

Tiago Januário da Costa

**TESTOTERONA ABOLE OS EFEITOS
VASCULOPROTETORES NO TRATAMENTO COM
CONJUGADO ESTROGÊNIO EQUINO (PREMARIN®) EM
RATAS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSAS
OVARIECTOMIZADAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Helena Catelli de Carvalho

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

**São Paulo
2012**

RESUMO

Costa TJ. Testosterona abole os efeitos vasculoprotetores do tratamento com conjugado estrogênio equino (Premarin®) em ratas espontaneamente hipertensas ovariectomizadas. [Dissertação (Mestrado em Ciências)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2012.

Os efeitos vasculares do tratamento hormonal com estrogênios associados à testosterona, utilizado para tratamento do distúrbio do desejo sexual hipoativo na pós-menopausa, ainda não estão completamente elucidados. Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos do tratamento de ratas espontaneamente hipertensas (SHR) ovariectomizadas (OVX) com um conjugado estrogênio equino (CEE) associado à ciproionato de testosterona sobre a reatividade de anéis de aorta isoladas e sobre a pressão arterial. Para isso, ratas SHR com 12 semanas de idade foram divididas em quatro grupos experimentais: animais controle (sham - ratas em estro-fisiológico), OVX, OVX tratada por 15 dias com CEE (9,6 µg/Kg/dia, gavagem) e OVX tratada com CEE associado ao ciproionato de testosterona (2,85 mg/kg/semana,im). Foi demonstrado que o tratamento de ratas OVX com CEE corrige a hiperreatividade dos anéis de aorta com endotélio a agentes vasoconstritores: angiotensina II (ANGII) e Fenilefrina (FE). Além disso, o CEE também aumenta a resposta vasodilatadora endotélio-dependente à acetilcolina (ACh) nos anéis de aorta das fêmeas. Estes efeitos benéficos do CEE parecem estar relacionados com a redução da expressão de subunidades da enzima NADPH oxidase e aumento na expressão de enzimas antioxidantes o que resultou em correção da marcação para espécies reativas de oxigênio (EROs) na aorta. Por outro lado, quando a testosterona foi associada ao CEE os benefícios promovidos pelos estrogênios na aorta das ratas SHR-OVX foram abolidos. Dessa forma, os anéis de aorta com endotélio de ratas OVX tratadas com testosterona associada a CEE foram hiperreativos a ANG II e FE, ao passo que a resposta vasodilatadora induzida pela ACh foi diminuída em comparação com as ratas controle e OVX tratadas apenas com CEE. Este comprometimento do efeito protetor do CEE pela associação com testosterona parece depender da maior geração de EROs induzidas pela ativação de

receptores AT1 de ANG II, por ação do metabólito 20-HETE e ainda pela ativação da NADPH oxidase. Portanto, a associação de CEE e testosterona abole os efeitos vasculoprotetores do CEE, agravando a disfunção endotelial de fêmeas SHR-OVX.

Palavras-chave: Hipertensão. Estrógeno. Testosterona. Endotélio Vascular. Ovariectomia. Estresse oxidativo.

Abstract

Costa TJ. The vascular protective effects of conjugated equine estrogen (Premarin®) is blunted by testosterone in ovariectomized SHR. [Masters thesis (Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2012.

The vascular effects of estrogens and testosterone association, used hypoactive sexual desire disorder in postmenopausal women, have not been elucidated. The aim of this study was to evaluate the vascular effects of ovariectomized spontaneously hypertensive rats (OVX-SHR) with a conjugated equine estrogen (CEE) associated or not with testosterone cypionate on reactivity of isolated aortic rings and in blood pressure. For this purpose, 12 week-old SHR were divided into four groups: control (estrus), OVX treated and untreated. The treated OVX groups received either CEE for 15 days (9.6 µg / kg / day gavage) or CEE associated or testosterone cypionate (2.85 mg / kg / week, im). Treatment of OVX rats with CEE corrected the hyperreactivity to vasoconstrictor agents: angiotensin II (ANGII) and phenylephrine (PE). Furthermore, the CEE treatment also increased the endothelium-dependent vasodilator response to acetylcholine (ACh) from OVX rats. These beneficial effects of CEE appear to be related with increased expression of antioxidant enzymes; a reduction in NADPH oxidase subunits expression and reactive oxygen species (ROS) generation. On the other hand, the testosterone association blunted the vascular benefits provided by CEE in SHR-OVX. Thus, aortic rings with endothelium from OVX rats treated with testosterone and CEE were hyperresponsive to vasoconstrictors and exhibited impaired vasodilator responses to ACh, compared to aortas from control and CEE rats. The inhibition of CEE protective effect in aorta by testosterone seems to be related with increased ROS generation through a mechanism that involves ANG II AT1 receptors activation, increased responses to in metabolite 20-HETE and NADPH oxidase activation.

Key words: Hypertension. Estrogen. Testosterone. Vascular endothelium. Ovariectomy. Oxidative stress.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Pressão arterial, hipertensão arterial e pós-menopausa

A principal causa-morte até meados do século XX nos países em desenvolvimento estava relacionada a infecções bacterianas, disenterias ou pestes. Hoje, com o avanço da globalização numa sociedade marcada pelo sedentarismo, má alimentação, obesidade e tabagismo, as doenças cardiovasculares passaram a representar a principal causa-morte no mundo (Roger et al., 2012)

A hipertensão arterial sistêmica representa o principal fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. A hipertensão arterial é uma doença crônica-degenerativa, multifatorial e multigênica e ocorre, na maioria dos casos, devido a mudanças nos fatores de controle da pressão arterial (PA). A manutenção da PA ocorre de forma constante devido à força motriz do volume sanguíneo, garantindo irrigação tecidual, o transporte de gases, nutrientes, íons e, assim, a manutenção da vida (Krieger et al., 1996, Krieger et al., 1999). A PA é uma variável física que depende do volume, do débito cardíaco e da resistência vascular periférica. Quaisquer alterações em uma dessas variáveis, ou em todas, interfere na manutenção dos níveis pressóricos (Krieger et al., 1996, Krieger et al., 1999). A regulação de PA ocorre por fatores locais, neurais e humorais que podem ser regulados a longo ou curto prazo. O controle em curto prazo é importante para rápidas alterações (segundos a minutos), respondendo a necessidade imediata do organismo, como por exemplo, fornecimento de oxigênio (O₂) ou de nutrientes e remoção de gás carbônico (CO₂) ou metabólitos celulares. Em longo prazo a regulação da PA estabelece alterações que podem variar de dias a meses e envolve mecanismos de *feedback*, nos fluidos renais e corporais (equilíbrio entre ingestão/excreção de água e sais) e fatores físicos (rarefação, neoformação de vasos) (Irigoyen et al., 2001).

Dentre os fatores locais do controle da PA destaca-se o papel do tônus miogênico vascular, de fatores metabólicos (O₂, do CO₂, do pH, da osmolaridade) e dos fatores relaxantes, hiperpolarizantes e constritores derivados do endotélio. Entre

os fatores neurais destaca-se a ação dos mecanos e quimiorreceptores e dos fatores humorais a ação das catecolaminas (adrenalina, noradrenalina), do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRA), da vasoprenina, da ocitocina etc. (Mayers, Hughes, 2003)

A hipertensão arterial é caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (PA), com pressão sistólica acima de 140mmHg e diastólica acima de 90mmHg, seguindo os padrões de medida estipulados nas Diretrizes Brasileiras de Hipertensão (Diretrizes Brasileira de hipertensão-VI, 2010).

A elevação nos níveis pressóricos é responsável por alterações funcionais e/ou estruturais em órgãos-alvo como coração, cérebro, rins e vasos sanguíneos e alterações metabólicas, contribuindo para o aumento do risco de eventos cardiovasculares que podem ou não ser fatais (Harrap, 1994; Brow, 1996).

No início do século XXI estimou-se que 1 bilhão de adultos fossem hipertensos, sendo que para 2025 a expectativa é que 1,5 bilhão de pessoas sejam hipertensas. Esse aumento ocorre em ambos os sexo, porém, interessante, o maior número de indivíduos hipertensos, e consequentemente com doenças cardiovasculares, se dá em mulheres com idade superior a 49 anos, período esse que coincide com o início do climatério (Roger et al., 2012).

O climatério tem início entre 49 e 55 anos, é um processo lento e gradual, onde há o declínio da produção e dos níveis endógenos dos hormônios sexuais gonadais, principalmente o estrógeno, devido à cessação da função folicular ovariana, ocasionando a ausência permanente da menstruação, o que é denominado menopausa (Bhavnani et al., 2000; Soules et al., 2001; Fernandes et al., 2008). Após a última menstruação inicia-se o período da pós-menopausa e com o aumento da expectativa de vida feminina no mundo (Diczfalusy et al., 1997) e no Brasil (IBGE, 2010) cerca de um terço das mulheres entrarão na pós-menopausa e permanecerão nesta fase por pelo menos 30 anos (Bhavnani et al., 2003), portanto os estudos científicos básicos e clínicos, nesta faixa etária, são de suma importância para a sociedade.

Em modelos experimentais o envelhecimento também pode aumentar os níveis pressóricos. De fato, ratas SHR velhas apresentam pressão arterial elevada

quando comparadas a ratas jovens, como acontece na pós-menopausa em mulheres (Reckelhoff, 2004). Não se sabe ao certo a relação entre aumento de pressão arterial e queda dos níveis estrogênicos. Alguns estudos evidenciam que o estrógeno pode regular a pressão arterial, sendo que a ausência desse hormônio aumenta os níveis pressóricos (Dantas et al, 2004). O ciclo estral das ratas começa a se alterar entre o décimo e décimo segundo mês de vida, sendo que a partir décimo sexto mês as ratas são consideradas velhas, com cessação da função folicular ovariana, queda nos níveis hormonais gonadais e aumento da pressão arterial (Reckelhoff, 2004). Entretanto o procedimento cirúrgico de remoção dos ovários, ovariectomia, é um método classicamente adotado e aceito como modelo para estudo dos efeitos dos baixos níveis hormonais sexuais gonadais, como é observado na pós-menopausa em humanos (Wayntorth et al, 1980).

Os estrógenos são hormônios sexuais com diversas ações fisiológicas nas mulheres e nos homens e sua ação ocorre em tecidos reprodutivos como vagina, endométrio, ovários e em tecidos não-reprodutivos como ossos, sistema nervoso central e sistema cardiovascular. Assim, a ausência desse hormônio no organismo pode levar ao surgimento de sintomas nesses tecidos-alvos (Levin, 2002). As ações clássicas dos estrogênios ocorrem por meio de receptores nucleares denominados alfa ($ER\alpha$) (Kuiper et al., 1985) e beta ($ER\beta$) (Walter et al., 1985) e pelo receptor de membrana acoplado a proteína G denominado GPR30 (*G-protein coupled receptor 30*) (Revankar et al., 2005).

Os receptores nucleares, $ER\alpha$ e $ER\beta$, possuem 44% de homologia e são expressos em diversos órgãos e tecidos, permitindo, assim, diferentes funções fisiológicas de acordo com o tecido-alvo (Kuiper et al., 1997). O $ER\alpha$ é expresso abundantemente no útero, vagina, ovários, e, em menor proporção, no cérebro, hipotálamo e glândulas mamárias (Kuiper et al., 1997). Por sua vez, o $ER\beta$ está expresso em ovários, rins, ossos, pulmão e cérebro (Kuiper et al., 1997). No sistema vascular já foi descrito a expressão desses dois receptores no músculo liso (Orimo et al., 1993) e no endotélio (Colburn et al., 1978), o que é de suma importância para o entendimento das ações estrogênicas sobre os vasos sanguíneos.

Para que atuem em seus receptores intracelulares, os estrógenos penetram nas células por difusão passiva. No citoplasma celular, ligam-se aos receptores, desencadeando ações denominadas genômicas (transcricionais) ou não-genômicas (não-transcricionais). Tanto as ações genômicas quanto as não-genômicas podem estar envolvidas nos efeitos desses hormônios sobre o endotélio e músculo liso vascular (Paech et al., 1997).

Nos vasos, os efeitos não-genômicos ocorrem de maneira rápida em resposta a ligação dos estrógenos aos receptores, independentemente de transcrição gênica e síntese proteica (Farhat et al., 1996), promovendo vasodilatação que envolve a ativação de quinases, fosfatases e de canais iônicos presentes na membrana (Simoncini et al., 2004; Hammes et al., 2007). Especificamente, o 17 β -estradiol, por seus efeitos não-genômicos, vem sendo apontado como um fator importante no controle do tônus vascular por ação no endotélio e no músculo liso vascular (Khalil et al., 2009). Nas células endoteliais, contribui para produção de óxido nítrico (NO), ativando a enzima NO sintase endotelial (eNOS). O NO é um poderoso vasodilatador produzido a partir da transformação da L-arginina em L-citrulina pela NO sintase (NOS). Outro importante mediador das ações estrogênicas é o fator hiperpolarizante derivado do endotélio que atua nos canais iônicos, principalmente ativando os canais de potássio, promovendo hiperpolarização celular (Simoncini et al., 2000; Hisamoto et al., 2001).

Nas células do músculo liso vascular, o estrógeno atua antagonizando os canais de cálcio sensíveis a voltagem, reduzindo a entrada do cálcio para o meio intracelular e a formação do complexo cálcio-calmodulina que ativa a cadeia leve de miosina e leva a contração das células (Prossnitz et al., 2009; Meyer et al., 2009), concomitantemente, com a diminuição da ação de enzimas mediadoras da contração via cálcio, como a PKC e Rho-Kinase (Crews et al., 1999). Além disso, foi demonstrado que ações não-genômicas podem ocorrer via o receptor GPR30, uma vez que a ativação deste por seus agonistas promove vasodilatação em artérias coronárias de porcas (Meyer et al., 2010), por mecanismos ainda não esclarecidos.

O estrógeno atua também em seus receptores intracelulares regulando processos transcricionais que envolvem a translocação nuclear do complexo

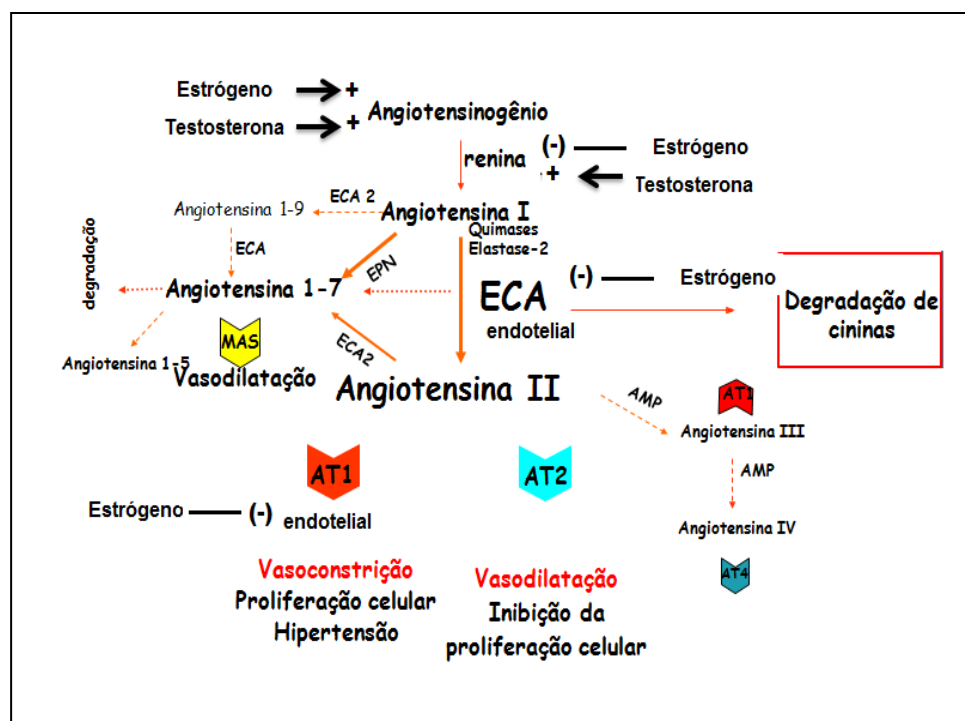
estrógeno-receptor e ligação ao elemento responsivo ao estrógeno (ERE) e a regulação da expressão do gene alvo (Khalil et al., 2009). Nos vasos, a ação estrogênica afeta a expressão de genes envolvidos na síntese de proteínas que alteram o tônus vascular, que participam da resposta a injúria vascular e aterosclerose. Dentre estes genes, o da eNOS (Macritchie et al., 1997; Rubanyi, 1997), da ciclooxigenase-1 (COX1) (Jun et al., 1998), da prostaciclina sintase (Stewart et al., 1999; Khalil et al., 2009) têm sua expressão modulada positivamente, enquanto os genes da endotelina (Akishita et al., 1998) e das MAPKs (*mitogen-activated protein kinase*) (Dubey et al., 1999) são regulados negativamente.

O SRA é um importante complexo hormonal que atua na regulação da pressão arterial, sais, fluidos corporais e sua ação pode ser regulada por hormônios esteróides (Brosnihan et al., 1999). A formação dos peptídeos do SRA ocorre quando o angiotensinogênio hepático sofre ação da protease renina, formada na células justaglomerulares renais, originando o decapeptídeo angiotensina I que é clivado pela enzima conversora de angiotensina (ECA), formando o octapeptídeo angiotensina II (ANGII), o principal peptídeo vasoconstritor deste sistema. Alguns órgãos podem sintetizar componentes do SRA, por isso, esse sistema pode ser dividido em local ou circulante. Além da cascata clássica de formação de peptídeos, pode-se destacar a produção de outras angiotensinas importantes e com ações específicas, entre elas as angiotensinas III, IV, 1-7 (Rigatto et al., 2004).

A ANGII interage com pelo menos dois receptores acoplados a proteína G, denominados AT1 (AT1R) e AT2 (AT2R). Na interação entre ANGII e AT1R as ações fisiológicas observadas são vasoconstrição, estimulação da secreção de aldosterona, retenção de sal e água, crescimento celular e produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Schiffrin et al., 2002). Os efeitos observados na interação entre ANGII e AT2R são vasodilatação, inibição do crescimento celular, diferenciação celular e apoptose (Ferrario et al., 2006). O AT1R é expresso na maioria das células, incluindo vasos sanguíneos e coração e sua ativação está mais relacionada a alterações cardiovasculares, ao passo que o AT2R é pouco expresso em tecidos adultos, tendo sua maior expressão em tecidos embrionários (Schiffrin et al., 2002).

Os hormônios esteróides promovem efeitos diretos sobre o SRA (Figura 1). O estrógeno é capaz de aumentar os níveis circulantes de angiotensinogênio, porém promove um efeito inibitório sobre a produção de renina e a expressão de ECA e do AT1R endoteliais (Brosnihan et al., 1999; Fisher et al., 2002; Xue et al., 2007; Yanes et al., 2010). Essas alterações, no SRA, são observadas principalmente na fase folicular do ciclo menstrual, fase essa associada a altos níveis séricos de estrógeno (Brosnihan et al., 1999). Além disso, mulheres que utilizam a Terapia Hormonal (TH) com estrógeno apresentam essas mesmas alterações no SRA (Alhenc-gelas et al., 1986), o que também pode estar relacionado com os altos níveis estrogênicos.

Figura 1 – Esquema representativo da cascata de reações do sistema renina-angiotensina e as ações hormonais (estrógeno e testosterona) sobre a produção de angiotensinogênio e renina e na expressão da ECA e AT1R endoteliais.



Fonte: Costa, 2012.

Outra importante função atribuída ao SRA refere-se ao seu papel modulador na biodisponibilidade de NO, por meio da produção de EROs, como o ânion superóxido, peróxido nitrito e de hidrogênio, podendo dessa forma participar do desenvolvimento de disfunção endotelial (Touyz et al., 2003). A disfunção endotelial

caracteriza-se por desequilíbrio na liberação/produção de agentes vasoconstritores e vasodilatadores derivados do endotélio. Dentre os fatores contráteis derivados do endotélio, o ânion superóxido desempenha importante papel na disfunção endotelial por promover oxidação do vasodilatador NO a peroxinitrito, o que leva a diminuição de sua biodisponibilidade. Este desequilíbrio, entre fatores relaxantes e contráteis, pode promover alterações de tônus vascular, favorecer a agregação plaquetária, a proliferação celular, a adesão e migração leucocitária e a fibrinólise. Destaca-se que o NO é um importante agente vasodilatador, antiproliferativo, antiaterogênico e antiinflamatório. Portanto, sua menor biodisponibilidade contribui fortemente para disfunção endotelial (Wajchenberg, 2002)

A produção de EROs na vasculatura pode ter como origem diversas fontes, dentre elas a da ciclooxigenase e da lipoxigenase, do citocromo P450, o desacoplamento da NOS e ativação da NADPH oxidase (*nicotine adenine dinucleotide phosphate*, na forma reduzida) (Cai et al., 2003). Na interação ANGII e AT1R em vasos sanguíneos, tanto no músculo liso como no endotélio, a produção enzimática de EROs se dá principalmente pela ativação da NADPH oxidase (Lasségue et al., 2003).

As NADPH oxidases, ou Noxes, são importantes enzimas reguladoras das sinalizações redox e as principais geradoras de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) do tecido vascular (Park et al., 1997). O protótipo das Noxes, é a enzima presente em células fagocíticas estando intimamente relacionada com a resposta imune inata, por gerar grandes quantidades de ânion superóxido. A atividade da NADPH oxidase requer o recrutamento de subunidades citosólicas ($p40^{phox}$, $p47^{phox}$ e $p67^{phox}$) e sua associação com subunidades de membrana ($gp91^{phox}$ e $p22^{phox}$). Alterações na expressão dessas subunidades leva a maior ou menor atividade da enzima e conseqüentemente na produção de EROs (Price et al., 2002). Foram descritas sete subunidades homólogas a $gp91^{phox}$ denominadas Nox, sendo que quatro delas foram descritas na vasculatura (Nox1, Nox2, Nox4 e Nox5) (Lasségue et al., 2010).

Para controlar a ação oxidante, as células desenvolveram mecanismos antioxidantes. Pela ação da superóxido dismutase (SOD) o $O_2^{\cdot-}$ é transformado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 , por sua vez, sofre ação da enzima catalase

(CAT), sendo convertido em água (H₂O) (Vasconcelos et al., 2007). Esse sistema antioxidante é de suma importância para evitar os danos oxidativos as células, incluindo células do músculo liso e endotélio vascular.

O papel antioxidante do estrógeno está associado na diminuição da atividade da NADPH oxidase, reduzindo a expressão das subunidades, e/ou no aumento da expressão/atividade das enzimas antioxidantes, contribuindo também dessa forma para controle do tônus vascular (Brosnihan et al., 1999; Fisher et al., 2002; Dantas et al., 2004; Xue et al., 2007; Yanes et al., 2010) e, assim, firmando cada vez mais a relação entre estrógeno e proteção cardiovascular.

1.2 Terapia Hormonal - TH

O uso de TH com conjugado estrogênio equino (CEE) para tratamento de sintomas da pós-menopausa vem sendo realizado desde 1942, época em que *Food and Drug Administration* (FDA) liberou a utilização do primeiro CEE (Premarin®), como TH, com o indicativo para a redução das ondas de calor (ou fogachos), umas das principais reclamações das mulheres no climatério e pós-menopausa (Fernandes et al., 2004). Essa nova terapia farmacológica foi bem aceita e de grande sucesso, pois as evidências eram claras de que amenizava os principais sintomas da pós-menopausa (Sprintzer, 1998). O Premarin® é um conjugado natural retirado da urina de éguas prenhes que contém pelo menos 10 estrógenos, sendo eles: estrona (48%); equilin (24%); 17β-dihidroequilin (15%); Δ8-estrona (4,3%); 17α-estradiol (3,8%); 17β-dihidroequilin (1,8%); equilenin (1,1%); 17β-estradiol (0,68%); 17α-dihidroequilenin (0,45%) e 17β-dihidroequilenin (0,3%) (Bhavnano et al., 2003; Berrodin et al., 2009). Os componentes estrona, Δ8-estrona e equilin são metabolizados na circulação formando, respectivamente, 17β-estradiol, Δ8-17β-estradiol e 17β-dihidroequilenin (Bhavnano et al., 2003). Os componentes do CEE tem afinidade diferente pelos receptores de estrógeno, podendo desencadear diferentes respostas (Tabela 1).

Apesar de ser um dos medicamentos mais utilizados para TH na pós-menopausa e de ser incluído em protocolos de grandes estudos clínicos e

multicentricos, as ações e os mecanismos do CEE (Premarin®) no sistema vascular ainda são um tanto controversas, mas a hipótese de que esta TH teria efeito benéfico ainda é considerada (Wingrove et al., 1999; Novensa et al., 2010).

Tabela 1 – Afinidade relativa de ligação (RAL) do CEE nos receptores de estrógeno α e β (modificado de BHAVNANI, 2002)

Estrógenos	ERα (RAL)	ERβ (RAL)	Razão ERα/ ERβ
17 β -estradiol	100	100	1.00
17 β -dihidroequilin	113	108	1.05
17 β -dihidroequilenin	68	90	0.75
Δ 8-17 β -estradiol	68	72	0.94
17 α -dihidroequilin	42	32	1.30
Estrona	26	52	0.50
17 α -dihidroequilenin	20	49	0.40
Δ 8-estrona	19	32	0.60
17 α -estradiol	19	42	0.45
Equilenin	15	29	0.50
Equilin	13	49	0.26

* afinidade relativa de ligação calculada a partir do $\frac{IC_{50} \text{ do estrógeno}}{IC_{50} \text{ do competidor}} \times 100$

De fato, estudos epidemiológicos mostraram que a TH pode reduzir de 35-50% o risco de eventos cardiovasculares em mulheres na pós-menopausa (Limacher, 2002). Porém, é importante salientar que estudos clínicos randomizados multicêntricos, como o *Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study* (HERS) e o *Women's Health Initiative* (WHI) levantaram dúvidas sobre os efeitos protetores do estrógeno na biologia 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). Para participação neste ensaio clínico as mulheres deveriam estar na pós-menopausa, terem sido submetidas à histerectomia e apresentarem previamente doenças cardiovasculares (coronariopatia); sendo, portanto, um estudo de prevenção secundária. Neste estudo, um grupo de 2.763 mulheres, com idades entre 50 e 79 anos, foi acompanhado por um período de 4,1 anos. No primeiro ano de seguimento do estudo, as mulheres que utilizavam TH apresentaram aumento nos eventos coronarianos e tromboembólicos venosos quando comparadas a mulheres que não faziam uso de TH (Hulley et al., 1998). Entretanto, após o terceiro ano de estudo, os resultados mostraram que o risco cardiovascular poderia ser menor entre as usuárias de TH e, por isso, estendeu-se a pesquisa (Borrelli et al., 2005).

No segundo seguimento deste estudo (HERS II), não duplo-cego, um grupo de 2.321 foi acompanhado por mais 2,7 anos, completando 6,8 anos de ensaio clínico. Nesta fase, quando comparadas mulheres que faziam uso da TH com as que não faziam, nenhuma diferença foi encontrada em relação a ocorrência de infarto agudo do miocárdio, mortes por doença coronariana ou outros eventos cardiovasculares, exceto para arritmia ventricular que foi maior no grupo tratado (Grady et al., 2002).

Em 2002 foi realizado o WHI (Women's Health Initiative) estudo multicêntrico, randomizado e duplo-cego que avaliou, em 27.347 mulheres, o efeito da TH na prevenção primária da doença cardiovascular, diferentemente do HERS, que avaliou a prevenção secundária (Fernandes et al., 2004). Neste estudo houve a formação de dois grupos. O primeiro composto por mulheres na pós-menopausa natural e o segundo por mulheres na pós-menopausa induzida por histerectomia. O primeiro grupo recebeu o mesmo esquema de tratamento do HERS (associação de CEE com medroxiprogesterona) e o segundo somente o CEE (Grady et al., 2002; Borrelli et al., 2005). Foi observado nas pacientes do primeiro grupo um aumento de 29% no índice de eventos cardiovasculares, o que levou ao interrompimento do ensaio clínico. No segundo grupo, o estudo estendeu-se até 2004, resultando a análise denominada

“braço terapêutico do WHI”. Os resultados deste “braço terapêutico do WHI” mostraram que o uso isolado de CEE nessas mulheres, embora não estatisticamente significante, promoveu redução de quatro eventos por ano para cada dez mil mulheres, quando comparadas com o grupo placebo, demonstrando que a TH em mulheres com baixo risco de eventos cardiovasculares pode causar proteção neste sistema (Grady et al., 2002; Fernandes et al., 2004).

É importante destacar que os estudos realizados são considerados de excelente qualidade, no entanto, são alvos de diversas críticas, uma vez que a seleção de pacientes incluiu mulheres com idade uma década superior àquela em que normalmente a TH é recomendada (média do grupo 63,2 anos). Além disso, no HERS I as mulheres apresentavam risco prévio para as complicações cardiovasculares (Windler et al., 2007) e no WHI não foi investigado se as mulheres selecionadas apresentavam alguma predisposição para eventos cardiovasculares; foram considerados apenas sintomas clínicos (Fernandes et al., 2004).

Os dados negativos quanto à proteção cardiovascular promovida pela TH contrariaram os dados obtidos tanto em estudos observacionais, quanto àqueles desenvolvidos em animais de experimentação, uma vez que estes apontavam o efeito protetor do estrógeno no sistema cardiovascular (Fernandes et al., 2004). O que pode se destacar é que há evidências de estudos em primatas (Clarkson, 2005) coelho (Hanke et al., 1999) e camundongos (Rosenfeld et al., 2002) de que os efeitos benéficos da TH, na prevenção da aterosclerose, ocorrem somente se for iniciada antes do seu desenvolvimento (Maas et al., 2009), o que colabora, talvez, para a dificuldade de interpretação dos estudos multicêntricos.

Recentemente, com os novos seguimentos dos estudos multicêntricos e com a reconsideração dos resultados obtidos no primeiro seguimento, vem sendo sugerido que a TH quando iniciada no climatério e não na pós-menopausa, ou seja, em mulheres mais jovens, poderia promover algum tipo de proteção cardiovascular (Brezekinski, Danenberg, 2005). De fato, se considerado que, a partir dos 50 anos, as mulheres podem apresentar níveis pressóricos mais elevados e que as complicações cardiovasculares geralmente ocorrem por volta dos 65 anos de idade (Dubey et al., 2005) e que os estudos em sua maioria alocaram pacientes com mais

de 60 anos, é aceitável considerar que durante o período inicial da pós-menopausa exista uma “janela de oportunidade”, quando o tratamento hormonal pode conferir cardioproteção (Brezezinski, Danenberg, 2005) e isso deve ser considerado e avaliado em todos os estudos realizados .

1.3 Menopausa, distúrbio da atividade sexual e terapia hormonal com testosterona

Apesar de serem controversos os efeitos da TH com estrógenos sobre o sistema cardiovascular, sua ação benéfica sobre alterações psicológicas, somáticas, vasomotora, urogenital e osteoporose está bem evidenciada (Greene et al., 1998). Porém, além dos sintomas descritos, a pós-menopausa (fisiológica ou cirúrgica) também pode promover importantes alterações no comportamento sexual, como a perda da libido, sendo que a TH com estrógeno (CEE ou 17 β -estradiol) não leva a melhora neste quadro (Schimdt et al., 1994).

O atual tratamento para as alterações da libido envolve o TH com estrogênios associados à testosterona. Esse tratamento tem se mostrado altamente eficiente na pós-menopausa e em mulheres histerectomizadas, uma vez que, essas apresentaram aumento na frequência e na satisfação sexual com o uso de testosterona (Basson et al., 2009; Buster et al. 2005; Simon et al. 2005; Shifren et al., 2002). Entretanto, são escassos os estudos que avaliam as ações androgênicas no sistema cardiovascular em mulheres na pós-menopausa.

A testosterona é o principal andrógeno natural produzido nos homens e nas mulheres, sendo responsável pelas características sexuais (sexo masculino), libido, aumento da massa óssea e muscular. Nos homens, é produzida nas células de Leydig do testículo, nas adrenais (em pequena proporção), ou por conversão periférica a partir de outros andrógenos como a desidroepiandrosterona e a androstenodiona (Winters, 1999). Nas mulheres é produzida no folículo ovariano, no córtex adrenal, pelo fígado e pele (El-Alfy et al. 1999). No organismo feminino, a testosterona encontra-se, em sua maior parte, ligada a proteína transportadora de hormônios sexuais (do inglês *SHBG*) e albumina, tornando esse hormônio pouco disponível para ação tecidual na mulher (Burger et al., 2002), diferentemente do

observado no gênero masculino. No climatério e nos primeiros anos da pós-menopausa a testosterona também sofre redução na produção e nos níveis plasmáticos e, por volta dos 70 anos de idade, restauram-se a níveis pré-menopausa, por produção exclusiva do ovário (Judd et al., 1974).

A testosterona exerce suas ações pela interação com dois tipos de receptores, um denominado receptor citosólico, pertencente à família dos receptores nucleares para hormônios esteróides, e outro localizado na membrana plasmática, desencadeando efeitos genômicos e não-genômicos. É importante destacar que os receptores nucleares são mais abundantes no gênero masculino do que no feminino, contribuindo ainda mais para que esse hormônio tenha maior efeito nos homens (Lin et al., 1990).

Para ativação dos receptores citosólicos a testosterona atravessa a membrana plasmática, liga-se ao receptor, formando o complexo testosterona-receptor que migra para o núcleo e modifica a transcrição gênica, promovendo os efeitos genômicos (Jones et al., 2004). A testosterona desencadeia também efeitos não-genômicos pela ligação aos receptores de membrana, levando a ativação de segundos mensageiros, como a PKC, PKA e MAPKs, ocasionando efeitos de acordo com a necessidade/efeito do tecido-alvo (Heinlein, Chang, 2002). Os dois tipos de receptores de testosterona já foram descritos em diversos tecidos, incluindo células endoteliais e do músculo liso vascular de humanos e modelos animais (Littleton-Kearney et al., 2004; Sinha-Hikim et al., 2004).

Os efeitos vasculares da testosterona são controversos, complexos e, em geral, dependem da dose utilizada, do tempo de exposição, de prévia doença vascular e do gênero. Exemplificando, a testosterona pode exercer efeito vasodilatador (Adams et al., 1995) ou vasoconstritor (Teoh et al., 2000; Littleton-Kearney et al., 2004) em diferentes leitos vasculares. Em homens, a administração intracoronariana de testosterona causa relaxamento e aumento no fluxo sanguíneo em pacientes com doença coronariana estabelecida (Webb et al., 1999) e em ratos e coelhos também causam relaxamento de artérias coronárias por antagonizar canais de cálcio (Yue et al., 1995; Honda et al., 1999).

Em cultura de células do músculo liso vascular da microcirculação mesentérica de ratos espontaneamente hipertensos (SHR), a testosterona induz a geração de EROs e a migração dessas células, sugerindo que este hormônio possa induzir lesão vascular (Chinaglia, 2009). Além disso, a testosterona vem sendo apontada como um importante fator para o desenvolvimento e manutenção da hipertensão em SHR machos (Reckelhoff et al.; 1998). Em machos, a remoção cirúrgica dos testículos e a consequente queda da produção de testosterona reduzem a PA que é restabelecida com a reposição de testosterona (Reckelhoff et al.; 1998).

Poucos estudos descrevem as ações dos andrógenos no sistema cardiovascular de fêmeas. Foi observado por Reckelhoff et al. (1998) e por Tatchum-Talom et al. (2002) que a administração de testosterona em ratas SHR ovariectomizadas, apesar de aumentar a resposta vasodilatadora à ACh pelo aumento na produção de NO e prostaglandinas vasodilatadoras, causa aumento da PA. Dois importantes mecanismos foram descritos para explicar o aumento da PA em fêmeas SHR. O primeiro, por ação renal devido ao aumento na reabsorção de sódio pelo túbulo proximal do néfron (Ramon et al., 2002) e, segundo, pela produção do 20-HETE (*20-hydroxyeicosatetraenoic acid*) um metabólito do ácido araquidônico com ação vasoconstritora (Croft et al., 2000; Yanes et al., 2005). O ácido araquidônico é metabolizado pelo citocromo P-450 (CYP) formando diversos produtos (metabólitos), dentro eles o 20-HETE (*20-hydroxyeicosatetraenoic acid*), um potente vasoconstritor. Sua produção pode ser estimulada pela ANG II, vasopressina, endotelina em tecido renal e vascular (McGiff et al., 1999) e por hormônios sexuais, como a testosterona (Yanes et al., 2005).

Frente ao exposto, e considerando que a testosterona vem sendo empregada para o tratamento de distúrbio da hipoatividade sexual relacionada a pós-menopausa, estudos que avaliem os efeitos cardiovasculares dos andrógenos em mulheres tornam-se de grande importância.

1.4 Objetivo

Avaliar em ratas SHR-OVX os efeitos do tratamento com CEE associado à testosterona na pressão arterial e na reatividade de anéis de aorta a agentes vasodilatadores e vasoconstritores. Paralelamente, foram estudados os mecanismos envolvidos nas ações vasculares da associação CEE e testosterona, considerando o papel da geração de EROs e da ANG II.

6 CONCLUSÃO

Nossos dados permitem concluir que o tratamento de fêmeas SHR-OVX com CEE promove melhora da função endotelial por mecanismos que envolvem a redução do estresse oxidativo e aumento no mecanismo antioxidante celular. A testosterona quando associada ao CEE aumentou a geração e diminuiu a expressão da eNOS, contribuindo para a disfunção endotelial. Porém, diferente do observado nas fêmeas SHR-OVX, a geração de EROs neste grupo ocorreu independente do aumento na expressão das subunidades da NADPH oxidase, mas devido à participação do metabólito 20-HETE. Portanto, a associação de CEE e testosterona abole os efeitos vasculoprotetores do CEE, agravando a disfunção endotelial de fêmeas SHR-OVX.

7 PERSPECTIVA

A associação de testosterona no tratamento com CEE deve ser realizada com cautela visto que, em modelo animal de hipertensão, este tratamento inibiu os efeitos vascular benéficos do CEE.

RERERÊNCIAS¹

Akishita M, Kozaki K, Eto M, Yoshizumi M, Ishikawa M, Toba K, et al. Estrogen attenuates endothelin-1 production by bovine endothelial cells via estrogen receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988; 251(1):17-21.

Alhenc-Gelas F, Tache A, Saint-Andre JP, Milliez J, Sureau C, Corvol P, Menard J. The renin-angiotensin system in pregnancy and parturition. *Adv Nephrol Necker Hosp*. 1986;15:25-33.

August P, Oparil S. Commentary: hypertension in women. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84:1862-6.

Basson R. Pharmacotherapy for women's sexual dysfunction. *Expert Opin Pharmacother*. 2009; 10:1631-48.

Bhavnani BR, Cecutti A, Gerulath A, Woolever AC, Berco M. Comparasion of the antioxidant effects os equine estrogen, red win components, vitamin E, and probucol on low-density lipropotein oxidation in postmenopausal women. *Menopause*. 2001;8(6): 408-19

Brzezinski A, Danenberg HD. Estrogen, progesterone, and cardiovascular health: when shall we complete thpuzzle? *Menopause*. 2005;12(5):488-91.

Borreli CL, Almeida PG. Doenças cardiovasculares e as terapias de reposição hormonal. *Hipertensão*. 2005; 8(3):1-5.

Burger HG. Androgen production in women. *Fertil Steril*. 2002; 77(4):S3-S5.

Burl VL, Whelton P, Roccella EJ, Brown C, Cutler JA, Higgins M, Horan MJ, Labarthe, D. Prevalence of hypertension in the US adult population: results from the Thrid National Health and Nutricion Examination Survey, 1988-1991. *Hypertension*. 1995; 25:305-13.

Broshihan KB, Senanayake PS, Li P, Ferrario CM. Bi-directional actions of estrogen on the rennin-angiotensin system. *J Hypertens*. 2004; 22(Suppl 1):111S.

Buster JE, Kingsberg SA, Aguirre O, Brown C, Breaux JG, Buch A, Rodenberg CA, Wekselman K, Casson P, et al. Testosterone patch for low sexual desire in surgically menopausal women: a randomized trial. *Obstet Gynecol*. 2005;105:944-52.

¹ 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].

Brown NJ, Vaughan DE. The Renin-Angiotensin and fibrinolytic systems co-conspirators in the pathogenesis of ischemic cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med.* 1996; 6(7):239-43.

Cai H, Griendling KK, Harrison DG. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol Sci.* 2003;24:471-8.

Calhoun DA, Oparil S. The sexual dimorphism of high blood pressure. *Cardiol Rev.* 1988; 6:356-63.

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

Chen YF, Meng QM. Sexual dimorphism of blood pressure in spontaneously hypertensive rats is androgen dependent. *Life Sci.* 1991;48:85-96.

Chen YF, Naftilan AJ, Oparil S. Androgen dependent angiotensinogen and rennin messenger RNA expression in hypertensive rats. *Hypertension.* 1992;19:456-63.

Chignalia AZ. Testosterona induz migração de células da musculatura lisa vascular de ratos espontaneamente hipertensos por mecanismos dependentes de EROs e ativação da NADPH oxidase via c- Src. [tese (Doutorado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

Christian RC, Harrington S, Edwards WD, et al. Estrogen status correlates with the calcium content of coronary atherosclerotic plaques in women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:1062-7.

Chrissbois S, Budzyn, K, Marley, PD, Sobey CG. Evidence that estrogen suppresses rho-kinase function in the cerebral circulation in vivo. *Stroke.* 2004;35:2200-5.

Chumlea WC, Roche AF, Siervogel RM, Knittle JL, Webb P. Adipocytes and adiposity in adults. *Am J Clin Nutr.* 1981;34(9):1798-803.

Clarkson TB, Appt SE. Controversies about HRT-lessons from monkey models. *Maturitas.* 2005; 51(1):64-74.

Colburn P, Buonassisi V, Estrogen binding sites in endothelial cell cultures. *Science.* 1978;201:817-9.

Crane MG, Harris JJ, Winsor W 3rd. Hypertension and oral contraceptives. *Br Med J.* 1978; 21;2(6145):1165.

Crews JK, Khalili, RA. Gender-specific of Ca²⁺ entry mechanisms of arterial vasoconstriction by sex hormones. *Clin Exp Pharmacol Physiol*.1999;26(9):707-15.

Croft KD, McGiff JC, Sanchez-Mendoza A, Carroll MA. Angiotensin II releases 20-HETE from rat renal microvessels. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000; 279:F544–F51.

Dantas APV, Tostes RC, Fortes ZB, Carvalho MHC, et al. In vivo evidence for antioxidant potential of estrogen in microvessels of female spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2002; 39:405-11.

Dantas APV, Franco MCP, Silva-Antonialli MM, Tostes RC, Fortes ZB, Nigro D, Carvalho MHC et al. Gender differences in superoxide generation in microvessels of hypertensive rats: role of NAD(P)H-oxidase. *Cardiovasc Res*. 2004; 61(1):22-9.

Dantas APV, Scivoletto R, Fortes ZB, Nigro D, Carvalho MHCC. Influence of female sex hormones on endothelium-derived vasoconstrictor prostanoid generation in microvessels of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*.1999;34:914-9.

Diczfalusy E. [In search of human dignity: gender equality, reproductive medicine and aging in good health]. *Contracept Fertil Sex*.1997;25(12):885-93.

Dubey RK, Jackwson E, Keller P, Imthurn B, Rosselli M. Estradiol metabolites inhibit endothelin synthesis by an estrogen receptor-independent mechanism. *Hypertension*. 2001;37:640-4.

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

El-Alfy M, Luu-The V, Huang XF, Berger L, Labrie F, Pelletier G. Localization of type 5 β -hydroxysteroid dehydrogenase, 3β -hydroxysteroid dehydrogenase, and androgen receptor in the human prostate by in situ hybridization and immunocytochemistry. *Endocrinology*. 1999; 140(3):1481-91.

Farhat, MY, Abi-Younes S, Ramwell PW. Non-genomic effects of estrogen and the vessel wall. *Biochem Pharmacol*. 1996; 51(5):571-6.

Fernandes CE, Ferreira JAS, Melo NR, Peixoto S. *Terapêutica hormonal no climatério feminino: onde estamos e para onde vamos?* São Paulo: Editora Segmento;2009.160p.

Fernandes CE, Pinho-Neto JSL, Gebara OCV, et al. I Diretriz Brasileira sobre Prevenção de Doenças Cardiovasculares em Mulheres Climatéricas e a Influência da Terapia de Reposição Hormonal (TRH) da Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC) e da Associação Brasileira do Climatério (SOBRAC). *Arq Brás Cardiol*, 2008. 91(1 supl.1):1-23

Fernandes DC, Wosniak J, Pescatore LA, Bertoline MA, Liberman M, Laurindo FRM, Santos CX. Analysis of dihydroethidium-derived oxidation products by HPLC in the assessment of superoxide production and NADPH oxidase activity in vascular systems. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007;292:C413–C22.

Ferrario CM. Role of angiotensin II in cardiovascular disease therapeutic implications of more than a century of research. *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2006; 7(1):3-14.

Fisher M, Baessler A, Schunkert H. Renin angiotensina system and gender differences in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res*.2002;53:672-7.

Grady D, Herrington D, Bittner V, et al. Cardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II). *JAMA*. 2002;288(1):49–57.

Greene JG. Constructing a standard climacteric scale. *Maturitas*.1998;29(1):25-31.

Gentry RT, Wade GN. Sex differences in sensitivity of food intake, body weight, and running-wheel activity to ovarian steroids in rats. *J Comp Physiol Psychol*. 1976; 90(8):747-54.

Goldstein RS, Tarloff, JB, Hook, JB. Age-related nephropathy in laboratory rats. *FASEB J*. 1998; 2:2241-51.

Groot AA, Zwieter PA, Peter SLM. Involvement of Reactive Oxygen Species in Angiotensin II-induced vasoconstriction. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004; 43 (1):154-9.

Hames SR, Levin ER. Extranuclear steroid receptors: nature and actions. *Endocr. Rev*. 2007; 28(7):726–41.

Hanke H, Kamenz J, Hanke S, et al. Effect of 17-beta estradiol on pre-existing atherosclerotic lesions: role of the endothelium. *Atherosclerosis*. 1999; 147(1): 123-32.

Harrap SB. Public health, cardiovascular disease and molecular biology. *Kidney Int*. 1994; 46(6):1546-9.

Harvey PJ, Molloy D, Upton J, Wing LM. Dose response effect of conjugated equine oestrogen on blood pressure in postmenopausal women with hypertension. *Blood Press*. 2000;9(5):275-82.

Heinlein CA, Chang, C. The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. *Mol. Endocrinol*. 2002; 16(10):2181-2187.

Heine PA, Taylor JA, Iwamoto GA, Lubahn DB, Cooke PS. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor- α knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:12729-34.

Hinojosa L, Craig T, Zheng W, Ji H, Haywood JR, Sandberg K. Ovariectomy augments hypertension in aging female Dahl-salt-sensitive rats. *Hypertension*. 2004; 44:405-9.

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; 360:291-3.

Honda H, Unemoto T, Kogo H. Different mechanisms for testosterone-induced relaxation of aorta between normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1999; 34:1232-6.

Hulley S, Grady D, Bush T, 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*. 1998; 280(7): 605-13.

Irigoyen MC, Consolim-Colombo FM, Krieger Em. Controle cardiovascular: regulação reflexa e papel do sistema nervoso simpático. *Ver Bras Hipertens*. 2001; 8:55-62.

Jiang CW, Sarrel PM, Linday DC, Poole-Wilson PA, Collins P. Endothelium-independent relaxation of rabbit coronary artery by 17 beta estradiol in vitro. *Br J Pharmacol*. 1991;104:1033-37.

Jones R, Hugh JT, Channer KS. The influence of testosterone upon vascular reactivity. *Eur J Endocrinol*. 2004;151(1):29-37.

Judd HL, Judd, GE, Lucas WE, Yen SS Endocrine function of the postmenopausal ovary: concentration of androgens and estrogens in ovarian and peripheral vein blood. *J Clin Endocrinol Metab*. 1974;39(6):1020-4.

Jun SS, Chen Z, Pace MC, Shaul PW. Estrogen upregulates cyclooxygenase-1 gene expression in ovine fetal pulmonary artery endothelium. *J Clin Invest*. 1998; 102(1):176-83.

Khalil RA, Smiley DA. Estrogenic compounds, estrogen receptors and vascular cell signaling in the aging blood vessels. *Curr Med Chem*. 2009;16(15):1863-87.
Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet*. 2005;365(9455):217-23.

Keating NL, Clery PD, Rossi AS, et al. Use of hormone replacement therapy by postmenopausal women in the United States. *Ann Intern Med*. 1999;130:545-53.

Kornhauser C, Malacara JM, Garay ME, Pérez-Luque E.L. The effect of hormone replacement therapy on blood pressure and cardiovascular risk factors in menopausal women with moderate hypertension. *J Hum Hypertens.*1997;11(7):405-11.

Kuiper GG, Carlsson B, Grandien, K, et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors ER α and ER β . *Endocrinology.*1997;138:863-70.

Krieger EM, Franchini KG, Krieger JE. Fisiopatogenia da hipertensão arterial. *Medicina.* 1996; (29):181-92.

Krieger EM, Irygoen MC, Krieger JE. Fisiopatologia da hipertensão. *Ver Soc Cardiol Estado de São Paulo.* 1999; (9):1-7

Krapf JM, Simon JA. The role of testosterone in the management of hypoactive sexual desire disorder in postmenopausal women. *Maturitas.* 2009; 20;63(3):213-9.

Lassegue B, Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidase: specific features, expression and regulation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2003; 285(2): R277-R97.

Lassegue B, Griendling KK. NADPH oxidase: functions and pathologies in the vasculature. *Atheroscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30:653-61.

Lee JH, Yang DH, Park HS, Cho Y, Jun JE, Park WH, Chun BY, Shin JY, Shin DH, Lee KS, Kim KB, Kim YJ, Chae SC. Incidence of hypertension in Korea: 5 year follow-up study. *J Korean Med Sci.* 2011;26(10):1286-392.

Levin ER. Estrone- β and the cardiovascular system. *Endocrinol metab.* 2002; 13(5):184-5.

Lerman A, Zeiher AM. Endothelial function: cardiac events. *Circulation.* 2005; 111(3):363–68.

Liu B, Ely D. Testosterone increases: sodium reabsorption, blood pressure, and renal pathology in female spontaneously hypertensive rats on a high sodium diet. *Adv Pharmacol Sci.* 2011; (2011):817835.

Limacher MC. Hormones and heart disease: what we thought, what we have learned, what we still need to know. *Trans Am Clin Climatol. Assoc.*2002;113:31– 40.

Lin AL, Schultz JJ, Brenner RM, Shain, SA. Sexual dimorphism characterizes baboon myocardial androgen receptors but not myocardial estrogen and progesterone receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol.*1990; 37(1):85-95.

Lindheim SR, Buchanan TA, Duffy, et al. Comparison of estimates of insulin sensitivity in preand postmenopausal women using the insulin tolerance test and frequently sampled intravenous glucose tolerance test. *J Soc Gynecol Investig.* 1994; 1:150-4.

Littleton-Kearney M, Hurn PD. Testosterona as a modulator of vascular behavior. *Biol. Res. Nurs.* 2004;5(4):276-285.

Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz. J. Biol.* 2002. 62(4): 609-14

Mass A, Franke HR. Women's health in menopause with a focus on hypertension. *Neth J.* 2009; 2:68-72.

Marji JS, Wang MH, Laniado-Schwartzman M. Cytochrome P-450 4A isoform expression and 20-HETE synthesis in renal preglomerular arteries. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002; 283(1):F60-F7.

Meyer MR, Baretella O, Prossnitz ER, Barton M. Dilation of epicardial coronary arteries by the G protein-coupled estrogen receptor agonists G-1 and ICI 182,780. *Pharmacology.* 2010;86(1):58-64.

Meyer MR, Haas E, Prossnitz ER, Barton M. Non-genomic regulation of vascular cell function and growth by estrogen. *Mol Cell Endocrinol.* 2009; 24(1-2):9-16.

McGiff, JC, Quilley, J. 20-HETE and the kidney: resolution of old problems and new beginnings. *Am J Physiol (Reg Integr Com Physiol).* 1999; 227:R607-R23.

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

Okano HMD, Jayachandran MP, Yoshikawa, AWD, Miller VMP. Differential effects of chronic treatment with estrogen receptor ligands on regulation of nitric oxide synthase in porcine aortic endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2006; 47:621-28.

Orimo A, Inoue S, Ikegami A, et al. Vascular smooth cells are targets for estrogen. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;195:730-36.

Ouchi Y, Share L, Crofton JT, et al. Sex difference in the development of deoxycorticosterone-salt hypertension in the rat. *Hypertension.* 1987;9:172-7.

Pasqualini C, Leviel V.; Guibert B, Faucon-Bigué N.; Kerdelhui B. Inhibitory action of acute estradiol treatment on the activity and quantity of tyrosine hydroxylase in the median eminence of ovariectomized rats. *J Neuroendocrinol.* 1991;3:575-80.

Paech K, Webb P, Kuiper GG, Nilsson S, Gustafsson J, Kushner PJ, et al. Differential ligand activation of estrogen receptors ER α and ER β at AP1 sites. *Science*. 1997;277(5331):1508-10.

Park JW, Hoyal CR, Benna J, Baior, BM. Kinase-dependent activation of the leukocyte NADPH Oxidase in a cell-free system. *J Biol Chem*. 1997;272(17):11035-43.

Pérez-Torres I, El Hafidi M, Infante O, Baños G. Effects of sex hormone levels on aortic vascular reactivity and variables associated with the metabolic syndrome in sucrose-fed female rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 2008; 86(1-2): 25-35.

Pinto S, Virdis A, Ghiadoni L, et al. Endogenous estrogen and acetylcholine-induced vasodilation in normotensive women. *Hypertension*. 1997; 29 (1,pt2):268–73.

Price MO, McPhail LC, Lambeth D, Han CH, Knaus UG, Dinauer MC. Creation of a genetic system for analysis of the phagocyte respiratory burst: high-level reconstitution of the NADPH oxidase in a nonhematopoietic system. *Blood*. 2002; 99(8): 2653-61.

Raisz LG, Wiita B, Artis A, Bowen A, et al. Comparison of the effects of estrogen alone and estrogen plus androgen on biochemical markers of bone formation and resorption in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996; 81:37-43.

Ramos AM, Camargos AF, Pereira FE. Effects of simultaneous treatment with estrogen and testosterone on the uterus of female adult rats. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2007; 34:52-4.

Rao AK, Dietrich AK, Ziegler YS, Nardulli AM. 17 β -Estradiol-mediated increase in Cu/Zn superoxide dismutase expression in the brain: A mechanism to protect neurons from. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2011; 127(3-5):382-9.

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

Reckelhoff JF. Sex Steroids, Cardiovascular disease, and hypertension. *Hypertension*. 2004; 45:170-4.

Resta, TC, Kanagy NL, Walker BR. Estradiol-induced attenuation of pulmonary hypertension is not associated with altered eNOS expression. *AM J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001; 280:L88-L97.

Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science*. 2005;307(5715):1625-30.

Rigatto KV, Bohlke M, Irigoyen MC. Sistema renina-angiotensina: da fisiologia o tratamento. *Rev Soc Cardiol Rio Grande do Sul*. 2004;3:1-5.

Rosenfeld ME, Kauser K, Martin-McNulty B, et al. Estrogen inhibits the initiation of fatty streaks throughout the vasculature but does not inhibit intra-plaque hemorrhage and the progression of established lesions in apolipoprotein E deficient mice. *Atherosclerosis*. 2002; 164(2):251-9.

Roman RJ. P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiol Rev*. 2002;82:131–85.

Rosselli M, Imthurn B, Macas E, Keller PJ, Dubey RK. Circulating nitrite/nitrate levels increase with follicular development: indirect evidence for estradiol mediated NO release. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994; 202(3):1543–52.

Rossi R, Grimald T, Origliani G, Fantini G, Coppi F, Modena MG. Menopause and cardiovascular risk. *Pathophysiol Haemost Thromn*. 2002 (32):325-28.

Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*. 2002;288(3):321-33

Rowland NE, Fregly MJ. Role of gonadal hormones in hypertension in the Dahl salt-sensitive rat. *Clin. Exp. Hypertens*. 1992;14:367-75.

Roman RJ. P-450 metabolites of arachidonic acid in the control cardiovascular function. *Physiol Rev*. 2002; 82:131-85.

Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, et al. Heart disease and stroke statistics - 2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2012;125:e2–e220

Rubanyi GM, Freay AD, Kauser K, Sukovich D, Burton G, Lubahn, DB, et al. estrogen receptors and endothelium-derived nitric oxide production in the mouse aorta. Gender difference and effect of estrogen receptor gene disruption. *J Clin Invest*. 1997; 99(10):2429-37.

Sarrel P, Dobay B, Wiita B. Estrogen and estrogen-androgen replacement in postmenopausal women dissatisfied with estrogen-only therapy. Sexual behavior and neuroendocrine responses. *J Reprod Med*. 1998; 43(10): 847-56.

Seely EW. Hypertension in pregnancy: a potential window into long-term cardiovascular risk in women. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(6):1858-61.

Sewer MB, Koop DR, Morgan ET. Endotoxemia in rats is associated with induction of the P4504A subfamily and suppression of several other forms of cytochrome P450. *Drug Metab Dispos* 1996; 24:401-7.

Schmidt CW. Sexual and gender identity disorders. In: First MB, Ross R, (eds.) *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*, 4.ed. Washington, DC: American Psychiatric Association; 1994. p.496-8.

Schmidt-Nielsen K. *Fisiologia Animal*. São Paulo: Editora Santos; 2007. 609p.

Shifren JL. Androgen deficiency in the oophorectomized woman. *Fertil Steril*. 2002;77 (Suppl 4):S60-S2.

Sinha-Hikim I.; Taylor, W. E.; Gonzalez-Cadavid, N.F.; Zheng, W.; Bhasin, S. Androgen receptor in human skeletal muscle and cultured muscle satellite cells: up-regulation by androgen treatment. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89,(10):5245-55.

Simoncini T, Hafezi-moghadam A, Brasil DP, Ley K, Chin WW, Liao JK. Interaction oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature*. 2000; 407(6803):538-41.

Silva-antonialli MM, Fortes ZB, Carvalho MHC, Scivoletto R, Nigro D. et al. Sexual dimorphism in the response of thoracic aorta from SHR to losartan. *Gen Pharmacol*. 2000; 34(5):329-35.

Sociedade Brasileira de Cardiologia / Sociedade Brasileira de Hipertensão / Sociedade Brasileira de Nefrologia. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. *Arq Bras Cardiol* 2010; 95(1 supl.1): 1-51

Schiffrin EL. Vascular and cardiac benefits of angiotensin receptor blockers. *Am. J. Med*. 2002; 113(5):409-418.

Smith CL, O'Malley BW Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. *Endocr Rev*. 2004; 25:45-71.

Stewart KG, Zhang Y, Davidge ST. Estrogen decreases prostaglandin H synthase products from endothelial cells. *J Soc Gynecol Investig*. 1999; 6(6):322-7.

Stewart KG, Zhang Y, Davidge ST. Estrogen decreases prostaglandin H synthase products from endothelial cells. *J Soc Gynecol Investig*. 1999;6(6):322-7.

Soules MR, Sherman S, Parrot E, Rebar R, Santoro N, Utian W, Woods N. Stages of reproductive aging workshop (STRAW). *J Womens Health Gend. Baesd. Med*. 2001; 10 (9): 843-8.

Spyridopoulos I, Sullivan AB, Keanery M, Isner JM, Losordo DW. Estrogen-receptor-mediated inhibition of human endothelial cell apoptosis. Estradiol as a survival factor. *Circulation*. 1997; 95(6):1505-14.

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.* 62(3):587-93, 2004.

Simon J, Braunstein G, Nachtigall L, et al. Testosterone Patch Increases Sexual Activity and Desire in Surgically Menopausal Women with Hypoactive Sexual Desire Disorder. *J Clin End Metab.* 2005; 90:5226–33.

Tatchum-Talom R, Martel C, Marette A. Effects of ethinyl estradiol, estradiol, and testosterone on hindlimb endothelial function in vivo. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2002; 39:496-502.

Teoh H, Quan A, Leung SW, Man Y. Differential effects of 17beta-estradiol and testosterone on the contractile responses of porcine coronary arteries. *B J. Pharmacol.* 2000. 129 (7): p.1301-08.

Thompson J, Khalil RA. Gender differences in the regulation of vascular tone. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2003; 30(1-2):1-15.

Torrezan R. O tratamento com isoflavonas mimetiza a ação do estradiol no acúmulo de gordura em ratas ovariectomizadas. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2008; 52(9): 1489-96.

Tostes RC, Nigro D, Fortes ZB, Carvalho MHC. Effects of estrogen on the vascular system. *Braz J Med Biol Res.* 2003; 36(9):1143-58.

Tostes RCA, David FL, Carvalho MHC, Nigro D, Scivoletto R, Fortes ZB. Gender differences in vascular reactivity to endothelin-1 in deoxycorticosterone-salt hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2000; 36(1):S99-S101.

Thompson J, Khalil R. A. Gender differences in the regulation of vascular tone. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2003; 30(1-2):1-15.

Touyz RM, Tabet F, Schiffrin EL. Redox-dependent signalling by angiotensin II and vascular remodelling in hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2003; 30(11):860-6.

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

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

Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Benfato VMMS, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim Nova.* 2007; 30(5):1323-38.

Vedernikov YP, Liao QP, Jain V, et al. Effects of chronic treatment with 17 β -estradiol and endothelium-dependent and -independent relaxation in isolated aortic rings from ovariectomized rats. *Am J Obstet Gynecol.* 1999;176:603-8.

Walter P, Green S, Greene G, Krust A, Bornert JM, Jeltsch JM, et al. Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985; 82(23):7889-93.

Ward NC, Chen K, Li C, Croft KD, Keaney JF Jr. Chronic activation of AMP-activated protein kinase prevents 20-hydroxyeicosatetraenoic acid-induced endothelial dysfunction. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2011; 38(5):328-33.

Washburn SA, Adams MR, Clarkson TB, Adelman SJ. A conjugated equine estrogen with differential effects on uterine weight and plasma cholesterol in the rat. *Am J Obstet Gynecol.* 1993;169(2 Pt 1):251-6.

Watts NB, Notelovitz M, Timmons MC, et al. Comparison of oral estrogens and estrogens plus androgen on bone mineral density, menopausal symptoms and lipid-lipoprotein profiles in surgical menopause. *Obstet Gynecol* 1995; 85:529-37.

Xing D, Nozell S, Chen YF. Estrogen and mechanisms of vascular protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009; 29:289-95.

Wajchenberg BL. Disfunção endotelial no diabetes tipo 2. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2002; 46(5):1-6.

Waynforth HB. Experimental and surgical technique in the rat. 1980. London ; Uk. Academic press. p.161

Webb CM, McNeill JG, Hayward CS, Zeigler DE, Collins P. Effects of testosterone on coronary vasomotor regulation in men with coronary heart disease. *Circulation.* 1999; 100:1690-6.

Windler E, Zyriax BC, Eidenmuller B, et al. 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; 57(3): 239-46.

Wingorve CS, Garr E, Pickar JH, Dey M, Stevenson JC. Effects of equine oestrogens on markers of vasoactive function in human coronary artery endothelial cells. *Mol Cell Endocrinol.* 1999; 150:33-37.

Winters SJ. Androgens and antioandrogens. In: Brody TM, Larner J, Minnerman KP. *Human pharmacology: molecular to clinics.* St Louis: Mosby, 1999; p.519-31.

Yue P, Chatterjee K, Beale C, Poole-Wilson PA, Collins P. Testosterone relaxes rabbit coronary arteries and aorta. *Circulation.* 1995; 91:1154–60.

Yung LM, Wing TW, Xiao YT, Fung PL, Lai HY, et al. Inhibition of Renin-angiotensin system reverses endothelial dysfunction and oxidative stress in estrogen deficient rats. *Plos one.* 2011; 29;6(3):e17437.

Ylikorkala O, Orpana A, Puolakka J, Pyorala T, Viinikka L. Postmenopausal hormonal replacement decreases plasma levels of endothelin-1. *Clin Endocrinol Metab.* 1995; 80: 3384-87.

Zhang QC, Raz L, Wang GR, et al. Estrogen attenuates ischemic oxidative damage via an estrogen receptor alpha-mediated inhibition of NADPH oxidase activation. *J Neurosci.* 2009; 29:13823–36.

Yanes LL, Rormare DG, Cucchiarelli VE, Fortepiani LA, Gomez-Sanchez CE, Santacruz F, Reckelhoff JF. . Role of endothelin in mediating postmenopausal hypertension in a rat model. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 288: R229–R33.

Yanes LL, Romero DG, Iles JW, Iliescu R, Gomez-Sanchez C, Reckelhoff JF. Sexual dimorphism in the renin-angiotensin system in aging spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006; 291: R383–R90.

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

Yanes LL, Reckelhoff JF. Postmenopausal hypertension. *Am J Hypertens.* 2011;24(7):740-9.