja. As células superficiais apresentaram uma redução não significativa. O grupo placebo também apresentou mudanças, mas sem significância estatística. Já Upmail e colaboradores observaram um aumento de 3% nas células superficiais e um declínio de 3% nas células parabasais no grupo de soja, mas nenhuma mudança nas células intermediárias. Houve também um decréscimo de 4% das células superficiais, 16% as células parabasais e 10% nas células intermediárias no grupo controle. O terceiro ensaio clínico avaliado foi o realizado por Scambia e colaboradores e não mostrou efeito estrogênico estatisticamente significativo nos grupos soja e placebo. Seis semanas após o tratamento, houve um ligeiro aumento nas células parabasais, uma ligeira queda nas células intermediárias e nenhuma alteração nas células superficiais. Esta revisão concluiu que as isoflavonas da soja podem diminuir os sintomas vaginais em mulheres na pós-menopausa, mas

os efeitos benéficos permanecem incertos devido aos possíveis vieses de publicação ou grande heterogeneidade entre os estudos incluídos e que futuros estudos com projetos mais consistentes e com melhor abordagem estatística devem ser realizados para validar ainda mais os resultados desta revisão sistemática (39).

Equol e Microbiota intestinal

Em 1932, Marrian e Haslewood isolaram pela primeira vez a estrutura química do equol na urina da égua grávida e foi atribuída a composição química $C_{15}H_{14}O_3$. Observaram também, que este composto estava presente na urina de éguas não grávidas e garanhões, além de ser isolado em grande quantidade no verão, pequena quantidade no outono e praticamente ausente no inverno. Isso corrobora com o que sabemos hoje, a variação sazonal das isoflavonas da soja (40). A partir dos anos 40, o equol foi encontrado na urina de pessoas que consumiam soja, mas somente em 1984, Stechell e colaboradores, descreveram que o consumo de soja estava relacionado com a capacidade individual de produzir equol (41,42). Decroos e colaboradores, em 2005, descobriram que o equol é absorvido mais eficientemente pela parede do cólon do que a daidzeína (43). Em 2003, Zubik e Medyani, descobriram que o equol aparece no plasma após a ingestão de daidzeína e permanece no mesmo por um período de tempo relativamente mais longo do que a genisteína e daidzeína. Além disso, observaram que a concentração de equol no plasma é desprezível nas primeiras 4 horas, mas atinge uma concentração máxima em 24 h após a ingestão das isoflavonas. Depois disso, a concentração de equol no plasma diminui (44). Os metabólitos da isoflavona, como o equol, são excretados pela urina 24 horas após sua ingestão (35).

O equol é o metabólito mais potente da daidzeína, sendo produzido exclusivamente pela ação das bactérias intestinais, porém apenas um terço da população é capaz de produzi-lo (22,45). Na Ásia, o equol é produzido por cerca de 50% a 55% das pessoas, provavelmente pela dieta rica em fitoestrógenos que é capaz de manter uma microbiota intestinal favorável (34,46). Wiseman e colaboradores realizaram um ensaio clínico randomizado com adultos jovens para avaliar se o consumo contínuo de soja é capaz de influenciar a biodisponibilidade da isoflavona e a atividade da microbiota intestinal produtora da enzima β -glicosidase. Concluiu-se que indivíduos com dieta rica em soja apresentaram uma atividade significativamente

maior da enzima β -glicosidase em relação às pessoas com baixa ingestão de soja (47). Já no ocidente, somente 20% a 35% são capazes de produzir tal substância, porém 80% a 95% são capazes de produzir O-DMA, substância inativa (34,46).

Não há uma boa explicação para o fato de certos indivíduos produzirem S-equol e outros não, e muitos estudos investigaram os possíveis papéis da dieta. No entanto, é mais provável que a falta da produção de equol esteja ligada a ausência de uma microbiota intestinal adequada, ou é possível que haja uma flora intestinal adequada, porém inativa. Sabendo que a produção de S-equol depende da flora microbiota intestinal individual para ser produzido, alguns trabalhos publicados tem evidenciado que o uso do probiótico associado à isoflavona é capaz de modificar e modular a flora intestinal, e deste modo melhorar a ação dos fitoestrógenos (48, 49).

O potencial do S-equol para o tratamento da menopausa foi recentemente revisado pela NAMS. Esse mostra afinidade seletiva para $ER\beta$, e pode ser sintetizado quimicamente ou feito naturalmente pela fermentação do germe de soja com uma bactéria produtora de equol, como o *Lactococcus garvieae* (50). O equol está sendo desenvolvido como fármaco e disponível comercialmente como um suplemento natural de "S-equol" (51).

A estrutura química do S-equol é semelhante ao 17- β -estradiol (52). Ao contrário do estradiol, que se liga com igual afinidade tanto ao $ER\alpha$ quanto ao $ER\beta$, a genisteína e o S-equol apresentam maior afinidade com $ER\beta$ e ligam-se fracamente ao $ER\alpha$ (52). Portanto, nesse aspecto, as isoflavonas e o S-equol se assemelham com os moduladores seletivos dos receptores de estrogênio (SERMs) podendo ter efeitos benéficos (ação agonista) cardiovasculares e na massa óssea, mas sem efeito (ação antagonista) na mama e endométrio (38, 53-56).

Diante de todas as alterações provocadas no organismo da mulher pelo hipoestrogenismo e a redução na qualidade de vida, há também falta de pesquisas avaliando se a administração de fitoestrógeno associado ao probiótico é capaz de produzir melhora nos sinais e sintomas urogenitais, quando comparados com a TH, uma vez que já se sabe que nem todas as mulheres que utilizam a isoflavona isolada se beneficiam de seus efeitos no alívio dos sintomas urogenitais (57-64).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Comparar a resposta terapêutica da isoflavona isolada ou associada ao probiótico à terapia hormonal em pacientes climatéricas com sintomas da síndrome genitourinária da menopausa.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1 Avaliar comparativamente os efeitos dos três tipos de tratamento na melhora dos sinais e sintomas da síndrome genitourinária da menopausa presente na subescala urogenital da Menopause Rating Scale ao longo do tempo e entre os grupos.

2.2.2. Comparar os efeitos dos três tipos de tratamento no alívio dos sintomas urinários.

2.2.3. Comparar os efeitos dos três tipos de tratamento na citologia vaginal ao longo do tempo e comparar os grupos.

2.2.4. Comparar os efeitos dos três tipos de tratamento no pH vaginal ao longo do tempo e comparar os grupos.

2.2.5. Comparar os efeitos dos três tipos de tratamento na flora vaginal ao longo do tempo e comparar os grupos.

2.2.6. Comparar a produção de S-equol e associar a resposta clínica nos três grupos.

3. METODOLOGIA

3.1. Tipo de estudo

Ensaio clínico controlado randomizado

3.2. Participantes do estudo

Foram recrutadas, entrevistadas e atendidas no ambulatório de ginecologia do Departamento de Tocoginecologia da Universidade Estadual de Campinas de Universidade de Campinas (UNICAMP), e incluídas no ensaio clínico randomizado, 60 mulheres na pós-menopausa com sinais e sintomas da síndrome genitourinária da menopausa presente na subescala urogenital Menopause Rating Scale.

Os critérios de inclusão foram idade entre 40 a 60 anos; data da última menstruação espontânea há pelo menos 12 meses; valor de FSH superior a 40 mUI/mL e de estradiol inferior a 30 pg/mL; presença de pelo menos um dos sintomas apresentados na subescala urogenital Menopause Rating Scale (MRS), os quais consistem em problemas sexuais (falta de desejo e satisfação na atividade sexual), problemas de bexiga (dificuldade de urinar, incontinência urinária e desejo excessivo de urinar), ressecamento vaginal (sensação de ressecamento, ardência e problemas durante a relação sexual).

Os critérios de exclusão foram mulheres portadoras de diabetes mellitus; mulheres portadoras ou com antecedentes de doenças cardiovasculares (hipertensão arterial severa, eventos tromboembólicos); mulheres portadoras de doenças gastrointestinais; mulheres em tratamento ou com antecedente de neoplasia hormônio dependente; intolerância ao uso de probiótico; antecedente de cirurgia bariátrica ou histerectomia; uso de contraceptivos hormonais, terapia hormonal, antibióticos ou hipolipemiantes nos últimos seis meses.

O estudo foi realizado no período de setembro de 2016 a agosto de 2017 e foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (CAAE/número do processo 56751216.7.0000.5404) e catalogado no Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (ReBEC; RBR-83wwpx). Todas as participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

3.3. Tamanho amostral

O tamanho amostral foi calculado com base no estudo de Carmignani et al (2015) (26). Foram consideradas 18 mulheres por grupo para detectar com 80% de confiança e nível de significância de α 0.05. O número de participantes por grupo foi acrescido para 20 pacientes por grupo devido a eventuais perdas de seguimento.

Cálculo do tamanho da amostra para comparação da média de variável numérica entre os três grupos de estudo, segundo dados de literatura.

Variável	Grupos			Tamanho Amostral por Grupo (n)*	Tamanho Amostral Total (n)
	TH	Isoflavona	Placebo		
Diferença % de MRS	M=-71,	M=-48,	M=-11,	18	54
Ressecamento vaginal	DP=36	DP=71	DP=40		

* Cálculo do tamanho amostral considerando poder de 80% e nível de significância de 5%. Carmignani et al. Effects of a soy-based dietary supplement compared with low-dose hormone therapy on the urogenital system: a randomized, double-blind, controlled clinical trial. *Menopause* 2015; 22(7):741-9.

3.4. Randomização

Após a seleção inicial 176 participantes, foram randomizadas 60 mulheres. As pacientes foram selecionadas aleatoriamente em três grupos de 20 mulheres, sendo estes grupos classificados em: Grupo A-Isoflavona, Grupo B-Isoflavona associada à probióticos e Grupo C-Terapia hormonal. A randomização foi realizada no programa Microsoft Excel para Windows 2007 e a sua sequência era desconhecida pela investigadora. Cada participante sabia em qual grupo estava alocada, uma vez que o estudo foi um ensaio clínico aberto. Das 116 pacientes excluídas, 33% apresentaram pelo menos um critério de exclusão, 10.3% desistiram de participar e 57% não tinham disponibilidade de agenda para comparecer a todas as consultas do estudo, não

ficaram satisfeitas com o tratamento ao qual foram alocadas ou apresentaram alteração no ultrassom transvaginal (Figura 1).

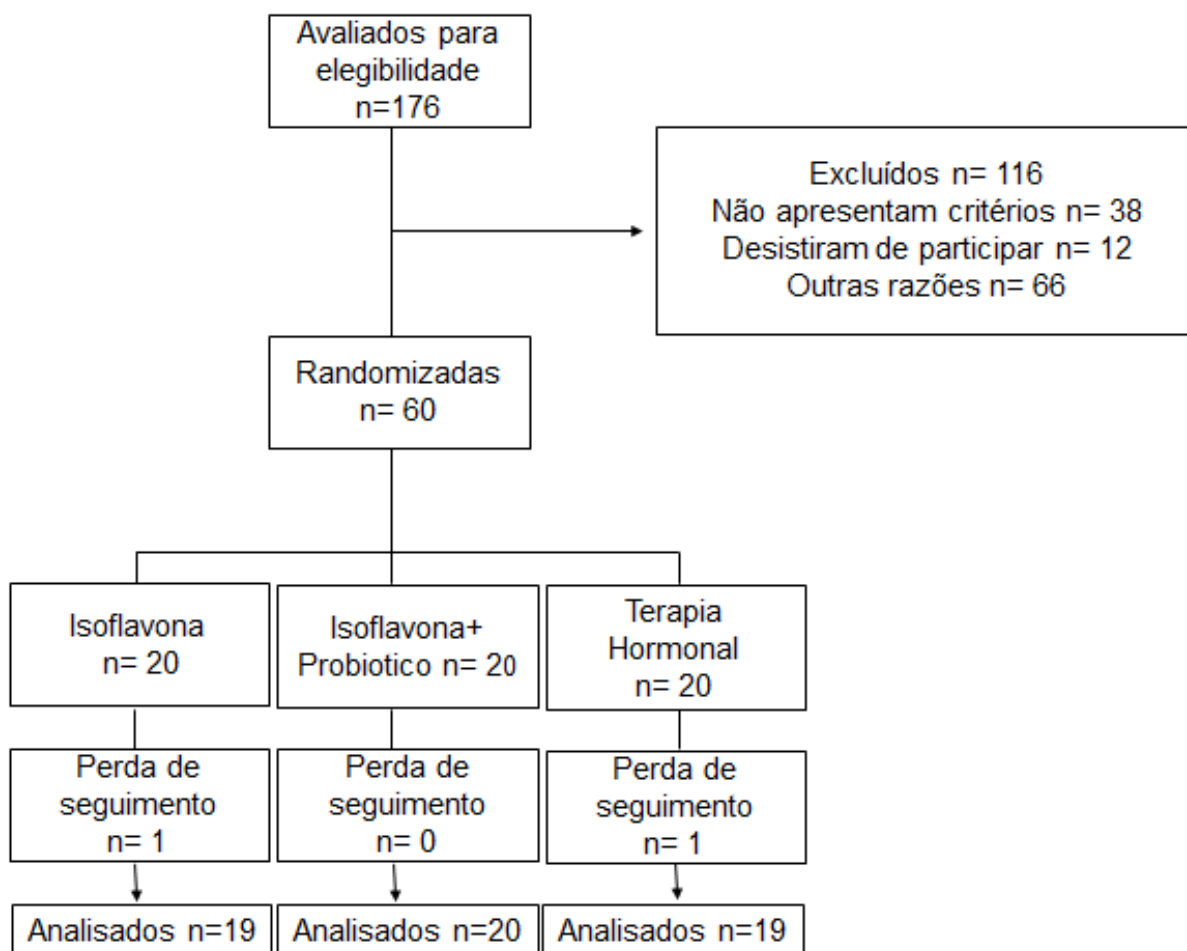


Figura 1: Fluxograma (CONSORT)

3.5. Intervenção

As mulheres receberam o tratamento de acordo com o grupo participante:

- Grupo A - Isoflavona: Ingestão de 60 mg de isoflavonas, ou seja, uma cápsula gelatinosa de SoyFemme® com um copo de água, uma vez ao dia, durante 120 dias. Cada cápsula gelatinosa de SoyFemme® contém 150mg de extrato seco de *Glycine max* 40%, derivado da soja, e é produzido pelo laboratório Aché e liberado pelo Ministério da Saúde com o registro de número 1.0573.0280 na Agência Nacional de Saúde (Anvisa).

- Grupo B - Isoflavonas + Probióticos: Ingestão diária de 60 mg de isoflavonas, ou seja, uma cápsula gelatinosa de SoyFemme® com um copo de água

juntamente com a ingestão um sachê do probiótico Simfort®, que consiste em um pó, o qual deverá ser diluído em 100mL de água na temperatura ambiente, agitado com auxílio de uma colher até a total homogeneização, uma vez ao dia, durante 120 dias. Simfort® é um composto probiótico produzido pelo laboratório Vitafor, que contém 109 UFC das cepas de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, as quais são eficazes na recomposição da flora intestinal. Está liberado pelo Ministério da Saúde com o registro de número 6.5426.0006.001-2 na Anvisa.

- Grupo C - Terapia Hormonal: Ingestão de uma pílula contendo 1 mg de estradiol associado a 0,5 mg de acetato de noretisterona (Suprelle®), uma vez ao dia, durante 120 dias. Suprelle® consiste em uma terapia hormonal oral combinada contínua produzida pelo laboratório Biolab, sendo liberado pelo Ministério da Saúde com o registro de número 1.0974.0176 na Anvisa.

3.6. Procedimentos

Na primeira consulta (T0), as pacientes responderam a um questionário que continha questões sobre características demográficas, idade, estado civil, cor da pele, escolaridade, nível socioeconômico, idade da menopausa, tempo de menopausa, paridade, tabagismo, etilismo, comorbidades, atividade física, uso de medicamentos, história de artrite reumatoide, antecedentes familiares com informações de pais com histórico de fratura de quadril, hábito intestinal, ingestão de água e uso de adoçantes.

As mulheres foram submetidas a exame ginecológico realizado por uma ginecologista para avaliar o trofismo vaginal, coleta de bacterioscopia e citologia vaginal. Este exame foi feito nos três momentos da pesquisa T0 (primeira consulta), T8 (oito semanas após o início do tratamento) e T16 (16 semanas após o início do tratamento). Além disso, as participantes responderam perguntas sobre sintomas da síndrome genitourinária da menopausa através do questionário Menopause Rating Scale (MRS) e International Consultation on Incontinence Questionnaire – Short Form (ICIQ-SF), e questionamentos mensais sobre os efeitos colaterais dos tratamentos.

A paciente foi submetida, na primeira consulta (T0) e última consulta (T16), a coleta de sangue para dosagem do FSH e estradiol (E2).

Para controle endometrial, a paciente realizou ultrassom transvaginal nos momentos T0 e T16 do estudo.

As participantes foram orientadas a entregar amostras de urina nos três momentos da pesquisa para que fossem realizadas as dosagens urinárias das isoflavonas e seus metabólitos.

Além das consultas, houveram duas avaliações que aconteceram através de contato telefônico nos momentos T4 (quatro semanas após o início do tratamento) e T12 (12 semanas após o início do tratamento), a fim de se obter informações sobre a adesão ao tratamento e possíveis efeitos colaterais que tivessem surgido.

As técnicas utilizadas na pesquisa estão descritas a seguir:

- **Sintomas vulvovaginais:** Foram avaliados através dos itens 8, 9 e 10 do questionário Menopause Rating Scale (MRS), validado no Brasil, que correspondem aos problemas sexuais (falta do desejo sexual na atividade e satisfação), problemas da bexiga (dificuldade de urinar, incontinência, desejo excessivo de urinar), ressecamento vaginal (sensação de ressecamento, ardência e problemas durante a relação). Cada item é graduado pelo indivíduo em 0 (ausente), 1 (leve), 2 (moderado), 3 (grave) e 4 (muito grave) (57). A pontuação total é realizada pela soma de cada item, conforme o questionário.

- **Trofismo da mucosa vaginal:** Foi avaliado através do escore de saúde vaginal (*Vaginal Health Score Index*). Este questionário, validado no Brasil, consiste em cinco parâmetros graduados de 1 a 5 para avaliar a elasticidade, o volume do fluido, pH, integridade do epitélio e umidade vagina. Se o escore for menor ou igual a 15, a mucosa vaginal será considerada atrofica. Já se o score for maior que 15, a mucosa vaginal será considerada normotrófica (58). Os critérios citados acima foram avaliados através da inspeção vulvar e exame especular realizados através do exame ginecológico. O questionário foi preenchido pela pesquisadora.

- **Sintomas urinários:** As pacientes foram avaliadas através do questionário International Consultation on Incontinence Questionnaire – Short Form (ICIQ-SF), validado no Brasil, que é composto de quatro questões que avaliam a frequência, a gravidade e o impacto da incontinência urinária. O escore geral é obtido pela soma dos escores das questões 3, 4 e 5. Quanto maior o escore, maior será o impacto sobre a qualidade de vida. O impacto sobre a qualidade de vida é classificado da seguinte forma: nenhum impacto (0 ponto); impacto leve (de 1 a 3 pontos); impacto

moderado (de 4 a 6 pontos); impacto grave (de 7 a 9 pontos); e impacto muito grave (10 ou mais pontos) (59,60);

- **Citologia vaginal:** Foi colhido esfregaço das paredes laterais da vagina por uma médica ginecologista. A lâmina foi fixada com fixador apropriado para citologia e corado pela técnica de Papanicolau e analisada por um citopatologista, do Laboratório de Patologia do Departamento de Anatomia Patológica do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM), através de um microscópio óptico. A maturação do epitélio escamoso estratificado vaginal foi realizada através da relação entre células parabasais(P), intermediárias (I) e células superficiais (S). Esta relação conhecida como Índice de Frost ou índice de maturação celular (IM), ou seja, $IM = P/I/S$ foi dicotomizada em presença de células superficiais e intermediárias e consideradas como nível estrogênico adequado quando o $IM = 00/20/80$, ou seja, 80% de células superficiais, 20% de células intermediárias e ausência de células parabasais. Já a presença de células parabasais e intermediárias ($IM = 80/20/00$), ou seja, 80% de células parabasais, 20% de células intermediárias e ausência de células superficiais foi caracterizado hipoestrogenismo (61);

- **Maturação vaginal:** O valor da maturação celular (VM) foi calculado de acordo com a fórmula: $\{[0x(\%P)] + [0,5x(\%I)] + [1x(\%S)]\}$. A maturação do epitélio vaginal (efeito positivo do tratamento) foi evidenciada por diminuição nas células parabasais e aumento na proporção de células superficiais e está representado por um aumento no valor de maturação (62).

- **pH vaginal:** Foi utilizado para avaliar o grau de acidez ou alcalinidade vaginal. A leitura do pH vaginal foi realizada após o papel indicador de pH (pH 0-14 Merck) ser colocado sobre a superfície do epitélio vaginal durante um minuto. O pH inferior ou igual a 4.5 foi considerado ácido e pH superior a 4.5 foi considerado básico (5).

- **Flora vaginal:** Foi colhido esfregaço das paredes vaginais laterais com a espátula de Ayres por uma médica ginecologista. A lâmina foi fixada em soro fisiológico 0,9%, corada pela técnica de Gram e analisada em um laboratório privado. Foi classificada como flora tipo 1, o predomínio de pelo menos 80% de Lactobacillus, ou seja, nível estrogênico adequado; flora tipo 2, quando houve equilíbrio entre Lactobacillus e flora cocoide que também caracteriza nível adequado de estrogênio

flora tipo 3, a ausência ou redução acentuada (menor 5%) de *Lactobacillus* e presença de flora cocoide (63).

- **Dosagem do S-equol, intermediário do equol, O-DMA agliconas:** A urina colhida foi armazenada sob-refrigeração a -20°C até a análise no Laboratório de Bioprocessos da Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP. A dosagem foi feita através da técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas utilizando aparelho GC-MS instrumento (Modelo GCMS-QP2010S Ultra, Shimadzu Co., Japan), por uma nutricionista. O procedimento foi baseado no método para determinar equol na urina, de acordo com KO et al; 2010 (64). O modo de análise foi feito através do monitoramento de íons selecionados, com moléculas 192 íons (m/z) classificadas como equol; 371 e 386 íons (m/z) como intermediário do equol; 73 íons (m/z) como O-DMA; 398 íons m/z como daidzeína; 471 íons m/z como genisteína e 428 íons m/z como gliciteína. Além disso, foi feita a identificação e quantificação das isoflavonas presentes no SoyFemme® através da técnica citada acima. As dosagens das isoflavonas agliconas e isoflavonas glicosiladas variaram entre 46.10 a 51.40 mg e 8.60-13.90 mg, respectivamente. A daidzeína foi encontrada em maior quantidade e variou entre 24.61 a 31.61 mg, enquanto a genisteína e gliciteína variaram entre 9.60 a 14.38 e 7.10 a 10.19, respectivamente. Chegamos à conclusão que as dosagens das isoflavonas estão de acordo com a descrição do produto.

- **Espessura endometrial:** A medida foi realizada por um médico ultrassonografista. A paciente foi colocada em posição ginecológica e em seguida, foi introduzido um transdutor endovaginal protegido com preservativo. A leitura da espessura endometrial foi feita em escala de cinza e medida em milímetros (mm) pelo aparelho de ultrassom da GE, modelo Voluson 730, com sonda 3D;

- **Dosagem de FSH:** A dosagem sérica foi realizada em um laboratório privado, e quando a dosagem tivesse acima de 40 mIU /mL, a paciente foi considerada na pós- menopausa (15,16). A dosagem foi feita com o Kit Backman Coulter por método de imunoensaio quimioluminescente com partículas paramagnéticas com determinação quantitativa dos níveis plasmáticos de FSH utilizando os Sistemas de Imunoensaio Access.

- **Dosagem de estradiol:** A dosagem sérica foi realizada em um laboratório privado e foi considerado hipoestrogenismo quando o valor estava abaixo de 30. A dosagem do estradiol foi feita com o Kit Backman Coulter, por método de imunoensaio

quimioluminescente com partículas paramagnéticas com determinação quantitativa dos níveis plasmáticos de estradiol utilizando os Sistemas de Imunoensaio Access.

3.7. Análise estatística

Os dados foram analisados de acordo com a intenção de tratar, incluindo todas as participantes de cada grupo. As características clínicas e sociodemográficas foram analisadas utilizando o teste de Kruskal-Wallis, teste exato de Fisher, teste chi-quadrado e análise de variância (ANOVA). A análise intragrupo dos sintomas genitourinários presentes na subescala urogenital MRS foi realizada através das comparações das médias ao longo do tempo, utilizando o teste ANOVA seguido do Mann-Whitney, enquanto que a análise intergrupo foi realizada utilizando o teste ANOVA. As produções de equol, intermediário do equol, O-DMA e agliconas foram analisadas através do teste de Kruskal-Wallis. Para as comparações das médias de cada grupo ao longo do tempo para maturação vaginal, saúde vaginal, pH vaginal, FSH, estradiol utilizou-se o teste ANOVA seguido do Mann-Whitney. A mudança da flora vaginal foi analisada através do teste ANOVA seguido do Mann-Whitney. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para avaliar a espessura endometrial e os sintomas urinários presentes no Questionário Internacional de Incontinência urinária- forma curta. Os efeitos colaterais foram avaliados através do teste exato de Fisher e teste Chi-quadrado.

O p-valor foi considerado significativo se o mesmo fosse menor de 0,05. O programa computacional utilizado foi o SAS System para Windows, version 9.2 (SAS Institute Inc., 2002-2008, Cary, NC, USA).

3.8. Considerações éticas

O projeto atendeu às normas de pesquisa das instituições envolvidas, além de atender aos princípios éticos da DECLARAÇÃO DE HELSINKI, 2000 e a resolução 196-96 do Ministério da Saúde (Brasil, 1996). As participantes do estudo foram convidadas a participar do estudo de livre e espontânea vontade e receberam todas as orientações sobre o conteúdo e a finalidade do mesmo. Foi lido e oferecido para leitura, logo no início da entrevista, o termo de consentimento livre esclarecido. Este termo contém informações a respeito dos riscos, inconvenientes e benefícios do

tratamento e foi redigido de maneira clara e acessível. O termo foi assinado em duas cópias pelas mulheres que aceitaram fazer parte deste estudo, sendo uma cópia para arquivo e outra para a paciente.

As pacientes receberam esclarecimento em relação ao sigilo das informações, sendo garantido o direito a não participação, sem qualquer tipo de prejuízo à sua assistência na instituição.

As mulheres receberam o tratamento de maneira gratuita e auxílio para comparecerem à coleta de dados na forma de vale-transporte e vale-alimentação.

A documentação referente à pesquisa está mantida em sigilo e em local seguro. Uma vez defendida a tese, após cinco anos os instrumentos de coleta de dados utilizados serão destruídos.

O protocolo desse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas–Unicamp (CAAE/process number 56751216.7.0000.5404) e catalogado no Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (ReBEC) identificador RBR-83wwpx.

Todas as participantes assinaram o termo de consentimento livre esclarecido.

4. RESULTADOS

Title: Can the use of probiotics in association with isoflavone improve the symptoms of genitourinary syndrome of menopause?

Authors: Ana Elisa Ribeiro, MD; Naice Eleidiane Santana Monteiro, Msc; Anna Valéria Gueldini de Moraes, MD; Lucia Helena Simões da Costa Paiva, MD, PhD; Adriana Orcesi Pedro, MD, PhD.

Affiliation: Department of Obstetrics and Gynecology – State University of Campinas (UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas) - Campinas – SP - Brazil.

Source of Funding: This research was funded by The São Paulo Foundation for the Support of Research (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP), grant # **2016/08089-9**.

Conflict of interest: None declared.

Corresponding author contact:

Adriana Orcesi Pedro Campana

Rua Alexander Flemming, 101- Cidade Universitária Zeferino Vaz,
Campinas, São Paulo – Brasil - Phone/fax: 55 19 3521- 9306

CEP: 13083-881

E-mail: aopedro@uol.com.br

Localizar na página: Nenhum resultado < > Opções ▾





HOME • LOGOUT • HELP • REGISTER • UPDATE MY INFORMATION • JOURNAL OVERVIEW
 MAIN MENU • CONTACT US • SUBMIT A MANUSCRIPT • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Role: [Author](#) Username: [otavio01](#)

Submissions Being Processed for Author [Adriana Orcesi Pedro, MD, PhD](#)

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
View Submission Author Status Correspondence		Can the use of probiotics in association with isoflavone improve the symptoms of genitourinary syndrome of menopause?	07/18/2018	07/18/2018	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display 10 results per page.

<< [Author Main Menu](#)

ABSTRACT

Objective: To evaluate the effect of isoflavones, either in conjunction with probiotics administration or not, on the symptoms of the genitourinary syndrome of menopause and compare the effects with hormone therapy.

Methods: It was conducted a randomized clinical trial with 60 postmenopausal women aged between 40 and 60 years, randomly assigned to isoflavone (150 mg of dry extract of glycine max), isoflavone plus probiotic (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, and *Bifidobacterium lactis*) or hormone therapy (1 mg of estradiol and 0.5 mg of norethisterone acetate). The urogenital symptoms subscale of Menopause Rating Scale and International Consultation on Incontinence Questionnaire–Short Form were used to assess urogenital symptoms. Vaginal maturation index, pH, vaginal health score, vaginal flora were used to evaluate vaginal atrophy. The equol, equol intermediate, O-dimethylangolensin, and aglycones were measured by gas chromatography coupled to mass spectrometry.

Results: The urogenital symptoms improved significantly only in the hormone therapy group. Sexual problems, urinary symptoms, and vaginal dryness did not change with treatment in the three groups. There were a significant increase in daidzein, glycitein, equol intermediates and O-dimethylangolensin after 16 weeks only in the isoflavone plus probiotic group. The maturation value, vaginal pH and vaginal flora improved in the hormone therapy group. The vaginal health score increased in the isoflavone and hormone therapy groups.

Conclusions: Probiotics improved the metabolism of isoflavone after 16 weeks of treatment. However, the increase of isoflavones and its metabolites failed to produce an estrogenic effect on urogenital tract and to relief the symptoms of genitourinary syndrome.

Keywords: menopause, vaginal atrophy, phytoestrogen, soy, equol, hormone therapy.

INTRODUCTION

The genitourinary syndrome of menopause (GSM) describes the signs and symptoms that occur in the vulva, vagina, and lower urinary tract resulting from hypoestrogenism.¹ The symptoms are vaginal burning, dryness and irritation. The associated sexual symptoms are lack of lubrication, discomfort or pain during sexual intercourse.^{1,2} The most frequent urinary symptoms are urinary urgency and incontinence and recurrent urinary tract infection (UTI).^{3,4} The prevalence of GSM is approximately 25-50% in midlife and older women. Urogenital symptoms are progressive and improvement is less likely without treatment.²

The gold standard treatment for GSM is low-dose vaginal estrogen, since the vaginal epithelium is controlled by estrogen². Among treatment options for genitourinary syndrome are non-hormonal treatments, including phytoestrogens, isolated from plants and nonsteroidal substances with a structure and similar function to 17 β -estradiol.⁵ The most common phytoestrogen is isoflavone, which has affinity for estrogen receptors α and β (ER α and ER β), and shows agonistic and antagonistic activity towards them.^{6,7,8,9} Isoflavones are found in foods, mainly in the daidzin and genistin form, which in the intestinal tract are hydrolyzed by β -glycosidase enzymes giving rise to genistein and daidzein. Genistein is metabolized to p-ethyl-phenol and daidzein is metabolized to S-equol and O-dimethylangolensin (O-DMA) by the intestinal microbiota.^{7,8,9}

S-equol is a biologically active compound, which has a higher affinity for ER β than ER α . The chemical structure is comparable to estradiol and S-equol may act like a selective estrogen receptor modulator (SERM).¹⁰ The production of S-equol depends on appropriate intestinal microbiota and some studies have shown that the

use of probiotics in association with isoflavone is able to modulate intestinal flora, and thus, enhances phytoestrogen therapeutic effects.^{11,12}

It is known that not all women, using isoflavone alone, benefit from its therapeutic effects on climacteric symptoms. Therefore, the purpose of this study was to evaluate the effect of isoflavones, either in conjunction with probiotics administration or not, on the symptoms of the genitourinary syndrome and compare the effects with hormone therapy (HT).

METHODS

Study participant

The study was conducted in the Department of Gynecology of the University of Campinas (Universidade Estadual de Campinas; Campinas, São Paulo, Brazil). These patients were subjected to initial screening to determine the eligibility criteria through a check list. Inclusion criteria included postmenopausal women between 40 and 60 years of age who had had their last menstrual period more than 12 months, had follicle-stimulating hormone (FSH) levels higher than 40mIU/mL and estradiol levels lower than 30 pg/ml, and current presence of symptoms of estrogen deprivation according to the Menopause Ratio Scale (MRS). The exclusion criteria included diabetes mellitus, cardiovascular or gastrointestinal disorder, any contraindication to hormone therapy, chronic disease (two or more disease), and intolerance to soy, vegetarian diet, bariatric surgery, previous hysterectomy, and use of hormonal contraceptives or antibiotics and, lipid-lowering drugs during the previous 6 months.

In total, 300 women responded to local advertisements of the study on social networks, e-mail and phone, of which 176 accepted to participate in a screening visit for eligibility through exclusion and inclusion criteria, received clarification about the study, and provided informed consent (Figure 1). Sixty women were selected

to participate in the study and one-hundred and sixteen were excluded, because they do not fit in the study criteria, decline participation or other reasons.

After initial screening, 60 women were invited to participate in a parallel, open, randomized controlled clinical trial, involving three types of treatment regimens, designed to examine the effects of soy isoflavone plus probiotics on urogenital symptoms compared to isoflavona alone and HT.

The study was conducted between September 2016 and August 2017. It was approved by the Human Research Ethics Committees by the Research Ethics Committee (CEP, acronym in Portuguese) (CAAE/process number 56751216.7.0000.5404) and all the participants signed informed consent forms.

The trial was registered on the Brazilian Clinical Trials Registry (ReBEC; RBR-83wwpx). ReBEC is an open-access virtual platform for registration of ongoing or concluded experimental and nonexperimental studies on humans performed in Brazil and elsewhere. ReBEC is a joint project of the Brazilian Ministry of Health, the Panamerican Health Organization, and the Oswaldo Cruz Foundation. The study dates registered on the ReBEC comply with the dataset requirements of the International Committee of Medical Journal Editors and the World Health Organization.

This clinical trial was performed in accordance with Consolidated Standards of reporting Trials 2010 statement (CONSORT).

Randomization

The randomization was performed by a computerized random-number generator, which allocated the participants to the three different treatments groups. Each woman received a randomized envelope which contained a letter A, B or C, corresponding to Isoflavone, Isoflavone plus probiotic or HT, respectively. Each

participant was informed of the order of treatment as the study was open. The follow-up check-ups were conducted by a gynecologist who knew the screening treatment distribution.

Procedures

The three treatment groups consisted of 20 participants in each group, and followed during 16 weeks. The participants were randomized according to the following therapies: soy isoflavone group (n=20) given one capsule containing 150mg of isoflavone (SoyFemme®, Aché Pharmaceuticals) which consists of gelatinous capsules containing 150mg of dry extract of glycine max 40%, derived from soy, and 60mg of isoflavone; soy isoflavones and probiotics group (n=20) given one capsule containing 150 of isoflavone (SoyFemme®, Aché Pharmaceuticals) plus one pack of probiotic (SimFort® – Vitafor Nutrientes) compound containing 109 CFU of strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, and *Bifidobacterium lactis*, which are effective in the restoration of intestinal and it is a powder which should be diluted by shaking in 100 ml of water at room temperature; and hormone therapy (n=20) given one tablet containing 1 mg of estradiol and 0.5 mg of norethisterone acetate (Suprelle®, Biolab Sanus Pharmaceuticals).

Measurements

At the screening visit, the participant answered a standardized questionnaire on demographic characteristics, including age, marital status, ethnicity, educational level, and socioeconomic status. Women were also questioned about their age at menopause, time since menopause, and reproductive history. Besides that, the participants answered questions about comorbidities, such as history of cigarette

smoking; frequency of alcohol use, frequency of regular physical activity, use of medication, history of rheumatoid arthritis and previous fracture, history of hip fracture in parents, daily water ingestion, intestinal habits, and use of sweetener. Body fat percentage, measured with dual-energy X-ray absorptiometer (DEXA) and body mass index (BMI) (kg/m^2), calculated as body weight divided by the square of height, were measured at the baseline.

To examine the effects of the endogenous hormone levels, FSH and 17β -estradiol were measured at baseline and at 16 weeks.

The genitourinary symptoms were evaluated using the urogenital subscale Menopause Rating Scale (MRS) and International Consultation on Incontinence Questionnaire–Short Form (ICIQ-SF). The MRS consists of 11 items assessing menopausal symptoms and is divided into three subscales: somatic symptoms, psychological symptoms, and urogenital symptoms. Each item is graded by the participant, with scores ranging from 0 (absent) to 4 (1, mild; 2, moderate; 3, severe; and 4, very severe).¹³ The urogenital subscale includes three complaints: sexual and urinary complaints and vaginal dryness. The ICIQ-SF consists of four questions on the following: urinary frequency, volume of urine lost, interference with quality of life, and situations when there is urinary loss. Each item was graded by the participant with scores ranging from 0 (no impact), 1-3 (light impact), 4-6 (moderate impact), 7-9 (serious impact) and 10 or more (very serious impact).¹⁴ Both questionnaires were answered at baseline, eight weeks, and at 16 weeks.

The vaginal trophism was evaluated by the Vaginal Health Score Index (VHI), vaginal cytology, vaginal pH and vaginal flora. The VHI is composed of five items (elasticity, fluid volume, pH, epithelial integrity, and moisture) graded from 1 to 5 evaluated during a gynecology examination.¹⁵ A score lower than 15 indicates vaginal

atrophy. The vaginal cytology was obtained from the lateral wall with an Ayres spatula. Stainin was performed according to the Papanicolau technique. A cytopathologist blinded to study group, analyzed the maturation index, the ratio between the parabasal cells (P), intermediate cells (I), and superficial cells (S) under a light microscope. The maturation value (MV) was calculated as follows: superficial cells were assigned a point value of 1.0, intermediate cells were assigned a point value of 5.0, and parabasal cells were assigned 0. The number of cells in each category was multiplied by the point value, and the results were added to calculate the MV. The vaginal pH was measured using pH paper (pH 0-14; Merck, Darmstadt, Germany) kept in contact for one minute with one-third of the external left vaginal wall. The vaginal flora was obtained through a swab from the vaginal wall and evaluated by gram-stained technique and classified into: Type 1 (85% or more of lactobacillis), type 2 (the same proportion between lactobacillis and coccoid) and type 3 (only coccoid or < 5% of lactobacillis). The assessments of vaginal trophism were performed at baseline, eight weeks, and at 16 weeks. The adverse effects were evaluated at baseline to know if were already present previously, at eight weeks and 16 weeks to know if the symptoms occurred after the treatment initiation or if there was aggravation during the study period. Beyond this, the participants received phone calls at four weeks and twelve weeks, which were attempted to question about the adverse effects .

A nutritionist measured the commercial phytoestrogen by gas chromatography coupled to mass spectrometry using the GC-MS instrument (Model GCMS-QP2010S Ultra, Shimadzu Co., Japan) to identify and quantify the isoflavones offered to patients. The aglycone isoflavones were in a range of 46.10–51.40 mg, with glycosylated isoflavones in a range of 8.6–13.90 mg. The isoflavone daidzein quantify was found to be high, ranging from 24.61 to 31.61 mg, whereas the other aglycones, genistein, and

glycitein, were found in smaller amounts, ranging from 9.60 to 14.38 mg and 7.10 to 10.19, respectively. The quantification agreed with the manufacturer's requirements, stating 60 mg of total isoflavones in the product label. Figure 2 shows the chromatographic analysis of phytoestrogen, which identified and quantified the aglycones as daidzein, genistein, and glycitein, which are known to modulate hypoestrogenic symptoms.

The equol, equol intermediate, O-DMA, and aglycones were measured by gas chromatography coupled to mass spectrometry using GC-MS instrument (Model GCMS-QP2010S Ultra, Shimadzu Co., Japan) by a nutritionist. To determine the levels of these compounds in urine, the levels of selected ions were monitored with 192 ions (m/z) classified as equol; 371 and 386 ions (m/z) were classified as equol intermediate; 73 ions (m/z) as O-DMA, 398 ions m/z as daidzein; 471 m/z ions as genistein; and 428 m/z ions as glycitein.

Sample size

The sample size was calculated considering a power of 80% with a significance level of $\alpha=0.05$ and was based on the study by Carmignani et al. (2015).⁵ Using the MRS vaginal dryness symptoms difference obtained from Carmignani et al (2015), i.e., mean of -71% and standard deviation of 36% in the HT group, -48% (71%) in the isoflavone group and -11% (40%) in the placebo group, the sample size was estimated in 18 women per group. The number of participants per group was increased to 20 to compensate for any possible loss of follow-up.

Statistical analysis

Data were analyzed on an intention-to-treat basis, including all participants enrolled in each group. The clinical and sociodemographic characteristic were

evaluated using the Kruskal-Wallis nonparametric test, the Fisher's exact test, Chi-square test and analysis of variance (ANOVA). The intragroup analysis of urogenital symptoms in the MRS subscale was performed by comparing the means over time using ANOVA followed by the Mann-WhitneyU test, while the intergroup analysis was performed using ANOVA. The analyses of the means of each group over time for vaginal maturation, vaginal health, pH vaginal, FSH and estradiol were analyzed by ANOVA followed by the Mann-WhitneyU test. The medians of equol, equol intermediary, O-DMA, and aglycones were assessed using the Kruskal-Wallis followed by the Mann-Whitney U test. The Mann-Whitney U test was used to evaluate the endometrial thickness and the urinary symptoms present in the International Consultation on Incontinence Questionnaire – Short Form (ICIQ-SF). The side effects were assessed using the Fisher and the Chi-square tests. $P < 0.05$ was considered statistically significant. The software used was SAS System for Windows, version 9.2 (SAS Institute Inc, 2002-2008, Cary, NC, USA).

RESULTS

The sociodemographic characteristics of the participants are described in Table 1. The treatment groups were homogeneous, except the HT group participants who had a higher social class ($p = 0.03$). The mean age of the patients was 52.4 years and mean age at menopause was 48.6 years, and the mean time since menopause was 46.5 months.

There was a significant improvement of urogenital symptoms only in the HT group after 16 weeks of treatment contrast to the baseline score ($p=0.002$) (Table 2).

The comparison between the studied groups did not show any significant differences in the total MRS urogenital subscale and in specific symptoms, like bladder and sexual problems and vaginal dryness (Figure 3).

The urinary evaluation of the aglycones showed a significant increase in daidzein ($p < 0.001$), glycitein ($p = 0.009$), equol intermediates ($p < 0.001$) and O-DMA ($p = 0.021$) after 16 weeks of treatment in contrast to the baseline only in the isoflavones plus probiotic group. In the HT group, there was a significant increase only in the daidzein content, but in a lower magnitude (Table 3).

Vaginal cytology showed that maturation values of the HT group had a significant increase, probably caused by a significant decrease of parabasal cells and an increase of superficial cells. The isoflavone plus probiotic group showed an inverse result contrast to that of the HT group (Table 4).

The mean VHI showed an improvement in HT and isoflavone groups ($p = 0.0002$ and $0 = 0.03$ respectively) (Table 5).

The intragroup comparison among the studied groups also showed that the treatment with HT increased the number of lactobacilli in the vagina, flora type 1 ($p < 0.0001$) (Table 5).

With respect to pH values, there was no change from the baseline in the isoflavone group and the isoflavone plus probiotic groups. However, there was a decrease in the HT group ($p = 0.0007$) (Table 5).

The urinary symptoms evaluated by ICIQ-SF did not present significant differences in the studied groups (data not showed in tables).

There was a significant decrease of FSH ($p < 0.001$) and an increase of estradiol ($p < 0.02$) only in the HT group, but these remained unchanged in the isoflavone ($p = 0.66$; $p = 0.78$, respectively) and in the isoflavone plus probiotic groups ($p = 0.49$; $p = 0.06$

respectively) (data not showed in tables). There were no statistically significant differences in endometrial thickness among the three groups at the baseline and after 16 weeks of treatment (data not showed in tables).

Statistically significant differences in the evaluated adverse effects were observed for mastalgia and bleeding only in the HT group (Table 6).

DISCUSSION

The results of this controlled clinical trial showed that HT was the only effective treatment for urogenital symptoms, in contrast to isoflavones and isoflavones plus probiotic. An improvement of the urogenital symptoms in women who used isoflavone plus probiotic was expected, because there was an increase in the aglycone content and the metabolite of isoflavones in this group. The production of equol is considered the main biologically active isoflavone. However, we did not observe any clinical or laboratory-based improvement in this group. There was also a significant presence of daidzein in the HT group probably because there are several cereals, vegetables, and fruits that are rich in phenolic and polyphenolic substances.¹⁶

The vaginal flora and vaginal pH are interconnected because type 1 vaginal flora produces lactic acid and maintains an acidic pH.¹⁷ There was no improvement in the pH in the isoflavone and isoflavone plus probiotic groups due to no improvement in the vaginal flora in these groups. In contrast, in the HT group, these differences were statistically significant, showing an estrogenic effect on the vaginal mucosa proliferation and acidification. Petricevic et al. showed evidence to prove that oral administration of probiotic strains of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14, increased the lactobacilli content in vaginal flora, but were not able to improve vaginal atrophy.¹⁸

There was an increase of MVs in the HT group after 16 weeks of treatment. In the isoflavone and the isoflavone plus probiotic groups, there were no improvements in vaginal cytology, showing an absence of estrogenic effects of these treatments, despite the increase in the intermediate production of equol during treatment in the isoflavone plus probiotic group.

The VHI did not show any change in the isoflavone and the isoflavone plus probiotic groups because there was no improvement in the MVs and pH, which was different from the HT group. Several factors contribute to the action of isoflavone on the vaginal mucosa, among them is the production of equol. The vaginal mucosa has two types of estrogen receptors, ER α and ER β . ER α is present in the vaginal epithelium in premenopausal and postmenopausal women, but ER β , which equol has affinity for equol and isoflavones, is either decreased or absent during menopause.^{2,9,19} The genistein and S-equol have preferential affinity for ER β and bind poorly to ER α .¹⁰ The isoflavone and S-equol resemble estrogen receptor selective modulators (SERMs), such as tamoxifen and raloxifene²⁰. This may be related to the cause of the absence of clinical improvement in the GSM in the isoflavone plus probiotic group.

After 16 weeks, we observed increase in daidzein, glycitein, equol intermediary, and O-DMA in the isoflavone plus probiotics group showing an intense metabolism, but this did not result in any clinically significant effects. The major soy isoflavones are free and conjugated forms of genistein and daidzein, which make up 60% and 30% of total isoflavones, respectively. The glycitein group is a minor component (10%) of total soy isoflavones.²¹ Equol is a specific metabolite from daidzein, but about one-third of people are able to metabolize it.²² Also, the individual intestinal microbiota is able to define the metabolite to be formed.²³ We thought that the lack of clinical improvement and objective parameters (pH, vaginal flora and vaginal cytology) could be explained

by the fact that the treatment time was insufficient to produce effective serum levels of equol from the metabolism of daidzein. This result could benefit a future study conducted to correlate the effective change of the intestinal flora with the production of equol, and investigating the effective serum levels of equol.

The probiotics can change the intestinal microbiota and select cepa that show a high activity of the β - glucosidase enzymes.²⁴ It has been shown that the ingestion of isoflavone with probiotics increases the bioavailability of isoflavone.²⁵ Cohen et al. demonstrated that soy isoflavone plus probiotic decreases isoflavone excretion by around 40%. This maybe because probiotics prevent their degradation and deconjugation.²⁶ Bonorden et al. evaluated the intake of soy protein isolate in association with probiotic strains, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium longum*, for two months and they did not observe a significant increase in the production of equol.²⁷

No change in urinary symptoms was reported by the ICIQ-SF score. Some studies show worsening of urinary incontinence with the use of systemic HT.^{28,29,30}

After the publication of the WHI, there was a drastic reduction in the prescription of HT and there was an increase in demand and in prescription of non-hormonal treatments for the relief of climacteric symptoms.³¹ In Brazil, there was a 49% decrease in HT use, due to the doctors' fear of prescribing and the patients' refusal of HT because of the associated risks.³²

Phytoestrogen is widely used to treat menopausal symptoms like vasomotor symptoms.³³ The literature is controversial on the improvement of genitourinary symptoms with the use of isoflavone. The North American Menopause Society found only two studies that evaluated the use of isoflavone to treat vaginal dryness and found no benefits.⁶ Nikander et al. conducted a 3-month randomized controlled trial

investigating 62 women, and showed that isoflavone did not improve the vaginal dryness and did not change MVs in postmenopausal women.³⁴ Ghazanfarpour et al. conducted a systematic review of randomized clinical trials to find evidence of improvement of vaginal atrophy caused by the use of soy isoflavone and found divergent results.³⁵ Carmiganini et al. conducted a clinical trial and found that isoflavone does not improve vaginal trophism, but it promotes the improvement of vaginal dryness symptoms.⁵

Some studies have already used oral equol to observe its effect on menopausal symptoms. An American study compared the efficacy of a nutraceutical containing 50mg of isoflavone with S-equol at doses of 10 mg, 20 mg and 40 mg for menopausal symptoms. The group that used S-equol 10mg per day showed similar improvement to the group that used isoflavone 50 mg per day. It was observed that those who used S-equol at 20 and 40 mg per day showed a greater reduction of symptoms when compared to the isoflavone group.²⁷ Three Japanese clinical trials have shown improvement in symptoms with the ingestion of 10 mg equol three times a day.^{36,3}

After 16 weeks of treatment, there was no significant variation in the plasma FSH and estradiol in the isoflavone and the isoflavone plus probiotic groups. Despite the known bioactive compound of non-steroidal and phenolic nature of isoflavones, it is known for its estrogenic activity.¹⁰ The study conducted by Cassidy et al. showed an increase in estradiol in perimenopausal women who used 45 mg of isoflavone.³⁸ Duncan et al. demonstrated a reduction in the estrone and estradiol values, but did not show alteration of the FSH value with the use of isoflavone.³⁹ In the study by Camignani et al., no variation was observed in the plasma estradiol and FSH levels in women who used isoflavone.⁵

Endometrial proliferation was not observed in this clinical trial. Quaas et al conducted a clinical trial and found no endometrial hyperplasia in women who used 145mg of isoflavone per day.⁴⁰ Other studies also did not find endometrial hyperplasia in women who used isoflavone.^{5,41} This reinforces the lack of important estrogenic effect of isoflavone and evidence on endometrial safety.

A possible limitation to this study was the impossibility of evaluating the presence of ER β in the vaginal mucosa of the patients because this receptor is decreased or absent in menopausal women and may affect the response to treatment. The MRS is a subjective method to evaluate climacteric symptoms. However, during the patient interviews, it was observed that many had difficulties in evaluating the severity of the symptoms, often in contradictory results. Among others difficulties faced in this study were: some patients did not attend the scheduled appointments, and failed to collect urine 24 hours after ingestion of isoflavone. The equol plasma concentration is negligible in the first 4 hours, but reaches a peak 24 hours after ingestion of the isoflavones.⁴² The isoflavone metabolites, such as equol, are excreted through urine 24 hours after ingestion.⁷

The importance of this randomized controlled clinical trial, with the methodology to evaluate the presence of isoflavones associated or not to probiotics and their metabolites was to demonstrate the lack of therapeutic effect of isoflavone and its metabolites in improving the symptoms and the objective parameters of vaginal atrophy associated with climacteric hypoestrogenism.

Future perspectives demonstrating the duration of treatment necessary to bring an observable change in intestinal flora, with a longer observation time, should be conducted to explain the controversies of this treatment and to recommend specific probiotics to potentiate equol production.

CONCLUSION

This study showed that probiotics associated to isoflavone was able to increase equol production over time, but these effects did not show any beneficial clinical improvement on genitourinary symptoms of menopause and vaginal atrophy.

REFERENCES

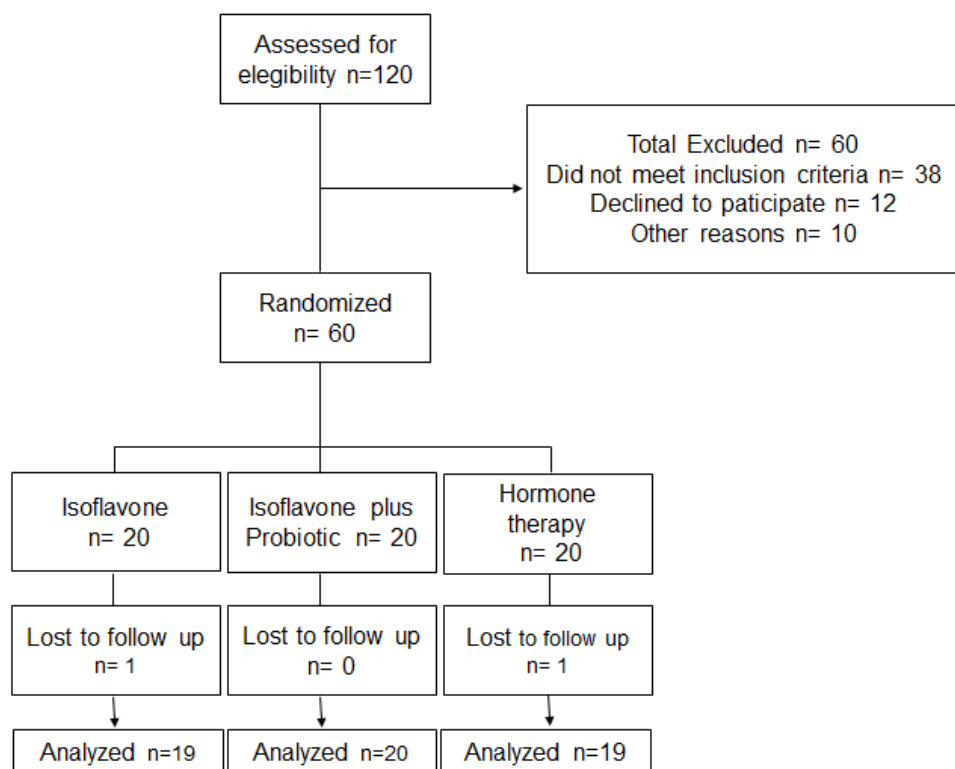
1. Portman DJ, Gass MLS. Genitourinary syndrome of menopause: New terminology for vulvovaginal atrophy from the International Society for the Study of Women's Sexual Health and The North American Menopause Society. *Maturitas*. 2014;79(3):349–54.
2. The North American Menopause Society. Management of symptomatic vulvovaginal atrophy: 2013 position statement of the North American Menopause Society. *Menopause*. 2013;20(9):888–902.
3. Steinauer JE, Waetjen LE, Vittinghoff E, Subak LL, Hulley SB, Grady D, et al. Postmenopausal hormone therapy: does it cause incontinence? *Obstet Gynecol*. 2005;106(5):940-5.
4. Jones HJ, Huang AJ, Subak LL, Brown JS, Lee KA. Bladder Symptoms in the Early Menopausal Transition. *J Womens Health*. 2016;25(5):457–63.
5. Carmignani LO, Pedro AO, Montemor EB, Arias VA, Costa-Paiva LH, Pinto-Neto AM. Effects of a soy-based dietary supplement compared with low-dose hormone therapy on the urogenital system: A randomized, double-blind, controlled clinical trial. *Menopause*. 2015;22(7):741–9.
6. Clarkson TB, Utian WH, Barnes S, Gold EB, Basaria SS, Aso T, et al. The role of soy isoflavones in menopausal health: Report of the North American Menopause Society/Wulf H. Utian Translational Science Symposium . *Menopause*. 2011;18(7):732–53.
7. Setchell KDR, Brown NM, Lydeking-Olsen E. The clinical importance of the metabolite equol-a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *J Nutr*. 2002;132(12):3577–84.
8. Guadamuro L, Delgado S, Redruello B, Flórez AB, Suárez A, Martínez-Cambor P, et al. Equol status and changes in fecal microbiota in menopausal women receiving long-term treatment for menopause symptoms with a soy-isoflavone concentrate. *Front Microbiol*. 2015;6:1–10.

9. Poluzzi E, Piccinni C, Raschi E, Rampa A, Recanatini M, De Ponti F. Phytoestrogens in postmenopause: the state of the art from a chemical, pharmacological and regulatory perspective. *Curr Med Chem*. 2014;21(4):417–36.
10. Setchell KDR. The history and basic science development of soy isoflavones. *Menopause*. 2017;24(12):1338–50.
11. McCabe L, Britton RA, Parameswaran N. Prebiotic and Probiotic Regulation of Bone Health: Role of the Intestine and its Microbiome. *Curr Osteoporos Rep*. 2015;13(6):363–71.
12. Palacios S, Rojo IÁ, Cancelo MJ, Neyro JL, Castelo-Branco C. Women's perception of the efficacy of a soy extract with probiotic: The M3 study. *Gynecol Endocrinol*. 2008;24(4):178–83.
13. Heinemann K, Ruebig A, Potthoff P, Schneider HPG, Strelow F, Heinemann LAJ, et al. The Menopause Rating Scale (MRS) scale: A methodological review. *Health Qual Life Outcomes*. 2004;2:1–8.
14. Tamanini JT, Dambros M, D'Ancona CA, Palma PC, Rodrigues Netto N. Validation of the "International Consultation on Incontinence Questionnaire -- Short Form" (ICIQ-SF) for Portuguese. *Rev Saude Publica*. 2004;38(3):438-44.
15. Bachmann G, Nevadunsky N. Diagnosis and treatment of atrophic vaginitis. *Am Fam Physician*. 2000;61(10):3090–6.
16. Shahidi F, Ambigaipalan P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. *J Funct Foods*. 2015;18:820–97.
17. Panda S, Das A, Singh AS, Pala S. Vaginal pH: A marker for menopause. *J Midlife Health*. 2014;5(1):34-7.
18. Petricevic L, Unger FM, Viernstein H, Kiss H. Randomized, double-blind, placebo-controlled study of oral lactobacilli to improve the vaginal flora of postmenopausal women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2008;141(1):54–7.

19. Oliver RH, Leung BS, Lin LY, Yeh J. Estrogen receptor α and β expression in the vaginal walls and uterosacral ligaments of premenopausal and postmenopausal women. *Fertil Steril*. 1999;71(6):1099–102.
20. Jordan VC, Morrow M. Tamoxifen, raloxifene, and the prevention of breast cancer. *Endocr Rev*. 1999;20(3):253–78.
21. Zaheer K, Humayoun Akhtar M. An updated review of dietary isoflavones: Nutrition, processing, bioavailability and impacts on human health. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2017;57(6):1280–93.
22. Atkinson C, Frankenfeld C, Lampe J. Gut bacterial metabolism of the soy isoflavone daidzein: exploring the relevance to human health. *Exp Biol Med*. 2005;230:155–70.
23. Pawlowski JW, Martin BR, McCabe GP, McCabe L, Jackson GS, Peacock M, et al. Impact of equol-producing capacity and soy-isoflavone profiles of supplements on bone calcium retention in postmenopausal women: A randomized crossover trial. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2015;102(3):695–703.
24. Selma M V., Espín JC, Tomás-Barberán FA. Interaction between phenolics and gut microbiota: Role in human health. *J Agric Food Chem*. 2009;57(15):6485–501.
25. Benvenuti C, Setnikar I. Effect of *Lactobacillus sporogenes* on oral isoflavones bioavailability: single dose pharmacokinetic study in menopausal women. *Arzneimittelforschung*. 2011;61(11):605–9.
26. Cohen L, Crespín J, Wolper C, Zang EA, Pittman B, Zhao Z, et al. Soy isoflavone intake and estrogen excretion patterns in young women: effect of probiotic administration. *In Vivo*. 2011;61.
27. Bonorden MJL, Greany KA, Wangen KE, Phipps WR, Feirtag J, Adlercreutz H, et al. Consumption of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium longum* do not alter urinary equol excretion and plasma reproductive hormones in premenopausal women. *Eur J Clin Nutr*. 2004;58(12):1635–42.
20. Hendrix SL. Effects of Estrogen With and Without Progestin on Urinary Incontinence. *Jama*. 2005;293(8):935.

39. Grady D, Brown JS, Vittinghoff E, Applegate W, Varner E, Snyder T. Postmenopausal hormones and incontinence: The Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study. *Obstet Gynecol.* 2001;97(1):116–20.
30. Grodstein F, Lifford K, Resnick NM, Curhan GC. Postmenopausal hormone therapy and risk of developing urinary incontinence. *Obstet Gynecol.* 2004;103(2):254–60.
31. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix A, Kooperberg C, Stefanick M, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA.* 2002;288:321–33.
32. Lazar F, Costa-Paiva L, Morais SS, Pedro AO, Pinto-Neto AM. The attitude of gynecologists in São Paulo, Brazil 3 years after the Women's Health Initiative study. *Maturitas.* 2007;56(2):129–41.
33. Hardy G. Nutraceuticals and Functional Foods : Introduction and Meaning A European Consensus of Scientific Concepts of Functional Foods. *Nutrition.* 2000;16:688–97.
34. Nikander E, Rutanen EM, Nieminen P, Wahlström T, Ylikorkala O, Tiitinen A. Lack of effect of isoflavonoids on the vagina and endometrium in postmenopausal women. *Fertil Steril.* 2005;83(1):137–42.
35. Ghazanfarpour M, Latifnejad Roudsari R, Treglia G, Sadeghi R. Topical administration of isoflavones for treatment of vaginal symptoms in postmenopausal women: A systematic review of randomised controlled trials. *BJOG.* 2015;35(8):783–7.
36. Utian WH, Jones M, Setchell KDR. S-equol: A Potential Nonhormonal Agent for Menopause-Related Symptom Relief. *J Womens Health.* 2015;24(3):200–8.
37. Aso T, Uchiyama S, Matsumura Y, Taguchi M, Nozaki M, Takamatsu K, et al. A Natural S -Equol Supplement Alleviates Hot Flushes and Other Menopausal Symptoms in Equol Nonproducing Postmenopausal Japanese Women. *J Womens Health.* 2012;21(1):92–100.

38. Cassidy A, Bingham S, Setchell KDE. Biological effects of a diet of soy protein rich in isoflavones on the menstrual cycle of premenopausal women. *Am J Clin Nutr.* 1994;60:333–40.
39. Duncan AM, Underhill KEW, Xu X, LaValleur J, Phipps WR, Kurzer MS. Modest Hormonal Effects of Soy Isoflavones in Postmenopausal Women . *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(10):3479–84.
40. Quaas AM, Kono N, Mack WJ, Hodis HN, Felix JC, Paulson RJ, et al. Effect of isoflavone soy protein supplementation on endometrial thickness, hyperplasia, and endometrial cancer risk in postmenopausal women: A randomized controlled trial. *Menopause.* 2013;20(8):840–4.
41. Liu J, Yuan F, Gao J, Shan B, Ren Y, Wang H, et al. Oral isoflavone supplementation on endometrial thickness: a meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. *Oncotarget.* 2016;7(14):17369–79.
42. Zubik L, Meydani M. Bioavailability of soybean isoflavones from aglycone and glucoside forms in American women. *Am J Clin Nutr.* 2003;77(6):1459–65.

Figures and Tables**Figure1.** Flow chart of study participants.

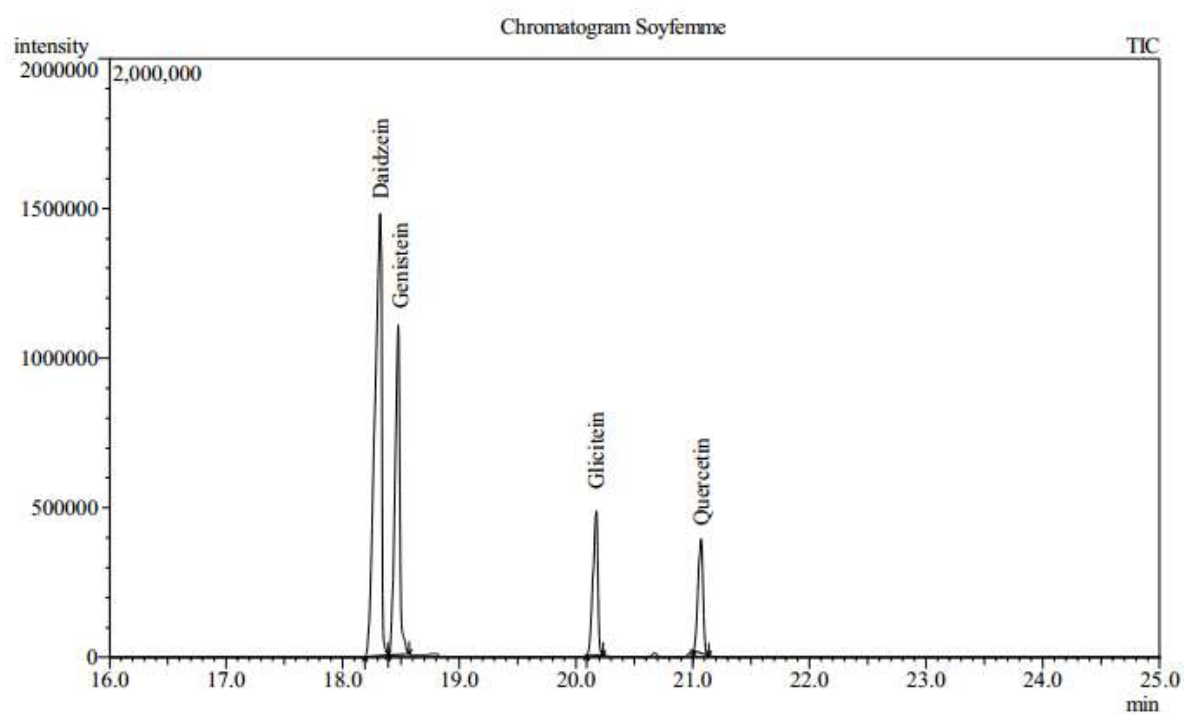


Figure 2. Chromatogram (GC/MS) of phytoestrogen (SoyFemme - Ache®) offered to women (Peaks: 1- Daidzein; 2- Genistein; 3- Glycitein; 4- Quercetin (added as internal standard at concentration of 0,1 mg/ml).

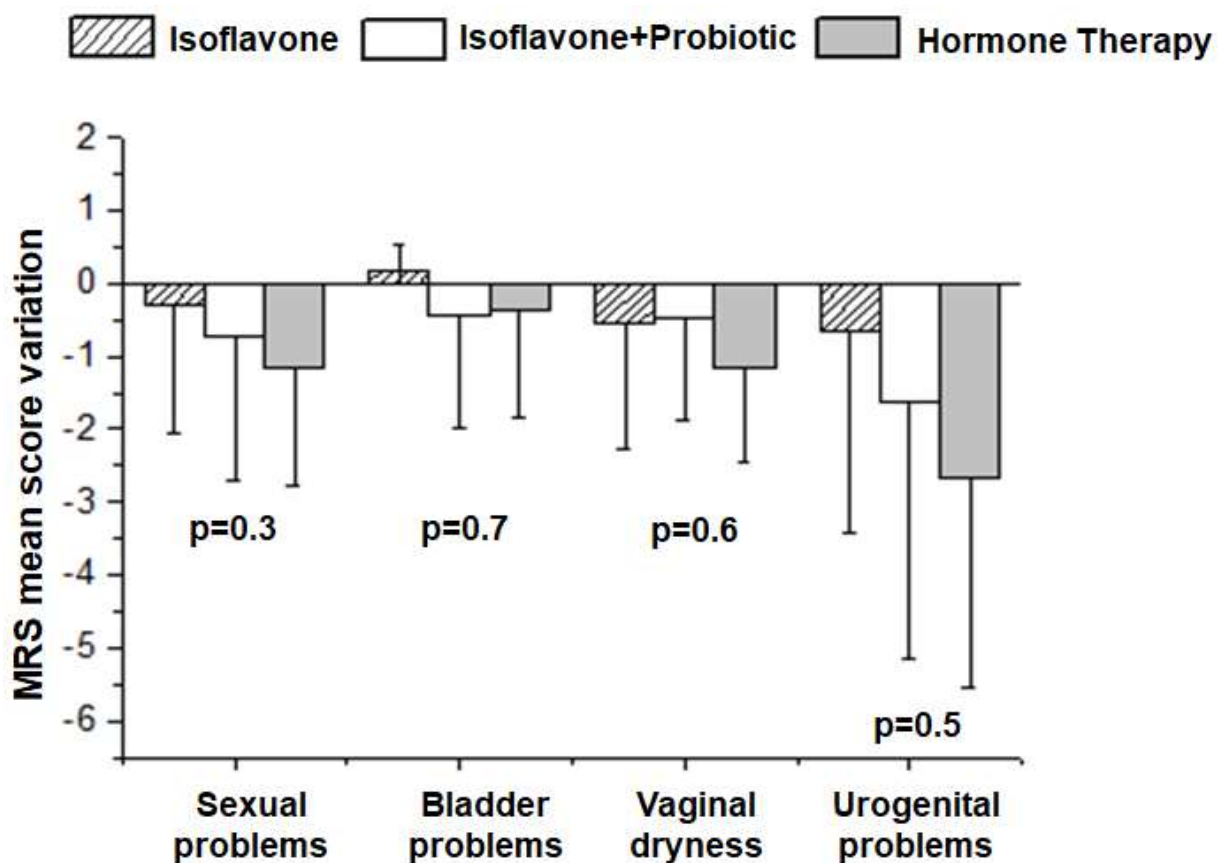


Figure 3. Mean score variation in the urogenital symptom subscale of the Menopause Rating Scale according to treatment group. Change from baseline (Analysis of variance).

Table1. Clinical and sociodemographic characteristic of the studied population according to treatment groups (n=60)

Characteristics	Groups			p-value
	Isoflavone	Isoflavone+probiotic	Hormone Therapy	
Age, (mean±SD)	53.0(3.4)	52.0(3.4)	52.2(3.4)	0.55 ^a
Age at menopause (years), (Mean±SD)	49.4(3.6)	48.4(2.8)	47.8(4.8)	0.47 ^a
Time since menopause (months) (mean±SD)	44.7(35.6)	43.2(25.6)	51.9(70.7)	0.30 ^a
Education (%)				0.68 ^b
Elementary school	15.8	35.0	21.0	
High school	52.6	45.0	57.9	
Higher education	31.6	20.0	21.0	
Race (%)				0.15 ^c
White	57.9	50.0	78.9	
Non-white	42.1	50.0	21.0	
Numbers of pregnancy, (mean ±SD)	2.5(1.6)	2.7(1.3)	2.2(1.2)	0.54 ^a
Socialstatus (%)				0.03 ^c
Classe A	47.4	40.0	78.9	
Classe B/C	52.6	60.0	21.0	
Status marital,%				0.42 ^c
With partner	36.8	45.0	57.9	
Without partner	63.1	55.0	42.1	
Clinical co-morbidities (%)	36.8	40.0	26.3	0.64 ^c
Current smoker (%)	15.8	25.0	5.3	0.26 ^b
Body fat (SD)	38.5(3.8)	37.3(6.1)	38.7(4.8)	0.60 ^d
Body mass index(SD)	29.0(4.2)	30.0(6.3)	28.7(4.3)	0.72 ^d
Physical activity (%)	47.4	45.0	73.7	0.14 ^c

^aKruskal-Wallis non parametric test.

^bFisher's exact test.

^cχ²test.

^dAnalysis of variance (followed by Mann-Whitney U test).

Table 2. Mean score variation in urogenital subscale of Menopause Rating Scale (MRS), according to treatment groups (n=58)

Groups	Treatment		
	Baseline	16 Weeks	<i>p</i> for intragroup differences ^a
Isoflavone	2.88(3.2)	2.23(2.5)	0.44
Isoflavone+Probiotic	4.68(3.6)	3.05 (2.2)	0.06
Hormone Therapy	4.94(3.5)	2.26 (2.4)	0.002

Data are presented as mean ($\pm$ SD).

^aAnalysis of variance (followed by Mann-Whitney *U* test).

Table 3.Median urinary content of aglycones, intermediates compounds, equol and O-DMA at baseline and 16 weeks of treatment according to the studied group (n=58)

Urinary content (ug/mL)	Isoflavone – Median (Q1-Q3)				Isoflavone+Probiotic - Median (Q1-Q3)				Hormone Therapy - Median (Q1-Q3)			
	Baseline (n=19)	8 weeks (n=18)	16 weeks (n=17)	p- value	Baseline (n=19)	8 weeks (n=19)	16 weeks (n=19)	p- value	Baseline (n=19)	8 weeks (n=19)	16 weeks (n=19)	p- value
Daidzein	0.0 (0-0)	3.0 (0-27.7)	14.7 (2.2-71.2)	0.16	0.0 (0-0)	9.2 (0-20.4)	3.6(1.5-8.9)	<0.001	0.0 (0-0)	0.0 (0-0)	2.5 (0-6.0)	0.003
Genistein	1.8 (0-3.0)	2.1 (0-4.0)	5.4 (3.4-9.4)	0.87	2.0 (0-3.2)	2.0 (0-3.3)	7.5(5.7-9.9)	0.06	2.2 (0-3.3)	0.0 (0-2.0)	5.3 (3.6-7.2)	0.18
Genistein intermediary	0.0 (0-2.3)	0.0 (0-4.2)	0.0 (0-1.9)	0.41	2.0 (0-2.4)	1.4(0-1.9)	0.0 (0-2.0)	0.54	2.0 (0-2.4)	0.0 (0-1.7)	0.0 (0-2.0)	0.88
Glycitein	0.0 (0-0)	0.0 (0-0)	1.7 (0-3.0)	1.00	0.0 (0-0)	0.0 (0-2.3)	2.41(1.8-3.2)	0.009	0.0 (0-0)	0.0 (0-0)	2.1 (0-3.0)	0.39
Equol	1.9 (0-2.6)	3.4 (1.6-7.2)	2.3 (0-4.6)	0.15	2.1 (1.8-3.4)	2.2(0.0-4.0)	2.7(2.1-3.5)	0.15	1.7 (0-2.2)	1.3 (0-3.2)	1.8 (0-3.2)	0.26
Equol intermediary	1.6 (0-2.2)	2.5 (2.0-51.6)	3.0 (2.5-4.3)	0.75	0.0 (0-2.2)	3.3(1.7-11.6)	3.0 (0-4.0)	<0.001	1.6 (0-1.9)	0.0 (0-1.8)	2.3 (0-3.0)	0.15
O-DMA	0.0 (0-0)	0.0 (0-0)	0.0 (0-1.3)	1.00	0.0 (0-0)	0.0 (0-5.7)	1.7 (0-4.5)	0.02	0.0 (0-0)	0.0 (0-0)	0.0 (0-3.4)	0.06

Kruskal-Wallis non parametric test

Table 4.Maturation values, parabasal, intermediate and superficial cells at baseline and after 16 weeks, by treatment groups (n=58)

Variable	Baseline	16 weeks	p^a for intragroup differences
Maturation values			
Isoflavone	44 (22)	37 (27)	0.50
Isoflavone+Probiotic	43 (33)	32 (25)	0.02
Hormone Therapy	48 (26)	69 (22)	0.02
Parabasal cells			
Isoflavone	23 (34)	41 (43)	0.22
Isoflavone+Probiotic	37 (42)	44 (42)	0.24
Hormone Therapy	27 (36)	5 (22)	0.01
Intermediate cells			
Isoflavone	63 (32)	46 (34)	0.04
Isoflavone+Probiotic	37 (33)	42 (34)	0.52
Hormone Therapy	51 (30)	56 (28)	0.64
Superficial cells			
Isoflavone	12 (14)	14 (18)	1.00
Isoflavone+Probiotic	24 (31)	9 (15)	0.02
Hormone Therapy	22 (21)	41 (28)	0.02

Data are presented as mean (SD).

^aAnalysis of variance (followed by Mann-Whitney *U* test)

Table 5. Percentage distribution of women according vaginal health score (VHI), vaginal flora and pH at baseline and 16 weeks of treatment (n=58)

Variable	Baseline	16 weeks	<i>p</i>^a for intragroup differences
VHI, (mean $\pm$SD)			
Isoflavone	15.2 (3.8)	16.8 (3.6)	0.03
Isoflavone+Probiotic	15.1 (3.6)	15.8 (3.4)	0.30
Hormone Therapy	15.1 (3.4)	20.7 (3.1)	0.0002
Flora Type 1 (%)			
Isoflavone	23.5	52.9	0.16
Isoflavone+Probiotic	44.4	29.4	0.49
Hormone Therapy	26.3	94.7	<0.0001
pH, mean (SD)			
Isoflavone	5.6 (0.9)	5.5 (1.0)	0.78
Isoflavone+Probiotic	6.0 (1.0)	6.2 (0.9)	0.24
Hormone Therapy	6.0 (0.7)	4.6 (0.8)	0.0007

Data are presented as mean (SD).

^aAnalysis of variance (followed by Mann-Whitney *U* test).

VHI: Vaginal Health Index

Table 6. Percentage distribution of adverse effects during treatment period

Side effects	Isoflavone	Isoflavone+ Probiotic	Hormone Therapy	<i>P^a intergroups differences</i>
Mastalgia	11.7	15.8	47.4	0.02 ^a
Bleeding	0	5.2	31.5	0.01 ^b
Headache	29.4	36.8	31.5	0.88 ^a
Nausea	11.7	5.2	21.0	0.36 ^b
Skin allergy	0	15.8	10.5	0.35 ^b
Intestinal constipation	17.6	15.7	36.8	0.32 ^b
Diarrhoea	0	5.2	10.5	0.76 ^b
Flatulence gas	47.0	36.8	31.5	0.62 ^a
Water retention	17.6	16.6	42.1	0.16 ^b
Subjective Weight gain	35.2	26.3	21.0	0.62 ^a

^a χ^2 test^bFisher's exact test.

5. DISCUSSÃO GERAL

As mulheres apresentam alterações importantes em seu corpo durante a vida devido a sua fisiologia, como a menarca, a gestação e a menopausa (65). Ainda hoje, a menstruação é vista como sinal de fertilidade e é associada à feminilidade. A menopausa é um marco importante na vida da mulher, pois muitas se tornam inseguras, tanto pelo medo de envelhecer como pelo medo de desenvolver doenças. O envelhecimento deve ser considerado como um processo natural tanto para homens quanto para mulheres, porém na sociedade ocidental existe uma relação entre beleza e a mulher jovem. O hipoestrogenismo provocado pela menopausa faz com que muitas mulheres apresentem sintomas antes desconhecidos e faz com que muitas entrem em conflito, levando a consequências psicológicas, fazendo com que pensem que são inúteis, menos atraentes, perdem seu valor pessoal e se tornam assexuadas. Todos os sintomas e conflitos das mulheres no período menopausal causam redução da qualidade de vida (65).

A SGM tem alta prevalência nas mulheres pós-menopausa, provocando queda na qualidade de vida e impacto na vida sexual, e mesmo assim tem sido subdiagnosticada e subtratada (13).

A atrofia vaginal surge após quatro a cinco anos do hipoestrogenismo, sendo geralmente o ressecamento vaginal o primeiro sintoma relatado da SGM pela paciente. A secura vaginal ocorre pela diminuição da transudação através do epitélio vaginal e redução da secreção pelas glândulas do colo uterino (66).

Em 2013, a Sociedade Americana de Menopausa publicou um consenso sobre o tratamento SGM recomendando como tratamento farmacológico o uso de estrogênio vaginal, Desidroepiandrosterona vaginal (DHEA), ospemifeno via oral e como tratamento não farmacológico recomendou o uso de lubrificantes ou hidratantes vaginais (9).

Em 2010, foi realizado o estudo *Vaginal Health: Insights, Views & Attitudes* (VIVA), que incluiu mulheres entre 55 a 65 anos de idade dos Estados Unidos, Grã-Bretanha, Canadá, Dinamarca, Finlândia, Suécia e Noruega. O objetivo deste estudo foi avaliar o conhecimento das mulheres sobre a saúde vaginal, em especial, sobre a atrofia vaginal. Foi observado que a maioria das mulheres atribuiu os sintomas da atrofia vaginal a outras condições e não sabiam que era uma condição crônica com necessidade de tratamento. Além disso, grande parte das participantes alegou sofrer

algum impacto negativo sobre suas vidas devido à atrofia vaginal, como perda da autoestima, sentirem-se velhas, vida social prejudicada, consequências negativas na vida sexual e relacionamento (67).

A América Latina possui países com diferentes condições socioeconômicas, etnias e sistemas políticos. No entanto, a maioria é de religião (católica) e origem mestiça (68). A fim de avaliar se os fatores biológicos e socioculturais teriam efeitos sobre a sexualidade feminina nos países da América Latina, em 2016, foi realizado o estudo *Vaginal Health: Insights, Views & Attitudes (VIVA-LATAM): results from a survey in Latin America*, que incluiu Argentina, Brasil, Chile, Colômbia e México. Participaram do estudo mulheres entre 55 a 65 anos, as quais preencheram o mesmo questionário aplicado do estudo VIVA. As mulheres relacionaram a menopausa a sintomas como fogachos e sintomas vaginais, mas apenas 6% associaram os sintomas vaginais com atrofia vaginal. A maioria das participantes não sabia que a atrofia vaginal é uma condição crônica. Entretanto, mais da metade já havia apresentado algum desconforto e impacto negativo na vida causado por ela, em especial, na vida sexual (12). Os estudos VIVA e VIVA-LATAM mostraram a redução da qualidade de vida, perda da autoestima e impacto negativo na vida sexual causado pela SGM, independente do nível socioeconômico e sociocultural das mulheres.

O nosso trabalho foi realizado com a finalidade de avaliar a resposta terapêutica, na melhora dos sintomas urogenitais presentes na SGM, da isoflavona associada ao probiótico a fim de dar mais uma opção de tratamento para as pacientes com contraindicação, que não desejam fazer uso de terapia hormonal ou que não apresentam resposta com o uso da isoflavona isolada.

A literatura é vasta e controversa ao analisar a melhora da saúde vaginal com o uso da isoflavona. Sabe-se que a isoflavona é metabolizada em S-equol, seu derivado ativo e mais potente, pela flora intestinal no cólon (34). Portanto, se faz necessário uma microbiota intestinal adequada para a produção de S-equol. Vários fatores alteram a microbiota intestinal como idade, estado de saúde e fatores ambientais. Os probióticos podem ser usados para modular o desequilíbrio da microbiota intestinal e introduzir cepas com efeitos específicos promotores da saúde (69).

Caruso e colaboradores realizaram um ensaio clínico que evidenciou que o uso de um nutracêutico que contém 10 mg de equol é capaz de melhorar a maturação celular e ressecamento vaginal, além de reduzir pH vaginal (70). Em contrapartida, outro estudo mostrou que a isoflavona não foi capaz de melhorar a maturação celular e a secura vaginal (71). Em 2011, a NAMS publicou um relatório sobre o uso da isoflavona nas pacientes na pós-menopausa. De centenas de artigos analisados, apenas dois eram sobre o uso da isoflavona na melhora do ressecamento vaginal, os quais não evidenciaram melhora da saúde vaginal (55).

Nosso estudo mostra que a TH ainda é a melhor escolha para o tratamento da SGM. Ao compararmos a melhora dos sintomas urogenitais presentes na subescala urogenital MRS após 16 semanas de tratamento, notamos que houve uma queda superior do escore no grupo isoflavona que no grupo isoflavona associado ao probiótico. O score de saúde vaginal permaneceu praticamente constante no grupo isoflavona e isoflavona com probiótico.

O pH e flora vaginal estão interligados, já que a produção de ácido láctico é feita pelos lactobacillus. Na menopausa, há predomínio de flora vaginal tipo 2 e tipo 3, devido ao hipoestrogenismo (5). No estudo foi evidenciado melhora do pH e da flora vaginal apenas no grupo TH, uma vez que nos demais tratamentos não houve mudança da flora vaginal.

Em relação aos sintomas urinários, nosso estudo não evidenciou diferenças significativas nos três grupos estudados ao longo do tempo, uma vez que a maior parte das mulheres não apresentavam sintomas urinários. No entanto, existem estudos que mostraram piora dos sintomas urinários com o uso da TH. O estudo WHI mostrou que o uso de terapia hormonal oral combinada aumentou o risco de incontinência urinária (72). Outro estudo, o *Heart and estrogen-progestin Replacement Study*, evidenciou piora na incontinência urinária de esforço nas mulheres que fizeram uso de terapia hormonal combinada (73). Já o *Nurses Health Study* observou que o uso de terapia hormonal combinada aumentou em 78% a chance das mulheres apresentarem quadro de incontinência urinária (74).

Em nosso meio, Carmignani e colaboradores publicaram um estudo que comparava os efeitos da isoflavona com TH nos sintomas urogenitais. Foi um estudo randomizado, duplo cego, contando com a participação de 60 mulheres que foram distribuídas em três grupos de 20. Um grupo recebeu pílulas que continham 1mg de

estradiol associado a 0,5 mg de acetato de noretisterona, além de duas porções diárias de placebo em pó. Outro grupo recebeu pílulas de placebo, além de duas porções diárias de 45mg de soja em pó, totalizando 90mg de isoflavona por dia. Já outro grupo recebeu pílulas de placebo e duas porções diárias de placebo em pó. Não houve resultado significativo no alívio dos sintomas sexuais e urinários comparando os três grupos. No entanto, houve melhora no quadro de ressecamento vaginal no grupo tratado com TH e isoflavona. Na avaliação da citologia vaginal, houve apenas resultado significativo no grupo tratado com TH, pois houve aumento das células intermediárias e superficiais, além da diminuição das células parabasais, e não houve resposta com o uso da isoflavona, revelada pela queda nas células superficiais e discreto aumento das células intermediárias (26).

Alguns estudos têm evidenciado melhora da atrofia vaginal com o uso de isoflavona tópica. Lima e colaboradores realizaram um ensaio clínico com o uso de isoflavona *Glycine max*, vaginal gel 4% (1g/dia) durante 12 semanas. A isoflavona pareceu ser eficaz para aliviar os sintomas da secura vaginal e da dispareunia, além de promover um aumento nas células intermediárias e superficiais (75). Em 2001, foi publicado um ensaio clínico cujo objetivo foi investigar o efeito clínico de uma formulação de gel vaginal contendo isoflavonas em comparação com nenhum tratamento tópico em mulheres com distrofia vaginal. As participantes foram randomizada para o gel vaginal, que continha isoflavonas, *Lactobacillus sporogenes*, extrato de *Calêndula officinalis* e ácido láctico ou nenhum tratamento tópico por quatro semanas. Todos os pacientes receberam isoflavonas orais diárias mais *Lactobacillus sporogenes*. A combinação de isoflavonas orais e tópicas mostrou ser mais eficaz que o tratamento oral isolado na redução de prurido, ardor, eritema vulvovaginal, secura vaginal e dispareunia (76). Ghazanfarpour e colaboradores realizaram uma revisão sistemática para avaliar o efeito da isoflavona tópica na melhora dos sintomas vaginais. Foram encontrados apenas quatro ensaios clínicos e concluiu-se que as isoflavonas tópicas tiveram um efeito benéfico sobre a atrofia vaginal em mulheres na pós-menopausa. No entanto, ensaios clínicos randomizados de maiores proporções e mais consistentes são necessários para fortalecer esta conclusão (77).

Alguns estudos já tem utilizado o equol via oral para observar seu efeito na melhora da GSM. Uma empresa japonesa, através do uso da biofermentação com uma cepa de lactobacilos, produziu equol a partir de germe de soja, sendo este equol

chamado de Natural S-Equol. A justificativa para administrar S-equol é contornar a falta de uma flora intestinal adequada em pessoas não produtoras de equol. Três estudos foram feitos até agora usando S-equol para sintomas da menopausa. Todos os estudos foram feitos no Japão usando uma ferramenta chamada Japanese Menopause Symptom Score, que é uma escala de qualidade de vida. O S-equol na dose de 10 mg, uma vez por dia, mostrou-se menos eficaz. Enquanto S-equol 10 mg, três vezes ao dia, foi associado a melhoras significativas nas medidas de humor e ansiedade. Nenhuma alteração evidente ocorreu no hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH), estradiol ou progesterona (78, 79). Um estudo americano comparou a eficácia de um suplemento contendo genisteína, daidzeína e gliciteína, perfazendo um total de 50mg/dia de isoflavona, ao S-equol nas dosagens de 10mg, 20mg e 40 mg/dia. O grupo que usou 10mg/dia de S-equol apresentou melhora das ondas de calor semelhante ao grupo que usou o suplemento associado a 50mg/dia de isoflavona. Já as mulheres que utilizaram 20 e 40 mg/ dia de S-equol apresentaram maior redução dos sintomas quando comparado com o grupo que usou o suplemento associado à isoflavona (55).

Este trabalho, cujo objetivo era encontrar melhora dos sintomas urogenitais nas mulheres que receberam isoflavona combinada com probiótico, através do aumento da produção de S-equol devido à modificação da microbiota intestinal, mostrou o contrário. Após o início do tratamento, notou-se que as pacientes que utilizaram o probiótico apresentaram aumento das isoflavonas agliconas e seus metabólitos quando comparada com a isoflavona isolada. No entanto, essa elevação não foi suficiente para produzir o efeito terapêutico esperado. Com este resultado pensamos que o tempo de tratamento pode ter sido curto para que houvesse uma remodelação total da microbiota intestinal, para que a produção de equol elevasse significativamente para produzir melhora dos sintomas. Além disso, estudos futuros poderão estabelecer o nível plasmático adequado de equol necessário para que ocorra efeito terapêutico significativo.

6. CONCLUSÃO

- A terapia hormonal foi eficaz na melhora do escore dos sintomas urogenitais da subescala urogenital da Menopause Rating Scale.
- Não houve alterações das queixas urinárias nos três grupos de tratamento.
- Apenas o grupo que utilizou terapia hormonal apresentou queda das células parabasais e aumento das células superficiais, consequentemente aumentando a maturação celular.
- Apenas a terapia hormonal foi eficaz em reduzir o pH vaginal.
- Apenas o grupo que utilizou a terapia hormonal apresentou uma flora vaginal rica em lactobacillus.
- O probiótico foi capaz de melhorar a metabolização das isoflavonas, porém não proporcionou melhora dos sintomas urogenitais e da atrofia vaginal.

7. REFERÊNCIAS

1. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [internet]. Projeção da população do Brasil e das Unidades da Federação-2017 [acesso 01/07/2018]. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/apps/populacao/projecao/>.
2. Malheiros ES, Chein MB, da Silva DS, Dias CL, Brito LG, Pinto-Neto AM, et al. Climacteric syndrome in a Northeastern Brazilian city: a household survey. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2014;36(4):163-9.
3. Lui Filho JF, Baccaro LF, Fernandes T, Conde DM, Costa-Paiva L, Pinto Neto AM. Factors associated with menopausal symptoms in women from a metropolitan region in Southeastern Brazil: a population-based household survey. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2015;37(4):152-8.
4. Fritz MA, Speroff L. Menopausa e Transição Perimenopausica. *Endocrinologia Ginecológica e Infertilidade*. 8 ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2015. p. 689-768.
5. Panda S, Das A, Singh AS, Pala S. Vaginal pH: A marker for menopause. *J Midlife Health*. 2014;5(1):34-7.
6. Carmignani LO, Pedro AO, Costa-Paiva LH, Pinto-Neto AM. The effect of dietary soy supplementation compared to estrogen and placebo on menopausal symptoms: a randomized controlled trial. *Maturitas*. 2010;67(3):262-9.
7. Ayers B, Forshaw M, Hunter MS. The impact of attitudes towards the menopause on women's symptom experience: a systematic review. *Maturitas*. 2010;65(1):28-36.
8. Avis NE, Crawford SL, Greendale G, Bromberger JT, Everson-Rose SA, Gold EB, et al. Duration of menopausal vasomotor symptoms over the menopause transition. *JAMA*. 2015;175(4):531-9.
9. The North American Menopause Society. Management of symptomatic vulvovaginal atrophy: 2013 position statement of The North American Menopause Society. *Menopause*. 2013;20(9):888-902.
10. Portman DJ, Gass ML, Panel VATCC. Genitourinary syndrome of menopause: new terminology for vulvovaginal atrophy from the International Society for the Study of Women's Sexual Health and the North American Menopause Society. *Maturitas*. 2014;79(3):349-54.

11. Moral E, Delgado JL, Carmona F, Caballero B, Guillán C, González PM, et al. The impact of genitourinary syndrome of menopause on well-being, functioning, and quality of life in postmenopausal women. *Menopause*. 2018.
12. Nappi RE, de Melo NR, Martino M, Celis-González C, Villaseca P, Röhrich S, et al. Vaginal Health: Insights, Views & Attitudes (VIVA-LATAM): results from a survey in Latin America. *Climacteric*. 2018;1-7.
13. The North American Menopause Society 3rd Utian Translational Science Symposium. A conversation about hormone therapy: is there an appropriate dose, route, and duration of use? *Menopause*. 2017;24(11):1221-35.
14. Chen GD, Oliver RH, Leung BS, Lin LY, Yeh J. Estrogen receptor alpha and beta expression in the vaginal walls and uterosacral ligaments of premenopausal and postmenopausal women. *Fertil Steril*. 1999;71(6):1099-102.
15. Brotman RM, Shardell MD, Gajer P, Fadrosch D, Chang K, Silver MI, et al. Association between the vaginal microbiota, menopause status, and signs of vulvovaginal atrophy. *Menopause*. 2014;21(5):450-8.
16. Steinauer JE, Waetjen LE, Vittinghoff E, Subak LL, Hulley SB, Grady D, et al. Postmenopausal hormone therapy: does it cause incontinence? *Obstet Gynecol*. 2005;106(5):940-5.
17. Kim HK, Kang SY, Chung YJ, Kim JH, Kim MR. The Recent Review of the Genitourinary Syndrome of Menopause. *J Menopausal Med*. 2015;21(2):65-71.
18. Jones HJ, Huang AJ, Subak LL, Brown JS, Lee KA. Bladder Symptoms in the Early Menopausal Transition. *J Womens Health*. 2016;25(5):457-63.
19. Fritz MA, Speroff L. Menopausa e Transição Perimenopausica. *Endocrinologia Ginecológica e Infertilidade*. 8 ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2015. p. 689-768.
20. Stuenkel CA, Davis SR, Gompel A, Lumsden MA, Murad MH, Pinkerton JV, et al. Treatment of Symptoms of the Menopause: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(11):3975-4011.
21. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy

- postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*. 2002;288(3):321-33.
22. Taylor M. Complementary and Alternative Approaches to Menopause. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2015;44(3):619-48.
 23. Gold EB, Bair Y, Zhang G, Utts J, Greendale GA, Upchurch D, et al. Cross-sectional analysis of specific complementary and alternative medicine (CAM) use by racial/ethnic group and menopausal status: the Study of Women's Health Across the Nation (SWAN). *Menopause*. 2007;14(4):612-23.
 24. Lazar F, Costa-Paiva L, Morais SS, Pedro AO, Pinto-Neto AM. The attitude of gynecologists in São Paulo, Brazil 3 years after the Women's Health Initiative study. *Maturitas*. 2007;56(2):129-41.
 25. The North American Menopause Society. Nonhormonal management of menopause-associated vasomotor symptoms: 2015 position statement of The North American Menopause Society. *Menopause*. 2015;22(11):1155-72.
 26. Carmignani LO, Pedro AO, Montemor EB, Arias VA, Costa-Paiva LH, Pinto-Neto AM. Effects of a soy-based dietary supplement compared with low-dose hormone therapy on the urogenital system: a randomized, double-blind, controlled clinical trial. *Menopause*. 2015;22(7):741-9.
 27. Faubion SS, Larkin LC, Stuenkel CA, Bachmann GA, Chism LA, Kagan R, et al. Management of genitourinary syndrome of menopause in women with or at high risk for breast cancer: consensus recommendations from The North American Menopause Society and The International Society for the Study of Women's Sexual Health. *Menopause*. 2018.
 28. Bennetts HW, Underwood EJ, Shier FL. A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia. *Br Vet J*. 1946;102(11):348-52.
 29. Landete JM, Arqués J, Medina M, Gaya P, de Las Rivas B, Muñoz R. Bioactivation of Phytoestrogens: Intestinal Bacteria and Health. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2016;56(11):1826-43.
 30. Moosmann B, Behl C. The antioxidant neuroprotective effects of estrogens and phenolic compounds are independent from their estrogenic properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(16):8867-72.

31. Mueller SO, Simon S, Chae K, Metzler M, Korach KS. Phytoestrogens and their human metabolites show distinct agonistic and antagonistic properties on estrogen receptor alpha (ERalpha) and ERbeta in human cells. *Toxicol Sci.* 2004;80(1):14-25.
32. Zaheer K, Humayoun Akhtar M. An updated review of dietary isoflavones: Nutrition, processing, bioavailability and impacts on human health. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2017;57(6):1280-93.
33. Preedy VR. Isoflavones : chemistry, analysis, function and effects. Cambridge, U.K.: Royal Society of Chemistry; 2013.
34. Poluzzi E, Piccinni C, Raschi E, Rampa A, Recanatini M, De Ponti F. Phytoestrogens in postmenopause: the state of the art from a chemical, pharmacological and regulatory perspective. *Curr Med Chem.* 2014;21(4):417-36.
35. Setchell KD, Brown NM, Lydeking-Olsen E. The clinical importance of the metabolite equol-a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *J Nutr.* 2002;132(12):3577-84.
36. Guadamuro L, Delgado S, Redruello B, Flórez AB, Suárez A, Martínez-Cambor P, et al. Equol status and changes in fecal microbiota in menopausal women receiving long-term treatment for menopause symptoms with a soy-isoflavone concentrate. *Front Microbiol.* 2015;6:777.
37. Monteiro NES, Queirós LD, Lopes DB, Pedro AO, Macedo GA. Impact of microbiota on the use and effects of isoflavones in the relief of climacteric symptoms in menopausal women – A review. *Journal of Functional Foods.* 2018;41:p.100-111.
38. Chen MN, Lin CC, Liu CF. Efficacy of phytoestrogens for menopausal symptoms: a meta-analysis and systematic review. *Climacteric.* 2015;18(2):260-9.
39. Ghazanfarpour M, Sadeghi R, Roudsari RL. The application of soy isoflavones for subjective symptoms and objective signs of vaginal atrophy in menopause: A systematic review of randomised controlled trials. *J Obstet Gynaecol.* 2016;36(2):160-71.
40. Marrian GF, Beall D. The constitution of equol. *Biochem J.* 1935;29(7):1586-9.

41. Axelson M, Kirk DN, Farrant RD, Cooley G, Lawson AM, Setchell KD. The identification of the weak oestrogen equol [7-hydroxy-3-(4'-hydroxyphenyl)chroman] in human urine. *Biochem J.* 1982;201(2):353-7.
42. Setchell KD, Borriello SP, Hulme P, Kirk DN, Axelson M. Nonsteroidal estrogens of dietary origin: possible roles in hormone-dependent disease. *Am J Clin Nutr.* 1984;40(3):569-78.
43. Decroos K, Vanhemmens S, Cattoir S, Boon N, Verstraete W. Isolation and characterisation of an equol-producing mixed microbial culture from a human faecal sample and its activity under gastrointestinal conditions. *Arch Microbiol.* 2005;183(1):45-55.
44. Zubik L, Meydani M. Bioavailability of soybean isoflavones from aglycone and glucoside forms in American women. *Am J Clin Nutr.* 2003;77(6):1459-65.
45. Hur HG, Lay JO, Beger RD, Freeman JP, Rafii F. Isolation of human intestinal bacteria metabolizing the natural isoflavone glycosides daidzin and genistin. *Arch Microbiol.* 2000;174(6):422-8.
46. Nakatsu CH, Armstrong A, Clavijo AP, Martin BR, Barnes S, Weaver CM. Fecal bacterial community changes associated with isoflavone metabolites in postmenopausal women after soy bar consumption. *PLoS One.* 2014;9(10):e108924.
47. Wiseman H, Casey K, Bowey EA, Duffy R, Davies M, Rowland IR, et al. Influence of 10 wk of soy consumption on plasma concentrations and excretion of isoflavonoids and on gut microflora metabolism in healthy adults. *Am J Clin Nutr.* 2004;80(3):692-9.
48. McCabe L, Britton RA, Parameswaran N. Prebiotic and Probiotic Regulation of Bone Health: Role of the Intestine and its Microbiome. *Curr Osteoporos Rep.* 2015;13(6):363-71.
49. Palacios S, Rojo IA, Cancelo MJ, Neyro JL, Castelo-Branco C. Women's perception of the efficacy of a soy extract with probiotic: the M3 study. *Gynecol Endocrinol.* 2008;24(4):178-83.
50. Utian WH, Jones M, Setchell KD. S-equol: a potential nonhormonal agent for menopause-related symptom relief. *J Womens Health.* 2015;24(3):200-8.

51. Ishiwata N, Melby MK, Mizuno S, Watanabe S. New equol supplement for relieving menopausal symptoms: randomized, placebo-controlled trial of Japanese women. *Menopause*. 2009;16(1):141-8.
52. Setchell KDR. The history and basic science development of soy isoflavones. *Menopause*. 2017;24(12):1338-50.
53. Jordan VC, Morrow M. Tamoxifen, raloxifene, and the prevention of breast cancer. *Endocr Rev*. 1999;20(3):253-78.
54. Pike AC, Brzozowski AM, Hubbard RE, Bonn T, Thorsell AG, Engström O, et al. Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist. *EMBO J*. 1999;18(17):4608-18.
55. The North American Menopause Society. The role of soy isoflavones in menopausal health: report of The North American Menopause Society/Wulf H. Utian Translational Science Symposium. *Menopause*. 2011;18(7):732-53.
56. Quaas AM, Kono N, Mack WJ, Hodis HN, Felix JC, Paulson RJ, et al. Effect of isoflavone soy protein supplementation on endometrial thickness, hyperplasia, and endometrial cancer risk in postmenopausal women: a randomized controlled trial. *Menopause*. 2013;20(8):840-4.
57. Heinemann K, Ruebig A, Potthoff P, Schneider HP, Strelow F, Heinemann LA, et al. The Menopause Rating Scale (MRS) scale: a methodological review. *Health Qual Life Outcomes*. 2004;2:45.
58. Bachmann G, Nevadunsky N. Diagnosis and treatment of atrophic vaginitis. *Am Fam Physician*. 2000;61(10):3090-6.
59. Tamanini JT, Dambros M, D'Ancona CA, Palma PC, Rodrigues Netto N. Validation of the "International Consultation on Incontinence Questionnaire -- Short Form" (ICIQ-SF) for Portuguese. *Rev Saude Publica*. 2004;38(3):438-44.
60. Almeida PPD, Machado LRG. A prevalência de incontinência urinária em mulheres praticantes de jump. *Fisioterapia em Movimento*. 2012;25:55-65.
61. Lustosa ÁB, Girão MJBC, Sartori MGF, Baracat EC, Lima GRd. Citologia Hormonal do Trato Urinário Baixo e da Vagina de Mulheres na Pós-menopausa, antes e durante Estrogenioterapia Oral e Transdérmica. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*. 2002;24(9):573-7.

62. McEndree B. Clinical application of the vaginal maturation index. *Nurse Pract.* 1999;24(9):48, 51-2, 5-6.
63. Spiegel CA, Amsel R, Holmes KK. Diagnosis of bacterial vaginosis by direct gram stain of vaginal fluid. *J Clin Microbiol.* 1983;18(1):170-7.
64. Ko KP. Isoflavones: chemistry, analysis, functions and effects on health and cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(17):7001-10.
65. Ministério da Saúde. Climatério: mais uma fase na vida da mulher. Manual de Atenção à Mulher no Climatério / Menopausa. 1 ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde. 2008. p. 9-14.
66. Sturdee DW, Panay N, Group IMSW. Recommendations for the management of postmenopausal vaginal atrophy. *Climacteric.* 2010;13(6):509-22.
67. Nappi RE, Kokot-Kierepa M. Vaginal Health: Insights, Views & Attitudes (VIVA) - results from an international survey. *Climacteric.* 2012;15(1):36-44.
68. Blümel JE, Chedraui P, Baron G, Belzares E, Bencosme A, Calle A, et al. Sexual dysfunction in middle-aged women: a multicenter Latin American study using the Female Sexual Function Index. *Menopause.* 2009;16(6):1139-48.
69. Landete JM, Gaya P, Rodríguez E, Langa S, Peirotén Á, Medina M, et al. Probiotic Bacteria for Healthier Aging: Immunomodulation and Metabolism of Phytoestrogens. *Biomed Res Int.* 2017;2017:5939818.
70. Caruso S, Cianci S, Fava V, Rapisarda AMC, Cutello S, Cianci A. Vaginal health of postmenopausal women on nutraceutical containing equol. *Menopause.* 2018;25(4):430-5.
71. Nikander E, Rutanen EM, Nieminen P, Wahlström T, Ylikorkala O, Tiitinen A. Lack of effect of isoflavonoids on the vagina and endometrium in postmenopausal women. *Fertil Steril.* 2005;83(1):137-42.
72. Hendrix SL, Cochrane BB, Nygaard IE, Handa VL, Barnabei VM, Iglesia C, et al. Effects of estrogen with and without progestin on urinary incontinence. *JAMA.* 2005;293(8):935-48.
73. Grady D, Brown JS, Vittinghoff E, Applegate W, Varner E, Snyder T, et al. Postmenopausal hormones and incontinence: the Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study. *Obstet Gynecol.* 2001;97(1):116-20.

74. Grodstein F, Lifford K, Resnick NM, Curhan GC. Postmenopausal hormone therapy and risk of developing urinary incontinence. *Obstet Gynecol.* 2004;103(2):254-60.
75. Lima SM, Yamada SS, Reis BF, Postigo S, Galvão da Silva MA, Aoki T. Effective treatment of vaginal atrophy with isoflavone vaginal gel. *Maturitas.* 2013;74(3):252-8.
76. Tedeschi C, Benvenuti C, EG RG. Comparison of vaginal gel isoflavones versus no topical treatment in vaginal dystrophy: results of a preliminary prospective study. *Gynecol Endocrinol.* 2012;28(8):652-4.
77. Ghazanfarpour M, Latifnejad Roudsari R, Treglia G, Sadeghi R. Topical administration of isoflavones for treatment of vaginal symptoms in postmenopausal women: A systematic review of randomised controlled trials. *J Obstet Gynaecol.* 2015;35(8):783-7.
78. Aso T, Uchiyama S, Matsumura Y, Taguchi M, Nozaki M, Takamatsu K, et al. A natural S-equol supplement alleviates hot flushes and other menopausal symptoms in equol nonproducing postmenopausal Japanese women. *J Womens Health (Larchmt).* 2012;21(1):92-100.
79. Aso T. Equol improves menopausal symptoms in Japanese women. *J Nutr.* 2010;140(7):1386S-9S.

8. ANEXOS

Anexo 1 - Randomização Aleatorizada

Casos	A	B	C
1	6	1	3
2	7	2	4
3	12	5	8
4	13	9	11
5	15	10	14
6	16	22	21
7	17	27	30
8	18	28	31
9	19	29	34
10	20	32	36
11	23	33	37
12	24	40	38
13	25	42	41
14	26	47	43
15	35	49	44
16	39	51	45
17	46	52	48
18	53	54	50
19	58	56	55
20	59	60	57

Anexo 2 - Ficha de coleta de dados

Nome: _____ HC: _____
 Data: 1º: ____/____/____ 2º: ____/____/____ 3º: ____/____/____
 Grupo: _____ Nº _____
 Endereço: _____ Cidade _____
 Estado _____ CEP: _____ Telefones para contato: Fixo () _____ Celular () _____
 Contatos telefônicos (melhor data/horário): 1º contato _____ 2º contato _____

1) Data de nascimento: ____/____/____ 2) Idade: _____

3) Estado civil: () Solteira () Casada () Múva () Divorciada () Outros

4) Cor (classificação feita pelo sujeito): () Branco () Preto () Pardo () Amarelo () Indígena

5) Anos que frequentou a escola: _____

6) Há quantos meses foi a última menstruação: _____

7) Anos de menopausa: _____ ou () Não se lembra () 1 a 5 anos () 6 a 10 anos () mais que 10 anos

8) Número de gestações: _____ Número de partos: _____ Número de abortos: _____ Número de cesáreas: _____

9) Doenças crônicas/comorbidades: _____

10) Tabagismo: () Fuma - há quanto tempo: _____ número de cigarros por dia: _____ () Nunca Fumou
 () Ex-tabagista - por quanto tempo fumou? _____

11) Etilismo: () Etilista – copos/dia _____ Há quanto tempo: _____ () Nunca foi etilista () Ex- etilista - por quanto tempo bebeu? _____ copos/dia

12) Realiza alguma atividade física regular: () Sim () Não
 Caso sim, Quais? _____

Em média: Com que frequência? _____ vezes/semana Por quanto tempo? _____ tempo/sessão

13) Faz uso de Medicamentos: () Sim () Não Se sim, Quais?

1- Anti-hipertensivo 2- Hipolipemiante 3- Hipoglicemiante 4- Anticoagulante 5- Glicocorticoides

Nome do(s) medicamento(s): _____

Dose(s): _____

Posologia(s): _____

14) Tem Artrite Reumatoide? () Sim () Não

15) Histórico de Fratura prévia () Sim () Não Se sim, Que local? _____
 Há quanto tempo foi a fratura? _____

16) Histórico de pai ou mãe com fratura de quadril: () Sim () Não () Não sabe

17) Quanto consome de água por dia? _____ litros/copos

18) Hábito intestinal: () Normal () Diarreico () Constipado

19) Usa Adoçante? () Sim () Não Se sim, qual? _____ Quantas vezes/dia? _____ vezes

Questões sobre Qualidade de Vida (QQL SF36)

1-Durante as últimas 4 semanas, quanto do seu tempo a sua condição física ou problemas emocionais interferiram com as suas atividades sociais (como visitar amigos, parentes, etc)?

1- Todo o tempo 2- A maior parte do tempo 3-Alguma parte do tempo

4- Uma pequena parte do tempo 5- Não interfere/Nenhuma parte do tempo

2-O quanto verdadeiro ou falso é cada uma das informações para você:

	Definitivamente verdadeira	A maioria das vezes verdadeira	Não sei	A maioria das vezes falsa	Definitivamente falsa
a)Eu costumo adoecer um pouco mais facilmente que as outras pessoas	1	2	3	4	5
b) Eu sou tão saudável quanto qualquer outra pessoa que conheço	1	2	3	4	5
c)Eu acho que minha saúde vai piorar	1	2	3	4	5
d) Minha saúde é excelente	1	2	3	4	5

3- Como você classifica o seu estado de saúde?

Pré tratamento (T): () Excelente () Boa () Regular () Ruim () Péssima

Durante o tratamento (T60): () Excelente () Boa () Regular () Ruim () Péssima

Pós tratamento (T120): () Excelente () Boa () Regular () Ruim () Péssima

16) Peso Inicial: _____ Kg Data inicial: ____/____/____ Pré tto

17) Peso Final: _____ Kg Data final: ____/____/____ Pós tto

18) Altura: _____ m

19) IMC _____ kg/m² Estado nutricional: _____ Início Pré tto

IMC _____ kg/m² Estado nutricional: _____ Final Pós tto

Exame Físico Geral

16) Peso Inicial: _____ Kg

Data inicial: ____/____/____ Pré tto

17) Peso Final: _____ Kg

Data final: ____/____/____ Pós tto

18) Altura: _____ m

19) IMC _____ kg/m² Estado nutricional: _____ Início Pré ttoIMC _____ kg/m² Estado nutricional: _____ Final Pós tto

20) Aferições antropométricas

Pré tratamento (T0):

Pós tratamento (T120):

Cintura: _____ cm

Cintura: _____ cm

Quadril: _____ cm

Quadril: _____ cm

Relação cintura/quadril: _____ cm

Relação cintura/quadril: _____ cm

21) Pressão Arterial:

Sistólica: Diastólica _____: _____ mmHg

Data: ____/____/____ Início do protocolo

Sistólica: Diastólica _____: _____ mmHg

Data: ____/____/____ Final do protocolo

Testes Laboratoriais	Pré tratamento	Pós Tratamento
22) Fsh		
23) E2		
24) Colesterol Total		
25) Hdl		
26) Ldl		
27) Triglicérides		
28) Glicemia		
29) Insulina		
30) CTX		
32) BSAP		
33) Osteocalcina		
	Data inicial:	Data final:

2.6) Exame Ginecológico

Exame	T0	T60	T120
Citologia	Superficiais:	Superficiais:	Superficiais:
	Intermediárias:	Intermediárias:	Intermediárias:
	Parabasaís:	Parabasaís:	Parabasaís:
pH vaginal			
Score de saúde vaginal			
Flora vaginal			
Espessura endometrial			

Parâmetros de Avaliação

Citologia vaginal: 1-IM#00/20/80: Nível estrogênico adequado 2- IM#80/20/00: Hipostrogenismo

pH vaginal: 1-pH entre 3.8 – 4.5: Nível estrogênico adequado 2-pH > 4.5: Hipostrogenismo

Flora vaginal: 1-Tipo 1 2-Tipo 2 3-Tipo 3

Espessura endometrial: 1-Espessura endometrial > 5mm 2-Espessura endometrial < 5mm

2.7) Avaliação do trofismo vaginal (Vaginal Health Score Index)

	Elasticidade Global	Secreção fluida	pH	Mucosa epitelial	Umidade
1	Nenhuma	Nenhuma	>6.1	Petéquias antes do contato	Nenhuma, mucosa inflamada
2	Pobre	Escassa	5.6 – 6.0	Sangra com leve contato	Nenhuma, mucosa não inflamada
3	Discreta	Superficial	5.1 – 5.5	Sangra com contato tipo raspagem	Mínima
4	Boa	Moderada	4.7 -5.0	Não friável Mucosa fina	Moderada
5	Excelente	Normal	≤ 4.6	Não friável Mucosa normal	Normal
Total					

Escore vaginal: /___/ 1-Escore vagina: Se > 15 = vagina normotrófica/ 2-Escore vaginal: Se ≤ 15 = vagina

atrófica

3-Classificação do Status Socioeconômico

3) Classificação social: Entr.Diga: Agora gostaria de fazer-lhe algumas perguntas sobre sua casa.

3.1) Quem é o chefe da família na sua casa? () Própria Entrevistada () Outra Pessoa Quem? _____

3.2) Qual o último ano da escola que o Chefe-da-Família cursou?

1) Não Estudou / Primária Incompleto.....0 Pontos

2) Primário Completo/ Ginásial Incompleto.....5 Pontos

3) Ginásial Completo / Colegial Incompleto.....10 Pontos

4) Colegial Completo/ Universitário Incompleto.....15 Pontos

5) Universitário completo..... 21 Pontos

Total de Pontos = _____

3.3) Na sua casa tem:

	Não tem	Quantas tem?			
		1	2	3	4 ou mais
a) Tv em cores	0	2	3	4	5
b) Rádio	0	1	2	3	4
c) Banheiro	0	2	3	4	4
d) Automóvel	0	2	4	5	5
e) Empregada mensalista	0	2	4	4	4
f) Aspirador de pó	0	1	1	1	1
g) Máquina de lavar	0	1	1	1	1
h) Vídeo cassete ou DVD	0	2	2	2	2
i) Geladeira	0	2	2	2	2
j) Freezer*	0	1	1	1	1

*independente ou parte da geladeira duplex

Total de pontos= _____

Some o total de pontos da pergunta 3.2 e 3.3

Total geral de pontos = _____ + _____ = _____ pontos = estrato _____

I 1 I A1 (30 A 34 PONTOS)

I 1 I C (11 A 16 PONTOS)

I 1 I A2 (25 A 29 PONTOS)

I 1 I D (6 A 10 PONTOS)

I 1 I B1 (21 A 24 PONTOS)

I 1 I E (0 A 5 PONTOS)

I 1 I B2 (17 A 20 PONTOS)

4- Efeitos colaterais sentidos ao longo do estudo, após intervenção.

1.1) Os escores da intensidade dos efeitos a serem preenchidos na Tabela são: *Ausente-0, *Leves- 1, *Moderados-2, * Intensos-3.

Efeitos Colaterais	Data: __/__/__	Data: __/__/__	Data: __/__/__	Data: __/__/__	Data: __/__/__
Mastalgia					
Sangramento					
Alergia de pele					
Cefaléia					
Náuseas/vômitos					
Flatulência					
Diarréia					
Constipação intestinal					
Aumento de peso					
Edema					
Outros					

1.2 Houve melhora dos sintomas climatéricos e urogenitais da consulta 1 para a consulta 2? () Sim () Não Se sim, dê uma nota de 0 a 10: _____

OBS: _____

1.3 Houve melhora dos sintomas climatéricos e urogenitais da consulta 2 para a consulta 3? () Sim () Não Se sim, dê uma nota de 0 a 10: _____

OBS: _____

1.4 Houve melhora dos sintomas climatéricos e urogenitais após o término do tratamento? () Sim () Não Se sim, dê uma nota de 0 a 10: _____

OBS: _____

5- Menopause Rating Scale (MRS)

Qual dos seguintes sintomas e em que medida você diria que sente atualmente?

Sintomas:	Nenhum	Pouco severo	Moderado	Severo	Muito severo	Pré TTO / /	Pós TTO / /
Score =	-----0	-----1	-----2	-----3	-----4		
1. Falta de ar, suores, calores.....	()	()	()	()	()		
2. Mal-estar do coração (batidas do coração diferentes, saltos nas batidas, batidas mais longas, pressão).....	()	()	()	()	()		
3. Problemas de sono (dificuldade em conciliar o sono, em dormir toda a noite e desperta-se cedo).....	()	()	()	()	()		
4. Estado de animo depressivo (sentir-se decaída, triste, a ponto das lágrimas, falta de vontade, trocas de humor).....	()	()	()	()	()		
5. Irritabilidade (sentir-se nervosa, tensa, agressiva).....	()	()	()	()	()		
6. Ansiedade (impaciência, pânico).....	()	()	()	()	()		
7. Esgotamento físico e mental (caída geral em seu desempenho, falta de concentração, falta de memória).....	()	()	()	()	()		
8. Problemas sexuais (falta do desejo sexual na atividade e satisfação).....	()	()	()	()	()		
9. Problemas de bexiga (dificuldade de urinar, incontinência, desejo excessivo de urinar).....	()	()	()	()	()		
10. Ressecamento vaginal (sensação de ressecamento, ardência e problemas durante a relação sexual).....	()	()	()	()	()		
11. Problemas musculares e nas articulações (dores reumáticas e nas articulações).....	()	()	()	()	()		

6. Satisfação

6.1 Qual sua satisfação com o tratamento?

1- Muito insatisfeito 2- Insatisfeito 3- Indiferente 4- Satisfeito 5- Muito satisfeito

6.2 Você pode dar prosseguimento ao seu tratamento adquirindo por conta própria os medicamentos utilizados ao longo do estudo. Você deseja uma receita para compra em farmácia?

() Sim Não ()

7. Recordatório 24h

Nome _____ Idade _____ data do atendimento: ____/____/____

Dia do recordatório: ____/____/____ ()Seg ()Ter ()Qua ()Qui ()Sex ()Sáb ()Dom - Primeira consulta

Consumo mensal de: Sal _____ kg Açúcar _____ kg óleo _____ litros

Quantidades de pessoas que consomem, incluindo o entrevistado: _____

Refeição/Horário	Alimentos, bebidas ou preparações	Quantidades
Acordou as: ____:____ Desjejum ____:____h		
Colação ____:____h		
Almoço ____:____h		
Lanche da Tarde ____:____h		
Jantar ____:____h		
Ceia ____:____h		

8. Questionário de Frequência Alimentar

Nome: _____ Data da entrevista: ____/____/____

Você mudou seus hábitos alimentares recentemente ou está fazendo dieta para emagrecer ou por qualquer outro motivo?

1 - não 5 - sim, para redução de sal 2 - sim, para perda de peso 6 - sim, para redução do Colesterol 3 - sim, por orientação médica

7 - sim, para ganho de peso 4 - sim, para dieta vegetariana ou diminuição do consumo de carne

Outro motivo: _____

Você está tomando algo para suplementar sua dieta (Vitaminas, minerais ou outros produtos?)

1 - não 2 - sim, regularmente 3 - sim, mas não regularmente

Se a resposta da pergunta anterior for sim, favor preencher o quadro abaixo:

Suplemento	Composição		Dose	Frequência	Há quanto tempo

As questões seguintes relacionam-se ao seu hábito alimentar usual no período de um ano. Para cada questão responda, por favor, a frequência que melhor descreva quantas vezes a senhora costuma comer cada alimento.

Alimento	Quantas vezes consome												Frequência			
Pão	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	
Manteiga ou margarina	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	
Café com açúcar	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	
Leite	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	
Iogurte	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	
Queijos	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	
Biscoito (com ou sem recheio)	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	
Bolo (simples ou recheado)	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	
Arroz (branco, integral ou parboilizado)	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	
Feijão (carioca, branco, feijoada)	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	
Macarrão, lasanha, nhoque	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	

Carne de Boi	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
Carne de porco	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
Carne de frango	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
Carne de peixe	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
Linguiça fresca (porco ou frango)	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
Embutidos (mortadela, presunto, salame)	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
Defumados (calabresa, bacon, paio)	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
Salsicha (em refeições ou hot dog)	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
Hamburguer (em refeições ou lanches)	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
Ovo (cozido, frito)	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
Batata, mandioca ou polenta (fritos)	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
Batata, mandioca, inhame ou polenta (cozidos ou assados)	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
Farinha de mandioca	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
Aveia	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
Soja e derivados	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
Verduras (alface, couve, repolho, acelga)	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
Legumes (tomate, abobrinha, chuchu, cenoura)	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
Frutas	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
Suco natural	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
Suco industrializado	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
Refrigerante	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
Pizza	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
Salgados fritos (coxinha, quibe, risole, pastel)	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
Salgado assado (bauru, pão de queijo, esfiha)	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
Doces (chocolate em barra, brigadeiro, bombom, tortas cremosas)	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
Cerveja	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
Vinho	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
Destilados (vodka, pinga, caipirinha)	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
Adoçantes	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A

Qual o modo de preparo que você geralmente utiliza para:

Carne de boi

() Cozida () Grelhado () Assada () Microondas () Frito em pouco óleo () Frito com muito óleo (imersão)

Carne de porco

() Cozida () Grelhado () Assada () Microondas () Frito em pouco óleo () Frito com muito óleo (imersão)

Carne de frango

() Cozida () Grelhado () Assada () Microondas () Frito em pouco óleo () Frito com muito óleo (imersão)

QFA Retirado de: Manual de Avaliação do Consumo Alimentar em estudos populacionais: a experiência do inquérito de saúde em São Paulo (ISA)

Anexo 3 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Avaliação da Influência de probióticos na absorção e produção de metabólitos de isoflavonas da soja em mulheres menopausadas com sintomatologia climatérica.

Pesquisadores responsáveis: Nutricionista Naice Eleidiane Santana Monteiro, Dra. Ana Elisa Ribeiro, Prof.^a Dra Adriana Orcesi Pedro, Prof.^a Dra Gabriela Alves Macedo Número do CAAE: 56751216.7.0000.5404

Você está sendo convidada a participar como voluntária de uma pesquisa que terá a duração de 4 meses. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visa assegurar seus direitos como participante e é elaborado em duas vias, uma que deverá ficar com você e outra com o pesquisador. Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com a pesquisadora. Se preferir, pode levar este Termo para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo se você não aceitar participar ou retirar sua autorização em qualquer momento.

Justificativa e objetivos:

A menopausa é uma fase natural da vida da mulher. Muitas mulheres passam pela menopausa sem queixas ou necessidade de tratamento, porém algumas apresentam sintomas como ondas de calor, suor intenso, insônia, depressão, ansiedade, infecções urinárias recorrentes, dentre diversos outros problemas que fazem necessário uso de medicamentos sintéticos ou terapias alternativas, como alimentos ou medicamentos extraídos de plantas para aquelas mulheres que não podem ou não desejam realizar a reposição hormonal.

Este estudo tem o objetivo de avaliar se o tratamento alternativo constituído de isoflavonas, que são substâncias benéficas da soja, ao serem acrescidas ou não de probióticos, que são bactérias benéficas que vivem no seu corpo e ajudam a manter sua saúde e evitar doenças, contribuem na melhora dos sintomas da menopausa em comparação a terapia padrão de reposição hormonal.

Lembre-se: *Probióticos: São bactérias do bem. **Isoflavonas: São substâncias benéficas da soja que dentro do nosso organismo trabalham imitando hormônios. Por isso, na falta de um hormônio, as isoflavonas são reconhecidas pelo organismo como um substituto, provocando a ação necessária.

Procedimentos:

Ao participar deste estudo você deverá vir ao Ambulatório de menopausa do CAISM/UNICAMP em **três consultas** agendadas pela pesquisadora, além de receber **dois telefonemas** em momentos intermediários do estudo, para informar a equipe da pesquisa como você vem se sentindo com o uso do medicamento.

Durante as consultas no Ambulatório de menopausa você deverá:

- Vir 3 vezes ao Ambulatório de menopausa do CAISM. Cada consulta deve demorar aproximadamente 40 minutos;
- Responder questionários aplicados pela pesquisadora, sobre informações pessoais e sintomas da menopausa;
- Realizar coleta de sangue na primeira e na terceira consulta, na quantidade de 10 ml por amostra;
- Trazer em cada consulta uma amostra de urina e uma amostra de fezes, separadas em dois potes coletores que você receberá antecipadamente. Você deve coletar urina e fezes o suficiente para preencher pouco mais da metade do pote coletor;
- Realizar exame de densitometria óssea;
- Realizar exame ginecológico de rotina nas três consultas. Esse exame será realizado por uma médica ginecologista e deve durar aproximadamente 15 minutos; Participando deste estudo você poderá ser alocada no grupo isoflavona, no grupo isoflavona com probióticos ou no grupo hormônios tradicionais. Essa alocação será por meio de sorteio. Durante os 4 meses da pesquisa você não poderá consumir soja ou produtos derivados de soja.

Participando deste estudo você poderá ser alocada no grupo isoflavona, no grupo isoflavona com probióticos ou no grupo hormônios tradicionais, essa alocação será por meio de sorteio.

Desconfortos e riscos:

Você **não** deve participar deste estudo se apresentar alergia ou intolerância a probióticos, se possui contraindicação a uso de terapia de reposição hormonal, em caso de apresentar câncer de mama, doença do fígado ou dos rins, problemas vasculares, hipertensão arterial severa e diabetes descompensado. Os possíveis desconfortos do estudo são coleta de sangue, realização de exame ginecológico, trazer amostras de urina e fezes em cada consulta e disponibilizar tempo para responder aos questionamentos da pesquisa durante as consultas e por telefone. Neste estudo existem riscos associados ao uso de terapia hormonal em mulheres com histórico familiar de doenças cardiovasculares e possibilidade de sangramento vaginal. Naquelas que vierem a usar isoflavonas isoladas não há riscos previsíveis, mas pode haver possível desconforto gastrointestinal (flatulência e aumento na frequência de evacuações) no grupo que receber isoflavonas acrescidas de

probióticos. Para minimizar surgimento de desconfortos e riscos existirá acompanhamento dos exames de sangue e exames ginecológicos com contato frequente entre participantes e pesquisadora.

Benefícios:

Não há benefícios diretos com a participação na pesquisa, mas os resultados deste estudo podem colaborar para o futuro acompanhamento e tratamento de outras mulheres.

Acompanhamento e assistência:

Os pesquisadores colocam-se a disposição para sanar quaisquer dúvidas das participantes da pesquisa pelos telefones (19)3521-4079 ou (19) 9601-2321 e pelo e-mail naice.esm@gmail.com. A participante pode entrar em contato com a equipe de pesquisa, caso necessite de orientação ou assistência, a qualquer momento que julgar necessário. Serão realizadas 3 consultas e dois contatos por telefone, nessas situações as participantes serão reavaliadas, existindo efeitos adversos importantes haverá descontinuação deste indivíduo no estudo e será providenciada assistência adequada a situação, sendo importante que a participante da pesquisa saiba que receberá a assistência integral e imediata, de forma gratuita, oferecida pela equipe de pesquisa, pelo tempo que for necessário em caso de danos decorrentes da pesquisa.

Sigilo e privacidade:

Você tem a garantia de que sua identidade será mantida em sigilo e nenhuma informação será dada a outras pessoas que não façam parte da equipe de pesquisadores. Na divulgação dos resultados desse estudo seu nome não será citado. Os resultados dos seus exames de sangue e ginecológicos farão parte do prontuário para que seu médico tenha acesso durante as consultas. Você tem o direito de desistir de participar em qualquer momento do estudo, sendo que os seus dados coletados até o momento da sua desistência poderão ser utilizados para compor a pesquisa. A decisão por interromper a participação em nada prejudica o seu atendimento no hospital da UNICAMP. **ATENÇÃO: Caso você não possa comparecer a alguma consulta marcada deve reagendar com a pesquisadora o mais rápido possível para que não comprometa seu próprio tratamento e os resultados da pesquisa.**

Ressarcimento e Indenização:

Você tem direito a trazer um acompanhante nas consultas e durante o período do estudo você e seu/sua acompanhante receberão auxílio para custear o transporte na forma de vale transporte e alimentação na forma de vale alimentação. Você terá a garantia ao direito à indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

Armazenamento de MATERIAL BIOLÓGICO: As amostras de urina e fezes que você trará em cada consulta serão armazenadas em Biofreezer no Laboratório de Bioprocessos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, durante o

período do estudo e mais 5 anos após a conclusão do ensaio, para caso haja necessidade de repetir alguma análise. Toda nova pesquisa a ser realizada com o material armazenado será submetida para aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

- Quanto à coleta, o depósito, o armazenamento e a utilização do meu material biológico:

() concordo em participar do presente estudo, porém NÃO AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, devendo o mesmo ser descartado ao final desta pesquisa.

() concordo em participar do presente estudo e AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, sendo necessário meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

Você, ou seu representante legal, a qualquer tempo e sem quaisquer ônus ou prejuízos, pode retirar o consentimento da guarda e utilização do seu material biológico armazenado. O descarte do material armazenado será autorizado nas seguintes situações: Exigência do doador da amostra.

Em caso de falecimento ou condição incapacitante, os direitos sobre o material armazenado deverão ser dados a: _____.(pedir para o participante indicar o nome de uma pessoa a ser contatada).

Contato:

Em caso de dúvidas sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com os pesquisadores: Naice Eleidiane Santana Monteiro, Laboratório de Bioprocessos Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA-UNICAMP), e-mail naice.esm@gmail.com ou telefone (19) 3521-4079, ou com a Dra Adriana Orcesi Pedro, Departamento de Tocoginecologia, CAISM- Unicamp, e-mail aopedro@uol.com.br ou telefone (19) 9601-2321. Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação e sobre questões éticas do estudo, você poderá entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNICAMP das 08:30hs às 11:30hs e das 13:00hs as 17:00hs na Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126; CEP 13083-887 Campinas – SP; telefone (19) 3521-8936 ou (19) 3521-7187; e-mail: cep@fcm.unicamp.br.

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).

O papel do CEP é avaliar e acompanhar os aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos. A Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), tem por objetivo desenvolver a regulamentação sobre proteção dos seres humanos envolvidos nas pesquisas. Desempenha um papel coordenador da rede de Comitês de Ética em Pesquisa (CEPs) das instituições, além de assumir a função de órgão consultor na área de ética em pesquisas.

Consentimento livre e esclarecido:

Após ter recebido esclarecimentos sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar, aceito participar e declaro estar recebendo uma via original deste documento assinada pelo pesquisador e por mim, tendo todas as folhas por nós rubricadas:

Nome do (a) participante: _____

Contato telefônico: _____ e-mail (opcional) _____

_____ Data: ____/____/____.

(Assinatura da participante)

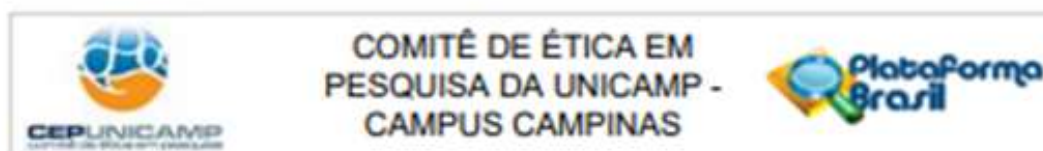
Responsabilidade do Pesquisador:

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma via deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado e pela CONEP, quando pertinente. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante. _____

Data ____/____/____.

(Assinatura do pesquisador)

Anexo 4 - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp



Continuação do Parecer: 1.639.965

Considerações Finais a critério do CEP:

- O sujeito de pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.
- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado.
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.
- Relatórios parciais e final, em formulário próprio do CEP, devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMACOES_BASICAS_DO_P ROJETO_704202.pdf	08/07/2016 11:13:51		Aceito
Outros	CartaRecrutamentoOficial.pdf	08/07/2016 11:12:09	Naice Eleidiane Santana Monteiro	Aceito
Outros	CartaResposta.pdf	08/07/2016 11:11:24	Naice Eleidiane Santana Monteiro	Aceito

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
 UF: SP Município: CAMPINAS
 Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

 CEPUNICAMP Comitê de Ética em Pesquisa	COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS	
--	---	---

Continuação do Parecer: 1.639.965

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLErefeito.pdf	08/07/2016 11:10:10	Naice Eleidiane Santana Monteiro	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoFinalJulho2016.pdf	08/07/2016 11:09:49	Naice Eleidiane Santana Monteiro	Aceito
Outros	IdentidadeFuncional.pdf	04/06/2016 21:40:20	Naice Eleidiane Santana Monteiro	Aceito
Outros	AtestadoMatricula.pdf	04/06/2016 21:39:28	Naice Eleidiane Santana Monteiro	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biorepositório.pdf	04/06/2016 21:37:12	Naice Eleidiane Santana Monteiro	Aceito
Outros	Parecer.pdf	27/04/2016 18:01:38	Naice Eleidiane Santana Monteiro	Aceito
Folha de Rosto	FolhaRosto.pdf	27/04/2016 17:42:29	Naice Eleidiane Santana Monteiro	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 18 de Julho de 2016

Assinado por:
Maria Fernanda Ribeiro Bittar
 (Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126			
Bairro: Barão Geraldo		CEP: 13.083-887	
UF: SP	Município: CAMPINAS		
Telefone: (19)3521-8936	Fax: (19)3521-7187	E-mail: cep@for.unicamp.br	