



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**EFEITOS VASCULARES PROMOVIDOS PELA ESTRONA EM RATAS
WISTAR OVARIECTOMIZADAS**

THIAGO SARDINHA DE OLIVEIRA

**GOIÂNIA-GO
2018**

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☐ Dissertação ☒ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

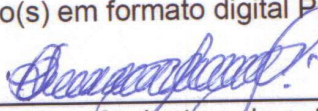
Nome completo do autor: Thiago Sardinha de Oliveira

Título do trabalho: Efeitos Vasculares Promovidos pela Estrona em Ratas Wistar Ovariectomizadas

3. Informações de acesso ao documento:

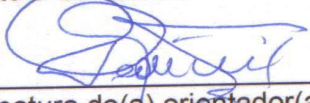
Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.



Assinatura do autor²

Ciente e de acordo:



Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 31 / 08 / 2018

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada.

THIAGO SARDINHA DE OLIVEIRA

**EFEITOS VASCULARES PROMOVIDOS PELA ESTRONA EM RATAS
WISTAR OVARIECTOMIZADAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas

Área de Concentração: Farmacologia e Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Paulo César Ghedini
Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Paranaíba Filgueira

**GOIÂNIA-GO
2018**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Sardinha de Oliveira, Thiago
Efeitos Vasculares Promovidos pela Estrona em Ratas Wistar
Ovariectomizadas [manuscrito] / Thiago Sardinha de Oliveira. - 2018.
117 f.

Orientador: Prof. Dr. Paulo César Ghedini; co-orientador Dr.
Fernando Paranaíba Filgueira.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de
Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Biologia,
Goiânia, 2018.

Bibliografia.

Inclui siglas, abreviaturas, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. estrona. 2. ovariectomia. 3. disfunção endotelial. 4. pressão
arterial. 5. reatividade vascular. I. Ghedini, Paulo César, orient. II.
Título.

CDU 615



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE TESE DE Nº 66

1
2 Aos trinta e um dias do mês de agosto do ano de dois mil e dezoito, às catorze
3 horas, no Anfiteatro do Instituto de Ciências Biológicas II da Universidade
4 Federal de Goiás, reuniram-se os componentes da banca examinadora: Prof.
5 Dr. Paulo César Ghedini, Prof. Dr. Fernando Paranaíba Filgueira, Profa. Dra.
6 Núbia de Souza Lobato, Prof. Dr. Rafael Menezes Costa, Profa. Dra. Fernanda
7 Cristina Casagrande Giachini Vitorino e Profa. Dra. Rita de Cassia Aleixo Tostes
8 Passaglia para, em sessão pública presidida pelo primeiro examinador citado,
9 procederem à avaliação da defesa de tese intitulada "Efeitos Vasculares
10 Promovidos pela Estrona em Ratas Wistar Ovariectomizadas", em nível de
11 doutorado, área de concentração em Farmacologia e Fisiologia, de autoria de
12 **Thiago Sardinha de Oliveira**, discente do Programa de Pós-Graduação em
13 Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo
14 presidente, que fez a apresentação formal dos membros da banca. A palavra, a
15 seguir, foi concedida ao autor da tese que em cerca de 30 minutos
16 procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada
17 membro da banca arguiu o examinado, tendo-se adotado o sistema de diálogo
18 sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da tese.
19 Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº1491 de 2017 do Conselho de
20 Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa
21 de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, a tese foi aprovada,
22 considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção
23 do título de Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Goiás.
24 A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega da versão definitiva da tese
25 na Secretaria do programa, com as devidas correções sugeridas pela banca
26 examinadora, no prazo de trinta dias a contar da data da defesa. Cumpridas as



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

27 formalidades de pauta, às 18 horas e 30 minutos, encerrou-se a sessão
28 de defesa de tese e, para constar, eu, Renato César Rodrigues, Assistente em
29 Administração da Universidade Federal de Goiás, lavrei a presente ata que,
30 após lida e aprovada, será assinada pelos membros da banca examinadora em
31 três vias de igual teor.

32

33 **Prof. Dr. Paulo César Ghedini**

34 Presidente da Banca

35 Universidade Federal de Goiás

36

37 **Prof. Dr. Fernando Paranaíba Filgueira**

38 Universidade Federal de Jataí

39

40 **Profa. Dra. Núbia de Souza Lobato**

41 Universidade Federal de Jataí

42

43 **Prof. Dr. Rafael Menezes Costa**

44 Universidade Federal de Jataí

45

46 **Prof. Dr. Fernanda Regina Casagrande Giachini Vitorino**

47 Universidade Federal do Mato Grosso

48

49 **Profa. Dra. Rita de Cassia Aleixo Tostes Passaglia**

50 Universidade de São Paulo

THIAGO SARDINHA DE OLIVEIRA

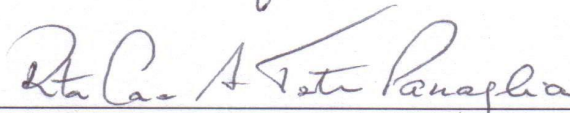
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Paulo César Ghedini
Universidade Federal de Goiás



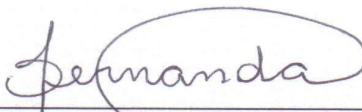
Prof. Dr. Fernando Paranaíba Filgueira
Universidade Federal de Jataí



Profª. Dra. Rita de Cassia Aleixo Tostes Passaglia
Universidade de São Paulo



Profª. Dra. Núbia de Souza Lobato
Universidade Federal de Jataí



Profª. Dra. Fernanda Regina Casagrande Giachini Vitorino
Universidade Federal do Mato Grosso



Prof. Dr. Rafael Menezes da Costa
Universidade Federal de Jataí

Aprovada em 31/08/2018

A verdadeira coragem é ir atrás de seu sonho mesmo
quando todos dizem que ele é impossível.

Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que
ensina.

Cora Coralina

Dedico este trabalho a minha querida avó Ana Alves Sardinha (*in memoriam*), que desde meu primeiro ano de vida, muitas vezes a deixou faltar para que eu pudesse chegar aonde cheguei. Foi apenas questão de semanas para que pudesse estar comigo comemorando o alcance desta grande conquista, mas me alegro nas recordações de como era feliz por tudo que já havíamos alcançado. Amo-te.

À minha esposa Lanussy pelo companheirismo, amor e dedicação durante toda esta fase. Sempre tivemos em mente, desde a graduação, que o caminho seria longo, mas a esperança de que o amanhã seria melhor nos fez com que continuássemos, sou grato por ter tornado meus objetivos como seus e acredito que tudo daria certo.

Aos meus pais Sandra e Reinaldo, que através de todo carinho e amor me incentivaram mesmo que distantes.

Aos meus avós José, Josimiro (*in memoriam*) e Leontina, pelo exemplo de perseverança, com vocês eu aprendi a vencer obstáculos.

Aos meus irmãos Maryanna, Lucas e minha sobrinha Ana Luísa, meus grandes amigos e luz do meu caminho, que compartilham comigo grandes momentos de alegria e de dificuldade, aprendendo que juntos podemos alcançar nossos sonhos desde que sejamos trabalhadores e persistentes.

À Domisália pela amizade e todo apoio nesta jornada, aprendi com você que simples atitudes tornam o dia-a-dia mais agradável.

Agradecimento especial,

Ao Dr. Paulo César Ghedini e ao Dr. Fernando Paranaíba Filgueira pela orientação, pelas valiosas oportunidades, pelos ensinamentos, pelas críticas que contribuíram e contribuirão em minha formação científica e pelo exemplo de profissionalismo, comprometimento e ética. A vocês minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por iluminar minha vida e ajudar a aceitar situações aparentemente inaceitáveis e permitir que este trabalho fosse realizado, e que ao longo da minha vida, não somente nestes anos, foi o maior mestre que eu poderia conhecer.

Aos membros da banca avaliadora deste trabalho pelo aceite na participação, pelas observações e contribuições dadas.

À prof^a. Dra Rita de Cássia Aleixo Passaglia que gentilmente aceitou fazer colaboração com nosso grupo de pesquisa, contribuindo para a realização deste estudo.

Ao amigo Rafael Menezes por toda dedicação, apoio e suporte na colaboração com os experimentos de Western Blotting e que em todos os momentos que solicitei, esteve sempre presente e disposto a colaborar com extrema competência e generosidade.

À prof^a. Dra Fernanda Cristina Alcântara dos Santos e a todos os colegas do laboratório de histofisiologia pela estrutura e auxílios prestados nos protocolos experimentais da histologia que muito colaboraram neste estudo.

À prof^a. Dra Núbia de Souza Lobato por todo auxílio e suporte prestado ao nosso grupo com suas pertinentes discussões e empenho para o sucesso já obtido em nossos trabalhos.

À querida amiga Lais Moraes de Oliveira pela parceria desde o primeiro momento no laboratório. Você foi colaboradora fundamental em minha formação, me auxiliou nos primeiros passos da pesquisa, durante essa longa jornada que pacientemente conseguimos enfrentar, e afirmo, com sucesso! Guardo sua amizade para toda vida.

Aos amigos do laboratório: Christielly, Dionelis, Douglas, Francienne, Gisele, Hericles, Hiasmin, Hiorrana, Kettily, Lívio, Rafaella, Rodrigo, Stephanie e Vanessa. Todos vocês iniciaram como colegas, hoje são meus amigos, companheiros de trabalho, irmãos que contribuíram na minha formação através de discussões científicas e que nos momentos de descontração tornaram a convivência no

laboratório mais divertida. Vocês sem dúvida vão continuar presentes em minha vida.

Aos colegas da pós-graduação e aos amigos do laboratório que já se foram. Tenho muito orgulho em ver como amadurecemos juntos, vocês sempre foram prestativos e prontos a atender nos momentos que precisei, sendo parceiros fundamentais que estarão para sempre em meu coração.

Aos servidores dos departamentos de farmacologia (DFar) e fisiologia (DCiF) do Instituto de Ciências Biológicas da UFG, em especial às técnicas Lécia (DFar) e Thatiane (biotério DCiF) pela atenção, apoio e por todo suporte necessário à execução deste trabalho.

Aos servidores do biotério central do instituto de ciências biológicas da UFG que sempre prestativos e atenciosos forneceram todo suporte com os animais de fundamental importância ao nosso estudo.

À Universidade Federal de Goiás e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas por oferecer um curso conceituado que cresce mais a cada dia. Minha sincera admiração ao coordenador prof. Dr. Paulo César Ghedini que trabalha incansavelmente para o sucesso deste programa.

A todos os professores, desde meus alfabetizadores até os professores da pós-graduação, pelos conhecimentos transmitidos, esforço e exemplo de competência. Vocês não proporcionaram apenas conhecimento racional, mas também minha formação moral e ética, que nos devidos momentos não dedicaram somente a me ensinar, mas principalmente por me fazer aprender. Um reconhecimento especial ao mestre Edson Negreiros pelo despertar do amor à Farmacologia ainda durante a graduação, tornando-me mais motivado por essa área e apoiando nos devidos momentos. A vocês, mestres, professores dedicados, aos quais não consigo nominar, pois a lista é muito grande, meu eterno agradecimento.

À secretaria do programa de pós-graduação em ciências biológicas na pessoa do secretário Renato pela atenção incomparável, amizade e ajuda nos assuntos burocráticos durante a pós-graduação.

Às meninas da limpeza por suas contribuições em nosso ambiente de trabalho, tornando limpo e agradável, processo fundamental para o bom andamento de qualquer pesquisa.

A todos os amigos, familiares e pessoas que direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho.

À coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

*Quem caminha sozinho pode até
chegar mais rápido, mas aquele que vai
acompanhado, com certeza vai mais longe.*

Clarice Lispector

Muito Obrigado a Todos!

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Siglas	XVI
Lista de Figuras	XIX
Lista de Tabelas	XXI
Resumo	XXIII
Abstract	XXIV
1. Introdução	1
1.1. Efeitos Vasculares dos Estrogênios	2
1.2. Receptores de Estrogênios	5
1.3. Deficiência Estrogênica e Disfunção Endotelial	6
1.4. Estrogênios como Antioxidantes	8
1.5. Terapia Hormonal – TH	9
1.6. Estrona	10
2. Justificativa	11
3. Objetivos	12
4. Materiais e métodos	13
4.1. Animais	13
4.2. Drogas e reagentes	13
4.3. Grupos experimentais	13
4.4. Protocolos experimentais	14
4.5. Ovariectomia	14
4.6. Acompanhamento de massa	14
4.7. Tratamentos	15
4.8. Registro de pressão arterial	15
4.9. Reatividade vascular	16
4.10. Protocolos de estudo da reatividade vascular	16
4.11 Massa do útero, coração e gordura retroperitoneal	17
4.12 Dosagem de colesterol total e LDL	17
4.13 Dosagem hormonal	18
4.14 Western blotting	18
4.14.1 Extração de proteínas	18
4.14.2 Immunoblotting	19
4.15 Atividades enzimáticas	20
4.15.1 Atividade da CAT	20
4.15.2 Atividade da SOD	20
4.16 Lucigenina	21
4.17 Histologia	21

4.17.1 Morfometria	21
4.17.2 Colágeno	22
4.17.3 Elastina	22
4.18 Análise estatística	23
5. Resultados	24
5.1 Influência do tratamento hormonal sobre o peso dos animais	24
5.2 Pressão arterial sistólica	26
5.3 Pressão arterial diastólica	28
5.4 Pressão arterial média	30
5.5 Frequência cardíaca	32
5.6 Massa uterina	34
5.7 Massa do coração	36
5.8 Gordura retroperitoneal	38
5.9 Níveis séricos de colesterol total e LDL	40
5.10 Níveis séricos de 17 β -estradiol	42
5.11 Reatividade à fenilefrina em preparações com endotélio	44
5.12 Reatividade à fenilefrina em preparações sem endotélio	46
5.13 Relaxamento induzido por nitroprussiato de sódio	48
5.14 Relaxamento induzido por acetilcolina	50
5.15 Resposta vasodilatadora da acetilcolina na presença da CAT	52
5.16 Resposta vasodilatadora da acetilcolina na presença da SOD	54
5.17 Resposta vasodilatadora da acetilcolina na presença do inibidor da NADPH oxidase	56
5.18 Análise da expressão proteica da enzima CAT	58
5.19 Análise da expressão proteica das enzimas Cu/Zn-SOD e Mn-SOD	59
5.20 Análise da expressão proteica da enzima NOX-1	60
5.21 Análise da expressão proteica da enzima gp91phox (NOX-2)	61
5.22 Análise da expressão proteica da enzima NOX-4	62
5.23 Atividade da CAT	63
5.24 Atividade da SOD	64
5.25 Lucigenina	65
5.26 Análise Morfométrica	66
5.27 Colágeno	67
5.28 Elastina	68
6. Discussão	69
7. Conclusão	74
9. Referências bibliográficas	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Adenilato ciclase
ACh	Acetilcolina
AMPC	Monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA	Análise de variância
ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	Albumina sérica bovina (do inglês <i>Bovine serum albumin</i>)
Ca ²⁺	Cálcio
CaM	Calmodulina
CAT	Catalase
CCE	Curva concentração efeito
CEE	Composto estrogênico equino
COX	Ciclooxigenase
DAG	Diacylglicerol
DCV	Doenças Cardiovasculares
E1	Estrona
E2	17 β -estradiol
EDHF	Fator Hiperpolarizante derivado do endotélio (do inglês <i>endothelium-derived hyperpolarizing factor</i>)
eNOS	Sintase do óxido nítrico endotelial
Epm	Erro padrão da média
ER	Receptor de estrogênio
ERE	Elemento responsivo ao estrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ER α	Receptor de estrogênio subtipo alfa
ER β	Receptor de estrogênio subtipo beta

GCs	Guanilato ciclase solúvel
GMPc	Monofosfato cíclico de 3',5' guanosina
GPR30	Receptor de estrogênios acoplado a proteína G
GSH	Glutationa
GTP	Trifosfato de adenosina
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HERS	<i>Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study</i>
HSP	Heat shock protein
IP ₃	Inositol 1,4,5, trifosfato
L-arg	L-arginina
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NO	Óxido nítrico
NPS	Nitroprussiato de sódio
O ⁻	Ânion superóxido
ONOO ⁻	Peroxinitrito
OVX	Ovariectomia
PA	Pressão arterial
PAM	Pressão arterial média
pEC ₅₀	-log da concentração que promove 50% do efeito
PGI ₂	Prostaciclina
Phe	Fenilefrina
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PKA	Proteína quinase A
PLC	Fosfolipase C
R _{max}	Resposta máxima

SOD	Superóxido dismutase
TBS	Tris-Buffered Saline
TRH	Terapia de reposição hormonal
Trx	Tiorredoxina
TXA ₂	Tromboxano A ₂
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
WHI	<i>Women's Health Initiative</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismo de vasodilatação na célula endotelial mediada pelos estrogênios

Figura 2: Influência do tratamento hormonal sobre o peso dos animais

Figura 3: Pressão arterial sistólica

Figura 4: Pressão arterial diastólica

Figura 5: Pressão arterial média

Figura 6: Frequência cardíaca

Figura 7: Peso uterino

Figura 8: Peso do coração

Figura 9: Gordura retroperitoneal

Figura 10: Níveis séricos de colesterol total e LDL

Figura 11: Níveis séricos de 17β -estradiol

Figura 12: Reatividade à fenilefrina em preparações de aorta torácica com endotélio vascular

Figura 13: Reatividade à fenilefrina em preparações de aorta torácica sem endotélio vascular

Figura 14: Relaxamento induzido por nitroprussiato de sódio

Figura 15: Relaxamento induzido por acetilcolina em preparações de aorta torácica com endotélio vascular

Figura 16: Avaliação da resposta vasodilatadora à acetilcolina na presença da enzima CAT

Figura 17: Avaliação da resposta vasodilatadora à acetilcolina na presença da enzima SOD

Figura 18: Avaliação da resposta vasodilatadora à acetilcolina na presença do inibidor da NADPH oxidase

Figura 19: Análise da expressão proteica da enzima CAT

Figura 20: Análise da expressão proteica das enzimas Cu/Zn-SOD e Mn-SOD

Figura 21: Análise da expressão proteica da enzima NOX-1

Figura 22: Análise da expressão proteica da enzima gp91phox (NOX-2)

Figura 23: Análise da expressão proteica da enzima NOX-4

Figura 24: Atividade da CAT

Figura 25: Atividade da SOD

Figura 26: Estudo da geração de EROs na aorta - Lucigenina

Figura 27: Análise morfométrica

Figura 28: Colágeno

Figura 29: Elastina

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Peso inicial e final de ratas dos grupos Sham, OVX, E1 e E2

Tabela 2: Pressão arterial sistólica

Tabela 3: Pressão arterial diastólica

Tabela 4: Pressão arterial média

Tabela 5: Frequência cardíaca

Tabela 6: Peso uterino

Tabela 7: Peso do coração

Tabela 8: Peso da gordura retroperitoneal

Tabela 9: Níveis plasmáticos de colesterol total e LDL

Tabela 10: Níveis séricos de 17β -estradiol

Tabela 11: Valores de resposta máxima e sensibilidade das curvas concentração efeito para fenilefrina

Tabela 12: Valores de resposta máxima e sensibilidade das curvas concentração efeito para fenilefrina

Tabela 13: Valores de resposta máxima e sensibilidade das curvas concentração efeito para NPS

Tabela 14: Valores de resposta máxima e sensibilidade das curvas concentração efeito à ACh

Tabela 15: Valores de resposta máxima das curvas concentração efeito à ACh na ausência ou presença de CAT

Tabela 16: Valores de resposta máxima das curvas concentração efeito à ACh na ausência ou presença de SOD

Tabela 17: Valores de resposta máxima das curvas concentração efeito à ACh na ausência ou presença de apocinina

RESUMO

A estrona (E1), componente majoritário do Premarin® e estrogênio predominante na circulação feminina na pós-menopausa, não possui seus efeitos vasculares e mecanismos de ação completamente elucidados. Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos do tratamento com E1 em ratas Wistar ovariectomizadas (OVX) sobre a reatividade de anéis de aorta e pressão arterial. Para este estudo, ratas com 12 semanas de idade foram divididas em quatro grupos experimentais, Sham (ratas em estro fisiológico tratadas com veículo), OVX (ratas OVX tratadas com veículo), OVX + E1 (ratas OVX tratadas com 825µg/Kg de E1) e OVX + 17β-estradiol (E2) (ratas OVX tratadas com 15µg/Kg de E2). Os tratamentos foram iniciados após 8 semanas da cirurgia pela via subcutânea pelo período de 30 dias. Ao final do tratamento, foi realizada a medida de pressão arterial por pletismografia de cauda. Além disso, anéis de aorta foram isolados para avaliar resposta contrátil à fenilefrina (Phe), relaxamento à acetilcolina (ACh) ou ao nitroprussiato de sódio (NPS) por meio de curvas de concentração efeito cumulativas. Foi ainda avaliada a resposta à ACh em anéis incubados previamente com superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) ou apocinina (inibidor da NADPH-oxidase (NOX)). A expressão protéica da SOD, CAT, NOX 1, NOX 2 e NOX 4 foi quantificada por Western-blot. Foi realizado o acompanhamento do ganho de peso após o procedimento de ovariectomia nos grupos OVX ou Sham e, após a eutanásia, foi avaliado o peso da gordura retroperitoneal, útero e coração. O tratamento com E1 diminuiu o peso corporal e a gordura retroperitoneal, aumentou o peso uterino, normalizou os níveis de pressão arterial, o aumento da resposta contrátil à Phe e a resposta vasodilatadora dependente de endotélio à ACh. Os efeitos apresentados por este hormônio estão relacionados com mecanismos compensatórios na expressão e atividade de enzimas antioxidantes como SOD e CAT, além da redução na expressão da isoforma NOX 4. Além disso, a E1 reverteu o aumento do colesterol total e LDL observados nas ratas OVX. Os dados apresentados demonstram o papel benéfico da E1 frente ao estresse oxidativo na disfunção vascular, restabelecendo a função endotelial e os níveis fisiológicos da pressão arterial.

Palavras-chave: estrona; ovariectomia; disfunção endotelial; pressão arterial; reatividade vascular

ABSTRACT

Estrone (E1), the major component of Premarin® and predominant estrogen in postmenopausal women, does not have its vascular effects involving its vasodilatory mechanism of action completely elucidated. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effects of E1 treatment on the vascular reactivity of isolated aortic rings and blood pressure in ovariectomized Wistar rats (OVX). For this purpose, 12 week-old Wistar rats were divided into four experimental groups, Sham (physiological estrous rats treated with vehicle), OVX (OVX rats treated with vehicle), OVX + E1 (OVX rats treated with 825µg / kg of E1) and OVX + 17β-estradiol (E2) (OVX rats treated with 15µg / kg of E2). The treatments started after the 8 weeks of surgery through subcutaneous pathway for 30 days. At the end of treatment, blood pressure measurement by tail plethysmograph was performed. In addition, aortic rings were isolated to evaluate contractile response to phenylephrine (Phe), relaxation to acetylcholine (ACh) or sodium nitroprusside (NPS) by means of concentration curves. The response to ACh in rings previously incubated with superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) or apocynin (NADPH oxidase inhibitor) was also evaluated. The protein expression of SOD, CAT, NOX 1, NOX 2 and NOX 4 were quantified by Western blotting. Follow-up of the weight gain after the OVX or Sham procedure was also performed. After euthanasia, the weight of retroperitoneal fat, uterus and heart were evaluated. E1 treatment decreased body weight and retroperitoneal fat, increased uterine weight, and corrected both the increased blood pressure, and the decreased hyperreactivity to Phe vasoconstrictor agent and also increased endothelium-dependent vasodilatory response to ACh. The effects presented by this hormone are related to compensatory mechanisms in the activity of antioxidant enzymes such as SOD and catalase besides the reduction in the expression of the NADPH oxidase NOX 4 isoform. In addition, E1 reverses the increase in total and LDL cholesterol in the OVX group. Our study confirms the role of oxidative stress in endothelial dysfunction of OVX rats and further demonstrates that E1 reverses elevation of blood pressure and restores endothelial function in OVX rats.

Keywords: estrone; ovariectomy; endothelial dysfunction; blood pressure; vascular reactivity

1. INTRODUÇÃO

O risco do desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCVs) aumenta com a idade, mas em mulheres os sintomas se tornam mais acentuados após a menopausa. Neste período, há cessação da função ovariana e do ciclo menstrual e consequente deficiência dos níveis plasmáticos de estrogênios, período em que a terapia de reposição hormonal (TRH) se torna eficaz na prevenção e na diminuição da mortalidade por DCVs [1-3]. Entretanto, a TRH também está relacionada com o risco aumentado de acidente vascular cerebral e tromboembolismo venoso [4-6], levando a questionamentos sobre seus reais benefícios. Nesse contexto, dois grandes estudos randomizados contestaram os benefícios cardiovasculares da TRH com base em estudos observacionais: “*The Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study (HERS)*” e “*Women’s Health Initiative (WHI)*” [7, 8].

O HERS foi um ensaio clínico randomizado duplo cego iniciado na década de 90 e desenvolvido com o objetivo de testar a eficácia da TRH na prevenção secundária de doenças coronarianas cardíacas. Um grupo de 2.763 mulheres, na pós-menopausa, foi acompanhado por um período de 4,1 anos. No primeiro ano de estudo, os resultados indicaram que o tratamento com estrogênios equinos conjugados (CEE) em combinação com acetato de medroxiprogesterona não reduziu a incidência de DCV. Em contraste, este tratamento aumentou o risco de tromboembolismo e colelitíase [7] e, somente após o terceiro ano de estudo, é que foi demonstrado que o risco cardiovascular poderia ser diminuído em mulheres que faziam o uso da TRH [9]. Diferente da pesquisa estendida (HERS II) com um grupo não duplo cego de 2.321 mulheres acompanhadas por mais 2,7 anos, em que nenhuma diferença foi encontrada em relação ao risco de eventos cardiovasculares, com exceção para arritmia ventricular em que houve aumento no grupo tratado [10].

O WHI foi um estudo multicêntrico iniciado em 2002, randomizado e duplo cego, que avaliou o efeito protetor da TRH sobre a incidência de DCVs em um grupo de 27.347 mulheres. Dois grupos foram formados, mulheres na pós-menopausa natural e pós-menopausa induzida (histerectomia). As mulheres na pós menopausa natural receberam a TRH assim como no estudo HERS (CEE + medroxiprogesterona) e as mulheres na pós-menopausa induzida receberam somente CEE. Este estudo necessitou ser interrompido no grupo de mulheres na pós-menopausa natural, logo em sua fase inicial, pelo aumento no índice de DCVs

em 29%. No grupo de mulheres em pós-menopausa induzida, o estudo foi estendido até 2004, sendo demonstrada redução de DCVs em um pequeno grupo de mulheres, embora não fosse estatisticamente significativa (4 por ano a cada 10.000 mulheres tratadas). Assim, foi demonstrado que os riscos excediam os benefícios do uso combinado da TRH associado a progesterona em mulheres pós menopausa que utilizaram esta combinação pelo tempo de avaliação do estudo [8].

Embora tais estudos sejam considerados de qualidade, os mesmos constituem alvo de diversas críticas, pois a seleção das pacientes incluiu mulheres com idade média de 63,2 anos, diferente do que é preconizado no início da TRH (aproximadamente 10 anos antes). Além disso, no HERS as mulheres apresentavam risco prévio para DCVs e no WHI não houve a investigação da predisposição a doenças cardiovasculares, considerando somente sintomas clínicos [11].

Estudos sugerem que a TRH iniciada logo no climatério, ou seja, em mulheres mais jovens, pode oferecer proteção contra DCVs [12]. Diante disso, torna-se indispensável à realização de novos estudos, tanto clínicos quanto experimentais, para elucidar os verdadeiros efeitos promovidos pela TRH e seus componentes isoladamente em mulheres pós-menopausa.

1.1.Efeitos Vasculares dos Estrogênios

Os estrogênios contribuem na modulação vascular por meio de mecanismos vasodilatadores genômicos, envolvendo a transcrição gênica - um processo que pode sintetizar as substâncias vasoativas em horas ou dias, ou por efeitos não-genômicos - em que o efeito ocorre de forma aguda. Neste contexto, a deficiência destes hormônios, pode conduzir à disfunção endotelial devido ao comprometimento da síntese de fatores vasodilatadores [13-15].

Os mecanismos genômicos são regulados por processos de transcrição que envolvem translocação nuclear, ligação a elementos responsivos aos estrogênios (ERs) e regulação da expressão de genes alvo [16]. Os estrogênios estão envolvidos com a regulação de genes reguladores do tônus vascular, sendo sua regulação mediada pelo aumento na expressão de genes para enzimas vasodilatadoras, como a sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS) e a prostaciclina (PGI₂) sintase. Na ausência de estrogênios, os receptores intracelulares de estrogênios (ER - ER α [17] e ER β [18]) apresentam-se como monômeros na forma

inativa ligados a proteínas de choque térmico (HSP – *heat shock protein*). Após a ligação do estrogênio ao ER, estes sofrem alterações conformacionais que resultam na sua dissociação do HSP e formação de homo- ou heterodímeros que se dirigem ao núcleo ligando-se aos EREs [19]. O complexo hormônio-receptor pode atuar diretamente em EREs nos promotores de genes alvo ou, alternativamente, interagir com outros complexos de fatores de transcrição como o Fos/Jun influenciando na transcrição de genes cujos promotores não envolvem diretamente EREs [20, 21].

Os mecanismos não genômicos ocorrem através da ligação dos estrogênios ao seu receptor são respostas que ocorrem rapidamente e que são mediadas de modo independente de transcrição gênica e síntese de proteínas, envolvendo a modulação de proteínas citoplasmáticas reguladoras [22]. A vasodilatação por este mecanismo ocorre dentro de segundos a minutos após à ligação do estrogênio ao ER, envolvendo a ativação de proteínas quinases, fosfatases e mudanças no fluxo de íons através das membranas [16, 22].

Os mecanismos vasculares não genômicos pelos quais os estrogênios conferem efeito protetor podem ser justificados por mecanismos dependentes do endotélio [óxido nítrico (NO), PGI₂ ou fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF)] ou diretamente no músculo liso [23-28].

O endotélio desempenha um papel fundamental na regulação local da atividade vascular, realizando a síntese de substâncias que são responsáveis tanto pela vasodilatação como pela vasoconstrição [29]. Muitos agonistas como a acetilcolina (ACh), bradicinina, substância P ou estímulos físicos como o “*shear stress*” podem desencadear relaxamento vascular por meio de uma substância vasoativa em vias dependentes do endotélio através do fator relaxante derivado do endotélio [30-33]. Uma das substâncias que podem promover este efeito vasodilatador dependente do endotélio é o NO [34].

No endotélio, a liberação do NO e também de outros fatores como a PGI₂ e o EDHF, participam de um processo de homeostase no sistema cardiovascular que promove a regulação do tônus vascular basal e a resposta vasomotora a diferentes estímulos, o que resulta no controle da camada muscular subjacente ao endotélio, promovendo assim a vasodilatação [35].

O NO é um potente vasodilatador produzido a partir da conversão de L-arginina a L-citrulina através da eNOS [36]. Os estrogênios atuam aumentando a transcrição de eNOS (mecanismos genômicos) ou mesmo estimulando esta enzima

de forma aguda (mecanismo não genômico) e, deste modo, o aumento na expressão ou ativação desta enzima resulta no aumento da produção de NO [37]. No sistema vascular a síntese de NO inicia-se nas células endoteliais a partir da ligação de um agonista a um receptor acoplado à proteína G que desencadeia a ativação da fosfolipase C (PLC), formando posteriormente o inositol 1, 4, 5, trifosfato (IP_3) e o diacilglicerol [38]. O IP_3 promove a liberação de Ca^{2+} pelo retículo endoplasmático, o qual liga-se a calmodulina (CaM), que por sua vez induz a estimulação da eNOS [39]. O NO é então formado e se difunde para as células do músculo liso, onde estimula a guanilil ciclase solúvel (GCs), aumentando a concentração citosólica de monofosfato cíclico de 3',5' guanosina (GMPc), modulando então a concentração intracelular do Ca^{2+}/K^+ e induzindo o relaxamento vascular [40-42].

Os efeitos dos estrogênios nas células endoteliais também podem envolver a liberação de PGI_2 , um potente vasodilatador produzido a partir da ação das enzimas ciclooxigenase-1 (COX-1) e COX-2 sobre o ácido araquidônico. A PGI_2 assim como o NO, age localmente para promover a vasodilatação [43, 44]. Na célula muscular lisa, a PGI_2 possui receptores acoplados à adenilato ciclase (AC) e seu acoplamento resulta no aumento dos níveis de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) [45], segundo mensageiro que ao ativar a proteína quinase A (PKA), promove diminuição da sensibilidade da maquinaria contrátil desta musculatura devido à redução dos níveis citosólicos de Ca^{2+} [46, 47].

Além do NO e da PGI_2 , os estrogênios podem promover vasodilatação mediada por uma hiperpolarização celular, atribuída à liberação do EDHF, mecanismo que envolve a ativação dos canais de K^+ presentes nas células do músculo liso. Como consequência da hiperpolarização promovida pela abertura dos canais de K^+ na membrana celular, ocorre o fechamento de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem e o relaxamento do músculo liso, promovendo a vasodilatação [48, 49].

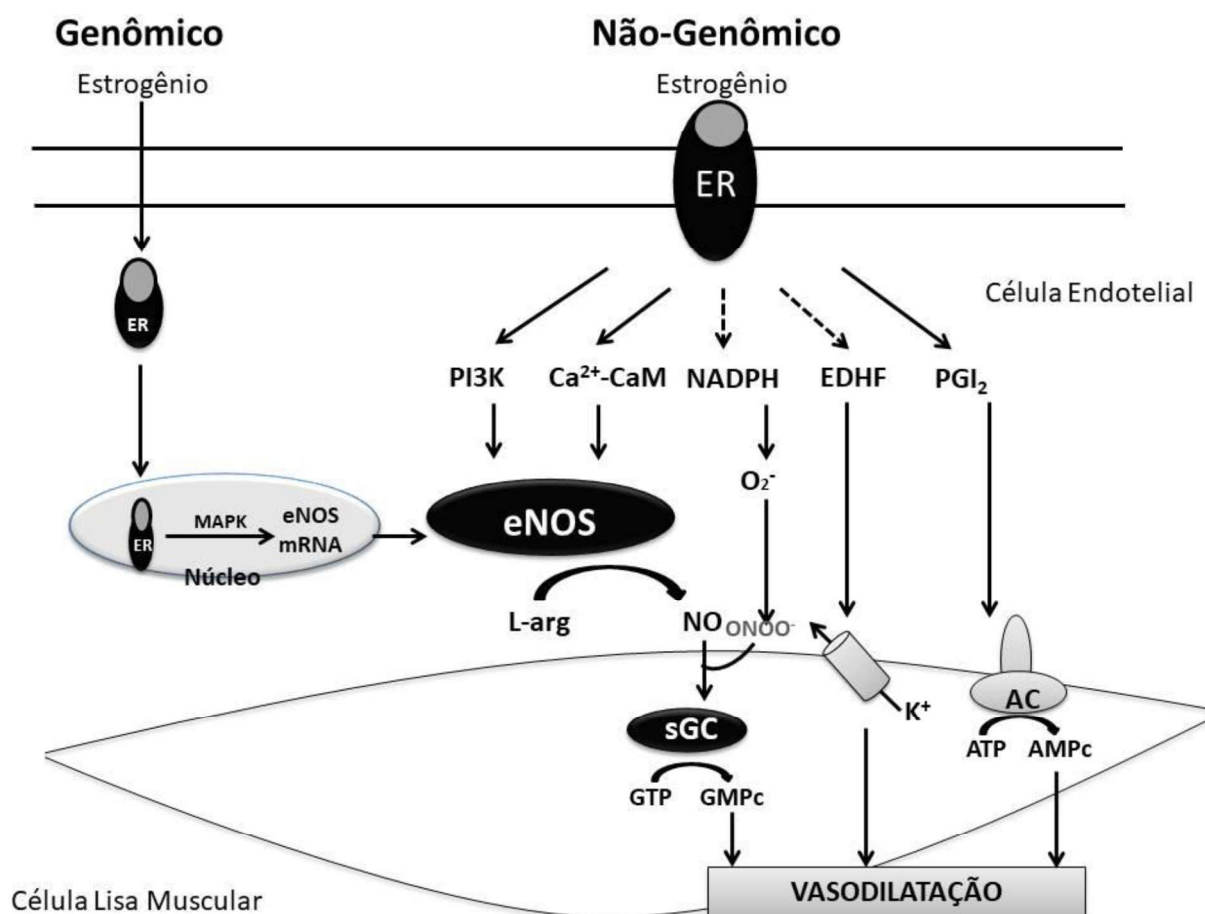


Figura 1 – Mecanismos genômicos e não genômicos de vasodilatação mediado pelos estrogênios na célula endotelial. ER, receptores de estrogênios; Ca²⁺, cálcio; eNOS, sintase do óxido nítrico endotelial; PGI₂, prostaciclina; EDHF, fator hiperpolarizante derivado do endotélio; K⁺, potássio; NO, óxido nítrico; ONOO⁻, peroxinitrito; L-arg, L-arginina; sGC, guanilato ciclase; AC, adenilato ciclase (Adaptado de Orshal e Khalil, 2004 [13]). Setas tracejadas correspondem à inibição e as contínuas representam ativação.

1.2. Receptores de Estrogênios

Os estrogênios promovem efeito nas células do músculo liso por mecanismos dependentes das células endoteliais ou diretamente no músculo liso [23], de tal forma que os receptores de estrogênios têm sido identificados em ambas as células [50-53]. Estes efeitos mediados pelos ER α , ER β ou pelos receptores de estrogênios acoplados à proteína G (GPER).

Um ER α funcional pode ser importante na função vascular, pois seus mecanismos de sinalização podem envolver a via do NO, sendo sua produção mediada pelos estrogênios circulantes [54], mostrando que a falta prolongada de

estrogênios e consequente desacoplamento destes compostos do ER α promovem a diminuição de vasodilatação dependente do NO.

A ação vascular não genômica dos estrogênios pode ocorrer ainda por meio do receptor GPER [55], uma descoberta que abriu uma nova linha para avaliação do mecanismo de ação vascular dos estrogênios. O GPER deflagra respostas biológicas mediadas por uma grande variedade de transdutores de sinais, tais como: proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), complexo Ca²⁺-CaM, eNOS, PGI₂, EDHF e inibição de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato-oxidase (NADPH oxidase) [13].

1.3. Deficiência Estrogênica e Disfunção Endotelial

A manutenção da homeostase vascular é feita através da produção e secreção de fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRFs), destacando-se NO, PGI₂ e EDHF e de fatores constritores derivados do endotélio (EDCFs), dentre os quais prostanóides, tromboxano A₂ (TXA₂), prostaglandinas (PGH₂), endotelinas (ET 1, 2 e 3), angiotensina II (ANG II) e espécies reativas de oxigênio (EROs). Em condições fisiológicas, há um equilíbrio na homeostase entre os EDRFs e EDCFs, no entanto, em condições patológicas este equilíbrio é rompido, havendo biodisponibilidade diminuída de NO, ocorrendo atenuação da função vasodilatadora dependente do endotélio, sendo esta a principal característica da disfunção endotelial, considerada um denominador comum para diversas DCVs [56-59].

É bem estabelecido que na pós menopausa a disfunção endotelial está associada à fisiopatologia das DCVs, pois as células endoteliais, assim como as células da musculatura lisa vascular passam a ser fontes de EROs e, adicionalmente, há comprometimento da regulação do tônus vascular basal, processo em que há redução na síntese e/ou bioatividade dos fatores vasodilatadores derivados do endotélio. Em contrapartida, é favorecido o aumento de vasoconstritores derivados do endotélio [60-65]. Apesar dos efeitos benéficos, os mecanismos responsáveis pelo efeito cardioprotetor dos estrogênios em mulheres ainda não são claros. Há evidências de que os estrogênios atuem promovendo alterações das concentrações séricas de lipídeos, coagulação e fibrinólise, propriedades antioxidantes e produção de moléculas vasoativas, como o NO e prostaglandinas já descritos anteriormente. Além disso, os estrogênios podem promover inibição da resposta dos vasos sanguíneos à lesão e ao desenvolvimento

da aterosclerose [66-72]. Esses processos são regulados por meio de vias genômicas e não genômicas [73].

O aumento no nível de estresse oxidativo no organismo é marcado pela redução dos níveis plasmáticos de estrogênios. Altas concentrações de estrogênios promovem um efeito antioxidante benéfico através da inibição da hidroxilação de bases guanina enquanto que as baixas na concentração destes hormônios levam a danos ao DNA e oxidação de bases [74].

As EROs podem modificar cadeias laterais de aminoácidos, realizar a clivagem de ligações polipeptídicas e fazer com que as proteínas se tornem mais susceptíveis à degradação proteolítica, resultando na síntese de derivados da carbonila [75]. Para contrapor estes efeitos prejudiciais do estresse oxidativo, as células possuem a capacidade de controlar e neutralizar a produção de EROs por meio de enzimas antioxidantes. Muitos estudos têm investigado o risco de DCVs na menopausa comparando os níveis lipídicos e estresse oxidativo na pré- e pós-menopausa, indicando aumento nos níveis lipídicos e no estresse oxidativo em mulheres na pós-menopausa [76-78].

O estresse oxidativo representa o desequilíbrio entre a produção e a eliminação de EROs. O aumento da produção de EROs pode favorecer a disfunção endotelial e sua produção advém de diversas origens, como da ciclooxigenase e da lipoxigenase, do citocromo P450, do desacoplamento da NOS e ativação da NADPH oxidase – NOX, levando à menor biodisponibilidade de NO. Os estrogênios possuem efeitos antioxidantes *in vitro* e *in vivo*. Acredita-se que desempenham um papel inibitório sobre as EROs e, um exemplo desta ação, é a inibição da NADPH oxidase, uma importante fonte do radical superóxido (O_2^-) que reage com o NO e gera peroxinitrito (ONOO) [79-88].

A principal enzima produtora de EROs no endotélio é a NADPH oxidase. A NADPH oxidase é expressa em células fagocíticas e consiste na porção gp91^{phox} catalítica (também conhecida como NOX2) e subunidades reguladoras p22^{phox}, p47^{phox}, p40^{phox} e p67^{phox} juntamente com GTPases Rac 1/2. Várias isoformas de NOX2 tem sido identificadas em tipos celulares não fagocíticas e incluem NOX1, NOX3, NOX4, e NOX5 assim como a oxidase dual Duox1/2 [89].

Os prejuízos associados à expressão aumentada desta enzima incluem a disfunção endotelial, que envolve diminuição da resposta vasodilatadora à ACh, com alterações envolvendo os agentes endoteliais EDHF, NO e PGI₂. Todo este quadro é

observado na ovariectomia (OVX) (modelo experimental que mimetiza a menopausa) [90-93], modelo em que a disfunção endotelial promove alterações na vasodilatação mediada pelo NO, o que culmina na diminuição da resposta vasodilatadora à ACh [94-96], demonstrando que o aumento de EROs promove prejuízos ao sistema cardiovascular.

1.4. Estrogênios como Antioxidantes

As células possuem uma série de mecanismos de defesa para se protegerem contra os efeitos nocivos das EROs. Uma das defesas naturais do organismo são os estrogênios, que atuam no meio intra- e extracelular para manter a defesa antioxidante. Um dos mecanismos pelos quais os estrogênios podem diminuir a concentração de radicais livres é através do aumento da expressão de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT) [97].

A SOD representa uma importante defesa, pois catalisa a reação de dois ânions superóxidos, formando H_2O_2 , que é menos reativo e pode ser degradada por outras enzimas como a CAT. A enzima SOD possui algumas variações: a citoplasmática (SOD1), a mitocondrial (SOD2) e a extracelular (SOD3). A SOD1 e SOD3 possuem cobre e zinco (CuZn-SOD) nos sítios de ativação, já a SOD2 contém manganês (Mn-SOD) [98]. A CAT é uma enzima que contém um grupo heme em seu sítio ativo e tem como função catalisar a reação de H_2O_2 em água, inativando esta espécie reativa [99].

Além destas enzimas, também tem merecido destaque o sistema antioxidante da tioredoxina (Trx), que apresenta efeitos consideráveis sobre a homeostase redox podendo eliminar hidroperóxidos, incluindo o H_2O_2 [100, 101]. Outro importante antioxidante que faz parte de um sistema considerável é a glutathiona reduzida (GSH). A GSH atua removendo radicais livres e EROs como o radical hidroxila e o H_2O_2 [102].

O efeito antioxidante conferido pelos estrogênios também é mediado pela Akt, proteína de sinalização redox-sensível [103]. Em situações de estresse oxidativo, por meio de mudanças conformacionais nas proteínas de membrana, a via da Akt pode ser modulada e, quando ativada, pode estimular a eNOS, atuando assim na proteção contra o estresse oxidativo [104, 105].

Os efeitos antioxidantes dos estrogênios são relevantes, uma vez que após a OVX, há redução na vasodilatação dependente do endotélio, caracterizada pelo aumento das EROs e prejuízo na formação de NO, fatores determinantes da disfunção endotelial [53, 106, 107].

1.5. Terapia de Reposição Hormonal – TRH

Os estrogênios são os hormônios sexuais predominantes nas mulheres e que influenciam o desenvolvimento e a função do sistema reprodutor feminino, incluindo o endométrio, útero e glândulas mamárias. Os estrogênios podem ser utilizados como contraceptivos ou na TRH, onde são os componentes majoritários. Os estrogênios podem ainda ser utilizados em mulheres na pós-menopausa para tratar incontinência urinária, tonturas, fadiga, irritabilidade e prevenção da osteoporose [108].

Estudos experimentais que analisaram os efeitos da TRH com estrogênios em ratas ovariectomizadas (OVX), modelo que mimetiza a menopausa, demonstraram diversos efeitos benéficos destes hormônios sobre o sistema cardiovascular. Esses efeitos incluem a capacidade de reduzir a pressão arterial, de reduzir o estresse oxidativo [107, 109, 110], prevenir a disfunção endotelial e melhorar a reatividade vascular dependente do endotélio [111, 112]. Em mulheres, é sugerido que a TRH confere proteção contra DCVs na pós-menopausa, sendo que o risco de mortalidade por estas patologias está reduzido [113]. No entanto, devem ser levados em consideração os estudos HERS e WHI [7, 8] em que foram levantadas dúvidas sobre o efeito protetor da TRH no sistema cardiovascular.

Nos estudos HERS e WHI, o Premarin® (Wyeth, Newbridge, CountyKildare, Irlanda) foi o medicamento de escolha para TRH com estrogênios [7, 8]. Assim como nestes estudos, na prática clínica, dentre várias preparações farmacêuticas, o Premarin® é o medicamento mais comumente prescrito para TRH [114]. Sua formulação compreende uma mistura estrogênica derivada de equinos que contém cerca de dez tipos de estrogênios quimicamente diferentes: E1 (48%); equilina (24%); 17 β -dihidroequilina (15%); Δ 8,9-dehidroestrone (4,3%); 17 α -estradiol (3,8%); 17 α -dihidroequilina (1,8%); equilenina (1,1%); E2 (0,68%); 17 α -dihidroequilenina (0,45%) e 17 β -dihidroequilenina (0,3%) [115]. Dentre estes componentes, alguns deles, como é o caso da E1, equilina e Δ 8,9-dehidroestrone, são metabolizados na

circulação, convertendo-se a E2, 17 β -dihidroequilina e Δ 8-17 β -estradiol, respectivamente **[116-119]**.

O Premarin[®], há mais de 60 anos, é o medicamento mais utilizado na prática clínica, entretanto, pouco se sabe sobre o efeito vascular individual da maioria de seus componentes. O efeito vascular de dois componentes desta formulação, o E2 e E1, demonstrou que ambos possuem efeito vasorrelaxante agudo **[120]**, mas ainda são necessários estudos que demonstrem os efeitos da E1 (componente majoritário da preparação), quando administrada cronicamente em ratas OVX.

Com o risco aumentado de disfunção endotelial em mulheres na pós-menopausa e levando em consideração o possível efeito protetor dos estrogênios sobre o sistema vascular, criou-se a hipótese se E1, a exemplo de E2, possui efeito protetor sobre a disfunção endotelial em ratas OVX.

1.6. Estrona (E1)

A E1, além de ser o componente majoritário em preparações de estrogênios conjugados como o Premarin[®] **[115]** e sofrer metabolização em E2 após sua administração **[116-119]**, possui importância fisiológica por tratar-se do principal hormônio circulante na pós-menopausa, com proporções duas vezes maiores que o E2 **[121]**.

Sua síntese no organismo é realizada à partir do colesterol em sítios de síntese de esteroides como ovários, testículos e glândulas adrenais **[122]**, através da clivagem da cadeia lateral que se projeta do anel D do colesterol e redução de 27 para 18 átomos de carbono nesta molécula por reações de hidroxilação e oxigenação, catalisadas por oxidases de função mista (citocromo P450 mitocondrial), que utilizam NADPH e O₂ como cofatores e, através da aromatização, que é a última etapa do processo de síntese de estrogênios, funcionam como desmetilases convertendo testosterona em E2 e androstenediona em E1, que também pode ser um metabólito do estradiol ou mesmo seu precursor através da enzima 17-OH-SDH **[123]**.

Apesar da E1 ser o hormônio estrogênico mais abundante na pós-menopausa **[121]**, o mesmo não ocorre durante a idade fértil, período em que o E2 encontra-se em concentrações séricas superiores e, além disso, possui maior potência em relação à E1 **[114, 124]**. No entanto, diante de investigações prévias sobre os efeitos

vasculares agudos demonstrando o mecanismo de ação da E1 e seus efeitos benéficos sobre este sistema [120], além do fato de ser o componente majoritário de preparações farmacêuticas utilizadas na TRH, estudos que visem elucidar seus efeitos crônicos tornam-se necessários.

2. JUSTIFICATIVA

Na pós-menopausa o Premarin® é amplamente utilizado como forma de TRH [114], no entanto, pouco se sabe sobre a ação individual de seus componentes sobre o sistema vascular. Esta preparação estrogênica contém, entre seus diversos componentes, 17 β -estradiol (E2) e estrona (E1), que são os principais componentes da formulação e fisiológicos. Em mulheres férteis o E2 é o hormônio estrogênico mais abundante e o mais potente [2, 85], sendo também o hormônio que possui seus efeitos cardiovasculares melhor caracterizados. A E1 é o componente majoritário do Premarin® e, na menopausa, torna-se o estrogênio predominante na circulação feminina. O conjunto desses fatores são determinantes para a realização de pesquisas que visem à elucidação dos efeitos vasculares da E1, uma vez que há poucos dados na literatura investigando sua importância sobre o sistema cardiovascular. O E2 foi escolhido como controle deste estudo, pois grande parte dos mecanismos envolvendo sua resposta vasodilatadora encontram-se bem caracterizadas.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Determinar as ações vasculares promovidas pela estrona (E1) em ratas Wistar ovariectomizadas.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Analisar o efeito do tratamento com E1 sobre a pressão arterial.
- 2) Avaliar o efeito crônico da E1 sobre a função vascular.
- 3) Mensurar possíveis alterações nos parâmetros morfológicos, fisiológicos e bioquímicos, na aorta torácica de animais submetidos ao tratamento com E1.
- 4) Investigar a expressão e a atividade de enzimas anti- e oxidantes na aorta torácica de animais tratados cronicamente com E1.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizadas ratas Wistar adultas, fêmeas com 12 semanas de idade e peso corporal variando entre 180 e 200 gramas. Esses animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Goiás (UFG) e mantidos no Biotério dos Departamentos de Fisiologia e de Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB II). Os animais foram acondicionados em temperatura controlada de 22 ± 2 °C em ciclo claro (07h00min – 19h00min) e escuro (19h00min – 07h00min), com livre acesso à água e ração. Os protocolos experimentais foram realizados seguindo as diretrizes da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (CONCEA) e de acordo com as normas institucionais do Comitê de Ética em Pesquisa da UFG através de projeto aprovado por este mesmo comitê (CEUA/UFG 20/2013).

4.2. Drogas e Reagentes

Durante a realização dos experimentos foram utilizadas as seguintes drogas e reagentes: cloreto de sódio (Synth), cloreto de potássio (Synth), cloreto de cálcio dihidratado (Vetec), sulfato de magnésio (Synth), fosfato de potássio monobásico (Impex), bicarbonato de sódio (Vetec), glicose (Synth), fenilefrina (Phe) (Sigma - USA), acetilcolina (ACh) (Sigma - USA), apocinina (APO) (Sigma – USA), superóxido dismutase (SOD) (Sigma – USA), estrona (Sigma – USA), 17β -estradiol (Sigma – USA), nitroprussiato de sódio (NPS) (Sigma - USA), todas as soluções, incluindo a solução de Krebs-Henseleit modificada, foram preparadas em água destilada.

4.3. Grupos Experimentais

As ratas foram separadas em quatro grupos experimentais, sendo:

- Fêmeas falso operadas (n=16, Sham) tratadas⁺ com veículo (óleo de milho);
- Fêmeas ovariectomizadas (n=16, OVX) tratadas⁺ com veículo (óleo de milho);
- Fêmeas OVX tratadas⁺ com 17β -estradiol 15 μ g/Kg/dia^{*} (SC) (n=16, OVX+E2);
- Fêmeas OVX tratadas⁺ com estrona 825 μ g/Kg/dia^{**} (SC) (n=16, OVX+E1).

⁺O tratamento foi realizado pelo período de 30 dias.

^{*} Dose calculada com base na terapia de reposição hormonal com 17β -estradiol (comprimido de 1mg).

** Dose calculada levando em consideração a proporção estrona/17 β -estradiol (55/1) presente em preparações de estrogênios conjugados equinos como o Premarim®.

4.4. Protocolos Experimentais

Os experimentos foram realizados seguindo o cronograma abaixo:

- 1º dia: Verificação do peso corporal seguido de ovariectomia, com exceção das fêmeas do grupo SHAM. Nas semanas seguintes foram realizadas novas verificações do peso.
- 60º dia: Início do tratamento.
- 90º dia: Registro de pressão arterial.
- 90º dia: Coleta de sangue, morte e dissecação da aorta torácica para realização da reatividade vascular, western blotting, atividade enzimática e morfometria; dissecação do útero, coração e gordura retroperitoneal.



4.5. Ovariectomia

Após anestesia intraperitoneal com mistura de quetamina (70mg.kg⁻¹) e xilazina (10mg.kg⁻¹), os animais foram submetidos a uma incisão de 1 a 1,5 cm na pele do abdômen, seguida de uma incisão na camada muscular, abertura da cavidade peritoneal para posterior remoção bilateral dos ovários e ligadura da tuba uterina. Após a retirada dos ovários, foi realizada sutura da musculatura e pele. Ao final do procedimento os animais foram recolocados em gaiolas. No grupo SHAM foi realizada uma incisão no abdômen, mas não houve remoção dos ovários, a fim de estabelecer parâmetros semelhantes em todos os animais deste estudo.

4.6. Acompanhamento de Massa

Para a avaliação da massa corpórea (g), as ratas foram pesadas antes da ovariectomia (12ª semana de idade) e semanalmente até a última semana de tratamento (90 dias após a cirurgia - 24ª semana de idade).

4.7. Tratamentos

Os tratamentos foram iniciados 60 dias após a ovariectomia (OVX) e tiveram a duração de 30 dias. Tal protocolo foi pré-estabelecido por nosso grupo de forma que as fêmeas OVX apresentassem alterações de reatividade vascular e regressão no peso do útero, sendo este um critério de inclusão para os animais utilizados no estudo.

O grupo OVX+E1 foi tratado por 30 dias com estrona (Sigma, St. Louis, USA) dissolvida em óleo de milho, em uma dose diária de 825µg/kg de peso corporal por via subcutânea (0,5 mL/Kg).

O grupo OVX+E2 foi tratado por 30 dias com 17β-estradiol (Sigma, St. Louis, USA) dissolvido em óleo de milho, numa dose diária de 15µg/kg de peso corporal por via parenteral direta (subcutânea), transfixando-se a massa muscular da coxa traseira da rata, alternando as patas.

Os grupos Sham e OVX receberam por 30 dias os veículos dos tratamentos (óleo de milho), por via parenteral direta (subcutânea), transfixando-se a massa muscular da coxa traseira da rata, alternando as patas.

4.8. Registro de Pressão Arterial

O registro de pressão arterial foi realizado por método indireto, através de pletismografia de cauda ao final do tratamento dos animais. Sete dias antes do primeiro registro arterial, iniciou-se uma ambientação em que os ratos foram submetidos a uma adaptação que envolvia o aquecimento dos animais em lâmpada infravermelha por 10 minutos em temperatura aproximada de 40°C e posterior contenção em cilindro de acrílico com abertura para o focinho e cauda, por 15 minutos. Este procedimento foi realizado por mais duas vezes, sendo um a cada dois dias.

Após o procedimento de ambientação, foram determinados os níveis pressóricos dos animais. Neste procedimento, os animais foram aquecidos por 10 minutos a 40°C e colocados no cilindro de contenção. Um oclisor e um sensor foram ajustados à porção proximal da cauda do rato, acoplados a um esfigmomanômetro elétrico conectado a um sistema de transdução (Plestismógrafo de cauda V2.11/ Software medidor de pressão versão 2.1, Insight® Ribeirão Preto, Brasil). Depois de climatizados foram registrados a pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e a pressão arterial média (PAM). A pressão arterial média foi obtida

a partir do cálculo: $PAM = PAD + (\Delta + 40\%)$. O valor final da pressão arterial caudal de cada animal representa a média aritmética de três medidas sequenciais.

4.9. Reatividade Vascular

As ratas foram mortas por decapitação, as aortas torácicas cuidadosamente removidas e imersas imediatamente em solução nutriente Krebs-Henseleit modificada à 4°C (pH 7,4; composição em mM: NaCl – 130; NaHCO₃ – 14,9; KCl – 4,7; KH₂PO₄ – 1,18; MgSO₄ 7H₂O – 1,17; CaCl₂ 2H₂O – 1,6; glicose – 5,5), em seguida foi removido todo tecido conectivo e foram seccionadas em anéis transversais de 4 mm de comprimento. Os anéis vasculares foram suspensos por um par de hastes de aço inoxidável, em cubas de vidro (10 mL) contendo solução nutritiva de Krebs-Henseleit modificada sob temperatura constante de 37°C e aerada com carbogênio (95% de O₂ e 5% de CO₂). Uma das extremidades das hastes foi conectada a um transdutor de força que, acoplado a um sistema computadorizado, permitiu o registro das tensões (Transdutor de força TIM-200, MOB IOB, Amplificador AECAD 04, AVS Projetos, Brasil).

As preparações permaneceram sob tensão de 1,5 g durante 60 minutos (período para estabilização), com trocas de solução nutritiva e ajuste de tensão a cada 15 minutos. Após estabilização, foi adicionada fenilefrina (Phe - 1μM) para verificação da resposta vascular ao estímulo contrátil e, na sequência, acetilcolina (ACh - 10μM) para a confirmação da presença ou ausência de endotélio funcional nas preparações estudadas. Para execução dos protocolos experimentais em aortas desprovidas de endotélio vascular, a camada íntima foi removida mecanicamente por meio da fricção de uma cânula metálica coberta de algodão no lúmen do vaso. Foram considerados anéis com endotélio funcional aqueles cujo relaxamento mínimo produzido pela ACh correspondeu a 90% e, anéis sem endotélio, aqueles cujo relaxamento máximo correspondeu a 10% [125].

Após a realização do teste da integridade do endotélio, as preparações foram lavadas com solução nutritiva de Krebs-Henseleit modificada e, posteriormente, reestabilizadas por mais 30 minutos para que fossem iniciados os protocolos experimentais.

4.10. Protocolos de Estudo da Reatividade Vascular

Após estabilização do registro e obtenção do platô de contração, foi realizada uma curva concentração resposta a Phe, um agonista vasoconstritor, em concentrações crescentes (0,1 nM a 30 μ M) nas preparações de aorta torácica. Estas curvas foram realizadas em preparações com endotélio (E+) e sem endotélio vascular (E-). Foram ainda realizadas curvas concentração resposta a ACh, um agonista vasodilatador dependente do endotélio, em concentrações crescentes (10 pM a 10 μ M) nas preparações de aorta torácica. Essas curvas foram realizadas na ausência de inibidores farmacológicos (curva controle) e, posteriormente, na presença destes, a aorta torácica foi incubada por um período de 30 minutos; em seguida, foram repetidas concentrações crescentes de ACh para a realização da curva concentração resposta.

Para avaliar a influência de EROs formados pela NADPH oxidase na resposta vascular, concentrações crescentes de ACh foram adicionadas na presença de apocinina (APO) (10 μ M). Para verificar a influência da enzima superóxido dismutase (SOD) (150 U/mL) ou catalase (CAT) (100 U/mL), foi realizada a incubação com estas enzimas e em seguida repetida a curva de concentração resposta para a ACh.

Em outra sequência de experimentos, foram realizadas curvas concentração resposta ao NPS, um vasodilatador independente do endotélio, em concentrações crescentes (1 pM a 3 μ M) nas preparações de aorta torácica, avaliando a integridade do músculo liso destas preparações frente ao tratamento realizado.

4.11. Massa do útero, coração e gordura retroperitoneal

Para avaliação da massa do útero, coração e gordura retroperitoneal, estes foram removidos após a morte dos animais e as massas foram tomadas para comparação da diferença de massa entre os grupos.

4.12. Dosagem de colesterol e LDL

As dosagens de colesterol e LDL foram realizadas através de Kits Analisa (Belo Horizonte, MG, Brasil), específicos para cada parâmetro bioquímico para determinação quantitativa no soro.

O princípio da dosagem de colesterol envolve a hidrólise dos ésteres de colesterol pela colesterol esterase formando colesterol livre que, após oxidação pela colesterol oxidase, forma peróxido de hidrogênio. Este, reagindo com o fenol e 4-aminoantipirina, através de copulação oxidativa catalisada pela peroxidase, produz

uma quinonimina de cor vermelha. A absorvância do complexo formado é medida em espectrofotômetro em 500 nm, sendo diretamente proporcional à concentração de colesterol da amostra.

Na dosagem de LDL, por ação de um detergente específico, as lipoproteínas de alta densidade (HDL), as de muito baixa densidade (VLDL) e os quilomicrons presentes na amostra analisada foram solubilizados. Os ésteres de colesterol foram hidrolisados por ação das enzimas colesterol esterase e colesterol oxidase mediante uma reação não formadora de cor. O segundo detergente, presente em um segundo tampão, solubiliza o colesterol das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) da amostra que, em seguida, é determinado por espectrofotômetro em comprimento de onda de 546nm.

4.13. Dosagem hormonal

A determinação quantitativa da concentração de estradiol foi mensurada a partir do soro sanguíneo das ratas, utilizando o kit Monobind Inc. (Lake Forest, CA 92630, USA) de acordo com as instruções do fabricante. O princípio do teste envolve reagentes essenciais necessários para o imunoensaio enzimático incluindo anticorpos, enzima-antígeno conjugada e antígenos nativos. Após a mistura dos anticorpos biotinados com um soro contendo o antígeno, a reação resulta na interação antígeno e anticorpo.

Após incubação, a enzima conjugada é adicionada e, a seguir, ocorre uma competição entre a enzima conjugada e o antígeno da amostra. Simultaneamente, o complexo é depositado nos poços e imobilizado pela alta afinidade entre a estreptavidina e o anticorpo biotinado. A atividade enzimática na fração do anticorpo ligado é inversamente proporcional à concentração do antígeno nativo. Com a utilização de diversos soros de referência de concentrações conhecidas, uma curva de resposta pode ser gerada onde a concentração de antígeno para um anticorpo desconhecido pode ser verificada.

4.14. Quantificação proteica por Western blotting na aorta

4.14.1. Extração de proteínas

Segmentos de aorta torácica de ratas Wistar submetidos a tratamento crônico foram isolados, congelados em nitrogênio líquido, pulverizados e homogeneizados em tampão de lise gelado acrescido de ortovanadato de sódio (10 mM), fluoreto de

fenil metil sulfonila (10 mM) e coquetel inibidor de protease (fluoreto de benzenosulfonil, pepstatina A, E-64, bestatina, leupeptina e aprotinina) (1%). Os extratos teciduais foram centrifugados a 13000 rpm a 4 °C por 20 minutos para a remoção do material insolúvel. Após a centrifugação, foi quantificado o conteúdo proteico total pelo método de Bradford [126], de forma que em cada experimento foi construída uma curva padrão com solução de albumina nas concentrações de 0,03125; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,50; 1,0 e 2,0 mg/mL. Para tanto, a cada 300 µL do reagente de Bradford, foram adicionados 10 µL de cada amostra ou ponto da curva. Quando necessário, as amostras foram diluídas em 1:5 ou 1:10. O branco foi determinado pela leitura de 10 µL de água diluído em 300 µL do reagente de Bradford. A absorbância foi lida a 596nm e para determinação proteica, subtraiu-se o valor da absorbância do branco de cada amostra e o resultado foi aplicado à equação da reta da curva padrão. O resultado foi expresso em µg/mL de proteína. As amostras foram tratadas com tampão de Laemmli contendo ditiotretol (200 mM) e, posteriormente, 60 µg de proteína total foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (do inglês sodium dodecyl sulfate-poliacrilamida gel electrophoresis - SDS PAGE 10%) em aparelho para mini gel (BioRad, Hercules, USA). Em cada gel, havia um marcador com peso molecular de valores estabelecidos.

4.14.2. Immunoblotting

A transferência das proteínas separadas no gel para a membrana de nitrocelulose foi feita eletricamente por 2 horas a 100V. Ao tampão foi acrescido SDS 0,1% para melhorar a eluição de proteínas. As membranas foram incubadas com solução bloqueadora (albumina de soro bovino 5% - do inglês bovine serum albumin - BSA) à temperatura ambiente por 1 hora, para reduzir a ligação inespecífica de proteínas na membrana. As membranas foram incubadas individualmente com os anticorpos listados na tabela abaixo. As incubações foram feitas com solução bloqueadora TBS 1%/BSA (do inglês Tris-Buffered Saline - TBS), por 18 horas a 4 °C. Em seguida, as membranas foram lavadas com solução tampão TBS-Tween por 30 minutos e incubadas com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase, por 1 hora, em temperatura ambiente e, logo após, com a solução para detecção por quimioluminescência. A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria óptica com auxílio de programa de análise de intensidade de bandas (ImageJ, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland).

Anticorpo Primário	Peso Molecular (kDa)	Diluição	Fabricante
β -actina	42	1:10000	Cell Signaling
Catalase	64	1:1000	Cell Signaling
Cu/Zn-SOD	18	1:1000	Abcam
Mn-SOD	18	1:500	Millipore
NOX-1	65	1:500	Abcam
gp91phox	65	1:1000	Abcam
NOX-4	63	1:500	Abcam

4.15. Atividades enzimáticas

4.15.1. Atividade da CAT

Aortas torácicas de ratas Wistar submetidas ao tratamento, conforme protocolo experimental, foram pulverizadas e em seguida homogeneizadas a 10% (p/v) em tampão fosfato 50 mM, pH 7,4 e centrifugado a 1500 g (4000 rpm) por 15 minutos (2°C). O sobrenadante foi utilizado no ensaio. A atividade da CAT foi determinada seguindo metodologia adaptada de Chance et al. (1979) [127], o qual se baseia no acompanhamento da decomposição do H_2O_2 , determinada espectrofotometricamente a 240 nm durante 2 minutos. O meio de reação foi composto de 191 μ L de tampão fosfato 50 mM pH 7,4 e 2 μ L de amostra do sobrenadante de aortas. A reação foi iniciada com a adição de 7 μ L de H_2O_2 0,3 M. A concentração de CAT foi expressa em pmoles / mg de proteína.

4.15.2. Atividade da SOD

Aortas torácicas de animais tratados foram pulverizadas e em seguida homogeneizadas a 10% (100 mg/mL) em tampão fosfato 50 mM pH 7,4 e centrifugadas a 1500g (4000 rpm) por 15 minutos (2°C). Após o sobrenadante foi recolhido para a dosagem enzimática. A atividade da SOD foi determinada utilizando metodologia adaptada de Mc Cord e Fridovich (1969) [128]. Esta técnica é baseada na inibição da reação do radical superóxido com a adrenalina. A SOD presente na amostra em estudo compete pelo radical superóxido com o sistema de detecção. Dado que não se pode determinar a concentração da enzima nem sua atividade em termos de substrato consumido por unidade de tempo, se utiliza a quantificação em unidades relativas. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima

que inibe 50% a velocidade de oxidação do detector (adrenalina). A oxidação da adrenalina leva à formação de um produto colorido, o adrenocromo, detectado espectrofotometricamente. A atividade da SOD é determinada medindo a velocidade de formação do adrenocromo, observada a 480 nm, em um meio de reação contendo glicina-NaOH (50 mM, pH 10) e adrenalina (1 mM). Os resultados foram expressos em unidades de SOD por mg de proteína.

4.16. Estudo da geração de EROs na aorta - Lucigenina

Aortas torácicas dos animais tratados foram lavadas e colhidas em tampão de lise [KH_2PO_4 , 20 mM; EGTA, 1 mM; aprotinina, 1 μg / mL; leupeptina 1, μg / mL; pepstatina, 1 μg / mL; e phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM]. Em seguida, 50 μL da amostra foram adicionados a uma suspensão contendo 175 μL de tampão de ensaio [KH_2PO_4 , 50 mM; EGTA, 1 mM; e sacarose, 150 mM; (pH 7,4)] e lucigenina (5 μM). NADPH (1 μM) foi adicionado à suspensão (300 μL) contendo lucigenina.

A luminescência foi medida a cada 18 segundos por 3 min por um luminômetro (AutoLumat LB 953, Berthold), antes e depois da estimulação com NADPH. Um valor de branco contendo apenas tampão foi subtraído de cada leitura. Os resultados foram expressos em unidades relativas por miligrama de proteína.

4.17. Avaliação histológica

Os testes morfo-histológicos descritos abaixo foram realizados no Laboratório de Histofisiologia do Departamento de Histologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, coordenado pela Prof^a. Dr^a. Fernanda Cristina Alcantara dos Santos.

4.17.1. Análise morfométrica

Segmentos de aorta torácica foram dissecados e imediatamente fixados em metacarn (solução de metanol 60%, clorofórmio 30% e ácido acético 10%). Os procedimentos seguintes envolveram desidratação com concentrações crescentes de etanol, clarificação em xilol e por último a inclusão em Paraplast (Histotec, Merck). Posteriormente, fragmentos teciduais foram seccionados em aproximadamente 5 μm e corados pela técnica Hematoxilina-Eosina (HE) para os estudos morfológicos de espessura da parede do vaso e área do lúmen [127].

Morfometricamente, a análise da espessura da parede do vaso e área do lúmen (μm) foram realizadas em todos os grupos experimentais. Para esta análise foram realizadas 40 medidas da espessura da parede e 30 medidas da área do lúmen para cada grupo experimental. A análise morfométrica foi analisada utilizando o programa Image Pro-Plus versão 6.1 para Windows (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, MD, USA). Os valores obtidos foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média.

4.17.2. Colágeno

Segmentos de aorta torácica foram dissecados e imediatamente fixados em metacarn (solução de metanol 60%, clorofórmio 30% e ácido acético 10%). Os procedimentos seguintes envolveram desidratação com concentrações crescentes de etanol, clarificação em xilol e por último inclusão em Paraplast (Histotec, Merck). Posteriormente, fragmentos teciduais foram seccionados em aproximadamente 5 μm e corados pela técnica picrossírius-hematoxilina. As secções histológicas foram analisadas e digitalizadas em fotomicroscópio Zeiss Axioscope, em seguida, foram realizados estudos estereológicos quantificando a porcentagem de colágeno.

4.17.3. Elastina

Segmentos de aorta torácica foram dissecados e imediatamente fixados em metacarn (solução de metanol 60%, clorofórmio 30% e ácido acético 10%). Os procedimentos seguintes envolveram desidratação com concentrações crescentes de etanol, clarificação em xilol e por último a inclusão em Paraplast (Histotec, Merck). Posteriormente, fragmentos teciduais foram seccionados em aproximadamente 5 μm e corados pela técnica resorcina-fucsina. As secções histológicas foram analisadas e digitalizadas em fotomicroscópio Zeiss Axioscope, em seguida, foram realizados estudos estereológicos quantificando a porcentagem de elastina.

As análises estereológicas foram realizadas no sistema de teste multipontos com 130 pontos, agrupados em 10 linhas e 13 colunas, para comparar a frequência relativa de cada constituinte celular. Para isso, foram capturados 30 campos aleatórios de cada grupo experimental (6 campos por animal; $n=5$). Os valores relativos foram determinados pela contagem dos pontos coincidentes sobre cada compartimento em estudo, seguido da divisão destes pelo número total de pontos do

sistema teste. Esta análise foi realizada utilizando o programa Image Pro-Plus versão 6.1 para Windows (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, MD, USA).

4.18. Análise Estatística

Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (epm) de 5-6 animais por grupo. Para comparação entre dois grupos, os resultados foram submetidos ao teste “t” de Student (bicaudal não pareado). Quando comparados mais de dois grupos, os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey (grupos com apenas uma variável) ou ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni (quando necessário avaliar duas variáveis dentro de um mesmo grupo).

As diferenças entre os dados foram consideradas significativas quando $P < 0,05$ e todos os dados foram analisados utilizando-se o programa GraphPad Prism® versão 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

As respostas de relaxamento evocadas pela ACh foram expressas como porcentagem de relaxamento à pré-contração obtida pela Phe. As curvas concentração-resposta tiveram calculados e expressos valores de resposta máxima ($R_{\text{máx}}$) e de pEC_{50} ($-\text{Log } EC_{50}$), que representa o valor da concentração que produz 50% do E_{max} . Para tal, foram usadas análises de regressão não linear obtidas a partir das curvas dose-resposta utilizando o programa GraphPad Prism Software (San Diego, CA, USA).

5. RESULTADOS

5.1. Influência do tratamento hormonal sobre a massa dos animais

A massa corpórea das ratas foi avaliada inicialmente na 12ª semana de idade, sendo que nessa semana os animais apresentaram similaridade nos valores de peso (Tabela 1), mostrando que o peso dos animais antes da ovariectomia (OVX) era homogêneo. Semanalmente foi observado aumento de massa em todos os grupos experimentais, no entanto, nos grupos de ratas OVX, este aumento foi significativamente maior quando comparados com o grupo Sham após a 2ª semana de recuperação (Figura 2). Após o início do tratamento (8ª semana após a cirurgia), observou-se que os grupos tratados com estrona (E1) ou 17β -estradiol (E2) apresentaram decréscimo no ganho de massa, apresentando valores semelhantes ao grupo Sham a partir da 9ª semana e mantendo-se até o final do tratamento (Tabela 1).

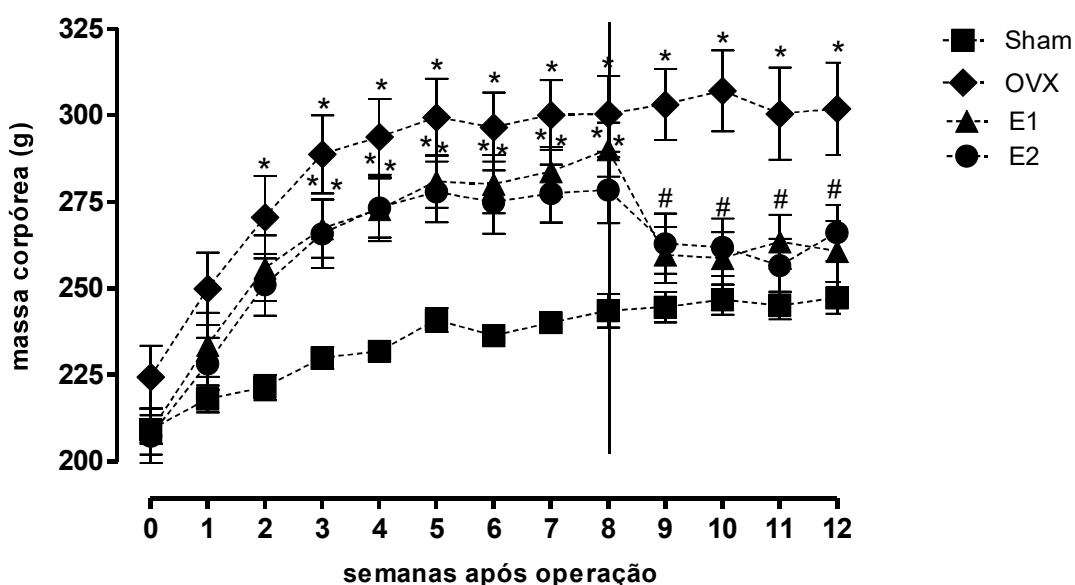


Figura 2 - Alterações na massa corpórea de ratas dos grupos Sham, OVX, OVX tratadas com E1 e OVX tratadas com E2 durante o período experimental. Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média de 5 a 6 animais por grupo. Foi utilizado o teste ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni. * $P < 0.05$ valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo Sham. # $P < 0.05$ valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo de ratas OVX. Sham, ratas falso-operadas tratadas com veículo. OVX, ratas OVX tratadas com veículo. E1, ratas OVX tratadas com E1 na dose de $825\mu\text{g/Kg}$. E2, ratas OVX tratadas com E2 na dose de $15\mu\text{g/Kg}$.

Tabela 1. Valores em gramas da massa inicial e final de ratas dos grupos Sham, OVX, OVX tratadas com E1 e OVX tratadas com E2

	Massa Inicial	Massa Final
Sham	209,2 ± 4,18	247,2 ± 4,60
OVX	223,3 ± 9,02	301,8 ± 13,35 [*]
E1	208,6 ± 6,61	260,6 ± 8,84 [#]
E2	207,3 ± 7,88	266,0 ± 8,07 [#]

Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média de 5 a 6 animais por grupo. Foi utilizado o teste ANOVA de uma via para análise. ^{*}*P* < 0.05 valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo Sham. [#]*P* < 0.05 valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo OVX.

5.2. Pressão arterial sistólica

No registro de pressão arterial sistólica (PAS), foi evidenciado que os tratamentos com E1 ($124,5 \pm 1,01$ mmHg) ou E2 ($134,9 \pm 4,08$ mmHg) reverteram o aumento na PAS do grupo de ratas OVX ($145,3 \pm 0,55$ mmHg), retomando valores próximos àqueles apresentados pelo grupo Sham ($130,9 \pm 0,76$ mmHg) (Figura 4).

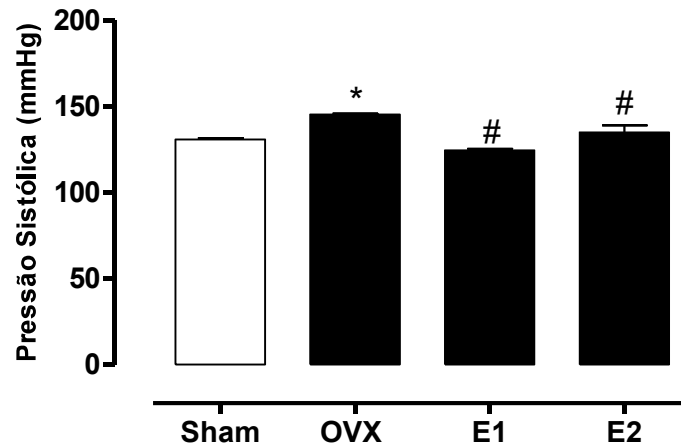


Figura 3 - PAS de ratas dos grupos Sham, OVX, OVX tratadas com E1 e OVX tratadas com E2. Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média de 5 a 6 animais por grupo. Foi utilizado o teste ANOVA de uma via para análise. * $P < 0.05$ valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo Sham. # $P < 0.05$ valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo de ratas OVX.

Tabela 2. Valores de PAS em mmHg de ratas dos grupos Sham, OVX, OVX tratadas com E1 e OVX tratadas com E2

	Pressão arterial sistólica (mmHg)	N
Sham	130,9 ± 0,76	6
OVX	145,3 ± 0,55 [*]	5
E1	124,5 ± 1,01 [#]	6
E2	134,9 ± 4,08 [#]	6

Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média de 5 a 6 animais por grupo. Foi utilizado o teste ANOVA de uma via para análise. ^{*}*P* < 0.05 valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo Sham. [#]*P* < 0.05 valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo OVX.

5.3. Pressão arterial diastólica

No registro de pressão arterial diastólica (PAD) foi evidenciado que os grupos de animais tratados com E1 ($90,1 \pm 1,00$ mmHg) ou E2 ($95,42 \pm 0,72$ mmHg) reverteram o aumento na PAD apresentado no grupo de ratas OVX ($99,75 \pm 1,00$ mmHg), retomando valores próximos aos apresentados pelo grupo Sham ($93,7 \pm 1,67$ mmHg) (Figura 5).

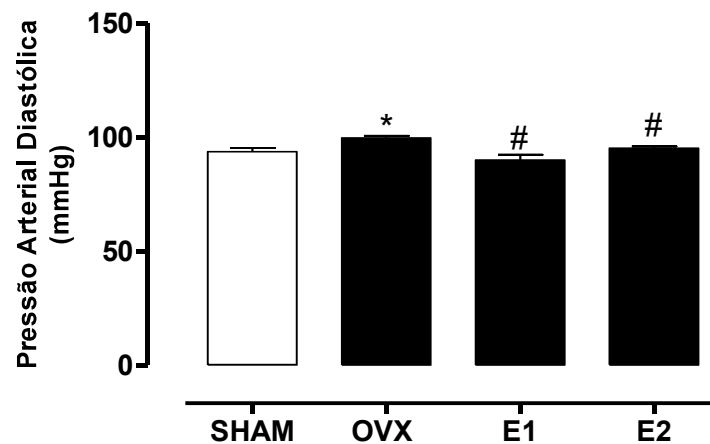


Figura 4 - PAD de ratas dos grupos Sham, OVX, OVX tratadas com E1 e OVX tratadas com E2. Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média de 5 a 6 animais por grupo. Foi utilizado o teste ANOVA de uma via para análise. * $P < 0.05$ valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo Sham. # $P < 0.05$ valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo OVX.

Tabela 3. Valores de PAD em mmHg de ratas dos grupos Sham, OVX, OVX tratadas com E1 e OVX tratadas com E2

	Pressão arterial diastólica (mmHg)	n
Sham	93,7 ± 1,67	6
OVX	99,7 ± 1,00 [*]	5
E1	90,1 ± 2,31 [#]	6
E2	95,42 ± 0,72 [#]	6

Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média de 5 a 6 animais por grupo. Foi utilizado o teste ANOVA de uma via para análise. ^{*}*P* < 0.05 valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo Sham. [#]*P* < 0.05 valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo OVX.

5.4. Pressão arterial média

A pressão arterial média (PAM) foi menor mediante tratamento com E1 ($101,1 \pm 2,12$ mmHg) ou E2 ($107,2 \pm 1,61$ mmHg) quando comparados ao grupo de ratas OVX ($115,7 \pm 1,70$ mmHg), retomando valores próximos ao grupo Sham ($104,1 \pm 2,07$ mmHg) (Figura 5).

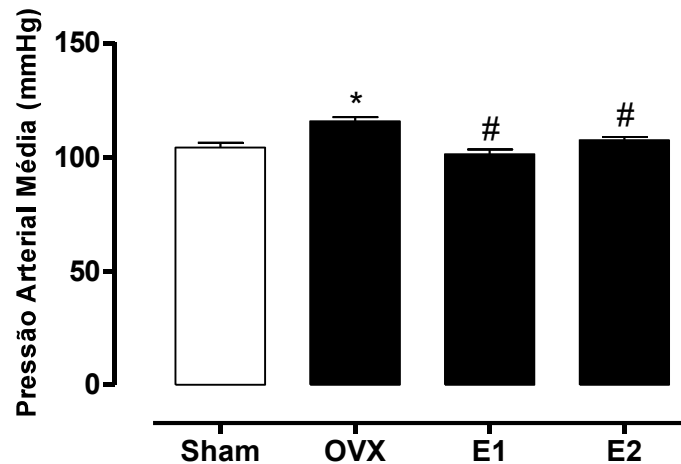


Figura 5 - PAM de ratas dos grupos Sham, OVX, OVX tratadas com E1 e OVX tratadas com E2. Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média de 5 a 6 animais por grupo. Foi utilizado o teste ANOVA de uma via para análise. * $P < 0.05$ valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo Sham. # $P < 0.05$ valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo de ratas OVX.

Tabela 4. Valores de PAM em mmHg de ratas dos grupos Sham, OVX, OVX tratadas com E1 e OVX tratadas com E2

	PAM (mmHg)	N
Sham	104,1 ± 2,07	6
OVX	115,7 ± 1,70 [*]	5
E1	101,1 ± 2,12 [#]	6
E2	107,2 ± 1,61 [#]	6

Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média de 5 a 6 animais por grupo. Foi utilizado o teste ANOVA de uma via para análise. ^{*}*P* < 0.05 valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo Sham. [#]*P* < 0.05 valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo OVX.

5.5. Frequência Cardíaca

Na mensuração da frequência cardíaca (FC) (bpm), não foi evidenciada diferença entre os grupos Sham ($290,6 \pm 16,04$), OVX ($313,5 \pm 10,51$), E1 ($311,9 \pm 8,15$) e E2 ($335,5 \pm 8,50$) (Figura 6).

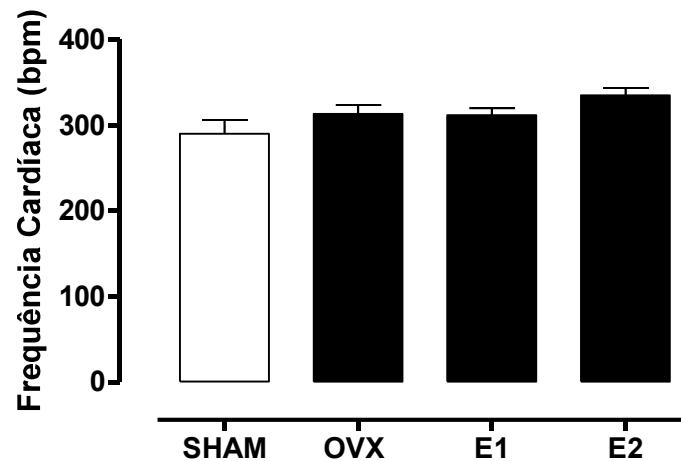


Figura 6 – FC (bpm) de ratas dos grupos Sham, OVX, OVX tratadas com E1 e OVX tratadas com E2. Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média de 5 a 6 animais por grupo. Foi utilizado o teste ANOVA de uma via para análise.

Tabela 5. FC (bpm) de ratas dos grupos Sham, OVX, OVX tratadas com E1 e OVX tratadas com E2

	BPM	n
Sham	290,6 ± 16,04	6
OVX	313,5 ± 10,51	5
E1	311,9 ± 8,15	6
E2	335,5 ± 8,50	6

Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média de 5 a 6 animais por grupo.

5.6. Massa uterina

A remoção dos ovários promoveu redução significativa da massa relativa do útero das ratas OVX ($0,17 \pm 0,01$ g) quando comparado com as ratas que não tiveram os ovários removidos ($0,57 \pm 0,05$ g). Nos grupos tratados observou-se aumento na massa uterina, sendo estes valores significativos tanto para o grupo tratado com E1 ($0,62 \pm 0,06$ g) quanto com E2 ($0,58 \pm 0,06$ g) (Figura 7).

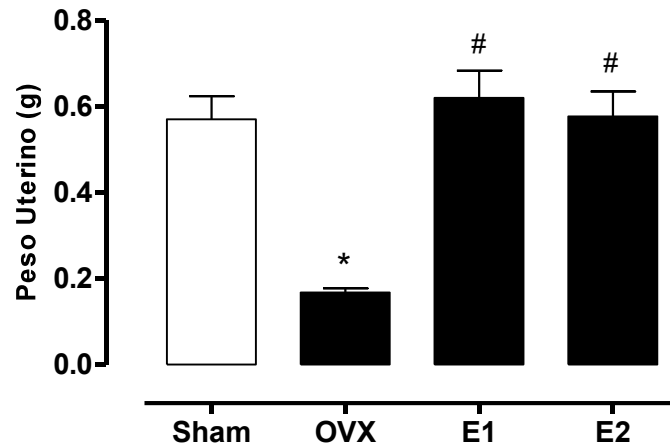


Figura 7 - Massa uterina de ratas dos grupos Sham, OVX, OVX tratadas com E1 e OVX tratadas com E2. Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média de 5 a 6 animais por grupo. Foi utilizado o teste ANOVA de uma via para análise. * $P < 0.05$ valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo Sham. # $P < 0.05$ valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo de ratas OVX.

Tabela 6. Massa uterina de ratas em gramas (g) dos grupos Sham, OVX, OVX tratadas com E1 e OVX tratadas com E2

	Útero (g)	n
Sham	0,57 ± 0,05	6
OVX	0,17 ± 0,01 [*]	5
E1	0,62 ± 0,06 [#]	6
E2	0,58 ± 0,06 [#]	6

Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média de 5 a 6 animais por grupo. Foi utilizado o teste ANOVA de uma via para análise. ^{*}*P* < 0.05 valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo Sham. [#]*P* < 0.05 valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo OVX.

5.7. Massa do coração

Ao final do tratamento, analisando a massa do coração, não foi evidenciada diferença em seus valores entre os grupos de ratas Sham ($0,95 \pm 0,01$ g), OVX ($0,99 \pm 0,04$ g), E1 ($0,86 \pm 0,04$ g) e E2 ($0,93 \pm 0,04$ g) (Figura 8).

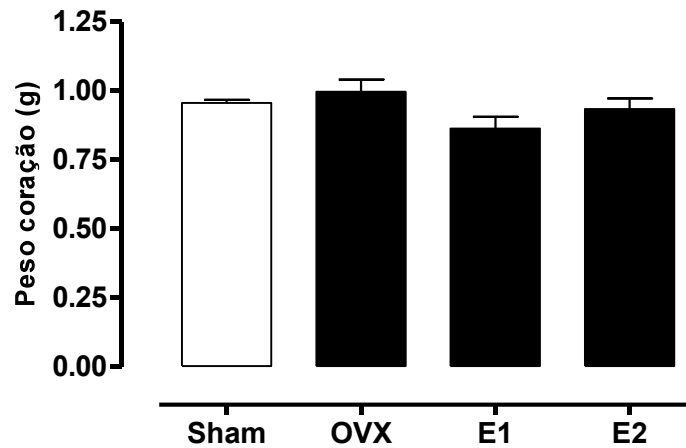


Figura 8 – Massa do coração de ratas dos grupos Sham, OVX, OVX tratadas com E1 e OVX tratadas com E2. Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média de 5 a 6 animais por grupo.

Tabela 7. Massa do coração em gramas (g) de ratas dos grupos Sham, OVX, OVX tratadas com E1 e OVX tratadas com E2

	Coração (g)	n
Sham	0,95 ± 0,01	6
OVX	0,99 ± 0,04	5
E1	0,86 ± 0,04	6
E2	0,93 ± 0,04	6

Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média de 5 a 6 animais por grupo.

5.8. Gordura retroperitoneal

O tratamento com E1 ($3,09 \pm 0,35$ g) reduziu a massa da gordura retroperitoneal de modo semelhante ao tratamento com E2 ($3,76 \pm 0,39$ g), quando comparado ao grupo de ratas OVX, onde a ausência de tratamento fez com que houvesse aumento significativo na massa da gordura retroperitoneal ($8,54 \pm 0,48$ g) (Figura 9).

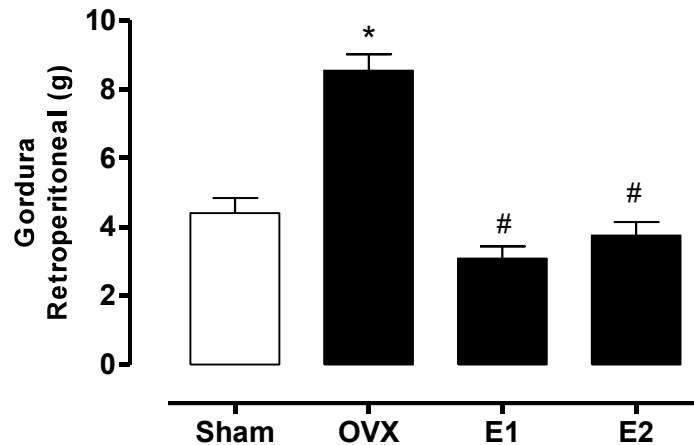


Figura 9 – Massa da gordura retroperitoneal de ratas dos grupos Sham, OVX, OVX tratadas com estrona (E1) e OVX tratadas com 17β -estradiol (E2). Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média de 5 a 6 animais por grupo. Foi utilizado o teste ANOVA de uma via para análise. * $P < 0.05$ valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo Sham. # $P < 0.05$ valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo de ratas OVX.

Tabela 8. Massa da gordura retroperitoneal em gramas (g) de ratas dos grupos Sham, OVX, OVX tratadas com E1 e OVX tratadas com E2

	Gordura retroperitoneal (g)	n
Sham	4,39 ± 0,44	6
OVX	8,54 ± 0,48 [*]	5
E1	3,09 ± 0,35 [#]	6
E2	3,76 ± 0,39 [#]	6

Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média de 5 a 6 animais por grupo. Foi utilizado o teste ANOVA de uma via para análise. ^{*}*P* < 0.05 valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo Sham. [#]*P* < 0.05 valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo OVX.

5.9. Níveis séricos de colesterol total e LDL

Nos grupos tratados, observou-se redução nos níveis séricos de colesterol total e LDL, sendo estes valores significativamente diferentes tanto do grupo tratado com E1 ($46,58 \pm 4,90$; $26,35 \pm 2,81$ mg/dL) quanto com E2 ($69,41 \pm 5,08$; $34,88 \pm 2,98$ mg/dL), quando comparados ao grupo OVX em que a ovariectomia promoveu aumento significativo nos níveis séricos destes parâmetros bioquímicos nas ratas OVX ($77,40 \pm 7,86$; $38,69 \pm 3,51$ mg/dL, respectivamente). Os valores apresentados com o tratamento são semelhantes ao grupo Sham ($47,67 \pm 3,75$; $21,77 \pm 2,43$ mg/dL) (Figura 10).

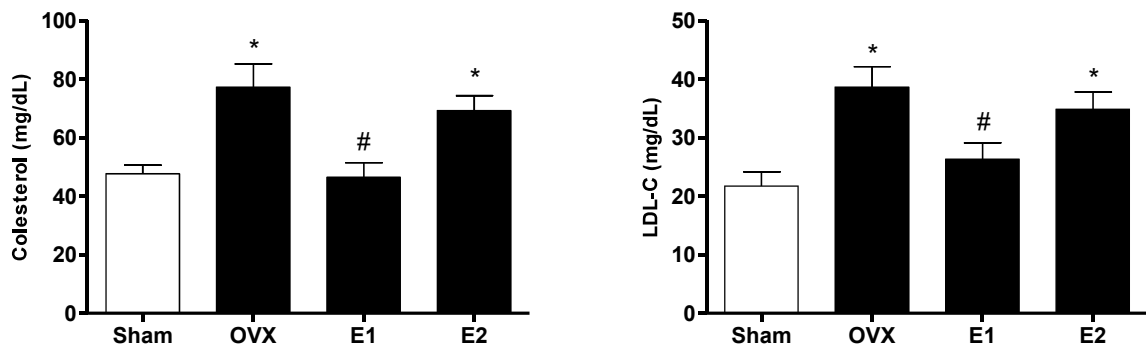


Figura 10 - Colesterol total e LDL de ratas dos grupos Sham, OVX, OVX tratadas com E1 e OVX tratadas com E2. Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média de 5 a 6 animais por grupo. Foi utilizado o teste ANOVA de uma via para análise. * $P < 0.05$ valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo Sham. # $P < 0.05$ valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo de ratas OVX.

Tabela 9. Níveis séricos de colesterol total e LDL (mg/dL) de ratas dos grupos Sham, OVX, OVX tratadas com E1 e OVX tratadas com E2

	Colesterol total (mg/dL)	LDL (mg/dL)	n
Sham	47,67 ± 3,75	21,77 ± 2,43	6
OVX	77,40 ± 7,86 [*]	38,69 ± 3,51 [*]	5
E1	46,58 ± 4,90 [#]	26,35 ± 2,81 [#]	6
E2	69,41 ± 5,08 [#]	34,88 ± 2,98 [#]	6

Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média de 5 a 6 animais por grupo. Foi utilizado o teste ANOVA de uma via para análise. ^{*}*P* < 0.05 valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo Sham. [#]*P* < 0.05 valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo OVX.

5.10. Níveis séricos de 17 β -estradiol

Nos grupos tratados observou-se aumento nos níveis de 17 β -estradiol, sendo estes valores significativamente diferentes tanto no grupo tratado com E1 ($26,43 \pm 3,52$ pg/mL) quanto E2 ($23,73 \pm 3,69$ pg/mL), valores aumentados tanto pela comparação com o grupo Sham em estro fisiológico ($5,71 \pm 0,63$ pg/mL) e ao grupo OVX em que a ovariectomia reduziu os níveis séricos de 17 β -estradiol das ratas OVX ($14,55 \pm 0,59$ pg/mL) (Figura 11).

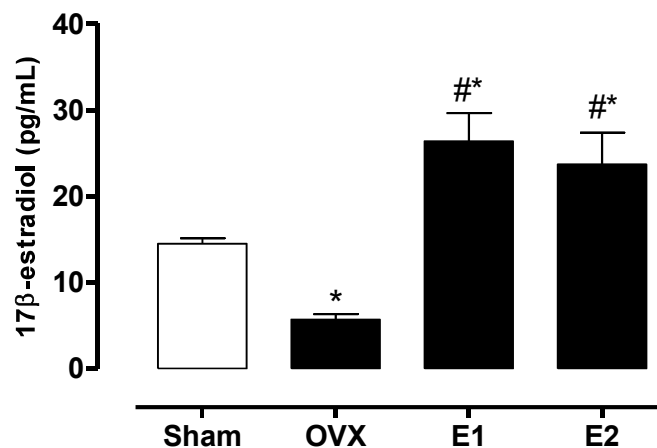


Figura 11 - Níveis séricos de 17 β -estradiol de ratas dos grupos Sham, OVX, OVX tratadas com E1 e OVX tratadas com E2. Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média de 5 a 6 animais por grupo. Foi utilizado o teste ANOVA de uma via para análise. * $P < 0.05$ valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo Sham. # $P < 0.05$ valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo de ratas OVX.

Tabela 10. Níveis séricos de 17 β -estradiol (pg/mL) de ratas dos grupos Sham, OVX, OVX tratadas com E1 e OVX tratadas com E2

	17 β -estradiol (pg/mL)	n
Sham	14,55 $\pm$ 0,59	6
OVX	5,71 $\pm$ 0,63 [*]	5
E1	26,43 $\pm$ 3,52 ^{*#}	6
E2	23,73 $\pm$ 3,69 ^{*#}	6

Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média de 5 a 6 animais por grupo. Foi utilizado o teste ANOVA de uma via para análise. ^{*}*P* < 0.05 valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo Sham. [#]*P* < 0.05 valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo OVX.

5.11. Reatividade à fenilefrina em preparações de aorta torácica com endotélio vascular

A resposta máxima (Rmax) vasoconstritora à fenilefrina, agonista α_1 adrenérgico, foi aumentada nos segmentos arteriais do grupo de ratas OVX ($2,27 \pm 0,10$ g) quando comparada ao grupo Sham ($1,45 \pm 0,16$ g). Os tratamentos com E1 ($1,76 \pm 0,09$ g) ou E2 ($1,54 \pm 0,09$ g) foram capazes de normalizar essa alteração. Avaliando a sensibilidade (pEC50), não foi apresentado diferença entre os grupos Sham ($6,74 \pm 0,21$) e OVX ($6,38 \pm 0,12$). Entretanto, os grupos tratados com E1 ($7,21 \pm 0,10$) e E2 ($7,04 \pm 0,10$) apresentaram valores menores quando comparados ao grupo OVX (Tabela 11).

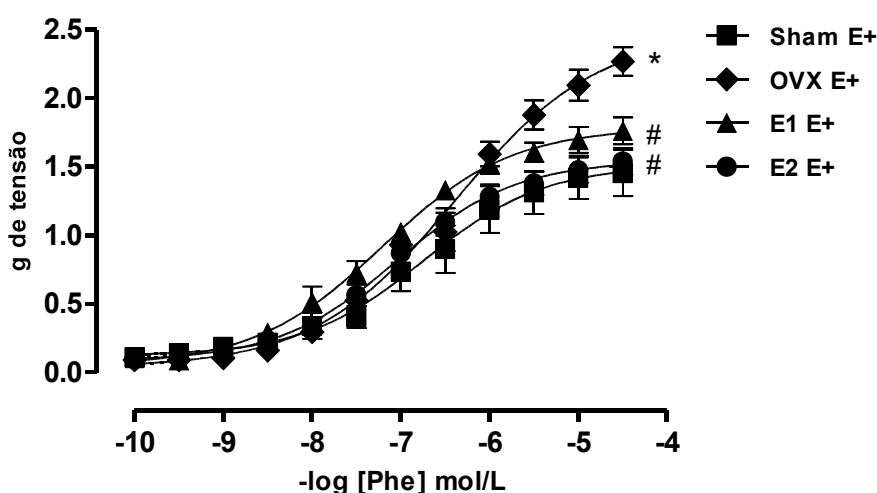


Figura 12 - Curvas concentração resposta para fenilefrina em aorta torácica de ratas Wistar com endotélio nos grupos Sham, OVX, OVX tratadas com E1 e OVX tratadas com E2. Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média de 5 a 6 animais por grupo. Foi utilizado o teste ANOVA de uma via para análise. * $P < 0.05$ valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo Sham. # $P < 0.05$ valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo de ratas OVX.

Tabela 11. Valores de Rmax das curvas concentração efeito para fenilefrina em aorta torácica nos grupos Sham, OVX, OVX tratadas com E1 e OVX tratadas com E2

	Rmáx (g)
Sham (n=6)	1,45 ± 0,16
OVX (n=5)	2,27 ± 0,10 [*]
E1 (n=6)	1,76 ± 0,09 [#]
E2 (n=6)	1,54 ± 0,09 [#]

Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média de 5 a 6 animais por grupo. Foi utilizado o teste ANOVA de uma via para análise. ^{*}*P* < 0.05 valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo Sham. [#]*P* < 0.05 valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo OVX.

5.12. Reatividade à fenilefrina em preparações de aorta torácica sem endotélio vascular

A resposta à fenilefrina em preparações desprovidas de endotélio não apresentou diferença entre os grupos Sham, OVX, OVX tratadas com E1 e OVX tratadas com E2 (Figura 10), bem como na sensibilidade entre os grupos (Tabela 12).

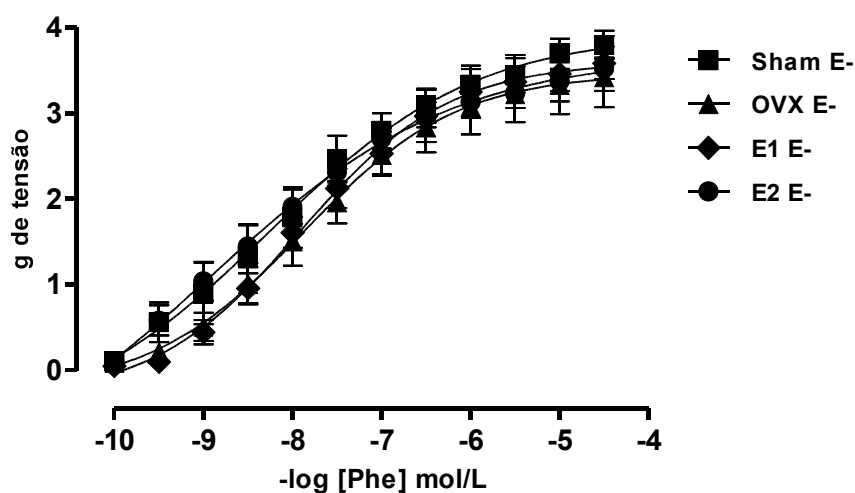


Figura 13 - Curvas concentração resposta para fenilefrina em aorta torácica de ratas Wistar sem endotélio nos grupos Sham, OVX, OVX tratadas com E1 e OVX tratadas com E2. Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média de 5 a 6 animais por grupo.

Tabela 12. Valores de Rmax das curvas concentração efeito para fenilefrina em aorta torácica sem endotélio nos grupos Sham, OVX, OVX tratadas com E1 e OVX tratadas com E2

	Rmax (g)
Sham (n=6)	3,80 ± 0,16
OVX (n=5)	3,42 ± 0,36
E1 (n=6)	3,59 ± 0,32
E2 (n=6)	3,53 ± 0,13

Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média de 5 a 6 animais por grupo.

5.13. Relaxamento induzido por nitroprussiato de sódio (NPS)

O relaxamento independente do endotélio foi avaliado por meio da curva concentração resposta para o NPS. Todos os grupos estudados apresentaram semelhante efeito máximo na curva de NPS (Figura 18), e semelhante pEC_{50} (Tabela 17).

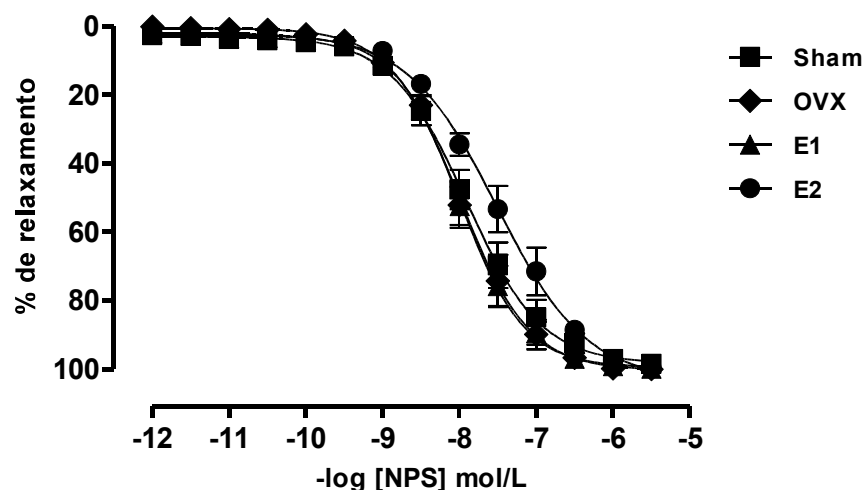


Figura 14 - Curvas concentração resposta para NPS para avaliação do relaxamento dependente do endotélio em aorta torácica de ratas Wistar nos grupos Sham, OVX, OVX tratadas com E1 e OVX tratadas com E2. Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média de 5 a 6 animais por grupo.

Tabela 13. Valores de Rmax e pEC₅₀ das curvas concentração efeito para NPS em aorta torácica nos grupos Sham, OVX, OVX tratadas com E1 e OVX tratadas com E2

	Rmax (%)
Sham (n=6)	98,51 ± 0,97
OVX (n=5)	100,00 ± 0,01
E1 (n=6)	99,95 ± 0,05
E2 (n=6)	99,66 ± 0,34

Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média de 5 a 6 animais por grupo.

5.14. Relaxamento induzido por acetilcolina em preparações de aorta torácica com endotélio vascular

O relaxamento mediado pelo endotélio foi avaliado por meio da curva concentração resposta para ACh, apresentando melhora no relaxamento mediante o tratamento com E1 ($96,24 \pm 3,22$ %) ou E2 ($97,21 \pm 1,29$ %), diferente do grupo OVX em que a Rmax foi diminuída ($62,10 \pm 7,53$ %) quando comparado ao grupo Sham ($98,85 \pm 1,15$ %) (Tabela 13).

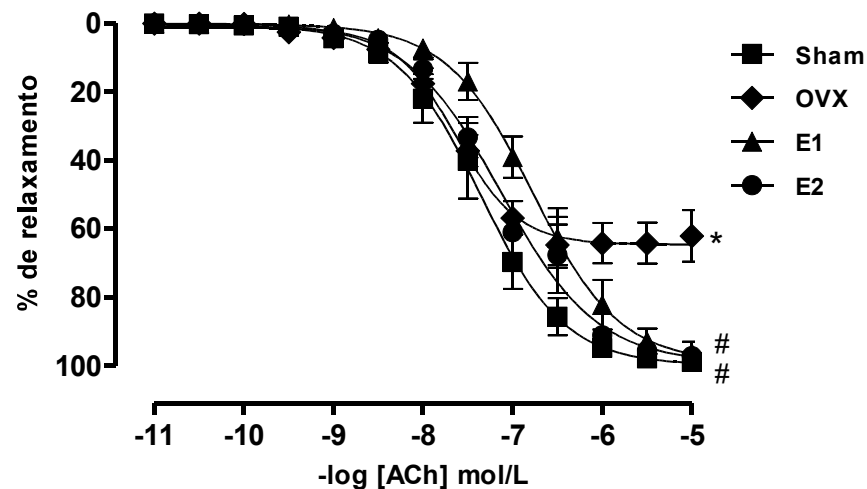


Figura 15 - Curvas concentração resposta para ACh para avaliação do relaxamento dependente do endotélio em aorta torácica de ratas Wistar nos grupos Sham, OVX, OVX tratadas com E1 e OVX tratadas com E2. Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média de 5 a 6 animais por grupo. Foi utilizado o teste ANOVA de uma via para análise. * $P < 0.05$ valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo Sham. # $P < 0.05$ valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo de ratas OVX.

Tabela 14. Valores de Rmax e pEC₅₀ das curvas concentração efeito à ACh em aorta torácica nos grupos Sham, OVX, OVX tratadas com E1 e OVX tratadas com E2

	Rmax (%)	pEC ₅₀
Sham (n=6)	98,85 ± 1,15	7,35 ± 0,07
OVX (n=5)	62,10 ± 7,53 [*]	7,63 ± 0,08
E1 (n=6)	96,24 ± 3,22 [#]	6,77 ± 0,07
E2 (n=6)	97,21 ± 1,29 [#]	7,12 ± 0,07

Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média de 5 a 6 animais por grupo. Foi utilizado o teste ANOVA de uma via para análise. ^{*}P < 0.05 valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo Sham. [#]P < 0.05 valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo OVX.

5.15. Avaliação da resposta vasodilatadora à ACh na presença da enzima catalase (CAT)

A enzima CAT não exerceu efeito na curva de concentração-resposta e na R_{max} da ACh nos anéis de aorta com endotélio dos grupos grupo Sham ($96,21 \pm 1,56 \%$), E1 ($99,13 \pm 0,87 \%$) ou E2 ($98,41 \pm 0,92 \%$) quando comparado ao efeito promovido pela ACh na ausência de CAT ($98,85 \pm 1,15$; $96,24 \pm 3,22$; $97,21 \pm 1,29 \%$, respectivamente). Já no grupo OVX, a incubação aguda com CAT aumentou a R_{max} induzida pela ACh ($99,07 \pm 0,64 \%$) quando comparado ao efeito promovido pela ACh na ausência da enzima ($62,10 \pm 7,52 \%$) (Figura 15).

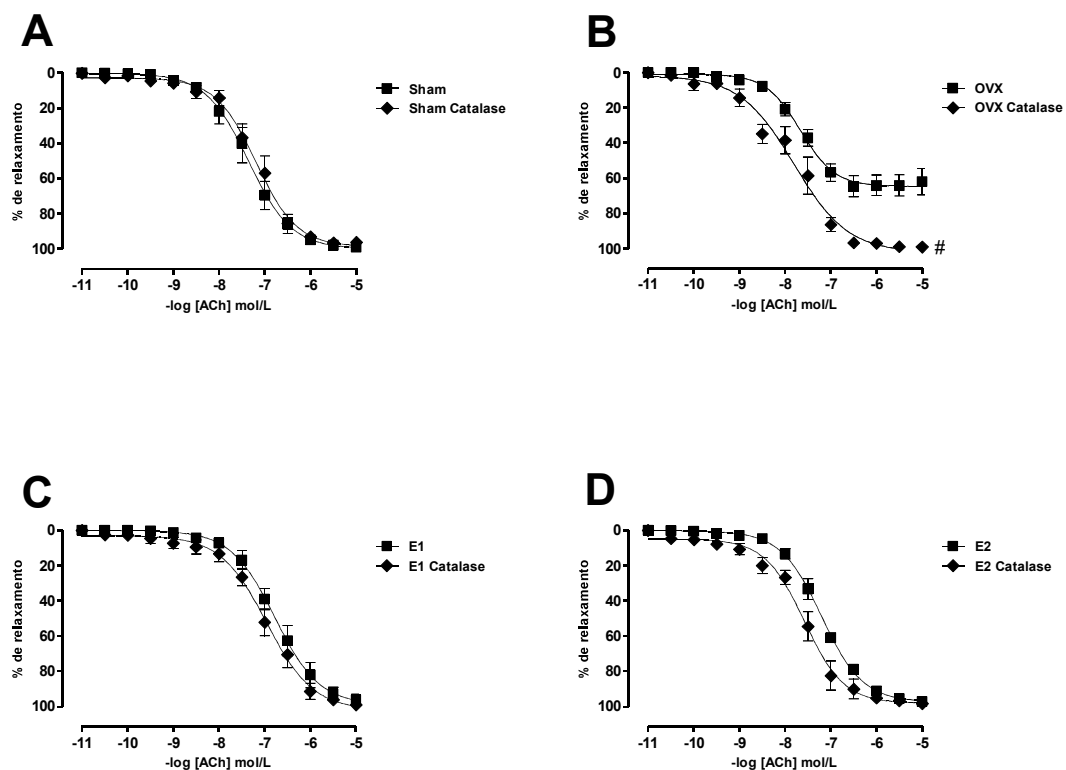


Figura 16 - Curvas concentração resposta para ACh para avaliação do relaxamento dependente do endotélio em aorta torácica de ratas Wistar na ausência ou incubados agudamente com CAT nos grupos Sham (A), OVX (B), OVX tratadas com E1 (C) e OVX tratadas E2 (D). Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média de 5 a 6 animais por grupo. Foi utilizado o teste “t” de student para análise. $^{\#}P < 0.05$ valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo de ratas OVX sem inibidor.

Tabela 15. Valores de Rmax das curvas concentração efeito à ACh em aorta torácica nos grupos Sham, OVX, OVX tratadas com E1 e OVX tratadas com E2, na ausência ou presença de CAT

	Rmax sem CAT (%)	Rmax com CAT (%)
Sham (n=6)	98,85 ± 1,15	96,21 ± 1,56
OVX (n=5)	62,10 ± 7,53 [*]	99,07 ± 0,64 [§]
E1 (n=6)	96,24 ± 3,22 [#]	99,13 ± 0,87
E2 (n=6)	97,21 ± 1,29 [#]	98,41 ± 0,92

Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média de 5 a 6 animais por grupo. Foi utilizado o teste ANOVA de uma via ou “t” de student para comparação entre o efeito sem e com CAT. ^{*}*P* < 0.05 valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo Sham. [#]*P* < 0.05 valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo OVX. [§]*P* < 0.05 valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo OVX sem catalase.

5.16. Avaliação da resposta vasodilatadora à ACh na presença da enzima superóxido dismutase (SOD)

A enzima SOD não exerceu efeito na curva concentração-resposta e na R_{max} à ACh nos anéis de aorta com endotélio dos grupos grupo Sham ($93,83 \pm 1,78 \%$), E1 ($97,86 \pm 0,99 \%$) ou E2 ($96,14 \pm 1,91 \%$) quando comparado ao efeito promovido pela ACh na ausência de SOD ($98,85 \pm 1,15$; $96,24 \pm 3,22$; $97,21 \pm 1,29 \%$, respectivamente). Já no grupo OVX a incubação aguda com SOD aumentou a R_{max} induzida pela ACh ($96,14 \pm 1,90 \%$) quando comparado ao efeito promovido pela ACh na ausência da enzima ($62,10 \pm 7,52 \%$) (Figura 16) (Tabela 15).

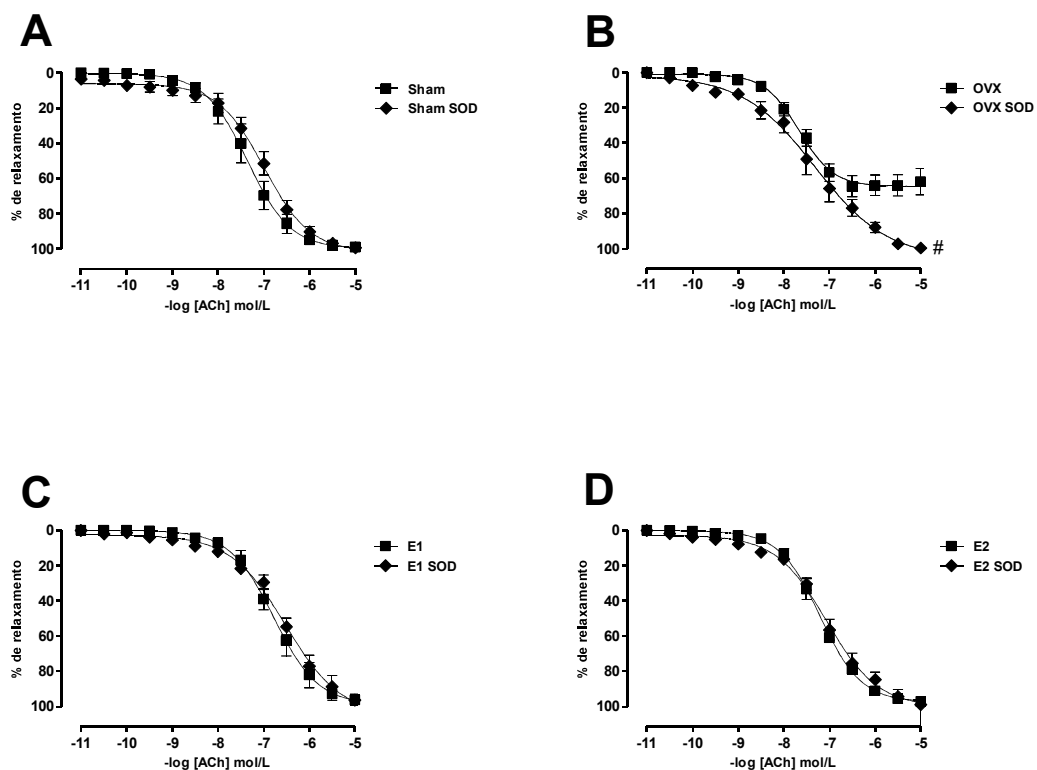


Figura 17 - Curvas concentração resposta para ACh para avaliação do relaxamento dependente do endotélio em aorta torácica de ratas Wistar na ausência ou incubados agudamente com SOD nos grupos Sham (A), OVX (B), OVX tratadas com E1 (C) e OVX tratadas com E2 (D). Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média de 5 a 6 animais por grupo. Foi utilizado o teste “t” de student para análise. $^{\#}P < 0.05$ valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo de ratas OVX sem inibidor.

Tabela 16. Valores de Rmax das curvas concentração efeito à ACh em aorta torácica nos grupos Sham, OVX, OVX tratadas com E1 e OVX tratadas com E2, na ausência ou presença de SOD

	Rmax sem SOD (%)	Rmax com SOD (%)
Sham (n=6)	98,85 ± 1,15	93,83 ± 1,78
OVX (n=5)	62,10 ± 7,53 [*]	96,14 ± 1,90 [§]
E1 (n=6)	96,24 ± 3,22 [#]	97,86 ± 0,99
E2 (n=6)	97,21 ± 1,29 [#]	96,14 ± 1,91

Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média de 5 a 6 animais por grupo. Foi utilizado o teste ANOVA de uma via ou “t” de student para comparação entre o efeito sem e com SOD. ^{*}*P* < 0.05 valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo Sham. [#]*P* < 0.05 valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo OVX. [§]*P* < 0.05 valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo OVX sem SOD.

5.17. Avaliação da resposta vasodilatadora à ACh na presença do inibidor da NADPH oxidase

O inibidor da NADPH oxidase, apocinina, não exerceu efeito na curva concentração-resposta e na R_{max} à ACh nos anéis de aorta com endotélio dos grupos grupo Sham ($99,19 \pm 0,59$ %), E1 ($96,34 \pm 2,35$ %) ou E2 ($98,97 \pm 1,03$ %) quando comparado ao efeito promovido pela ACh na ausência de apocinina ($98,85 \pm 1,15$; $96,24 \pm 3,22$; $97,21 \pm 1,29$ %, respectivamente). Já no grupo OVX a incubação aguda com apocinina aumentou a R_{max} da resposta vasodilatadora induzida pela ACh ($99,60 \pm 0,24$ %) quando comparado ao efeito promovido pela ACh na ausência deste inibidor ($62,10 \pm 7,52$ %) (Figura 16) (Tabela 16).

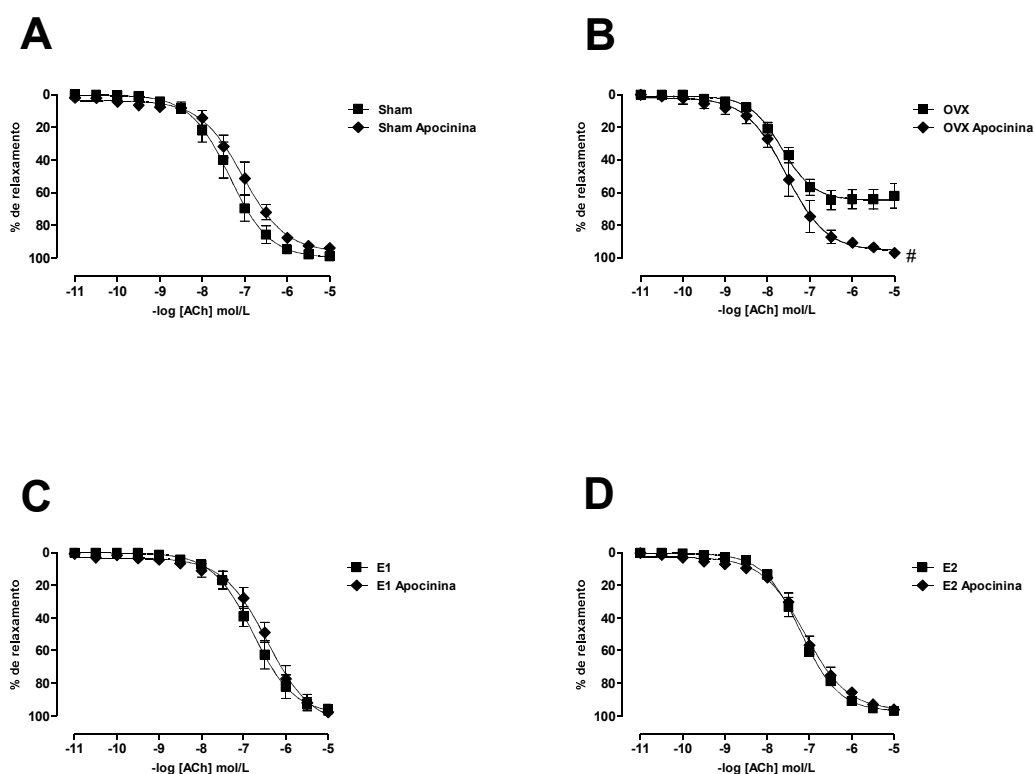


Figura 18 - Curvas concentração resposta para ACh para avaliação do relaxamento dependente do endotélio em aorta torácica de ratas Wistar na ausência ou incubados agudamente com o inibidor da NADPH oxidase, apocinina (APO), nos grupos Sham (A), OVX (B), OVX tratadas com E1 (C) e OVX tratadas com E2 (D). Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média de 5 a 6 animais por grupo. Foi utilizado o teste “t” de student para análise. # $P < 0.05$ valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo de ratas OVX sem inibidor.

Tabela 17. Valores de Rmax das curvas concentração efeito à ACh em aorta torácica nos grupos Sham, OVX, OVX tratadas com E1 e OVX tratadas com E2, na ausência ou presença de apocinina

	Rmax sem apocinina (%)	Rmax com apocinina (%)
Sham (n=6)	98,85 ± 1,15	99,19 ± 0,59
OVX (n=5)	62,10 ± 7,53 [*]	99,60 ± 0,24 [§]
E1 (n=6)	96,24 ± 3,22 [#]	96,34 ± 2,35
E2 (n=6)	97,21 ± 1,29 [#]	98,97 ± 1,03

Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média de 5 a 6 animais por grupo. Foi utilizado o teste ANOVA de uma via ou “t” de student para comparação entre o efeito sem e com apocinina. ^{*}*P* < 0.05 valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo Sham. [#]*P* < 0.05 valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo OVX. [§]*P* < 0.05 valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo OVX sem apocinina.

5.18. Análise da expressão proteica da enzima CAT

O tratamento com E1 atenuou e com E2 restabeleceu o aumento da expressão proteica de CAT em comparação às aortas das ratas OVX que apresentaram expressão da enzima antioxidante CAT comparada com as ratas do grupo Sham (Figura 19).

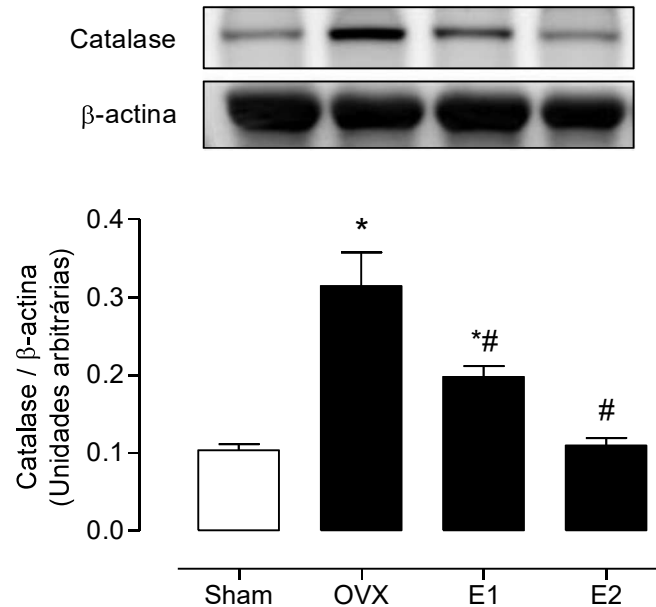


Figura 19 - Expressão da proteína CAT pela técnica de western blotting em aorta torácica com endotélio, de ratas Wistar nos grupos Sham, OVX, OVX tratadas com E1 e OVX tratadas com E2. Painel superior: imagens representativas do imunoblotting para CAT (64 kDa) e β-actina (42 kDa). Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média de 5 a 6 animais por grupo. Foi utilizado o teste ANOVA de uma via para análise. * $P < 0.05$ valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo Sham. # $P < 0.05$ valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo de ratas OVX.

5.19. Análise da expressão proteica das enzimas Cu/Zn-SOD e Mn-SOD

As aortas das ratas OVX dos diferentes grupos experimentais estudados apresentaram expressão das enzimas antioxidantes Cu/Zn- e Mn-SOD. O tratamento com E1 ou E2 restabeleceu a expressão proteica de Cu/Zn-SOD em comparação ao grupo OVX, onde a expressão da enzima Cu/Zn-SOD foi aumentada em comparação ao grupo Sham (Figura 20A). A expressão de Mn-SOD não apresentou diferença entre os grupos experimentais (Figura 20B).

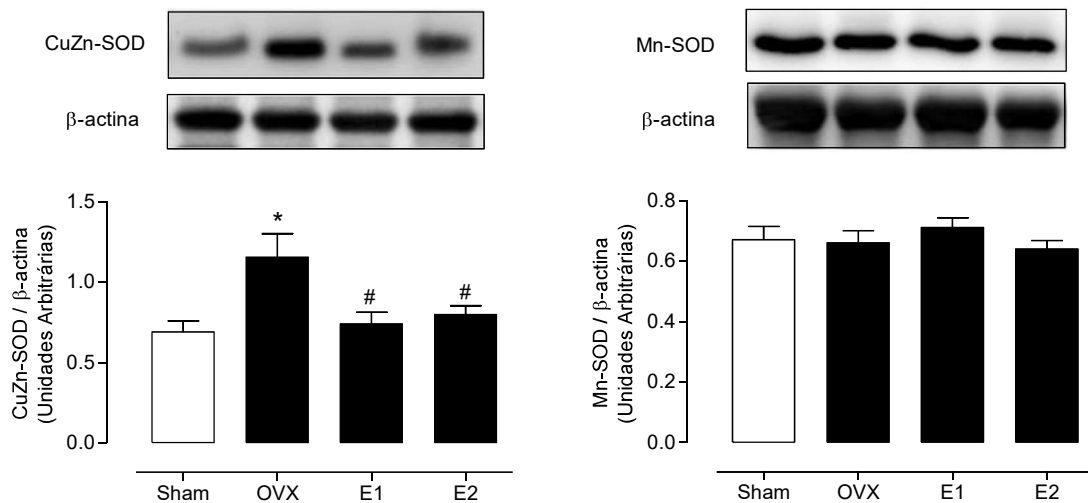


Figura 20 - Expressão das proteínas Cu/Zn e Mn-SOD pela técnica de western blotting em aorta torácica com endotélio, de ratas Wistar nos grupos Sham, OVX, OVX tratadas com E1 e OVX tratadas com E2. Painel superior: imagens representativas do immunoblotting para Cu/Zn-SOD (18 kDa) (A), Mn-SOD (18 kDa) (B) e β -actina (42 kDa). Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média de 5 a 6 animais por grupo. Foi utilizado o teste ANOVA de uma via para análise. * $P < 0.05$ valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo Sham. # $P < 0.05$ valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo de ratas OVX.

5.20. Análise da expressão proteica da enzima NOX-1

As aortas das ratas OVX dos diferentes grupos experimentais estudados apresentaram expressão da enzima NOX-1 (Figura 21), no entanto nenhuma diferença foi verificada entre os grupos experimentais estudados.

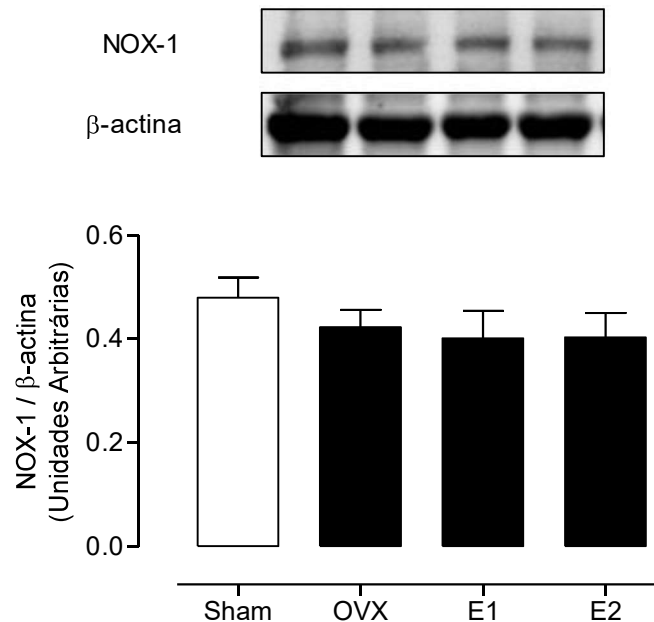


Figura 21 - Expressão da proteína NOX-1 pela técnica de western blotting em aorta torácica com endotélio, de ratas Wistar nos grupos Sham, OVX, OVX tratadas com E1 e OVX tratadas com E2. Painel superior: imagens representativas do immunoblotting para NOX2 (65 kDa) e β -actina (42 kDa). Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média de 5 a 6 animais por grupo.

5.21. Análise da expressão proteica da enzima gp91phox (NOX-2)

As aortas das ratas OVX dos diferentes grupos experimentais estudados apresentaram expressão da enzima gp91phox (Figura 22), no entanto nenhuma diferença foi verificada entre os grupos experimentais estudados.

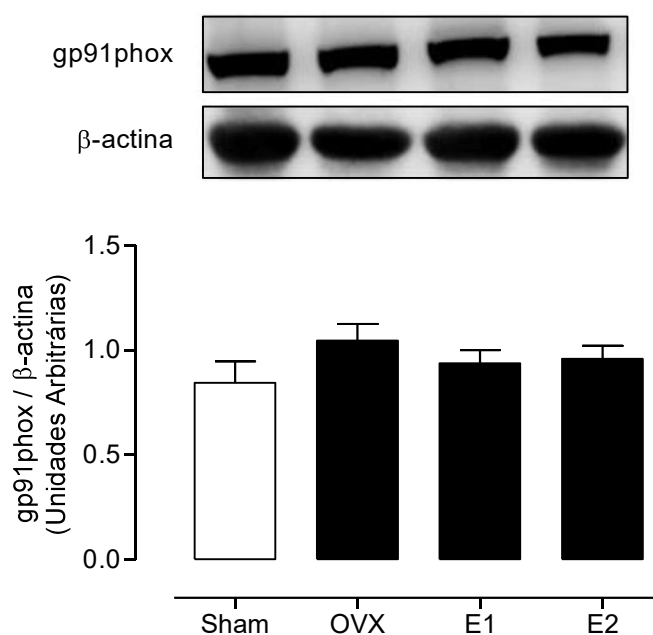


Figura 22 - Expressão da proteína gp91phox pela técnica de western blotting em aorta torácica com endotélio, de ratas Wistar nos grupos Sham, OVX, OVX tratadas com E1 e OVX tratadas com E2. Painel superior: imagens representativas do imunoblotting para gp91phox (65 kDa) e β-actina (42 kDa). Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média de 5 a 6 animais por grupo.

5.22. Análise da expressão proteica da enzima NOX-4

As aortas das ratas OVX dos diferentes grupos experimentais estudados apresentaram expressão da enzima NOX-4. O tratamento com E1, bem como com E2, reduziram a expressão proteica da NOX4 em comparação com o grupo OVX em que a expressão da NOX-4 foi aumentada, valores diferentes do grupo Sham (Figura 23).

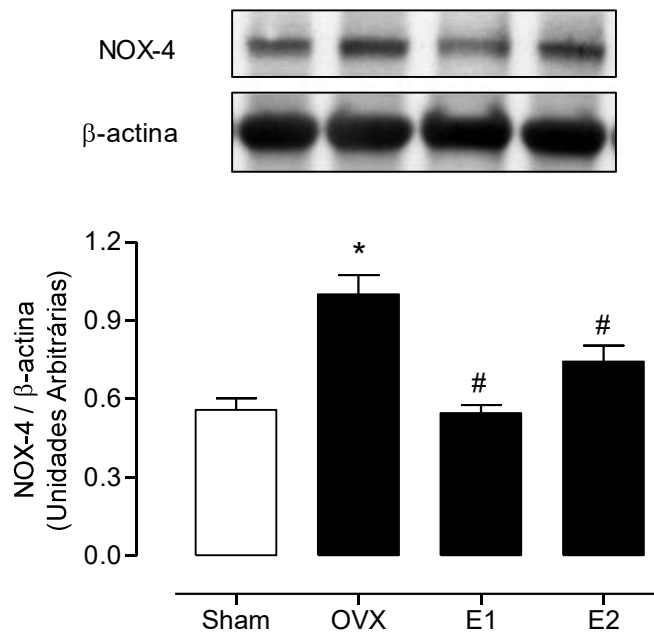


Figura 23 - Expressão da proteína NOX-4 pela técnica de western blotting em aorta torácica com endotélio, de ratas Wistar nos grupos Sham, OVX, OVX tratadas com E1 e OVX tratadas com E2. Painel superior: imagens representativas do immunoblotting para NOX-4 (63 kDa) e β-actina (42 kDa). Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média de 5 a 6 animais por grupo. Foi utilizado o teste ANOVA de uma via para análise. * $P < 0.05$ valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo Sham. # $P < 0.05$ valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo de ratas OVX.

5.23. Atividade da CAT

A atividade da enzima CAT foi restabelecida com o tratamento com E1 nas doses de 15, 150 e 825 µg/kg, demonstrando um efeito dependente de dose. O controle E2 na dose de 15 µg/kg restabeleceu a atividade da CAT, efeito semelhante ao observado com a menor dose de E1. Os valores apresentados pelo grupo Sham foram semelhantes ao grupo E1 na dose de 825 µg/kg (Figura 24).

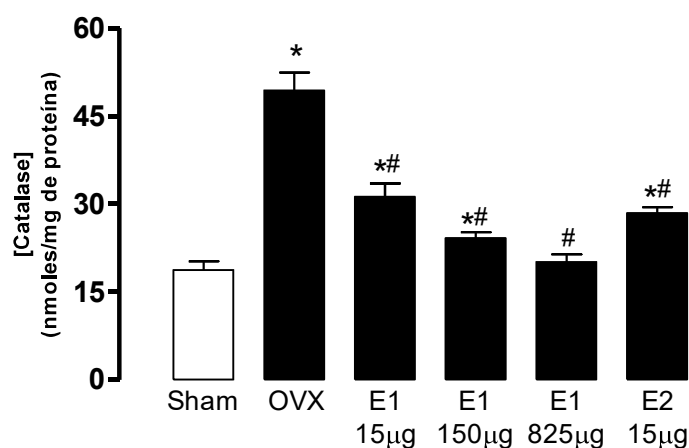


Figura 24 – Atividade da enzima CAT em aorta torácica de ratas Wistar nos grupos Sham, OVX, OVX tratadas com E1 15 µg/kg, OVX tratadas com E1 150 µg/kg, OVX tratadas com E1 825 µg/kg e OVX tratadas com E2 15 µg/kg. Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média de 5 animais por grupo. Foi utilizado o teste ANOVA de uma via para análise. * $P < 0.05$ valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo Sham. # $P < 0.05$ valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo de ratas OVX.

5.24. Atividade da SOD

A atividade da enzima SOD em preparações de aorta torácica dos grupos experimentais estudados foi restabelecida com o tratamento com E1, nas doses de 15, 150 e 825 µg/kg apresentaram redução na atividade desta enzima, do mesmo modo que o controle E2 na dose de 15 µg/kg, quando comparado ao grupo OVX em que sua atividade encontra-se aumentada. Os valores apresentados pelo grupo Sham foram semelhantes ao grupo E1 na dose de 825 µg/kg (Figura 25).

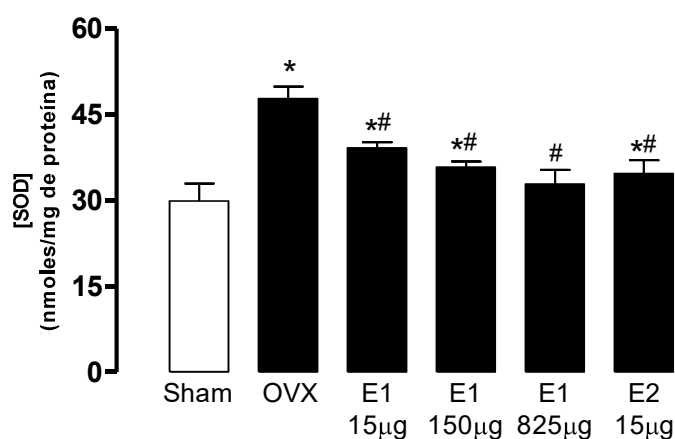


Figura 25 – Atividade da enzima SOD em aorta torácica de ratas Wistar nos grupos Sham, OVX, OVX tratadas com E1 15µg/kg, OVX tratadas com E1 150 µg/kg, OVX tratadas com E1 825 µg/kg e OVX tratadas com E2 15 µg/kg. Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média de 5 animais por grupo. Foi utilizado o teste ANOVA de uma via para análise. * $P < 0.05$ valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo Sham. # $P < 0.05$ valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo de ratas OVX.

5.25. Estudo da geração de EROs na aorta - Lucigenina

A geração aumentada de EROs na aorta torácica de ratas tratadas com E1 foi revertida quando comparado ao grupo OVX, apresentado parâmetros semelhante ao grupo Sham e animais tratados com E2 (Figura 26).

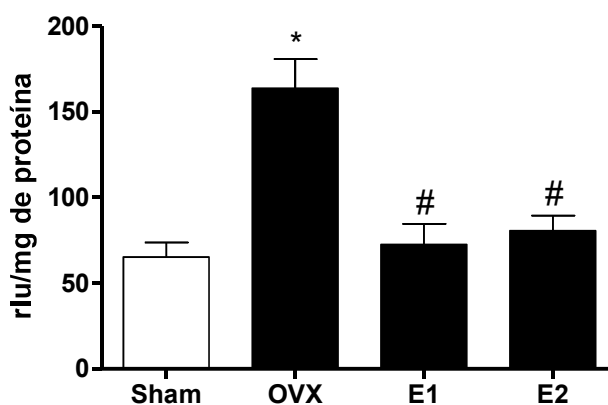


Figura 26 – Estudo da geração de EROs aorta torácica de ratas Wistar nos grupos Sham, OVX, OVX tratadas com E1 15 µg/kg, OVX tratadas com E1 150 µg/kg, OVX tratadas com E1 825 µg/kg e OVX tratadas com E2 15 µg/kg. Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média de 5 animais por grupo. Foi utilizado o teste ANOVA de uma via para análise. * $P < 0.05$ valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo Sham. # $P < 0.05$ valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo de ratas OVX.

5.26. Análise morfométrica

A morfometria demonstrou que o tratamento com E1 reverteu a espessura da parede (Figura 25A) e área do lúmen (Figura 25B) em comparação ao grupo OVX, medidas semelhantes ao grupo Sham e efeito equivalente ao E2.

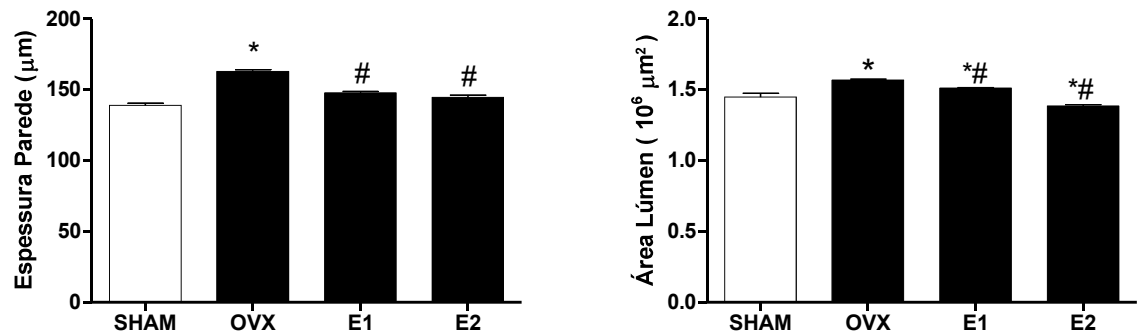


Figura 27 – Representação gráfica da espessura (A) e área do lúmen (B) (µM) de aorta torácica de ratas Wistar nos grupos Sham, OVX, OVX tratadas com E1 e OVX tratadas com E2. Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média de 5 animais por grupo. Foi utilizado o teste ANOVA de uma via para análise. * $P < 0.05$ valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo Sham. # $P < 0.05$ valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo de ratas OVX.

5.27. Colágeno

A análise estereológica para quantificação do colágeno demonstrou que o tratamento com E1 reverteu o aumento deste constituinte celular quando comparado ao grupo OVX, de semelhante modo ao que é visto em ratas em estro fisiológico. O tratamento com E2 demonstrou semelhante efeito, revertendo o aumento de colágeno.

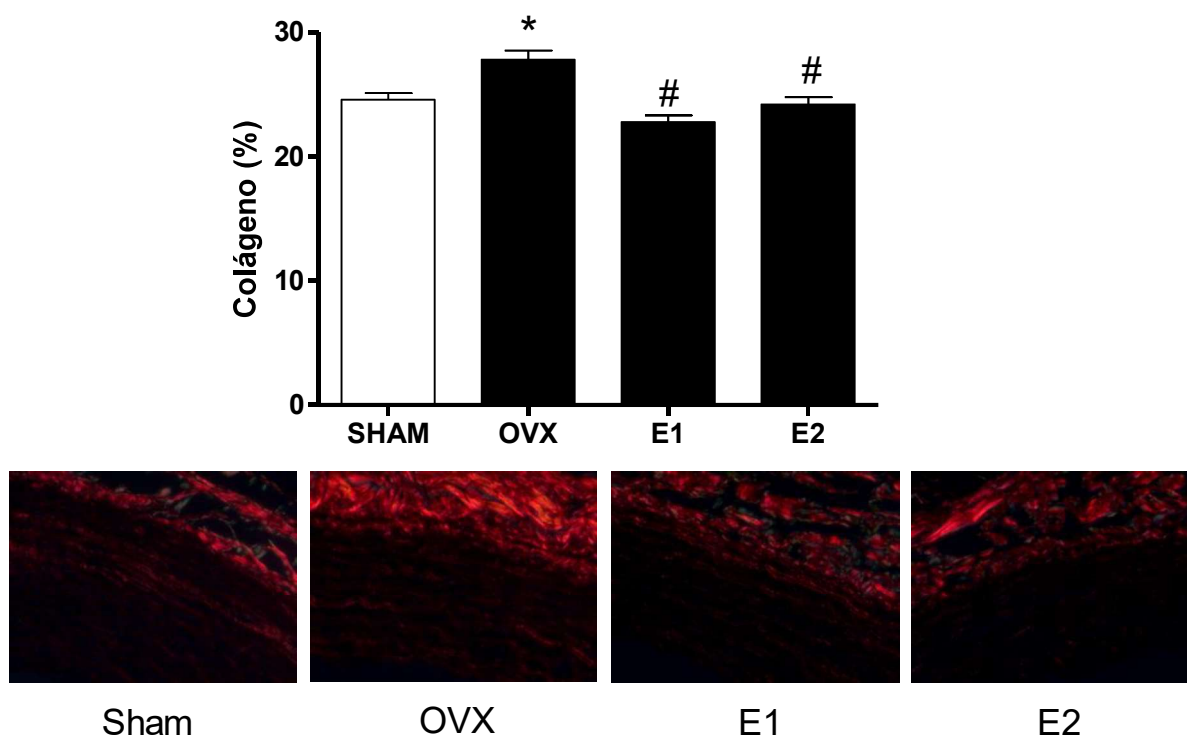


Figura 28 – Representação gráfica da frequência relativa (%) do colágeno em aorta torácica de ratas Wistar nos grupos Sham, OVX, OVX tratadas com E1 e OVX tratadas com E2. Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média de 5 animais por grupo. Foi utilizado o teste ANOVA de uma via para análise. * $P < 0.05$ valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo Sham. # $P < 0.05$ valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo de ratas OVX.

5.28. Elastina

A quantificação de elastina mediante análise estereológica demonstrou que o tratamento com E1 reverteu a diminuição deste constituinte celular frente ao procedimento de OVX, de semelhante modo ao que é visto em ratas em estro fisiológico. O tratamento com E2 demonstrou semelhante efeito, retomando níveis semelhantes aos fisiológicos.

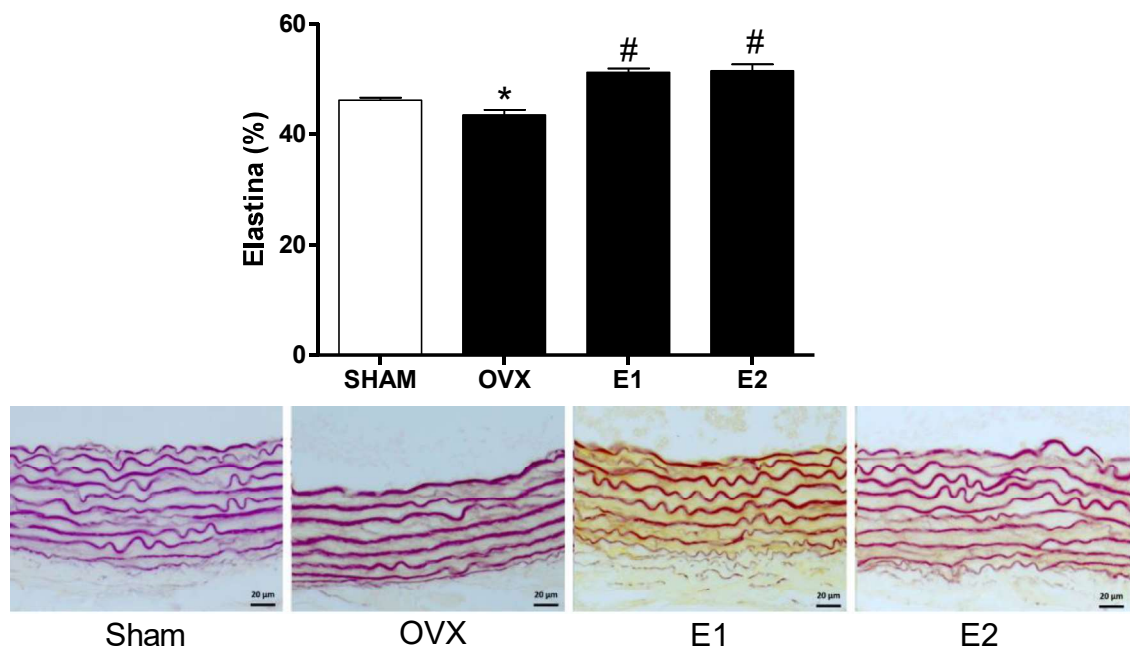


Figura 29 – Representação gráfica da frequência relativa (%) de elastina em aorta torácica de ratas Wistar nos grupos Sham, OVX, OVX tratadas com E1 e OVX tratadas com E2. Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média de 5 animais por grupo. Foi utilizado o teste ANOVA de uma via para análise. * $P < 0.05$ valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo Sham. # $P < 0.05$ valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo de ratas OVX.

DISCUSSÃO

No presente trabalho foi demonstrado o efeito do tratamento crônico com estrona (E1) em modelo experimental de menopausa, a ovariectomia (OVX), condição experimental que promove aumento da pressão arterial (PA), e, adicionalmente disfunção endotelial em ratas Wistar. Foi observado que nestas condições experimentais o tratamento com E1 promoveu redução da PA através da melhora na função endotelial, sendo seu efeito comparável ao do tratamento com 17 β -estradiol (E2), demonstrando que os efeitos vasculoprotetores promovidos por este hormônio contribuem para a reversão das alterações vasculares endotélio-dependentes. Além disso, no tratamento com E1 ou E2 foi verificada diminuição na expressão das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e NADPH oxidase (NOX-4), associado com a diminuição nas atividades enzimáticas de SOD e CAT e com a menor geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), efeitos que também foram observados com o hormônio utilizado como padrão neste estudo, o E2.

Essas informações contribuem para elucidação dos efeitos vasculares promovidos pela E1 durante a reposição hormonal, complementando o estudo prévio realizado pelo grupo em que se demonstrou o mecanismo de ação vasorrelaxante da E1 [120]. A avaliação funcional com a investigação do efeito crônico da E1 permitiu a melhor elucidação dos efeitos genômicos e não-genômicos da E1, corroborando para consolidar os poucos estudos até agora realizados para avaliar as ações vasculares da E1 [120, 129-133]. Este estudo constitui, pela primeira vez, a caracterização do efeito crônico da E1 e, por isso, apresenta relevância por contribuir na melhor compreensão do efeito de medicamentos utilizados na terapia de reposição hormonal (TRH), como o Premarin® - um dos medicamentos mais prescritos para o tratamento e prevenção dos sintomas advindos com a menopausa, e em que a E1 é o seu componente majoritário (~48% de sua composição) [114, 115, 134, 135].

Em relação ao sistema cardiovascular, mulheres pós-menopausa apresentam diminuição abrupta dos níveis plasmáticos de estrogênios, sendo esta, uma das causas da alta prevalência de hipertensão arterial [107]. Reproduzindo experimentalmente condições miméticas que pudessem se assemelhar a cessação da atividade ovariana e alterações fisiológicas advindas nesta condição, foi utilizada

estratégia de remoção cirúrgica dos ovários [136-138]. Neste sentido, ratas Wistar submetidas à OVX apresentaram alterações características e comprovado déficit nos níveis séricos de estrogênios com regressão do peso uterino, aumento do peso corpóreo e gordura retroperitoneal e consequente alteração no perfil lipídico.

Os resultados obtidos associam-se com benefícios que a TRH com E1 pode promover. A eficácia refletiu-se justamente no reestabelecimento das alterações provenientes pela queda nos níveis hormonais [139-142], com isso os efeitos observados com E1 na reversão do peso uterino, diminuição do peso corpóreo, gordura retroperitoneal e perfil lipídico semelhante ao grupo Sham (estro fisiológico), validam a efetividade deste tratamento e, de modo comparativo ao E2 mostrou semelhante efeito, com exceção ao perfil lipídico, onde E1 restabeleceu a níveis semelhantes ao observado nas ratas Sham, o que não é observado com E2 [143].

A queda dos níveis hormonais possui correlação direta com o aumento da pressão arterial [97], o que foi comprovado neste estudo através da alteração da pressão arterial sistólica e diastólica no grupo OVX. De modo semelhante ao E2, onde já foi demonstrada a reversão deste parâmetro hemodinâmico [144], a E1 também é capaz de reestabelecer os níveis pressóricos basais, o que possibilita indicar que este efeito se agrupa aos benefícios da TRH no sistema cardiovascular, corrigindo o aumento destes níveis pressóricos e melhorando a função endotelial prejudicada [95, 145].

Como a elevação da pressão arterial é frequentemente associada a alterações funcionais e estruturais de diversos órgãos e tecidos, o efeito funcional observado com o tratamento com a E1 na reatividade vascular, demonstra que fisiopatologias envolvidas na gênese e/ou manutenção desta alteração hemodinâmica [146] podem ser prevenidas ou até mesmo revertidas mediante o tratamento com este hormônio. Em relação às alterações estruturais, foi possível realizar uma integração entre a morfologia, fisiologia e a farmacologia, com associação benéfica ao uso terapêutico da reposição hormonal.

A carência de estrogênios associada ao aumento da PA provocada pela OVX promoveu alterações na morfologia da aorta, mecanismo para proteger da tensão exagerada na parede deste vaso sanguíneo [147, 148]. Todavia, a reposição hormonal com E1 foi capaz de retomar a morfometria fisiológica semelhante ao grupo Sham e ao grupo tratado com E2. Os experimentos funcionais, em consonância com os dados morfométricos, demonstraram que a reposição com E1

ou E2 reverteram a hiper-reatividade promovida pela OVX, corroborando com os estudos de Yanes et al. (2005) [149] e Jiang (1991) [150], que relacionam a carência de estrogênios com a redução do efeito vasodilatador pelo endotélio, evidenciado por redução no efeito do NO e consequente aumento da vasoconstrição. Esses dados também estão de acordo com Jonason, et al. (1998) [147] e Kallizakaros et al. (2002) [151] que justificam o enrijecimento da parede arterial devido à deficiência de estrogênios.

Quando se avalia o efeito da E1 em promover uma densidade menor de colágeno e maior de elastina, é possível associar que a reposição hormonal com E1 desencadeia um processo protetor, uma vez também que as alterações promovidas no grupo OVX para proteger a parede da aorta contra as tensões exageradas frente ao aumento da PA, não foram vistas nos grupos tratados com E1 ou E2.

Já é descrito que preparações de estrogênios conjugados, à exemplo do Premarin®, atuam na prevenção desta alteração em ratas OVX [152]. Entretanto, trata-se de uma preparação contendo vários estrogênios e sem ainda ser estabelecido o efeito individual de cada um dos componentes nos efeitos biológicos, à exceção da E2. Neste estudo, foi demonstrado que seu componente majoritário (E1), isoladamente, promoveu reversão da disfunção endotelial e das alterações morfológicas e fisiológicas da aorta torácica. Estes efeitos foram semelhantes aos observados com E2, o hormônio mais potente presente nesta preparação.

A disfunção endotelial acompanhada pelo aumento na pressão arterial e, posteriormente, a reversão destas disfunções pelo tratamento com E1, levou à investigação dos mecanismos envolvidos nesta proteção. Já é estabelecido na literatura que o comprometimento endotelial possui relação estreita com o aumento na produção de EROs [153], contribuindo para agravos no sistema cardiovascular, de modo dependente ou independente ao aumento na pressão arterial [154] e que, estas alterações, podem ser desencadeadas pela diminuição dos níveis plasmáticos de estrogênios [146, 155].

De fato, estudos *in vitro* sugerem um potente efeito antioxidante para os estrogênios [156] e, os resultados aqui obtidos pela incubação aguda com E1 e a posterior avaliação funcional de segmentos aórticos de ratas OVX incubados com SOD, CAT ou apocinina, foram associados ao restabelecimento do equilíbrio oxidativo promovido pelo estrogênio. No intuito de realizar tal investigação, a expressão e atividade das enzimas SOD e CAT, bem como a quantificação da

geração de EROs, foram analisadas, e os resultados demonstraram que animais tratados com E1 apresentam características semelhantes ao grupo em estro fisiológico e inversas ao que é observado no grupo de ratas com função endotelial comprometida. Assim sendo, é sugerido que a E1 promove o equilíbrio entre a produção de EROs e as defesas antioxidantes do organismo, favorecendo o restabelecimento da estrutura e da função vascular.

O aumento observado para SOD e CAT são esperados frente a situações de aumento no estresse oxidativo, com o intuito de regular as concentrações demasiadas de EROs para níveis homeostáticos não tóxicos **[157]**. Os resultados apresentados pela E1 reforçam esta linha de raciocínio, uma vez que restabeleceu o aumento na atividade e na expressão destas enzimas promovidos pela ovariectomia (condição que promove o aumento do estresse oxidativo), para níveis semelhantes aos do grupo SHAM.

Por outro lado, enzimas que promovem efeitos pró-oxidantes, como a NADPH oxidase, podem também estar associadas a condições patológicas na parede vascular, com aumento na pressão arterial **[97, 158]**. Sendo assim, foi realizada a investigação do comportamento desta enzima frente ao tratamento com E1.

A NADPH oxidase encontra-se associada a membranas, realizando transferência de elétrons através da utilização de NADPH como doador, possuindo seis isoformas descritas (NOX-1, NOX-2 (gp91phox), NOX-4, NOX-5, DUOX-1 e DUOX-2) - família de NADPH oxidases que compartilham a capacidade de transportarem elétrons e promoverem a geração de EROs **[159]**.

A isoforma catalítica da NADPH oxidase conhecida como NOX-2 e também chamada de gp91phox, não alterou sua expressão nos grupos experimentais deste estudo. De modo semelhante, a expressão da isoforma NOX1, um grupo homólogo independente, não apresentou diferença entre os grupos. Embora as isoformas NOX-1 e NOX-2 já estejam descritas em artérias e em células endoteliais, a expressão da isoforma NOX-4 é mais abundante **[160]**. Analisando a isoforma NOX-4 da NADPH oxidase, foi observado que, inversamente ao aumento da expressão da NOX-4 presente nos tecidos de ratas OVX, o tratamento com E1 ou E2 reverteu o aumento na sua expressão. Este dado confirma que o tratamento com E1 influencia também no sistema pró-oxidante NADPH oxidase de modo seletivo.

Por fim, o conjunto dos resultados desse estudo e a relação encontrada entre os mesmos, possibilitam indicar o potencial efeito benéfico da E1 sobre o sistema

cardiovascular. Estes efeitos foram semelhantes aos do estradiol que, juntamente à E1 constituem-se, respectivamente, nos componentes mais potente e majoritário, presentes em preparações farmacêuticas amplamente utilizadas na terapia de reposição hormonal feminina.

6. CONCLUSÃO

Os principais achados desse estudo foram de que a estrona:

- Restabeleceu as massas corporal e uterina, reduziu a gordura retroperitoneal e os níveis séricos de colesterol total e LDL;
- Reduziu o aumento da pressão arterial e restabeleceu a função endotelial;
- Diminuiu a espessura da parede e a área do lúmen e restabeleceu os níveis de colágeno e de elastina em aortas torácicas;
- Restabeleceu o equilíbrio do sistema entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante, determinados pela diminuição da expressão e da atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase, assim como da expressão da isoforma NOX-4 do sistema pró-oxidante NADPH oxidase, nas preparações de aorta torácica;
- O conjunto dos efeitos da estrona foi semelhante aos observados para o estradiol, hormônio utilizado como padrão para o estudo.

Portanto, conclui-se que a estrona tem efeito protetor sobre as alterações prejudiciais observadas no sistema vascular de mulheres pós-menopausa.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Barrett-Connor E, Bush TL. Estrogen and coronary heart disease in women. *JAMA* 1991 Apr 10;265(14):1861-7.
- [2] 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 Sep 12;325(11):756-62.
- [3] Bhavnani BR. Pharmacology of hormonal therapeutic agents, in: Eskin BA, The Menopause Comprehensive Management, The Parthenon Publishing Group, New York, 2000, Chapter 18, pp. 229–56. .
- [4] Paganini-Hill A, Ross RK, Henderson BE. Postmenopausal oestrogen treatment and stroke: a prospective study. *BMJ* 1988 Aug 20-27;297(6647):519-22.
- [5] Million Women Study Collaborators (2003) Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 362:419–27. .
- [6] Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (1997) Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. *Lancet* 350:1047–59
- [7] 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 Aug 19;280(7):605-13.
- [8] 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 Jul 17;288(3):321-33.
- [9] Borrelli CL, Almeida PG. Doenças cardiovasculares e as terapias de reposição hormonal. *Hipertensão* 2005 8(3): 1-5.

- [10]** 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 Jul 03;288(1):49-57.
- [11]** 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 Jul 20;57(3):239-46.
- [12]** Brzezinski A, Danenberg HD. Estrogen, progesterone, and cardiovascular health: when shall we complete the puzzle? *Menopause* 2005 Sep-Oct;12(5):488-91.
- [13]** Orshal JM, Khalil RA. Gender, sex hormones, and vascular tone. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004 Feb;286(2):R233-49.
- [14]** Wang Y, Marsden PA. Nitric oxide synthases: gene structure and regulation. *Adv Pharmacol* 1995;34:71-90.
- [15]** Cutini PH, Campelo AE, Agriello E, Sandoval MJ, Rauschemberger MB, Massheimer VL. The role of sex steroids on cellular events involved in vascular disease. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2012 Nov;132(3-5):322-30.
- [16]** Simoncini T, Mannella P, Fornari L, Caruso A, Varone G, Genazzani AR. Genomic and non-genomic effects of estrogens on endothelial cells. *Steroids* 2004 Aug;69(8-9):537-42.
- [17]** 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 Dec;82(23):7889-93.
- [18]** 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 Jun 11;93(12):5925-30.

- [19]** Jacob J, Sebastian KS, Devassy S, Priyadarsini L, Farook MF, Shameem A, et al. Membrane estrogen receptors: genomic actions and post transcriptional regulation. *Mol Cell Endocrinol* 2006 Feb 26;246(1-2):34-41.
- [20]** Saville B, Wormke M, Wang F, Nguyen T, Enmark E, Kuiper G, et al. Ligand-, cell-, and estrogen receptor subtype (alpha/beta)-dependent activation at GC-rich (Sp1) promoter elements. *J Biol Chem* 2000 Feb 25;275(8):5379-87.
- [21]** Gougelet A, Mueller SO, Korach KS, Renoir JM. Oestrogen receptors pathways to oestrogen responsive elements: the transactivation function-1 acts as the keystone of oestrogen receptor (ER)beta-mediated transcriptional repression of ERalpha. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007 May;104(3-5):110-22.
- [22]** Hammes SR, Levin ER. Extranuclear steroid receptors: nature and actions. *Endocr Rev* 2007 Dec;28(7):726-41.
- [23]** Farhat MY, Lavigne MC, Ramwell PW. The vascular protective effects of estrogen. *FASEB J* 1996 Apr;10(5):615-24.
- [24]** Mendelsohn ME. Nongenomic, ER-mediated activation of endothelial nitric oxide synthase: how does it work? What does it mean? *Circ Res* 2000 Nov 24;87(11):956-60.
- [25]** Golding EM, Kepler TE. Role of estrogen in modulating EDHF-mediated dilations in the female rat middle cerebral artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001 Jun;280(6):H2417-23.
- [26]** Jun SS, Chen Z, Pace MC, Shaul PW. Estrogen upregulates cyclooxygenase-1 gene expression in ovine fetal pulmonary artery endothelium. *J Clin Invest* 1998 Jul 1;102(1):176-83.
- [27]** Ruehlmann DO, Steinert JR, Valverde MA, Jacob R, Mann GE. Environmental estrogenic pollutants induce acute vascular relaxation by inhibiting L-type Ca²⁺ channels in smooth muscle cells. *FASEB J* 1998 May;12(7):613-9.

- [28]** Valverde MA, Rojas P, Amigo J, Cosmelli D, Orio P, Bahamonde MI, et al. Acute activation of Maxi-K channels (hSlo) by estradiol binding to the beta subunit. *Science* 1999 Sep 17;285(5435):1929-31.
- [29]** Lüscher TF, Vanhoutte PM. The Endothelium: Modulator of Cardiovascular Function. Boca Raton 1990 Fla: CRC Press. 1990. .
- [30]** Furchgott RF. Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Circ Res* 1983 Nov;53(5):557-73.
- [31]** De Mey JG, Vanhoutte PM. Role of the intima in cholinergic and purinergic relaxation of isolated canine femoral arteries. *J Physiol* 1981 Jul;316:347-55.
- [32]** Luscher TF, Cooke JP, Houston DS, Neves RJ, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent relaxations in human arteries. *Mayo Clin Proc* 1987 Jul;62(7):601-6.
- [33]** Luscher TF, Diederich D, Siebenmann R, Lehmann K, Stulz P, von Segesser L, et al. Difference between endothelium-dependent relaxation in arterial and in venous coronary bypass grafts. *N Engl J Med* 1988 Aug 25;319(8):462-7.
- [34]** Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987 Jun 11-17;327(6122):524-6.
- [35]** Stankevicius E, Kevelaitis E, Vainorius E, Simonsen U. [Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors]. *Medicina (Kaunas)* 2003;39(4):333-41.
- [36]** Nelson SH, Steinsland OS, Wang Y, Yallampalli C, Dong YL, Sanchez JM. Increased nitric oxide synthase activity and expression in the human uterine artery during pregnancy. *Circ Res* 2000 Sep 01;87(5):406-11.
- [37]** Rahimian R, Chan L, Goel A, Poburko D, van Breemen C. Estrogen modulation of endothelium-derived relaxing factors by human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004 Sep 17;322(2):373-9.
- [38]** Griffith TM, Edwards DH, Lewis MJ, Newby AC, Henderson AH. The nature of endothelium-derived vascular relaxant factor. *Nature* 1984 Apr 12-18;308(5960):645-7.

- [39] Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol* 1989 Jun 01;38(11):1709-15.
- [40] Rubio AR, Morales-Segura MA. Nitric oxide, an iceberg in cardiovascular physiology: far beyond vessel tone control. *Arch Med Res* 2004 Jan-Feb;35(1):1-11.
- [41] Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987 Dec;84(24):9265-9.
- [42] Rapoport RM, Murad F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ Res* 1983 Mar;52(3):352-7.
- [43] Case J, Davison CA. Estrogen alters relative contributions of nitric oxide and cyclooxygenase products to endothelium-dependent vasodilation. *J Pharmacol Exp Ther* 1999 Nov;291(2):524-30.
- [44] Moncada S, Vane JR. The role of prostacyclin in vascular tissue. *Fed Proc* 1979 Jan;38(1):66-71.
- [45] Gryglewski RJ, Botting RM, Vane JR. Mediators produced by the endothelial cell. *Hypertension* 1988 Dec;12(6):530-48.
- [46] Hopkins NK, Gorman RR. Regulation of endothelial cell cyclic nucleotide metabolism by prostacyclin. *J Clin Invest* 1981 Feb;67(2):540-6.
- [47] Carvalho MHC, Nigro D, Lemos VL, Tostes RCA, Fortes ZB. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. *Revista Brasileira de Hipertensão* 2001(8):76-88.
- [48] White RE, Darkow DJ, Lang JL. Estrogen relaxes coronary arteries by opening BKCa channels through a cGMP-dependent mechanism. *Circ Res* 1995 Nov;77(5):936-42.
- [49] 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 Feb 15;53(3):650-61.

[50] Bayard F, Clamens S, Meggetto F, Blaes N, Delsol G, Faye JC. Estrogen synthesis, estrogen metabolism, and functional estrogen receptors in rat arterial smooth muscle cells in culture. *Endocrinology* 1995 Apr;136(4):1523-9.

[51] Losordo DW, Kearney M, Kim EA, Jekanowski J, Isner JM. Variable expression of the estrogen receptor in normal and atherosclerotic coronary arteries of premenopausal women. *Circulation* 1994 Apr;89(4):1501-10.

[52] Orimo A, Inoue S, Ikegami A, Hosoi T, Akishita M, Ouchi Y, et al. Vascular smooth muscle cells as target for estrogen. *Biochem Biophys Res Commun* 1993 Sep 15;195(2):730-6.

[53] 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 Feb;39(2 Pt 2):405-11.

[54] Mendelsohn ME, Karas RH. HRT and the young at heart. *N Engl J Med* 2007 Jun 21;356(25):2639-41.

[55] Crews JK, Khalil RA. Gender-specific of Ca²⁺ entry mechanisms of arterial vasoconstriction by sex hormones. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999 26(9): 107-15. .

[56] Yeboah J, Crouse JR, Hsu FC, Burke GL, Herrington DM. Brachial flow-mediated dilation predicts incident cardiovascular events in older adults: the Cardiovascular Health Study. *Circulation* 2007 May 08;115(18):2390-7.

[57] John S, Schmieder RE. Impaired endothelial function in arterial hypertension and hypercholesterolemia: potential mechanisms and differences. *J Hypertens* 2000 Apr;18(4):363-74.

[58] Busse R, Fleming I. Endothelial dysfunction in atherosclerosis. *J Vasc Res* 1996 May-Jun;33(3):181-94.

[59] Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 2004 Jun 15;109(23 Suppl 1):III27-32.

- [60]** Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J* 1989 Jul;3(9):2007-18.
- [61]** Feletou M, Vanhoutte PM. EDHF: an update. *Clin Sci (Lond)* 2009 Jul 16;117(4):139-55.
- [62]** Leung HS, Leung FP, Yao X, Ko WH, Chen ZY, Vanhoutte PM, et al. Endothelial mediators of the acetylcholine-induced relaxation of the rat femoral artery. *Vascul Pharmacol* 2006 May;44(5):299-308.
- [63]** Qiao X, McConnell KR, Khalil RA. Sex steroids and vascular responses in hypertension and aging. *Gend Med* 2008;5 Suppl A:S46-64.
- [64]** Cohen RA, Shepherd JT, Vanhoutte PM. Inhibitory role of the endothelium in the response of isolated coronary arteries to platelets. *Science* 1983 Jul 15;221(4607):273-4.
- [65]** Darley-Usmar VM, McAndrew J, Patel R, Moellering D, Lincoln TM, Jo H, et al. Nitric oxide, free radicals and cell signalling in cardiovascular disease. *Biochem Soc Trans* 1997 Aug;25(3):925-9.
- [66]** Lobo RA. Estrogen and cardiovascular disease. *Ann N Y Acad Sci* 1990;592:286-94; discussion 334-45.
- [67]** Wahl P, Walden C, Knopp R, Hoover J, Wallace R, Heiss G, et al. Effect of estrogen/progestin potency on lipid/lipoprotein cholesterol. *N Engl J Med* 1983 Apr 14;308(15):862-7.
- [68]** Walsh BW, Schiff I, Rosner B, Greenberg L, Ravnikaar V, Sacks FM. Effects of postmenopausal estrogen replacement on the concentrations and metabolism of plasma lipoproteins. *N Engl J Med* 1991 Oct 24;325(17):1196-204.
- [69]** Collins P, Rosano GM, Jiang C, Lindsay D, Sarrel PM, Poole-Wilson PA. Cardiovascular protection by oestrogen--a calcium antagonist effect? *Lancet* 1993 May 15;341(8855):1264-5.

- [70]** Gisclard V, Miller VM, Vanhoutte PM. Effect of 17 beta-estradiol on endothelium-dependent responses in the rabbit. *J Pharmacol Exp Ther* 1988 Jan;244(1):19-22.
- [71]** Hayashi T, Fukuto JM, Ignarro LJ, Chaudhuri G. Basal release of nitric oxide from aortic rings is greater in female rabbits than in male rabbits: implications for atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992 Dec 1;89(23):11259-63.
- [72]** Mendelsohn ME. Genomic and nongenomic effects of estrogen in the vasculature. *Am J Cardiol* 2002 Jul 3;90(1A):3F-6F.
- [73]** Miller VM, Duckles SP. Vascular actions of estrogens: functional implications. *Pharmacol Rev* 2008 Jun;60(2):210-41.
- [74]** Wang Z, Chandrasena ER, Yuan Y, Peng KW, van Breemen RB, Thatcher GR, et al. Redox cycling of catechol estrogens generating apurinic/aprimidinic sites and 8-oxo-deoxyguanosine via reactive oxygen species differentiates equine and human estrogens. *Chem Res Toxicol* 2010 Aug 16;23(8):1365-73.
- [75]** Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Free Radic Res* 2006 Dec;40(12):1250-8.
- [76]** Arora KS, Gupta RA, Singh S, Nagpal, Arora D. Role of free radicals in menopausal distress. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 2009 3(6): 1900-02.
- [77]** Shrivastava V, Singh S, Sapre S. Status of antioxidant enzyme and trace metals in postmenopausal women. *The Journal of Obstetrics and Gynecology of India* 2005 55(1):64-6.
- [78]** Onvural B, Ozturk H, Onvural A, Fadiloglu M. Lipid peroxidation and lipid metabolism in postmenopausal women. *Turkish Journal of Medical Sciences* 1998 28: 519-24.
- [79]** Wagner AH, Schroeter MR, Hecker M. 17beta-estradiol inhibition of NADPH oxidase expression in human endothelial cells. *FASEB J* 2001 Oct;15(12):2121-30.

- [80]** Sudoh N, Toba K, Akishita M, Ako J, Hashimoto M, Iijima K, et al. Estrogen prevents oxidative stress-induced endothelial cell apoptosis in rats. *Circulation* 2001 Feb 06;103(5):724-9.
- [81]** Keaney JF, Jr., Shwaery GT, Xu A, Nicolosi RJ, Loscalzo J, Foxall TL, et al. 17 beta-estradiol preserves endothelial vasodilator function and limits low-density lipoprotein oxidation in hypercholesterolemic swine. *Circulation* 1994 May;89(5):2251-9.
- [82]** Eskurza I, Monahan KD, Robinson JA, Seals DR. Effect of acute and chronic ascorbic acid on flow-mediated dilatation with sedentary and physically active human ageing. *J Physiol* 2004 Apr 01;556(Pt 1):315-24.
- [83]** Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Salvetti G, Bernini G, Magagna A, et al. Age-related reduction of NO availability and oxidative stress in humans. *Hypertension* 2001 Aug;38(2):274-9.
- [84]** O'Donnell VB, Freeman BA. Interactions between nitric oxide and lipid oxidation pathways: implications for vascular disease. *Circ Res* 2001 Jan 19;88(1):12-21.
- [85]** Kojda G, Harrison D. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res* 1999 Aug 15;43(3):562-71.
- [86]** Lam KK, Lee YM, Hsiao G, Chen SY, Yen MH. Estrogen therapy replenishes vascular tetrahydrobiopterin and reduces oxidative stress in ovariectomized rats. *Menopause* 2006 Mar-Apr;13(2):294-302.
- [87]** Mueller CF, Laude K, McNally JS, Harrison DG. ATVB in focus: redox mechanisms in blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005 Feb;25(2):274-8.
- [88]** Cai H, Griending KK, Harrison DG. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol Sci* 2003 Sep;24(9):471-8.

- [89]** Banfi B, Malgrange B, Knisz J, Steger K, Dubois-Dauphin M, Krause KH. NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear. *J Biol Chem* 2004 Oct 29;279(44):46065-72.
- [90]** Liu MY, Hattori Y, Fukao M, Sato A, Sakuma I, Kanno M. Alterations in EDHF-mediated hyperpolarization and relaxation in mesenteric arteries of female rats in long-term deficiency of oestrogen and during oestrus cycle. *Br J Pharmacol* 2001 Mar;132(5):1035-46.
- [91]** Nawate S, Fukao M, Sakuma I, Soma T, Nagai K, Takikawa O, et al. Reciprocal changes in endothelium-derived hyperpolarizing factor- and nitric oxide-system in the mesenteric artery of adult female rats following ovariectomy. *Br J Pharmacol* 2005 Jan;144(2):178-89.
- [92]** Knowlton AA, Lee AR. Estrogen and the cardiovascular system. *Pharmacol Ther* 2012 Jul;135(1):54-70.
- [93]** Camporez JP, Akamine EH, Davel AP, Franci CR, Rossoni LV, Carvalho CR. Dehydroepiandrosterone protects against oxidative stress-induced endothelial dysfunction in ovariectomized rats. *J Physiol* 2011 May 15;589(Pt 10):2585-96.
- [94]** Moreau KL, Meditz A, Deane KD, Kohrt WM. Tetrahydrobiopterin improves endothelial function and decreases arterial stiffness in estrogen-deficient postmenopausal women. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012 Mar 01;302(5):H1211-8.
- [95]** Viridis A, Ghiadoni L, Pinto S, Lombardo M, Petraglia F, Gennazzani A, et al. Mechanisms responsible for endothelial dysfunction associated with acute estrogen deprivation in normotensive women. *Circulation* 2000 May 16;101(19):2258-63.
- [96]** Taddei S, Viridis A, Ghiadoni L, Mattei P, Sudano I, Bernini G, et al. Menopause is associated with endothelial dysfunction in women. *Hypertension* 1996 Oct;28(4):576-82.
- [97]** 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 Oct;34(4 Pt 2):914-9.

[98] Peskin AV, Winterbourn CC. A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1). *Clin Chim Acta* 2000 Mar;293(1-2):157-66.

[99] Goyal MM, Basak A. Human catalase: looking for complete identity. *Protein Cell* 2010 Oct;1(10):888-97.

[100] World CJ, Yamawaki H, Berk BC. Thioredoxin in the cardiovascular system. *J Mol Med (Berl)* 2006 Dec;84(12):997-1003.

[101] Barranco-Medina S, Krell T, Finkemeier I, Sevilla F, Lazaro JJ, Dietz KJ. Biochemical and molecular characterization of the mitochondrial peroxiredoxin PsPrxII F from *Pisum sativum*. *Plant Physiol Biochem* 2007 Oct-Nov;45(10-11):729-39.

[102] Soriani M, Pietraforte D, Minetti M. Antioxidant potential of anaerobic human plasma: role of serum albumin and thiols as scavengers of carbon radicals. *Arch Biochem Biophys* 1994 Jul;312(1):180-8.

[103] Sugden PH, Clerk A. Akt like a woman: gender differences in susceptibility to cardiovascular disease. *Circ Res* 2001 May 25;88(10):975-7.

[104] Tanaka T, Nakamura H, Yodoi J, Bloom ET. Redox regulation of the signaling pathways leading to eNOS phosphorylation. *Free Radic Biol Med* 2005 May 01;38(9):1231-42.

[105] Yang ZZ, Tschopp O, Baudry A, Dummler B, Hynx D, Hemmings BA. Physiological functions of protein kinase B/Akt. *Biochem Soc Trans* 2004 Apr;32(Pt 2):350-4.

[106] Darblade B, Pendaries C, Krust A, Dupont S, Fouque MJ, Rami J, et al. Estradiol alters nitric oxide production in the mouse aorta through the alpha-, but not beta-, estrogen receptor. *Circ Res* 2002 Mar 08;90(4):413-9.

- [107]** Hernandez I, Delgado JL, Diaz J, Quesada T, Teruel MJ, Llanos MC, et al. 17beta-estradiol prevents oxidative stress and decreases blood pressure in ovariectomized rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000 Nov;279(5):R1599-605.
- [108]** Stefanick ML. Estrogens and progestins: background and history, trends in use, and guidelines and regimens approved by the US Food and Drug Administration. *Am J Med* 2005 Dec 19;118 Suppl 12B:64-73.
- [109]** Xu X, Xiao JC, Luo LF, Wang S, Zhang JP, Huang JJ, et al. Effects of ovariectomy and 17beta-estradiol treatment on the renin-angiotensin system, blood pressure, and endothelial ultrastructure. *Int J Cardiol* 2008 Nov 12;130(2):196-204.
- [110]** 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 Jun 01;62(3):587-93.
- [111]** Claudio ER, Endlich PW, Santos RL, Moyses MR, Bissoli NS, Gouvea SA, et al. Effects of chronic swimming training and oestrogen therapy on coronary vascular reactivity and expression of antioxidant enzymes in ovariectomized rats. *PLoS One* 2014;8(6):e64806.
- [112]** Garcia PM, Gimenez J, Bonacasa B, Carbonell LF, Miguel SG, Quesada T, et al. 17beta-estradiol exerts a beneficial effect on coronary vascular remodeling in the early stages of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Menopause* 2005 Jul-Aug;12(4):453-9.
- [113]** 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; discussion -1.
- [114]** Ruggiero RJ, Likis FE. Estrogen: physiology, pharmacology, and formulations for replacement therapy. *J Midwifery Womens Health* 2002 May-Jun;47(3):130-8.
- [115]** 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 Jan;23(1):74-85.

[116] Ruder HJ, Loriaux L, Lipsett MB. Estrone sulfate: production rate and metabolism in man. *J Clin Invest* 1972 Apr;51(4):1020-33.

[117] Longcope C. The metabolism of estrone sulfate in normal males. *J Clin Endocrinol Metab* 1972 Jan;34(1):113-22.

[118] Bhavnani BR, Woolever CA, Benoit H, Wong T. Pharmacokinetics of equilin and equilin sulfate in normal postmenopausal women and men. *J Clin Endocrinol Metab* 1983 May;56(5):1048-56.

[119] Bhavnani BR, Cecutti A. Pharmacokinetics of 17 beta-dihydroequilin sulfate and 17 beta-dihydroequilin in normal postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1994 Jan;78(1):197-204.

[120] Oliveira TSd. Efeito vasorrelaxante da estrona sobre aorta torácica de ratos: Contribuição ao estudo do mecanismo de ação. Goiânia UFG; 2014.

[121] Kuhl H. Pharmacology of estrogens and progestogens: influence of different routes of administration. *Climacteric* 2005 Aug;8 Suppl 1:3-63.

[122] Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC. Production and actions of estrogens. *N Engl J Med* 2002 Jan 31;346(5):340-52.

[123] Meinhardt U, Mullis PE. The aromatase cytochrome P-450 and its clinical impact. *Horm Res* 2002;57(5-6):145-52.

[124] Pare G, Krust A, Karas RH, Dupont S, Aronovitz M, Chambon P, et al. Estrogen receptor-alpha mediates the protective effects of estrogen against vascular injury. *Circ Res* 2002 May 31;90(10):1087-92.

[125] Pantan R, Onsa-Ard A, Tocharus J, Wonganan O, Suksamrarn A, Tocharus C. Endothelium-independent vasorelaxation effects of 16-O-acetyldihydroisosteviol on isolated rat thoracic aorta. *Life Sci* 2014 Aug 21.

[126] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976 May 07;72:248-54.

[127] Weibel ER. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Lab Invest* 1963 Feb;12:131-55.

[128] de Oliveira TS, de Oliveira LM, de Oliveira LP, da Costa RM, de Cassia Tostes R, de Castro Georg R, et al. Activation of PI3K/Akt pathway mediated by estrogen receptors accounts for estrone-induced vascular activation of cGMP signaling. *Vascul Pharmacol* 2018 Jul 31.

[129] Freay AD, Curtis SW, Korach KS, Rubanyi GM. Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by estrogen in depolarized rat and mouse aorta. Role of nuclear estrogen receptor and Ca²⁺ uptake. *Circ Res* 1997 Aug;81(2):242-8.

[130] Selles J, Polini N, Alvarez C, Massheimer V. Novel action of estrone on vascular tissue: regulation of NOS and COX activity. *Steroids* 2005 Apr;70(4):251-6.

[131] Massheimer V, Polini N, Alvarez C, Benozzi S, Rauschemberger MB, Selles J. Signal transduction pathways involved in non-genomic action of estrone on vascular tissue. *Steroids* 2006 Oct;71(10):857-64.

[132] Rauschemberger MB, Selles J, Massheimer V. The direct action of estrone on vascular tissue involves genomic and non-genomic actions. *Life Sci* 2008 Jan 2;82(1-2):115-23.

[133] Teoh H, Quan A, Leung SW, Man RY. Vascular effects of estrone and diethylstilbestrol in porcine coronary arteries. *Menopause* 2009 Jan-Feb;16(1):104-9.

[134] Ancelin ML, Ritchie K. Lifelong endocrine fluctuations and related cognitive disorders. *Curr Pharm Des* 2005;11(32):4229-52.

[135] Scambia G, Mango D, Signorile PG, Anselmi Angeli RA, Palena C, Gallo D, et al. Clinical effects of a standardized soy extract in postmenopausal women: a pilot study. *Menopause* 2000 Mar-Apr;7(2):105-11.

- [136]** Mishra GD, Kuh D. Health symptoms during midlife in relation to menopausal transition: British prospective cohort study. *BMJ* 2012;344:e402.
- [137]** te Velde ER, Scheffer GJ, Dorland M, Broekmans FJ, Fauser BC. Developmental and endocrine aspects of normal ovarian aging. *Mol Cell Endocrinol* 1998 Oct 25;145(1-2):67-73.
- [138]** Waynforth HB. Experimental and surgical technique in the rat. 1980. London, UK Academic press. p 161.
- [139]** Caliman IF, Lamas AZ, Dalpiaz PL, Medeiros AR, Abreu GR, Figueiredo SG, et al. Endothelial relaxation mechanisms and oxidative stress are restored by atorvastatin therapy in ovariectomized rats. *PLoS One* 2013;8(11):e80892.
- [140]** Sato M, Bryant HU, Iversen P, Helterbrand J, Smietana F, Bemis K, et al. Advantages of raloxifene over alendronate or estrogen on nonreproductive and reproductive tissues in the long-term dosing of ovariectomized rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1996 Oct;279(1):298-305.
- [141]** de Medeiros AR, Lamas AZ, Caliman IF, Dalpiaz PL, Firmes LB, de Abreu GR, et al. Tibolone has anti-inflammatory effects in estrogen-deficient female rats on the natriuretic peptide system and TNF-alpha. *Regul Pept* 2012 Nov 10;179(1-3):55-60.
- [142]** Nash JD, Ozols RF, Smyth JF, Hamilton TC. Estrogen and anti-estrogen effects on the growth of human epithelial ovarian cancer in vitro. *Obstet Gynecol* 1989 Jun;73(6):1009-16.
- [143]** Frackiewicz EJ, Cutler NR. Women's health care during the perimenopause. *J Am Pharm Assoc (Wash)* 2000 Nov-Dec;40(6):800-11.
- [144]** Yung LM, Wong WT, Tian XY, Leung FP, Yung LH, Chen ZY, et al. Inhibition of renin-angiotensin system reverses endothelial dysfunction and oxidative stress in estrogen deficient rats. *PLoS One* 2011 Mar 29;6(3):e17437.

- [145]** Mercurio G, Zoncu S, Saiu F, Mascia M, Melis GB, Rosano GM. Menopause induced by oophorectomy reveals a role of ovarian estrogen on the maintenance of pressure homeostasis. *Maturitas* 2004 Feb 20;47(2):131-8.
- [146]** Davel AP, Wenceslau CF, Akamine EH, Xavier FE, Couto GK, Oliveira HT, et al. Endothelial dysfunction in cardiovascular and endocrine-metabolic diseases: an update. *Braz J Med Biol Res* 2011 Sep;44(9):920-32.
- [147]** Cui A, Di Niro R, Vander Heiden JA, Briggs AW, Adams K, Gilbert T, et al. A Model of Somatic Hypermutation Targeting in Mice Based on High-Throughput Ig Sequencing Data. *J Immunol* 2016 Nov 1;197(9):3566-74.
- [148]** Jiang Y, Oron TR, Clark WT, Bankapur AR, D'Andrea D, Lepore R, et al. An expanded evaluation of protein function prediction methods shows an improvement in accuracy. *Genome Biol* 2016 Sep 7;17(1):184.
- [149]** Yanes LL, Romero DG, Cucchiarelli VE, Fortepiani LA, Gomez-Sanchez CE, Santacruz F, et al. Role of endothelin in mediating postmenopausal hypertension in a rat model. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005 Jan;288(1):R229-33.
- [150]** 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 Dec;104(4):1033-7.
- [151]** Kallikazaros I, Tsioufis C, Zambaras P, Stefanadis C, Toutouzas P. Conjugated estrogen administration improves common carotid artery elastic properties in normotensive postmenopausal women. *Clin Cardiol* 2002 Apr;25(4):167-72.
- [152]** Ceravolo GS, Filgueira FP, Costa TJ, Lobato NS, Chignalia AZ, Araujo PX, et al. Conjugated equine estrogen treatment corrected the exacerbated aorta oxidative stress in ovariectomized spontaneously hypertensive rats. *Steroids* 2013 Mar;78(3):341-6.
- [153]** Zalba G, Beaumont FJ, San Jose G, Fortuno A, Fortuno MA, Etayo JC, et al. Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2000 May;35(5):1055-61.

- [154]** Yung LM, Tian XY, Wong WT, Leung FP, Yung LH, Chen ZY, et al. Chronic cranberry juice consumption restores cholesterol profiles and improves endothelial function in ovariectomized rats. *Eur J Nutr* 2013 Apr;52(3):1145-55.
- [155]** Blanco-Rivero J, Sagredo A, Balfagon G, Ferrer M. Protein kinase C activation increases endothelial nitric oxide release in mesenteric arteries from orchidectomized rats. *J Endocrinol* 2007 Jan;192(1):189-97.
- [156]** Bhavnani BR, Cecutti A, Gerulath A, Woolever AC, Berco M. Comparison of the antioxidant effects of equine estrogens, red wine components, vitamin E, and probucol on low-density lipoprotein oxidation in postmenopausal women. *Menopause* 2001 Nov-Dec;8(6):408-19.
- [157]** Pigeolet E, Corbisier P, Houbion A, Lambert D, Michiels C, Raes M, et al. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mech Ageing Dev* 1990 Feb 15;51(3):283-97.
- [158]** Brosnihan KB, Li P, Figueroa JP, Ganten D, Ferrario CM. Estrogen, nitric oxide, and hypertension differentially modulate agonist-induced contractile responses in female transgenic (mRen2)27 hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008 May;294(5):H1995-2001.
- [159]** Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2007 Jan;87(1):245-313.
- [160]** Ago T, Kitazono T, Ooboshi H, Iyama T, Han YH, Takada J, et al. Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H oxidase. *Circulation* 2004 Jan 20;109(2):227-33.

A sensatez é fonte de vida para quem a possui, mas é
desperdício disciplinar dos insensatos.

Confia ao senhor as tuas obras, e os teus planos serão
estabelecidos.

Provérbios 16: 3/22