PRISCILA XAVIER DE ARAUJO

**EFEITOS DO CONJUGADO ESTROGÊNIO EQUINO (PREMARIN®)
SOBRE O LEITO VENULAR MESENTÉRICO DE SHR
OVARIECTOMIZADAS: PAPEL DO ENDOTÉLIO**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

São Paulo
2011

PRISCILA XAVIER DE ARAUJO

**EFEITOS DO CONJUGADO ESTROGÊNIO EQUINO (PREMARIN®)
SOBRE O LEITO VENULAR MESENTÉRICO DE SHR
OVARIECTOMIZADAS: PAPEL DO ENDOTÉLIO**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Dra Maria Helena Catteli de
Carvalho

Versão original

São Paulo
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Araujo, Priscila Xavier de.

Efeitos do conjugado estrogênio equino (Premarin®) sobre o leito venular mesentérico de SHR ovariectomizadas: papel do endotélio / Priscila Xavier de Araujo. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Maria Helena Catelli de Carvalho.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Menopausa, Hipertensão, Endotélio.

Versão do título para o inglês: Effect of conjugated equine estrogen (Premarin®) on the mesenteric venular bed of ovariectomized SHR: role of endothelium.

Descritores: 1. Estrógenos 2. Veias 3. Angiotensina II 4. Endotélio vascular 5. Óxido nítrico 6. Estresse oxidativo I. Carvalho, Maria Helena Catelli de II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB0212/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Priscila Xavier de Araujo.

Título da Dissertação: Efeitos do conjugado estrogênio equino (Premarin®) sobre o leito venular mesentérico de SHR ovariectomizadas: papel do endotélio

Orientador(a): Maria Helena Catelli de Carvalho.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob n.º **145** nas fls. **95** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Maria Helena Catelli de Carvalho, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Reatividade de macro e microvasos em patologias experimentais. Papel do endotélio** do qual participam o(s) alunos **Graziela Scialanti Ceravolo, Rosana Marangoni, Fernando Paranaíba Filgueira, Gisele Facholi Bomfim, Luciana dos Reis Rigueiral Giaquinto, Thiago Januário da Costa, Priscila Xavier de Araujo, Cynthia Echem de Souza Pereira, Murilo Lombardo Lopes Pereira**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **06.12.2010, com validade de 3 anos.**

São Paulo, 08 de dezembro de 2010.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário-suplente
CEUA - ICB/USP

***Às lindas e pequenas fêmeas
SHR que deram a vida por este
projeto.***

AGRADECIMENTOS

As meninas do laboratório costumam dizer que eu tenho sorte em meus resultados, mas eu não acredito em sorte, acredito em bênçãos de Deus, e a Ele sou grata.

No laboratório de Hipertensão e Diabetes eu fui uma aluna atípica, não vim sozinha, tinha um “pacotinho extra”, e quando pensei que deveria desistir, eu percebi que estava cercada de pessoas incríveis. Para cada passo, cada tarefa executada, tive a ajuda de alguém. Pessoas que me acolheram, que me ensinaram não somente como seguir protocolos, ou como escrever um *paper*, mas também como ser solidário, como ser companheiro, como ser mais humana. Pessoas que nunca tinham trocado uma fralda, ou dado uma mamadeira, se tornaram verdadeiros pais e mães para que eu pudesse realizar meu trabalho.

Muito obrigada Dra Maria Helena Catelli de Carvalho, pela orientação, pela confiança, pela amizade, pelo tempo dispersado em discutir um resultado, por me ensinar a ser uma cientista.

Dra Zuleica Bruno Fortes, muito obrigada pelo apoio, pelas sugestões, as críticas sempre construtivas, e tempo dispensado na fase final deste trabalho.

À Dra Rita Tostes, pela indicação à Dra M^a Helena e pelo apoio.

Ao Dr. Edson Antunes, e seu aluno Lineu Baldissera Jr, da Universidade de Campinas, por abrirem as portas de seu laboratório.

Dra Maria Aparecida Oliveira, “cumadre Cidinha colega abençoada”, sou grata a você não só pelos ensinamentos na reatividade vascular, mas pela amizade, o companheirismo, as risadas e o “oi colega” de todos os dias (menos nas terças e quintas).

Dra Rosângela Eichler, muito obrigada pelos PCRs, pelos ensinamentos no laboratório, pela parceria no bandeijão, por sua amizade.

Dra Graziela Ceravolo e Dra Eliana Akamine, quero deixar documentado a minha frase de todos os dias: “Grá, Eli, o que seria da minha vida sem vocês?” Muito obrigada por tudo meninas. Pelos protocolos, os tratamentos de animais, por me mostrarem que não preciso me desesperar tanto, pelas dicas, correções e paciência.

Aos funcionários do Laboratório de Hipertensão: Antônio Garcia, Sônia Maria R. Leite, Marta R. da Silva e Manoel Santos da Rocha, pela ajuda nos experimentos, pela amizade e a conversa-fora diária na copinha.

Às secretárias do Departamento de Farmacologia: Julieta Santos, Selma Rigonati, Camila e Mônica pela ajuda nos assuntos burocráticos.

Aos meus grandes amigos do laboratório de Hipertensão e Diabetes: Tiago Januário, Simone Sartoretto, Graziela Neves, Vanessa Oliveira, Beatriz Ponzio, Cinthya Echem, Gisele Bomfim, Eveline Fonseca, Núbia Lobato, Fernando Parnaíba, Paula Honda e Carolina Midori, pelas risadas, os escândalos, as piadas virtuais, a “cassação de assunto”, as imitações, por cuidarem da Laurinha em dias de experimento, por ouvirem “borboletinha ta na cozinha” mil vezes, pelos churrascos, enfim, vocês são a companhia que todo pesquisador gostaria de ter.

Agradeço também à minha família, meus queridos pais Elghislaine Xavier de Araujo e Adalberto Martins de Araujo e meu irmão Humberto Xavier de Araujo, pelo amor, carinho, incentivo e apoio emocional, intelectual e financeiro.

Ao meu esposo Wallace Barbosa de Sousa, pelo amor, paciência, por me acalmar em dias difíceis e pela dedicação.

À minha alegre Bebel (você sempre esta em meus agradecimentos), meu mundo sempre é mais feliz quando você esta!

Aos meus primos Vanessa e Carlos Custódio, e ao meu querido cunhado Douglas Sousa, por me darem abrigo para que eu pudesse terminar este trabalho.

À minha doce e simpática Laura, não só por passar o dia me acompanhando em um experimento e continuar com sorriso no rosto, ou por correr no corredor do ICB como se fosse o melhor parque de diversões do mundo, nem por dormir em um colchonete de uma salinha enquanto eu trabalho, mas simplesmente por existir.

***“Os que esperam no Senhor
voam com asas como a águia,
correm sem nunca se cansar e
vão mais além” (Isaías 40:31)***

RESUMO

Araujo PX. EFEITO DO CONJUGADO ESTROGÊNIO EQUINO (Premarin®) SOBRE O LEITO VENULAR MESENTÉRICO DE SHR OVARECTOMIZADAS: PAPEL DO ENDOTÉLIO [dissertação (Mestrado em Ciências)] – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Ainda existe controvérsia se a terapia hormonal estrogênica (TH) confere benefício ou dano cardiovascular. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da ovariectomia na reatividade do leito venular mesentérico (LVM) de fêmeas SHR à angiotensina II (ANG II), submetidas ou não ao TH com conjugado estrogênio equino (CEE). Foi avaliado o papel do endotélio no mecanismo de ação das doses terapêutica padrão (SD) e mínima (LD), dez vezes menor do que a padrão. Curvas-concentração-efeito à ANG II foram construídas no LVM de fêmeas SHR. A vasoconstrição induzida pela ANG II foi maior nos LVM das OVX e SD comparado à das SHAM e LD. Após perfusão com L-NAME, a resposta à ANG II foi aumentada nos LVM das SHAM e LD. O tratamento com L-NAME não alterou a hipereatividade à ANGII nos LVM das OVX e SD. A biodisponibilidade do NO foi medida por 4,5 diaminofluoresceína diacetato. A produção de NO foi reduzida nos LVM das OVX e SD em relação à dos grupos SHAM e LD. A geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) foi demonstrada pela dihidroetidina. Houve aumento na geração de EROS nos LVM das OVX e SD quando comparado à dos LVM dos SHAM e LD. A incubação do LVM com L-NAME corrigiu a geração de EROS apenas no grupo SD, entretanto a apocinina, catalase e superóxido dismutase reduziram a geração de EROs nos grupos OVX e SD. A expressão do RNAm da eNOS, dos receptores para ANG II, AT1 e AT2 e de estrógeno ER α e GPCR30 foi avaliada por RT-PCR. A eNOS mostrou-se reduzida no LVM das OVX comparada à dos grupo SHAM. Os tratamentos com CEE, SD e LD restauraram a expressão para níveis similares às daquelas do grupo SHAM. Observamos aumento da expressão do receptor AT1 no LVM das OVX quando comparadas às do grupo SHAM. Por

outro lado, a expressão do RNAm do receptor AT₂, ER α e GPR30 no grupo LD mostrou-se aumentada quando comparada com os demais grupos. Em resumo, no presente trabalho demonstramos que o aumento da resposta à ANGII no LVM de SHR OVX e SD pode estar relacionado a diminuição da biodisponibilidade de NO caracterizando assim, disfunção endotelial/vascular. Essas alterações vasculares podem ser devidas a maior geração EROs, tais como ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, produzidas possivelmente por maior atividade da enzima NADPH oxidase no LVM das OVX, e também pelo desacoplamento da eNOS nos LVM de SHR OVX tratadas com SD. O tratamento das OVX SHR com LD corrigiu a disfunção endotelial/vascular aumentando a biodisponibilidade do NO. Isso pode estar relacionado, provavelmente com a correção da geração de EROS, modulação da expressão da enzima eNOS, e dos receptores AT₂ de ANG II e ER α /GPR30 de estrógeno. Esses dados sugerem que a TH com LD possa ser benéfica no leito venular, prevenindo aparecimento de doença venosa, tal como trombose, que é um efeito colateral observado durante a TH. Nossa hipótese é que a TH com CEE possa promover benefício ou não ao LVM, dependendo da dose utilizada.

Palavras-chave: Estrogênio, Veias, Angiotensina II, Endotélio Vascular, Óxido Nítrico, Estresse Oxidativo.

ABSTRACT

Araujo PX..EFFECT OF CONJUGATED EQUINE ESTROGENS (Premarin®) ON THE MESENTERIC VENULAR BED OF OVARIECTOMIZED SHR:ROLE OF ENDOTHELIUM [Masters thesis (Science)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2011.

There is still controversy whether the estrogen hormone therapy confers cardiovascular benefit or harm. The aim of this study was evaluated the effect of conjugated equine estrogen (CEE) treatment, in isolated mesenteric venular bed (MVB) of ovariectomized SHR (OVX), at standard therapeutic (SD) and the ten times lower than standard dose (LD), analyzing the role of the endothelium. Angiotensin II (Ang II) concentration-effect curve was built and the maximum response analyzed. The vasoconstriction induced by ANG II was increased in OVX and SD compared to SHAM and LD. After L-NAME perfusion the MVB of SHAM and LD presented increased response to ANG II. The L-NAME treatment did not change the ANG II responses in MVB of SD and OVX groups. The NO bioavailability was evaluated by 4.5 diaminofluorescein. The NO production was reduced in MVB of OVX and SD compared to SHAM and LD groups. The ROS generation was evaluated by dihidroethidine. ROS were increased in MVB of OVX and SD and SHR when compared to SHAM and LD. The treatment of MVB with L-NAME corrected ROS generation in SD group, on the other hand, apocinin, catalase and superoxide dismutase corrected ROS generation in OVX as well in SD groups. The eNOS, ANG II AT1 and AT2 receptor and estrogen receptors ER α and GPR30 mRNA expression were evaluated by RT-PCR. The eNOS and AT1 receptors expression were increased in OVX MVB when compared with SHAM and was restored by SD and LD treatments. On the other hand, the AT2, ER α and GPR30 receptors expression were increased in LD groups when compared with the other groups. In summary, the OVX and SD MVB presented endothelial/vascular dysfunction characterized by reduced NO

bioavailability, which might be caused by increased ROS generation, such as superoxide anion and hydrogen peroxide, derived from NADPH oxidase in OVX and also uncoupled eNOS in SD rats. The endothelial/vascular dysfunction observed in OVX SHR was restored by LD treatment increasing NO bioavailability. This might be related to decrease in ROS generation and increase in eNOS, AT₂, ER α and GPR30 receptors expression. We might hypothesize that CEE have protective effect in MVB, when administrated at a low dose.

Key words: Estrogen, Veins, Angiotensin II, Vascular Endothelium, Nitric Oxide, Oxidative Stress.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANGII	Angiotensina II
ANGI	Angiotensina I
ANG(1-7)	Angiotensina 1-7
AT1	Receptor de Angiotensina 1
AT2	Receptor de Angiotensina 2
CE	Célula endotelial
CEE	Conjugado estrogênio equino
CCE	Curva concentração efeito
CMLV	Célula músculo liso vascular
COX	Ciclooxigenase
DAF-2	Diaminofluoresceína
DCV	Doença cardiovascular
DHE	Diidroetidina
E	Etídeo
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EDCF	Fator contrátil derivado do endotélio
EDHF	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
EDRF	Fator relaxante derivado do endotélio
EHO	2-hidróxi-etídeo
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ERα	Receptor de estrógeno α
EROS	Espécies reativas de oxigênio
ET	Endotelina
FDA	Food and drug administration
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
GPR30	Receptor de estrógeno acoplado à proteína G 30
I.P.	Intraperitonal
LD	Dose mínima de CEE
LVM	Leito venular mesentérico

L-NAME	Éster de N-metil-L-arginina
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
OVX	Ovariectomizada
PA	Pressão arterial
PE	Polietileno
PGH2	Prostaglandina H ₂
SHAM	Controle falso operado em estro fisiológico
SD	Dose padrão de CEE
SRA	Sistema renina angiotensina
TH	Terapia hormonal
TXA2	Tromboxano A ₂

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Fatores Relaxantes Derivados do Endotélio (EDRF's)	26
Figura 2- Fatores Constrictores Derivados do Endotélio (EDCF's).....	27
Figura 3 - Mecanismos genômicos e não genômicos da produção de NO induzida por estrógeno.....	29
Figura 4 - Vias proteolíticas de síntese e metabolização de angiotensinas.....	33
Figura 5 - Mecanismo de sinalização pelo qual o receptor AT1 modula a disfunção endotelial.	34
Figura 6 - Diferentes tipos de vasos que compõe o sistema vascular	36
Figura 7 - Representação esquemática do sistema para estudo de reatividade do leito venular mesentérico perfundido.....	44
Figura 8 – Dosagem plasmática de estradiol (pg/ml) em fêmeas SHR.	49
Figura 9 – Dosagem plasmática de progesterona (ng/ml) de fêmeas SHR.....	49
Figura 10 - Peso corpóreo (g) de fêmeas SHR.....	51
Figura 11 – Pressão arterial caudal (mmHg) de fêmeas SHR após ovariectomia e tratamento com CEE.	52
Figura 12 – Reatividade do leito venular mesentérico (LVM) perfundido de fêmeas SHR à ANGII.	53
Figura 13 – Reatividade do Leito Venular Mesentérico à ANG II 10 μ M na presença de L-nitro-metil-Ester(L-NAME)10 μ M.....	54
Figura 14 – Produção basal de NO no LVM de fêmeas SHR.	55
Figura 15 – Geração de EROS em vênulas mesentéricas de fêmeas SHR.	56
Figura 16 – Quantificação da produção de EROS em vênulas mesentéricas de fêmeas SHR na presença de L-NAME, apocinina, catalase e superóxido-dismutase.	57
Figura 17– Expressão de RNAm do receptor AT1 para ANG II em vênulas mesentéricas de fêmeas SHR.	58
Figura 18 – Expressão de RNAm do receptor AT2 de vênulas mesentéricas de fêmeas SHR.	59

Figura 19 – Expressão de RNAm da enzima eNOS em vênulas mesentéricas de fêmeas SHR.	60
Figura 20 – Expressão do RNAm do receptor ER α de vênulas mesentéricas de fêmeas SHR.	61
Figura 21 – Expressão do RNAm do receptor de estrógeno GPR30 em vênulas mesentéricas de fêmeas SHR.	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Cronograma experimental.	41
Tabela 2 - Especificações dos oligonucleotídeos utilizados no estudo.....	45
Tabela 3 - Peso do útero de fêmeas SHR SHAM e OVX não tratadas e tratadas com CEE (conjugado estrogênio equino) (SD (9,6µg/kg) e LD (0,96µg/kg)).....	50

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Menopausa e doenças cardiovasculares	21
1.2 Terapia Hormonal	22
1.3 Ações vasculares da TH	25
1.4 Sistema Renina Angiotensina e TH	31
1.5 Sistema Venoso e TH	35
2 OBJETIVOS	39
3 MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1 Animais	40
3.2 Grupos experimentais	40
3.3 Determinação do Estro Fisiológico	40
3.4 Ovariectomia e Tratamento	41
3.5 Dosagem Hormonal	42
3.6 Determinação do Peso Corpóreo	42
3.7 Peso do útero	42
3.8 Determinação da Pressão Arterial (PA) Caudal	42
3.9 Estudo da reatividade do leito venular mesentérico perfundido	43
3.9.1 Curva Concentração Efeito para Angiotensina II	43
3.10 Determinação da expressão de RNAm por PCR em Tempo Real	44
3.11 Medida de produção de NO em vênulas mesentéricas	46
3.12 Determinação da produção de EROS em vênulas mesentéricas	46
3.13 Soluções e drogas	47
3.13.1 Solução Krebs-Henseleit Modificada	47
3.13.2 Drogas	47
3.14 Análises Estatísticas	47
4 RESULTADOS	48
4.1 Caracterização do modelo	48
4.1.1 Dosagens hormonais	48
4.1.2 Peso do útero	50
4.1.3 Peso corpóreo	50
4.1.4 Pressão Arterial Caudal	51
4.2 Estudo de reatividade do leito venular mesentérico perfundido	52
4.2.1 Avaliação da resposta do LVM á ANG II	52

4.2.2 Avaliação da resposta á ANGII na presença do inibidor da Óxido Nítrico Sintase (NOS), L-NAME	54
4.3 Produção de NO em vênulas mesentéricas	55
4.4 Produção de EROs em vênulas mesentéricas.....	56
4.5 Avaliação da expressão de RNAm dos receptores de angiotensina II (AT1 e AT2)	58
4.6 Expressão de RNAm da eNOS	59
4.7 Expressão de RNAm dos receptores de estrógeno	60
4.7.1 ER alfa	61
4.7.2 GPR30	61
5 DISCUSSÃO	63
6 CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIAS	71

1 INTRODUÇÃO

1.1 Menopausa e doenças cardiovasculares

A menopausa é definida como a cessação permanente da menstruação. No início do século passado, apenas 6% das mulheres atingiam esta fase da vida e estima-se que no ano 2025, 23% da população feminina dos países desenvolvidos estarão com mais de 60 anos (Byyny et al., 1996).

Estudos epidemiológicos mostraram que mulheres na pré-menopausa apresentam menor incidência de doenças cardiovasculares (DCV), tais como doença da artéria coronária e hipertensão arterial, quando comparada a homens da mesma idade (Lloyd-Jones et al., 2010). Esta vantagem aparente do sexo feminino tem sido atribuída ao efeito protetor do estrogênio. Além disso, o risco de doença cardiovascular é maior em mulheres na pós-menopausa comparadas a mulheres na pré-menopausa (Orshal e Khalil, 2004) sendo que na Europa, 55% das mulheres na pós-menopausa morriam de DCV (Graham et al., 2007).

A hipertensão arterial sistêmica, caracterizada por elevados níveis na pressão sistólica (acima de 140mmHg) e diastólica (acima de 90 mmHg), é a doença crônico-degenerativa mais comum em países desenvolvidos e representa o principal fator de risco para o desenvolvimento de DCV fatais e não-fatais, tais como aterosclerose e trombose venosa (Brandao et al., 2004; Simões e Schmidt, 1996). No Estado de São Paulo, cerca de 60% das mulheres na pós-menopausa são hipertensas (Lessa, 2001).

Na pós-menopausa ocorre declínio nos níveis hormonais gonadais, principalmente do estrogênio, devido a cessação da função folicular ovariana (Bhavnani et al., 2001). Alterações cardiovasculares também têm sido observadas após a remoção cirúrgica dos ovários de mulheres jovens (Eaker et al., 1993; Yim et al., 1998), indicando que nesse caso o fator idade não está envolvido no aumento da incidência de DCV mas sim, a diminuição ou ausência da produção dos hormônios sexuais produzidos pelos ovários (Bhavnani et al., 2001).

1.2 Terapia Hormonal

Em 1930, o médico e pesquisador Dr. Serge Voronoff iniciou um longo estudo para mostrar a necessidade de tratamento hormonal na menopausa. Seu estudo constituía em transplantes de ovários de macacas em mulheres na pós-menopausa. Após várias mortes, seu estudo concluiu que os sintomas da pós-menopausa eram devidos a diminuição hormonal e que para tratá-los era necessário sintetizar hormônios (Lellouch e Segal, 2001).

Em 1966, o ginecologista Robert Wilson lançou o *best-seller* “Femine Forever”, onde a terapia com hormônio sexual feminino sintético não combinado era descrita como a pílula da juventude, onde toda mulher, independente da idade, poderia ter vida sexual segura e satisfatória pelo resto da vida (Houck, 2003).

O estrógeno, hormônio sexual predominante em mulheres, é comumente usado como contraceptivo e também um dos principais fármacos utilizados na terapia hormonal (TH). O Premarin® (Wyeth®, Newridge, CountyKildore, Irlanda), conjugado estrogênio eqüino (CEE) , derivado de urina de éguas prenhes, é composto por mais de dez componentes estrogênios sendo que a estrona, o equilin, equilenin são as substâncias em maior concentração nesse composto (Berrodin et al., 2009) . Em 1942, o CEE foi a primeira preparação aprovada pelo Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento dos sintomas da pós menopausa tais como: ondas de calor, sudorese noturna, ressecamento e atrofia vaginais. Estrógenos também são utilizados em mulheres na pós-menopausa para tratar incontinência urinária, fadiga, irritabilidade e prevenção de osteoporose.

Em meados de 1970, estudos observacionais como o Nurses Health Study (NHS) sugeriu que a terapia com estrógeno em mulheres na pós-menopausa reduzia o risco de DCV de 35% para 50% (Manson e Martin, 2001). Também a meta-análise de estudos observacionais mostrou que as usuárias de TH apresentavam aproximadamente 33% menos DCV fatal do que aquelas não usuárias (Stefanick, 2005).

Alguns estudos epidemiológicos avaliando a relação entre a TH e DCV mostraram evidências de que o tratamento hormonal era benéfico em mulheres na pós-menopausa, reduzindo significativamente a mortalidade por essas doenças (Stampfer et al., 1991).

Estudos em humanos e em animais, assim como, em tecidos e células também sugerem efeitos benéficos do estrógeno na vasculatura. A administração de estrógeno em indivíduos do sexo feminino e masculino melhorou as respostas vasodilatadoras para acetilcolina em artéria coronária e na isquemia do miocárdio (Rosano et al., 2003). Além disso, estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram efeitos benéficos do 17 β -estradiol promovendo vasodilatação em arteríolas de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (Dantas et al., 1999, 2002; Silva-antonialli et al., 2004) e em aorta de ratos DOCA-sal (Tostes et al., 2000).

Entretanto, o Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study (HERS I e II), estudos multicêntricos e randomizados, demonstraram que mulheres na pós-menopausa com cardiopatia, usuárias da TH com CEE (0,625mg/dia) e acetato de medroxiprogesterona (2,5mg/dia), apresentaram aumento do risco para eventos coronarianos ou morte por DCV quando comparadas com as do grupo placebo, (Hulley et al., 1998). Outro estudo multicêntrico e randomizado o Women's Health Initiative (WHI), realizado com mulheres na pós-menopausa sem histórico de DCV, também não demonstrou efeito cardioprotetor da TH com CEE (0,625mg/dia), combinado ou não com progesterona, quando iniciado dez ou vinte anos após o início da menopausa (Anderson et al., 2004; Rousseauw et al., 2002), sugerindo que a TH não promovia prevenção secundária para a DCV.

É importante destacar que estes estudos sofrem críticas em alguns aspectos, como por exemplo: 1) seleção de pacientes incluindo mulheres com idade média (67 anos) uma década superior àquela em que normalmente a TH é recomendada (Windler et al., 2007); 2) uso de TH por mulheres com doença da artéria coronária pré-existente 3) recrutamento de mulheres utilizando concomitantemente outros fármacos tais como aspirina, redutores de

colesterol, outros hormônios e beta bloqueadores e; 4) a formulação do estrógeno utilizado (Borelli, 2005).

Recentemente, vem sendo sugerido que a TH possa oferecer proteção cardiovascular quando iniciada no período da peri-menopausa para o da pós-menopausa, o que seria denominado “The timing hypothesis”. Alguns autores demonstram, em modelos de aterosclerose, que quando a TH com estrógeno é iniciada antes da queda dos hormônios ovarianos o desenvolvimento da placa de ateroma é reduzido (Pardini, 2007; Sherwood et al., 2007). Dessa forma, quanto antes iniciada a TH maior seria a proteção promovida por este tratamento.

De fato, novas análises do estudo WHI dão suporte para a “timing hypothesis”. Nestes estudos, o tratamento apenas com CEE, foi associado a poucos eventos cardiovasculares (e mortalidade) em mulheres com idade entre 50 a 59 anos, ou naquelas que iniciaram a TH antes dos dez anos do início da menopausa. Entretanto, não houve nenhum efeito protetor em mulheres acima de 60 anos, ou naquelas tratadas apenas com CEE após dez anos do o início da menopausa. Além disso, em mulheres com vinte anos ou mais do início da menopausa, ou setenta anos ou mais de idade, havia aumento de risco cardiovascular particularmente naquelas com TH de CEE associado à progesterona (Rossouw et al., 2007). Esses dados são também consistentes com aquele estudo observacional Nurses Health Study, no que se refere à idade das mulheres e risco cardiovascular (Grodstein et al., 2006). A falta de benefício e os efeitos deletérios da TH em mulheres na pós-menopausa acima de setenta anos, pode ser devido a alterações na parede vascular, na qual o endotélio não mais responde à TH, ou ainda a presença de lesões ateroscleróticas avançadas, onde a TH pode acelerar processo inflamatório, levando a instabilidade na placa e aumentar eventos cardiovasculares nessas mulheres (Clarkson, 2007).

Além da hipótese acima, nos últimos anos são vários os estudos desenvolvidos em humanos que demonstram que a proteção cardiovascular produzida pelos hormônios sexuais está diretamente relacionada com a dose utilizada. Desta forma, a diminuição das doses de 17 β -estradiol ou de CEE na

TH vem sendo associada com a diminuição do risco para desenvolvimento de DCV como aterosclerose, trombose venosa e doença cardíaca coronariana (Ettinger, 2007; Wakatsuki et al., 2004).

Em 2008, Meendering et al., demonstraram que o tratamento de mulheres com CEE na dose 0,0625mg/dia, dose essa dez vezes menor que a dose padrão de hormônios utilizadas na TH, aumentava os efeitos antioxidantes exercidos pelo estrógeno, enquanto a dose de 0,625mg/dia possuía atividade pró-inflamatória e que, além disso, não possuía os efeitos antioxidantes. Em 2004, Wakatsuki et al. demonstraram que doses baixas de CEE não elevavam os triglicerídeos no plasma, resultando em partículas de LDL inalteradas que eram resistentes a oxidação, dessa forma, o efeito antioxidante do estrógeno preservado. Além disso, Windler et al. (2007) demonstraram que a TH com baixa dose (0,325 mg/dia) estava associada com a diminuição da incidência de trombose venosa profunda .

Entretanto, estudos experimentais sobre os mecanismos celulares e moleculares pelos quais os hormônios podem proteger (ou não proteger) os vasos sanguíneos são necessários para definir o papel da TH na pós-menopausa e na doença cardiovascular.

1.3 Ações vasculares da TH

O estrógeno afeta a reatividade vascular através de efeitos diretos nas células endoteliais e parece ser ativo também no músculo liso (Farhat et al., 1996). Receptores para o estrógeno têm sido identificados tanto no músculo liso vascular (Bayard et al., 1995; Losordo et al., 1994; Orimo et al., 1993) como no endotélio (Dantas et al., 2002), reforçando a idéia que os estrogênios podem regular a função das células vasculares.

A célula endotelial, um epitélio pavimentoso que reveste internamente os vasos sanguíneos, ocupa posição estratégica estabelecendo interface com elementos do sangue e com o músculo liso vascular, exerce um papel importante na manutenção da homeostase e saúde vascular. O endotélio regula tônus vascular, promoção e inibição do crescimento vascular,

modulação da agregação plaquetária, coagulação, e inflamação através da síntese e liberação de vários fatores em resposta a estímulos físicos e químicos (Krieger, 2008).

A descoberta da importante participação do endotélio na modulação do tônus vascular foi feita por Furchgott e Zawadzki (1980) em aorta e em arteríolas de coelhos por Carvalho e Furchgott (1981). Eles observaram que a acetilcolina exercia vasodilatação apenas em vasos sanguíneos com endotélio intacto liberando substância (s) que foi (ram) denominada (s) “EDRFs”. A partir desses trabalhos o endotélio passou a ser considerado então um verdadeiro órgão endócrino liberando substâncias vasodilatadoras (*endothelium derived relaxing factors*- EDRFs) e constritoras (*endothelium derived contracting factors*- EDCFs) (Figura 1 e 2).

Dentre os EDRFs destacam-se: o óxido nítrico (NO), a prostaciclina (PGI₂) e fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (EDHF) que podem ser metabólitos do ácido araquidônico, derivados da enzima do citocromo P450, endocanabinóides entre outras substâncias (Vanhoutte, 1997). Dentre os EDCFs podemos citar prostanóides, tromboxano A₂ (TXA₂), prostaglandinas (PGH₂), endotelinas (ET 1, 2 e 3), a angiotensina II (ANG II) e espécies reativas de oxigênio (EROS).

Em condições fisiológicas há predomínio dos EDRFs em relação aos EDCFs e em situações fisiopatológicas, onde há disfunção da célula endotelial, esse perfil se inverte havendo diminuída biodisponibilidade do NO. É importante ressaltar que disfunção endotelial é prognóstico de futuros eventos cardiovasculares (Yeboah et al., 2007).

Figura 1-Fatores Relaxantes Derivados do Endotélio (EDRF's).

LEGENDA: Ne: norepinefrina; 5-HT: serotonina; Thr: trombina; Try: tripsina; ACh: acetilcolina; ET-1: endotelina-1; BK: bradicinina; ADP: difosfato de adenosina; PGI₂: prostaciclina; CE: célula endotelial; CMLV: célula músculo liso vascular; LEI: lâmina elástica interna; eNOS: óxido nítrico endotelial; Cit: citrulina; L-arg: L-arginina; CAM: calmodulina; BH₄: tetrahydropterina; NO: óxido nítrico; NAD(P)H: fosfato de nicotiamina adenina dinucleotídeo; FADH₂: flavina adenina dinucleotídeo; EDHF: fator hiperpolarizante derivado do endotélio; AA: ácido araquidônico; COX: ciclooxigenase; GTP: trifosfato de guanossina; GMPc: monofosfato cíclico de guanossina; GCs: guanilato ciclase solúvel; ATP: trifosfato de adenosina; AMPc: monofosfato cíclico de adenosina; AC: adenilato ciclase; Ca⁺⁺: cálcio; K⁺: potássio.

FONTE: Colaço (2010) com permissão.

arterial. Além disso, o NO pode ser liberado em resposta ao *shear stress* ou a agentes vasodilatadores causando relaxamento vascular (Münzel et al., 2005). A NOS constitutiva inicialmente descoberta no endotélio foi denominada eNOS e aquela presente no cérebro, medula espinal, sistema nervoso central e periférico como nNOS. A isoforma induzida por estímulo inflamatório ou imunológico é conhecida como iNOS. Outras isoformas também foram recentemente descritas como a Mt NOS, encontrada nas mitocôndrias de diversos tipos celulares.

Os mecanismos pelos quais o estrógeno modula a função endotelial não são completamente entendidos. Em parte, essa modulação se faz aumentando a liberação de NO e promovendo vasodilatação. No leito vascular as respostas do estrógeno são mediadas através de seus receptores nucleares (ER α e ER β) e de membrana (GPR30).

O estrógeno induz a liberação de NO através do receptor ER α mediado por mecanismos genômicos e não genômicos (Figura 3). Isto ocorre tanto através da ativação da eNOS, bem como por aumentar a transcrição do RNAm da eNOS (Mendelsohn e Karas, 2007) e prostaciclina sintase (Simoncini et al., 2004).

ER α funcional parece ser importante para função vascular normal e influencia a biodisponibilidade de NO independente da concentração de estrógeno circulante (Mendelsohn e Karas, 2007). Assim, a falta prolongada de estrógeno resulta em redução acentuada dos níveis protéicos de ER α , levando a diminuição da sinalização ER α /eNOS.

Os níveis protéicos de ER α estão fortemente relacionados com a dilatação dependente do endotélio e são menores nas mulheres na pós-menopausa quando comparado com aqueles na pré-menopausa. Portanto, expressão alterada do ER α poderia explicar os resultados negativos obtidos no estudo WHI, no qual, as mulheres estavam aproximadamente dez a vinte anos pós-menopausa. Níveis sustentados de estrógeno durante a transição da menopausa podem preservar a saúde do endotélio vascular e pode prevenir ou atenuar o decréscimo na função endotelial, por manter a expressão e funcionamento do ER α .

O receptor GPR30 é um receptor de membrana acoplado a proteína G que é responsável pelas respostas não genômicas do estradiol. Ou seja, a ativação desses receptores promove respostas independentes da síntese protéica, promovendo rápida vasodilatação, por ativar NOS endotelial (eNOS) e bloquear canais de Ca^{2+} (Simoncini et al., 2004).

Figura 3- Mecanismos genômicos e não genômicos da produção de óxido nítrico (NO) induzida por estrógeno.

LEGENDA: E2: estradiol; NO: óxido nítrico; eNOS: óxido nítrico sintase endotelial. ER α : receptor de estrógeno α .

Fonte: Adaptada de Moreau (2011).

A eNOS pode ser regulada por múltiplos sítios de fosforilação em resíduos de tirosina, serina e treonina, e a desregulação de sua atividade está ligada a uma série de doenças vasculares. A diminuição da biodisponibilidade de NO pode estar ligada a acelerada degradação do NO por espécies reativas de oxigênio (EROS), a diminuição da expressão de eNOS, a falta de substrato ou co-fatores para eNOS, ou alterações na sinalização celular de tal forma que a eNOS não esteja devidamente ativada (desacoplamento da eNOS) (Cai e Harrison, 2000).

A meia-vida de NO e, portanto, sua atividade biológica é decisivamente determinada por EROS, como ânion superóxido (Gryglewski et al., 1986). Ânion superóxido rapidamente reage com NO formando como o peroxinitrito. A reação entre o NO e ânion superóxido produzindo peroxinitrito é de 3 a 4 vezes mais rápida que a dismutação do superóxido pela superóxido dismutase (SOD) (Beckman et al., 1996). Portanto, a formação de peroxinitrito representa uma importante via de produção de superóxido no tecido. O peroxinitrito em altas concentrações é citotóxico e pode causar danos oxidativos a proteínas, lipídios e DNA (Beckman et al., 1996). Estudos também indicam que peroxinitrito pode ter efeitos deletérios sobre a atividade e função da prostaciclina sintase (Zou et al., 1996) e da eNOS (Zou et al., 2002). Outras EROS, como o produto da dismutação do ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio, e ácido hipocloroso liberado pela ativação dos neutrófilos, têm alta capacidade oxidante, o que contribuirá ainda mais para estresse oxidativo no tecido vascular (Münzel, et al., 2005).

No organismo existe uma variedade de fontes intracelulares geradoras de EROS. Estas fontes incluem, mas não estão limitadas às enzimas NADPH oxidase, ciclooxigenase e xantina oxidase (Freeman e Crapo, 1982), sendo a NADPH oxidase a principal enzima geradora de EROS no sistema cardiovascular (Khaper et al., 2001).

Alguns trabalhos tem demonstrado que o estrógeno exerce papel modulatório na atividade e expressão da ciclooxigenase (Davidge e Zhang, 1998) e também na geração de ânion superóxido em ratas SHR através da modulação na expressão dos receptores AT1 (Wassman et al. 2001).

Outro provável mecanismo pelo qual o estrógeno pode diminuir a concentração de radicais livres é através do aumento da expressão de enzimas antioxidantes, como a SOD e a catalase (CAT). Dantas et al. (2002) demonstraram que a retirada dos hormônios ovarianos pela ovariectomia acarretou em aumento da concentração de ânion superóxido no leito mesentérico arteriolar isolado de fêmeas SHR. Neste trabalho, o tratamento das preparações de fêmeas SHR com SOD restaurou a sensibilidade à acetilcolina diminuída pela ovariectomia. Nenhuma alteração de sensibilidade à

acetilcolina foi observada em preparações isoladas de fêmeas em estro fisiológico, sugerindo que na presença de estrógeno há menor geração de ânion superóxido (Dantas et al., 1999). Portanto, a reduzida vasodilatação dependente do endotélio, caracterizada pela perda da produção do NO derivado do endotélio é determinante da disfunção endotelial (Furchgott e Zawadzki, 1980).

O envelhecimento está associado com o declínio na vasodilatação dependente do endotélio, tanto em homens quanto em mulheres (Celermajer et al., 1994). Nos homens, esse declínio está relacionado a idade e tem início relativamente mais cedo; em mulheres, entretanto, a diminuição na função endotelial é evidente somente após a transição da pós-menopausa, quando ela declina e torna-se similar àquela dos homens na sexta década da vida (Celermajer et al., 1994). Esses dados sugerem um efeito benéfico do estrógeno no endotélio vascular.

Resultados de estudos desenvolvidos tanto em animais quanto em mulheres na pós-menopausa são consistentes com a noção que o estrógeno melhora a função do endotélio vascular e aumenta a biodisponibilidade do NO. Dessa forma, a vasodilatação endotélio-dependente, as concentrações plasmáticas de nitrato/nitrito os quais são marcadores da produção de NO, e as respostas vasoconstritoras ao bloqueio agudo da eNOS estão todos aumentados na vasculatura periférica após exposição ao estrógeno (Best et al., 1998; Kawano et al., 1997; Lieberman et al., 1994).

Além disso, em mulheres na pré-menopausa, a vasodilatação endotélio-dependente varia de acordo com os níveis circulantes de hormônios sexuais, sendo maior durante a fase folicular mais tardia (alta concentração de estrógeno) comparada com a fase folicular iniciais (baixo estrógeno), fases essas do ciclo menstrual (Hashimoto et al., 1995).

1.4 Sistema Renina Angiotensina e TH

O sistema renina angiotensina (SRA), outro importante sistema na regulação do tônus e crescimento da parede vascular, também parece sofrer

influência dos hormônios sexuais femininos (Dantas et al., 2002). Entretanto, informações limitantes e contraditórias relatando a influência do estrógeno sobre o SRA tem sido encontradas na literatura. Por um lado, vem sendo mostrado que o estrógeno estimula o SRA aumentando os níveis de renina e angiotensina I (ANG I) tecidual e circulante (Brosnihan et al., 1999). A ANG I é convertida, através da ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) em ANG II, um potente vasoconstritor (Figura 4). Logo, o aumento dos níveis plasmáticos de renina e ANG I induzido pelo estrógeno pode levar ao aumento dos níveis de ANG II circulante, e consequentemente promover aumento da resistência vascular periférica. Neste caso, o uso de estrógeno pode ser considerado como fator de risco para o sistema cardiovascular. Alguns autores tem inclusive proposto que este é o modo pelo qual os anticoncepcionais orais podem elevar a pressão arterial (Kaplan, 1995).

Por outro lado, tem sido demonstrado que o estrógeno diminui a atividade da ECA tanto em ratas ovariectomizadas (Brosnihan et al., 1999) quanto em mulheres na pós-menopausa (Proudlar et al., 1995).

A atividade da ECA diminuída provoca redução dos níveis de ANG II e consequentemente aumento dos níveis de ANG I. Está bem estabelecido que o aumento dos níveis plasmáticos e teciduais de ANG I resulta em aumento da formação do agente vasodilatador angiotensina (1-7) (ANG (1-7), pela ação das endopeptidases sobre a ANG I (Campbell et al., 1993). Desta forma, a redução da atividade da ECA em presença de altas concentrações de ANG I, como ocorre na presença de estrógeno, promove inversão da quantidade dos peptídeos formados a partir da ANG I, ou seja, diminuição da formação de ANG II e aumento da geração de ANG (1-7). De fato, Brosnihan et al. (1999) observaram em ratas ovariectomizadas que, após o tratamento crônico (3 semanas) com estrógeno estas ratas passaram a apresentar diminuição da atividade da ECA e menor concentração de ANG II circulante, enquanto os níveis plasmáticos de ANG (1-7) foram aumentados. Considerando que a ANG (1-7) é apontada como peptídeo vasodilatador e anti-hipertensivo, o balanço final dos efeitos promovidos pelo estrógeno no SRA pode ser considerado benéfico para o sistema cardiovascular.

Figura 4 - Vias proteolíticas de síntese e metabolização de angiotensinas.

LEGENDA: Ap: aminopeptidases; Ang I: angiotensina I; ANG II: angiotensina II; Ang III: angiotensina III; Ang IV: angiotensina IV; Ang 1-5: Angiotensina 1-5; Ang 1-7: Angiotensina 1-7; ECA: enzima conversora de angiotensina; ECA 2: enzima conversora da angiotensina 2; EPN endopeptidase.

FONTE: Higuchi et al. (2007).

A ANG II promove suas ações principalmente através de sua ligação a dois receptores de membrana, AT1 e AT2, que ativam múltiplas vias de transdução intracelular, embora já tenham sido clonados os receptores AT3 e AT4 (Sadoshima, 1998; Siragy, 2000).

O receptor AT1 medeia a maioria das respostas fisiológicas e patológicas exercidas pela ANGII, além disso, este receptor é predominantemente expresso em células do músculo liso vascular. Através deste receptor a ANGII ativa vias de sinalizações citoplasmáticas que podem

contribuir para o aumento da resistência vascular periférica (Brosnihan et al., 1999) e remodelamento vascular (Griendling et al., 1997). Além disso, há evidências que a sinalização dos receptores AT1 em células endoteliais induz disfunção endotelial provavelmente por diminuir a função vasodilatadora do NO (Ohtsu et al., 2006). Embora muito pouco se saiba sobre a sinalização da ANG II no endotélio, sugere-se que o receptor AT1 endotelial possa participar do equilíbrio entre NO e EROs (Watanabe et al., 2005). Neste contexto, o aumento da geração de EROs desempenha um papel importante na gênese da disfunção endotelial e a ativação do receptor AT1 é fundamental neste processo (Luscher et al., 2000) (Figura 5).

Figura 5 - Mecanismo de sinalização pelo qual o receptor AT1 modula a disfunção endotelial.

LEGENDA: AngII: angiotensina II; AT1: receptor de angiotensina II; BH4: tetrahydrobiopterina; CaM: calmodulina; CE: célula endotelial; DHFR: dihidrofosfato redutase; eNOS: NO sintase endotelial; EROs: espécies reativas de oxigênio; ERK: quinase de regulação de sinalização extracelular; Gq: proteína G quiminescente; ICAM-1: molécula de adesão intracelular – 1; NFκB: fator nuclear κB; NIK: quinase de indução de NFκB; NO: óxido nítrico; ONOO•:

peroxinitrito; PARP: poli (ADP-ribose) polimerase; Ser1179: sítio de fosforilação da eNOS; VCAM-1: molécula de adesão vascular – 1;

3NT: 3 nitrotirosina.

FONTE: Adaptada de Higuchi et al. (2007).

Vale ressaltar que a disfunção endotelial é fator desencadeante de fenômenos tromboembólicos (Esmon, 2009) e que a ativação do SRA tem sido relacionada ao estágio pró-trombótico associado com a hipertensão (Brown e Vaughan, 2000; Nadar e Lip, 2003). De fato, há evidências clínicas de que pacientes hipertensos que se tratam com inibidor da ECA ou bloqueador do receptor AT1 apresentam menor incidência de fenômenos tromboembólicos (Skowasch et al., 2006; Monton et al., 2000). Além disso, a administração de ANGII em animais pode induzir eventos trombóticos em artérias (Kaminska et al., 2005) e arteríolas (Senchenkova et al., 2010).

Por outro lado, os efeitos vasodilatadores mediados pela ANG II parecem ocorrer via receptor AT2. Foi demonstrado que a ANG II via receptor AT2 promove aumento de NO/GMPc em cultura de células endoteliais (Chaki e Inagami, 1993; Pueyo et al., 2000), e *in vivo* em vasos sanguíneos de ratos (Siragy e Carey, 1996, 1997, 1999; Siragy, 2000; Walters et al., 2005), e de camundongos (Tsutsumi et al., 1998).

Tem sido descrito que a ANG II pode contrair vênulas do leito mesentérico de ratos (Toledo et al., 2003; Warner, 1990). Fernandes et al. (2005) demonstraram em machos Wistar que a ANG II induz constrição venular que pode ser mediada por receptores AT1 e AT2 e modulada pela produção basal de NO. Além disso, Loiola et al. (2011) demonstraram que em animais SHR há aumento na venoconstrição induzida por ANG II e este efeito pode ser modulado por metabólitos da COX e pelo receptor de bradicinina B2.

1.5 Sistema Venoso e TH

O sistema vascular é formado por vários tipos de vasos, como artérias, capilares e veias. Esses vasos são estruturalmente distintos e adaptados a funções específicas. São formados por camadas de tecido conjuntivo, tecido

muscular liso e endotélio. Veias têm estrutura semelhante às artérias, porém, com menor quantidade de tecido, diferenciando no tamanho da luz e na espessura de tecido muscular liso (Figura 6). Os capilares, por sua vez, são formados por células endoteliais e se coalescem formando vênulas – vasos de parede delgada – e estas se unem formando veias (Belloni, 1999; Sjöstrand, 1953).

Figura 6 - Diferentes tipos de vasos sanguíneos que compõe o sistema vascular

FONTE: Adaptada de Torres-Vázquez et al. (2003).

As veias são vasos de capacitância, devido à presença de fibras elásticas, permitindo que esses vasos funcionem como reservatório de sangue. Quando há necessidade de aumentar o volume sanguíneo para determinados órgãos, ocorre venoconstrição, resultando em aumento de volume de sangue disponível para atender as necessidades metabólicas dos tecidos. De forma contrária, quando há pouca atividade, grande quantidade de sangue é armazenada nas veias pelo estiramento das suas paredes. Na venoconstrição

chega mais sangue ao coração, aumentando assim o retorno venoso e a força de contração (Monos et al., 1995).

O sistema venoso, formado por veias e vênulas, foi considerado por muitos anos apenas como uma via passiva de condução do sangue dos tecidos para o coração, porém, sabe-se que este leito tem a capacidade de controlar o tônus venoso, influenciando diretamente na pressão atrial direita e pressão de enchimento cardíaco, alterando o débito cardíaco e o desempenho cardíaco (Lanner et al., 2007), conferindo ao sistema venoso um importante papel na manutenção da homeostasia do sistema cardiovascular.

Alguns estudos comprovam que na hipertensão arterial humana e animal há aumento da complacência venosa e da capacitância do compartimento venoso, mostrando que alterações no sistema venoso podem desempenhar papel importante no desenvolvimento da hipertensão (Fernandes et al., 2005; Greenberg e Bohr, 1975; Ito et al., 1986; Loiola et al., 2011; Widgren et al., 1991)

Embora os efeitos do estrogênio sobre as artérias, tenham sido muito estudados as informações sobre seus efeitos no leito venoso são escassas. Isto é surpreendente, tendo em vista que um dos efeitos colaterais que ocorrem em mulheres tratadas com compostos estrogênicos é a trombose venosa.

Como se observa nas artérias, a aplicação aguda de 17β -estradiol *in vitro* diminui o tônus de anéis de veia femoral, isoladas de fêmeas suínas, de forma dependente do endotélio. Esse relaxamento ao 17β -estradiol é mediado pelo NO e também envolve a ativação de canais de potássio (Bracamonte e Miller, 2002). Em contraste com estes resultados, estudos demonstram que a aplicação aguda de 17β -estradiol não causa relaxamento em veia safena humana derivadas de pacientes com aterosclerose, provavelmente pela presença de disfunção endotelial (Haas et al., 2007).

Em 2000, Ceballos et al. utilizando técnica de pletismografia de oclusão venosa, demonstraram que a perfusão com bradicinina provocava maior aumento no diâmetro da veia dorsal da mão de mulheres na pós-menopausa, após 6 meses de tratamento com CEE e progesterona em comparação com mulheres não tratadas. Este efeito foi perdido quando tratamento foi

interrompido. Portanto, a TH parece aumentar as respostas dependentes do endotélio em veia cutânea de mulheres.

Baseado na revisão acima pode ser verificado que a maioria dos trabalhos descritos na literatura foi desenvolvida com 17β -estradiol e leito arterial, tanto em humanos quanto em animais. Entretanto, pouco se sabe sobre o efeito do CEE em vasos sanguíneos do leito venoso, muito embora o CEE seja uma das TH mais utilizadas mundialmente.

OBJETIVOS

Estudar os efeitos da ovariectomia na reatividade do leito venular mesentérico de fêmeas SHR à ANG II, submetidas ou não ao tratamento hormonal com CEE. Foram avaliados os mecanismos de ação de duas diferentes doses desse composto estrogênio, analisando a participação do endotélio.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O protocolo para uso de animais de experimentação está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do ICB. (Protocolo nº 145 nas fls. 95 do livro 02)

2.1 Animais

Foram utilizadas ratas espontaneamente hipertensas (SHR) do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas com 12 semanas de idade e pesando em média 185g. As fêmeas foram alojadas no Biotério do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP) do grupo de Hipertensão e Diabetes e mantidas em caixas de polipropileno, acondicionadas em ambiente com temperatura controlada de 22 ± 2 °C e ciclo claro-escuro de 12h, com livre acesso à água e alimento.

2.2 Grupos experimentais

Foram utilizados os seguintes grupos experimentais:

SHAM: grupo controle - fêmeas SHR falso operadas e em estro-fisiológico.

OVX: fêmeas SHR ovariectomizadas;

SD: fêmeas SHR OVX tratadas com conjugado estrogênio equino (CEE) na dose 9,6µg/Kg/dia.

LD: fêmeas SHR OVX tratadas com CEE na dose 0,96µg/Kg/dia.

2.3 Determinação do Estro Fisiológico

Após realização do esfregaço vaginal, o estro fisiológico foi determinado pela observação, ao microscópio óptico, das alterações celulares cíclicas no

aparelho reprodutor feminino, refletidas na secreção vaginal. O exame celular desta secreção permite diferenciar as fases do ciclo estral das fêmeas (Wayntorth, 1980).

2.4 Ovariectomia e Tratamento

Após anestesia com mistura de cetamina (113mg/kg) e xilazina (7,4 mg/kg) na dose de 0,15mL/100g, intra-muscular, fêmeas SHR com 12 semanas de idade foram submetidas à incisão abdominal e tiveram os ovários totalmente removidos. Trinta dias após a cirurgia essas fêmeas foram tratadas com CEE, por via oral (gavagem), administrado no período da tarde por 15 dias. A drágea de CEE foi triturada e suspendida em água filtrada. O grupo SD foi tratado com 9,6µg/Kg/dia de CEE dose equivalente a 0,625mg/65kg/dia utilizada em humanos, enquanto o LD foi tratado com 0,96µg/Kg/dia. Após os 15 dias de TH foram realizados os experimentos de dosagens hormonais, peso corpóreo, medida de pressão arterial caudal, pesos dos útero úmido e seco, expressão de RNAm por PCR em tempo real, reatividade venular mesentérica, medida de produção de NO e de EROs (Tabela 1).

Tabela 1- Cronograma experimental.

12 SEMANAS	16 SEMANAS	18 SEMANAS
SHAM	SHAM	Experimentos
OVX	OVX	Experimentos
	SD (9,6µg/Kg/dia) de CEE	
	LD (0,966µg/Kg/dia) de CEE	

SHAM: grupo controle; OVX: grupo ovariectomizado; CEE: Conjugado Estrogênio Equino; SD: grupo tratado com CEE 9,6µg/kg/dia; LD: grupo tratado com 0,96µg/kg/dia.

FONTE: Araujo (2011).

2.5 Dosagem Hormonal

As concentrações de estrógeno e progesterona foram determinadas no plasma de fêmeas de todos os grupos experimentais antes e após o período de TH, utilizando-se kit de enzima imunoensaio (Siemens Coat-A-Count Progesterona e Coat-A-Count estradiol).

2.6 Determinação do Peso Corpóreo

Para avaliar se a TH poderia alterar o peso corpóreo(g) das fêmeas, as mesmas foram pesadas antes e após o tratamento com CEE.

2.7 Peso do útero

As fêmeas foram anestesiadas com tiopental sódico (50mg/Kg/IP). Após o nível cirúrgico de anestesia ter sido atingido, as fêmeas foram submetidas à laparotomia e o útero foi removido, pesado (peso úmido) e colocado por 24 horas em estufa a 37 °C para secagem (peso seco). Os resultados foram expressos em miligramas de útero por centímetro de tibia (mg/cm).

2.8 Determinação da pressão arterial (PA) caudal

A PA caudal foi determinada por método indireto de pletismografia. As medidas foram realizadas antes da ovariectomia, 30 dias após a cirurgia e após a TH. Um oclisor e um sensor foram ajustados na porção proximal da cauda da rata, acoplados ao esfigmomanômetro elétrico PE-300 conectado a um amplificador e a um sistema de aquisição de dados (PowerLab/4S,

ADInstrument Pty Ltd, Austrália). As fêmeas foram aquecidas por 10 minutos a 40 °C e colocadas em cilindro de contenção com abertura para a cauda e o focinho. O valor final da PA caudal (mmHg) de cada fêmea representa a média de três medidas sequenciais.

2.9 Estudo da reatividade do leito venular mesentérico perfundido

2.9.1 Curva concentração efeito (CCE) para Angiotensina II

A perfusão do leito venular mesentérico (mmHg) foi realizada de acordo com procedimento descrito por Warner (1990). Fêmeas dos quatro grupos experimentais foram anestesiadas com tiopental (50mg/Kg, IP), foi realizada laparotomia e o leito mesentérico vascular foi exposto. Após este procedimento, um cateter de polietileno (PE 10) foi introduzido na veia porta iniciando-se a perfusão do leito venular mesentérico (LVM) de forma retrógrada, e em seguida o intestino foi removido. Utilizando-se bomba peristáltica (Miniplus 3- Gilson/ França) o LVM foi perfundido com solução de Krebs-Henseleit, pH 7,4, na temperatura de 37 °C, gaseificado com mistura de 95% de O₂ e 5% de CO₂ por 40 min, sendo que nos 20 min iniciais num fluxo contínuo de 2ml/min e no restante do tempo num fluxo de 4mL/min. Após este período de equilíbrio da preparação, o LVM foi perfundido com solução de Krebs-Henseleit contendo fenilefrina 10μM e após 10 minutos de estabilização da contração, foi realizada a CCE não cumulativa para ANG II, nas concentrações de 10nM-100μM, na presença de fenilefrina, com intuito de evitar a dessensibilização do receptor AT₁ de ANG II. A ANG II foi administrada *in bolus*, com intervalo de 15 minutos entre as concentrações. Avaliamos também a CCE para ANG II, na presença do inibidor da NO sintase, L-nitro arginina metil-ester (L-NAME 10μM). O L-NAME foi adicionado juntamente com a fenilefrina e permaneceu em contato com a preparação durante todo o experimento. As alterações na pressão de perfusão foram mensuradas por um transdutor de pressão conectado ao sistema de aquisição de dados (Power Lab 4S, ADInstruments Pty Ltda., Castle Hill, Australia) (Figura 7). Os resultados

representam a diferença (Δ) obtidos entre a pressão de perfusão basal e estimulada (mmHg), e foram expressos em histograma de barra na concentração 10 μ M, por ser a concentração que atingiu a resposta máxima (Rmax) da preparação. Vale ressaltar que apesar de uma CCE para ANG II ter sido realizada, as preparações do LVM responderam somente nas concentrações de 1 μ M, 10 μ M e 100 μ M, entretanto, para que isso ocorresse, foi necessária estimulação a partir das concentrações menores.

Figura 7 - Representação esquemática do sistema para estudo de reatividade do leito venular mesentérico perfundido.

FONTE: modificado de Costa (1988) por Araujo, 2011. Com permissão.

2.10 Determinação da expressão de RNAm por PCR em Tempo Real

A expressão de RNAm dos receptores AT1 e AT2 para ANGII, para os receptores de estrógeno GPR30 e ER α , e para a isoforma da NOS, a eNOS, pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real-time PCR) foi

avaliada no LVM. Para tal, as vênulas foram removidas rapidamente e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80 °C até o processamento. O RNA total (tRNA) foi obtido utilizando o método de Trizol (Invitrogen-EUA). Após a obtenção do RNA, a integridade das amostras foi verificada pela presença das bandas 18S e 28S. As amostras foram então submetidas à digestão do DNA remanescente. Após esse procedimento, 2 mg do RNA total de cada amostra foram utilizadas para obtenção da fita de cDNA pelo método da transcriptase reversa (reação de RT). A reação em cadeia de polimerase em tempo real foi realizada em um volume final de 12,5 µL contendo oligonucleotídeos específicos (tabela 2), que foram construídos a partir de informações retiradas do GENE BANK. A especificidade da reação com SYBR® green foi confirmada pela análise da curva de dissociação. As reações de PCR foram realizadas e analisadas usando o sistema Corbett Research (Corbett Life Sciences, Australia). A expressão de RNAm foi quantificada utilizando o cálculo do $\Delta\Delta C_t$ ("cycle threshold"). A normalização das amostras foi realizada utilizando o cDNA sintetizado a partir do RNAm de β actina (controle interno padronizado). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias normalizadas pela expressão de RNAm de β -actina.

Tabela 2 – Especificações dos oligonucleotídeos utilizados no estudo

	Pares de bases (tamanho do produto de PCR)	de Sequências
AT1	141 pb	Sense CACTTTCCTGGATGTGCTGA Antisense CCCAGAAAGCCGTAGAACAG
AT2	94pb	Sense CTGCTGGGATTGCCTTAATGA Antisense

		AGCAGATGTTTTCTGATTCCAAAGT
ER α	90pb	Sense GAACGAGCCCAGCGCCTACG Antisense TCTCGGCCATTCTGGCGTCG
GPR30	108pb	Sense CGCCGTGCTCTGCACCTTCA Antisense GCTTTGGCCAGCGCCAGGTA
eNOS	98pb	Sense GCCAGGAGGGACTGCAGT Antisense GCGGGGAAGTGATGTCCA

FONTE: "Nacional Center for Biotechnology Information".

2.11 Medida de produção de NO em vênulas mesentéricas

O NO foi medido utilizando-se diacetato de 4,5 diaminofluoresceína (DAF-2), um marcador fluorescente sensível ao NO (KOJIMA et al., 1998). As fêmeas foram anestesiadas, o mesentério foi exposto e as vênulas foram rapidamente dissecadas, congeladas e cobertas com meio para congelamento. Utilizando-se um criostato (Leica, Alemanha), cortes transversais das vênulas (20 μ m) foram obtidos, coletados em lâminas de vidro e incubados a 37 °C com DAF-2 (12,5 μ M) em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4) contendo CaCl₂ (0,45mM). Imagens digitais foram capturadas por um microscópio (Nikon E 1000, Japão) equipado com epifluorescência. As imagens foram analisadas com o programa Image (NIH, EUA), medindo-se a densidade óptica média da fluorescência observada no endotélio. Os níveis de fluorescência foram normalizados pela área e expressos em unidade arbitrárias (UA).

2.12 Determinação da produção de EROS em vênulas mesentéricas

EROS foram detectadas utilizando-se dihidroetidina (DHE). A DHE quando oxidada dá origem a dois produtos fluorescentes, etídeo (E) e 2-hidróxi

etídeo (EHO), os quais têm afinidade pelo DNA nuclear. A formação do EHO deve-se principalmente a oxidação da DHE pelo ânion superóxido, enquanto o E é formado pela oxidação da DHE por outras EROs como o peróxido de hidrogênio.

As vênulas foram dissecadas, imersas em meio para congelamento e congeladas à -80 °C. Foram feitos cortes transversais de 7 µm em criostato e foram colocadas em lâminas salinizadas. Os cortes das vênulas foram incubados com 50µL de DHE 5µM (30 min, a 37 °C) em câmara úmida e protegidos da luz. Após este período as lâminas foram observadas em microscópio óptico (Nikon E 1000, Japão) equipado com filtro para rodamina e câmara fotográfica, utilizando uma objetiva para fluorescência com aumento de 40X e as imagens obtidas foram analisadas com o programa Image (NIH, EUA). A localização da geração de EROs foi realizada visualmente em três áreas diferentes de cada corte, onde haviam núcleos marcados com fluorescência vermelha proveniente dos produtos de oxidação da DHE. Para os bloqueios, foram utilizados o L-NAME 10-4M; Apocinina 10-3M; Catalase 100U/mL e PEG - Superóxido-Dismutase 150U/mL.

2.13 Soluções e drogas

2.13.1 Solução Krebs-Henseleit Modificada

Composição em mM: NaCl 113,0; KCl 4,7; CaCl 2,5; KH₂PO₄ 1,18; MgSO₄ 1,17; NaHCO₃ 25,0; Glicose 11,0; EDTA 0,02 (sais: Merck S/A, Ind. Química, Rio de Janeiro – RJ, Brasil/ Glicose: Ecibra Equipamentos Científicos do Brasil) e o pH foi mantido em torno de 7,4.

2.13.2 Drogas

Angiotensina II – Sigma, St Louis, USA.

Apocinina (acetovanilona) – Sigma, Steinheim, Germany.

Catalase - Sigma, St Louis, USA.

Conjugado Estrogênio Equino (Premarin[®])

Fenilefrina - Sigma, St Louis, USA.

L-NAME - Sigma, St Louis, USA.

PEG-Superóxido-dismutase - Sigma, St Louis, USA.

2.14 Análises Estatísticas

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (epm). Os resultados foram avaliados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do teste de múltiplas comparações Turkey-Kramer. O nível de significância mínima aceitável foi $p < 0,05$. Para análise dos bloqueios com DHE os resultados foram avaliados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do teste de comparação de todos os grupos com o controle Dunnet.

3 RESULTADOS

3.1 Caracterização do modelo

3.1.1 Dosagens hormonais

A eficácia da ovariectomia, assim como a dos tratamentos hormonais foi avaliada através da dosagem dos hormônios sexuais femininos determinados no plasma das fêmeas de todos os grupos experimentais. Como pode ser observada na figura 8, a concentração de 17β -estradiol (pg/mL) foi reduzida nas OVX ($17,52 \pm 0,4$ pg/mL) quando comparada à das fêmeas SHAM ($30,11 \pm 1,05$ pg/mL). Entretanto, houve aumento significativo dos níveis plasmáticos de 17β -estradiol após o tratamento com SD ($113,1 \pm 13,3^{* \#}$ pg/mL) enquanto nas fêmeas tratadas com LD ($32,2 \pm 6,95$ pg/mL) a dosagem foi similar àquelas observadas no grupo SHAM. Com relação à progesterona, a concentração plasmática diminuiu significante após a ovariectomia, e o tratamento com CEE, em ambas as doses, não promoveu nenhuma alteração na concentração da mesma (Figura 9).

Figura 8 – Dosagem plasmática de 17β -estradiol em fêmeas SHR

As barras representam as concentrações plasmáticas de 17β -estradiol em pg/mL de fêmeas controle (SHAM), ovariectomizadas (OVX) e OVX tratadas com diferentes doses de CEE (conjugado estrogênio eqüino) [SD (9,6 μ g/kg) e LD (0,96 μ g/kg)]. Os valores foram expressos como média $\pm$ epm. O número de animais utilizados por grupo encontra-se dentro das barras. * $P < 0,05$ em relação ao SHAM. # $P < 0,05$ em relação ao SHAM.

FONTE: Araujo (2011).

Figura 9 – Dosagem plasmática de progesterona em fêmeas SHR

As barras representam as concentrações plasmáticas de progesterona em fêmeas: controle (SHAM), ovariectomizadas (OVX) e OVX tratadas com diferentes doses de CEE (conjugado estrogênio eqüino) [SD (9,6 μ g/kg) e LD (0,96 μ g/kg)]. Os valores foram expressos como média $\pm$ epm. O número de animais utilizados por grupo encontra-se dentro das barras. * $P < 0,05$ em relação ao SHAM.

FONTE: Araujo (2011).

3.1.2 Peso do útero

A eficácia da ovariectomia foi analisada por meio do peso do útero úmido e seco, conforme indicado na tabela 3. As fêmeas OVX apresentaram diminuição do peso uterino (seco e úmido) em relação ao do grupo SHAM, confirmando a eficácia cirúrgica de remoção dos ovários. O tratamento com CEE SD e LD aumentou o peso do útero úmido/seco das fêmeas, porém não para níveis semelhantes aos dos observados nas SHAM.

Tabela 3 - Peso do útero de fêmeas SHR SHAM e OVX não tratadas e tratadas com CEE (conjugado estrogênio equino) (SD (9,6µg/kg) e LD (0,96µg/kg))

Grupos	Peso do útero úmido (mg/cm tibia)	Peso do útero seco (mg/cm tibia)
SHAM	9,10±0,1 (n=7)	2,65±0,1 (n=7)
OVX	1,54±0,1* (n=6)	0,75±0,1* (n=6)
SD	8,17±0,2#* (n=8)	2,32±0,1# (n=8)
LD	7,58±0,4#* (n=6)	2,08±0,2# (n=6)

Os valores foram expressos como média ± epm e n representa o número de animais por grupo * p<0,05 vs SHAM. # p<0,05 vs OVX.

FONTE: Araujo (2011).

3.1.3 Peso corpóreo

As fêmeas OVX (242±1,63g*) apresentaram aumento do peso corpóreo após quarenta e cinco dias de ovariectomia quando comparadas com o das fêmeas SHAM (190,9±2,35g) de mesma idade. O tratamento com CEE SD

($206,3 \pm 3,06$ g) reduziu o peso corpóreo das fêmeas OVX, porém não para níveis semelhantes aos observados nas SHAM. Por outro lado o tratamento com CEE LD ($226,4 \pm 1,92$ g*) não alterou o peso corpóreo das OVX (Figura 10).

Figura 10 - Peso corpóreo de fêmeas SHR

As barras representam o peso corpóreo (g) de fêmeas controle (SHAM), ovariectomizadas (OVX) e OVX tratadas com diferentes doses de CEE [(SD($9,6\mu\text{g/kg}$) e LD($0,96\mu\text{g/kg}$)). Os valores foram expressos como média $\pm$ epm. O número de animais utilizados por grupo encontra-se dentro das barras. * $P < 0,05$ em relação ao SHAM. # $P < 0,05$ em relação ao OVX.

FONTE: Araujo (2011).

3.1.4 Pressão arterial caudal

A ovariectomia, assim como o tratamento com ambas as doses de CEE, não alterou a PA caudal (mmHg) de ratas SHR quando comparada com a das SHAM, como mostra a figura 11.

Figura 11 – Pressão arterial caudal de fêmeas SHR após ovariectomia e tratamento com CEE

As barras representam a pressão arterial em mmHg de fêmeas controle (SHAM), ovariectomizadas (OVX) e OVX tratadas com diferentes doses de CEE ((SD(9,6µg/kg) e LD(0,96µg/kg)). Os valores foram expressos como média±epm. O número de animais utilizados por grupo encontra-se dentro das barras.

FONTE: Araujo (2011).

3.2 Estudo de reatividade do leito venular mesentérico (LVM) perfundido

3.2.1 Avaliação da resposta do LVM à ANG II

A pressão de perfusão do LVM na condição basal e após adição de fenilefrina (10µM) foi semelhante nos diferentes grupos experimentais (dados não mostrados). A ANG II induziu aumento na pressão de perfusão no LVM de todos os grupos experimentais quando aplicada nas concentrações de 1µM, 10µM e 100µM (Figura 12 B) e a Rmax para este agonista foi obtida com a concentração de 10µM (Figura 12 A). O LVM isolado de fêmeas OVX (21,5±1,26* mmHg) apresentou hiperreatividade à ANGII quando comparado àqueles do grupo SHAM (14,68±1,06 mmHg). O tratamento das fêmeas OVX

com SD ($19,53 \pm 1,53^*$ mmHg) não alterou a hiperreatividade do LVM à ANG II, enquanto nas tratadas com LD ($12,86 \pm 1,16$ mmHg) houve correção dessa resposta para níveis semelhantes aos das SHAM, como mostra a figura 12 C.

Figura 12 – Reatividade do leito venular mesentérico (LVM) perfundido de fêmeas SHR à angiotensina II.

A

B

C

3.2.2 Avaliação da resposta à ANGII na presença do inibidor da Óxido Nítrico Sintase (NOS), L-NAME

O papel modulador do NO na venoconstrição induzida por ANGII foi analisado através do estudo da reatividade do LVM, à ANGII (10nm-100µM) na presença do inibidor da NOS (L-NAME -10 µM). Foi demonstrado que após esse tratamento houve aumento na resposta à ANG II no LVM das fêmeas SHAM (sem L-NAME: 14,68±1,06 mmHg vs com L-NAME: 19,37±1,16*mmHg) e LD (sem L-NAME: 12,86±1,16mmHg vs com L-NAME: 18,94±1,11*mmHg) quando comparados com resultados obtidos antes da aplicação de L-NAME. Esses resultados sugerem que nos grupos SHAM e LD o NO modula a resposta para ANG II. Entretanto, o L-NAME não alterou as respostas à ANGII nos grupos OVX (sem L-NAME: 21,5±1,26mmHg vs com L-NAME: 17,43±1,83 mmHg) e SD (sem L-NAME: 19,53±1,53 vs com L-NAME: 17,87±1,94 mmHg) (Figura 13).

Figura 13 – Reatividade do LVM à ANG II 10µM na presença de L-NAME 10µM.

As barras representam a Δ pressão de perfusão (mmHg) induzidas por ANG II 10µM (R Máx). Essa resposta foi obtida durante a construção da curva concentração efeito a esse agente no LVM, de fêmeas SHAM (controle), ovariectomizadas (OVX) e OVX tratadas com conjugado estrogênio equino nas

concentrações SD (9,6µg/kg) e LD(0,96µg/kg). Os valores foram expressos como média±epm. O número de animais utilizados por grupo encontra-se dentro das barras.

FONTE: Araujo (2011).

3.3 Produção de NO em vênulas mesentéricas de fêmeas SHR

Na figura 14 podemos observar que a produção basal de NO está diminuída em vênulas mesentéricas de fêmeas SHR OVX (0,61±0,12 UA) e ovariectomizadas tratadas com SD (0,75±0,06 UA) quando comparadas à do grupo SHAM (1,99±0,43 UA). Em contraste, o tratamento com LD (2,91±0,41 UA) restaurou a produção basal de NO nas vênulas das fêmeas OVX para nível semelhante ao do grupo SHAM (Figura 14).

O L-NAME bloqueou a produção de NO detectável nas vênulas de fêmeas SHAM, OVX, SD e LD (dados não mostrados).

Figura 14 – Produção basal de NO no LVM de fêmeas SHR

A

B

3.4 Produção basal de EROs em vênulas mesentéricas

A geração basal de EROs foi demonstrada pela emissão de fluorescência a partir do núcleo das células do músculo liso vascular e do endotélio, detectada no comprimento de onda da rodamina e expresso como unidades arbitrárias (UA). Os cortes transversais de vênulas das fêmeas OVX ($19,07 \pm 3,29^*$ UA) apresentaram maior produção de EROs quando comparados aos do grupo SHAM ($6,51 \pm 0,64$ UA). O tratamento com LD ($6,52 \pm 0,61$ UA) reduziu a geração de EROs para níveis semelhantes aos observados nos cortes do grupo SHAM. Porém, o tratamento com SD ($19,43 \pm 1,50^*$ UA) não alterou a geração aumentada pela ovariectomia (Figura 15).

Figura 15 – Geração de EROS em vênulas mesentéricas de fêmeas SHR

Nas figuras 16 A e 16 D podemos observar que ao tratar as vênulas mesentéricas das fêmeas SHAM e LD com L-NAME, apocinina, catalase e superóxido dismutase, não houve alteração na geração de EROS quando comparadas ao basal. Porém, para o grupo OVX (Figura 16 B), observamos diminuição da geração de EROS ao tratar as vênulas mesentéricas com apocinina, CAT e SOD quando comparadas ao basal. O tratamento com L-NAME não alterou essa produção. Entretanto, as vênulas das fêmeas tratadas com CEE SD demonstraram redução da geração de EROS com o tratamento com L-NAME, apocinina, catalase e superóxido dismutase quando comparados ao basal (Figura 16 C).

Figura 16 – Quantificação da produção de EROS em vênulas mesentéricas de fêmeas SHR na ausência e na presença de L-NAME, apocinina, catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD).

3.5 Avaliação da expressão de RNAm dos receptores de angiotensina II (AT1 e AT2)

O LVM das fêmeas dos diferentes grupos experimentais apresentaram expressão do RNAm de receptores AT1 e AT2 de ANGII. As fêmeas OVX ($1,44 \pm 0,03$) apresentaram aumento da expressão de RNAm para o receptor AT1 quando comparadas àquelas do grupo SHAM ($0,9 \pm 0,04$). Ambas as doses de CEE (SD ($0,74 \pm 0,05$) e LD ($0,8 \pm 0,13$)) reduziram a expressão do RNAm do receptor AT1 para níveis semelhantes àqueles do grupo SHAM (Figura 17).

Figura 17– Expressão de RNAm do receptor AT1 para ANG II em vênulas mesentéricas de fêmeas SHR

As barras representam a expressão de RNAm do receptor AT1/ β -actina de fêmeas SHAM (controle), ovariectomizadas (OVX) e OVX tratadas com diferentes doses de conjugado estrogênio eqüino (CEE) [SD (9,6 μ g/kg) e LD (0,96 μ g/kg)]. Os valores foram expressos como média média $\pm$ epm. O número de animais utilizados por grupo encontra-se dentro das barras. * $P < 0,05$ em relação ao SHAM.

FONTE: Araujo (2011).

Por outro lado, a expressão do RNAm do receptor AT2 no grupo LD (2,07 $\pm$ 0,2) foi aumentado em comparação com aqueles dos outros grupos (SHAM (0,94 $\pm$ 0,1), OVX (0,86 $\pm$ 0,09) e SD (0,64 $\pm$ 0,06) (figura 18).

Figura 18 – Expressão de RNAm do receptor AT2 de vênulas mesentéricas de fêmeas SHR

As barras representam a expressão de RNAm do receptor AT2/ β actina de fêmeas SHAM (controle), ovariectomizadas (OVX) e OVX tratadas com diferentes doses de conjugado estrogênio eqüino (CEE) [SD (9,6 μ g/kg) e LD (0,96 μ g/kg)]. Os valores foram expressos como média $\pm$ epm. O número de animais utilizados por grupo encontra-se dentro das barras. * $P < 0,05$ em relação ao SHAM, OVX e SD.

FONTE: Araujo (2011).

3.6 Expressão de RNAm da eNOS de vênulas mesentéricas de fêmeas SHR

A expressão do RNAm da NO sintase endotelial de vênulas mesentéricas foi avaliada em todos os grupos experimentais. Demonstramos que houve diminuição da expressão de RNAm da eNOS com a ovariectomia quando comparada com grupo SHAM, e esta foi restaurada com ambos os tratamentos com CEE, SD e LD (Figura 19).

Figura 19 – Expressão de RNAm da enzima eNOS em vênulas mesentéricas de fêmeas SHR

As barras representam a expressão do RNAm da NO sintase endotelial (eNOS)/βactina de fêmeas SHAM (controle), ovariectomizadas (OVX) e OVX tratadas com diferentes doses de conjugado estrogênio eqüino (CEE): SD(9,6μg/kg) e LD(0,96μg/kg). Os valores foram expressos como média±epm. O número de animais utilizados por grupo encontra-se dentro das barras. * $P < 0,05$ em relação ao SHAM, SD e LD.

FONTE: Araujo (2011).

3.7 Expressão de RNAm dos receptores de estrógeno

3.7.1 ER-α

A expressão do RNAm do receptor de estrógeno ER-α de vênulas isoladas dos grupos SHAM ($1,02 \pm 0,082$), OVX ($1,06 \pm 0,13$) e OVX tratados com a SD ($0,92 \pm 0,12$) foi semelhante. Porém, as vênulas isoladas das fêmeas OVX tratados com a LD ($3,02 \pm 0,4^*$) apresentaram aumento da expressão do RNAm de ER-α quando comparadas aquelas dos outros grupos experimentais (Figura 20).

Figura 20 – Expressão do RNAm do receptor ER α de vênulas mesentéricas de fêmeas SHR

As barras representam a expressão do RNAm de ER α /βactina de fêmeas SHAM (controle), ovariectomizada (OVX) e OVX tratadas com diferentes doses de conjugado estrogênio equino (CEE): SD (9,6μg/kg) e LD (0,96μg/kg). Os valores foram expressos como média±epm. O número de animais utilizados por grupo encontra-se dentro das barras. * $P < 0,05$ em relação ao SHAM, OVX e SD.

FONTE: Araujo (2011).

3.7.2 GPR30

A expressão do RNAm do receptor de estrógeno GPR30 nas vênulas mesentéricas isoladas dos grupos SHAM (1,07±0,16), OVX (0,93±0,12) e OVX tratados com SD(0,89±0,11) foi semelhante. Porém, as vênulas isoladas das fêmeas OVX tratadas com LD (3,16±0,3*) apresentaram aumento da expressão desse receptor (Figura 21).

Figura 21 – Expressão do RNAm do receptor de estrógeno GPR30 em vênulas mesentéricas de fêmeas SHR

As barras representam a expressão do RNAm de GPR30/βactina de fêmeas SHAM (controle), ovariectomizada (OVX) e OVX tratadas com diferentes doses de conjugado estrogênio equino (CEE): SD (9,6μg/kg) e LD (0,96μg/kg). Os valores foram expressos como média±epm. O número de animais utilizados por grupo encontra-se dentro das barras. * $P < 0,05$ em relação ao SHAM, OVX e SD.

FONTE: Araujo (2011).

4 DISCUSSÃO

No seu conjunto esse trabalho analisou, de forma pioneira, vários parâmetros: 1) a reatividade do leito venular em fêmeas; 2) a influência do tratamento hormonal com CEE nesse leito vascular e; 3) a comparação de duas doses de CEE à semelhança daquelas utilizadas em humanos.

O pioneirismo pode ser detectado, pois praticamente todos os trabalhos, que verificamos na literatura, foram desenvolvidos em micro e/ou macrovasos do leito arterial. Além disso, embora o tratamento com CEE seja um dos mais utilizados na terapia hormonal, a maioria dos trabalhos tanto clínicos quanto experimentais têm sido desenvolvidos com o 17 β -estradiol e, em geral, escolhido para tratamento apenas uma dose desse hormônio.

No presente trabalho, demonstramos que o leito venular mesentérico de fêmeas SHR OVX apresenta hiperatividade à ANGII, e que apenas o tratamento com a dose terapêutica mínima (LD) de CEE corrige essa alteração, por mecanismos que envolvem o aumento da expressão do RNAm da eNOS, dos receptores AT₂, ER α , GPR30 e redução da geração de EROs o que resultou em maior biodisponibilidade de NO, provavelmente liberado pela célula endotelial.

A ovariectomia é um procedimento comumente utilizado para simulação tanto da menopausa quanto de histerectomia em mulheres jovens (Waynforth, 1980). Os parâmetros por nós utilizados para demonstrar a eficácia da ovariectomia foram: 1) níveis plasmáticos de hormônios gonadais; 2) aumento de peso corpóreo; e 3) aumento dos pesos de útero seco e úmido. Baseados nos parâmetros descritos, podemos considerar que a ovariectomia foi eficaz, pois, diminuiu os níveis plasmáticos dos hormônios 17 β -estradiol e progesterona, o peso uterino seco e úmido e aumentou o peso corpóreo desses animais. Esses dados estão de acordo com trabalhos anteriores do nosso laboratório em animais SHR e DOCA-sal (Dantas et al., 1999, 2002; Tostes et al., 2000), e também de outros laboratórios (Torres, 2008; Wayntorth, 1980).

O tratamento com CEE é utilizado como terapia hormonal na pós-menopausa e também após histerectomia (menopausa cirúrgica), a fim de restabelecer os níveis estrogênicos e, assim evitar os efeitos indesejáveis da falta deste hormônio. A dose de CEE SD utilizada para o tratamento das OVX elevou os níveis plasmáticos de 17 β -estradiol para valores supra-fisiológicos. Por outro lado, nas fêmeas OVX tratadas com CEE LD, dose dez vezes menor do que a dose padrão SD, os níveis plasmáticos de 17 β -estradiol foram equivalentes àqueles encontrados nas fêmeas em estado fisiológico. É importante ressaltar que as doses de CEE utilizadas nesse trabalho são equivalentes às utilizadas para tratamento hormonal em humanos, a saber, 0,625mg/dia e a 0,0625 mg/dia.

O peso uterino também é outro importante parâmetro para confirmação da eficácia do tratamento hormonal (Gorodeski et al., 2005). No útero, o estrógeno através da ativação do receptor ER- α , principalmente, promove aumento do fluxo sanguíneo local, da absorção de água e proliferação celular tornando o endométrio mais espesso (Gruber et al. 2002; Utian et al., 1987). De fato, foi observado que após a ovariectomia houve redução do peso do útero das SHR e que o mesmo foi restabelecido pelo tratamento com CEE com ambas as doses, SD e LD. Este resultado está de acordo com o descrito por Dantas et al., 1999 que utilizando fêmeas SHR, entretanto tratadas com 17 β -estradiol e não com CEE que é uma mistura de compostos estrogênicos com apenas 0,68% de 17 β -estradiol em sua composição (Berrodin et al., 2009).

O tratamento com CEE SD diminuiu o peso corpóreo das fêmeas OVX. Esse resultado obtido em animais de experimentação se assemelha aos obtidos em mulheres na pós-menopausa descritos nos grandes estudos randomizados (PEPI, HERS, DOPS e HOPE) que demonstram que a TH promoveu diminuição do peso corpóreo (Wierman e Kohrt, 2007). Entretanto, trabalhos realizados com mulheres na pós-menopausa verificaram que a TH com CEE associado à medroxiprogesterona, não foi eficaz em promover diminuição do peso corpóreo (Sites et al., 2005), o que sugere um efeito não benéfico da progesterona sobre este parâmetro. No que se refere ao tratamento das OVX SHR com CEE LD, observamos que o mesmo diminuiu o

peso corpóreo desses animais, porém, estes valores ainda não foram semelhantes aos do grupo SHAM. É provável que quinze dias de tratamento com uma dose mínima não seja suficiente para corrigir o aumento do peso corpóreo. Portanto, podemos concluir que a eficácia da ovariectomia e do tratamento com CEE de fêmeas SHR podem ser confirmadas com os níveis plasmáticos de 17β -estradiol, pesos do útero e corpóreo.

No que se refere ao efeito da ovariectomia e do tratamento hormonal na pressão arterial, os dados da literatura são ainda controversos. Nas condições experimentais utilizadas no presente trabalho não detectamos alteração na hipertensão arterial pré-existente nas OVX SHR, o que vem de encontro aos resultados descritos para ratas SHR (Reckelhoff et al., 2008; Yung et al., 2011) e Wistar (Baylis, 1994; Goldstein, 1988; Pérez-torres et al., 2008). Entretanto, em desacordo com esses resultados, a ovariectomia pode aumentar os níveis pressóricos em ratas Sprague-Dawley (Yung et al., 2011) e SHR (Dantas et al., 1999). Provavelmente essas discrepâncias estejam relacionadas ao método de medida de pressão arterial, a diferentes linhagens de animais, ao tempo de ovariectomia, etc.

O efeito do 17β -estradiol, na pressão arterial de mulheres na menopausa e em fêmeas ovariectomizadas, tem sido bastante explorado, entretanto os trabalhos clínicos e experimentais com CEE ainda são escassos e controversos. Foi observado que o tratamento hormonal, por via oral com CEE (Dubey et al., 2002) e pellets subcutâneos 17β -estradiol (Dantas et al., 1999; Seely et al., 1999) reduziram a pressão arterial em modelos experimentais. Por outro lado, um estudo recente envolvendo mulheres Koreanas apontou que a terapia com CEE aumentou a pressão arterial em normotensas e reduziu nas hipertensas (Lee et al., 2011).

Está bem estabelecido que a menopausa e doenças cardiovasculares-metabólicas tais como hipertensão, aterosclerose, diabetes tipo I e II e síndrome metabólica, possuem como característica comum a disfunção endotelial. Os mecanismos responsáveis pela disfunção endotelial são multifatoriais e dentre eles podemos citar hipereatividade a vasoconstritores, reatividade diminuída para vasodilatadores derivados do endotélio, incluindo

mudanças na atividade e/ou expressão de eNOS ou aumentada degradação de NO através de sua interação com EROs tais como ânion superóxido.

Neste trabalho observamos que a ovariectomia em fêmeas SHR induziu alterações no leito venular caracterizadas por hiperatividade à ANG II, aumento na expressão de receptor de ANG II do tipo AT1 e na geração basal de EROs quando comparadas àquelas em fêmeas SHR SHAM. Algumas dessas alterações foram encontradas no leito arterial de ratas Wistar OVX (Davidge e Zhang, 1998) e SHR OVX (Dantas et al., 1999; Silva-Antonialli et al., 2004; Wassman et al., 2001). A hiperatividade à ANG II observada no LVM de SHR OVX pode ser devida a interação com o receptor AT1, como foi demonstrado em nosso laboratório em veias e vênulas de ratos SHR machos (Loiola et al., 2011).

As alterações observadas nas OVX SHR foram restauradas pelo tratamento com CEE LD reproduzindo de certa forma, os resultados obtidos com 17 β -estradiol no leito arterial (Dantas et al., 1999; Davidge e Zhang, 1998; Silva-Antonialli et al., 2004; Wassman et al., 2001). Por outro lado, o tratamento com CEE na dose padrão (SD) não corrigiu nem o aumento da reatividade à ANG II nem de EROs, encontrados no LVM das SHR OVX. No que se refere à expressão de receptores para a ANG II houve diminuição na expressão do RNAm para receptor AT1 no LVM de fêmeas tratadas com CEE SD e CEE LD e aumento para AT2 naquelas tratadas com CEE LD.

Vem sendo descrito tanto em estudos clínicos em aterosclerose, quanto em estudos experimentais com ratos SHR (Morawietz et al., 1997) e hipertensos por infusão de ANG II (Fukui et al., 1997; Rajagopalan et al., 1996) a existência de uma maior ativação do SRA, e simultaneamente da enzima NADPH oxidase, uma das principais fontes geradoras de EROS na parede vascular. Em nossos experimentos, observamos que houve aumento de EROs nos LVM de fêmeas SHR OVX tratadas ou não com CEE SD. Uma das hipóteses para explicar esse resultado seria que a ativação do receptor AT1, que tem sua expressão aumentada nesses leitos venulares, induziria maior atividade da NADPH oxidase nas células endoteliais e do músculo liso vascular, aumentando assim a produção de ânion superóxido (Watanabe et al.,

2005). Resultados semelhantes foram descritos em leito arterial isolado de fêmeas OVX Wistar (Camporez et al., 2011) e SHR (Dantas et al., 2002).

EROs tem um importante papel no desenvolvimento da disfunção endotelial e/ou vascular. De acordo com Munzel et al., 2005, na maioria das situações onde há aumento da geração de EROs, causando disfunção endotelial, a expressão da eNOS está paradoxalmente aumentada. Isto indica que a capacidade da enzima eNOS de produzir NO pode estar limitada, pois o estado desacoplado da eNOS resulta em produção de ânion superóxido superior à de NO. A inibição da formação de ânion superóxido por L-NAME, inibidor da NOS, é um método conveniente para detectar o desacoplamento da eNOS em tecidos vasculares. A adição do inibidor da NOS diminui o sinal derivado do ânion superóxido, tal como a fluorescência da dihidroetidina (Muller FJ et al. 1998)

Portanto, para avaliarmos se a eNOS poderia ser uma das fontes de geração de EROs nos LVM das SHR OVX tratadas ou não com CEE SD, onde a geração basal de EROs estava aumentada, incubamos esses vasos sanguíneos com L-NAME. Este tratamento diminuiu a geração de EROS somente no LVM das OVX tratadas com CEE SD, o que sugere que a NOS seja uma das enzimas responsáveis pela geração de EROS neste grupo experimental, devido ao seu desacoplamento. Entretanto, a geração aumentada de EROs no LVM das SHR OVX não foi alterada pelo tratamento com L-NAME, porém foi corrigida pelo tratamento com a menor dose, LD, de CEE. Uma das explicações para esse resultado é que nas SHR OVX há uma perda da função endotelial caracterizada pela falta de NO que foi restaurada após tratamento com CEE LD.

Foi demonstrado que o ânion superóxido produzido pela enzima NADPH oxidase, poderia ser o gatilho para o desacoplamento de eNOS de ratos hipertensos Doca-sal (Landmesser U et al., 2003). De fato, ao bloquearmos essa enzima, com apocinina, demonstramos que houve diminuição de EROs tanto no LVM das SHR OVX tratadas quanto das não tratadas com CEE SD. Portanto, analisando esses resultados conjuntamente podemos sugerir que o aumentada produção de EROs, pode ser o sinal para o

desacoplamento da eNOS, e contribui para a disfunção endotelial/vascular encontrada nos LVM de fêmeas SHR OVX não tratadas e tratadas com CEE SD. Entretanto, apenas com estes resultados não podemos afirmar qual o tipo de EROs nos LVM de fêmeas SHR OVX não tratadas e tratadas com CEE SD.

Embora a hidroetidina seja oxidada em brometo de etidio mais rapidamente pelo ânion superóxido, não podemos descartar totalmente a participação de outras EROs, tais como o peróxido de hidrogênio. Sendo assim, ao incubar as vênulas mesentéricas com CAT e PEG-SOD observamos diminuição da geração de EROs na ovariectomia e com o tratamento com CEE SD, sugerindo que o ânion superóxido e peróxido de hidrogênio sejam as principais EROs geradas na ovariectomia e no tratamento com SD. Além disso, é possível que haja diminuição da atividade ou expressão dessas enzimas nesses grupos experimentais. Portanto, novos experimentos precisam ser realizados para responder a esta pergunta.

Alguns mecanismos vêm sendo descritos para explicar o papel modulador do estrógeno sobre a resposta vascular. Um provável mecanismo seria seu efeito direto na célula endotelial, aumentando a produção de NO e consequentemente modulando o tônus vascular (Bracamonte e Miller, 2002; Dantas et al., 2004). De fato, demonstramos que tanto em animais em estrofisiológico quanto naqueles tratados com CEE LD, o NO modula a resposta à ANGII em vênulas mesentéricas, uma vez que o L- NAME, inibidor da NOS, aumentou a resposta vasoconstritora à ANG II, tornando-a semelhante àquelas observadas nos LVM de SHR OVX tratadas ou não com CEE SD. Isso nos sugere que o efeito protetor do CEE LD se faz através do NO corrigindo as alterações vasculares observadas nas fêmeas OVX. Esses resultados obtidos por nós com CCE LD também se assemelham àqueles obtidos com 17 β -estradiol em diferentes leitos vasculares, como artéria uterina (Vanburen et al., 1992), artéria que irriga o músculo gracilis (Huang et al., 1997) ; macro e microvasos do leito arteriolar de SHR (Dantas et al., 2002; Silva-Antonialli et al., 2004) e com CEE em veia femoral de suínas(Bracamonte e Miller, 2002) e veia dorsal da mão de mulheres(Ceballos et al.,2000)

Além disso, utilizando o método DAF-2, observamos que a produção de NO encontra-se diminuída em vênulas mesentéricas de SHR OVX, confirmando os dados obtidos nos nossos estudos funcionais de reatividade venular. É possível que isso se deva ao aumento na geração de EROs, o que levaria a oxidação do NO, diminuindo sua biodisponibilidade aumentando assim a contração vascular induzida pela ANG II, caracterizando uma diminuição (perda) da função endotelial no LVM dos SHR OVX. De fato, a produção de NO foi restaurada pelo tratamento com CEE LD, o que pode ser devido a melhora da função do endotélio, uma vez que está bem definido que o estrógeno aumenta a biodisponibilidade do NO, tal qual foi encontrada em arteríolas de SHR (Costa et al., 1998, Dantas et al 1999) e em aorta de Wistar (Camporez et al., 2011).

É importante ressaltar que os resultados acima descritos vem ao encontro daqueles de Meendering et al. 2008, que demonstrou que o tratamento de mulheres com CEE na dose 0,0625mg/dia aumentava os efeitos antioxidantes exercidos pelo estrógeno, enquanto a dose de 0,625mg/dia possuía atividade pró-inflamatória e que, além disso, não possuía os efeitos antioxidantes exercidos pelo estrógeno. Em 2004, Wakatsuki et al. demonstraram que doses baixas de CEE não elevava triglicerídeos no plasma, resultando em partículas de LDL inalteradas que eram resistentes a oxidação, dessa forma, o efeito antioxidante do estrógeno poderia ser preservado. Além disso, Windler et al. (2007) demonstraram que a TH com baixa dose (0,325 mg/dia) estava associada com a diminuição da incidência de trombose venosa profunda. Esses dados em conjunto demonstram haver diminuição da biodisponibilidade do NO em LVM de SHR OVX e CEE SD e que a mesma foi restaurada com o tratamento com CEE LD.

O mecanismo, mais provável para explicar o aumento da atividade da eNOS seria a indução da expressão do RNAm desta enzima pelo estrógeno, uma vez que o estrógeno ao se ligar em seu receptor nuclear pode modular a transcrição gênica de uma série de proteínas (Macgregor e Jordan, 1998). Isto vem ao encontro com os resultados por nós obtidos, quando estudamos a expressão de RNAm da enzima eNOS que está diminuída em vênulas

mesentéricas de SHR OVX e que foi corrigida com ambas as doses de CEE. De fato, vários autores tem demonstrado a influência do 17β -estradiol na expressão de RNAm para eNOS em cultura de células endoteliais (Hishikawa et al., 1995; Kauser e Rubanyi, 1997; Rosselli et al., 1994). Por outro lado, estudos têm demonstrado que o estrógeno pode aumentar a atividade do NO por mecanismos não genômicos (Goetz et al., 1999; Kim et al., 1999; Simoncini et al., 2004). Neste contexto, observamos que ao tratar as fêmeas OVX com LD ocorreu aumento da expressão do receptor $ER\alpha$ no LVM o que está de acordo com a correção da hiperreatividade à ANG II. Além disso, encontramos o aumento na expressão do receptor GPR30 em vênulas mesentéricas das fêmeas OVX tratadas com LD.

5 CONCLUSÕES

No presente trabalho demonstramos que há aumento da resposta à ANGII:

- no LVM de SHR OVX;
- no LVM de SHR OVX tratadas com CEE SD.

É provável que isso seja devido ao:

- aumento da expressão do receptor de ANG II, tipo AT1, no LVM de SHR OVX,
- aumento na produção de EROs, tais como ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, devido possivelmente a maior atividade da enzima NADPH oxidase no LVM das OVX, e também ao desacoplamento da eNOS nos LVM de SHR OVX tratadas com CEE SD,
- diminuição da biodisponibilidade de NO caracterizando assim disfunção endotelial/vascular.

O tratamento das OVX SHR com CEE LD corrigiu a disfunção endotelial/vascular aumentando a biodisponibilidade do NO. Isso pode estar relacionado, provavelmente com a correção da geração de EROS, modulação da expressão da enzima eNOS, e dos receptores AT2 de ANG II e ER α /GPR30 de estrógeno. Esses dados sugerem que a TH com CEE LD possa ser benéfica no leito venular, prevenindo aparecimento de doença venosa, tal como trombose, que é um efeito colateral observado durante a TH.

Resumindo:

Nossa hipótese é que a TH com CEE possa promover benefício, ou não, ao LVM dependendo da dose utilizada.

REFERÊNCIAS*

- Alvarez AM, Zhuo J, Mendelsohn FAO. Localization and function of angiotensin AT1 receptors. *Am J Hypertens*. 2000;13:32-38.
- Anderson GL, Limacher M, Assaf AR, et al. Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*, 2004;291:1701-1712.
- Bauriedel G. Differential antiplatelet effects of angiotensin converting enzyme inhibitors: comparison of ex vivo platelet aggregation in cardiovascular patients with ramipril, captopril and enalapril. *Clin Res Cardiol*. 2006;95:212–216.
- Baylis C. Age-dependent glomerular damage in the rat. Dissociation between glomerular injury and both glomerular hypertension and hypertrophy. Male gender as a primary risk factor. *J Clin Invest*. 1994;94(5):1823-9.
- Belloni FL. Teaching the principles of hemodynamics. *Am J Physiol*. 1999;277(6 Pt 2):S187-202.
- Appel LJ, Moore TJ, Obarzanek E, Vollmer WM, Svetkey LP, Sacks FM, et al. A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure. *N Eng J Med*. 1997;336(16):117–124.
- Bayard F, Clamens S, Meggetto F, Blaes N, Delsol G, Faye JF. Estrogen synthesis, estrogen metabolism, and functional estrogen receptors in rat arterial smooth muscle cells in culture. *Endocrinology*. 1995; 136: 1523-1529.
- Beckman JS. Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chem Res Toxicol*. 1996;9(5):836-44.
- Berrodin TJ, Chang KC, Komm BS, et al. Differential biochemical and cellular actions of Premarin estrogens: distinct pharmacology of bazedoxifene-conjugated estrogens combination. *Mol. Endocrinol*. 2009;23(1):74-85.
- Best PJ, Berger PB, Miller VM, Lerman A. The effect of estrogen replacement therapy on plasma nitric oxide and endothelin-1 levels in postmenopausal women. *Ann Intern Med*. 1998;28:285-288.
- Bhavnani BR, Cecutti A, Gerulath A, Woolever AC, Berco M. Comparison of the antioxidant effects of equine estrogens, red wine components, vitamin E, and probucol on low-density lipoprotein oxidation in postmenopausal women. *Menopause*. 2001;8(6):408-19.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Bhoola KD, Figueroa CD, Worhy K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens and kininases. *Pharmacol. Rev.* 1992;44:1-80.

Blann DA. How a damaged blood vessel wall contributes to thrombosis and hypertension. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2004;33:445-448.

Borelli CL. Doenças cardiovasculares e as terapias de reposição hormonal. *Hipertensão*, 2005;3:91-94.

Bracamonte MP, Miller VM. Vascular effects of estrogens: arterial protection versus venous thrombotic risk. *Trends Endocrinol Metab.* 2001;12: 204-209.

Brandão AA, Pozzan R, Freitas EV, Pozzan R, Magalhães MEC, Brandão AP. Blood pressure and overweight in adolescence and their association with insulin resistance and metabolic syndrome. *J Hypertens.* 2004;22 (Suppl 1):111S.

Brosnihan KB, Senanayake PS, Li P, Ferrario CM. Bi-directional actions of estrogen on the rennin-angiotensin system. *Braz J Med Biol Res.* 1999;32:373-381.

Brown NJ, Vaughan DE. Prothrombotic effects of angiotensin. *Adv Intern Med.* 2000;45:419-429.

Byyny RL, Speroff L. The rectangularization of life. A clinical guide for the care of older women: primary and preventive care. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996;2:1-19.

Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 2000;10;87(10):840-4.

Campbell DJ, Kladis A, Duncan AM. Bradykinin peptides in kidney, blood, and other tissues of the rat. *Hypertension*, 1993;21(2):155-65.

Camporez JP, Akamine EH, Davel AP, Franci CR, Rossoni LV, Carvalho CR. Dehydroepiandrosterone protects against oxidative stress-induced endothelial dysfunction in ovariectomized rats. *J Physiol.* 2011;15;589(Pt 10):2585-96.

Carvalho CR, Thirone AC, Gontijo JA. Effect of captopril, losartan, and bradykinin on early steps of insulin action. *Diabetes*, 1997;46:1950-7.

Carvalho MH, Scivoletto R, Fortes ZB. Reactivity of aorta and mesenteric microvessels to drugs in spontaneously hypertensive rats: role of the endothelium. *J. Hypertens.* 1987;5(3):377-82.

Ceballos C, Ribes C, Amado JA, Pérez J, García Unzueta MT, de Berrazueta JR. Venous endothelial function in postmenopausal women who are receiving long-term estrogen and progestagen therapy. *Fertil Steril.* 2000;74(2):268-73.

Celermajer DS, Sorensen KE, Spiegelhalter DJ, et al. Aging is associated with endothelial dysfunction in healthy men years before the age-related decline in women. *J Am Coll Cardiol.* 1994;24:471-476.

Chaki S, Inagami T. New signaling mechanism of angiotensin II in neuroblastoma neuro-2A cells: activation of soluble guanylyl cyclase via nitric oxide synthesis. *Mol Pharmacol.* 1993;43(4):603-8.

Clarkson TB. Estrogen effects on arteries vary with stage of reproductive life and extent of subclinical atherosclerosis progression. *Menopause.* 2007;14:373-384.

Colaço AL. Papel dos receptores ativados por protease (PARs) na reatividade vascular de ratos espontaneamente hipertensos (SHR). [tese (Doutorado em Ciências)]- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Colburn P, Buonassisi V. Estrogen binding sites in endothelial cell cultures. *Science.* 1978;201:817-819

Costa SG. Influência do estrógeno na reatividade de microvasos de ratas espontaneamente hipertensas e normotensas [tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 1996

Costa SG. Reatividade de aorta e vasos de resistência isolados de ratos com hipertensão renal (GII): participação do endotélio. [dissertação (Mestrado em Ciências)]- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1988.

Crackower MA, Sarao R, Oudit GY. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature.* 2002;417:822–28.

Dantas AP, Scivoletto R, Fortes ZB, Nigro D, Carvalho MH. Influence of gonadal steroids hormones on microvessels reactivity of spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 1998;16:103.

Dantas AP, Scivoletto R, Fortes ZB, Nigro D, Carvalho MH. Influence of Female Sex Hormones on Endothelium-Derived Vasoconstrictor Prostanoid Generation in Microvessels of Spontaneously Hypertensive Rats . *Hypertension.* 1999;34:914-919

Dantas AP, TOSTES RC, Fortes ZB, COSTA SG, Nigro D, Carvalho MH. In Vivo Evidence for Antioxidant Potential of Estrogen in Microvessels of Female Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension*, 2002;39[Pt 2]:405-411.

David FL, Carvalho MHC, Cobra, ALN, Nigro D, Fortes ZB, Reboucas NA, Tostes RC. Ovarian hormones modulates endothelin-1 vascular reactivity and mRNA expression in DOCA-salt hypertensive rats. *Hypertension*, 2001;38:692-696.

Davidge ST and Zhang Y. Estrogen Replacement Suppresses a Prostaglandin H Synthase-Dependent Vasocostrictor in Rat Mesenteric Arteries. *Circ Res*. 1998;83:388-395.

Dubey RK, Oparil S, Imthurn B, Jackson EK. Sex hormones and hypertension. *Cardiovasc Res*. 2002;53(3):688-708.

Eaker ED, Chesebro JH, Sacks FM, Wenger NK, Whisnant JP, Winston M. Cardiovascular disease in women. *Circulation*, 1993;88:1999-2009.

Esmon CT. Basic mechanisms and pathogenesis of venous thrombosis. *Blood Rev*. 2009;23(5):225-9.

Ettinger B. Rationale for use of lower estrogen doses for postmenopausal hormone therapy. *Maturitas*, 2007;57:81–84.

Fabris B, Candido R, Bortoletto M, Toffoli B, Bernardi S, Stebel M, Bardelli M, Zentilin L, Giacca M, Carretta R. Stimulation of cardiac apoptosis in ovariectomized hypertensive rats: potential role of the renin-angiotensin system. *J Hypertens*. 2011;29(2):273-81.

Farhat MY, Lavigne MC, Ramwell PW. The vascular protective effects of estrogen. *FASEB J*. 1996;10:615-624.

Fernandes L, Loiola RA, Tostes RC, Nigro D, Fortes ZB, de Carvalho MH. Angiotensin II-induced venoconstriction involves both AT1 and AT2 receptors and is counterbalanced by nitric oxide. *Peptides*, 2005;26(12):2458-63.

Fleming I, Kohlstedt K, Busse R. The tissue renin-angiotensin system and intracellular signalling. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2006;15(1):8-13.

Fortepiani LA, Zhang H. Characterization of an animal model of postmenopausal hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 2003;41:640-645.

Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest*. 1982;47(5):412-26.

Fukuda N, Satoh C, Hu WY, et al. Endogenous angiotensin II suppresses insulin signaling in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 2001;19:1651-8.

Fukui T, Ishizaka N, Rajagopalan S, Laursen JB, Capers Qt, Taylor WR, Harrison DG, de Leon H, Wilcox JN, Griendling KK. p22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats. *Circ Res*. 1997;80:45–51.

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 1980;288:373-376.

Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest*. 1989;83(5):1774-7.

Goetz RM, Thatte HS, Prabhakar P, Cho MR, Michel T, Golan DE. Estradiol induces the calcium-dependent translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci*. 1999;96(6):2788-93.

Gorodeski GI. Effects of estrogen on proton secretion via the apical membrane in vaginal-ectocervical epithelial cells of postmenopausal women. *Menopause*. 2005;12(6):679-84.

Grady D, Applegate W, Bush T, Furberg C, Riggs B, Hulley SB. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS): design, methods, and baseline characteristics. *Control Clin Trials*. 1998;19(4):314-35.

Greenberg S, Bohr DF. Venous smooth muscle in hypertension. Enhanced contractility of portal veins from spontaneously hypertensive rats. *Circ Res*. 1975;36(6 Suppl 1):208-15.

Gresele P, Momi S, Migliacci R. Endothelium, venous thromboembolism and ischaemic cardiovascular events. *Thromb Haemost*. 2010;103(1):56-61.

Griendling KK, Ushio-Fukai M, Lassègue B, Alexander RW. Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle. New concepts. *Hypertension*, 1997;29(1 Pt 2):366-73.

Grodstein F, Manson JE, Stampfer MJ. Hormone therapy and coronary heart disease: the role of time since menopause and age at hormone initiation. *J Womens Health (Larchmt)*. 2006;15:35-44.

Gruber HE, Yamaguchi D, Ingram J, Leslie K, Huang W, Miller TA, Hanley EN Jr. Expression and localization of estrogen receptor-beta in annulus cells of the

human intervertebral disc and the mitogenic effect of 17-beta-estradiol in vitro. *BMC Musculoskelet Disord.* 2002;3:4.

Gryglewski RJ, Moncada S, Palmer RM. Bioassay of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor (EDRF) from porcine aortic endothelial cells. *Br J Pharmacol.* 1986;87(4):685-94.

Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D, Sadowski J, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM. Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation.* 2002;105(14):1656-62.

Haas E, Meyer MR, Schurr U, Bhattacharya I, Minotti R, Nguyen HH, Heigl A, Lachat M, Genoni M, Barton M. Differential effects of 17beta-estradiol on function and expression of estrogen receptor alpha, estrogen receptor beta, and GPR30 in arteries and veins of patients with atherosclerosis. *Hypertension.* 2007;49(6):1358-63.

Hashimoto M, Akishita M, Eto M, et al. Modulation of endothelium-dependent flow-mediated dilatation of the brachial artery by sex and menstrual cycle. *Circulation.* 1995;92:3431-3435.

Hayashi T, Yamada K, Esaki M, Kuzuya M, Stake S. Estrogen increase endothelial nitric oxide by a receptor-mediated system. *Biochem Biophys Res Comm.* 1995;214:847-855.

Higuchi S, Ohtsu H, Suzuki H, Shirai H, Frank GD, Eguchi S. Angiotensin II signal transduction through the AT1 receptor: novel insights into mechanisms and pathophysiology. *Clin Sci.* 2007;112(8):417-28.

Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M, Skatchkov M, Thaiss F, Stahl RA, Warnholtz A, Meinertz T, Griendling K, Harrison DG, Forstermann U, Munzel T. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res.* 2001;88(2):E14-22.

Høibraaten E, Qvigstad E, Arnesen H, Larsen S, Wickstrøm E, Sandset PM. Increased risk of recurrent venous thromboembolism during hormone replacement therapy--results of the randomized, double-blind, placebo-controlled estrogen in venous thromboembolism trial (EVTET). *Thromb Haemost.* 2000;84(6):961-7.

Huang A, Sun D, Kaley G, Koller A. Superoxide released to high intra-arteriolar pressure reduces nitric oxide-mediated shear stress and agonist-induced dilations. *Circ Res.* 1998;83:960-965.

Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B, Vittinghoff E. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. *Heart and*

Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. JAMA, 1998;280(7):605-13.

Houck JA. "What do these women want?" Feminist responses to Feminine Forever, 1963-1980. Bull Hist Med. 2003;77(1):103-32.

Hishikawa K, Nakaki T, Marumo T, Suzuki H, Kato R, Saruta T. Up-regulation of nitric oxide synthase by estradiol in human aortic endothelial cells. FEBS Lett. 1995;360(3):291-3.

Ito N, Takeshita A, Higuchi S, Nakamura M. Venous abnormality in normotensive young men with a family history of hypertension. Hypertension, 1986;8(2):142-6

Jordan WM. Pulmonary embolism. Lancet, 1961;1146-47.

Kamińska M, Mogielnicki A, Stankiewicz A, Kramkowski K, Domaniewski T, Buczek W, Chabielska E. Angiotensin II via AT1 receptor accelerates arterial thrombosis in renovascular hypertensive rats. J Physiol Pharmacol. 2005;56(4):571-85

Kaplan NM. The treatment of hypertension in women. Arch Intern Med. 1995;155:563-567.

Kausar K, Rubanyi GM. Gender difference in endothelial dysfunction in the aorta of spontaneously hypertensive rats. Hypertension, 1995;25(4 Pt 1):517-23.

Kawano H, Motoyama T, Kugiyama K, et al. Gender difference in improvement of endothelium-dependent vasodilation after estrogen supplementation. J Am Coll Cardiol. 1997;30:914-919.

Khaper N, Singal PK. Modulation of oxidative stress by a selective inhibition of angiotensin II type 1 receptors in MI rats. J Am Coll Cardiol. 2001;37(5):1461-6.

Kim SO, Song SH, Hwang EC, Park KS, Kwon DD, Ahn KY, Kim DH, Ryu SB. The expression of AQP1 and eNOS in menopausal rat urinary bladder. Int Neurourol J. 2010;14(2):78-85.

Kramkowski K, Mogielnicki A, Leszczynska A, Buczek W. Angiotensin -(1-9), the product of angiotensin I conversion in platelets, enhances arterial thrombosis in rats. J Physiol Pharmacol. 2010;61(3):317-24.

Krieger JE. Bases moleculares das doenças cardiovasculares – A interação entre a pesquisa e a prática clínica. Atheneu – São Paulo, 2008.

Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukui T, Holland SM, Mitch WE,

Harrison DG. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest*. 2003;111:1201–1209.

Lanner F, Sohl M, Farnebo F. Functional arterial and venous fate is determined by graded VEGF signaling and notch status during embryonic stem cell differentiation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:487– 493. 65.

Laursen JB, Somers M, Kurz S, McCann L, Warnholtz A, Freeman BA, Tarpey M, Fukai T, Harrison DG. Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation*, 2001;103(9):1282-8.

Laszlo W, John G, Aaron E, Matthew A B Chris B. The nitric oxide pathway is amplified in venular vs arteriolar cultured rat mesenteric endothelial cells. *Microvasc Res*. 2001;62(3):401-9.

Lellouch A, Segal A. [Gerontology and endocrinology at the beginning of the 20th century: Dr. Voronoff (1866-1951)]. *Hist Sci Med*. 2001;35(4):425-34.

Lee JH, Yang DH, Park HS, Cho Y, Jun JE, Park WH, Chun BY, Shin JY, Shin DH, Lee KS, Kim KS, Kim KB, Kim YJ, Chae SC. Incidence of hypertension in Korea: 5-year follow-up study. *J Korean Med Sci*. 2011;26(10):1286-92.

Lessa I. Epidemiologia da insuficiência cardíaca e da hipertensão arterial sistêmica no Brasil. *Rev Bras de Hipertens*. 2001;8:383–392.

Lerner DJ, Kannel WB. Patterns of coronary heart disease morbidity and mortality in the sexes:a 26-years follow-up of the Framingham population. *Am Heart J*. 1968;111-383-390.

Lieberman EH, Gerhard MD, Uehata A, et al. Estrogen improves endothelium-dependent, flowmediated vasodilation in postmenopausal women. *Ann Intern Med*. 1994;121:936-941.

Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, et al; Heart disease and stroke statistics—2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, 2010;121:e46-e215.

Lip GY, Beevers G, Zarifis J. Hormone replacement therapy and cardiovascular risk: the cardiovascular physicians' viewpoint. *J Intern Med*. 1995;238:389-399.

Loiola RA, Fernandes L, Eichler R, Passaglia Rde C, Fortes ZB, de Carvalho MH. Vascular mechanisms involved in angiotensin II-induced venoconstriction in hypertensive rats. *Peptides*, 2011;32(10):2116-21.

Losordo DW, Kearney M, Kim EA, Jekanowski J, Isner JM. Variable expression of the estrogen receptor in normal and atherosclerotic coronary arteries of premenopausal women. *Circulation*, 1994;89:1501-1510.

Lüscher TF. Endothelial dysfunction: the role and impact of the renin-angiotensin system. *Heart*, 2000;84 Suppl 1:20-2.

Manson JE, Martin KA. Clinical practice. Postmenopausal hormone-replacement therapy. *N Engl J Med*. 2001;345(1):34-40.

Marchesi C, Paradis P. Role of the rennin-angiotensin system in vascular inflammation. *Trend Pharmacol Sci*. 2008;29(7):367-374.

Mayers LS. Effects os estrogen, androgen and progestin on sexual psychopshysiology and behaviour in pos-menopausal women. *J Clinical Endocrinol and Metabol*. 1990;70:1224-1131.

MacGregor JI, Jordan VC. Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action. *Pharmacol Rev*. 1998;50(2):151-96.

Meendering JR, Torgrimson BN, Miller NP, Kaplan PF, Minson CT. Estrogen, medroxyprogesterone acetate, endothelial function, and biomarkers of cardiovascular risk in young women. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;294:H1630–H1637.

Mendelsohn ME, Karas RH. HRT and the young at heart. *N Engl J Med*. 2007;356:2639-2641.

Miller FJ Jr, Gutterman DD, Rios CD, Heistad DD, Davidson BL. Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in atherosclerosis. *Circ Res*. 1998; 82:1298 –1305.

Miura H, Liu Y, Gutterman DD. Human coronary arteriolar dilation to bradykinin depends on membrane hyperpolarization. *Circulation*, 1999;99:3132-38.

Monton M, Jimenez A, Nunez A, Lopez-Blaya A, Farre J, Gomez J, Zalba LR, Sanchez de Miguel L, Casado S, Lopez-Farre A. Comparative effects of angiotensin II AT-1-type receptor antagonists in vitro on human platelet activation. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2000;35:906 –913.

Mooradian A. Sexuality in older woman. *Arch of Int Med*. 1990;150:1033-1038.

Morales A, Heaton JPW, Carson CC. Andropause: a misnomer for a true clinical entity. *J Urology*. 2000;163:705-12.

Morawietz H, Weber M, Rueckschloss U, Lauer N, Hacker A, Kojda G. Upregulation of vascular NAD(P)H oxidase subunit gp91phox and impairment of the nitric oxide signal transduction pathway in hypertension.

Biochem Biophys Res Commun. 2001;285:1130–1135.

Moreau KL. The modulatory influence of estrogen on vascular endothelial function in women: Is it all about timing? *Men Med.* 2001;19:S8-S11.

Münzel T, Daiber A, Ullrich V, Mülsch A. Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMP-dependent protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(8):1551-7.

Nacional Center for Biotechnology Information. GenBank. [database]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. Cited from: 2010 Jun 2010.

Nadar S, Lip GY. The prothrombotic state in hypertension and the effects of antihypertensive treatment. *Curr Pharm Des.* 2003;9:1715–1732.

Nantel P, René de Cotret P. The evolution of angiotensin blockade in the management of cardiovascular disease. *Can J Cardiol.* 2010;26 Suppl E:7E-13E.

Nadar S, Lip GY. The prothrombotic state in hypertension and the effects of antihypertensive treatment. *Curr Pharm Des.* 2003;9:1715–1732.

Needleman P, Denny SE, Isakson PC. Mechanism and modification of bradykinin-induced coronary vasodilation. *Proc Natl Acad Sci.* 1975;72:2060-63.

Novensa L, Selent J, Pastor M, Sandberg K, Heras M, Dantas AP. Equine estrogens impair nitric oxide production and endothelial nitric oxide synthase transcription in human endothelial cells compared with the natural 17{beta}-estradiol. *Hypertension*, 2010;56(3):405-11.

Ohtsu, H., Suzuki, H., Nakashima, H. et al. Angiotensin II signal transduction through small GTP-binding proteins: mechanism and significance in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, 2006;48:534–540

Orimo A, Inoue S, Ikegami A, Hosoi T, Akishita M, Ouchi Y, Muramatso M, Orimo H. Vascular smooth cells are targets for estrogen. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;195:730-736.

Orshal JM, Khalil RA. Gender, sex hormones, and vascular tone. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004;286(2):R233-49.

Pang CCY. Autonomic control of the venous system in health and disease: effects of drugs. *Pharmacol Ther.* 2001;90:179-230.

Panza JA. Endothelial dysfunction in essential hypertension. *Clin Cardiol.* 1997;20:1126-1133.

Pardini D. Terapia hormonal da menopausa. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2007;51/6:938-942.

Perez I, Hafid M EL. Castration modifies aortic vasoreactivity and serum fatty acids in a sucrose-fed rat model of metabolic syndrome. *Heart Vessels.* 2009;24:147-155.

Proudler AJ, Ahmed AI, Crook D, Fogelman I, Rymer JM, Stevenson JC. Hormone replacement therapy and serum angiotensin-converting-enzyme activity in postmenopausal women. *Lancet.* 1995;346:89-90.

Pueyo ME, Gonzalez W, Nicoletti A, Savoie F, Arnal JF, Michel JB. Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor-kappaB activation induced by intracellular oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:645-651.

Qiao X, McConnell KR, Khalil RA. Sex steroids and vascular responses in hypertension and aging. *Gend Med.* 2008;5 Suppl A:S46-64.

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. *Br J Pharmacol.* 1987;92(1):181-7.

Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, Harrison DG. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest.* 1996;97:1916-1923.

Reckelhoff JF, Zhang H, Granger JP. Testosterone exacerbates hypertension and reduces pressure-natriuresis in male spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1998;31:435-9.

Richey JM, Ader M, Moore D. Angiotensin II induces insulin resistance independent of changes in interstitial insulin. *Am J Physiol.* 1999;277:E920-26.

Rosano GM, Sarrel PM, Poole-Wilson PA, Collins P. Beneficial effect of oestrogen on exercise-induced myocardial ischaemia in women with coronary artery disease. *Lancet.* 1993;342(8864):133-6.

Rousseauw JE, Anderson GL, Prentice RL, et al; 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.

Rosselli M, Imthurn B, Keller PJ, Jackson EK, Dubey RK. Circulating nitric oxide (nitrite/nitrate) levels in postmenopausal women substituted with 17 beta-

estradiol and norethisterone acetate. A two-year follow-up study. *Hypertension*, 1995;25(4 Pt 2):848-53.

Rossouw JE, Prentice RL, Manson JE, et al. Postmenopausal hormone therapy and risk of cardiovascular disease by age and years since menopause. *JAMA*, 2007;297:1465-1477.

Ruggiero RJ, Likis FE. Estrogen: physiology, pharmacology, and formulations for replacement therapy. *J of Mid and Wom Heal*. 2002;47(3).

Sadoshima J. Versatility of the angiotensin II type 1 receptor. *Circ Res*. 1998;82(12):1352-5.

Seely EW, Walsh BW, Gerhard MD, Williams GH. Estradiol with or without progesterone and ambulatory blood pressure in postmenopausal women. *Hypertension*, 1999;33(5):1190-4.

Senchenkova EY, Russell J, Almeida-Paula LD, Harding JW, Granger DN. Angiotensin II-mediated microvascular thrombosis. *Hypertension*, 2010;56:1989-1095.

Sherwood A, Bower JK, McFetridge-Durdle J, et al. Age moderates the short-term effects of transdermal 17beta-estradiol on endothelium-dependent vascular function in postmenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:1782–1787.

Simoncini T, Mannella P, Fornari L, Caruso A, Varone G, Genazzani AR. Genomic and non-genomic effects of estrogens on endothelial cells. *Steroids*, 2004;69(8-9): 537-542.

Simões MV, Schmidt A. Hipertensão arterial como fator de risco para doenças cardiovasculares. *Medicina*, 1996; 29:214-219.

Siragy HM, Carey RM. The subtype 2 angiotensin receptor regulates renal prostaglandin F2 alpha formation in conscious rats. *Am J Physiol*. 1997;273(3 Pt 2):R1103-7.

Siragy HM, Carey RM. The subtype-2 (AT2) angiotensin receptor regulates renal cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate and AT1 receptor-mediated prostaglandin E2 production in conscious rats. *J Clin Invest*. 1996;15;97(8):1978-82.

Siragy HM, Carey RM. Protective role of the angiotensin AT2 receptor in a renal wrap hypertension model. *Hypertension*, 1999;33(5):1237-42.

Siragy HM. AT(1) and AT(2) receptors in the kidney: role in disease and treatment. *Am J Kidney Dis*. 2000;36(3 Suppl 1):S4-9.

Silva-Antonialli MM, Tostes RC, Fernandes L, Fior-Chadi DR, Akamine EH, Carvalho MH, Fortes ZB, Nigro D. A lower ratio of AT1/AT2 receptors of angiotensin II is found in female than in male spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res*. 2004;1;62(3):587-93.

Sites CK, L'Hommedieu GD, Toth MJ, Brochu M, Cooper BC, Fairhurst PA. The effect of hormone replacement therapy on body composition, body fat distribution, and insulin sensitivity in menopausal women: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(5):2701-7.

Sjöstrand T. Volume and distribution of blood and their significance in regulating the circulation. *Physiol Rev*. 1953;33(2):202-28

Skowasch D, Viktor A, Schneider-Schmitt M, Luderitz B, Nickenig G, Bauriedel G. Differential antiplatelet effects of angiotensin converting enzyme inhibitors: comparison of ex vivo platelet aggregation in cardiovascular patients with ramipril, captopril and enalapril. *Clin Res Cardiol*. 2006;95:212–216.

Smiley DA, Khalil RA. Estrogenic compounds, estrogen receptors and vascular cell signaling in the aging blood vessels. *Curr Med Chem*. 2009;16(15):1863-1887.

Skowasch D, Viktor A, Schneider-Schmitt M, Luderitz B, Nickenig G, Bauriedel G. Differential antiplatelet effects of angiotensin converting enzyme inhibitors: comparison of ex vivo platelet aggregation in cardiovascular patients with ramipril, captopril and enalapril. *Clin Res Cardiol*. 2006;95:212–216.

Subbiah MT, Kessel B, Agrawal M, Rajan R, Abplanalp W, Rymaszewski Z. Antioxidant potential of specific estrogens on lipid peroxidation. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993;77(4):1095-7.

Stampfer MJ, Colditz GA, Willet WC, Manson JE, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH. Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease: ten-year follow-up from the nurses health study. *N Eng J Med*. 1991;325:756-762.

Stefanick ML. Estrogens and progestins: background and history, trends in use, and guidelines and regimens approved by the us food and drug administration. *Am J Med*. 2005;118 Suppl 12B:64-73.

Taniyama Y, Griendling KK. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension*, 2003;42:1075–1081.

Tivesten A, Bollano E. Cardiac concentric remodelling induced by non-aromatizable (dihydro-) testosterone is antagonized by oestradiol in ovariectomized rats. *J of End*. 2006;189,485-491.

Toledo DP, Akamine E, Nigro D, Passaglia RCT, Carvalho MHC, Fortes ZB. Microvascular reactivity in experimental diabetes: responses of male and female rats. *Inflamm Res*. 2003;52:191-8.

Torres-Vázquez J, Kamei M, Weinstein BM. Molecular distinction between arteries and veins. *Cell Tissue Res*. 2003;314(1):43-59.

Tostes Passaglia RC, David FL, Fortes ZB, Nigro D, Scivolletto R, Carvalho MH. Deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats display gender-related differences in ET(B) receptor-mediated vascular responses. *Brit J Pharmacol*. 2000;130:1092-1098.

Touyz RM. Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells—implications in cardiovascular disease. *Braz J Med Biol Res*. 2004;37:1263–1273.

Tsutsumi Y, Matsubara H, Ohkubo N, Mori Y, Nozawa Y, Murasawa S, Kijima K, Maruyama K, Masaki H, Moriguchi Y, Shibasaki Y, Kamihata H, Inada M, Iwasaka T. Angiotensin II type 2 receptor is upregulated in human heart with interstitial fibrosis, and cardiac fibroblasts are the major cell type for its expression. *Circ Res* 1998;83:1035–1046.

Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Yin Q, Fujio Y, Walsh K, Griending KK. Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/protein kinase B by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1999;274:22699–22704.

Utian WH. Overview on menopause. *Am J Obstet Gynecol*. 1987;156(5):1280-3.

Van Buren GA, Yang DS, Clarck KE. Estrogen-induced uterine vasodilatation is antagonized by L-nitroarginine methyl ester; an inhibitor of nitric oxide synthesis. *An J Obstet Gynecol*. 1992;167:828-33.

Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction in hypertension. *J Hypertens*. 1997; 14:S83-S93.

Vásquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martíásek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, Tordo P, Pritchard KA Jr. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(16):9220-5.

Vaziri ND, Ni Z, Oveisi F. Upregulation of renal and vascular nitric oxide synthase in young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 1998;31(6):1248-54.

Wakatsuki A, Ikenoue N, Shinohara K, Watanabe K, Fukaya T. Effect of lower dosage of oral conjugated equine estrogen on inflammatory markers and endothelial function in healthy postmenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:571-576.

Wakatsuki A, Okatani Y, Ikenoue N, Shinohara K, Watanabe K, Fukaya T. Effect of lower dose of oral conjugated equine estrogen on size and oxidative susceptibility of low-density lipoprotein particles in postmenopausal women. *Circulation.* 2003;108:808-813.

Walters PE, Gaspari TA, Widdop RE. Angiotensin-(1-7) acts as a vasodepressor agent via angiotensin II type 2 receptors in conscious rats. *Hypertension.* 2005;45(5):960-6

Wang W, Wang S, Yan L, Madara P, Del Pilar Cintron A, Wesley RA, Danner RL. Superoxide production and reactive oxygen species signaling by endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* 2000;275(22):16899-903.

Warner TD. Simultaneous perfusion of rat isolated superior mesenteric arterial and venous beds: comparison of their vasoconstrictor and vasodilator responses to agonists. *Br J Pharmacol.* 1990;99(2):427-33.

Wassman S, Bäumer AT, Strehlow K, van Eickels M, Grohé C, Albory K, Böhm M, Nickenning G. Endothelial dysfunction and oxidative stress during estrogen deficiency in spontaneously hypertensive rats. *Circulation.* 2000;103:435-441.

Watanabe T, Barker TA, Berk BC. Angiotensin II and the endothelium: diverse signals and effects. *Hypertension.* 2005;45:163-169.

Waynforth HB. Experimental and surgical technique in the rat. Academic Press. London, 1980.

Widder J, Pelzer T, von Poser-Klein C, Hu K, Jazbutyte V, Fritzemeier KH, Hegele-Hartung C, Neyses L, Bauersachs J. Improvement of endothelial dysfunction by selective estrogen receptor-alpha stimulation in ovariectomized SHR. *Hypertension.* 2003;42(5):991-996.

Widgren BR. Family history and pathophysiological mechanisms of primary hypertension. Studies in non-hypertensive young men with positive and negative family histories of hypertension. *Scand J Urol Nephrol Suppl.* 1991;134:1-75.

Wierman ME, Kohrt WM. Vascular and metabolic effects of sex steroids: new insights into clinical trials. *Reprod Sci.* 2007;14(4):300-14.

Windler E, Zyriax BC, Eidenmüller B, Boeing H. Hormone replacement therapy and risk for coronary heart disease. Data from the CORA-study--a case-control

study on women with incident coronary heart disease. *Maturitas*, 2007;20;57(3):239-46.

Wynne BM, Chiao CW, Webb RC. Vascular smooth cell signaling mechanisms for contraction to angiotensin II and endothelin-1. *J Am Soc Hypertens*. 2009;1;3(2):84-95.

Xia Y, Zweier JL. Direct measurement of nitric oxide generation from nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci*. 1997;94(23):12705-10.

Yan C, Kim D, Aizawa T, Berk BC. Functional interplay between angiotensin II and nitric oxide: cyclic GMP as a key mediator. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:26–36.

Yanes LL, Romero DG, Iliescu R, Zhang H, Davis D, Reckelhoff JF. Postmenopausal hypertension: role of the renin-angiotensin system. *Hypertension*, 2010;56(3):359-63.

Yeboah J, Crouse JR, Hsu F-C, et al. Brachial flow-mediated dilation predicts incident cardiovascular events in older adults: the Cardiovascular Health Study. *Circulation*, 2007;115:2390-2397.

Yim SF, Lau TK, Sahota DS, Chung TK, Chang AM, Haines CJ. Prospective randomized study of the effect of “add-back” hormone replacement on Vascular function during treatment with gonadotropin-releasing hormone agonists. *Circulation*, 1998;98:1631-1635.

Yung, LM; Wing, TW; Xiao, YT; Fung, PL, Lai, HY. Inhibition of Renin-angiotensin system reverses endothelial dysfunction and oxidative stress in estrogen deficient rats. *Plos one*. 2011;6(3):e17437.

Yusuf S, Sleight P, Pogue J. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The heart outcomes prevention evaluation study investigators. *N Engl J Med*. 2000;342(3):145-53

Zou MH, Ullrich V. Nitrite formed by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide selectively inhibits bovine aortic prostacyclin synthase. *FEBS Lett*. 1996;382(1-2):101-4.

Zou MH, Shi C, Cohen RA. Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *J Clin Invest*. 2002;109(6):817-26.