

**TIAGO JANUÁRIO DA COSTA**

**Influência dos tratamentos com estrógeno, iniciados precoce e tardiamente, em fêmeas com envelhecimento precoce (SAMP8) ou não (SAMR1) ovariectomizadas: estudo do mecanismo de ação em carótidas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Helena Catelli de Carvalho

São Paulo  
2017

**TIAGO JANUÁRIO DA COSTA**

**Influência dos tratamentos com estrógeno, iniciados precoce e tardiamente, em fêmeas com envelhecimento precoce (SAMP8) ou não (SAMR1) ovariectomizadas: estudo do mecanismo de ação em carótidas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Helena Catelli de Carvalho

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações USP (BDTD).

São Paulo  
2017

## RESUMO

Costa, T.J. **Influência dos tratamentos com estrógeno, iniciados precoce e tardiamente, em fêmeas com envelhecimento precoce (SAMP8) ou não (SAMR1) ovariectomizadas: estudo do mecanismo de ação em carótidas.** 2017.104f. Tese (Doutorado em Farmacologia). São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Ensaio clínico observacional e em animais demonstraram que o estrógeno exerce proteção cardiovascular, entretanto existem controvérsias mesmo após estudos clínicos randomizados e multicêntricos. Tem sido sugerido que exista uma janela de oportunidade terapêutica, teoria *timing hypothesis*, que analisa os tratamentos com estrógeno, iniciados precoce ou tardiamente, em mulheres na pós-menopausa. Baseados nisso avaliamos a função de carótidas de camundongos fêmeas com senescência acelerada (SAMP8) ou resistentes à senescência (SAMR1) ovariectomizadas e tratadas com estrógeno precoce ou tardiamente na dose de 5 µg/Kg, aplicada por via subcutânea a cada três dias. Em SAMR1 os tratamentos com estrógeno promoveram vasculoproteção, reduzindo vasoconstrição à fenilefrina e aumentando a produção de prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e nas carótidas das SAMP8 o tratamento com início precoce não alterou o efeito da ovariectomia, porém o tratamento com início tardio aumentou a vasoconstrição à fenilefrina, a produção de tromboxano (TXA<sub>2</sub>) e a expressão proteica do ERα-36kDa, *splicing* alternativo do receptor clássico ERα-66kDa. Portanto, os efeitos do estrógeno não foram benéficos no envelhecimento, provavelmente podendo contribuir para o desenvolvimento de doenças cerebrovasculares decorrentes de alteração na circulação cerebral.

**Palavras-chave:** Estrógeno. Pós-menopausa. Doenças cardiovasculares. Receptor de estrógeno. *Splicing* alternativo. Artéria carótida.

## ABSTRACT

Costa, T.J. **Influence of early and late estrogen treatments in ovariectomized senescence accelerated (SAMP8) and resistant (SAMR1) female mice: a study of the mechanism of action in the carotid.** 2017. 104p. Thesis (Doutorado em Farmacologia) – São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Observational clinical trials and animal studies demonstrated that estrogen promote cardiovascular protection. However, there are controversies after randomized and multicenter clinical trials. It has been suggested that there is a therapeutic window of opportunity – timing hypothesis theory –, which analyzes the early and late estrogen treatment in postmenopausal women. Based on this, we evaluated the carotid function in ovariectomized senescence (SAMP8) or senescence-resistant (SAMR1) female mice, treated with estrogen in mineral oil solution dose of 5 µg/kg by subcutaneous injection every three days. In SAMR1 estrogen treatments promoted vasculoprotection, reducing the vasoconstriction to phenylephrine and increasing the prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) production. In carotid of SAMP8 early-onset estrogen treatment did not change the effect observed in the ovariectomy, however late-onset estrogen treatment increased the vasoconstriction to phenylephrine, the thromboxane production (TXA<sub>2</sub>) and the protein expression of ERα-36kDa, alternative splicing of the classical receptor ERα-66kDa. Therefore, the effects of estrogen were not beneficial in aging, contributing to the development of cardio and cerebrovascular diseases due to alteration cerebral circulation.

**Keywords:** Estrogen. Postmenopause. Cardiovascular disease. Estrogen receptor. Alternative splicing. Carotid artery.

## 1.INTRODUÇÃO

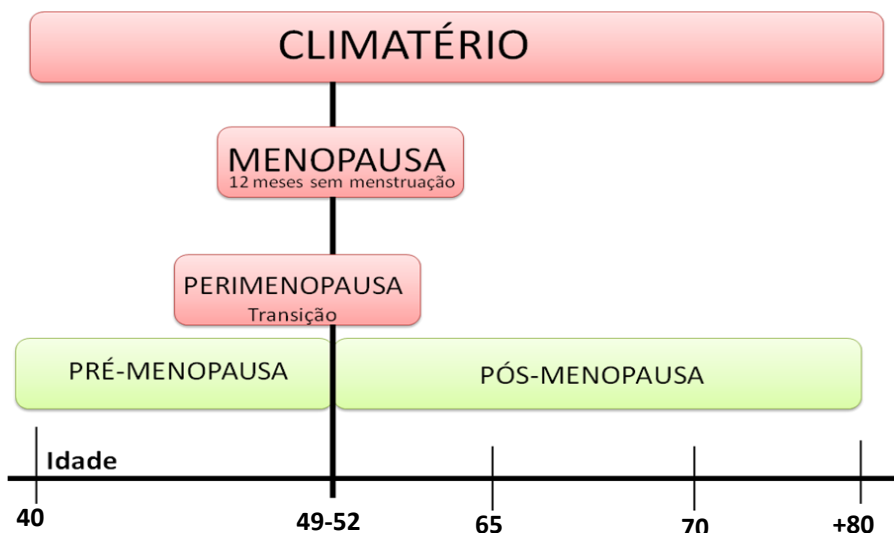
### 1.1 Terapia hormonal com estrógeno em mulheres na pós-menopausa: do efeito benéfico ao novo conceito de tratamento precoce e tardio

A terapia hormonal com estrógeno ou conjugados estrogênicos equinos (CEE), associados ou não a progesterona, com objetivo de proteção cardio e cerebrovascular é, ainda, um assunto de extrema controvérsia.

Em 1942, a *Food and Drug Administration (FDA)* liberou o uso do Premarin®, o primeiro CEE, com a indicação de amenizar os sintomas vasomotores da pós-menopausa <sup>2</sup>. Obviamente, por uma questão de expectativa de vida, que na época era de aproximadamente 50 anos, o hormônio era pouco utilizado.

Nos últimos anos com o avanço científico, tecnológico e em programas de saúde pública, o aumento da expectativa de vida feminina cresceu, alcançando a marca de 74,8 <sup>3</sup> anos no Brasil, 87 e 85 <sup>4</sup> anos em países como Japão e Espanha, respectivamente. Com isso, podemos concluir que atualmente o número de mulheres que adentram na pós-menopausa e permanecem nesta fase por pelo menos um terço de suas vidas cresceu exponencialmente. Segundo a Sociedade Norte Americana de Menopausa, estima-se que no ano de 2025 aproximadamente 1,1 bilhão de mulheres estarão no período da pós-menopausa.

A palavra menopausa é derivada do grego “*emmenopausis*”, junção de duas palavras “*mês*” e “*pausa/cessar*” e é definida quando há cessação espontânea da menstruação pelo período de 12 meses correntes. Após esse período inicia-se a pós-menopausa, denominação que perdura até a morte <sup>5</sup> (Figura 1).



**Figura 1** – Esquema representativo das terminologias menopausa, pré-menopausa, perimenopausa, pós-menopausa e climatério.

A transição menopausa/pós-menopausa é um processo fisiológico que se inicia entre 49 e 52 anos, com poucas variações entre os países e ao longo dos anos <sup>6</sup>. O início dessa transição ocorre quando há redução drástica do número de oócitos e queda da produção de inibina B, uma glicoproteína produzida nas células granulosas do corpo lúteo ovariano. <sup>5</sup>

A inibina B é importante na fisiologia do ciclo menstrual por regular a liberação do hormônio folículo estimulantes (FSH) e hormônio luteinizante (LH) logo após a menstruação. Com a redução da inibina B e consequentemente do *feedback* negativo no eixo hipotalâmico-hipofisário-ovariano há o aumento crônico do FSH e com isso a cessação da função folicular ovariana, levando à redução da produção de estrógeno <sup>5</sup>.

Apesar de atualmente o conceito e a fisiologia de pós-menopausa serem conhecidos, na década de 1966, por interesses financeiros de diversas indústrias farmacêuticas, a pós-menopausa foi conceituada como “uma fase de decadência de vida”. Esse errôneo conceito foi inserido na sociedade por meio do livro *Femine Forever*, escrito pelo médico Robert Wilson. No livro consta que:

As demais consequências físicas da castração são tão variadas, obscuras e caprichosas que a maioria dos médicos fica perplexamente perdida diante da narração dos sintomas pelas suas pacientes menopausadas. Por exemplo, o que pode fazer um pobre médico para uma mulher que se queixa de nervosismo, irritabilidade, ansiedade, apreensão, fogachos, suores noturnos, dores nas juntas, melancolia, palpitações, crises de choro, fraqueza, vertigens, enxaquecas, distração, perda da memória, indigestão crônica, insônia, micções frequentes, coceira na pele, vista seca, nariz seco, boca seca e dores nas costas? <sup>7</sup>.

A solução sugerida na época para todas essas alterações promovidas pela menopausa era a terapia hormonal com estrógeno e com isso esse hormônio passou de um simples tratamento farmacológico para a nova pílula do rejuvenescimento. Foi o ano em que a indústria farmacêutica mais lucrou com a venda de hormônios sintéticos. A partir de então diversos estudos na área básica e clínica deram início à busca do entendimento do efeito do estrógeno sobre a biologia humana <sup>8; 9</sup>.

Mulheres no período fértil são hemodinamicamente mais protegidas contra diversas doenças, dentre elas as do sistema cardiovascular, do que homens na mesma faixa etária <sup>10; 11</sup>. Essa constatação se dá pelo fato de que o índice de doenças cardiovasculares é maior em homens do que em mulheres até a menopausa, sendo que, após esse período, esse índice pode tornar-se semelhante ou maior do que aqueles observados em homens <sup>12; 13</sup>.

Dentre as doenças cardiovasculares, o acidente vascular encefálico (AVE) representa 16,4% dos casos, sendo considerada mundialmente uma das principais causas de morte e a principal causa de déficit cognitivo <sup>11; 12</sup>. É importante ressaltar que a prevalência de AVE em mulheres tem sido maior do que em homens, aproximadamente 55 mil casos a mais por ano <sup>12</sup>.

Sabendo-se que na pós-menopausa há redução drástica dos níveis endógenos de estrógeno, é válido propor que este hormônio exerça efeito protetor sobre os vasos sanguíneos e coração de mulheres no período fértil.

Interessantemente, alterações cardiovasculares também são observadas em mulheres jovens que foram submetidas ao procedimento de remoção cirúrgica dos ovários e/ou útero (pós-menopausa precoce) <sup>14; 15; 16</sup>.

O uso de hormônios esteróides, como o 17 $\beta$ -estradiol ou CEE, como terapia hormonal<sup>(\*)</sup> para mulheres na pós-menopausa é considerado uma alternativa eficaz para reduzir o risco de osteoporose, sintomas vasomotores como os fogachos, além da melhora nos quadros de sudorese noturna e secura vaginal <sup>2</sup>. Entretanto, do ponto de vista cardio e cerebrovascular os resultados ainda são controversos.

Em 1985 foi desenvolvido um dos maiores estudos observacionais sobre os efeitos da terapia hormonal com 17 $\beta$ -estradiol no sistema cardiovascular de enfermeiras do hospital de *Framingham (Nurses` Health Study)*, no qual foi demonstrado efeito cardioprotetor desse hormônio <sup>19 20</sup>. Durante o período de 10 anos, aproximadamente 48.000 mulheres na menopausa, natural ou cirúrgica, que faziam o uso de terapia hormonal foram acompanhadas e estabeleceu-se que neste grupo o índice de doença coronária aguda e morte por complicações cardiovasculares foram menor <sup>19; 21</sup>. A posteriori, estudos epidemiológicos demonstraram redução de 35-50% do risco de eventos cardiovasculares em mulheres na pós-menopausa que utilizavam terapia hormonal <sup>22; 23; 24; 25</sup>

Os estudos em modelos animais de pós-menopausa (retirada dos ovários) foram ao encontro dos resultados demonstrados nos estudos clínicos observacionais. Fêmeas ovariectomizadas, conseqüentemente com redução drástica dos níveis endógenos de estrógeno, apresentaram disfunção endotelial quando comparadas com fêmeas intactas <sup>26; 27; 28; 29; 30</sup>. Neste grupo de fêmeas

---

(\*) O termo terapia de reposição hormonal está em desuso e, atualmente, é considerado errôneo, porém ainda pode ser encontrado na literatura. O termo adotado na última declaração global sobre a terapia hormonal na menopausa foi: *menopausal hormone therapy* <sup>17; 18</sup>.



ovariectomizadas os tratamentos com  $17\beta$ -estradiol isolado ou com CEE restauraram a disfunção endotelial <sup>27; 28; 29</sup>. Entretanto, estudos clínicos randomizados multicêntricos como o *Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study* (HERS I e II) e o Women's Health Initiative (WHI) levantaram dúvidas sobre os efeitos protetores do estrógeno no sistema cardiovascular.

O estudo HERS foi um ensaio clínico randomizado e duplo-cego, iniciado na década de 1990, que testou a eficácia da terapia hormonal com CEE (Premarin® 0,625mg) e acetato de medroxiprogesterona (2,5mg) em mulheres entre 44 e 79 anos<sup>(\*2)</sup> com doença coronária diagnosticada, sendo, por isso, um estudo de prevenção secundária. O estudo perdurou 4,1 anos, acompanhou 2.763 mulheres e os primeiros resultados apontavam que os eventos coronarianos, tromboembólicos venosos e mortes por doenças cardiovasculares foram semelhantes nas usuárias de terapia hormonal e no grupo tratado com placebo <sup>31; 32; 33</sup>. Todavia, as complicações cardiovasculares observadas nas mulheres que estavam em tratamento hormonal ocorreram no primeiro ano do estudo e, por isso, foi aventada a hipótese que o tratamento prolongado com estrógeno poderia reduzir o risco cardiovascular, prorrogando, assim, o estudo. <sup>31</sup>

Em virtude do exposto acima, esse estudo foi estendido por mais 2,7 anos, nomeado HERS II, completando o total de 6,8 anos. Nesta fase, quando comparadas mulheres que faziam uso de terapia hormonal com as que não faziam, nenhuma diferença foi encontrada em relação à ocorrência de infarto agudo do miocárdio, mortes por doença coronariana ou outros eventos cardiovasculares, exceto para arritmia ventricular não fatal que foi maior no grupo tratado <sup>34</sup>. Em 2002,

---

(\*2) A média de idade das mulheres alocadas para o estudo era de 66,7 anos.

deu-se início a outro estudo clínico com o objetivo de suprir críticas e lacunas existentes no HERS I e II.

O WHI (*Women's Health Initiative*) foi um estudo multicêntrico, randomizado e duplo-cego que avaliou em mulheres de 50-79 anos o efeito da terapia hormonal na prevenção primária da doença cardiovascular, sendo esse o primeiro ponto contrapondo-se ao HERS, o qual avaliou a prevenção secundária<sup>34; 35</sup>.

No estudo WHI as mulheres foram divididas em dois grupos. O primeiro grupo foi composto por mulheres na pós-menopausa natural que recebeu o mesmo esquema de tratamento utilizado no HERS (associação de CEE com medroxiprogesterona) e foi observado aumento de 29% no índice de eventos cardiovasculares, determinando a finalização do ensaio clínico neste grupo. Entretanto, no segundo grupo as mulheres estavam na pós-menopausa induzida por histerectomia e essas foram tratadas com CEE sem progesterona,<sup>34</sup> suprimindo umas das críticas feitas ao ensaio HERS; ausência do uso isolado de estrógeno. Neste segundo grupo, o estudo estendeu-se até 2004 e foi demonstrado que o uso isolado de CEE aumentava o risco de AVE<sup>34</sup>.

Posteriormente, outros ensaios, incluindo meta-análises,<sup>36</sup> confirmaram o aumento de AVE e doença coronária em mulheres que faziam terapia hormonal<sup>36; 37</sup> sugerindo, portanto, que o estrógeno quando administrado em forma de terapia hormonal exercia efeito maléfico no sistema encéfalo-cardiovascular.

Todos os estudos realizados a respeito da terapia hormonal foram considerados de excelente qualidade, no entanto, são alvos de diversas críticas. GRODSTEIN et al. (2006)<sup>38</sup> sugeriram que os resultados negativos quanto à proteção cardiovascular podem estar relacionados com a média de idade das mulheres selecionadas para o estudo, que era de 66,7 anos, ou seja, uma década

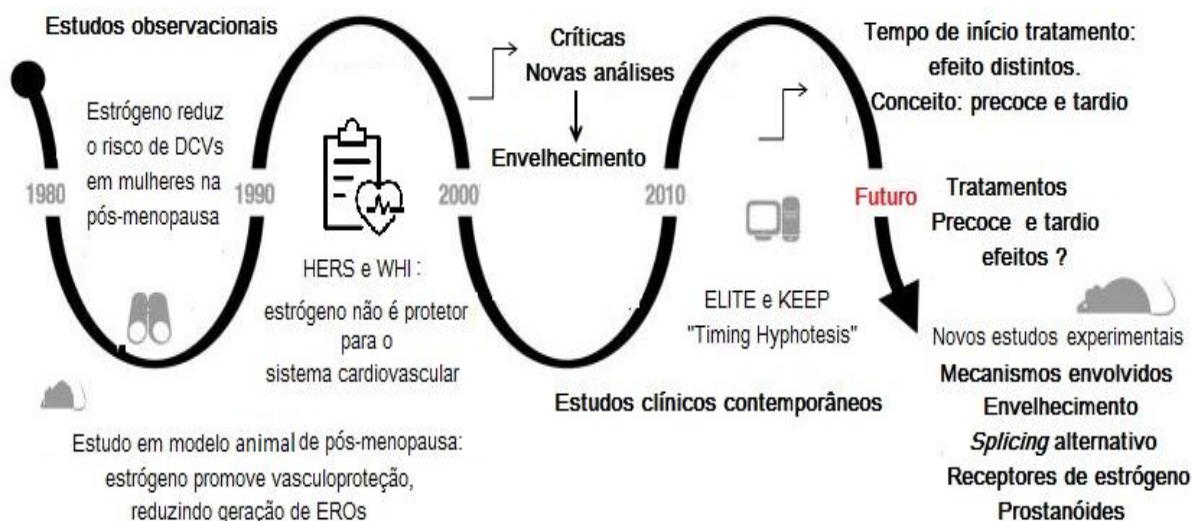
acima do início da pós-menopausa. Essa crítica vai ao encontro do observado em estudos com macacas *Cynomolgus*, uma vez que os efeitos benéficos do tratamento hormonal na prevenção da aterosclerose somente ocorriam nas fêmeas com menor tempo de privação do estrogênio, ou seja, as ovariectomizadas que ficaram menor tempo sem receber tratamento hormonal <sup>39</sup>.

De fato, uma revisão do WHI demonstrou que o maior índice de AVE nas mulheres que faziam uso de terapia hormonal ocorria naquelas acima de 60 anos, ou seja, nas que estavam pelo menos 10 anos na pós-menopausa <sup>40</sup>. Com isso, aventou-se a *timing hypothesis*, ou seja, a existência de uma possível janela de oportunidade terapêutica para o tratamento hormonal na pós-menopausa, onde o estrogênio poderia causar vasculoproteção <sup>41; 42</sup>.

Com a nova percepção sobre os possíveis efeitos do tratamento hormonal de acordo com o tempo de início e a idade, outros estudos clínicos foram desenhados. O estudo KEEP (*Kronos Early Estrogen Prevention Study*) demonstrou em 466 mulheres com idade média de 52,7 anos que o tratamento com 17 $\beta$ -estradiol ou CEE iniciado precocemente, ou seja, no início da pós-menopausa, estabilizou a calcificação nas placas de ateroma em relação ao grupo placebo <sup>43; 44; 45</sup>. Mais recentemente, o estudo ELITE (*Early versus Late Intervention Trial with Estradiol*) avaliou a progressão de aterosclerose em mulheres que iniciaram a terapia hormonal antes de completarem 6 anos na pós-menopausa e em mulheres que já estavam nesta condição por pelo menos 10 anos. Em 2016 foi publicado o primeiro resultado desse estudo realizado com 643 mulheres. Foi demonstrado que a progressão da placa de ateroma estabilizou nas mulheres que faziam uso de terapia hormonal e estavam até 6 anos na pós-menopausa. Estas foram comparadas com

mulheres que estavam sob tratamento hormonal há mais de 10 anos na pós-menopausa e com aquelas tratadas com placebo <sup>46</sup>.

Portanto, é possível considerar a existência de uma janela de oportunidade terapêutica onde o tempo de início do tratamento com estrógeno pode conferir ou não cardioproteção. Entretanto, os mecanismos pelo qual o hormônio tem esse distinto efeito são até o momento ainda desconhecidos. A figura 2 traz um histórico dos ensaios clínicos com estrógeno em mulheres na pós-menopausa e a contribuição dos estudos em modelos animais para a complementação dos novos ensaios e o entendimento do mecanismo de ação.



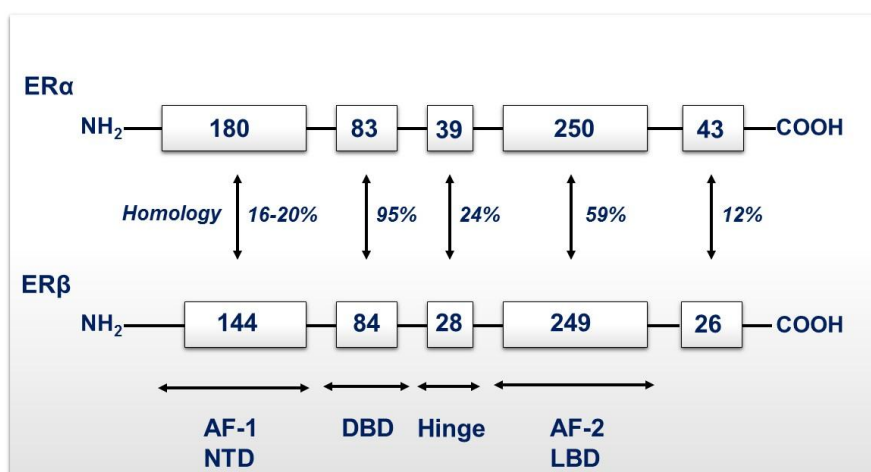
**Figura 2** – Estudos clínicos e experimentais ao longo dos anos sobre o tratamento hormonal com estrógeno no sistema cardiovascular. Adaptado de GARCIA et al. (2016) <sup>47</sup>

## 1.2 Estrógeno: efeitos no sistema cardiovascular

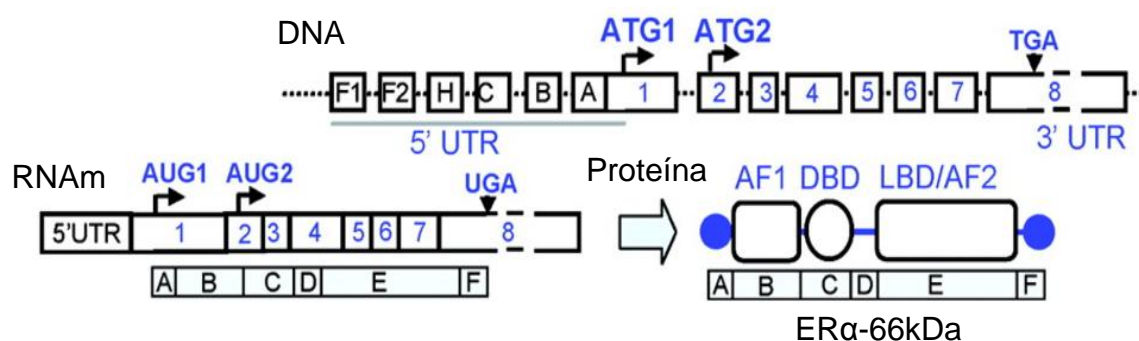
Os estrógenos são hormônios sexuais com diversas ações fisiológicas e em diferentes tecidos como vagina, endométrio, ovários, ossos, sistema nervoso central e sistema cardiovascular. Assim, a ausência desse hormônio no organismo pode ocasionar diferentes efeitos em diversos tecidos-alvo <sup>48</sup>.

As ações clássicas do estrógeno ocorrem por meio de receptores nucleares denominados alfa (ER $\alpha$ , NR3A1; gene ERS1) <sup>49; 50</sup> e beta (ER $\beta$ , NR3A2: gene ERS2) <sup>51</sup> e pelo receptor de membrana acoplado a proteína G denominado GPER (do inglês, *G-protein coupled receptor 30*) <sup>52</sup>.

Os receptores nucleares, ER $\alpha$  e ER $\beta$ , são constituídos por quatro domínios funcionais similares denominados da seguinte maneira: região amino (NH<sub>2</sub>)-terminal (NTD, do inglês *N-Terminal Domain*); domínio de ligação ao DNA (DBD, do inglês *DNA Binding Domain*), alça *Hinge* (ou dobradiça); e domínio de ligação ao agonista, localizado na porção carboxi(COOH)-terminal, (LDB, do inglês, *Ligand Binding Domain*) (Figuras 3 e 4).



**Figura 3** – Esquema representativo dos domínios funcionais dos receptores clássicos de estrógeno alfa (ER $\alpha$ -66kDa) e beta (ER $\beta$ ). Fonte: Costa et al. (2016) <sup>1</sup>



**Figura 4** – Esquema representativo da estrutura gênica do receptor de estrógeno alfa (ERS1 – ER $\alpha$ ). Adaptado de ARNAL et al. (2017) <sup>53</sup>

O NTD contém uma região autônoma de ativação transcricional, denominada AF-1, que modula positivamente ou negativamente a transcrição de diversos genes de forma específica em cada célula. Este domínio de regulação é consideravelmente diferente entre o ER $\alpha$  e o ER $\beta$ , pois possuem apenas 16-20% de homologia (Figura 3) <sup>54</sup>.

O domínio DBD é o mais conservado entre ER $\alpha$  e ER $\beta$  com 95% de homologia e está estruturado na forma de dois dedos de zinco capazes de reconhecer sequências específicas de DNA em genes-alvo; é denominado de elemento responsivo ao estrógeno – ERE. O domínio *Hinge* é essencial para a dimerização do receptor e é também um local de rotação (por isso a designação de *Hinge*, em português "dobradiça") que é essencial para que o receptor alcance diferentes conformações necessárias para a ligação ao DNA (Figura 3).

Na porção carboxi-terminal do receptor está o domínio LBD que contém o sítio de ligação ao hormônio e é responsável pela maior parte das funções ativadas pelo agonista como dimerização do receptor e sua translocação para o núcleo, além da atração de moléculas co-reguladoras da transcrição gênica via região autônoma de ativação. Essa região é denominada de AF-2 <sup>55</sup>. Em contraste com a grande

homologia do DBD entre os dois receptores, os domínios LBD de ER $\alpha$  e ER $\beta$  exibem muito menos homologia, 59%, sugerindo que as afinidades dos agonistas/antagonistas para os subtipos de receptores podem diferir (Figura 3).

Ambos os receptores nucleares ER $\alpha$  e ER $\beta$  foram descritos no sistema cardiovascular sendo observada expressão no músculo liso <sup>56</sup> e no endotélio vascular <sup>57</sup>.

A proteção do estrógeno endógeno no sistema cardiovascular foi observada em diversos modelos animais fêmeas como em ratas espontaneamente hipertensas (SHR) <sup>58; 59</sup>, DOCA-sal <sup>60; 61</sup>, Dahl sal-sensível <sup>62</sup> New Zealand <sup>63</sup> Sprague-Dawley <sup>26</sup> e Wistar <sup>30</sup>.

Para atuar em seus receptores intracelulares, o estrógeno penetra nas células por difusão passiva e no citoplasma celular ligam-se aos receptores desencadeando ações transcricionais (genômica clássica) e não transcricionais (não clássica)<sup>(\*3)</sup>. Os efeitos não transcricionais ocorrem de maneira rápida (de segundos a minutos) e, como o próprio nome diz, independentemente de transcrição gênica e síntese proteica <sup>64</sup>. Na vasculatura esses efeitos estão associados principalmente à vasodilatação e proteção vascular via a produção de prostaciclina <sup>65</sup>, ativação de quinases, fosfatases e de canais iônicos presentes na membrana, levando à mobilização de cálcio, ativação de segundos mensageiros e à produção de óxido nítrico (NO)<sup>66</sup>.

Nos efeitos transcricionais, após a formação do complexo estrógeno-receptor, há a translocação deste complexo para o núcleo onde ocorre a ligação ao elemento responsivo ao estrógeno e a regulação da expressão de diferentes genes-alvo <sup>67</sup>. Na vasculatura, a ação estrogênica afeta a expressão de genes envolvidos na síntese

---

(\*3) Atualmente pode ser encontrado o termo canônico e não canônico

de proteínas que alteram o tônus vascular e que participam da resposta a injúria vascular e aterosclerose. Dentre estes genes, o da eNOS<sup>68; 69</sup>, da ciclooxigenase-1 e 2 (COX-1 e COX-2)<sup>70</sup>, da prostaciclina sintase (PGI<sub>2</sub>S)<sup>71</sup> têm sua expressão modulada positivamente, enquanto os genes da endotelina<sup>60</sup>, das MAPKs (*mitogen-activated protein kinase*)<sup>72</sup> e da NADPH oxidase<sup>27; 28</sup> são regulados negativamente.

O NO, além de um potente vasodilatador, é anti-agregante plaquetário e inibe a proliferação das células do músculo liso vascular, sendo que a redução deste componente em carótidas pode ser o fator determinante para a disfunção vascular neste vaso. O NO é produzido a partir da transformação da L-arginina em L-citrulina pela NO sintase (NOS). Três isoformas da NOS foram descritas: nNOS (NOS I – neuronal), iNOS (NOS II – induzível) e eNOS (NOS III – endotelial)<sup>73, 73</sup>.

Além das isoformas da NOS, distintos mecanismos podem estar envolvidos na produção/biodisponibilidade do NO, tais como: a geração de EROs, principalmente o ânion superóxido<sup>59; 74</sup>, o aumento do cálcio intracelular ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)<sup>75</sup>, ativação não genômica da via PI3K/fosfoquinase B (PKB/AKT)<sup>76</sup> e diminuição da ADMA, inibidor endógeno da eNOS<sup>77</sup>.

O outro fator que pode ser modulado pelo estrógeno são eicosanóides, compostos biologicamente ativos de origem lipídica e derivados do ácido araquidônico e, neste grupo, estão incluídas(os) as prostaglandinas, o tromboxano, os leucotrienos, as lipoxinas e os HETEs.

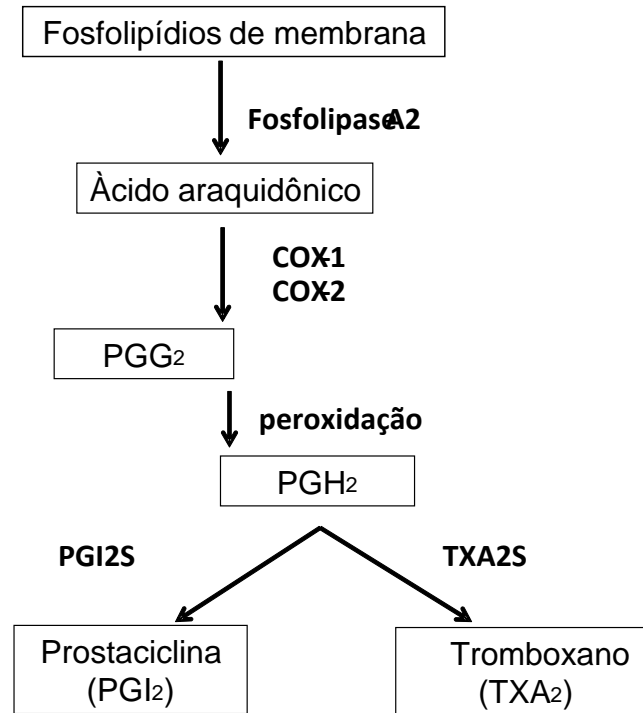
A prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e o tromboxano (TXA<sub>2</sub>) são prostanóides essenciais para o sistema cardiovascular, pois atuam na manutenção do tônus de micro e macrovasos. A PGI<sub>2</sub> é um importante vasodilatador e inibidor da agregação plaquetária, enquanto o TXA<sub>2</sub> promove vasoconstrição e induz a agregação plaquetária, ou seja, possuem efeitos opostos. O desequilíbrio entre a produção



desses prostanóides (vasoconstritor *versus* vasodilatador) está relacionado ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares <sup>78</sup>.

A formação desses prostanóides ocorre por meio da enzima ciclooxigenase (COX) que converte, por meio de uma reação de ciclooxigenação, o ácido araquidônico no metabólito instável PGG<sub>2</sub> e posteriormente por meio da reação de peroxidação converte o PGG<sub>2</sub> em PGH<sub>2</sub>, metabólito mais estável <sup>79</sup>. Duas isoformas da COX são conhecidas e denominadas COX-1 e COX-2. A COX-1 é uma enzima considerada constitutiva e está expressa em todo o organismo <sup>80; 81</sup> e no sistema cardiovascular está relacionada com a produção de prostanóides que promovem proteção <sup>82</sup>. A COX-2 é considerada enzima induzível, pois sua expressão é aumentada em áreas de inflamação e lesões ateroscleróticas <sup>80; 81</sup>, entretanto já foi observada sua expressão constitutivamente <sup>80</sup>.

Os metabólitos PGG<sub>2</sub> e PGH<sub>2</sub> são ainda metabolizados enzimaticamente para que haja a formação de prostanóides ativos. As prostaglandinas são metabolizadas pelas prostaciclina sintase (PGI<sub>2</sub>S) e tromboxano sintase (TXA<sub>2</sub>S), gerando assim os metabólitos PGI<sub>2</sub> e TXA<sub>2</sub>, respectivamente (Figura 5) <sup>78; 81</sup>.



**Figura 5-** Esquema representativo da biossíntese de prostanóides. Adaptado de Hermenegildo et al. (2006) <sup>78</sup>

Portanto, alterações em um ou mais desses componentes moleculares vasculares podem responder pelo aumento do índice de doenças cardiovasculares em mulheres na pós-menopausa e o tratamento com estrógeno pode ser ter efeitos positivos e/ou negativos por interferir com esses parâmetros.

### 1.3 Envelhecimento e pós-menopausa: associação com as doenças cardiovasculares

O envelhecimento *per se* é considerado um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares por promover alterações estruturais e funcionais que levam à disfunção endotelial, rigidez e remodelamento arterial<sup>83; 84</sup>.

A senescência como um processo celular geneticamente programado foi descrito pela primeira vez por HAYFLICK et al. (1961)<sup>85</sup> em culturas de fibroblastos. Os autores observaram que as células estudadas deixavam de se dividir após um número finito de duplicações populacionais, propondo assim a *replicative senescence theory of ageing*. De acordo com essa teoria, as células envelhecem perdendo sua capacidade de divisão e se acumulam nos tecidos durante todo o período de vida do organismo. Apesar dessa perda da capacidade de divisão, a célula continua biologicamente ativa e devido ao seu fenótipo alterado modifica sua função tecido-específico, podendo promover doenças associadas ao envelhecimento<sup>86; 87</sup>. A parada da divisão celular pode ocorrer por diferentes mecanismos e dentre eles podemos citar o aumento na expressão de fatores que inibem a entrada na fase S (síntese) da divisão mitótica, momento em que ocorre a duplicação do DNA<sup>86</sup>.

Nas células vasculares, o aumento da geração de ânion superóxido é um dos principais fatores discutidos que promovem a disfunção endotelial no envelhecimento, principalmente pela capacidade dessa espécie reativa de oxigênio em reduzir a biodisponibilidade de NO<sup>88; 89; 90</sup>. Entretanto, vem sendo descrito também que o desequilíbrio na produção de prostanóides pode ser outro fator para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares no envelhecimento<sup>78; 91; 92; 93</sup>. Durante anos os experimentos em modelos animais de pós-menopausa - fêmeas ovariectomizadas - foram realizados em animais jovens e com isso os resultados do

efeito e as vias de sinalização do estrógeno na vasculatura podem ser distintos comparando-os com modelos de envelhecimento.

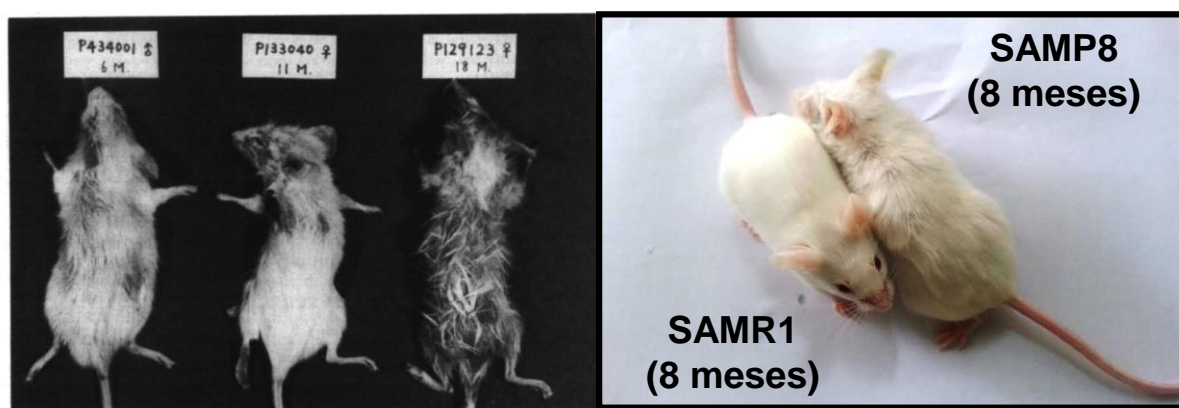
O envelhecimento cronológico promove disfunção endotelial em modelos animais <sup>94; 95</sup> e em humanos <sup>96</sup>, entretanto atualmente o modelo murino de senescência acelerada (SAMP) vem sendo associado às alterações vasculares similares ao envelhecimento cronológico, porém com características específicas de acordo a linhagem. Machos e fêmeas intactas SAMP apresentam disfunção endotelial em comparação com os animais resistentes à senescência-acelerada (SAMR)<sup>97; 98</sup>

Em 1981 TAKEDA et al. (1981) <sup>99</sup> desenvolveram a linhagem de camundongos SAMP (do inglês, senescence-accelerated mice prone – figura 6), considerado modelo de envelhecimento precoce, a partir do cruzamento da linhagem AKR/J, modelo murino para estudos de leucemia. A partir de observações apenas visuais, os autores constataram que dentro do mesmo grupo de AKR/J havia padrões diferentes de envelhecimento. Por isso, para confirmar a hipótese, os autores realizaram um *score* de envelhecimento que avaliava características como falta de brilho na pelagem, rugosidade da pele, lesões oftalmológicas e tempo de vida. A partir deste *score*, foi realizado o cruzamento entre machos e fêmeas que obtiveram *score* mais elevado e após cinco cruzamentos as características avaliadas mantiveram-se e passaram a se desenvolver mais precocemente, surgindo assim a linhagem SAMP. Dentre esses havia os animais que com a mesma faixa etária não desenvolviam envelhecimento precoce, *score* baixo, e por isso foram denominados “resistentes a senescência” (SAMR).

Atualmente foram descritas nove linhagens de SAMP (SAMP1/2/3/6/7/8/9/10/11) e três de SAMR (SAMR1/4/5). As linhagens foram

caracterizadas de acordo com determinadas características em comum. Por exemplo, a linhagem SAMP8 é considerada modelo de déficit cognitivo, devido a alterações cerebrais semelhantes ao do Alzheimer <sup>100</sup>, por isso é uma das linhagens mais utilizadas neste tipo de estudo. Além disso, foi caracterizada também como modelo de envelhecimento vascular por apresentar aumento na vasoconstrição induzida por fenilefrina e U46619 e, além disso, redução na vasodilatação induzida por ACh <sup>98; 101</sup>.

As alterações vasculares observadas no envelhecimento, no modelo murino SAMP8, aparecem mais precocemente (6 meses), quando comparadas com aquelas em ratas SHR (16 meses) <sup>102</sup> e Wistar (20 meses) <sup>103</sup>. A média de vida dos animais SAMP8 varia entre 10 e 18 meses <sup>104</sup>, enquanto a dos SAMR1 entre 19-21 meses (Ver Figura 6).



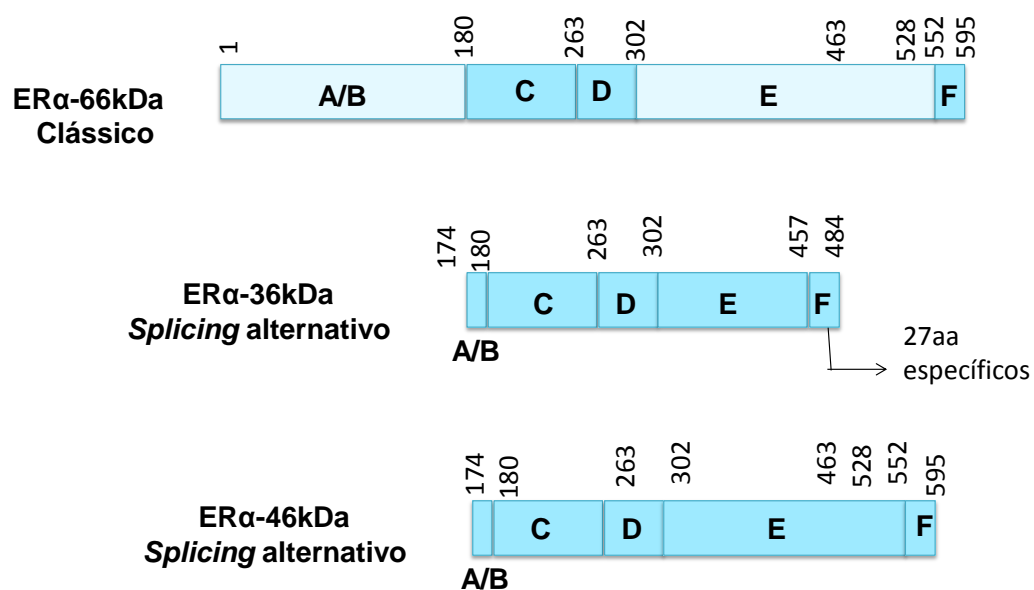
**Figura 6** – Imagens ilustrativas de camundongos da linhagem SAMP. Esquerda: machos e fêmeas SAMP com 6, 11 e 18 meses; fonte: TAKEDA et al. (1981) <sup>99</sup>. Direita: fêmeas SAMP8 e SAMR1 ovariectomizadas na idade de 8 meses.

### **1.3.1 *Splicing alternativo e a formação de novas proteínas funcionais do receptor de estrógeno***

*Splicing* é um processo pós-transcricional fisiológico em eucariotos no qual introns são removidos e os éxons são unidos em única determinada sequência, fazendo com que o pré-RNA seja transcrito em RNA maduro<sup>105; 106</sup>. Por outro lado, o processo de *splicing* alternativo é definido como um procedimento no qual moléculas idênticas de pré-RNA são transcritas de distintas formas, gerando RNA alternativos maduros e com isso a tradução de uma grande diversidade de proteínas<sup>107; 108; 109</sup> que possuem estrutura, localização e função diferentes<sup>110</sup>. Como resultado final, pode ser observada alteração da atividade celular que desencadeariam anormalidades associadas a doenças como o câncer e do sistema cardiovascular.<sup>106</sup>

Diversos *splicing* alternativos foram identificados para os receptores de estrógeno, principalmente do ER $\alpha$ -66kDa, sendo esses produzidos principalmente pela eliminação de determinados éxons ou uso alternativo de éxons terminais<sup>111</sup>. O ER $\alpha$ -36kDa é um *splicing* alternativo do receptor clássico de estrógeno, o ER $\alpha$ -66kDa, identificado em células MCF-7, linhagem celular epitelial derivada de câncer mamário<sup>112</sup>.

O ER $\alpha$ -36kDa contém 283 aminoácidos e sua transcrição ocorre do éxon 2 ao 7 mais 27 aminoácidos residuais do último éxon (Figura 7), assim este *splicing* alternativo perde os domínios funcionais AF1 e AF2<sup>112</sup>. A expressão desse receptor foi descrita em diversos tipos de câncer e associado à ativação de vias de proliferação, invasão e migração celular, principalmente por via não transcricional<sup>113; 114</sup>.



**Figura 7** - Esquema representativo dos domínios funcionais do receptor clássico de estrógeno, ERα-66kDa, e os *splicing* alternativos ERα-36kDa e ERα-46kDa . Adaptado SOLTYSIK et al. (2016)<sup>113</sup>.

Tendo em vista que o tempo em que o tratamento com estrógeno é instaurado pode influenciar no resultado final do seu efeito sobre as alterações vasculares, a diferença de resultados quando modelos animais de pós-menopausa jovens ou velhos são utilizados e a ausência de mecanismos descritos na literatura que expliquem a ação do tratamento com estrógenos em modelo animal velho de pós-menopausa, se fazem necessário estudos que reúnam tais critérios, a fim de se elucidar com clareza o efeito do tratamento com estrógeno na pós-menopausa.

## **2. OBJETIVO**

Avaliar os efeitos dos tratamentos com estrógeno iniciado precoce e tardiamente sobre a função de artérias carótidas e os respectivos mecanismos moleculares em camundongos fêmeas ovariectomizadas com senescência-acelerada (SAMP8) e resistente à senescência-acelerada (SAMR1).



## 7 CONCLUSÃO

Os dados apresentados permitem concluir que o estrógeno promove efeitos distintos nas carótidas comuns de fêmeas SAMR1 e SAMP8 ovariectomizadas, sendo benéficos em SAMR1 e maléficos em SAMP8, dependendo do tempo de início do tratamento. Esse efeito distinto confirma a existência da janela de oportunidade terapêutica durante o tempo de privação do estrógeno.

## 8 PERSPECTIVA

O tratamento com estrógeno na pós-menopausa deve ser revisto e, quando necessário, administrado com cautela, visto que, em modelo animal de envelhecimento, quanto mais tarde inicia-se o tratamento maior o dano vascular. Além disso, é importante ressaltar que o tratamento precoce não exerceu nenhum efeito benéfico do ponto de vista vascular, apenas manteve as características já observadas na ausência do hormônio.

A janela de oportunidade terapêutica confirma-se ainda mais com este trabalho e, além disso, parece esta associada à formação de *splicing* alternativo funcional do ER $\alpha$ . Sendo assim, em um futuro não distante, novos tratamentos farmacológicos específicos poderão surgir para tratamento/prevenção as doenças cardiovasculares em mulheres na pós-menopausa.

REFERÊNCIAS<sup>(\*)</sup>

- 1 COSTA, T., Echem C.; Colli L.G.; et al. Características do endotélio em ambos os sexos. In. **Endotélio e Doenças Cardiovasculares: biologia vascular e síndromes clínicas**. 2. Rio de Janeiro: 2016. 900p.
- 2 HICKEY, M.; DAVIS, S. R.; STURDEE, D. W. Treatment of menopausal symptoms: what shall we do now? **Lancet**, v. 366, n. 9483, p. 409-21, 2005 .
- 3 INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Projeção da população do Brasil por sexo e idade para o período de 2000/2060. Disponível em: [ftp://ftp.ibge.gov.br/Projecao\\_da\\_Populacao/Projecao\\_da\\_Populacao\\_2013/nota\\_metodologica\\_2013.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Projecao_da_Populacao/Projecao_da_Populacao_2013/nota_metodologica_2013.pdf) 2013. Acesso em: 05/08.
- 4 WORLD HEALTH ORGANIZATION. Life expectancy. FE EXPECTANCY. 2017. Disponível em: [http://www.who.int/gho/mortality\\_burden\\_disease/life\\_tables/en/](http://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/life_tables/en/) Acesso em: 05/08.
- 5 TAKAHASHI, T. A.; JOHNSON, K. M. Menopause. **Med Clin North Am**, v. 99, n. 3, p. 521-34, 2015.
- 6 Research on the menopause in the 1990s. Report of a WHO Scientific Group. **World Health Organ Tech Rep Ser**, v. 866, p. 1-107, 1996.
- 7 WILSON, R. A. **Feminine Forever**. 1. EUA: Pocket Books; 1st Edition Paperback edition, 1968. 176p.
- 8 HOUCK, J. A. "What do these women want?": Feminist responses to *Feminine Forever*, 1963-1980. **Bull Hist Med**, v. 77, n. 1, p. 103-32, 2003.
- 9 WILSON, R. A.; WILSON, T. A. The fate of the nontreated postmenopausal woman: a plea for the maintenance of adequate estrogen from puberty to the grave. **J Am Geriatr Soc**, v. 11, p. 347-62, 1963.
- 10 MESSERLI, F. H. et al. Disparate cardiovascular findings in men and women with essential hypertension. **Ann Intern Med**, v. 107, n. 2, p. 158-61, 1987.
- 11 FALSETTI, L. et al. From head to toe: Sex and gender differences in the treatment of ischemic cerebral disease. **Pharmacol Res**, v. 121, p. 240-250, 2017.
- 12 MOZAFFARIAN, D. et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association. **Circulation**, v. 133, n. 4, p. e38-360, 2016.

---

(\*) De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- 13 WOLFF, C. et al. Sex Disparities in Access to Acute Stroke Care: Can Telemedicine Mitigate this Effect? **J Health Dispar Res Pract**, v. 9, n. 1, 2016.
- 14 YIM, S. F. et al. Prospective randomized study of the effect of "add-back" hormone replacement on vascular function during treatment with gonadotropin-releasing hormone agonists. **Circulation**, v. 98, n. 16, p. 1631-5, 1998.
- 15 EAKER, E. D. et al. Cardiovascular disease in women. **Circulation**, v. 88, n. 4 Pt 1, p. 1999-2009, 1993.
- 16 COLDITZ, G. A. et al. Menopause and the risk of coronary heart disease in women. **N Engl J Med**, v. 316, n. 18, p. 1105-10, 1987.
- 17 PANAY, N.; FENTON, A. A global consensus statement on menopause hormone therapy--aims, aspirations and action points. **Climacteric**, v. 16, n. 2, p. 201-2, 2013.
- 18 DE VILLIERS, T. J. et al. Global consensus statement on menopausal hormone therapy. **Climacteric**, v. 16, n. 2, p. 203-4, 2013.
- 19 STAMPFER, M. J. et al. A prospective study of postmenopausal estrogen therapy and coronary heart disease. **N Engl J Med**, v. 313, n. 17, p. 1044-9, 1985.
- 20 \_\_\_\_\_. Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease. Ten-year follow-up from the nurses' health study. **N Engl J Med**, v. 325, n. 11, p. 756-62, 1991.
- 21 STAMPFER, M. J.; COLDITZ, G. A. Estrogen replacement therapy and coronary heart disease: a quantitative assessment of the epidemiologic evidence. **Prev Med**, v. 20, n. 1, p. 47-63, 1991.
- 22 LIMACHER, M. C. Hormones and heart disease: what we thought, what we have learned, what we still need to know. **Trans Am Clin Climatol Assoc**, v. 113, p. 31-40, 2002.
- 23 BARRETT-CONNOR, E. Menopause, atherosclerosis, and coronary artery disease. **Curr Opin Pharmacol**, v. 13, n. 2, p. 186-91, 2013.
- 24 Effects of estrogen or estrogen/progestin regimens on heart disease risk factors in postmenopausal women. The Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Trial. The Writing Group for the PEPI Trial. **JAMA**, v. 273, n. 3, p. 199-208, 1995.
- 25 GRODSTEIN, F. et al. Postmenopausal hormone therapy and mortality. **N Engl J Med**, v. 336, n. 25, p. 1769-75, 1997.

- 26 YUNG, L. M. et al. Inhibition of renin-angiotensin system reverses endothelial dysfunction and oxidative stress in estrogen deficient rats. **PLoS One**, v. 6, n. 3, p. e17437, 2011.
- 27 CERAVOLO, G. S. et al. Conjugated equine estrogen treatment corrected the exacerbated aorta oxidative stress in ovariectomized spontaneously hypertensive rats. **Steroids**, v. 78, n. 3, p. 341-6, 2013.
- 28 COSTA, T. J. et al. Association of testosterone with estrogen abolishes the beneficial effects of estrogen treatment by increasing ROS generation in aorta endothelial cells. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 308, n. 7, p. H723-32, 2015.
- 29 DANTAS, A. P. et al. Influence of female sex hormones on endothelium-derived vasoconstrictor prostanoid generation in microvessels of spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 34, n. 4 Pt 2, p. 914-9, 1999.
- 30 CAMPOREZ, J. P. et al. Dehydroepiandrosterone protects against oxidative stress-induced endothelial dysfunction in ovariectomized rats. **J Physiol**, v. 589, n. Pt 10, p. 2585-96, 2011.
- 31 HULLEY, S. et al. 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**, v. 280, n. 7, p. 605-13, 1998.
- 32 SIMON, J. A. et al. Postmenopausal hormone therapy and risk of stroke: The Heart and Estrogen-progestin Replacement Study (HERS). **Circulation**, v. 103, n. 5, p. 638-42, 2001.
- 33 HSIA, J. et al. Peripheral arterial disease in randomized trial of estrogen with progestin in women with coronary heart disease: the Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study. **Circulation**, v. 102, n. 18, p. 2228-32, 2000.
- 34 GRADY, D. et al. Cardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II). **JAMA**, v. 288, n. 1, p. 49-57, 2002.
- 35 \_\_\_\_\_. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS): design, methods, and baseline characteristics. **Control Clin Trials**, v. 19, n. 4, p. 314-35, 1998.
- 36 SARE, G. M.; GRAY, L. J.; BATH, P. M. Association between hormone replacement therapy and subsequent arterial and venous vascular events: a meta-analysis. **Eur Heart J**, v. 29, n. 16, p. 2031-41, 2008.

- 37 WENGER, N. K.; KNATTERUD, G. L.; CANNER, P. L. Early risks of hormone therapy in patients with coronary heart disease. **JAMA**, v. 284, n. 1, p. 41-3, 2000.
- 38 GRODSTEIN, F.; MANSON, J. E.; STAMPFER, M. J. Hormone therapy and coronary heart disease: the role of time since menopause and age at hormone initiation. **J Womens Health (Larchmt)**, v. 15, n. 1, p. 35-44, 2006 2006. ISSN 1540-9996.
- 39 CLARKSON, T. B.; APPT, S. E. Controversies about HRT--lessons from monkey models. **Maturitas**, v. 51, n. 1, p. 64-74, 2005.
- 40 HODIS, H. N.; MACK, W. J. Estrogen therapy and coronary-artery calcification. **N Engl J Med**, v. 357, n. 12, p. 1252-3; author reply 1254, 2007.
- 41 DUBEY, R. K. et al. Vascular consequences of menopause and hormone therapy: importance of timing of treatment and type of estrogen. **Cardiovasc Res**, v. 66, n. 2, p. 295-306, 2005.
- 42 MANSON, J. E. The 'timing hypothesis' for estrogen therapy in menopausal symptom management. **Womens Health (Lond Engl)**, v. 11, n. 4, p. 437-40, 2015.
- 43 HARMAN, S. M. Estrogen replacement in menopausal women: recent and current prospective studies, the WHI and the KEEPS. **Gend Med**, v. 3, n. 4, p. 254-69, 2006.
- 44 HARMAN, S. M. et al. KEEPS: The Kronos Early Estrogen Prevention Study. **Climacteric**, v. 8, n. 1, p. 3-12, 2005.
- 45 PINES, A. KEEPS results: a true frustration? **Climacteric**, v. 18, n. 2, p. 110-1, 2015.
- 46 HODIS, H. N. et al. Vascular Effects of Early versus Late Postmenopausal Treatment with Estradiol. **N Engl J Med**, v. 374, n. 13, p. 1221-31, 2016.
- 47 GARCIA, M. et al. Cardiovascular Disease in Women: Clinical Perspectives. **Circ Res**, v. 118, n. 8, p. 1273-93, 2016.
- 48 LEVIN, E. R. Plasma membrane estrogen receptors. **Trends Endocrinol Metab**, v. 20, n. 10, p. 477-82, 2009.
- 49 KUIPER, G. G. et al. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 12, p. 5925-30, 1996.
- 50 ARNAL, J. F. et al. Membrane and Nuclear Estrogen Receptor Alpha Actions: From Tissue Specificity to Medical Implications. **Physiol Rev**, v. 97, n. 3, p. 1045-1087, 2017.

- 51 WALTER, P. et al. Cloning of the human estrogen receptor cDNA. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 82, n. 23, p. 7889-93, 1985.
- 52 REVANKAR, C. M. et al. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. **Science**, v. 307, n. 5715, p. 1625-30, 2005.
- 53 ARNAL, J. F. et al. Estrogen receptors and endothelium. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 30, n. 8, p. 1506-12, 2010.
- 54 GIGUÈRE, V.; TREMBLAY, A.; TREMBLAY, G. B. Estrogen receptor beta: re-evaluation of estrogen and antiestrogen signaling. **Steroids**, v. 63, n. 5-6, p. 335-9, 1998.
- 55 KUMAR, R. et al. The dynamic structure of the estrogen receptor. **J Amino Acids**, v. 2011, p. 812540, 2011.
- 56 ORIMO, A. et al. Vascular smooth muscle cells as target for estrogen. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 195, n. 2, p. 730-6, 1993.
- 57 COLBURN, P.; BUONASSISI, V. Estrogen-binding sites in endothelial cell cultures. **Science**, v. 201, n. 4358, p. 817-9, 1978.
- 58 CHEN, Y. F.; MENG, Q. C. Sexual dimorphism of blood pressure in spontaneously hypertensive rats is androgen dependent. **Life Sci**, v. 48, n. 1, p. 85-96, 1991.
- 59 DANTAS, A. P. et al. In vivo evidence for antioxidant potential of estrogen in microvessels of female spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 39, n. 2 Pt 2, p. 405-11, 2002.
- 60 AKISHITA, M. et al. Estrogen attenuates endothelin-1 production by bovine endothelial cells via estrogen receptor. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 251, n. 1, p. 17-21, 1998.
- 61 TOSTES, R. C. et al. Gender differences in vascular reactivity to endothelin-1 in deoxycorticosterone-salt hypertensive rats. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 36, n. 5 Suppl 1, p. S99-101, 2000.
- 62 ROWLAND, N. E.; FREGLY, M. J. Role of gonadal hormones in hypertension in the Dahl salt-sensitive rat. **Clin Exp Hypertens A**, v. 14, n. 3, p. 367-75, 1992.
- 63 ASHTON, N.; BALMENT, R. J. Sexual dimorphism in renal function and hormonal status of New Zealand genetically hypertensive rats. **Acta Endocrinol (Copenh)**, v. 124, n. 1, p. 91-7, 1991.
- 64 FARHAT, M. Y.; ABI-YOUNES, S.; RAMWELL, P. W. Non-genomic effects of estrogen and the vessel wall. **Biochem Pharmacol**, v. 51, n. 5, p. 571-6, 1996.

- 65 MIKKOLA, T. et al. 17 beta-estradiol stimulates prostacyclin, but not endothelin-1, production in human vascular endothelial cells. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 80, n. 6, p. 1832-6, 1995.
- 66 RESLAN, O. M.; KHALIL, R. A. Vascular effects of estrogenic menopausal hormone therapy. **Rev Recent Clin Trials**, v. 7, n. 1, p. 47-70, 2012.
- 67 SMILEY, D. A.; KHALIL, R. A. Estrogenic compounds, estrogen receptors and vascular cell signaling in the aging blood vessels. **Curr Med Chem**, v. 16, n. 15, p. 1863-87, 2009.
- 68 RUBANYI, G. M. et al. Vascular estrogen receptors and endothelium-derived nitric oxide production in the mouse aorta. Gender difference and effect of estrogen receptor gene disruption. **J Clin Invest**, v. 99, n. 10, p. 2429-37, 1997.
- 69 MACRITCHIE, A. N. et al. Estrogen upregulates endothelial nitric oxide synthase gene expression in fetal pulmonary artery endothelium. **Circ Res**, v. 81, n. 3, p. 355-62, 1997.
- 70 JUN, S. S. et al. Estrogen upregulates cyclooxygenase-1 gene expression in ovine fetal pulmonary artery endothelium. **J Clin Invest**, v. 102, n. 1, p. 176-83, 1998.
- 71 STEWART, K. G.; ZHANG, Y.; DAVIDGE, S. T. Estrogen decreases prostaglandin H synthase products from endothelial cells. **J Soc Gynecol Investig**, v. 6, n. 6, p. 322-7, 1999.
- 72 DUBEY, R. K. et al. Phytoestrogens inhibit growth and MAP kinase activity in human aortic smooth muscle cells. **Hypertension**, v. 33, n. 1 Pt 2, p. 177-82, 1999.
- 73 SUMI, D.; IGNARRO, L. J. Estrogen-related receptor alpha 1 up-regulates endothelial nitric oxide synthase expression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 24, p. 14451-6, 2003.
- 74 WASSMANN, S. et al. Endothelial dysfunction and oxidative stress during estrogen deficiency in spontaneously hypertensive rats. **Circulation**, v. 103, n. 3, p. 435-41, 2001.
- 75 RUBIO-GAYOSSO, I. et al. 17Beta-estradiol increases intracellular calcium concentration through a short-term and nongenomic mechanism in rat vascular endothelium in culture. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 36, n. 2, p. 196-202, 2000.
- 76 HISAMOTO, K. et al. Estrogen induces the Akt-dependent activation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells. **J Biol Chem**, v. 276, n. 5, p. 3459-67, 2001.

- 77 MONSALVE, E. et al. Estradiol counteracts oxidized LDL-induced asymmetric dimethylarginine production by cultured human endothelial cells. **Cardiovasc Res**, v. 73, n. 1, p. 66-72, 2007.
- 78 HERMENEGILDO, C.; OVIEDO, P. J.; CANO, A. Cyclooxygenases regulation by estradiol on endothelium. **Curr Pharm Des**, v. 12, n. 2, p. 205-15, 2006.
- 79 SMITH, W. L.; GARAVITO, R. M.; DEWITT, D. L. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. **J Biol Chem**, v. 271, n. 52, p. 33157-60, 1996.
- 80 BISHOP-BAILEY, D.; MITCHELL, J. A.; WARNER, T. D. COX-2 in cardiovascular disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 26, n. 5, p. 956-8, 2006.
- 81 SMYTH, E. M. et al. Prostanoids in health and disease. **J Lipid Res**, v. 50 Suppl, p. S423-8, 2009.
- 82 BAKER, C. S. et al. Cyclooxygenase-2 is widely expressed in atherosclerotic lesions affecting native and transplanted human coronary arteries and colocalizes with inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine particularly in macrophages. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 19, n. 3, p. 646-55, 1999.
- 83 ERUSALIMSKY, J. D.; SKENE, C. Mechanisms of endothelial senescence. **Exp Physiol**, v. 94, n. 3, p. 299-304, 2009.
- 84 ERUSALIMSKY, J. D. Vascular endothelial senescence: from mechanisms to pathophysiology. **J Appl Physiol (1985)**, v. 106, n. 1, p. 326-32, 2009.
- 85 HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. **Exp Cell Res**, v. 25, p. 585-621, 1961.
- 86 CAMPISI, J. Replicative senescence: an old lives' tale? **Cell**, v. 84, n. 4, p. 497-500, 1996.
- 87 GOLDSTEIN, S. Replicative senescence: the human fibroblast comes of age. **Science**, v. 249, n. 4973, p. 1129-33, 1990.
- 88 BLACKWELL, K. A. et al. Mechanisms of aging-induced impairment of endothelium-dependent relaxation: role of tetrahydrobiopterin. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 287, n. 6, p. H2448-53, Dec 2004.
- 89 CSISZAR, A. et al. Aging-induced phenotypic changes and oxidative stress impair coronary arteriolar function. **Circ Res**, v. 90, n. 11, p. 1159-66, 2002.
- 90 VAN DER LOO, B. et al. Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging. **J Exp Med**, v. 192, n. 12, p. 1731-44, 2000.



- 91 SELLERS, R. S.; RADJ, Z. A.; KHAN, N. K. Pathophysiology of cyclooxygenases in cardiovascular homeostasis. **Vet Pathol**, v. 47, n. 4, p. 601-13, 2010.
- 92 NICHOLSON, W. T. et al. Aging is associated with reduced prostacyclin-mediated dilation in the human forearm. **Hypertension**, v. 53, n. 6, p. 973-8, Jun 2009.
- 93 BARNES, J. N. et al. Cyclooxygenase inhibition augments central blood pressure and aortic wave reflection in aging humans. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 302, n. 12, p. H2629-34, 2012.
- 94 LEBLANC, A. J. et al. Estrogen replacement restores flow-induced vasodilation in coronary arterioles of aged and ovariectomized rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 297, n. 6, p. R1713-23, 2009.
- 95 SHERWOOD, A. et al. Age moderates the short-term effects of transdermal 17beta-estradiol on endothelium-dependent vascular function in postmenopausal women. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 27, n. 8, p. 1782-7, 2007.
- 96 VIRDIS, A.; TADDEI, S. Endothelial aging and gender. **Maturitas**, v. 71, n. 4, p. 326-30, 2012.
- 97 LLORÉNS, S. et al. The senescence-accelerated mouse (SAM-P8) as a model for the study of vascular functional alterations during aging. **Biogerontology**, v. 8, n. 6, p. 663-72, 2007.
- 98 NOVELLA, S. et al. Gathering of aging and estrogen withdrawal in vascular dysfunction of senescent accelerated mice. **Exp Gerontol**, v. 45, n. 11, p. 868-74, 2010.
- 99 TAKEDA, T. et al. A new murine model of accelerated senescence. **Mech Ageing Dev**, v. 17, n. 2, p. 183-94, 1981.
- 100 MIYAMOTO, M. Characteristics of age-related behavioral changes in senescence-accelerated mouse SAMP8 and SAMP10. **Exp Gerontol**, v. 32, n. 1-2, p. 139-48, 1997 1997.
- 101 NOVELLA, S. et al. Aging enhances contraction to thromboxane A2 in aorta from female senescence-accelerated mice. **Age (Dordr)**, v. 35, n. 1, p. 117-28, 2013.
- 102 WYNNE, F. L. et al. Age-related reduction in estrogen receptor-mediated mechanisms of vascular relaxation in female spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 43, n. 2, p. 405-12, 2004.
- 103 LINDESAY, G. et al. Age and hypertension strongly induce aortic stiffening in rats at basal and matched blood pressure levels. **Physiol Rep**, v. 4, n. 10, 2016.

- 104 OKUMA, Y.; NOMURA, Y. Senescence-accelerated mouse (SAM) as an animal model of senile dementia: pharmacological, neurochemical and molecular biological approach. **Jpn J Pharmacol**, v. 78, n. 4, p. 399-404, 1998.
- 105 BLACK, D. L. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. **Annu Rev Biochem**, v. 72, p. 291-336, 2003.
- 106 DLAMINI, Z.; TSHIDINO, S. C.; HULL, R. Abnormalities in Alternative Splicing of Apoptotic Genes and Cardiovascular Diseases. **Int J Mol Sci**, v. 16, n. 11, p. 27171-90, 2015.
- 107 JIN, Y.; YANG, Y.; ZHANG, P. New insights into RNA secondary structure in the alternative splicing of pre-mRNAs. **RNA Biol**, v. 8, n. 3, p. 450-7, 2011.
- 108 CHEN, M.; MANLEY, J. L. Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 10, n. 11, p. 741-54, 2009.
- 109 LI, Q.; LEE, J. A.; BLACK, D. L. Neuronal regulation of alternative pre-mRNA splicing. **Nat Rev Neurosci**, v. 8, n. 11, p. 819-31, 2007.
- 110 WANG, E. T. et al. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. **Nature**, v. 456, n. 7221, p. 470-6, 2008.
- 111 HIRATA, S. et al. Novel isoforms of the mRNA for human female sex steroid hormone receptors. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 83, n. 1-5, p. 25-30, 2002.
- 112 WANG, Z. et al. Identification, cloning, and expression of human estrogen receptor-alpha36, a novel variant of human estrogen receptor-alpha66. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 336, n. 4, p. 1023-7, 2005.
- 113 SOŁTYSIK, K.; CZEKAJ, P. ER $\alpha$ 36--Another piece of the estrogen puzzle. **Eur J Cell Biol**, v. 94, n. 12, p. 611-25, 2015.
- 114 SUN, Q. et al. ER- $\alpha$ 36 mediates estrogen-stimulated MAPK/ERK activation and regulates migration, invasion, proliferation in cervical cancer cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 487, n. 3, p. 625-632, 2017.
- 115 NOVENSÀ, L. et al. Aging negatively affects estrogens-mediated effects on nitric oxide bioavailability by shifting ER $\alpha$ /ER $\beta$  balance in female mice. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e25335, 2011.
- 116 MULVANY, M. J.; HALPERN, W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. **Circ Res**, v. 41, n. 1, p. 19-26, 1977.

- 117 LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, 2001.
- 118 NOVENSA, L. et al. Equine estrogens impair nitric oxide production and endothelial nitric oxide synthase transcription in human endothelial cells compared with the natural 17{beta}-estradiol. **Hypertension**, v. 56, n. 3, p. 405-11, 2010.
- 119 YUAN, M. et al. Age-related changes in the oestrous cycle and reproductive hormones in senescence-accelerated mouse. **Reprod Fertil Dev**, v. 17, n. 5, p. 507-12, 2005.
- 120 KHAJURIA, D. K.; RAZDAN, R.; MAHAPATRA, D. R. Description of a new method of ovariectomy in female rats. **Rev Bras Reumatol**, v. 52, n. 3, p. 462-70, 2012.
- 121 LASOTA, A.; DANOWSKA-KLONOWSKA, D. Experimental osteoporosis--different methods of ovariectomy in female white rats. **Rocz Akad Med Bialymst**, v. 49 Suppl 1, p. 129-31, 2004.
- 122 WAYNFORTH, H. **Experimental and surgical technique in the rat**. London: Academic Press: 161 p. 1980.
- 123 ARAUJO, P. X. et al. Treatment with Standard and Low Dose of Conjugated Equine Estrogen Differentially Modulates Estrogen Receptor Expression and Response to Angiotensin II in Mesenteric Venular Bed of Surgically Postmenopausal Hypertensive Rats. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 362, n. 1, p. 98-107, 2017.
- 124 UTIAN, W. **Overview on menopause**. Am J Obstet Gynecol. 156: 1280 p. 1987.
- 125 The 2017 hormone therapy position statement of The North American Menopause Society. **Menopause**, 2017.
- 126 ROSSOUW, J. E. et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. **JAMA**, v. 288, n. 3, p. 321-33, 2002.
- 127 MACLENNAN, A. H. et al. Oral oestrogen and combined oestrogen/progestogen therapy versus placebo for hot flushes. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 4, p. CD002978, Oct 2004.
- 128 NOTELOVITZ, M. et al. Initial 17beta-estradiol dose for treating vasomotor symptoms. **Obstet Gynecol**, v. 95, n. 5, p. 726-31, 2000.
- 129 UTIAN, W. H. et al. Estrogen and progestogen use in postmenopausal women: July 2008 position statement of The North American Menopause Society. **Menopause**, v. 15, n. 4 Pt 1, p. 584-602, 2008.

- 130 SOCIETY, N. A. M. Estrogen and progestogen use in postmenopausal women: 2010 position statement of The North American Menopause Society. **Menopause**, v. 17, n. 2, p. 242-55, 2010.
- 131 PACHMAN, D. R.; JONES, J. M.; LOPRINZI, C. L. Management of menopause-associated vasomotor symptoms: Current treatment options, challenges and future directions. **Int J Womens Health**, v. 2, p. 123-35, 2010.
- 132 STEINKELLNER, A. R. et al. A decade of postmenopausal hormone therapy prescribing in the United States: long-term effects of the Women's Health Initiative. **Menopause**, v. 19, n. 6, p. 616-21, 2012.
- 133 FOURNIER, A. et al. Postmenopausal hormone therapy initiation before and after the Women's Health Initiative in two French cohorts. **Menopause**, v. 18, n. 2, p. 219-23, 2011.
- 134 STOBROCK, K. et al. Gender differences in patients with carotid stenosis. **Vasa**, v. 45, n. 1, p. 11-6, 2016.
- 135 MOZAFFARIAN, D. **Heart disease and stroke statistics--2015 update: a report from the American Heart Association**. 131: e29-132 p. 2015.
- 136 MIKKOLA, T. S.; CLARKSON, T. B. Estrogen replacement therapy, atherosclerosis, and vascular function. **Cardiovasc Res**, v. 53, n. 3, p. 605-19, 2002.
- 137 KHALIL, R. A. Estrogen, vascular estrogen receptor and hormone therapy in postmenopausal vascular disease. **Biochem Pharmacol**, v. 86, n. 12, p. 1627-42, 2013.
- 138 ORSHAL, J. M.; KHALIL, R. A. Gender, sex hormones, and vascular tone. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 286, n. 2, p. R233-49, 2004.
- 139 KOLEDOVA, V. V.; KHALIL, R. A. Sex hormone replacement therapy and modulation of vascular function in cardiovascular disease. **Expert Rev Cardiovasc Ther**, v. 5, n. 4, p. 777-89, 2007.
- 140 VIRDIS, A. et al. Mechanisms responsible for endothelial dysfunction associated with acute estrogen deprivation in normotensive women. **Circulation**, v. 101, n. 19, p. 2258-63, 2000.
- 141 TADDEI, S. et al. Menopause is associated with endothelial dysfunction in women. **Hypertension**, v. 28, n. 4, p. 576-82, 1996.
- 142 MOREAU, K. L. et al. Endothelial function is impaired across the stages of the menopause transition in healthy women. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 97, n. 12, p. 4692-700, 2012.

- 143 VAN BUREN, G. A.; YANG, D. S.; CLARK, K. E. Estrogen-induced uterine vasodilatation is antagonized by L-nitroarginine methyl ester, an inhibitor of nitric oxide synthesis. **Am J Obstet Gynecol**, v. 167, n. 3, p. 828-33, 1992.
- 144 HUANG, A. et al. Estrogen maintains nitric oxide synthesis in arterioles of female hypertensive rats. **Hypertension**, v. 29, n. 6, p. 1351-6, 1997.
- 145 HAYASHI, T. et al. Estrogen increases endothelial nitric oxide by a receptor-mediated system. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 214, n. 3, p. 847-55, 1995.
- 146 WEINER, C. P. et al. Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 11, p. 5212-6, 1994. <sup>147</sup>  
WELLMAN, G. C. et al. Gender differences in coronary artery diameter involve estrogen, nitric oxide, and Ca(2+)-dependent K<sup>+</sup> channels. **Circ Res**, v. 79, n. 5, p. 1024-30, 1996.
- 148 KAUSER, K.; RUBANYI, G. M. Gender difference in bioassayable endothelium-derived nitric oxide from isolated rat aortae. **Am J Physiol**, v. 267, n. 6 Pt 2, p. H2311-7, 1994.
- 149 WILLIAMS, J. K. et al. Effects of hormone replacement therapy on reactivity of atherosclerotic coronary arteries in cynomolgus monkeys. **J Am Coll Cardiol**, v. 24, n. 7, p. 1757-61, 1994.
- 150 YANG, S.; BAE, L.; ZHANG, L. Estrogen increases eNOS and NO<sub>x</sub> release in human coronary artery endothelium. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 36, n. 2, p. 242-7, 2000.
- 151 CHEN, Z. et al. Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. **J Clin Invest**, v. 103, n. 3, p. 401-6, 1999.
- 152 RUSSELL, K. S. et al. Human vascular endothelial cells contain membrane binding sites for estradiol, which mediate rapid intracellular signaling. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 11, p. 5930-5, 2000.
- 153 HAYNES, M. P. et al. Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells. **Circ Res**, v. 87, n. 8, p. 677-82, 2000.
- 154 INCALZA, M. A. et al. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. **Vascul Pharmacol**, 2017.
- 155 GRIENGLING, K. K.; FITZGERALD, G. A. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. **Circulation**, v. 108, n. 16, p. 1912-6, 2003.

- 156 FUKAI, T.; USHIO-FUKAI, M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. **Antioxid Redox Signal**, v. 15, n. 6, p. 1583-606, 2011.
- 157 SOBRINO, A. et al. Estradiol stimulates vasodilatory and metabolic pathways in cultured human endothelial cells. **PLoS One**, v. 4, n. 12, p. e8242, 2009.
- 158 RAZ, L. et al. Differential effects of oral and transdermal menopausal hormone therapy on prostacyclin and thromboxane in platelets. **Physiol Rep**, v. 2, n. 3, p. e00275, 2014.
- 159 CASE, J.; DAVISON, C. A. Estrogen alters relative contributions of nitric oxide and cyclooxygenase products to endothelium-dependent vasodilation. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 291, n. 2, p. 524-30, 1999.
- 160 CALKIN, A. C. et al. Rapid potentiation of endothelium-dependent vasodilation by estradiol in postmenopausal women is mediated via cyclooxygenase 2. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 87, n. 11, p. 5072-5, 2002.
- 161 HOWES, L. G. Selective COX-2 inhibitors, NSAIDs and cardiovascular events - is celecoxib the safest choice? **Ther Clin Risk Manag**, v. 3, n. 5, p. 831-45, 2007.
- 162 DEER, R. R.; STALLONE, J. N. Effects of age and sex on cerebrovascular function in the rat middle cerebral artery. **Biol Sex Differ**, v. 5, p. 12, 2014.
- 163 DARBLADE, B. et al. Estradiol alters nitric oxide production in the mouse aorta through the alpha-, but not beta-, estrogen receptor. **Circ Res**, v. 90, n. 4, p. 413-9, 2002.
- 164 ARNAL, J. F. et al. Estrogens in vascular biology and disease: where do we stand today? **Curr Opin Lipidol**, v. 18, n. 5, p. 554-60, 2007.
- 165 EGAN, K. M. et al. COX-2-derived prostacyclin confers atheroprotection on female mice. **Science**, v. 306, n. 5703, p. 1954-7, 2004.
- 166 PARE, G. et al. Estrogen receptor-alpha mediates the protective effects of estrogen against vascular injury. **Circ Res**, v. 90, n. 10, p. 1087-92, 2002.
- 167 BILLON-GALÉS, A. et al. Endothelial estrogen receptor-alpha plays a crucial role in the atheroprotective action of 17beta-estradiol in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. **Circulation**, v. 120, n. 25, p. 2567-76, 2009.
- 168 ZOU, W. et al. Estrogen Receptor (ER)- $\alpha$ 36 Is Involved in Estrogen- and Tamoxifen-Induced Neuroprotective Effects in Ischemic Stroke Models. **PLoS One**, v. 10, n. 10, p. e0140660, 2015.
- 169 ZHANG, J. et al. Estrogen-independent effects of ER- $\alpha$ 36 in ER-negative breast cancer. **Steroids**, v. 77, n. 6, p. 666-73, 2012.

- 170 DENG, H. et al. A variant of estrogen receptor-alpha, ER-alpha36 is expressed in human gastric cancer and is highly correlated with lymph node metastasis. **Oncol Rep**, v. 24, n. 1, p. 171-6, 2010.
- 171 WANG, J. et al. Expression of ER $\alpha$ 36 in gastric cancer samples and their matched normal tissues. **Oncol Lett**, v. 3, n. 1, p. 172-175, 2012.
- 172 XIE, H. et al. Estrogen receptor  $\alpha$ 36 mediates a bone-sparing effect of 17 $\beta$ -estradiol in postmenopausal women. **J Bone Miner Res**, v. 26, n. 1, p. 156-68, 2011.
- 173 PATKAR, S. et al. Differential vasoactive effects of oestrogen, oestrogen receptor agonists and selective oestrogen receptor modulators in rat middle cerebral artery. **Neurosci Res**, v. 71, n. 1, p. 78-84, 2011.
- 174 TENG, Y. et al. Dehydroepiandrosterone Activation of G-protein-coupled Estrogen Receptor Rapidly Stimulates MicroRNA-21 Transcription in Human Hepatocellular Carcinoma Cells. **J Biol Chem**, v. 290, n. 25, p. 15799-811, 2015.
- 175 WALLACIDES, A. et al. Estrogens promote proliferation of the seminoma-like TCam-2 cell line through a GPER-dependent ER $\alpha$ 36 induction. **Mol Cell Endocrinol**, v. 350, n. 1, p. 61-71, 2012.