

FERNANDO PARANAIBA FILGUEIRA

**CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA VASORELAXANTE
DO EQUILIN EM ARTÉRIAS MESENTÉRICAS
DE RATAS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSAS**

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 original

São Paulo
2012

RESUMO

Filgueira FP. Caracterização da resposta vasorelaxante do equilin em artérias mesentéricas de ratas espontaneamente hipertensas [tese (Doutorado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

As ações vasculares dos hormônios sexuais femininos têm sido amplamente investigadas, entretanto, grande parte dos estudos utilizaram o 17 β -estradiol como alvo de investigação. O Premarin, medicamento utilizado na terapia de reposição hormonal há mais de 60 anos, contém pelo menos dez tipos de substâncias estrogênicas em sua composição, entretanto pouco se sabe sobre a ação vascular direta da maioria desses componentes, dentre os quais destaca-se o equilin, que representa cerca de 25% da composição do premarin. Deste modo, o objetivo deste estudo foi investigar a ação do equilin em artérias mesentéricas de resistência de ratas espontaneamente hipertensas, bem como o mecanismo envolvido neste efeito, comparando com o 17 β -estradiol. Foram utilizadas ratas espontaneamente hipertensas (12 semanas de idade), ovariectomizadas 30 dias antes dos experimentos e seus respectivos controles (intactas). A reatividade de artérias mesentéricas de resistência foi avaliada utilizando miógrafo para estudo de tensão isométrica. Foram realizadas curvas concentração-efeito (10 nM-100 μ M) ao equilin, ao 17 β -estradiol, à estrona e ao 17 α -estradiol. Dentre estes compostos, apenas o equilin produziu resposta máxima vasodilatadora equivalente à do 17 β -estradiol. Não houve diferença nas respostas promovidas pelos estrógenos entre ratas intactas e ovariectomizadas. O antagonista específico de receptores de estrógeno (ICI 182,780) não afetou o relaxamento ao equilin. De modo similar, este efeito não foi alterado pela incubação com inibidores da adenilato ciclase e da PKA. A resposta ao equilin não foi alterada pela remoção do endotélio ou pela incubação com inibidores da óxido nítrico sintase, da guanilato ciclase e da PKG. A indometacina ou a associação de indometacina e L-NAME não alterou a ação do equilin. Além disso, o relaxamento a este hormônio não foi alterado pela incubação com: tetraetilamônio (bloqueador inespecífico de canal de K⁺), caribdotoxina (bloqueador de canal de K⁺ de alta e intermediária condutância ativado por Ca²⁺) + apamina (bloqueador de canal de K⁺ de baixa condutância ativado por Ca²⁺), iberiotoxina (bloqueador de canal de K⁺ de alta condutância ativado por Ca²⁺), glibenclamida (bloqueador de canal de K⁺ sensível ao ATP) ou 4-aminopiridina (bloqueador de canal de K⁺ dependente de voltagem). O equilin promoveu vasorelaxamento em preparações pré-contraídas tanto com U46619 quanto com endotelina-1 ou com KCl indicando efeito vasodilatador via bloqueio do influxo de Ca²⁺ por canais operados por voltagem ou por receptor. De fato, a incubação com equilin diminuiu a contração ao Ca²⁺, assim como ao BAY K 8644, ativador de canais de Ca²⁺ do tipo-L, porém, não modificou a contração à cafeína (que promove liberação de Ca²⁺ do retículo sarcoplasmático). Demonstramos com este estudo que o efeito vasorelaxante do equilin em artérias mesentéricas de ratas espontaneamente hipertensas se deve predominantemente ao bloqueio de canais de Ca²⁺ do tipo L.

Palavras-chave: Equilin. Artérias mesentéricas de resistência. Efeito vasorelaxante. Ratas espontaneamente hipertensas.

ABSTRACT

Filgueira FP. Characterization of vasorelaxant response to equilin in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. [Ph. D. thesis (Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

The vascular actions of female sex hormones have been widely explored; however, most of these studies have used 17β -estradiol as the choice drug for investigation. Premarin is a preparation used in postmenopausal hormone replacement therapy for over sixty years. At least ten types of estrogen compounds have been identified in Premarin, however, little is known about the direct vascular action of the majority of its components, among which, equilin stands out, representing 25% of Premarin composition. Based on these observations, the aim of the present study was to investigate the effects of equilin in mesenteric resistance arteries from female hypertensive rats. Mechanisms contributing to equilin-induced effects were determined, comparing with the vascular effects induced by 17β -estradiol. 12 week-old female spontaneously hypertensive rats (ovariectomized 30 days before initiation of the experimental protocols) and their counterparts (intact) were used. Vascular reactivity was evaluated in a myograph for isometric tension recording. Concentration-response curves (10 nM-100 μ M) to equilin, 17β -estradiol, estrone and 17α -estradiol were performed. Among these compounds, only equilin evoked a maximal relaxation response equivalent to that of 17β -estradiol. There was no difference in the responses evoked by the estrogen compounds between intact and ovariectomized rats. The estrogen receptor antagonist (ICI 182,780) failed to inhibit equilin-induced relaxation. Similarly, this effect was not affected by incubation with inhibitors of adenylyl cyclase and protein kinase A. Equilin response was not altered by endothelium removal or by incubation with inhibitors of eNOS, guanylate cyclase and protein kinase G. Indomethacin or the association of indomethacin plus L-NAME did not alter equilin-induced effects. Furthermore, the relaxation to this hormone was not altered after incubation with: tetraethylammonium (a non-selective K^+ channel blocker); charybdotoxin (a large and intermediate conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel blocker), glibenclamide (an ATP-dependent K^+ channel blocker) or 4-aminopyridine (a voltage-dependent K^+ channel blocker). Equilin evoked relaxation in preparations pre-constricted with U46619 and also with ET-1 or KCl, indicating a vasodilator effect via blockade of Ca^{2+} influx from both voltage-operated Ca^{2+} channels and receptor-operated Ca^{2+} channels. In fact, equilin incubation reduced contraction induced by both Ca^{2+} and Bay K 8644, an L-type Ca^{2+} channel activator. However, equilin was unable to alter caffeine-induced contraction (via Ca^{2+} release from the intracellular stores). We have demonstrated in the present study that equilin vasorelaxant effect in mesenteric arteries from female spontaneously hypertensive rats occurs predominantly due to blockade of L-type Ca^{2+} channels.

Keywords: Equilin. Resistance mesenteric arteries. Vasorelaxant effect. Spontaneously hypertensive rat.

1 INTRODUÇÃO

O hormônio sexual feminino estrógeno tem seu nome derivado da palavra “oistros” que significa “desejo louco”, e do sufixo “-gen” que significa “que produz”¹. Há mais de um século, havia indícios de que a função vascular periférica poderia ser influenciada por “efeitos maléficos” provenientes do aparelho reprodutor feminino. Deste modo, as primeiras investigações relacionadas aos efeitos farmacológicos do estrógeno foram cercadas de expectativas um tanto temerosas. Entretanto, a compreensão das ações deste hormônio cresceu de maneira substancial, diminuindo consideravelmente estes conceitos temerosos frente à terapia com estrogênio exógeno, principalmente em relação aos efeitos colaterais. Neste sentido, dados apontados por Richard White (2002)² mostram que o número de trabalhos investigando o efeito cardioprotetor do estrógeno era de apenas 100 entre os anos de 1900 e 1975. Esse número foi dez vezes maior entre os anos de 2000 e 2001. Como ressalta muito bem este autor, é evidente que o estudo dos efeitos do estrógeno sobre a função vascular será por muito tempo um dos principais alvos de investigação da área cardiovascular, com o objetivo de compreender de modo seguro o potencial benefício deste hormônio na terapia de reposição hormonal (TRH).

1.1 Estrógeno e Hipertensão Arterial

A hipertensão arterial (HA) é definida como uma doença de etiologia multifatorial que se caracteriza por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (PA), com a PA sistólica igual ou superior a 140 mmHg e a diastólica igual ou superior a 90 mmHg. Esta doença é a causa mais frequente de morbidade e mortalidade por doença cardiovascular (DCV), sendo responsável por uma a cada três mortes em todo o mundo. De acordo com dados do ano de 2000, a prevalência global de HA foi de aproximadamente 1 bilhão de pessoas, e para 2025, estima-se que mais de 1,5 bilhão de adultos serão hipertensos³.

Estudos epidemiológicos e clínicos demonstraram de maneira evidente a menor prevalência de HA em mulheres no período fértil quando comparadas aos homens de mesma idade. Após a menopausa, período de queda abrupta dos níveis de hormônios sexuais femininos, ocorre um aumento no número de mulheres

hipertensas⁴. Além disso, mulheres cirurgicamente menopausadas apresentam maior incidência de DCVs quando na ausência de reposição hormonal⁵. Em conjunto, estas observações tornam evidente a importância do estrógeno na saúde da mulher como hormônio protetor contra DCVs.

Pesquisas experimentais com diferentes modelos de HA como, por exemplo, ratos espontaneamente hipertensos (SHR)⁶, ratos DOCA-sal⁷, ratos Dahl sal-sensível⁸ e ratos geneticamente hipertensos New Zealand⁹, demonstram também que fêmeas apresentam níveis pressóricos reduzidos em comparação aos machos de mesma idade. Nesses modelos, sugere-se que os hormônios sexuais femininos podem proteger contra as complicações da HA. De fato, dados de nosso laboratório confirmaram esses achados utilizando os modelos SHR e DOCA-sal, e demonstraram um agravamento da HA em fêmeas ovariectomizadas, elevando a PA a níveis semelhantes aos observados em machos. O tratamento hormonal com 17 β -estradiol corrigiu a PA para níveis semelhantes aos encontrados em fêmeas falso-operadas¹⁰⁻¹¹.

1.2 Terapia de Reposição Hormonal

Por muitos anos, tem sido sugerido que a TRH pode proporcionar proteção contra DCVs em mulheres na pós-menopausa. A maioria dos estudos indica que mulheres no período pós-menopausa que fazem uso de alguma forma de TRH apresentam redução de 30-50% do risco de mortalidade cardiovascular¹²⁻¹⁶. Por outro lado, é importante mencionar resultados obtidos em estudos clínicos mais recentes, incluindo o Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study (HERS) e o Women's Health Initiative (WHI), os quais levantaram dúvidas a respeito dos efeitos protetores do estrógeno sobre o sistema cardiovascular. Nestes estudos, a TRH não reduziu o risco de eventos vasculares em mulheres na pós-menopausa¹⁷⁻¹⁸.

O HERS, um estudo clínico randomizado, avaliou a eficácia da associação de estrogênios conjugados equinos (CEE - conjugated estrogenic equine) com acetato de medroxiprogesterona na prevenção secundária de doenças coronarianas em pacientes com coronariopatia prévia. Os resultados mostraram uma tendência de aumento de eventos coronarianos e um aumento significativo de eventos tromboembólicos venosos no primeiro ano do estudo no grupo de mulheres que faziam uso da TRH¹⁷. No seguimento deste estudo (HERS II), os resultados

mostraram que a TRH não deve ser utilizada por mulheres na pós-menopausa para reduzir o risco de eventos cardiovasculares¹⁹.

O WHI, realizado em 2002, foi um dos estudos mais discutidos em sociedades de ginecologistas de todo o mundo. Este estudo tinha como um de seus objetivos avaliar o efeito da TRH na prevenção primária de DCV, diferentemente do HERS, que avaliou a prevenção secundária. Neste estudo, as pacientes receberam o mesmo esquema terapêutico utilizado no HERS e os resultados indicaram incidência superior (29%) de eventos cardiovasculares em mulheres que receberam o tratamento hormonal¹⁸. Em 2004, foram publicados outros resultados do estudo WHI que avaliou o uso isolado de CEE em mulheres na pós-menopausa e hysterectomizadas. Os resultados mostraram que o uso isolado de estrogênios conjugados nessas mulheres promoveu redução de quatro eventos coronarianos/ano para cada dez mil mulheres. Entretanto, uma vez que não se observou diferença significativa entre os grupos estudos, a conclusão deste estudo foi que o CEE não deve ser recomendado para prevenção de DCV em mulheres na pós-menopausa²⁰.

É importante destacar que estes estudos sofrem críticas em relação a alguns aspectos, dentre estes, a seleção das pacientes, que incluiu mulheres com idade em média uma década superior àquelas em que normalmente a TRH é recomendada. Além disso, como mencionado, essas mulheres apresentavam fatores de risco para as complicações observadas²¹. Evidências de estudos em primatas²² e em outros modelos animais²³⁻²⁴ indicam que os efeitos benéficos da TRH na prevenção da aterosclerose ocorrem somente se a terapia for iniciada antes do seu desenvolvimento. Considerando que as complicações cardiovasculares clínicas geralmente apresentam-se por volta dos 65 anos de idade²⁵ e que esses estudos alocaram pacientes em sua maioria com idade acima de 60 anos, é aceitável considerar que durante o período inicial da pós-menopausa exista uma “janela de oportunidade”, momento em que a TRH pode conferir cardioproteção²⁶. Esta crítica comentada, juntamente com outras²⁷, demonstram possíveis pontos falhos na interpretação final destes estudos que concluíram ausência de efeitos cardiovasculares benéficos com a TRH.

Assim, permanecem controversos os verdadeiros efeitos promovidos pela TRH sobre os riscos cardiovasculares no período da pós-menopausa, tornando-se indispensável a realização de novos estudos, tanto clínicos quanto experimentais.

Uma ampla variedade de terapias de reposição estrogênica (TRE) e TRH (estrógeno e progesterona) está disponível. As formulações estrogênicas utilizadas na terapia hormonal contêm formas distintas de estrógeno obtidas de fontes animais (naturais) ou quimicamente modificadas (sintéticas). As únicas preparações verdadeiramente “naturais” são os fitoestrógenos e o CEE, sendo este último extensivamente utilizado para TRE, isoladamente, ou associado à progesterona.

Uma importante consideração que se faz necessária em relação aos estudos comentados (HERS e WHI), é o fato de ambos utilizarem o Premarin como o medicamento de escolha para TRH. O Premarin é um CEE que contém pelo menos 10 tipos de estrógenos quimicamente diferentes, sendo um dos medicamentos mais prescritos nos Estados Unidos para mulheres na menopausa²⁸. A porcentagem de distribuição dos 10 componentes estrogênicos descritos no Premarin é: estrona (48%); equilin (24%); 17 β -dihidroequilin (15%); delta8,9-dehidroestrona (4,3%); 17 α -estradiol (3,8%); 17 α -dihidroequilin (1,8%); equilenin (1,1%); 17 β -estradiol (0,68%); 17 α -dihidroequilenin (0,45%) e 17 β -dihidroequilenin (0,3%)²⁹.

Apesar do Premarin ser utilizado na clínica há mais de 60 anos, pouco se sabe sobre a ação vascular individual de seus componentes. A literatura está repleta de trabalhos que investigaram a ação vascular de diversos hormônios estrogênicos, dentre estes o principal é o 17 β -estradiol. Entretanto, há poucos estudos que investigaram o efeito vascular do equilin, hormônio este responsável por aproximadamente 25% da composição do Premarin.

1.3 Ações Benéficas do Estrógeno

O estrógeno atua em diversos sistemas do organismo. De importância para o presente estudo, destaca-se a ação deste hormônio influenciando diretamente a função vascular³⁰⁻³¹. O estrógeno exerce efeito regulador sobre a estrutura vascular, inibindo a proliferação de células do músculo liso vascular³². A proliferação de células endoteliais após lesão encontra-se aumentada depois do tratamento das mesmas com estrógeno, sendo demonstrado em experimentos realizados *in vitro*³³ e *in vivo*³³⁻³⁴. Foi demonstrado também que o processo apoptótico da célula endotelial humana é inibido pelo tratamento com este hormônio³⁵. Além disso, o estrógeno reduz a adesão leucocitária sobre as células endoteliais e a migração

transendotelial, inibindo a expressão de moléculas de adesão induzidas por citocinas inflamatórias³⁶⁻³⁷.

Um importante avanço da ciência para o entendimento das ações vasculares do estrógeno foi a descoberta dos receptores estrogênicos (ERs – estrogen receptors) denominados ER α ³⁸ e ER β ³⁹. Estes receptores foram caracterizados tanto nas células endoteliais quanto nas células musculares lisas vasculares de humanos⁴⁰⁻⁴¹ e de ratos⁴²⁻⁴³. A partir dessas descobertas, surgiu um desafio aos pesquisadores de entender o papel funcional desses subtipos de receptores e o impacto dos mesmos sobre a fisiologia e fisiopatologia vascular.

Além dos receptores nucleares clássicos, recentemente novos receptores foram descritos, como o ER-X, um receptor de estrógeno associado à membrana plasmática e cujo papel nas ações dos estrógenos ainda não foi investigado⁴⁴. Outra proteína de membrana caracterizada recentemente e nomeada inicialmente de GPR30 (um receptor acoplado à proteína G) tem sido descrita como mediador das ações estrogênicas⁴⁵.

Outro efeito estrogênico bastante investigado é a influência desses hormônios sobre o perfil lipídico. O estrógeno reduz os níveis de colesterol LDL e aumenta os níveis de colesterol HDL em aproximadamente 15%, porém, aumenta também os níveis de triglicérides em cerca de 20%, efeitos estes proporcionais à dose utilizada no tratamento⁴⁶⁻⁴⁷. Além disso, foi demonstrado o efeito da TRH com estrógeno sobre a tolerância à glicose, a sensibilidade insulínica, a massa corpórea e a distribuição de gordura. O estudo randomizado PEPI (Postmenopausal Estrogen/Progestin Intervention), realizado durante 3 anos, demonstrou o efeito benéfico da TRH em reduzir os níveis séricos de insulina (-16%) e as concentrações de glicose (-2 mg/dL). Além deste, outros estudos⁴⁸⁻⁵⁰ mostram ainda que a TRH promove diminuição da massa corpórea e da distribuição de gordura, reduzindo ainda o risco de desenvolvimento de diabetes tipo 2. Estima-se que 25 a 30% da proteção cardiovascular atribuída ao estrógeno seja promovida pelos efeitos comentados acima.

1.4 Efeito Genômico do Estrógeno

Os efeitos do estrógeno podem ser classificados como: efeito transcricional clássico ou genômico e efeito extranuclear ou não-transcricional, também

denominado de não-genômico. Os efeitos genômicos dos estrogênios são mediados pelos ERs, os quais pertencem à superfamília de receptores nucleares, que são fatores de transcrição regulados por ligantes. Estes receptores, localizados preferencialmente no citoplasma, formam um complexo com proteínas de choque térmico (HSPs – heat shock protein). A ligação com o estrogênio dissocia os receptores deste complexo e induz a formação de homodímeros que se dirigem ao núcleo onde se ligam aos elementos responsivos ao estrogênio (ERE – estrogen response element) que estão localizados na região promotora dos genes a serem transcritos. Finalmente, com a contribuição de co-ativadores e outros fatores de transcrição⁵¹, o complexo hormônio-receptor promoverá a transcrição de genes alvos⁵²⁻⁵³.

A modulação da função vascular pelos estrogênios pode envolver efeitos genômicos. Neste sentido, a grande importância da modulação da reatividade vascular exercida pelo estrogênio, no que tange aos efeitos a longo prazo, é a regulação da transcrição do gene que codifica a síntese da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), demonstrada em trabalhos *in vitro*⁵⁴ e *in vivo*⁵⁵. Outros genes que codificam substâncias relacionadas à regulação do tônus vascular e que também podem sofrer influência do hormônio feminino são os genes da ciclooxigenase-1⁵⁶, da prostaglandina H sintase⁵⁷ e da endotelina-1⁵⁸.

1.5 Efeito Não-genômico do Estrogênio

Além do efeito clássico sobre a transcrição gênica, estudos têm demonstrado que o ER estão envolvidos em um efeito vascular rápido do estrogênio, denominado efeito não-genômico. É importante mencionar que esse efeito ocorre de maneira independente da transcrição gênica, ou seja, ocorre em questão de segundos ou minutos, diferentemente da ação genômica que necessita de algumas horas⁵⁹.

A resposta celular rápida do estrogênio está também associada com receptores de superfície celular, incluindo os receptores do fator de crescimento epidermal (EGFRs - epidermal growth factor receptors); com receptores acoplados a proteína G; e também estão ligados a vias de sinalização incluindo a mobilização de cálcio, a ativação de quinases e a produção de óxido nítrico⁶⁰. Desse modo, estudos demonstraram que esta ação não-genômica do estrogênio mediada via receptor e independente da transcrição gênica, está associada à ativação da eNOS através de

diferentes vias de sinalização como MAP quinases⁶¹⁻⁶² e a via PI₃-K/Akt⁶³⁻⁶⁵, resultando na geração de óxido nítrico. Considerando que a disfunção endotelial é considerada um dos principais componentes das doenças cardiovasculares e, associado ao fato da eNOS ser uma enzima vital na manutenção da integridade das células endoteliais, a regulação da mesma torna-se um evento importante na compreensão dos mecanismos envolvidos na proteção vascular promovida pelo estrógeno.

Como comentado anteriormente, a caracterização do GPR30, agora denominado GPER (receptor de estrógeno acoplado a proteína G), criou novas oportunidades de estudo sobre o modo de ação não-genômica promovido pelos hormônios femininos. Trabalhos recentes demonstraram a ação vasodilatadora direta do G1 (agonista do GPER) em artérias coronárias de porcos⁶⁶⁻⁶⁷. Além disso, demonstrou-se que a infusão deste agonista promove redução da pressão arterial em ratos Sprague–Dawley. Em artérias mamárias de humanos, a resposta relaxante induzida pelo G1 demonstrou ser superior àquela promovida pelo 17β-estradiol⁶⁸. Embora a ampla expressão do GPER em artérias tenha sido descrita por estudos recentes⁶⁹, o papel deste receptor na regulação da homeostase vascular ainda não se encontra totalmente elucidado.

Dentre as ações não-genômicas, existem também as ações que ocorrem de maneira independente de receptores, principalmente aquelas decorrentes da regulação de fluxo iônico. O estado contrátil das células musculares lisas é determinado pela diferença de potencial elétrico da membrana celular, gerada pela regulação dinâmica de fluxo iônico de potássio, cálcio e sódio através de canais iônicos específicos. Dados da literatura demonstraram que o efeito vasorelaxante do estrógeno envolve o bloqueio de canais de cálcio na membrana plasmática de células do músculo liso vascular, levando à redução de cálcio intracelular e consequente dilatação dos vasos sanguíneos. Embora a natureza molecular dos canais de cálcio envolvidos na resposta estrogênica não tenha sido elucidada, esses estudos demonstraram que o estrógeno reduz o influxo de cálcio e/ou estimula o efluxo deste íon⁷⁰⁻⁷¹. Além disso, embora apenas um estudo tenha demonstrado o efeito do estrógeno em bloquear a liberação de cálcio do retículo endoplasmático⁷², outros encontraram que a ação vasorelaxante do estrógeno não envolve efeito significativo sobre a liberação de cálcio intracelular ou sobre a sensibilidade do aparato contrátil^{70, 73}.

Outro mecanismo pelo qual o estrógeno promove seu efeito vasodilatador se dá através da abertura de canais de potássio ativados por cálcio e sensíveis à voltagem, levando à hiperpolarização de células do músculo liso vascular⁷⁴. Estes mecanismos comentados, dentre outros, evidenciam os efeitos independentes do endotélio, promovidos por este hormônio, sobre a reatividade vascular.

1.6 Ação Vascular Direta de Diferentes Estrógenos

Não há dúvidas de que grande parte dos estudos avaliando o efeito vasodilatador dos estrógenos utilizem o 17β -estradiol como principal alvo de investigação, uma vez que ele é considerado o hormônio feminino mais potente e presente em maior concentração na circulação. Além do 17β -estradiol, diversos outros estrógenos foram e estão sendo investigados com o objetivo de se compreender melhor a ação vascular dos mesmos e, conseqüentemente, o potencial benefício cardioprotetor, uma vez que estes efeitos podem se diferenciar conforme o composto estrogênico investigado.

Trabalhos que investigaram o efeito vasodilatador de outros compostos estrogênicos, utilizaram o 17β -estradiol como controle do estudo. Naderali et al. (1999)⁷⁵, avaliando a ação do 17α -estradiol, um estereoisômero do 17β -estradiol e presente em pequenas concentrações na circulação de mamíferos, demonstraram uma ação vasorelaxante semelhante à do 17β -estradiol. Compostos sintéticos como dietilestilbestrol (DES), também apresentam efeito vasorelaxante, e foi demonstrado que em artérias coronárias este hormônio sintético foi mais potente que o 17β -estradiol⁷⁶. Outro hormônio feminino amplamente utilizado nas TRH é a progesterona¹⁷, e assim como os estrógenos, também possui ação vasodilatadora⁷⁷⁻⁷⁸. Agonistas específicos de receptores estrogênicos, como o composto o PPT (4,4',4''-(4-propyl-[1H]-pyrazole-1,3,5-triyl) tris-phenol - agonista do ER α) e o DPN (2,3-bis(4-hydroxyphenyl)-propionitrile - agonista do ER β), tiveram também sua ação vasodilatadora demonstrada em artérias mesentéricas de rato. O agonista do ER α apresentou efeito vasorelaxante mais potente que o 17β -estradiol e este, por sua vez, foi mais potente que o DPN⁷⁹.

Outra classe de compostos bastante estudada é a das substâncias sintéticas denominadas de moduladores seletivos de receptores estrogênicos (SERMs – selective estrogen receptor modulators), que apresentam ações seletivas em

diferentes tecidos, atuando como agonistas e/ou antagonistas. Em geral, os SERMs atuam como agonistas em tecidos como vasos sanguíneos (promovendo ação vasodilatadora) e ossos, e apresentam ações antagonistas sobre tecidos reprodutivos como mamas e útero⁸⁰.

Assim como os SERMs, os fitoestrógenos apresentam propriedades tanto estrogênica quanto antiestrogênica, embora consideradas de baixa potência⁸¹. Esses compostos são derivados de plantas, e são estruturalmente e funcionalmente semelhantes aos estrógenos clássicos. Dentre as plantas consideradas como fontes de fitoestrógenos, a soja (*Glycine max* (L.) Merr.) é a que apresenta maiores proporções de isoflavonas, que são os fitoestrógenos mais comuns. Estas substâncias podem ainda ser encontradas em beterrabas (*Beta vulgaris* L.), batatas (*Solanum tuberosum* L.) e arroz (*Oryza sativa* L.). As isoflavonas mais estudadas são a genisteína e a daidzeína, que apresentaram ações benéficas sobre o sistema cardiovascular⁸².

Os principais estrógenos produzidos naturalmente na mulher são o estradiol, a estrona e o estriol. As mulheres no período pré-menopausa produzem estradiol em grandes quantidades pelo ovário e, em virtude deste hormônio apresentar alta afinidade pelos ERs, é considerado o hormônio mais potente²⁸. Por esta e outras características, o estradiol é o estrógeno mais utilizado nos estudos científicos, e portanto, as ações cardiovasculares deste hormônio estão bem caracterizadas, como já comentado anteriormente. O estriol é o principal estrógeno produzido pela placenta durante a gravidez mas ainda pode ser encontrado em quantidades menores se comparado ao estradiol e a estrona. A ação vascular deste hormônio tem sido pouco investigada. A estrona é menos potente que o estradiol e também é um metabólito deste último, sendo produzida a partir da androstenediona no tecido adiposo²⁸. Existem poucos estudos avaliando o efeito vascular direto desse composto, porém o interesse por este hormônio aumentou nos últimos anos.

É importante ressaltar ainda, como já comentado anteriormente, que o Premarin apresenta além da estrona, o equilin como substância presente em grande quantidade em sua composição (~25%). Este hormônio, entretanto, tem sido muito negligenciado, uma vez que a literatura apresenta poucos dados sobre a ação deste no sistema cardiovascular. Deste modo, torna-se importante a realização de um estudo que avalie o efeito vascular direto do equilin.

6 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste estudo permitem-nos concluir que o efeito vascular promovido pelo equilin em artérias mesentéricas de resistência de ratas geneticamente hipertensas é caracterizado como agudo e provavelmente não-genômico, além de não envolver a participação de receptores estrogênicos bem como a via adenilato ciclase/PKA. Além disso, este efeito é independente da presença do endotélio e da via NO/GMPc/PKG. A resposta vasodilatadora do equilin não envolve a liberação de prostanóides vasodilatadores e nem a ativação de diferentes canais de K^+ . Este efeito vasorelaxante induzido pelo equilin ocorre independente do bloqueio da liberação de cálcio intracelular e se deve predominantemente ao bloqueio do influxo de cálcio, principalmente bloqueando canais de cálcio do tipo L. Assim, podemos concluir que o efeito vasodilatador do equilin em artérias de resistência de ratas hipertensas poderia promover uma ação benéfica ao sistema vascular.

REFERÊNCIAS*

1. Shelfer L. The alchemy of Jargon: etymologies of urologic neologisms. Number 3: the genesis of steroid terminology. *Prostate*. 2009;69(3):228-30.
2. White RE. Estrogen and vascular function. *Vascul Pharmacol*. 2002;38(2):73-80.
3. 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.
4. Pereira M, Lunet N, Azevedo A, Barros H. Differences in prevalence, awareness, treatment and control of hypertension between developing and developed countries. *J Hypertens*. 2009;27(5):963-75.
5. Thompson J, Khalil RA. Gender differences in the regulation of vascular tone. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2003;30(1-2):1-15.
6. Chen YF, Meng QC. Sexual dimorphism of blood pressure in spontaneously hypertensive rats is androgen dependent. *Life Sci*. 1991;48(1):85-96.
7. Ouchi Y, Share L, Crofton JT, Iitake K, Brooks DP. Sex difference in the development of deoxycorticosterone-salt hypertension in the rat. *Hypertension*. 1987;9(2):172-7.
8. Rowland NE, Fregly MJ. Role of gonadal hormones in hypertension in the Dahl salt-sensitive rat. *Clin Exp Hypertens A*. 1992;14(3):367-75.
9. Ashton N, Balment RJ. Sexual dimorphism in renal function and hormonal status of New Zealand genetically hypertensive rats. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1991;124(1):91-7.
10. Dantas AP, Franco Mdo C, Silva-Antonialli MM, Tostes RC, Fortes ZB, Nigro D, 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.
11. Montezano AC, Callera GE, Mota AL, Fortes ZB, Nigro D, Carvalho MH, et al. Endothelin-1 contributes to the sexual differences in renal damage in DOCA-salt rats. *Peptides*. 2005;26(8):1454-62.
12. Bush TL, Barrett-Connor E, Cowan LD, Criqui MH, Wallace RB, Suchindran CM, et al. Cardiovascular mortality and noncontraceptive use of estrogen in women: results from the Lipid Research Clinics Program Follow-up Study. *Circulation*. 1987;75(6):1102-9.

* 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> [2011 Jul 15].

13. Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Manson JE, Rosner B, Speizer FE, et al. Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease. Ten-year follow-up from the nurses' health study. *N Engl J Med*. 1991;325(11):756-62.
14. Varas-Lorenzo C, Garcia-Rodriguez LA, Perez-Gutthann S, Duque-Oliart A. Hormone replacement therapy and incidence of acute myocardial infarction. A population-based nested case-control study. *Circulation*. 2000;101(22):2572-8.
15. Mosca L, Manson JE, Sutherland SE, Langer RD, Manolio T, Barrett-Connor E. Cardiovascular disease in women: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. Writing Group. *Circulation*. 1997;96(7):2468-82.
16. Stampfer MJ, Colditz GA. Estrogen replacement therapy and coronary heart disease: a quantitative assessment of the epidemiologic evidence. *Prev Med*. 1991;20(1):47-63.
17. Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B, 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.
18. 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.
19. Grady D, Herrington D, Bittner V, Blumenthal R, Davidson M, Hlatky M, 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.
20. Anderson GL, Limacher M, Assaf AR, Bassford T, Beresford SA, Black H, et al. Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*. 2004;291(14):1701-12.
21. Windler E, Zyriax BC, Eidenmuller B, Boeing H. Hormone replacement therapy and risk for coronary heart disease. Data from the CORA-study--a case-control study on women with incident coronary heart disease. *Maturitas*. 2007;57(3):239-46.
22. Clarkson TB, Appt SE. Controversies about HRT--lessons from monkey models. *Maturitas*. 2005;51(1):64-74.
23. Rosenfeld ME, Kauser K, Martin-McNulty B, Polinsky P, Schwartz SM, Rubanyi GM. 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.

24. Hanke H, Kamenz J, Hanke S, Spiess J, Lenz C, Brehme U, et al. Effect of 17-beta estradiol on pre-existing atherosclerotic lesions: role of the endothelium. *Atherosclerosis*. 1999;147(1):123-32.
25. Dubey RK, Imthurn B, Barton M, Jackson EK. Vascular consequences of menopause and hormone therapy: importance of timing of treatment and type of estrogen. *Cardiovasc Res*. 2005;66(2):295-306.
26. Brzezinski A, Danenberg HD. Estrogen, progesterone, and cardiovascular health: when shall we complete the puzzle? *Menopause*. 2005;12(5):488-91.
27. Ostrzenski A, Ostrzenska KM. WHI clinical trial revisit: imprecise scientific methodology disqualifies the study's outcomes. *Am J Obstet Gynecol*. 2005;193(5):1599-604; discussion 1605-6.
28. Ruggiero RJ, Likis FE. Estrogen: physiology, pharmacology, and formulations for replacement therapy. *J Midwifery Womens Health*. 2002;47(3):130-8.
29. Berrodin TJ, Chang KC, Komm BS, Freedman LP, Nagpal S. Differential biochemical and cellular actions of Premarin estrogens: distinct pharmacology of bazedoxifene-conjugated estrogens combination. *Mol Endocrinol*. 2009;23(1):74-85.
30. Rosenfeld CR, Killam AP, Battaglia FC, Makowski EL, Meschia G. Effect of estradiol-17, on the magnitude and distribution of uterine blood flow in nonpregnant, oophorectomized ewes. *Pediatr Res*. 1973;7(3):139-48.
31. Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med*. 1999;340(23):1801-11.
32. Bhalla RC, Toth KF, Bhatti RA, Thompson LP, Sharma RV. Estrogen reduces proliferation and agonist-induced calcium increase in coronary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol*. 1997;272(4 Pt 2):H1996-2003.
33. Morales DE, McGowan KA, Grant DS, Maheshwari S, Bhartiya D, Cid MC, et al. Estrogen promotes angiogenic activity in human umbilical vein endothelial cells in vitro and in a murine model. *Circulation*. 1995;91(3):755-63.
34. Krasinski K, Spyridopoulos I, Asahara T, van der Zee R, Isner JM, Losordo DW. Estradiol accelerates functional endothelial recovery after arterial injury. *Circulation*. 1997;95(7):1768-72.
35. Spyridopoulos I, Sullivan AB, Kearney 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.
36. Nathan L, Pervin S, Singh R, Rosenfeld M, Chaudhuri G. Estradiol inhibits leukocyte adhesion and transendothelial migration in rabbits in vivo : possible mechanisms for gender differences in atherosclerosis. *Circ Res*. 1999;85(4):377-85.

37. Caulin-Glaser T, Watson CA, Pardi R, Bender JR. Effects of 17beta-estradiol on cytokine-induced endothelial cell adhesion molecule expression. *J Clin Invest.* 1996;98(1):36-42.
38. 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.
39. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(12):5925-30.
40. Karas RH, Patterson BL, Mendelsohn ME. Human vascular smooth muscle cells contain functional estrogen receptor. *Circulation.* 1994;89(5):1943-50.
41. Register TC, Adams MR. Coronary artery and cultured aortic smooth muscle cells express mRNA for both the classical estrogen receptor and the newly described estrogen receptor beta. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1998;64(3-4):187-91.
42. Andersson C, Lydrup ML, Ferno M, Idvall I, Gustafsson J, Nilsson BO. Immunocytochemical demonstration of oestrogen receptor beta in blood vessels of the female rat. *J Endocrinol.* 2001;169(2):241-7.
43. Lin AL, Shain SA. Estrogen-mediated cytoplasmic and nuclear distribution of rat cardiovascular estrogen receptors. *Arteriosclerosis.* 1985;5(6):668-77.
44. Toran-Allerand CD, Guan X, MacLusky NJ, Horvath TL, Diano S, Singh M, et al. ER-X: a novel, plasma membrane-associated, putative estrogen receptor that is regulated during development and after ischemic brain injury. *J Neurosci.* 2002;22(19):8391-401.
45. 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.
46. 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.* 1995;273(3):199-208.
47. Koh KK, Cardillo C, Bui MN, Hathaway L, Csako G, Waclawiw MA, et al. Vascular effects of estrogen and cholesterol-lowering therapies in hypercholesterolemic postmenopausal women. *Circulation.* 1999;99(3):354-60.
48. Espeland MA, Hogan PE, Fineberg SE, Howard G, Schrott H, Waclawiw MA, et al. Effect of postmenopausal hormone therapy on glucose and insulin concentrations. PEPI Investigators. Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions. *Diabetes Care.* 1998;21(10):1589-95.

49. Evans EM, Van Pelt RE, Binder EF, Williams DB, Ehsani AA, Kohrt WM. Effects of HRT and exercise training on insulin action, glucose tolerance, and body composition in older women. *J Appl Physiol*. 2001;90(6):2033-40.
50. Jensen LB, Vestergaard P, Hermann AP, Gram J, Eiken P, Abrahamsen B, et al. Hormone replacement therapy dissociates fat mass and bone mass, and tends to reduce weight gain in early postmenopausal women: a randomized controlled 5-year clinical trial of the Danish Osteoporosis Prevention Study. *J Bone Miner Res*. 2003;18(2):333-42.
51. Paech K, Webb P, Kuiper GG, Nilsson S, Gustafsson J, Kushner PJ, et al. Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science*. 1997;277(5331):1508-10.
52. Matthews J, Gustafsson JA. Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol Interv*. 2003;3(5):281-92.
53. Simoncini T, Genazzani AR. Direct vascular effects of estrogens and selective estrogen receptor modulators. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2000;12(3):181-7.
54. MacRitchie AN, Jun SS, Chen Z, German Z, Yuhanna IS, Sherman TS, et al. Estrogen upregulates endothelial nitric oxide synthase gene expression in fetal pulmonary artery endothelium. *Circ Res*. 1997;81(3):355-62.
55. Rubanyi GM, Freay AD, Kauser K, Sukovich D, Burton G, Lubahn DB, 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*. 1997;99(10):2429-37.
56. 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.
57. Stewart KG, Zhang Y, Davidge ST. Estrogen decreases prostaglandin H synthase products from endothelial cells. *J Soc Gynecol Investig*. 1999;6(6):322-7.
58. 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*. 1998;251(1):17-21.
59. Farhat MY, Abi-Younes S, Ramwell PW. Non-genomic effects of estrogen and the vessel wall. *Biochem Pharmacol*. 1996;51(5):571-6.
60. Prossnitz ER, Maggiolini M. Mechanisms of estrogen signaling and gene expression via GPR30. *Mol Cell Endocrinol*. 2009;308(1-2):32-8.
61. Chen Z, Yuhanna IS, Galcheva-Gargova Z, Karas RH, Mendelsohn ME, Shaul PW. Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J Clin Invest*. 1999;103(3):401-6.

62. Chen DB, Bird IM, Zheng J, Magness RR. Membrane estrogen receptor-dependent extracellular signal-regulated kinase pathway mediates acute activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen in uterine artery endothelial cells. *Endocrinology*. 2004;145(1):113-25.
63. Haynes MP, Sinha D, Russell KS, Collinge M, Fulton D, Morales-Ruiz M, et al. Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells. *Circ Res*. 2000;87(8):677-82.
64. Hisamoto K, Ohmichi M, Kurachi H, Hayakawa J, Kanda Y, Nishio Y, et al. Estrogen induces the Akt-dependent activation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Biol Chem*. 2001;276(5):3459-67.
65. Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, Ley K, Chin WW, Liao JK. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature*. 2000;407(6803):538-41.
66. 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.
67. Yu X, Ma H, Barman SA, Liu AT, Sellers M, Stallone JN, et al. Activation of G protein-coupled estrogen receptor induces endothelium-independent relaxation of coronary artery smooth muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2011;301(5):E882-8.
68. Haas E, Bhattacharya I, Brailoiu E, Damjanovic M, Brailoiu GC, Gao X, et al. Regulatory role of G protein-coupled estrogen receptor for vascular function and obesity. *Circ Res*. 2009;104(3):288-91.
69. Traupe T, D'Uscio LV, Muentner K, Morawietz H, Vetter W, Barton M. Effects of obesity on endothelium-dependent reactivity during acute nitric oxide synthase inhibition: modulatory role of endothelin. *Clin Sci (Lond)*. 2002;103 Suppl 48:13S-15S.
70. Crews JK, Khalil RA. Antagonistic effects of 17 beta-estradiol, progesterone, and testosterone on Ca²⁺ entry mechanisms of coronary vasoconstriction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19(4):1034-40.
71. Prakash YS, Togaibayeva AA, Kannan MS, Miller VM, Fitzpatrick LA, Sieck GC. Estrogen increases Ca²⁺ efflux from female porcine coronary arterial smooth muscle. *Am J Physiol*. 1999;276(3 Pt 2):H926-34.
72. Han SZ, Karaki H, Ouchi Y, Akishita M, Orimo H. 17 beta-Estradiol inhibits Ca²⁺ influx and Ca²⁺ release induced by thromboxane A₂ in porcine coronary artery. *Circulation*. 1995;91(10):2619-26.
73. Kitazawa T, Hamada E, Kitazawa K, Gaznabi AK. Non-genomic mechanism of 17 beta-oestradiol-induced inhibition of contraction in mammalian vascular smooth muscle. *J Physiol*. 1997;499 (Pt 2):497-511.

74. White RE, Darkow DJ, Lang JL. Estrogen relaxes coronary arteries by opening BKCa channels through a cGMP-dependent mechanism. *Circ Res.* 1995;77(5):936-42.
75. Naderali EK, Walker AB, Doyle P, Williams G. Comparable vasorelaxant effects of 17alpha- and 17beta-oestradiol on rat mesenteric resistance arteries: an action independent of the oestrogen receptor. *Clin Sci (Lond).* 1999;97(6):649-55.
76. Teoh H, Quan A, Leung SW, Man RY. Vascular effects of estrone and diethylstilbestrol in porcine coronary arteries. *Menopause.* 2009;16(1):104-9.
77. Barbagallo M, Dominguez LJ, Licata G, Shan J, Bing L, Karpinski E, et al. Vascular Effects of Progesterone : Role of Cellular Calcium Regulation. *Hypertension.* 2001;37(1):142-147.
78. Minshall RD, Pavcnik D, Browne DL, Hermsmeyer K. Nongenomic vasodilator action of progesterone on primate coronary arteries. *J Appl Physiol.* 2002;92(2):701-8.
79. Montgomery S, Shaw L, Pantelides N, Taggart M, Austin C. Acute effects of oestrogen receptor subtype-specific agonists on vascular contractility. *Br J Pharmacol.* 2003;139(7):1249-53.
80. Nandur R, Kumar K, Villablanca AC. Cardiovascular actions of selective estrogen receptor modulators and phytoestrogens. *Prev Cardiol.* 2004;7(2):73-9.
81. Tham DM, Gardner CD, Haskell WL. Clinical review 97: Potential health benefits of dietary phytoestrogens: a review of the clinical, epidemiological, and mechanistic evidence. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(7):2223-35.
82. Ososki AL, Kennelly EJ. Phytoestrogens: a review of the present state of research. *Phytother Res.* 2003;17(8):845-69.
83. Mulvany MJ, Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res.* 1977;41(1):19-26.
84. Dantas AP, Scivoletto R, Fortes ZB, Nigro D, Carvalho MH. Influence of female sex hormones on endothelium-derived vasoconstrictor prostanoid generation in microvessels of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1999;34(4 Pt 2):914-9.
85. Silva-Antonialli MM, Tostes RC, Fernandes L, Fior-Chadi DR, Akamine EH, Carvalho MH, et al. A lower ratio of AT1/AT2 receptors of angiotensin II is found in female than in male spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res.* 2004;62(3):587-93.
86. Filgueira FP, Ceravolo GS, Lobato NS, Fortes ZB, Tostes RC, Dantas APV, et al. Conjugated Equine Estrogen Improves Vascular Reactivity and Metabolic Parameters in Ovariectomized SHR. *Hypertension.* 2009;54(4):E79-E79.

87. Liu ML, Xu X, Rang WQ, Li YJ, Song HP. Influence of ovariectomy and 17beta-estradiol treatment on insulin sensitivity, lipid metabolism and post-ischemic cardiac function. *Int J Cardiol.* 2004;97(3):485-93.
88. Giachini FR, Lima VV, Filgueira FP, Dorrance AM, Carvalho MH, Fortes ZB, et al. STIM1/Orai1 contributes to sex differences in vascular responses to calcium in spontaneously hypertensive rats. *Clin Sci (Lond).* 2012;122(5):215-26.
89. Tchernof A, Calles-Escandon J, Sites CK, Poehlman ET. Menopause, central body fatness, and insulin resistance: effects of hormone-replacement therapy. *Coron Artery Dis.* 1998;9(8):503-11.
90. Browne M, Connolly C, Docherty JR. Vascular actions of 17beta-oestradiol in rat aorta and mesenteric artery. *J Auton Pharmacol.* 1999;19(5):291-9.
91. Keung W, Vanhoutte PM, Man RY. Nongenomic responses to 17beta-estradiol in male rat mesenteric arteries abolish intrinsic gender differences in vascular responses. *Br J Pharmacol.* 2005;146(8):1148-55.
92. Tsang SY, Yao X, Chan HY, Wong CM, Chen ZY, Au CL, et al. Contribution of K⁺ channels to relaxation induced by 17beta-estradiol but not by progesterone in isolated rat mesenteric artery rings. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2003;41(1):4-13.
93. Mark CJ, Tatchum-Talom R, Martin DS, Eyster KM. Effects of estrogens and selective estrogen receptor modulators on vascular reactivity in the perfused mesenteric vascular bed. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007;293(5):R1969-75.
94. Shaw L, Taggart MJ, Austin C. Mechanisms of 17 beta-oestradiol induced vasodilatation in isolated pressurized rat small arteries. *Br J Pharmacol.* 2000;129(3):555-65.
95. Teoh H, Quan A, Leung SW, Man RY. Differential effects of 17beta-estradiol and testosterone on the contractile responses of porcine coronary arteries. *Br J Pharmacol.* 2000;129(7):1301-8.
96. Tep-areenan P, Kendall DA, Randall MD. Mechanisms of vasorelaxation to 17beta-oestradiol in rat arteries. *Eur J Pharmacol.* 2003;476(1-2):139-49.
97. Bhavnani BR. Estrogens and menopause: pharmacology of conjugated equine estrogens and their potential role in the prevention of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003;85(2-5):473-82.
98. Wu S, Ruan Y, Zhu X, Lai W. Estrogen receptors and the activity of nitric oxide synthase in the artery of female rats receiving hormone replacement therapy. *Horm Res.* 2000;53(3):144-7.

99. Ihionkhan CE, Chambliss KL, Gibson LL, Hahner LD, Mendelsohn ME, Shaul PW. Estrogen causes dynamic alterations in endothelial estrogen receptor expression. *Circ Res.* 2002;91(9):814-20.
100. Shaw L, Taggart M, Austin C. Effects of the oestrous cycle and gender on acute vasodilatory responses of isolated pressurized rat mesenteric arteries to 17 beta-oestradiol. *Br J Pharmacol.* 2001;132(5):1055-62.
101. Bolego C, Cignarella A, Sanvito P, Pelosi V, Pellegatta F, Puglisi L, et al. The acute estrogenic dilation of rat aorta is mediated solely by selective estrogen receptor-alpha agonists and is abolished by estrogen deprivation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;313(3):1203-8.
102. Lindsey SH, Carver KA, Prossnitz ER, Chappell MC. Vasodilation in response to the GPR30 agonist G-1 is not different from estradiol in the mRen2.Lewis female rat. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2011;57(5):598-603.
103. Ding Q, Gros R, Limbird LE, Chorazyczewski J, Feldman RD. Estradiol-mediated ERK phosphorylation and apoptosis in vascular smooth muscle cells requires GPR 30. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009;297(5):C1178-87.
104. Filardo EJ, Quinn JA, Frackelton AR, Jr., Bland KI. Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Mol Endocrinol.* 2002;16(1):70-84.
105. Hsieh YC, Yu HP, Frink M, Suzuki T, Choudhry MA, Schwacha MG, et al. G protein-coupled receptor 30-dependent protein kinase A pathway is critical in nongenomic effects of estrogen in attenuating liver injury after trauma-hemorrhage. *Am J Pathol.* 2007;170(4):1210-8.
106. Shan J, Resnick LM, Liu QY, Wu XC, Barbagallo M, Pang PK. Vascular effects of 17 beta-estradiol in male Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol.* 1994;266(3 Pt 2):H967-73.
107. Jiang CW, Sarrel PM, Lindsay DC, Poole-Wilson PA, Collins P. Endothelium-independent relaxation of rabbit coronary artery by 17 beta-oestradiol in vitro. *Br J Pharmacol.* 1991;104(4):1033-7.
108. Bell DR, Rensberger HJ, Koritnik DR, Koshy A. Estrogen pretreatment directly potentiates endothelium-dependent vasorelaxation of porcine coronary arteries. *Am J Physiol.* 1995;268(1 Pt 2):H377-83.
109. Mugge A, Riedel M, Barton M, Kuhn M, Lichtlen PR. Endothelium independent relaxation of human coronary arteries by 17 beta-oestradiol in vitro. *Cardiovasc Res.* 1993;27(11):1939-42.
110. Garcia-Duran M, de Frutos T, Diaz-Recasens J, Garcia-Galvez G, Jimenez A, Monton M, et al. Estrogen stimulates neuronal nitric oxide synthase protein expression in human neutrophils. *Circ Res.* 1999;85(11):1020-6.

111. Han G, Ma H, Chintala R, Miyake K, Fulton DJ, Barman SA, et al. Nongenomic, endothelium-independent effects of estrogen on human coronary smooth muscle are mediated by type I (neuronal) NOS and PI3-kinase-Akt signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293(1):H314-21.
112. Lekontseva O, Chakrabarti S, Jiang Y, Cheung CC, Davidge ST. Role of neuronal nitric-oxide synthase in estrogen-induced relaxation in rat resistance arteries. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011;339(2):367-75.
113. White RE, Han G, Maunz M, Dimitropoulou C, El-Mowafy AM, Barlow RS, et al. Endothelium-independent effect of estrogen on Ca(2+)-activated K(+) channels in human coronary artery smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*. 2002;53(3):650-61.
114. Wingrove 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(1-2):33-7.
115. Hayashi T, Yamada K, Esaki T, Kuzuya M, Satake S, Ishikawa T, et al. Estrogen increases endothelial nitric oxide by a receptor-mediated system. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;214(3):847-55.
116. Dantas AP, Tostes RC, Fortes ZB, Costa SG, Nigro D, Carvalho MH. In vivo evidence for antioxidant potential of estrogen in microvessels of female spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2002;39(2 Pt 2):405-11.
117. Miller C. An overview of the potassium channel family. *Genome Biol*. 2000;1(4):REVIEWS0004.
118. Harder DR, Coulson PB. Estrogen receptors and effects of estrogen on membrane electrical properties of coronary vascular smooth muscle. *J Cell Physiol*. 1979;100(2):375-82.
119. Rosenfeld CR, White RE, Roy T, Cox BE. Calcium-activated potassium channels and nitric oxide coregulate estrogen-induced vasodilation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;279(1):H319-28.
120. Ratz PH, Berg KM, Urban NH, Miner AS. Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium-sensitizing stimulus. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005;288(4):C769-83.
121. Sakamoto K, Hori M, Izumi M, Oka T, Kohama K, Ozaki H, et al. Inhibition of high K⁺-induced contraction by the ROCKs inhibitor Y-27632 in vascular smooth muscle: possible involvement of ROCKs in a signal transduction pathway. *J Pharmacol Sci*. 2003;92(1):56-69.
122. Ratz PH, Miner AS. Role of protein kinase C ζ and calcium entry in KCl-induced vascular smooth muscle calcium sensitization and feedback control of cellular calcium levels. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009;328(2):399-408.

123. Tosun M, Paul RJ, Rapoport RM. Role of extracellular Ca⁺⁺ influx via L-type and non-L-type Ca⁺⁺ channels in thromboxane A₂ receptor-mediated contraction in rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998;284(3):921-8.
124. Brown AM, Kunze DL, Yatani A. The agonist effect of dihydropyridines on Ca channels. *Nature*. 1984;311(5986):570-2.
125. Gonzales RJ, Kanagy NL. Endothelium-Independent Relaxation of Vascular Smooth Muscle by 17beta-Estradiol. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 1999;4(4):227-234.
126. Salom JB, Burguete MC, Perez-Asensio FJ, Centeno JM, Torregrosa G, Alborch E. Acute relaxant effects of 17-beta-estradiol through non-genomic mechanisms in rabbit carotid artery. *Steroids*. 2002;67(5):339-46.