

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Pró-Reitoria de Pós-graduação e Pesquisa  
Faculdade de Medicina  
Programa de Pós-Graduação em Cardiologia  
e Ciências Cardiovasculares

TERAPIA DE REPOSIÇÃO HORMONAL NÃO ALTERA A  
VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA  
EM MULHERES PÓS-MENOPÁUSICAS

Tese de Doutorado

Autora: Eney Oliveira Fernandes  
Orientador: Prof. Dr. Jorge Pinto Ribeiro  
Co-orientadores: Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Celeste Osório Wender  
Prof. Dr. Ruy Silveira Moraes

Porto Alegre, Dezembro de 2002

*Tudo responde ao chamado da alegria; tudo se reúne onde a vida é um canto.* Esta é a mensagem da nova vida, da nova ordem e dos novos tempos. É o texto áureo do grande Evangelho do esplendor humano. É a verdade central da sublime filosofia da existência que declara que o maior bem é a felicidade e que o céu está neste mundo.

Cristiano D. Larson

A meus pais Heller e Altiva,

Pelo apoio irrestrito em todos os momentos de minha vida.

A meus irmãos Heraldo, Glauca e Daisy,

Pela constante amizade,

Dedico este estudo

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Dr. Jonas Talberg, *in memoriam*, pelos ensinamentos sempre oportunos e a constante confiança no meu êxito profissional.

Ao Prof. Dr. Jorge Pinto Ribeiro, meu orientador, pela firmeza de propósitos, pela confiança no êxito deste trabalho e pelo apoio e orientação, decisivos para a conclusão deste estudo.

Ao Prof. Dr. Ruy Silveira Moraes, co-orientador deste trabalho, pelo apoio técnico e científico e pela efetiva participação na elaboração e na execução deste estudo.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Celeste Osório Wender, co-orientadora deste trabalho, pelo apoio técnico e científico e pela efetiva participação na execução deste estudo.

Ao físico Elton Ferlin, pelo apoio técnico e científico e pela efetiva participação na execução deste estudo.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nadine Clausell, pelo apoio e incentivo constantes.

Ao Programa de Pós-Graduação em Cardiologia e Ciências Cardiovasculares da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela oportunidade de aperfeiçoamento.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Cardiologia e Ciências Cardiovasculares da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelos ensinamentos, pelo incentivo e pela amizade.

Às funcionárias do Serviço de Cardiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo apoio para a realização dos exames cardiológicos e pela amizade.

Aos colegas do Serviço de Cardiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo apoio, amizade e solidariedade.

Ao Ambulatório de Climatério do Serviço de Ginecologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo apoio para a realização dos exames ginecológicos.

Ao Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo apoio.

Ao Serviço de Radiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo apoio.

Ao Grupo de Pesquisa e Pós-graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo suporte financeiro e pela consultoria técnica para a realização deste estudo.

À Universidade Federal do Rio de Janeiro, pela oportunidade de aperfeiçoamento profissional .

À Faculdade de Educação Física da Fundação Universidade de Brasília, pelo apoio para o término deste trabalho.

Enfim, a todos os amigos e familiares, pelo apoio, pela dedicação e pela amizade, que tornaram possível a realização e a conclusão deste estudo.

## Sumário

<u>ABREVIATURAS</u> .....	I
<u>LISTA DE TABELAS</u> .....	II
<u>LISTA DE FIGURAS</u> .....	III
<u>RESUMO</u> .....	IV
<u>ABSTRACT</u> .....	VI
<u>INTRODUÇÃO</u> .....	1
<u>OBJETIVOS</u> .....	3
<u>HIPÓTESE</u> .....	3
<u>OBJETIVOS</u> .....	3
<u>MATERIAL E MÉTODOS</u> .....	4
<u>PARTICIPANTES</u> .....	4
<u>INTERVENÇÃO</u> .....	5
<u>ANÁLISES LABORATORIAIS</u> .....	5
<u>ECG DE 24 HORAS E ANÁLISE DA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA</u> .....	6
<u>ANÁLISE ESTATÍSTICA</u> .....	8
<u>RESULTADOS</u> .....	10
<u>VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA</u> .....	19
<u>DISCUSSÃO</u> .....	22
<u>TERAPIA DE REPOSIÇÃO HORMONAL E VFC</u> .....	22
<u>REPOSIÇÃO HORMONAL E LIPÍDIOS</u> .....	24
<u>LIPÍDIOS E VFC</u> .....	25
<u>IMPLICAÇÕES CLÍNICAS</u> .....	25
<u>CONCLUSÕES</u> .....	27
<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u> .....	28
<u>ANEXOS</u> .....	35
<u>ANEXO 1 – ÍNDICE MENOPAUSAL DE KUPPERMAN</u> .....	35
<u>ANEXO 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO</u> .....	36
<u>ARTIGO EM INGLÊS</u> .....	37
<u>HORMONE REPLACEMENT THERAPY DOES NOT AFFECT HEART RATE VARIABILITY IN POSTMENOPAUSAL WOMEN</u> .....	38
<u>ABSTRACT</u> .....	39
<u>INTRODUCTION</u> .....	40
<u>METHODS</u> .....	42
<u>RESULTS</u> .....	48

<u>DISCUSSION</u> .....	51
<u>CONCLUSION</u> .....	54
<u>REFERENCES</u> .....	56

## Abreviaturas

DAC	→ doença arterial coronariana
DCV	→ doenças cardiovasculares
ECG	→ eletrocardiograma
FC	→ frequência cardíaca
IMC	→ índice de massa corporal
MN	→ $P_1 \times P_2 \times P_3 \times 10^{-3}$
$P_1$	→ inclinação do pico de maior concentração de pontos.
$P_2$	→ maior eixo longitudinal
$P_3$	→ maior eixo transversal
pNN50	→ porcentagem das diferenças sucessivas entre os intervalos RR adjacentes normais maiores do que 50 ms
rMSSD	→ raiz quadrada da média das diferenças sucessivas ao quadrado dos intervalos RR
RRmed	→ média de todos os intervalos RR normais
SDANNi	→ desvio padrão da média dos intervalos RR normais, medida em segmentos de 5 min
SDNN	→ desvio-padrão de todos os intervalos RR normais
TRE	→ terapia de reposição estrogênica
TRH	→ terapia de reposição hormonal combinada
VFC	→ variabilidade da frequência cardíaca

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Características clínicas, demográficas e laboratoriais das mulheres pós-menopáusicas pré-intervenção .....	<b>11</b>
<b>Tabela 2.</b> Características clínicas, demográficas e laboratoriais das mulheres pós-menopáusicas pré e pós-intervenção .....	<b>14</b>
<b>Tabela 3.</b> Índices da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) nas mulheres pós-menopáusicas, pré e pós-intervenção .....	<b>20</b>
<b>Tabela 4.</b> Coeficientes de correlação (Pearson) dos índices no domínio do tempo e dos índices derivados do mapa de retorno tridimensional .....	<b>21</b>



## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Triglicerídios pré e pós-intervenção nos três grupos .....	<b>15</b>
<b>Figura 2.</b> Colesterol-LDL pré e pós-intervenção nos três grupos .....	<b>16</b>
<b>Figura 3.</b> Colesterol-HDL pré e pós-intervenção nos três grupos .....	<b>17</b>
<b>Figura 4.</b> Estradiol pré e pós-intervenção nos três grupos .....	<b>18</b>

## RESUMO

**INTRODUÇÃO.** Mulheres pós-menopáusicas apresentam maior risco de desenvolvimento de doença arterial coronariana. Estudos observacionais demonstraram que a terapia de reposição hormonal produz efeitos benéficos no perfil lipídico e na modulação autonômica cardíaca. O aumento da variabilidade da frequência cardíaca (VFC), até então atribuído à reposição hormonal, não foi testado em estudos randomizados, placebo-controlados, delineados para permitir a comparação entre as duas formas mais utilizadas de reposição hormonal. A VFC de 24 horas calculada pelo método não linear Mapa de Retorno Tridimensional permite avaliar tanto a modulação vagal como a simpática.

**OBJETIVOS** Avaliar a modulação autonômica cardíaca de mulheres pós-menopáusicas através da análise da VFC no domínio do tempo e dos índices do Mapa de Retorno Tridimensional no ECG de 24 horas. Testar a hipótese de que a reposição hormonal contínua, seja com estradiol isolado (TRE), seja com estradiol associado à noretisterona (TRH), por um período de três meses, aumenta a VFC nessas mulheres.

**MÉTODOS** Quarenta mulheres pós-menopáusicas (46 a 63 anos; média =  $54,6 \pm 4,2$ ) foram randomizadas para um dos três tratamentos, de forma contínua: TRH, estrogênio terapia (TRE) ou placebo, por três meses consecutivos. Previamente, todas as mulheres foram submetidas a exames clínico, ginecológico e laboratorial (glicose, estradiol, HDL, LDL, triglicéridios; mamografia e ultrassonografia transvaginal). O ECG de 24 horas foi gravado em cada paciente, antes e após o tratamento, para calcular os índices da VFC.

**RESULTADOS** Não houve diferença estatisticamente significativa entre os três grupos, após 3 meses de tratamento, nos índices da VFC e do Mapa de Retorno

Tridimensional. A TRH diferiu da TRE apenas quanto ao perfil lipídico. A associação com a noretisterona provocou uma redução de 12,4 % no HDL ( $p = 0,008$ ).

**CONCLUSÃO** Em mulheres pós-menopáusicas, a terapia de reposição hormonal contínua com estradiol, ou com estradiol associado à noretisterona, por um período de 3 meses, não altera a modulação autonômica cardíaca avaliada pela VFC.

**Palavras chave:** sistema nervoso autônomo, variabilidade da frequência cardíaca, terapia de reposição hormonal, menopausa

## ABSTRACT

**Background:** Postmenopausal women are at greater risk of coronary heart disease. Observational studies have demonstrated that hormone replacement therapy (HRT) improves lipid profile and cardiac autonomic modulation. The cardioprotective effect attributed to HRT has not been tested in randomized, placebo-controlled trials to compare the two most frequently used regimens. This study evaluates cardiac autonomic modulation in postmenopausal women using time domain indices of heart rate variability (HRV) and indices derived from the three-dimensional return map, and investigates whether continuous HRT for three months, either with estradiol alone (ERT) or with estradiol and norethisterone (HRT), increases HRV in postmenopausal women.

**Methods:** Forty postmenopausal women aged 46 to 63 years were consecutively and randomly assigned to one of three treatment groups: HRT, ERT, or placebo. For all women, clinical, gynecological and laboratory data (glucose, estradiol, HDL, LDL, triglycerides, mammography and transvaginal sonography) were collected. Patients underwent 24-h ECG before and after the treatment to evaluate HRV indices.

**Results:** Time domain indices of HRV as well as indices derived from the three-dimensional return map presented no significant changes after interventions. The only significant difference between HRT and ERT groups was in lipid profile. HDL cholesterol levels decreased 12.4% ( $p = 0.008$ ) for women who used HRT.

**Conclusion:** In postmenopausal women, continuous hormone replacement therapy with estradiol or estradiol with norethisterone for 3 months does not affect cardiac autonomic modulation evaluated by HRV.

**Keywords:** Autonomic nervous system, heart rate variability, hormone replacement therapy, menopause

## Introdução

Mulheres pós-menopáusicas têm maior risco de desenvolvimento de doença arterial coronariana (DAC), principal causa de mortalidade nesta etapa da vida.<sup>1</sup> A redução dos níveis de estrogênio na menopausa tem sido apontada como a principal causa desse risco cardiovascular aumentado.<sup>2</sup> Na última década, vários estudos observacionais apontaram o impacto favorável da terapia de reposição hormonal sobre os fatores de risco coronariano,<sup>3</sup> sobre a mortalidade cardiovascular<sup>4</sup> e sobre a modulação autonômica cardíaca.<sup>5,6,7,8</sup>

As flutuações da frequência cardíaca (FC) batimento a batimento resultam da interação simpato-vagal e a variabilidade da frequência cardíaca traduz a regulação autonômica do coração, permitindo o estudo não invasivo do sistema nervoso autônomo (SNA).<sup>9</sup> Além disso, a elevação da frequência cardíaca está associada a um aumento da mortalidade cardiovascular.<sup>10</sup> A análise da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) constitui-se num método confiável e reprodutível<sup>11</sup> para avaliar a função autonômica cardíaca de indivíduos saudáveis<sup>12</sup> e de portadores de DAC<sup>13</sup>, sendo empregada na estratificação de risco destes pacientes.<sup>14</sup>

Estudos observacionais demonstraram um aumento da VFC em mulheres pós-menopáusicas em uso de reposição hormonal com estrógenos, traduzido por um predomínio parassimpático na regulação autonômica cardíaca, sugerindo-se que esta terapia teria efeitos cardioprotetores<sup>6,15,16</sup>. Contudo, alguns efeitos podem ser minimizados ou anulados pela adição de progestágenos, dependendo do tipo e da dose empregada<sup>17,18,19,20</sup>. O quadro atual ainda é controverso quanto aos efeitos da terapia de reposição hormonal sobre a regulação do sistema autonômico cardíaco de mulheres pós-menopáusicas<sup>6,7,8,16,21,22</sup>. Além disso, esses efeitos parecem estar relacionados ao tipo,

à dosagem, à via e ao tempo de utilização, principalmente no que diz respeito aos progestágenos<sup>18,23,24,25,26,27</sup>.

Portanto, neste estudo clínico randomizado, duplo cego, placebo-controlado, utilizamos a forma de reposição hormonal contínua amplamente empregada em países europeus, associando a noretisterona ao estradiol para comparação com a terapia estrogênica isolada, em mulheres pós-menopáusicas, por um período de três meses, com o intuito de determinar se as duas formas de terapia ou apenas uma delas promoveria um aumento da variabilidade da frequência cardíaca, analisada no ECG de 24 horas, através de seus índices no domínio do tempo e dos Mapas de Retorno Tridimensionais.

## Objetivos

### Hipótese

- A terapia de reposição hormonal provoca um aumento dos índices da VFC, calculada no ECG de 24 h, em mulheres pós-menopáusicas.

### Objetivos

Com este questionamento em mente, estabelecemos os seguintes objetivos:

- 1- Objetivo Geral: Avaliar a função autonômica cardíaca de mulheres pós-menopáusicas, empregando os índices no domínio do tempo da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e a análise quantitativa através do Mapa de Retorno Tridimensional.
- 2- Objetivo Específico: Testar a hipótese de que a terapia de reposição hormonal (TRH), instituída por um período de três meses, aumenta a variabilidade da frequência cardíaca (VFC) em mulheres pós-menopáusicas.

Optou-se por um delineamento experimental capaz de responder estas questões: um ensaio clínico randomizado, placebo-controlado, duplo-cego, prospectivo.

## Material e Métodos

### Participantes

Foram recrutadas, por meio da mídia escrita, falada e televisiva, mulheres na faixa etária entre os 45 e 65 anos de idade, que, após contato telefônico e pessoal foram encaminhadas para seleção final no Ambulatório de Climatério do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Foram selecionadas 45 mulheres sadias, que se encontravam no período pós-menopausa e que não faziam uso de TRH há pelo menos três meses. O período pós-menopausa foi definido como a ausência de menstruação há, no mínimo, doze meses, com ou sem a presença de fogachos ou outros sintomas associados.

Após a anamnese, para investigação de fatores de risco pessoais e familiares e obtenção do índice de Kupperman<sup>28</sup> (Anexo 1), todas as participantes foram submetidas a exame clínico, ginecológico e aos seguintes exames: dosagens de glicose, colesterol-LDL, colesterol-HDL, triglicerídios e estradiol; ECG em repouso; mamografia; ultrassonografia transvaginal; e eletrocardiografia de longa duração (Holter de 24 horas).

As pacientes que preenchiam os critérios de inclusão acima descritos e que não apresentavam nenhum dos critérios de exclusão assinavam um termo de consentimento informado (Anexo 2). Os critérios de exclusão foram: (1) presença de hipertensão arterial sistêmica, de diabetes melito, de depressão e de cardiopatia de qualquer natureza; (2) uso rotineiro de medicamentos com ação cardiovascular; (3) atividade física regular com objetivo competitivo; (4) presença de câncer de mama, câncer de endométrio, hepatopatia aguda ou fenômenos trombo-embólicos prévios; (5) resultados das mamografias e/ou das ultrassonografias transvaginais fora dos limites da normalidade; (6) glicemia de jejum maior que 105 mg/dl.



## **Intervenção**

As participantes foram randomicamente alocadas para cada um dos três grupos de tratamento propostos: o grupo TRH contínua (2 mg de estradiol associado a 1,0 mg de acetato de noretisterona); o grupo TRE (2 mg de estradiol); e o grupo placebo, e receberam a medicação correspondente, para uso diário, no período de um mês. Tanto as embalagens quanto o aspecto dos comprimidos não diferiam entre as três formas de terapia. No sentido de verificar o uso regular da medicação durante os três meses consecutivos de observação, as mulheres retornavam mensalmente ao Ambulatório de Climatério, para controle clínico e ginecológico, obtendo-se o índice de Kupperman<sup>28</sup> para cada etapa. Além de relatar eventuais sintomas no período, elas devolviam as embalagens vazias e recebiam o equivalente para mais um mês de terapia, de acordo com o grupo determinado na randomização. Todos os pesquisadores envolvidos desconheciam o tipo de terapia até o encerramento da coleta de dados. Durante o período de observação clínica, as mulheres receberam a orientação para não utilizarem qualquer outra medicação, salvo resolução médica em contrário.

## **Análises Laboratoriais**

Todas as análises laboratoriais foram efetuadas com as pacientes em jejum de 12 horas no Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. O estradiol foi dosado no equipamento Immulite, através do método da quimioluminescência, com o kit Immulite Estradiol DPC.<sup>29</sup> A glicose foi dosada no equipamento Mega Bayer, através do método Glico-DH, com o kit Glucose Hexokinase II (GLU H II) Bayer, Advia 1650.<sup>30</sup> Os lipídios foram dosados no equipamento Mega Bayer, com os kits: Sera-Pak Cholesterol, Bayer,<sup>31</sup> HDL-C Immuno FS, Diasys,<sup>32</sup> através de método direto por inibição seletiva, e Sera-Pak Tryglicerides (fast color),

Bayer, através do método GPO-PAP.<sup>33</sup> O colesterol LDL teve o seu valor calculado pela equação de Friedewald.<sup>34</sup> As dosagens de estradiol, colesterol-LDL, colesterol-HDL e triglicéridios também foram realizadas no final da intervenção.

### **Eletrocardiograma de 24 horas e análise da variabilidade da frequência cardíaca**

A gravação do Holter de 24 horas foi realizada, em todas as mulheres, até duas semanas antes do início da intervenção e na última semana de terapia. A instalação do gravador ocorreu sempre no período matutino, sendo precedida de orientações fornecidas por equipe treinada. A retirada do gravador ocorreu, invariavelmente, no dia seguinte, ao completar 24 horas de gravação.

Os registros eletrocardiográficos foram analisados no aparelho MARS Series 8500 (Marquette Medical Systems, Milwaukee, EUA). Esse analisador permite separar os batimentos normais dos artefatos e ectopias, montando uma série temporal, somente de intervalos RR normais, com uma resolução de 8 ms. Os exames foram avaliados por um observador independente, que desconhecia o tipo de tratamento empregado até o término da coleta de dados. O emprego da análise da VFC através da eletrocardiografia dinâmica (Holter de 24 horas) para avaliar a função autonômica cardíaca da mulher pós-menopáusia é seguro, confiável e reprodutível, permitindo avaliar evolutivamente os efeitos da reposição hormonal nestas mulheres.<sup>6,8,16,35</sup>

**Métodos no domínio do tempo.** Os índices derivados desta metodologia levam em consideração o fator tempo e avaliam o comportamento das oscilações cardiovasculares por meio de cálculos da dispersão em torno da média da frequência cardíaca, fornecendo informações relevantes sobre a regulação autonômica cardíaca.<sup>36,37,38,39</sup>

Foram analisados os seguintes índices da VFC, de acordo com as recomendações da Sociedade Européia de Cardiologia e a Sociedade Norte Americana

de Eletrofisiologia e Marcapasso<sup>40</sup>: desvio padrão de todos os intervalos RR normais do ECG de 24 h (SDNN); desvio padrão da média dos intervalos RR normais, medida em segmentos de 5 min do ECG de 24 h (SDANNi); raiz quadrada da média das diferenças sucessivas ao quadrado, entre os intervalos RR adjacentes normais do ECG de 24 h (rMSSD); e porcentagem das diferenças sucessivas entre os intervalos RR adjacentes normais maiores que 50 ms, computada no ECG de 24 h (pNN50).

**Mapa de Retorno Tridimensional.** Como as oscilações da frequência cardíaca apresentam comportamento dinâmico não-linear, os métodos lineares, como a análise espectral e os métodos no domínio do tempo não são capazes de descrever a dinâmica do sistema cardiovascular.<sup>41,42</sup> Os mapas de retorno habitualmente empregados apresentam limitações na avaliação de séries temporais longas, como é o caso dos registros eletrocardiográficos de 24 horas. Assim, optamos por utilizar um novo método, denominado mapa de retorno tridimensional, desenvolvido em nosso serviço e empregado, previamente, na avaliação de indivíduos saudáveis, de atletas e de pacientes cardíacos, chagásicos e diabéticos.<sup>11,43,44</sup>

Os Mapas de Retorno Tridimensionais foram construídos plotando  $RR_n$  versus  $[(RR_{n+1})-(RR_n)]$  versus densidade (ou número de contagens). Todos os intervalos RR normais que ocorreram durante o período de tempo analisado são plotados no eixo do x, contra a diferença entre intervalos RR adjacentes, no eixo do y, com uma resolução de 7,2 milissegundos. Sempre que ocorreu sobreposição de pontos, o número de pontos sobrepostos foi expresso no eixo do z, normalizado pela densidade máxima de pontos. Foi desenvolvido um conjunto de índices para quantificar as imagens tridimensionais denominados de  $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_3$  e MN.  $P_1$  é inversamente proporcional à inclinação entre 10% e 90% da máxima densidade de pontos, calculada no plano que intercepta a distribuição na sua máxima concentração de pontos, perpendicular a  $RR_n$ .  $P_1$  foi

expresso como o produto de 100 menos o dobro da inclinação. Para calcular  $P_2$  e  $P_3$ , as imagens tridimensionais foram representadas em 10 curvas de nível igualmente espaçadas, entre a máxima concentração de pontos e a mínima densidade de 10 contagens, que define o contorno externo das curvas de nível.  $P_2$  é o máximo comprimento longitudinal e  $P_3$  a máxima largura transversal. MN é um índice geral calculado pelo produto de  $P_1 \cdot P_2 \cdot P_3 \cdot 10^{-3}$ . Para representar os índices do mapa de retorno tridimensional foi utilizada uma escala arbitrária. Foram analisados os índices derivados do mapa de retorno tridimensional:  $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_3$ , MN, segundo metodologia de trabalho do nosso grupo.<sup>11</sup>

### **Considerações Éticas**

O delineamento e o projeto deste estudo clínico randomizado, duplo-cego, placebo-controlado foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética do Grupo de Pesquisa e Pós-graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GPPG/HCPA). Como se tratava de estudo que envolvia intervenção farmacológica, todas as mulheres assinaram um termo de consentimento informado (Anexo 2).

### **Análise Estatística**

Os dados obtidos nas mulheres pós-menopáusicas foram tabulados em uma planilha eletrônica (Microsoft Excel) e submetidos a análise de variância para dados repetidos de três entradas (ANOVA), para comparação entre as médias amostrais independentes e casuais de todas as variáveis extraídas dos três grupos (TRH, TRE e placebo) e que apresentaram distribuição normal. Neste estudo, utilizou-se o programa SPSS versão 8.0 para efetuar os cálculos estatísticos.

O tamanho da amostra baseou-se na análise de estudos recentes,<sup>6,8,22</sup> estimando-se a inclusão de 12 mulheres em cada grupo, para demonstrar as diferenças nos índices da VFC com alfa igual a 0,05 e poder estatístico de 90 %.

As variáveis triglicérides, pNN50 e P<sub>1</sub>, que não apresentaram distribuição normal pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk, sofreram transformação logarítmica prévia. As variáveis colesterol-HDL, colesterol-LDL e triglicéridios foram submetidas ao teste de Tukey para comparações múltiplas. A análise de covariância foi realizada para a variável colesterol-HDL. Os testes de correlação de Pearson e de Spearman foram utilizados para verificar a existência de associações entre as variáveis analisadas. O nível de significância estatística foi um valor de “p” menor do que 0,05 (p < 0,05).

## Resultados

Foram computados para análise os dados obtidos em 40 das 45 mulheres pós-menopáusicas inicialmente randomizadas, que ficaram assim distribuídas: 13 no grupo TRH contínua, 14 no grupo TRE e 13 no grupo placebo. Das 5 perdas, 3 pacientes abandonaram o tratamento, apesar de não ser detectado efeito adverso, e, portanto, não se submeteram à gravação final do Holter. As demais, apesar de concluírem a terapia, não tiveram seus dados incluídos por duas razões: uma apresentou um percentual inaceitável de arritmias (extra-sístoles supraventriculares freqüentes isoladas e em salvas, taquicardia supraventricular, correspondendo a 38 % dos batimentos) e o exame final de outra paciente mostrou-se tecnicamente inadequado.

As características clínicas, demográficas e laboratoriais das mulheres pós-menopáusicas pré-intervenção, por grupo de tratamento, estão contidas na Tabela 1. Após a randomização, os grupos mostraram-se homogêneos, não havendo diferenças estatisticamente significativas quanto à idade, ao peso, à altura, ao índice de massa corporal (IMC), à pressão arterial sistêmica e aos níveis séricos de glicose, estradiol, triglicerídios (TRG) e colesterol-LDL (Col-LDL).

A idade variou entre 46 e 63 anos. O IMC revelou sobrepeso em todos os grupos. Os níveis pressóricos revelaram valores limítrofes da normalidade. Nas dosagens sanguíneas, a glicemia em jejum manteve-se dentro da normalidade, enquanto os níveis séricos dos lipídios revelaram hiperlipidemia em todos os grupos. A variável Col-HDL mostrou-se significativamente diferente entre os grupos pré-intervenção, sendo maior no grupo TRE. As mulheres fumantes distribuíram-se uniformemente nos três grupos, não havendo diferença significativa entre os percentuais.

**Tabela 1.** Características clínicas, demográficas e laboratoriais das mulheres pós-menopáusicas, pré-intervenção (média  $\pm$  DP).

	<b>TRH (n = 13)</b>	<b>TRE (n = 14)</b>	<b>Placebo (n = 13)</b>	<b>p</b>
<b>Idade (anos)</b>	54 $\pm$ 4	55 $\pm$ 4	55 $\pm$ 5	0,88
<b>IMC (kg.m<sup>-2</sup>)</b>	27 $\pm$ 4	27 $\pm$ 5	28 $\pm$ 5	0,93
<b>PAs (mmHg)</b>	128 $\pm$ 14	132 $\pm$ 14	131 $\pm$ 12	0,74
<b>PAd (mmHg)</b>	80 $\pm$ 8	80 $\pm$ 7	84 $\pm$ 7	0,38
<b>FC (bpm)</b>	71 $\pm$ 8	71 $\pm$ 8	69 $\pm$ 9	0,69
<b>Glicose (mg/dl)</b>	89 $\pm$ 11	86 $\pm$ 8	87 $\pm$ 10	0,68
<b>Col-LDL (mg/dl)</b>	161 $\pm$ 48	149 $\pm$ 32	161 $\pm$ 50	0,71
<b>Col-HDL (mg/dl)</b>	54 $\pm$ 14	66 $\pm$ 14	56 $\pm$ 12	0,03*
<b>TRG (mg/dl)</b>	134 $\pm$ 62	117 $\pm$ 43	123 $\pm$ 50	0,69
<b>Estradiol (pg/dl)</b>	30 $\pm$ 13	29 $\pm$ 9	27 $\pm$ 11	0,78
<b>Fumantes (%)</b>	33	35	33	0,38
<b>Kupperman</b>	14 $\pm$ 11	12 $\pm$ 8	19 $\pm$ 10	0,22
<b>RRmed</b>	739 $\pm$ 51	742 $\pm$ 51	766 $\pm$ 78	0,46
<b>SDNN</b>	133 $\pm$ 22	133 $\pm$ 29	141 $\pm$ 24	0,67
<b>SDANNi</b>	125 $\pm$ 23	123 $\pm$ 28	129 $\pm$ 26	0,86
<b>rMSSD</b>	22 $\pm$ 6	22 $\pm$ 6	24 $\pm$ 7	0,61
<b>pNN50</b>	3,0 (1,7;5,1)	2,7 (1,6;4,6)	3,8 (2,2;6,6)	0,63
<b>P<sub>1</sub></b>	57,6 (54,3;61,1)	59,2 (56,0;62,7)	58,6 (55,3;62,2)	0,79
<b>P<sub>2</sub></b>	78 $\pm$ 11	76 $\pm$ 12	79 $\pm$ 11	0,79
<b>P<sub>3</sub></b>	93 $\pm$ 20	89 $\pm$ 19	93 $\pm$ 16	0,81
<b>MN</b>	416 $\pm$ 104	415 $\pm$ 158	435 $\pm$ 120	0,90

TRH: terapia de reposição contínua com estradiol e noretisterona. TRE: terapia de reposição contínua com estradiol. IMC: índice de massa corporal. PAs: pressão arterial sistólica. PAd: pressão arterial diastólica. FC: frequência cardíaca. Col-LDL: colesterol LDL. Col-HDL: colesterol HDL. TRG: triglicerídios. Kupperman: Índice Menopausal de Kupperman. Valores expressos em milissegundos, como média  $\pm$  desvio padrão, para RRmed, SDNN, SDANNi e rMSSD, e como média geométrica e intervalos de confiança (IC 95%) para pNN50. P<sub>2</sub> e P<sub>3</sub>: valores expressos em milissegundos, como média  $\pm$  desvio padrão. P<sub>1</sub> e MN: valores expressos em unidades arbitrárias, como média  $\pm$  desvio padrão para MN e média geométrica e IC 95% para P<sub>1</sub>.

\*p = 0,03 após análise de covariância. Nível de significância estatística: p < 0,05

O Índice Menopausal de Kupperman, obtido para avaliação da sintomatologia, não evidenciou diferenças entre os grupos tanto na condição pré-intervenção quanto após a terapia, possivelmente devido ao fato das pacientes mostrarem-se, previamente, pouco sintomáticas.

Os índices da VFC no domínio do tempo e dos Mapas de Retorno Tridimensionais foram semelhantes nos três grupos pré-intervenção. Os valores médios obtidos estavam dentro da faixa da normalidade para a idade.

Na Tabela 2 encontram-se as variáveis clínicas, demográficas e laboratoriais pré e pós-intervenção nos três grupos. A frequência cardíaca (FC), os níveis pressóricos e o índice de massa corporal não sofreram alterações significativas com a terapia.

Quanto ao perfil lipídico, os triglicerídios não sofreram alterações significativas (Figura 1), enquanto a variação do Col-LDL associada à intervenção apresentou significância limítrofe ( $p = 0,05$ ) (Figura 2). O efeito da terapia sobre o Col-HDL foi significativo quando se comparou os três grupos pré e pós-intervenção ( $p = 0,004$ ). No grupo TRE observou-se um aumento significativo do Col-HDL, enquanto no grupo TRH ocorreu uma diminuição significativa dessa variável (Figura 3). A variável delta-HDL, ou seja, a diferença percentual entre as situações pré e pós-intervenção, apresentou comportamento semelhante ( $p = 0,008$ ). O teste de Tukey para comparações múltiplas mostrou diferença entre o grupo TRE e o grupo TRH ( $p = 0,03$ ) e entre este e o placebo ( $p = 0,01$ ). A análise de covariância, tendo como covariável o col-HDL pré-intervenção, detectou diferença significativa entre os grupos TRH e TRE ( $p = 0,001$ ) e entre TRH e placebo ( $p = 0,002$ ). Após sofrer transformação logarítmica, a variável TRG não se mostrou significativamente diferente entre os grupos (ANOVA e teste de Tukey para comparações múltiplas). Não se demonstraram associações significativas entre os lipídios e os índices da VFC e do Mapa de Retorno Tridimensional.



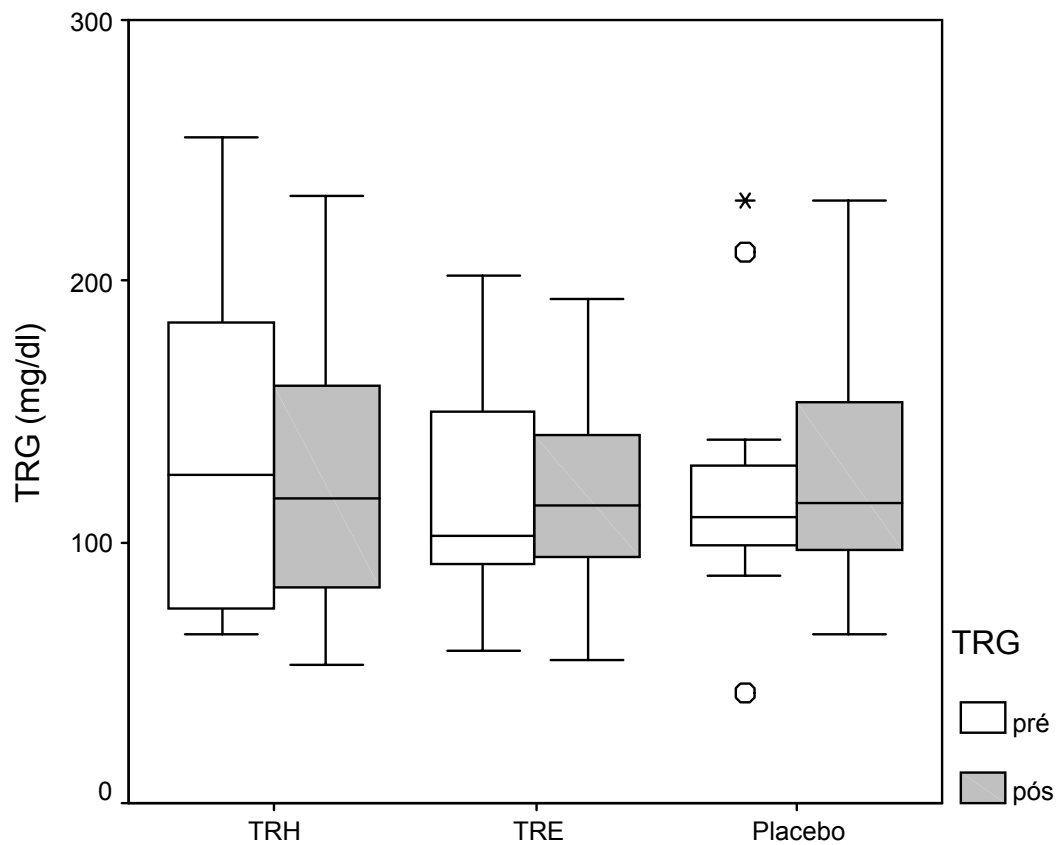
O estradiol aumentou significativamente com a intervenção nos grupos TRH e TRE ( $p = 0,001$ ) (Figura 4). Esse aumento não se associou a nenhum dos índices da VFC, mas detectou-se uma correlação inversa fraca entre o estradiol e o índice  $P_1$  do mapa de retorno tridimensional ( $r = 0,40$ ;  $p = 0,01$ ).

**Tabela 2.** Características clínicas, demográficas e laboratoriais das mulheres pós-menopáusicas, pré e pós-intervenção (M±DP).

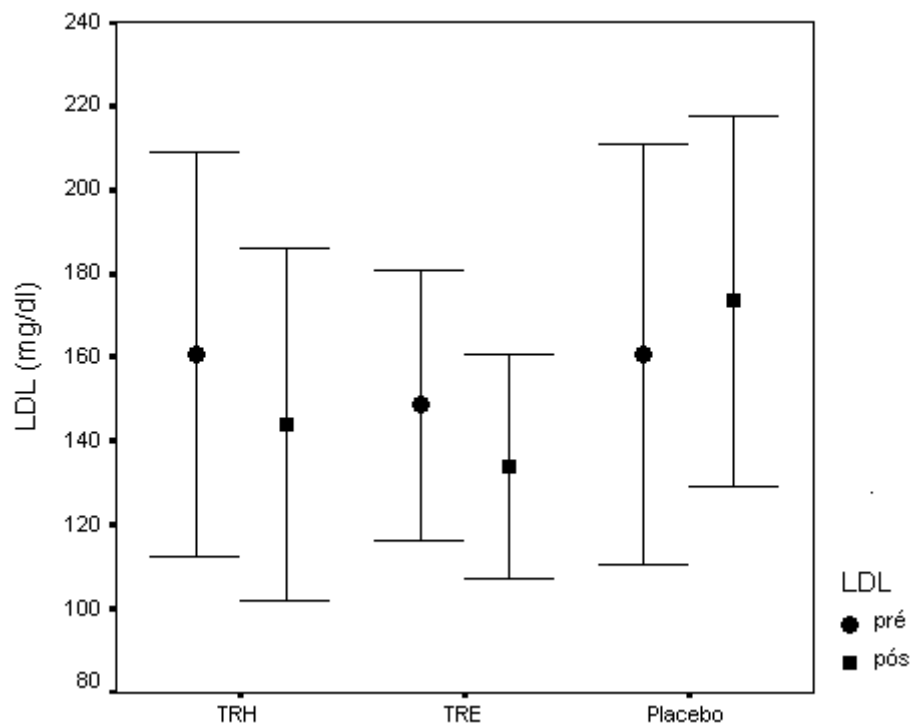
	<b>TRH (n = 13)</b>	<b>TRE (n = 14)</b>	<b>Placebo (n = 13)</b>	<b>p*</b>	<b>p**</b>	<b>p***</b>
<b>IMC (kg.m<sup>-2</sup>)</b>						
pré	27±4	27±5	28±5	0,94	0,92	0,86
pós	27±3	27±5	27±5			
<b>PAs (mmHg)</b>						
pré	128±14	132±14	131±12	0,94	0,43	0,28
pós	128±25	121±12	125±21			
<b>PAd (mmHg)</b>						
pré	80±8	80±7	84±7	0,91	0,001	0,43
pós	76±15	75±10	74±12			
<b>FC (bpm)</b>						
pré	71±8	71±8	69±9	0,88	0,97	0,66
pós	70±8	70±7	70±9			
<b>Col-LDL (mg/dl)</b>						
pré	161±48	149±32	167±46	0,17	0,04	0,05
pós	144±42	134±27	173±44			
<b>Col-HDL (mg/dl)</b>						
pré	54±14	66±14	56±12	0,002	0,90	0,004
pós	46±8	70±17	59±13			
<b>TRG (mg/dl)</b>						
pré	133±65	117±43	125±53	0,94	0,92	0,70
pós	123±56	119±38	130±54			
<b>Estradiol (pg/dl)</b>						
pré	30±13	29±9	27±11	<0,001	<0,001	0,001
pós	105±48	129±74	37±18			

TRH: terapia de reposição contínua com estradiol e noretisterona. TRE: terapia de reposição contínua com estradiol. IMC: índice de massa corporal. PAs: pressão arterial sistólica. PAd: pressão arterial diastólica. FC: frequência cardíaca. Col-LDL: colesterol LDL. Col-HDL: colesterol HDL. TRG: triglicerídios. A variável TRG sofreu transformação logarítmica.

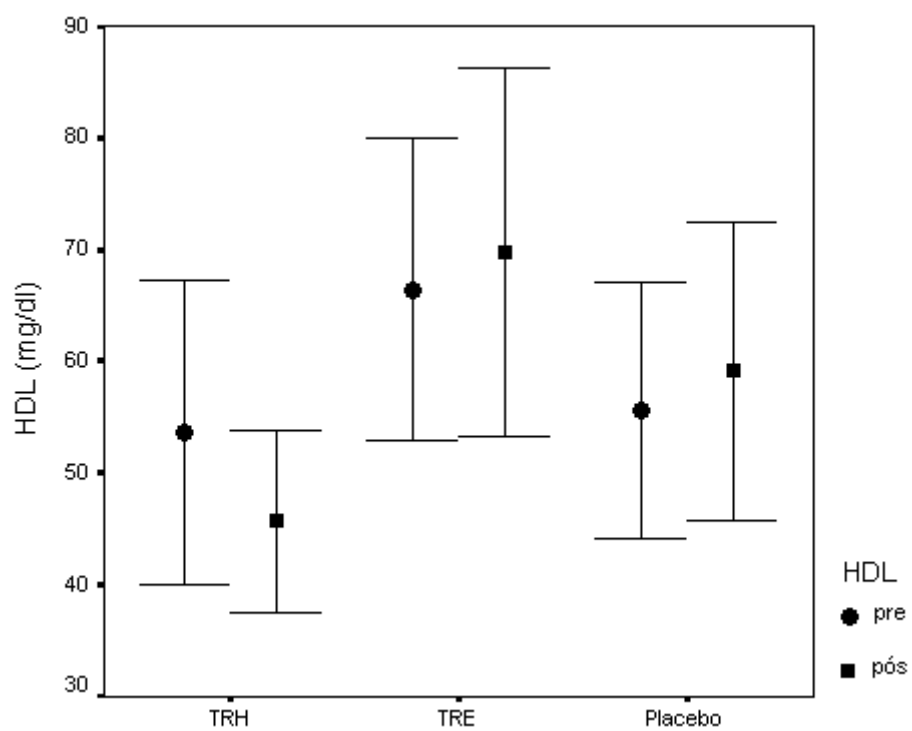
p\*: efeito grupo; p\*\*: intervenção; p\*\*\* : interação. Nível de significância estatística: p < 0,05



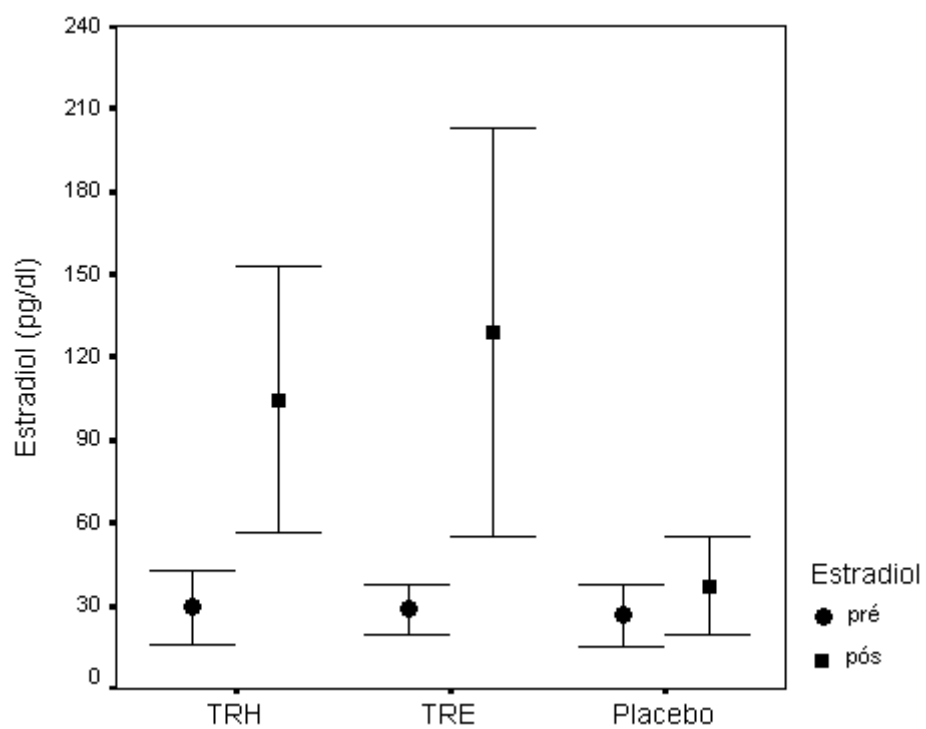
**Figura 1.** Diagramas de caixa de triglicerídeos (TRG) nos 3 grupos estudados: TRH, TRE e placebo, nas condições pré e pós-intervenção (Linha central: Mediana; limites das caixas: percentil 25/75; barras: extremos; círculo e asterisco indicam *outliers*). TRG: triglicerídios. TRH: terapia de reposição contínua com estradiol e noretisterona. TRE: terapia de reposição contínua com estradiol.



**Figura 2.** Col-LDL (LDL) nos 3 grupos estudados: TRH, TRE e placebo, nas condições pré e pós-intervenção (M±DP). Col-LDL: colesterol LDL. TRH: terapia de reposição contínua com estradiol e noretisterona. TRE: terapia de reposição contínua com estradiol.



**Figura 3.** Col-HDL (HDL) nos 3 grupos estudados: TRH, TRE e placebo, nas condições pré e pós-intervenção (M±DP). Col-HDL: colesterol HDL. TRH: terapia de reposição contínua com estradiol e noretisterona. TRE: terapia de reposição contínua com estradiol.



**Figura 4.** Estradiol nos 3 grupos estudados: TRH, TRE e placebo, nas condições pré e pós-intervenção (M±DP). TRH: terapia de reposição contínua com estradiol e noretisterona. TRE: terapia de reposição contínua com estradiol.

### **Variabilidade da Frequência Cardíaca**

Os valores dos índices da VFC no domínio do tempo e dos índices derivados do mapa de retorno tridimensional, obtidos nos três grupos estudados, nas condições de pré e pós-intervenção, estão listados nas Tabelas 1 e 3. Este estudo não detectou diferenças estatisticamente significativas entre os três grupos antes e após a terapia em nenhum dos índices no domínio do tempo da VFC. Não foi possível identificar nenhum predomínio na regulação autonômica devido à reposição hormonal. O índice  $P_1$  (derivado do mapa de retorno tridimensional) aumentou significativamente com a terapia em todas as mulheres, porém não se demonstrou diferença significativa entre os grupos ( $p = 0,36$ ).

Na Tabela 4 encontram-se os coeficientes de correlação (Pearson) entre todos os índices de VFC analisados. Ocorreu forte associação entre o índice  $P_2$  do mapa de retorno tridimensional e os índices SDNN e SDANNi e do  $P_3$  com rMSSD e pNN50 (índices que traduzem a modulação parassimpática) (Tabela 4).

**Tabela 3.** Índices da VFC, nas mulheres pós-menopáusicas, pré e pós-intervenção.

Índices	TRH (n = 13)	TRE (n = 14)	Placebo (n = 13)	p*	p**	p***
<b>RRmed</b>						
Pré	739±51	742±51	766±78	0,79	0,13	0,10
Pós	752±79	766±53	758±68			
<b>SDNN</b>						
Pré	133±22	133±29	141±24	0,66	0,95	0,86
Pós	132±20	135±27	140±25			
<b>SDANNi</b>						
Pré	125±23	123±28	129±26	0,69	0,79	0,56
Pós	119±16	124±29	131±27			
<b>rMSSD</b>						
Pré	22±6	22±6	24±7	0,65	0,40	0,92
Pós	23±7	23±7	25±6			
<b>pNN50</b>						
Pré	3,0 (1,7; 5,1)	2,7 (1,6; 4,6)	3,8 (2,2; 6,6)	0,58	0,97	0,58
Pós	2,5 (1,4; 4,7)	3,0 (1,7; 5,5)	4,1 (2,2; 7,6)			
<b>P<sub>1</sub></b>						
Pré	57,6 (54,3; 61,1)	59,2 (56,0; 62,7)	58,6 (55,3; 62,2)	0,39	0,03	0,36
Pós	58,0 (54,0; 62,3)	63,1 (58,9; 67,6)	60,9 (56,7; 65,4)			
<b>P<sub>2</sub></b>						
Pré	78±11	76±12	79±11	0,79	0,71	0,58
Pós	76±9	77±9	79±12			
<b>P<sub>3</sub></b>						
Pré	93±20	89±19	93±16	0,79	0,39	0,92
Pós	94±22	91±17	96±17			
<b>MN</b>						
Pré	417±104	415±158	435±120	0,80	0,17	0,66
Pós	420±144	462±163	464±106			

TRH: terapia de reposição contínua com estradiol e noretisterona. TRE: terapia de reposição contínua com estradiol. Valores expressos em milissegundos, como média ± desvio padrão, para RRmed, SDNN, SDANNi e rMSSD, e como média geométrica e intervalos de confiança (IC 95%) para pNN50. P<sub>2</sub> e P<sub>3</sub>: valores expressos em milissegundos, como média ± desvio padrão. P<sub>1</sub> e MN: valores expressos em unidades arbitrárias, como média ± desvio padrão para MN e média geométrica e IC 95% para P<sub>1</sub>. p\*: efeito grupo; p\*\*: intervenção; p\*\*\* : interação. Nível de significância estatística: p < 0,05



**Tabela 4.** Coeficientes de correlação (Pearson) dos índices da VFC no domínio do tempo e dos índices derivados do Mapa de Retorno Tridimensional.

	<b>P<sub>1</sub></b>	<b>P<sub>2</sub></b>	<b>P<sub>3</sub></b>	<b>MN</b>
<b>RRmed</b>	0,39**	0,59**	0,28*	0,58**
<b>SDNN</b>	0,04	0,89**	0,28*	0,55**
<b>SDANNi</b>	- 0,04	0,86**	0,15	0,42**
<b>RMSSD</b>	0,39**	0,32*	0,90**	0,86**
<b>pNN50</b>	0,36**	0,25*	0,90**	0,83**

Os índices pNN50 e P1 sofreram transformação logarítmica.

\*  $p < 0,05$  \*\* $p < 0,001$

## Discussão

Este é o primeiro ensaio clínico randomizado, duplo cego, placebo-controlado, que comparou duas formas distintas de reposição hormonal, utilizando a terapia isolada com estradiol e a associação estradiol-noretisterona, de forma contínua, durante três meses, em mulheres pós-menopáusicas saudáveis, para avaliar a modulação autonômica cardíaca. Com este delineamento, não encontramos efeito significativo da reposição hormonal sobre a modulação autonômica cardíaca nessas mulheres. A associação com este tipo de progestágeno, um derivado da testosterona, não provocou nem uma atenuação da VFC,<sup>8</sup> nem apresentou uma tendência de ampliação dos efeitos hemodinâmicos induzidos pelo estradiol.<sup>45</sup>

### Terapia de reposição hormonal e VFC

Diversos fatores afetam a função do sistema nervoso autônomo e, portanto, a VFC. A VFC diminui com a idade<sup>46</sup> e sofre a influência da frequência cardíaca<sup>47</sup> e do grau de atividade física.<sup>22</sup> Tanto a frequência cardíaca, quanto a VFC podem ser consideradas fatores preditivos isolados de risco cardiovascular, uma vez que o aumento da frequência cardíaca<sup>10</sup> e a redução da VFC<sup>48</sup> já foram associados a um aumento da mortalidade. Nossos resultados não confirmaram a existência de uma influência significativa da FC na VFC em mulheres pós-menopáusicas saudáveis. Ademais não ocorreu alteração significativa em resposta às modalidades de reposição hormonal.

A VFC está reduzida em mulheres pós-menopáusicas quando comparadas a mulheres pré-menopáusicas.<sup>49,50</sup> Contudo, o fator idade, além da diminuição do estrogênio circulante, tem nítida implicação nesta constatação.<sup>51</sup> Os valores médios dos índices da VFC no domínio do tempo obtidos nas mulheres do nosso estudo estavam dentro dos limites de normalidade estabelecido por outros autores para mulheres saudáveis

nessa faixa etária <sup>13,47,52</sup> e não diferiram dos valores pré-tratamento observados por outros. <sup>6,8,19</sup>

Até o presente estudo, o cenário sobre os reais efeitos da terapia de reposição hormonal na modulação autonômica cardíaca ainda estava nebuloso. Estudos observacionais apontavam um efeito cardioprotetor da reposição hormonal com estrogênios. <sup>5,6,12</sup> A atenuação dos efeitos estrogênicos estaria associada ao tipo e à via de atuação da progesterona empregada e a medroxiprogesterona, usada no “Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS)” <sup>53</sup>, reverteria os efeitos benéficos do estradiol em mulheres pós-menopáusicas portadoras de DAC. <sup>17,18</sup> Por este motivo, optamos por utilizar o acetato de noretisterona, um derivado da 19-nortestosterona, que, comprovadamente, exerceu efeitos hemodinâmicos favoráveis semelhantes aos do estradiol, <sup>45</sup> apesar dos efeitos negativos sobre o perfil lipídico já reportados. <sup>26</sup>

A observação de que a adição de progesterona, de diversos tipos, atenuaria os efeitos do estrogênio <sup>8</sup> poderia, ao menos parcialmente, explicar os resultados do “HERS” e do “Women’s Health Initiative Randomized Controlled Trial”, que não indicaram a terapia de reposição hormonal nem para a prevenção secundária, <sup>53,54</sup> nem para a prevenção primária. <sup>55</sup>

Recentemente, foi sugerido que a reposição hormonal com a combinação estradiol/medroxiprogesterona, por um período de 3 meses, produziria uma alteração favorável da função autonômica cardíaca, ou seja, um aumento da atividade vagal, medida através dos índices da variabilidade cardíaca no domínio da frequência, nas situações de repouso e estresse. <sup>56</sup> Este estudo não analisou a VFC de longa duração, necessária para a avaliação da modulação autonômica cardíaca nas 24 h. Além disso, foi previamente demonstrado que diversos tipos de progesterona, inclusive a medroxiprogesterona, atenuam os efeitos do estrogênio. <sup>8,19</sup>

Constatou-se, previamente, que três meses de reposição são suficientes para atingir os níveis séricos fisiológicos de estradiol.<sup>57</sup> Portanto, acreditamos que este prazo seria suficiente para induzir as modificações na regulação autonômica detectadas por outros em estudos não controlados.<sup>6,8</sup>

Métodos não lineares, como o Mapa de Retorno Tridimensional, conferem reprodutibilidade<sup>11</sup> à análise da VFC e permitem avaliar as diferenças inter-individuais.<sup>39</sup> O Mapa de Retorno Tridimensional foi utilizado pela primeira vez em mulheres pós-menopáusicas, devido à sua capacidade de detectar tanto a modulação vagal quanto a modulação simpática sobre o coração, refletindo a regulação autonômica nas 24 horas. Esta metodologia evidenciou que a reposição hormonal contínua com estradiol isolado ou com a associação estradiol-noretisterona não modifica a modulação autonômica cardíaca em mulheres pós-menopáusicas.

### **Reposição hormonal e lipídios**

Na fase pré-tratamento, as mulheres pós-menopáusicas apresentavam sobrepeso e hiperlipidemia, condições comumente observadas na menopausa e relatadas por outros autores.<sup>1,3,4</sup> Contudo, não se observou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, nem a análise de correlação evidenciou associações entre as dosagens de Col-LDL, Col-HDL, triglicerídios e os índices da VFC.

A redução do Col-HDL nas mulheres que receberam noretisterona associada ao estradiol já foi demonstrada por outros autores.<sup>26,45</sup> O aumento do Col-HDL no grupo placebo poderia ser secundário a uma maior aderência à dieta hipolipemiante ou à atividade física regular ou a ambas as condições (efeito placebo). Embora as pacientes fossem sedentárias no momento da inclusão no estudo, não foi possível controlar esta variável durante o período de intervenção. Da mesma maneira, de posse da informação

de que apresentavam níveis elevados de colesterol, as mulheres pós-menopáusicas poderiam ter adotado dietas com baixo teor de gorduras, situação que também não foi controlada durante este estudo.

### **Lipídios e VFC**

A hipercolesterolemia está associada a uma redução da VFC em homens.<sup>58,59</sup> A terapia com um tipo de estatina, a atorvastatina, aumenta a VFC em pacientes hipercolesterolêmicos, do sexo masculino, com ou sem DAC.<sup>14</sup> Antes do tratamento com a atorvastatina, observou-se uma correlação entre as concentrações de Col-LDL e a maioria dos índices de VFC.<sup>14</sup> Estudos semelhantes ainda não foram realizados com pacientes do sexo feminino. As mulheres pós-menopáusicas do nosso estudo, embora fossem hiperlipêmicas, não apresentaram valores reduzidos da VFC. Além disso, não observamos nenhum tipo de associação entre os valores dos lipídios e os índices da VFC, tanto pré quanto pós-intervenção, apesar do aumento significativo do Col-HDL no grupo que usou estradiol isolado. Nenhuma delas utilizou medicação hipolipemiante no período do estudo. A tendência de redução do Col-LDL não foi estatisticamente significativa quando compararam-se as duas formas de tratamento entre si e com o placebo. Talvez seja necessário um período maior de reposição hormonal para que se possa detectar um efeito significativo sobre os lipídios sanguíneos.

### **Implicações Clínicas**

Dois grandes estudos, que acompanharam mais de 19.000 mulheres pós-menopáusicas durante cerca de 6 anos, ambos recentemente concluídos: o “HERS” (de prevenção secundária) e o “Women’s Health Initiative” (de prevenção primária) evidenciaram que a TRH não reduziu a taxa de eventos coronarianos em mulheres pós-

menopáusicas com DAC estabelecida<sup>53,54</sup> e também não reduziu o risco de DAC em mulheres saudáveis.<sup>55</sup> Nossos dados vão ao encontro das observações dos grandes ensaios clínicos, documentando que a reposição hormonal não resulta em melhora da modulação autonômica cardíaca.

## **Conclusões**

1. Em mulheres pós-menopáusicas saudáveis, a terapia de reposição hormonal contínua com estradiol, ou com estradiol associado à noretisterona, por um período de 3 meses, não resulta em melhora da modulação autonômica cardíaca, avaliada pela variabilidade da frequência cardíaca.
2. As mulheres pós-menopáusicas deste estudo, embora fossem hiperlipêmicas, não apresentaram valores reduzidos da variabilidade da frequência cardíaca.

## Referências Bibliográficas

1. Greendale GA, Lee NP, Arriola ER. The menopause. *Lancet* 1999; 353: 571-580.
2. Thomas JL, Braus PA. Coronary artery disease in women. A historical perspective. *Arch Intern Med* 1998; 158: 333-337.
3. Grodstein F, Stampfer MJ, Manson JE, et al. Postmenopausal estrogen and progestin use and the risk of cardiovascular disease. *N Eng J Med* 1996; 335: 453-461.
4. Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, et al. Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease. Ten-year follow-up from the Nurses' Health Study. *N Engl J Med* 1991; 325: 756-762.
5. Huikuri HV, Pikkujamsa SM, Airaksinen KEJ, et al. Sex-related differences in autonomic modulation of heart rate in middle-aged subjects. *Circulation* 1996; 94: 122-125.
6. Rosano GMC, Patrizi R, Leonardo F, et al. Effect of estrogen replacement therapy on heart rate variability and heart rate in healthy postmenopausal women. *Am J Cardiol* 1997; 80: 815-817.
7. De Meersman RE, Zion AS, Giardina EGV, Weir JP, Lieberman JS, Downey JA. Estrogen replacement, vascular distensibility, and blood pressures in postmenopausal women. *Am J Physiol* 1998; 274: H1539-1544.
8. Christ M, Seyffart K, Wehling M. Attenuation of heart rate variability in postmenopausal women on progestin-containing hormone replacement. *Lancet* 1999; 353: 1939-1940.



9. Moraes R, Grupi CJ. Variabilidade da frequência cardíaca. Conceito e utilidade clínica. In Moffa PJ, Sanches PCR (eds). Eletrocardiograma: normal e patológico. São Paulo, Roca, 2001:839-863.
10. Gillman MW, Kannel WB, Belanger A, D'Agostino RB. Influence of heart rate on mortality among persons with hypertension: The Framingham Study. *Am Heart J* 1993;125: 1148-1154.
11. Moraes RS, Ferlin EL, Polanczyk CA, et al. Three-dimensional return map: a new tool for quantification of heart rate variability. *Autonom Neurosci* 2000; 83:90-99.
12. Ramaekers, D, Ector H, Aubert A, Rubens A, Van de Werf F. Heart rate variability and heart rate in healthy volunteers. Is the female autonomic nervous system cardioprotective ? *Eur Heart J* 1998; 19: 1334-1341.
13. Bigger JT Jr, Fleiss JL, Steinman RC, Rolnitzky LM, Schneider WJ, Stein PK. RR variability in healthy, middle-aged persons compared with patients with chronic coronary heart disease or recent acute myocardial infarction. *Circulation* 1995; 91: 1936-1943.
14. Pehlivanidis AN, Athyros VG, Demitriadis DS, Papageorgiou AA, Bouloukos VJ, Kontopoulos AG. Heart rate variability after long-term treatment with atorvastatin in hypercholesterolaemic patients with or without coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2001; 157: 463-469.
15. Bailey J. HRT and cardio-protection: unraveling the tangled web. *Eur Menopause J* 1997; 4: I-IV.
16. Yildirim A, Kabakci G, Yarali H, et al. Effects of hormone replacement therapy on heart rate variability in postmenopausal women. *ANE* 2001; 6: 280-284.
17. Christ M, Seyffart K, Tillmann H-C, Wehling M. Heart rate variability and hormone replacement therapy. *Lancet* 1999; 354: 1303.

18. Hayward CS, Webb CM, Collins P. Hormone replacement therapy and heart rate variability. *Lancet* 1999; 354: 256.
19. Christ M, Seyffart K, Tillmann H-C, Wehling M. Hormone replacement in postmenopausal women: impact of progestogens on autonomic tone and blood pressure regulation. *Menopause* 2002; 9: 127-136.
20. Rosano GMC, Panina G. Oestrogens and the heart. *Thérapie* 1999; 54: 381-385.
21. Lipsitz LA, Connelly CM, Kelley-Gagnon M, Kiely DK, Morin RJ. Effects of chronic estrogen replacement therapy on beat-to-beat blood pressure dynamics in healthy postmenopausal women. *Hypertension* 1995; 26: 711-715.
22. Davy KP, Miniclier NL, Taylor JA, Stevenson ET, Seals DR. Elevated heart rate variability in physically active postmenopausal women: a cardioprotective effect? *Am J Physiol* 1996; 271: H455-H460.
23. Seely EW, Walsh BW, Gerhard MD, Williams GH. Estradiol with or without progesterone and ambulatory blood pressure in postmenopausal women. *Hypertension* 1999; 33: 1190-1194.
24. Rosano GMC, Graziottin A, Fini M. Cardioprotective effects of ovarian hormones and the HERS in perspective. *Maturitas* 2000; 34: S3-S10.
25. Ashley CD, Kramer ML, Bishop P. Estrogen and substrate metabolism. A review of contradictory research. *Sports Med* 2000; 29: 221-227.
26. Sitruk-Ware R. Progestins and cardiovascular risk markers. *Steroids* 2000; 65: 651-658.
27. Vehkavaara S, Silveira A, Hakala-Ala-Pietilä T, et al. Effects of oral and transdermal estrogen replacement therapy on markers of coagulation, fibrinolysis, inflammation and serum lipids and lipoproteins in postmenopausal women. *Thromb Haemost* 2001; 85: 619-625.

28. Kupperman HS , Blatt MH, Weisbader H, Filler W. Comparative clinical evaluation of estrogenic preparation by the menopausal and amenorrhea indices. *J Clin Endocrinol* 1953; 6: 688-703.
29. Robertson RD, Picker RH, Wilson PC, Saunders DM. Assessment of ovulation by ultrasound and plasma estradiol determinations. *Obstet Gynecol* 1979; 54: 686-690.
30. Stein MW, Cori GT, Cori CF. A comparative study of hexokinase from yeast and animal tissues. *J Biol Chem* 1950; 186: 763-780.
31. Tarbutton PN, Gunter CR. Enzymatic determination of total cholesterol in serum. *Clin Chem* 1974; 20: 724-727.
32. Nauck M, Maerz W, Wieland H. New immunoseparation-based homogeneous assay for HDL-cholesterol compared with three homogeneous and two heterogeneous methods for HDL-cholesterol. *Clin Chem* 1998; 44: 1443-1451.
33. Fossati P, Prencipe L. Serum tryglicerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin Chem* 1982; 28: 2077-2080.
34. Friedewald WT, Levy RL, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18: 499-502.
35. Virtanen I, Polo O, Polo-Kantole P, Kuusela T, Ekholm E. The effect of estrogen replacement therapy on cardiac autonomic regulation. *Maturitas* 2000; 37: 45-51.
36. Parati G, Saul JP, Di Rienzo M, Mancia G. Spectral analysis of blood pressure and heart rate variability in evaluating cardiovascular regulation. A critical appraisal. *Hypertension* 1995; 25: 1276-1286.

37. Polanczyk CA, Rohde LEP, Moraes RS, Ferlin EL, Leite C, Ribeiro JP. Sympathetic nervous system representation in time and frequency domain indices of heart rate variability. *Eur J Appl Physiol* 1998; 79: 69-73.
38. Rohde LEP, Polanczyk CA, Moraes RS, Ferlin EL, Ribeiro JP. Effect of partial arrhythmia suppression with amiodarone on heart rate variability of patients with congestive heart failure. *Am Heart J* 1998; 136: 31-36.
39. Goldberger JJ, Challapalli S, Tung R, Parker M, Kadish AH. Relationship of heart rate variability to parasympathetic effect. *Circulation* 2001; 103: 1977-1983.
40. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society for Pacing and Electrophysiology. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. *ANE* 1996; 1 (2, Pt. 1): 151-181.
41. Elbert T, Ray WJ, Kowalik ZJ, Skinner JE, Graf KE, Birbaumer N. Chaos and physiology: deterministic chaos in excitable cell assemblies. *Physiol Rev* 1994; 74: 1-47.
42. Wagner CD, Nafz B, Persson PB. Chaos in blood pressure control. *Cardiovasc Res* 1996; 31: 380-387.
43. Nobrega AC, Reis AF, Moraes RS, Bastos BG, Ferlin EL, Ribeiro JP. Enhancement of heart rate variability by cholinergic stimulation with pyridostigmine in healthy subjects. *Clin Auton Res* 2001; 11: 11-17.
44. Ribeiro ALP, Moraes RS, Ribeiro JP, et al. Parasympathetic dysautonomia precedes left ventricular systolic dysfunction in Chagas disease. *Am Heart J* 2001; 141: 260-265.

45. Alfie J, Lugones L, Belardo A, et al. Hemodynamic effects of transdermal estradiol alone and combined with norethisterone acetate. *Maturitas* 1997; 27: 163-169.
46. Liao D, Cai J, Rosamond WD, et al. Cardiac autonomic function and incident coronary heart disease: a population-based case-cohort study. The ARIC Study. Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Am J Epidemiol* 1997; 145:696-706.
47. Tsuji H, Larson MG, Venditti FJ Jr, et al. Impact of reduced heart rate variability on risk for cardiac events. The Framingham Heart Study. *Circulation* 1996; 94:2850-2855.
48. Dekker JM, Crow RS, Folsom AR, et al. Low heart rate variability in a 2-minute rhythm strip predicts risk of coronary heart disease and mortality from several causes. The ARIC Study. *Circulation* 2000; 102: 1239-1244.
49. Brockbank CL, Chatterjee F, Bruce SA, Woledge RC. Heart rate and its variability change after the menopause. *Exp Physiol* 2000; 85: 327-330.
50. Ribeiro TF, Azevedo GD, Crescêncio JC, et al. Heart rate variability under resting conditions in postmenopausal and young women. *Braz J Med Biol Res* 2001; 34: 871-877.
51. Stein PK, Kleiger RE, Rottman JN. Differing effects of age on heart rate variability in men and women. *Am J Cardiol* 1997; 80:302-305.
52. Umetani K, Singer DH, McCraty R, Atkinson M. Twenty-four hour time domain heart rate variability and heart rate: relations to age and gender over nine decades. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31: 593-601.
53. Hulley S, Grady D, Bush T, et al, for the Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. *JAMA* 1998; 280: 605-613.

54. Grady D, Herrington D, Bittner V, et al. for the HERS Research Group. Cardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II). *JAMA* 2002; 288: 49-57.
55. Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. 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: 321-333.
56. Farag NH, Nelesen RA, Parry BL, Loreda JS, Dimsdale JE, Mills PJ. Autonomic and cardiovascular function in postmenopausal women: the effects of estrogen versus combination therapy. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186: 954-961.
57. Snabes MC, Herd JA, Schuyler NRN, Dunn K, Spence DW, Young RL. In normal postmenopausal women physiologic estrogen replacement therapy fails to improve exercise tolerance: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 175: 110-114.
58. Burger AJ, Hamer AW, Weinrauch LA, D'Elia JA. Relation of heart rate variability and serum lipoproteins in type 1 diabetes mellitus and chronic stable angina pectoris. *Am J Cardiol* 1998; 81: 945-949.
59. Christensen JH, Toft E, Christensen MS, Schmidt EB. Heart rate variability and plasma lipids in men with and without ischaemic heart disease. *Atherosclerosis* 1999; 145: 181-186.

## Anexos

### Anexo 1 – ÍNDICE MENOPAUSAL DE KUPPERMAN

#### ÍNDICE MENOPAUSAL DE KUPPERMAN

<b>Tipos de Sintomas</b>	<b>Leve</b>	<b>Moderado</b>	<b>Intenso</b>	<b>Score 0</b>	<b>Score 1</b>	<b>Score 2</b>	<b>Score 3</b>
<b>Vasomotores</b>	<b>4 (1 a 3/dia)</b>	<b>8 (4 a 9/dia)</b>	<b>12 (&gt; 10/dia)</b>				
<b>Parestesias</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>6</b>				
<b>Insônia</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>6</b>				
<b>Nervosismo</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>6</b>				
<b>Tristeza</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>				
<b>Vertigem</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>				
<b>Fraqueza</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>				
<b>Artralgia/Mialgia</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>				
<b>Cefaléia</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>				
<b>Palpitação</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>				
<b>Formigamento</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>				

**TOTAL**

## Anexo 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO

### TERMO DE CONSENTIMENTO

Estou ciente da indicação do exame denominado Holter de 24 horas, solicitado pelo meu (minha) médico (a) para avaliar melhor o funcionamento do meu coração. O exame será realizado no Serviço de Cardiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Este exame consiste na gravação do eletrocardiograma, durante 24 horas, por meio da instalação de cinco eletrodos no tórax conectados a um gravador de bolso, que não oferece nenhum risco de choque elétrico ou queimadura.

O objetivo deste estudo médico é o de avaliar os efeitos da terapia de reposição hormonal (TRH) sobre o coração, por meio da análise da variação dos batimentos cardíacos. Para afirmarmos, com certeza, que os efeitos sobre o coração serão realmente secundários ao uso dos hormônios, será necessária a comparação com o uso de um medicamento que não tem ação (o placebo). De acordo com o protocolo da pesquisa, a escolha do uso da TRH será feita ao acaso. Portanto, poderei ser incluída tanto no grupo que receberá a TRH como no que receberá placebo. Nem os exames nem o tratamento a que vou submeter-me acrescentam algum risco adicional à minha saúde.

Estou ciente de que serei questionada e examinada por um (a) médico (a) e que meu eletrocardiograma e minha pressão arterial serão registrados para excluir qualquer contra-indicação aparente para participar deste estudo, além de ser submetido a exames de sangue para verificação do nível de glicose, de gorduras, de hormônios femininos e de proteínas e a outros exames de rotina ambulatorial: mamografia e ultra-sonografia do útero e anexos.

Os exames de Holter, o primeiro no início do tratamento e o segundo ao final deste, serão realizados por pessoal especializado e analisados pelos pesquisadores responsáveis, podendo ser interrompidos tanto por mim quanto pelo (a) médico (a), caso seja necessário.

Os benefícios deste exame para mim são a avaliação dos efeitos da terapia de reposição hormonal sobre o meu coração.

Os meus direitos em não fornecer informações para pessoas que não estejam ligadas a esta pesquisa e o sigilo profissional serão respeitados, bem como o acesso aos resultados obtidos nos exames.

O meu bem-estar será promovido pelos cuidados profissionais da equipe médica e por todo tipo de tratamento que se fizer necessário durante o período.

Poderei entrar em contato com os pesquisadores responsáveis pelos telefones: 0 XX 47 9101-2690 (Dra. Eney) e 0 XX 51 316-8344 (Dr. Jorge).

Finalmente, eu concordo em participar de forma voluntária desta pesquisa e consinto que meu nome seja registrado para possíveis seguimentos no futuro.

Local e data: \_\_\_\_\_, \_\_/\_\_/\_\_.

Ass. \_\_\_\_\_

Participante

Ass. \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Jorge Pinto Ribeiro

Responsável/Orientador



**Artigo em inglês**

# **Hormone replacement therapy does not affect heart rate variability in postmenopausal women**

**Eney O. Fernandes, MD, MSc, Ruy S. Moraes, MD, ScD,  
Maria Celeste O. Wender, MD, ScD, Elton Ferlin, BSc EE,  
Jorge P. Ribeiro, MD, ScD**

Cardiology, Gynecology, and Biomedical Engineering Divisions,  
Hospital de Clínicas de Porto Alegre  
Department of Gynecology and Obstetrics and Department of Medicine,  
Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul;  
Porto Alegre, RS 90035-007, Brazil

Address for correspondence:

Jorge P. Ribeiro, MD, ScD  
Associate Professor and Chief, Cardiology Division,  
Hospital de Clínicas de Porto Alegre,  
Rua Ramiro Barcelos 2350,  
90035-007, Porto Alegre, RS, Brazil

Phone: +55 51 3168344  
Fax: +55 51 3168657  
E-mail: [jpribeiro@cpovo.net](mailto:jpribeiro@cpovo.net)

**ABSTRACT**

**Background:** Postmenopausal women are at greater risk of coronary heart disease. Observational studies have demonstrated that hormone replacement therapy (HRT) improves lipid profile and cardiac autonomic modulation. The cardioprotective effect attributed to HRT has not been tested in randomized, placebo-controlled trials to compare the two most frequently used regimens. This study evaluates cardiac autonomic modulation in healthy postmenopausal women using time domain indices of heart rate variability (HRV) and indices derived from the three-dimensional return map, and investigates whether continuous HRT for three months, either with estradiol alone (ERT) or with estradiol with norethisterone (HRT), increases HRV in postmenopausal women.

**Methods:** Forty healthy postmenopausal women aged 46 to 63 years were consecutively and randomly assigned to one of three treatment groups: HRT, ERT, or placebo. For all women, clinical, gynecological and laboratory data (glucose, estradiol, HDL, LDL, triglycerides, mammography and transvaginal sonography) were collected. Patients underwent 24-h ECG before and after the treatment to evaluate HRV indices.

**Results:** Time domain indices of HRV as well as indices derived from the three dimension return map presented no significant changes after interventions. The only significant difference between HRT and ERT groups was in lipid profile. HDL cholesterol levels decreased 12.4% ( $p = 0.008$ ) for women who used HRT.

**Conclusion:** In healthy postmenopausal women, continuous hormone replacement therapy with estradiol or estradiol with norethisterone for 3 months does not affect cardiac autonomic modulation evaluated by HRV.

**Keywords:** Autonomic nervous systems, heart rate variability, hormone replacement therapy, menopause

## **Introduction**

Postmenopausal women are at greater risk of coronary heart disease, the main cause of death in this population (1). The decrease in estrogen levels in menopause has been reported to be the main cause of this increased cardiovascular risk (2). In the last decade, several observational studies have reported the positive effect of hormone replacement therapy (HRT) on coronary risk factors (3), on cardiovascular mortality (4), and on cardiac autonomic modulation (5-8).

Beat-to-beat alterations in heart rate (HR) result from the sympathetic-vagal interaction; heart rate variability is a measure of the autonomic regulation of the heart and is a non-invasive tool to study the status of the autonomic nervous system (9). Moreover, an elevated heart rate is associated with an increase in cardiovascular mortality (10). The analysis of heart rate variability (HRV) is a reliable and reproducible method (11) to evaluate cardiac autonomic function in healthy individuals (12) and patients with CHD (13), and has been used in stratifying risk for these patients (14).

Observational studies have shown an increase in HRV in postmenopausal women who use hormones. This has been demonstrated by a parasympathetic pattern in cardiac autonomic regulation, which led researchers to suggest that this therapy has cardioprotective effects (6, 15, 16). However, some of these effects may be reduced or disappear with the addition of progestogens, depending on the type and dose used (17, 20). The effects of HRT on the regulation of the cardiac autonomic system of healthy postmenopausal women is still unclear (6-8, 16, 21, 22). In addition, these effects seem to be associated with the type, dosage, route of administration and duration of use, particularly in respect to progestogens (18, 23-27).

In this randomized, double-blind, placebo-controlled study, we compared the continuous hormone replacement regimen widely used in European countries, estradiol

with norethisterone, and the estrogen alone regimen, in healthy postmenopausal women for three months. The purpose of this study was to determine if both regimens or only one of them would promote an increase in heart rate variability, which was evaluated by means of time domain measurements and three-dimensional return map indices obtained from 24-hour Holter monitoring.

## **Methods**

### **Subjects**

Women 45 to 65 years old were recruited by means of advertisements in newspapers, radio and television. After telephone and personal contacts, the women were referred to the Menopause Outpatient Department, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil. We selected 45 healthy postmenopausal women who had not been using HRT for at least three months. Postmenopausal period was defined as amenorrhea for at least twelve months, with or without hot flashes or other associated symptoms.

After obtaining their medical history to investigate personal and familial risk factors and to obtain the Kupperman index (38), all women underwent clinical and gynecological baseline examinations and laboratory tests to measure glucose, LDL cholesterol (LDL-C), HDL cholesterol (HDL-C), triglycerides and estradiol levels. They also underwent resting ECG, mammography, transvaginal sonography and 24-hour electrocardiography (Holter).

Exclusion criteria were: (1) hypertension, diabetes, depression, and any type of cardiopathy; (2) routine use of cardiovascular medication; (3) competitive physical activity; (4) breast cancer, endometrial cancer, acute hepatopathy or previous thromboembolic disease; (5) abnormal mammography or transvaginal sonography findings; (6) fasting glucose levels above 105 mg/dl. Patients that met inclusion criteria signed an informed consent document (Annex 2)

### **Intervention**

Subjects were randomly assigned to one of the three treatment groups: HRT (2 mg estradiol with 1.0 mg norethisterone acetate); ERT (2 mg estradiol); and placebo. They all received the medication for daily use for one month. Packaging and tablets

were identical for the three regimens. Women returned to the Menopause Outpatient Service every month for control of regular use of medication, for clinical and gynecological control, and to obtain the Kupperman index (28) for each stage of the trial. They reported on symptoms in that month and returned the empty medication packaging. They then received medication for one more month according to the group to which they belonged. All researchers involved in the study were blinded to the type of regimen until the end of the data collection stage. Women were told not to use any other medication during the period of the study, unless otherwise recommended by their physicians.

### **Laboratory studies**

All laboratory tests were performed in the Clinical Pathology Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre after patients had fasted for 12 hours. Estradiol concentrations were measured in the Immulite device by means of chemoluminescence, with the Immulite Estradiol DPC kit (29). Glucose was measured with a Mega Bayer analyzer, by means of the Gluco-DH method with the Glucose Hexokinase II kit (GLU H II, Bayer, Advia 1650) (30). Serum lipid concentrations were measured in a Mega Bayer analyzer, with the following kits: Sera-Pak Cholesterol (31), HDL-C Immuno FS, Diasys (32) by direct selective inhibition, and Sera-Pak Triglycerides (fast color), by the GPO-PAP direct method (33). LDL cholesterol concentration was calculated using the Friedwald formula (34). Estradiol, LDL-C, HDL-C and triglyceride levels were also measured at the end of the intervention period.

### **Holter and analysis of heart rate variability**

Twenty four-hour Holter recordings were obtained for all the women up to two weeks before the beginning of interventions and in the last week of therapy. The recorder was placed in the morning after the women received instruction from a trained technician, and removed 24 hours later.

Electrocardiographic recordings were analyzed with a MARS Series 8500 analyzer (Marquette Medical Systems, Milwaukee, WI, USA), which separates normal beats from artifacts and ectopic beats, and provides a temporal series of normal RR intervals only, at an 8 ms resolution. The results were evaluated by an independent observer blinded to the type of regimen used until the end of data collection.

### **Heart rate variability**

The use of HRV analysis by means of dynamic electrocardiography (24-hour Holter) to evaluate cardiac autonomic function in postmenopausal women is a safe, reliable and reproducible method, and provides data for the progressive evaluation of the effects of HRT (6, 8, 15, 35).

### **Time domain measurements**

The indices produced by this methodology take into consideration the time factor, and evaluate the behavior of cardiovascular variation by means of calculation of dispersion around mean heart rate. These indices provide relevant information about cardiac autonomic regulation. (36-40).

We followed the recommendations of the Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society for Pacing and Electrophysiology (41), and analyzed the following HRV indices: standard deviation of normal RR intervals



obtained from 24-hour Holter readings (SDNN); standard deviation of the normal mean of RR intervals calculated over 5 min intervals for 24 hours (SDANNi); square root of the mean of the squared differences between adjacent normal RR intervals (rMSSD); and the percentage of RR intervals differing more than 50 ms from the preceding interval (pNN50).

### **Three-dimensional return map**

As heart rate variations have a non-linear dynamic behavior, linear methods, such as spectral analysis and time-domain methods, can not describe the dynamics of the cardiovascular system (42, 43). The return maps currently employed are limited for the evaluation of long temporal series, such as 24-hour Holter recordings. Therefore, we chose a new method, the three-dimensional return map, developed by our Service and previously used in the evaluation of healthy individuals, athletes and patients with heart disease, Chagas disease or diabetes (11, 44, 45).

The three-dimensional maps were built by plotting  $RR_n$  against  $[(RR_{n+1})-(RR_n)]$  against density (or number of countings). All normal RR intervals observed during the period of time analyzed were plotted on the x-axis, and the difference between adjacent RR intervals on the y-axis, at a 7.2 ms resolution. Whenever points overlapped, the number of overlapping points was plotted on the z-axis, normalized by the highest density of points. To quantify three-dimensional images, a set of indices,  $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_3$  and  $MN$ , was developed.  $P_1$  is inversely proportional to the inclination between 10 and 90 degrees of the highest density of points calculated at the plane that intercepts the distribution at its highest density of points, perpendicular to  $RR_n$ .  $P_1$  was expressed as the product of 100 minus two times the inclination. To calculate  $P_2$  and  $P_3$ , the three-dimensional images were represented in 10 level curves from the highest density of

points to the lowest density of 10 countings, which defines the external contour of the level curves.  $P_2$  is the maximum longitudinal length, and  $P_3$ , the maximal transverse width. MN is a general index calculated by  $P_1 \times P_2 \times P_3 \times 10^{-3}$ . An arbitrary scale was used to represent the indices of the three-dimensional return map. The indices derived from the three-dimensional return map ( $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_3$ , MN) were analyzed according to our team's methodology (11).

### **Ethical considerations**

The design and the protocol of this randomized, double-blind, placebo-controlled trial was approved by the Ethics Committee of the Research and Graduate Studies Group, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil (GPPG/HCPA). As this study involved pharmacological interventions, all women signed an informed consent document (Annex 2).

### **Statistical analysis**

The data collected from the postmenopausal women were entered on a spreadsheet and submitted to 3-way repeated measures analysis of variance (ANOVA) to compare independent and dependent means of all normally distributed variables for the three groups (HRT, ERT and placebo). Statistical calculations were made with the SPSS 8.0 software. Based on recent studies (6, 8, 22), we determined that a sample size of twelve women in each group would have 90% power to detect differences in the HRV indices at  $\alpha = .05$ . The variables triglycerides, pNN50 and  $P_1$ , which were not normally distributed by the Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk tests, underwent previous logarithmic transformation. The Tukey test for multiple comparisons was used for the variables HDL-C, LDL-C and triglycerides. Covariance analysis was carried out

for the variable HDL-C. The Pearson and Spearman correlation tests were used to test the associations between the variables analyzed. The level of statistical significance was established at  $p < .05$ .

## Results

Data were obtained from 40 of the 45 postmenopausal women initially randomized. Subjects were distributed as follows: 13 women in the continuous HRT group, 14 in the ERT group, and 13 in the placebo group. Five women were lost to the study: three stopped the treatment although no adverse effect was detected, and the final Holter recording was not obtained for these women. The other two women completed the treatment, but their data were not included for two reasons: one of them had an unacceptable percentage of arrhythmias (frequent single or multiple supraventricular extrasystoles, supraventricular tachycardia corresponding to 38% of beats); the other had a technically inadequate final examination.

Table 1 shows pre-intervention clinical, demographic and laboratory data of the postmenopausal women according to treatment group. After randomization, the groups were homogeneous and there were no statistically significant differences in age, weight, height, body mass index (BMI), blood pressure, serum glucose, estradiol, triglycerides (TRG) and LDL-C levels.

Subjects' ages ranged from 46 to 63 years. BMI indicated overweight in all groups. Blood pressure readings revealed borderline values. Fasting glucose levels were within normal values, but serum lipid concentrations revealed hyperlipidemia in all groups. HDL-C values were significantly different between the groups before intervention, and were higher in the ERT group. Smokers were uniformly distributed in the three groups, and there was no significant difference in percentages.

HRV in the time domain and the three-dimensional return map indices were similar in the three groups before intervention. Results were within the normal range for the age.

Table 2 shows clinical, demographic and laboratory variables before and after intervention in the three groups. Heart rate (HR), blood pressure and body mass index did not change significantly with therapy.

Triglyceride levels were not significantly affected (Figure 1), while the variation in LDL-C levels bordered significance ( $p = .05$ ) (Figure 2). The effect of the therapy on HDL-C level was significant when the three groups were compared before and after the intervention ( $p = .004$ ). We observed a significant increase in HDL-C levels in the ERT group, and a significant decrease in the HRT group (Figure 3). The increment of the HDL variable, that is, the percentage difference between pre- and post-intervention status, behaved similarly ( $p = .008$ ). The Tukey test for multiple comparisons revealed a difference between the ERT and the HRT groups ( $p = .03$ ) and between the HRT and the placebo groups ( $p = .01$ ). Covariance analysis, with the pre-intervention HDL-C as the covariable, detected a significant difference between the HRT and ERT groups ( $p = .001$ ) and between the HRT and placebo groups ( $p = .002$ ). After logarithmic transformation, the TRG variable was not significantly different in the three groups (ANOVA and Tukey test for multiple comparisons). There was no significant association between lipid profiles and HRV and three-dimensional return map indices.

Estradiol levels increased significantly with intervention in the HRT and ERT groups ( $p = .001$ ). This increase was not associated with any of the HRV indices, but there was a weak inverse correlation between estradiol and  $P_1$  ( $r = .40$ ;  $p = .01$ ).

### **Heart rate variability and three-dimensional return map**

Tables 1 and 3 show the indices of HRV in the time domain and three-dimensional return maps in the three groups before and after the intervention.

This study did not detect any statistically significant differences between the three groups before and after the therapy in any of the time-domain indices. It was not possible to identify any predominant pattern in autonomic regulation resulting from HRT.  $P_1$  (derived from the three-dimensional return maps) increased significantly with therapy in all women, but there was no significant difference between groups ( $p = .36$ ).

Table 4 shows Pearson correlation coefficients for all the HRV indices analyzed. There was a significant association between  $P_2$  and SDNN and SDANNi, and between  $P_3$  and rMSSD and pNN50 (indices that represent parasympathetic modulation) (Table 4).

## **Discussion**

This is the first randomized, double-blind, placebo-controlled study to compare two different forms of continuous hormone replacement regimens, estradiol alone and estradiol plus norethisterone, for three months in healthy postmenopausal women with the purpose to evaluate cardiac autonomic modulation. No significant effect of hormone replacement on cardiac autonomic modulation was found. The association with this type of progestogen, derived from testosterone, did not attenuate HRV (8) nor did it show a trend to amplify the hemodynamic effects induced by estradiol (45).

### **Hormone replacement therapy and heart rate variability**

Several factors affect the function of the autonomic nervous system and, consequently, HRV. HRV decreases with age (46) and by influence of heart rate (47) and the degree of physical activity (22). Both heart rate and HRV may be seen as independent predictive factors of cardiovascular risk: both the increase in heart rate (10) and the decrease in HRV (48) have already been associated with an increase in mortality.

HRT is reduced in postmenopausal women in comparison to premenopausal women (49, 50). However, the age factor, as well as the decrease in circulating estrogen, is clearly implicated in this observation (51). Mean values of HRV indices in the time domain obtained for the women in our study were within the normal range established by other authors for healthy women in this age group (13, 47, 52), and were consistent with pre-treatment values reported by other authors (6, 8, 19).

The actual effects of hormone replacement therapy on cardiac autonomic modulation have not been fully explained yet. Clinical observations point to a

cardioprotective effect of hormone replacement with estrogens (5, 6, 12). The addition of different types of progesterone may attenuate the effects of estrogen.

It has been demonstrated that three months of replacement therapy is enough to reach physiological serum concentrations of estradiol (53). Therefore, we believe this period of time is enough to induce the changes in autonomic regulation detected by other uncontrolled studies (6, 8).

Nonlinear methods, such as the three-dimensional return map, are reproducible (11) and permit the evaluation of interindividual differences (39). The three-dimensional return map was first used in postmenopausal women because it detects both vagal and sympathetic modulation of the heart and provides data about 24-hour autonomic regulation. This methodology showed that continuous hormone replacement with estradiol alone or with estradiol with norethisterone does not change cardiac autonomic regulation in healthy postmenopausal women.

### **Hormone replacement therapy and lipids**

Before the treatment, the postmenopausal women were overweight and had hyperlipidemia, which is frequently observed in postmenopausal women and has been reported by other authors (1, 3, 4). However, we did not find significant statistic differences between the groups, and the analysis of correlations did not reveal any association between LDL-C, HDL-C and triglycerides levels and HRV indices.

The decrease in HDL-C in women who received estradiol with norethisterone has already been reported (26, 45). The increase in HDL-C in the placebo group may be secondary to better adherence to a low-fat diet or to regular physical activity or both (the placebo effect). Patients did not have any regular physical activity before the study, but it was not possible to control this variable during the study. Similarly, we did not



control whether women adopted low-fat diets once they found out that their cholesterol levels were elevated.

### **Lipids and hormone replacement therapy**

Hypercholesterolemia is associated with a reduction in HRV in men (54, 55). Therapy with atorvastatin, a type of statin, increases HRV in hypercholesterolemic men with or without CHD (14). Correlation between LDL-C levels and higher HRV indices was observed only before treatment with atorvastatin (14). No similar studies have been conducted with women. The postmenopausal women in our study, although hyperlipidemic, did not have lower HRV indices. Moreover, we did not observe any type of association between lipid profiles and HRV indices before or after intervention in spite of the significant increase in HDL-C in the group that used estradiol alone. None of the women took hypolipidemic agents during the study. The trend to reduction in LDL-C levels was not statistically significant when the two regimens and the placebo groups were compared. A longer hormone replacement period may be necessary to detect a significant effect on serum lipids.

### **Clinical implications**

The HERS (secondary prevention) and the Women Health Initiative (primary prevention) are two recently completed studies that followed up more than 19 000 postmenopausal women for about 6 years. Both showed that HRT did not reduce the rate of coronary events in postmenopausal women with CHD (56,57) or the risk of CHD in healthy women (53). Our data are consistent with the findings of these large clinical studies, and indicate that hormone replacement does not improve cardiac autonomic modulation.

**Conclusion**

In healthy post-menopausal women, hormone replacement therapy with estradiol or estradiol and norethisterone, for 3 months, does not improve cardiac autonomic modulation evaluated by indices of heart rate variability. These findings are consistent with the lack of protective cardiovascular effect of hormone replacement therapy described in recent large randomized trials with hard end-points.

### Acknowledgements

This study was supported in part by a grant from the Grupo de Pesquisa e Pós-graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre and a Prof. Rubens Maciel Training Grant from the Brazilian Society of Cardiology.

## References

1. Greendale GA, Lee NP, Arriola ER. The menopause. *Lancet* 1999; 353: 571-580.
2. Thomas JL, Braus PA. Coronary artery disease in women. A historical perspective. *Arch Intern Med* 1998; 158: 333-337.
3. Grodstein F, Stampfer MJ, Manson JE, et al. Postmenopausal estrogen and progestin use and the risk of cardiovascular disease. *N Eng J Med* 1996; 335: 453-461.
4. Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, et al. Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease. Ten-year follow-up from the Nurses' Health Study. *N Engl J Med* 1991; 325: 756-762.
5. Huikuri HV, Pikkujamsa SM, Airaksinen KEJ, et al. Sex-related differences in autonomic modulation of heart rate in middle-aged subjects. *Circulation* 1996; 94: 122-125.
6. Rosano GMC, Patrizi R, Leonardo F, et al. Effect of estrogen replacement therapy on heart rate variability and heart rate in healthy postmenopausal women. *Am J Cardiol* 1997; 80: 815-817.
7. De Meersman RE, Zion AS, Giardina EGV, Weir JP, Lieberman JS, Downey JA. Estrogen replacement, vascular distensibility, and blood pressures in postmenopausal women. *Am J Physiol* 1998; 274: H1539-1544.
8. Christ M, Seyffart K, Wehling M. Attenuation of heart rate variability in postmenopausal women on progestin-containing hormone replacement. *Lancet* 1999; 353: 1939-1940.

9. Moraes R, Grupi CJ. Variabilidade da frequência cardíaca. Conceito e utilidade clínica. In Moffa PJ, Sanches PCR (eds). Eletrocardiograma: normal e patológico. São Paulo, Roca, 2001:839-863.
10. Gillman MW, Kannel WB, Belanger A, D'Agostino RB. Influence of heart rate on mortality among persons with hypertension: The Framingham Study. *Am Heart J* 1993;125: 1148-1154.
11. Moraes RS, Ferlin EL, Polanczyk CA, et al. Three-dimensional return map: a new tool for quantification of heart rate variability. *Autonom Neurosci* 2000; 83:90-99.
12. Ramaekers, D, Ector H, Aubert A, Rubens A, Van de Werf F. Heart rate variability and heart rate in healthy volunteers. Is the female autonomic nervous system cardioprotective ? *Eur Heart J* 1998; 19: 1334-1341.
13. Bigger JT Jr, Fleiss JL, Steinman RC, Rolnitzky LM, Schneider WJ, Stein PK. RR variability in healthy, middle-aged persons compared with patients with chronic coronary heart disease or recent acute myocardial infarction. *Circulation* 1995; 91: 1936-1943.
14. Pehlivanidis AN, Athyros VG, Demitriadis DS, Papageorgiou AA, Bouloukos VJ, Kontopoulos AG. Heart rate variability after long-term treatment with atorvastatin in hypercholesterolaemic patients with or without coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2001; 157: 463-469.
15. Bailey J. HRT and cardio-protection: unraveling the tangled web. *Eur Menopause J* 1997; 4: I-IV.
16. Yildirim A, Kabakci G, Yarali H, et al. Effects of hormone replacement therapy on heart rate variability in postmenopausal women. *ANE* 2001; 6: 280-284.

17. Christ M, Seyffart K, Tillmann H-C, Wehling M. Heart rate variability and hormone replacement therapy. *Lancet* 1999; 354: 1303.
18. Hayward CS, Webb CM, Collins P. Hormone replacement therapy and heart rate variability. *Lancet* 1999; 354: 256.
19. Christ M, Seyffart K, Tillmann H-C, Wehling M. Hormone replacement in postmenopausal women: impact of progestogens on autonomic tone and blood pressure regulation. *Menopause* 2002; 9: 127-136.
20. Rosano GMC, Panina G. Oestrogens and the heart. *Thérapie* 1999; 54: 381-385.
21. Lipsitz LA, Connelly CM, Kelley-Gagnon M, Kiely DK, Morin RJ. Effects of chronic estrogen replacement therapy on beat-to-beat blood pressure dynamics in healthy postmenopausal women. *Hypertension* 1995; 26: 711-715.
22. Davy KP, Miniclier NL, Taylor JA, Stevenson ET, Seals DR. Elevated heart rate variability in physically active postmenopausal women: a cardioprotective effect? *Am J Physiol* 1996; 271: H455-H460.
23. Seely EW, Walsh BW, Gerhard MD, Williams GH. Estradiol with or without progesterone and ambulatory blood pressure in postmenopausal women. *Hypertension* 1999; 33: 1190-1194.
24. Rosano GMC, Graziottin A, Fini M. Cardioprotective effects of ovarian hormones and the HERS in perspective. *Maturitas* 2000; 34: S3-S10.
25. Ashley CD, Kramer ML, Bishop P. Estrogen and substrate metabolism. A review of contradictory research. *Sports Med* 2000; 29: 221-227.
26. Sitruk-Ware R. Progestins and cardiovascular risk markers. *Steroids* 2000; 65: 651-658.
27. Vehkavaara S, Silveira A, Hakala-Ala-Pietilä T, et al. Effects of oral and transdermal estrogen replacement therapy on markers of coagulation,

- fibrinolysis, inflammation and serum lipids and lipoproteins in postmenopausal women. *Thromb Haemost* 2001; 85: 619-625.
28. Kupperman HS , Blatt MH, Weisbader H, Filler W. Comparative clinical evaluation of estrogenic preparation by the menopausal and amenorrhea indices. *J Clin Endocrinol* 1953; 6: 688-703.
29. Robertson RD, Picker RH, Wilson PC, Saunders DM. Assessment of ovulation by ultrasound and plasma estradiol determinations. *Obstet Gynecol* 1979; 54: 686-690.
30. Stein MW, Cori GT, Cori CF. A comparative study of hexokinase from yeast and animal tissues. *J Biol Chem* 1950; 186: 763-780.
31. Tarbutton PN, Gunter CR. Enzymatic determination of total cholesterol in serum. *Clin Chem* 1974; 20: 724-727.
32. Nauck M, Maerz W, Wieland H. New immunoseparation-based homogeneous assay for HDL-cholesterol compared with three homogeneous and two heterogeneous methods for HDL-cholesterol. *Clin Chem* 1998; 44: 1443-1451.
33. Fossati P, Prencipe L. Serum tryglicerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin Chem* 1982; 28: 2077-2080.
34. Friedewald WT, Levy RL, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18: 499-502.
35. Virtanen I, Polo O, Polo-Kantole P, Kuusela T, Ekholm E. The effect of estrogen replacement therapy on cardiac autonomic regulation. *Maturitas* 2000; 37: 45-51.

36. Parati G, Saul JP, Di Rienzo M, Mancia G. Spectral analysis of blood pressure and heart rate variability in evaluating cardiovascular regulation. A critical appraisal. *Hypertension* 1995; 25: 1276-1286.
37. Polanczyk CA, Rohde LEP, Moraes RS, Ferlin EL, Leite C, Ribeiro JP. Sympathetic nervous system representation in time and frequency domain indices of heart rate variability. *Eur J Appl Physiol* 1998; 79: 69-73.
38. Rohde LEP, Polanczyk CA, Moraes RS, Ferlin EL, Ribeiro JP. Effect of partial arrhythmia suppression with amiodarone on heart rate variability of patients with congestive heart failure. *Am Heart J* 1998; 136: 31-36.
39. Goldberger JJ, Challapalli S, Tung R, Parker M, Kadish AH. Relationship of heart rate variability to parasympathetic effect. *Circulation* 2001; 103: 1977-1983.
40. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society for Pacing and Electrophysiology. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. *ANE* 1996; 1 (2, Pt. 1): 151-181.
41. Elbert T, Ray WJ, Kowalik ZJ, Skinner JE, Graf KE, Birbaumer N. Chaos and physiology: deterministic chaos in excitable cell assemblies. *Physiol Rev* 1994; 74: 1-47.
42. Wagner CD, Nafz B, Persson PB. Chaos in blood pressure control. *Cardiovasc Res* 1996; 31: 380-387.
43. Nobrega AC, Reis AF, Moraes RS, Bastos BG, Ferlin EL, Ribeiro JP. Enhancement of heart rate variability by cholinergic stimulation with pyridostigmine in healthy subjects. *Clin Auton Res* 2001; 11: 11-17.



44. Ribeiro ALP, Moraes RS, Ribeiro JP, et al. Parasympathetic dysautonomia precedes left ventricular systolic dysfunction in Chagas disease. *Am Heart J* 2001; 141: 260-265.
45. Alfie J, Lugones L, Belardo A, et al. Hemodynamic effects of transdermal estradiol alone and combined with norethisterone acetate. *Maturitas* 1997; 27: 163-169.
46. Liao D, Cai J, Rosamond WD, et al. Cardiac autonomic function and incident coronary heart disease: a population-based case-cohort study. The ARIC Study. Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Am J Epidemiol* 1997; 145:696-706.
47. Tsuji H, Larson MG, Venditti FJ Jr, et al. Impact of reduced heart rate variability on risk for cardiac events. The Framingham Heart Study. *Circulation* 1996; 94:2850-2855.
48. Dekker JM, Crow RS, Folsom AR, et al. Low heart rate variability in a 2-minute rhythm strip predicts risk of coronary heart disease and mortality from several causes. The ARIC Study. *Circulation* 2000; 102: 1239-1244.
49. Brockbank CL, Chatterjee F, Bruce SA, Woledge RC. Heart rate and its variability change after the menopause. *Exp Physiol* 2000; 85: 327-330.
50. Ribeiro TF, Azevedo GD, Crescêncio JC, et al. Heart rate variability under resting conditions in postmenopausal and young women. *Braz J Med Biol Res* 2001; 34: 871-877.
51. Stein, PK, Kleiger RE, Rottman JN. Differing effects of age on heart rate variability in men and women. *Am J Cardiol* 1997; 80:302-305.
52. Umetani K, Singer DH, McCraty R, Atkinson M. Twenty-four hour time domain heart rate variability and heart rate: relations to age and gender over nine decades. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31: 593-601.

53. Hulley S, Grady D, Bush T, et al, for the Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. *JAMA* 1998; 280: 605-613.
54. Grady D, Herrington D, Bittner V, et al. for the HERS Research Group. Cardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II). *JAMA* 2002; 288: 49-57.
55. Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. 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: 321-333.
56. Snabes MC, Herd JA, Schuyler NRN, Dunn K, Spence DW, Young RL. In normal postmenopausal women physiologic estrogen replacement therapy fails to improve exercise tolerance: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 175: 110-114.
57. Burger AJ, Hamer AW, Weinrauch LA, D'Elia JA. Relation of heart rate variability and serum lipoproteins in type 1 diabetes mellitus and chronic stable angina pectoris. *Am J Cardiol* 1998; 81: 945-949.
58. Christensen JH, Toft E, Christensen MS, Schmidt EB. Heart rate variability and plasma lipids in men with and without ischaemic heart disease. *Atherosclerosis* 1999; 145: 181-186.

TABLE 1 Clinical, demographic and laboratory data of postmenopausal women before intervention (mean  $\pm$  SD)

	HRT (n =13)	ERT (n =14)	Placebo (n = 13)	p
Age (years)	54 $\pm$ 4	55 $\pm$ 4	55 $\pm$ 5	0.88
BMI (kg.m <sup>-2</sup> )	27 $\pm$ 4	27 $\pm$ 5	28 $\pm$ 5	0.93
BPs (mmHg)	128 $\pm$ 14	132 $\pm$ 14	131 $\pm$ 12	0.74
BPd (mmHg)	80 $\pm$ 8	80 $\pm$ 7	84 $\pm$ 7	0.38
HR (bpm)	71 $\pm$ 8	71 $\pm$ 8	69 $\pm$ 9	0.69
Glucose (mb/dl)	89 $\pm$ 11	86 $\pm$ 8	87 $\pm$ 10	0.68
LDL-C (mg/dl)	161 $\pm$ 48	149 $\pm$ 32	161 $\pm$ 50	0.71
HDL-C (mg/dl)	54 $\pm$ 14	66 $\pm$ 14	56 $\pm$ 12	0.03*
TRG (mg/dl)	134 $\pm$ 62	117 $\pm$ 43	123 $\pm$ 50	0.69
Estradiol (pg/dl)	30 $\pm$ 13	29 $\pm$ 9	27 $\pm$ 11	0.78
Smokers (%)	33	35	33	0.38
mean RR	739 $\pm$ 51	742 $\pm$ 51	766 $\pm$ 78	0.46
SDNN	133 $\pm$ 22	133 $\pm$ 29	141 $\pm$ 24	0.67
SDANNi	125 $\pm$ 23	123 $\pm$ 28	129 $\pm$ 26	0.86
rMSSD	22 $\pm$ 6	22 $\pm$ 6	24 $\pm$ 7	0.61
pNN50	3.0 (1.7;5.1)	2.7 (1.6;4.6)	3.8 (2.2;6.6)	0.63
P <sub>1</sub>	57.6 (54.3;61.1)	59.2 (56.0;62.7)	58.6 (55.3;62.2)	0.79
P <sub>2</sub>	78 $\pm$ 11	76 $\pm$ 12	79 $\pm$ 11	0.79
P <sub>3</sub>	93 $\pm$ 20	89 $\pm$ 19	93 $\pm$ 16	0.81
MN	416 $\pm$ 104	415 $\pm$ 158	435 $\pm$ 120	0.90

BMI: body mass index; BPs: systolic blood pressure; BPd: diastolic blood pressure; HR: heart rate; LDL-C: LDL cholesterol; HDL-C: HDL cholesterol; TRG: triglycerides. Values expressed in milliseconds as mean  $\pm$  standard deviation (SD) for mean RR, SDNN, SDANNi and rMSSD, and as average and confidence intervals (95% CI) for pNN50. P<sub>2</sub> and P<sub>3</sub> expressed in milliseconds as mean  $\pm$  SD. P<sub>1</sub> and MN expressed in arbitrary units as mean  $\pm$  SD for MN and average and 95% CI for P<sub>1</sub>. \*p = 0.03 after covariance analysis. Statistic significance was established at p < 0.05.

TABLE 2 Clinical, demographic and laboratory data for postmenopausal women before and after intervention (mean  $\pm$  SD).

	<b>HRT (n =13)</b>	<b>ERT (n =14)</b>	<b>Placebo (n = 13)</b>	<b>p*</b>	<b>p**</b>	<b>p***</b>
<b>BMI (kg.m<sup>-2</sup>)</b>	27 $\pm$ 4 27 $\pm$ 3	27 $\pm$ 5 27 $\pm$ 5	28 $\pm$ 5 27 $\pm$ 5	0.94	0.92	0.86
<b>BP (mmHg)</b>	128 $\pm$ 14 128 $\pm$ 25	132 $\pm$ 14 121 $\pm$ 12	131 $\pm$ 12 125 $\pm$ 21	0.94	0.43	0.28
<b>BP (mmHg)</b>	80 $\pm$ 8 76 $\pm$ 15	80 $\pm$ 7 75 $\pm$ 10	84 $\pm$ 7 74 $\pm$ 12	0.91	0.001	0.43
<b>HR (bpm)</b>	71 $\pm$ 8 70 $\pm$ 8	71 $\pm$ 8 70 $\pm$ 7	69 $\pm$ 9 70 $\pm$ 9	0.88	0.97	0.66
<b>LDL-C (mg/dl)</b>	161 $\pm$ 48 144 $\pm$ 42	149 $\pm$ 32 134 $\pm$ 27	167 $\pm$ 46 173 $\pm$ 44	0.17	0.04	0.05
<b>HDL-C (mg/dl)</b>	54 $\pm$ 14 46 $\pm$ 8	66 $\pm$ 14 70 $\pm$ 17	56 $\pm$ 12 59 $\pm$ 13	0.002	0.90	0.004
<b>TRG (mg/dl)</b>	133 $\pm$ 65 123 $\pm$ 56	117 $\pm$ 43 119 $\pm$ 38	125 $\pm$ 53 130 $\pm$ 54	0.94	0.92	0.70
<b>Estradiol (pg/dl)</b>	30 $\pm$ 13 105 $\pm$ 48	29 $\pm$ 9 129 $\pm$ 74	27 $\pm$ 11 37 $\pm$ 18	<0.001	<0.001	0.001

BMI: body mass index; BPs: systolic blood pressure; BPD: diastolic blood pressure; HR: heart rate; LDL-C: LDL cholesterol; HDL-C: HDL cholesterol; TRG: triglycerides. The TRG variable underwent logarithmic transformation. p\*: group effect; p\*\*: intervention; p\*\*\*: interaction. Statistic significance was established at  $p < 0.05$ .

TABLE 3. HRV indices before and after intervention

Indices	HRT (n = 13)	ERT (n = 14)	Placebo (n = 13)	p*	p**	p***
<b>meanRR</b>						
Pre	739±51	742±51	766±78	0.79	0.13	0.10
Post	752±79	766±53	758±68			
<b>SDNN</b>						
Pre	133±22	133±29	141±24	0.66	0.95	0.86
Post	132±20	135±27	140±25			
<b>SDANNi</b>						
Pre	125±23	123±28	129±26	0.69	0.79	0.56
Post	119±16	124±29	131±27			
<b>rMSSD</b>						
Pre	22±6	22±6	24±7	0.65	0.40	0.92
Post	23±7	23±7	25±6			
<b>pNN50</b>						
Pre	3.0 (1.7; 5.1)	2.7 (1.6; 4.6)	3.8 (2.2; 6.6)	0.58	0.97	0.58
Post	2.5 (1.4; 4.7)	3.0 (1.7; 5.5)	4.1 (2.2; 7.6)			
<b>P<sub>1</sub></b>						
Pre	57.6 (54.3; 61.1)	59.2 (56.0; 62.7)	58.6 (55.3; 62.2)	0.39	0.03	0.36
Post	58.0 (54.0; 62.3)	63.1 (58.9; 67.6)	60.9 (56.7; 65.4)			
<b>P<sub>2</sub></b>						
Pre	78±11	76±12	79±11	0.79	0.71	0.58
Post	76±9	77±9	79±12			
<b>P<sub>3</sub></b>						
Pre	93±20	89±19	93±16	0.79	0.39	0.92
Post	94±22	91±17	96±17			
<b>MN</b>						
Pre	417±104	415±158	435±120	0.80	0.17	0.66
Post	420±144	462±163	464±106			

Values expressed in milliseconds as mean ± standard deviation (SD) for mean RR, SDNN, SDANNi and rMSSD, and as average and confidence intervals (95% CI) for pNN50. P<sub>2</sub> and P<sub>3</sub> expressed in milliseconds as mean ± standard deviation. P<sub>1</sub> and MN expressed in arbitrary units as mean ± SD for MN and average and 95% CI for P<sub>1</sub>. p\*: group effect; p\*\*: intervention; p\*\*\*: interaction. Statistic significance was established at p < 0.05.

TABLE 4 Pearson correlation coefficient of time domain indices and indices obtained from three-dimensional return maps

	<b>P<sub>1</sub></b>	<b>P<sub>2</sub></b>	<b>P<sub>3</sub></b>	<b>MN</b>
<b>mean RR</b>	0.39**	0.59**	0.28*	0.58**
<b>SDNN</b>	0.04	0.89**	0.28*	0.55**
<b>SDANNi</b>	- 0.04	0.86**	0.15	0.42**
<b>rMSSD</b>	0.39**	0.32*	0.90**	0.86**
<b>pNN50</b>	0.36**	0.25*	0.90**	0.83**

pNN50 and P<sub>1</sub> indices underwent logarithmic transformation.

\* p < 0.05; \*\*p < 0.001

Figure 1

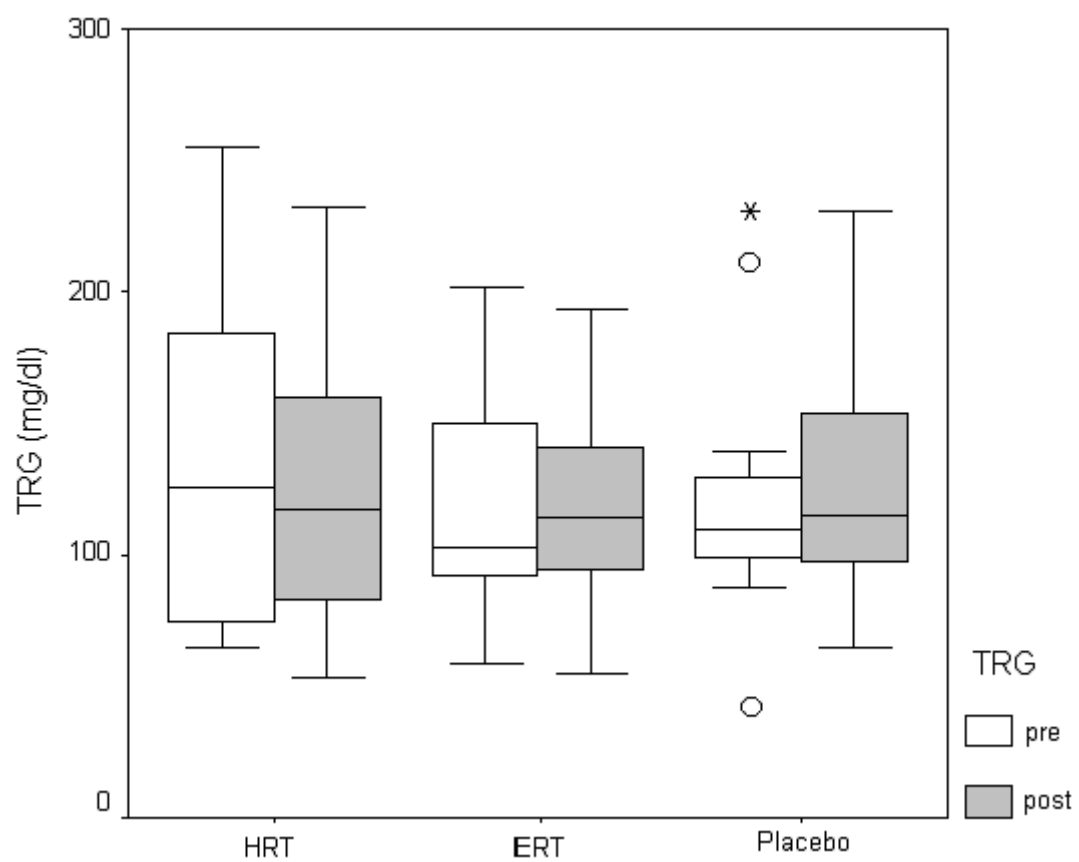


Figure 2

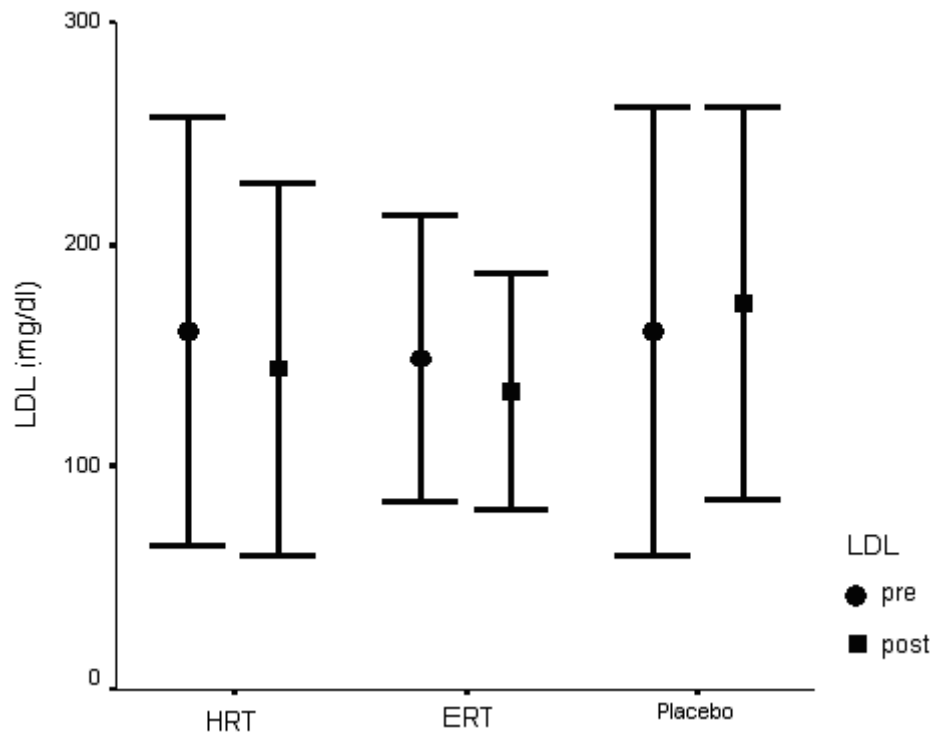
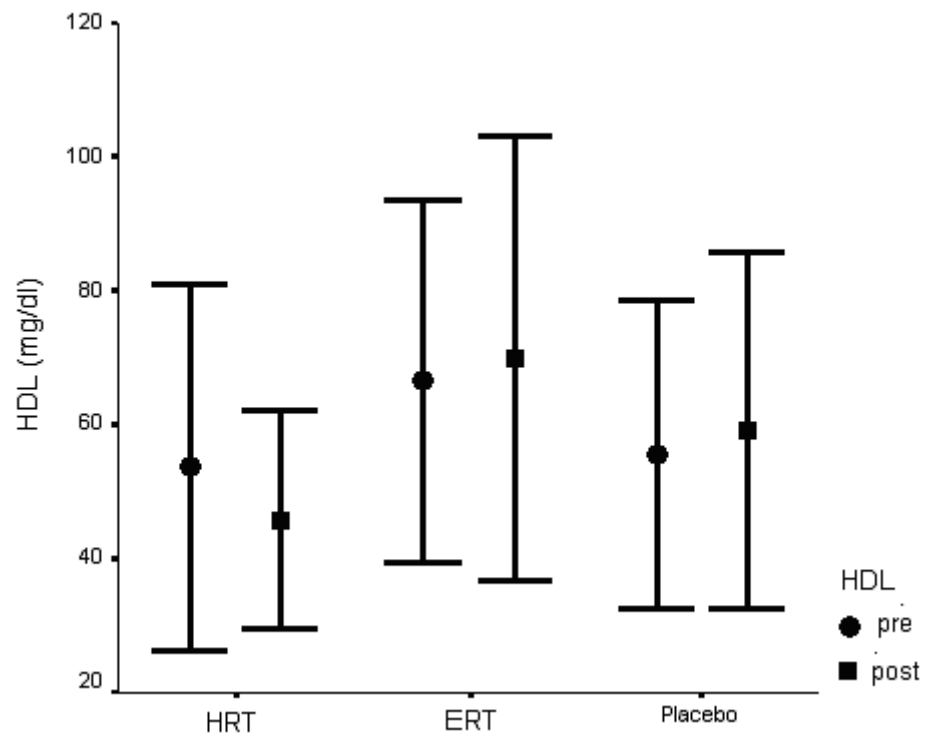




Figure 3



## Legends

Figure 1. Pre- and post-intervention TRG in the three groups studied: HRT, ERT and placebo (median, 25/75 percentile). TRG: triglycerides; HRT: hormone replacement therapy with estradiol and norethisterone; ERT; hormone replacement therapy with estradiol alone.

Figure 2. Pre- and post-intervention LDL-C in the three groups studied: HRT, ERT and placebo ( $M \pm SD$ ). LDL-C: LDL cholesterol. HRT: hormone replacement therapy with estradiol and norethisterone. ERT: hormone replacement therapy with estradiol alone.

Figure 3. Pre- and post-intervention HDL-C in the three groups studied: HRT, ERT and placebo ( $M \pm SD$ ). HDL-C: HDL cholesterol. HRT: hormone replacement therapy with estradiol and norethisterone. ERT: hormone replacement therapy with estradiol alone.