



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

**EFEITO VASORELAXANTE DA ESTRONA SOBRE AORTA
TORÁCICA DE RATOS: CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DO
MECANISMO DE AÇÃO**

THIAGO SARDINHA DE OLIVEIRA

GOIÂNIA-GO

2014

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) 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), 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

Autor:	Thiago Sardinha de Oliveira				
E-mail:	thiago_tso@hotmail.com				
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? <input checked="" type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não					
Vínculo empregatício do autor					
Agência de fomento:					Sigla:
País:	Brasil	UF:	GO	CNPJ:	
Título:	Efeito vasorelaxante da estrona sobre aorta torácica de ratos: contribuição ao estudo do mecanismo de ação				
Palavras-chave:	Estrógenos, estrona, óxido Nítrico, endotélio vascular, efeito vasorelaxante.				
Título em outra língua:	Vasorelaxant effect of estrone on rat thoracic aorta: contribution to the mechanism of action study				
Palavras-chave em outra língua:	Estrogens, estrone, nitric oxide, vascular endothelium, vasorelaxant effect.				
Área de concentração:	Biologia Celular e Molecular				
Data defesa:	19/09/2014				
Programa de Pós-Graduação:	Biologia				
Orientador:	Paulo César Ghedini				
E-mail:	pcohedini@gmail.com				
Co-orientador:	Fernando Paranaíba Figueira				
E-mail:	figueirafn@vahoo.com.br				

*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

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 ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

_____ Data: ____ / ____ / ____
Assinatura do autor

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

THIAGO SARDINHA DE OLIVEIRA

**EFEITO VASORELAXANTE DA ESTRONA SOBRE AORTA
TORÁCICA DE RATOS: CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DO
MECANISMO DE AÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo César Ghedini

Co-Orientador: Prof. Dr. Fernando P. Filgueira

GOIÂNIA-GO

2014

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Oliveira, Thiago Sardinha de
Efeito vasorelaxante da estrona sobre aorta torácica de ratos:
Contribuição ao estudo do mecanismo de ação [manuscrito] / Thiago
Sardinha de Oliveira. - 2014.
LXVI, 66 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Paulo César Ghedini; co-orientador Dr.
Fernando Paranaíba Filgueira.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de
Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Biologia,
Goiânia, 2014.

Bibliografia.

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

1. Estrogênios. 2. Estrona. 3. Óxido Nítrico. 4. Endotélio Vascular. 5.
Efeito Vasorelaxante. I. Ghedini, Paulo César, orient. II. Filgueira,
Fernando Paranaíba, co-orient. III. Título.

THIAGO SARDINHA DE OLIVEIRA

**EFEITO VASORELAXANTE DA ESTRONA SOBRE AORTA
TORÁCICA DE RATOS: CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DO
MECANISMO DE AÇÃO**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo César Ghedini
Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. Fernando Paranaíba Filgueira
Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil
Universidade Estadual do Centro-Oeste

Prof. Dr. Cláudio André Barbosa de Lira
Universidade Federal de Goiás

Aprovado em: ____/____/____

Dedicatória

À minha querida esposa **Lanussy** pelo amor e companheirismo em todos os momentos, por acreditar na minha capacidade e por lutar juntamente comigo para tornar possível a realização de nossos sonhos.

Aos meus avós **José e Ana** e aos meus pais **Reinaldo e Sandra**, aos quais devo imensamente pela minha formação moral e ética.

Aos meus avós **Josemiro e Leontina** e a minha sogra **Domisália** pelo apoio e por me fazer acreditar que tudo valeu a pena.

Aos meus irmãos **Lucas e Maryanna** e ao meu filho de coração **João Paulo** pelos sorrisos espontâneos, pelos olhares carinhosos e pelos abraços sinceros.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** por permitir a realização deste trabalho, por iluminar minha vida e ajudar a aceitar situações aparentemente inaceitáveis.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Paulo César Ghedini**, pela valiosa oportunidade a mim conferida, pelos ensinamentos, pela compreensão nos momentos difíceis e pelo exemplo de profissionalismo.

Ao meu co-orientador **Prof. Dr. Fernando Paranaíba Figueira** pelos ensinamentos de grande valia que me auxiliaram para que tudo se tornasse possível.

À minha colega de laboratório **MSc. Lais Moraes de Oliveira** pela amizade e pelos ensinamentos práticos e teóricos durante esta jornada.

Aos queridos e divertidos colegas do Laboratório de Farmacologia Bioquímica e Molecular **Aline, Amanda, Angela, Ayda, Bruna, Denise, Frederico, Karine, Lais, Leandro, Lênin, Luanna, Pedro Henrique, Rayane, Rodrigo Bernini, Rodrigo Silva e Victor Hugo** pelo companheirismo, pela ajuda e pelos momentos de descontração no dia a dia de trabalho.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Biologia - PPGB** por oferecer um curso conceituado que cresce mais a cada dia e que conferiu a mim a grande oportunidade de ingressar na carreira acadêmica.

Aos **professores do PPGB** e aos **professores presentes nas bancas de qualificação e defesa** deste trabalho pelos ensinamentos, críticas e sugestões que foram fatores decisivos para o bom andamento deste trabalho.

À secretária do programa de pós-graduação em biologia, em especial à **Gleizilene** pela atenção incomparável e auxílio durante a pós-graduação.

A todos os **amigos, familiares e pessoas** que direta ou indiretamente, colaboraram para realização de meu trabalho.

À coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (**CAPES**) pelo auxílio financeiro a mim concedido.

Muito Obrigado!

Ninguém ignora tudo, ninguém sabe tudo. Por isso,
aprendemos sempre.

Paulo Freire

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	IX
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS	XII
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XIV
1. Introdução.....	1
1.1. Menopausa e terapia de reposição hormonal	1
1.2. Estrogênios e seus efeitos vasculares	3
1.3. Estrona.....	7
2. Justificativa	9
3. Objetivos.....	11
4. Materiais e Métodos.....	12
4.1. Animais	12
4.2. Drogas e Reagentes	12
4.3. Reatividade Vascular	13
4.4. Protocolos experimentais	14
4.4.1. Avaliação do efeito da estrona frente à contração induzida por Phe em preparações de anéis de aorta de rato com e sem endotélio	14
4.4.2. Avaliação da participação dos receptores de estrogênios (ER's) no efeito vasorelaxante da estrona.....	14
4.4.3. Avaliação da participação dos receptores de estrogênios acoplados a proteína G (GPER) no efeito vasorelaxante da estrona.....	15
4.4.4. Avaliação da participação da via PI3K no efeito vasorelaxante da estrona e do 17β-estradiol	15
4.4.5. Avaliação da participação do complexo Ca ²⁺ -CaM no efeito vasorelaxante da estrona e do 17β-estradiol.....	15
4.4.6. Avaliação da participação da p38MAPK no efeito vasorelaxante da estrona e do 17β-estradiol	16
4.4.7. Avaliação da participação da via NO/GMPc no efeito vasorelaxante da estrona	16
4.4.8. Avaliação da participação de prostanóides vasodilatadores no efeito vasorelaxante da estrona e do 17β-estradiol.....	16

4.4.9. Avaliação da participação canais de potássio no efeito vasorelaxante da estrona e do 17β -estradiol	17
4.5. Análise Estatística	18
5. Resultados	19
5.1. Efeito da estrona frente à contração induzida por Phe em preparações de anéis de aorta de rato com e sem endotélio	19
5.2. Avaliação da participação de receptores estrogênicos no efeito vasorelaxante da estrona	21
5.3. Avaliação da participação dos receptores GPER no efeito vasorelaxante da estrona	23
5.4. Avaliação da participação da via PI3K no efeito vasorelaxante promovido pela estrona	25
5.5. Avaliação da participação do complexo Ca^{2+} -CaM no efeito vasorelaxante promovido pela estrona	27
5.6. Avaliação da participação da p38MAPK no efeito vasorelaxante promovido pela estrona	29
5.7. Avaliação da participação da via NO/GMPc no efeito vasorelaxante da estrona	31
5.8. Avaliação da participação de prostanóides vasodilatadores no efeito vasorelaxante promovido pela estrona	33
5.9. Avaliação da participação de canais de potássio no efeito vasorelaxante promovido pela estrona	35
6. Discussão	37
7. Conclusões	43
Referências Bibliográficas	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Adenilato ciclase
ACh	Acetilcolina
AMPC	Monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA	Análise de variância
ATP	Trifosfato de adenosina
Ca ²⁺ -CaM	Complexo cálcio-calmodulina
CCE	Curva concentração efeito
CEE	Composto estrogênico equino
COX	Ciclooxigenase
CYP450	Citocromo P450
DAG	Diacilglicerol
DCV	Doenças Cardiovasculares
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDHF	Fator Hiperpolarizante derivado do endotélio (do inglês <i>endothelium-derived hyperpolarizing factor</i>)
EDRF	Fator relaxante derivado do endotélio (do inglês <i>endothelium-derived relaxing factor</i>)
E _{max}	Efeito máximo
eNOS	Sintase do óxido nítrico endotelial
epm	Erro padrão da média
ER	Receptor de estrogênio
ERE	Elemento responsivo ao estrogênio
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
GP _{ER} /GPR30	Receptor de estrogênio acoplado a proteína G
GTP	Trifosfato de adenosina
HERS	<i>Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study</i>
IP ₃	Inositol 1,4,5, trifosfato
L-NAME	N ω -nitro-L-arginina metil éster
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MLC	Cadeias leves de miosina
MLCK	Proteína quinase das cadeias leves de miosina
NO	Óxido nítrico
NPS	Nitroprussiato de sódio
ODQ	1-H-[1,2,4] Oxadiazole [4,3-a] quinoxalin-1-one
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PGH ₂	Prostaglandina H ₂
PGI ₂	Prostaciclina
Phe	Fenilefrina
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PKA	Proteína quinase A
PKG	Proteína quinase G
TEA	Tetraetilamônio
TRH	Terapia de reposição hormonal
TXA ₂	Tromboxano A ₂
WHI	<i>Women's Health Initiative</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Vias de sinalização demonstrando o efeito genômico e não genômico envolvidos no mecanismo de relaxamento vascular induzido pelos estrogênios (Adaptado de Orshal e Khalil, 2004).

Figura 2: Estrutura e produção da estrona e do 17β -estradiol (Adaptado de Gruber et al., 2002).

Figura 3: Efeito da estrona frente à contração induzida por Phe em preparações de anéis de aorta de rato com e sem endotélio.

Figura 4: Avaliação da participação de receptores estrogênicos no efeito vasorelaxante da estrona.

Figura 5: Avaliação da participação dos receptores GPER no efeito vasorelaxante da estrona

Figura 6: Avaliação da participação da via PI3K no efeito vasorelaxante promovido pela estrona.

Figura 7: Avaliação da participação do complexo CaM no efeito vasorelaxante promovido pela estrona.

Figura 8: Avaliação da participação da via p38MAPK no efeito vasorelaxante promovido pela estrona.

Figura 9: Avaliação da participação da via NO/GMPc no efeito vasorelaxante da estrona.

Figura 10: Avaliação da participação de prostanóides vasodilatadores no efeito vasorelaxante promovido pela estrona.

Figura 11: Avaliação da participação de canais de potássio no efeito vasorelaxante promovido pela estrona.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores do efeito máximo (E_{max}) e E_{max} subtraído do veículo ($E_{max} - V$) para a estrona e para o 17β -estradiol em preparações de aorta torácica de ratos Wistar com (E+) ou sem endotélio (E-) pré-contraídas com fenilefrina (Phe).

Tabela 2 – Valores do E_{max} e de inibição de E_{max} obtidos em preparações de anéis de aorta de ratos Wistar com a estrona ou com o 17β -estradiol na ausência e na presença do antagonista de receptores de estrogênios ICI 182,780 (100 μ M).

Tabela 3 – Valores do E_{max} e de inibição de E_{max} obtidos em preparações de anéis de aorta de ratos Wistar com a estrona ou com o 17β -estradiol na ausência e na presença do inibidor de receptores GPER com G-15 (30 μ M).

Tabela 4 – Valores do E_{max} e de inibição de E_{max} obtidos em preparações de anéis de aorta de ratos Wistar com a estrona ou com o 17β -estradiol na ausência e na presença de Wortmannin (1 μ M; inibidor de PI3K).

Tabela 5 – Valores do E_{max} e de inibição de E_{max} obtidos em preparações de anéis de aorta de ratos Wistar com a estrona ou com o 17β -estradiol na ausência e na presença de Calmidazolium (10 μ M; inibidor de CAM).

Tabela 6 – Valores do E_{max} obtidos em preparações de anéis de aorta de ratos Wistar com a estrona ou com o 17β -estradiol na ausência e na presença de SB 203580 (10 μ M; inibidor de p38-MAPK).

Tabela 7 – Valores do E_{max} e de inibição de E_{max} obtidos em preparações de anéis de aorta de ratos Wistar com a estrona ou com o 17β -estradiol mediante o bloqueio da enzima óxido nítrico sintase com L-NAME (100 μ M) ou bloqueio da enzima guanilato ciclase com ODQ (10 μ M).

Tabela 8 – Valores do E_{max} obtidos em preparações de anéis de aorta de ratos Wistar com a estrona ou com o 17β -estradiol na ausência e na presença do inibidor de prostanoídes vasodilatadores Indometacina (10 μ M).

Tabela 9 – Valores do E_{max} obtidos em preparações de anéis de aorta de ratos Wistar com a estrona ou com o 17β -estradiol na ausência e na presença do inibidor de canais de potássio TEA (1mM).

RESUMO

Os estrogênios endógenos têm sido associados com uma maior proteção do sistema vascular em mulheres na pré-menopausa, uma vez que os riscos de doenças cardiovasculares em mulheres na pós-menopausa são maiores, alterações estas que se devem à diminuição nos níveis plasmáticos de estrogênios. Além disso, estudos recentes mostraram que o uso de estrogênios, como a estrona, apresenta notável efeito vasorelaxante quando avaliado seu efeito em artérias isoladas, no entanto, nenhuma investigação foi realizada para elucidar o mecanismo de ação deste composto. Assim, o presente estudo procurou investigar o efeito da estrona em aorta de ratos, verificando seu efeito em induzir o relaxamento vascular e modular a via de sinalização dependente do óxido nítrico (NO), e ainda o papel dos receptores de estrogênios, comparando com os efeitos promovidos pelo 17 β -estradiol. Os animais utilizados neste estudo foram ratos Wistar com 12 semanas de idade, os quais foram utilizados para realização da reatividade vascular em banho de órgãos isolados. Para os protocolos experimentais, curvas de concentração-resposta (0,1-100 μ M) foram feitas para a estrona ou para o 17 β -estradiol e as tensões isométricas gravadas. Os mecanismos envolvidos no efeito induzido pela estrona foram determinados através da incubação de inibidores farmacológicos e comparado ao efeito do 17 β -estradiol, que tem seu efeito vascular bem caracterizado. Observou-se que a estrona promove efeito vasorelaxante em aorta torácica de ratos, e que o relaxamento vascular promovido por ela é dependente do endotélio e do receptor de estrogênios. Após ativação do receptor de estrogênios, este ativa as vias de sinalização PI3K e Ca²⁺-CaM que posteriormente ativam a via NO/GMPc. Estes resultados contribuem para o melhor entendimento do papel da estrona em preparações de estrogênios conjugados equinos (CEE), que pode estar associado aos efeitos de benefícios dos estrogênios na terapia CEE.

Palavras-chave: Estrogênios. Estrona. Endotélio Vascular. Óxido Nítrico. Efeito Vasorelaxante.

ABSTRACT

Endogenous estrogens have been associated with greater vascular protection in premenopausal women, and the increased risk of cardiovascular diseases in postmenopausal women can be associated to the decrease in plasma estrogen levels. Furthermore recently studies showed that the use of estrogens, like estrone, exhibits remarkable vascular effect when used on isolated arteries, however any investigation was made to elucidate the mechanism of action of this compound. So, the present study was designed to investigate the ability of estrone to induce vascular relaxation and modulate NO-dependent signaling pathway and analyzed the role of estrogens receptor on estrone-mediated vascular relaxation, compared with the effects promoted by 17β -estradiol. 12 week-old male Wistar rats were used to the vascular reactivity, which was performed in an organ bath study for an isometric tension recording. To the experimental protocols, concentration-response curves (0.1 - 100 μ M) to estrone or 17β - estradiol were performed. The mechanism contributing to estrone-induced effects were determined comparing with the vascular effects induced by 17β - estradiol that have its effect vascular well characterized. It was observed that the vascular relaxation promoted by estrone is dependent on the endothelium and the estrogen receptor. The vasorelaxant effect promoted by estrone was significantly altered in the presence of the inhibitor of PI3K signaling pathway (wortmannin) and the Ca^{2+} -CaM complex inhibitor (calmidazolium), showing the involvement of PI3K/ Ca^{2+} -CaM signaling pathways. This study demonstrate that estrone promoted vasorelaxant effect on rat thoracic aortic on endothelium-dependent manner and its effect depends on the estrogen receptors that activate the PI3K pathway and the Ca^{2+} -calmodulin complex which subsequently activates the NO/cGMP pathway. These results contribute to the better understanding of the role of estrone in the conjugated equine estrogen (CEE) which could be associated to the benefits effects of estrogens in the CEE therapy.

Keywords: Estrogens. Estrone. Vascular endothelium. Nitric Oxide. Vasorelaxant effect.

1. Introdução

1.1. Menopausa e terapia de reposição hormonal

A menopausa é um estado fisiológico que ocorre na vida da mulher, caracterizada pelo fim da capacidade reprodutiva (1), sendo então definido como a cessação permanente da atividade folicular ovariana e eventualmente, do ciclo menstrual (2, 3). Este processo está associado com um declínio progressivo nos níveis de estrogênios, o que afeta muitos tecidos do corpo e produz uma variedade de sinais e sintomas (4). Em contraste, a remoção cirúrgica dos ovários interrompe completamente e de maneira abrupta a produção de estrogênios, o que leva a sintomas mais graves a que aqueles gerados pela menopausa natural (5, 6). Juntamente com a menopausa, devido às alterações hormonais, diversos sintomas são apresentados, como os vasomotores, psíquicos, urogenitais, metabólicos, ósseos e cardiovasculares (7).

A incidência de doenças cardiovasculares (DCV's) em mulheres na fase reprodutiva é menor em relação aos homens de mesma idade, no entanto, essa proteção desaparece após a menopausa (8), mostrando consistentemente a existência de uma associação entre os hormônios femininos e seus efeitos cardioprotetores. Além do mais, os estrogênios produzem um perfil de lipoproteínas favorável, promovem vasodilatação, inibem a resposta à lesão vascular e previnem a aterosclerose (9). Estes hormônios promovem a produção e/ou liberação de fatores com atividade vasoativa, dentre os quais estão os fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRF – *endothelium-derived relaxing factor*) como o óxido nítrico (NO), os prostanoídes vasodilatadores e os fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (EDHF – *endothelium-derived hyperpolarizing factor*), fatores que podem explicar, pelo menos em parte, os efeitos benéficos promovidos pelos hormônios femininos (10). Diante dessas evidências, a introdução da terapia de reposição hormonal (TRH) constitui-se numa abordagem terapêutica para a mulher no período pós-menopausa visando à manutenção dos níveis fisiológicos de hormônios femininos.

Embora a TRH não seja totalmente desprovida de riscos, seus objetivos são de manter os níveis dos estrogênios de forma que alivie os sintomas da menopausa e previna o surgimento de doenças associadas à diminuição desses hormônios (11).

Neste sentido, a TRH pode impedir o desenvolvimento de osteoporose, diminuir o risco de DCV's e melhorar a capacidade cognitiva e de humor (12). Estes efeitos benéficos promovidos com o uso da TRH foram constatados em diversos estudos epidemiológicos, os quais apresentaram evidências de que a reposição hormonal em mulheres pós-menopausa reduz significativamente a mortalidade causada por essas doenças (13-17).

Dentre as várias preparações farmacêuticas utilizadas para a TRH, o Premarin® (Wyeth®, Newridge, CountyKildare, Irlanda) é o medicamento mais comumente prescrito (18). Sua formulação compreende uma mistura de derivados estrogênicos oriundos de éguas prenhes, entre os quais: estrona; equilin; 17β-dihidroequilin; Δ8,9- dehidroestrona; 17α-estradiol; 17α-dihidroequilin; equilenin; 17β-estradiol; 17α-dihidroequilenin e 17β-dihidroequilenin. Dentre estes, a estrona corresponde a aproximadamente 48% do conteúdo estrogênico da formulação (19).

Apesar da origem natural, tem-se demonstrado que os compostos estrogênicos equinos (CEE) não podem ser considerados bioidênticos, ou seja, ter ação idêntica aos hormônios presentes na circulação humana e, portanto, podem apresentar efeitos não comparáveis aos estrogênios humanos (20).

Apesar dos benefícios potenciais que a TRH pode trazer para mulheres na pós-menopausa, dois grandes estudos clínicos - o *Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study* (HERS) (21) e o *Women's Health Initiative* (WHI) (22), questionaram a eficácia dos efeitos protetores dos estrogênios, pois não encontraram relação benéfica entre a TRH e a incidência de eventos cardiovasculares em mulheres na pós-menopausa.

Diante da controvérsia da TRH na prevenção das DCV's em mulheres pós-menopausa, da frequente utilização do Premarin® como medicamento para este fim, e do desconhecimento da real contribuição que cada componente estrogênico presente nos CEE's exerce sobre o sistema cardiovascular, faz-se necessário avaliar individualmente as ações hormonais sobre este sistema, visando auxiliar na compreensão da ação farmacológica de cada estrogênio presente na formulação.

1.2. Estrogênios e seus efeitos vasculares

Estrogênio é o termo genérico utilizado para substâncias quimicamente semelhantes e que funcionem como hormônios endógenos, afetando a função reprodutiva feminina (23). Os estrogênios humanos naturais são a estrona, o estradiol e o estriol. Estes hormônios alternam seus níveis conforme a fase da vida da mulher, sugerindo assim que eles podem apresentar funções específicas tanto nos processos celulares normais como nos patológicos (24).

O estradiol é o hormônio associado com a fase reprodutiva feminina, ao passo que a estrona está presente tanto na fase reprodutiva (~0.5–1 nM) como na pós-menopausa (150–200 pM) e o estriol apresenta níveis aumentados durante a gravidez. Além das ações sobre a função reprodutiva, os efeitos sobre outros tecidos, como ossos e sistemas nervoso e cardiovascular, podem ser diferentemente influenciados por estes hormônios conforme o transcorrer da idade (24). Entre os três estrogênios, o estradiol apresenta atividade estrogênica com potência farmacológica dez vezes maior do que a estrona e oitenta vezes maior que o estriol (25).

Os estrogênios medeiam por meio de seus receptores mecanismos celulares genômicos e não genômicos. No tecido vascular, pode ocorrer a síntese de prostanóides vasodilatadores (26), a ativação da sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS) e o aumento da transcrição do RNAm da eNOS (27). Neste sentido, as ações não genômicas dos estrogênios se caracterizam pelo surgimento dos efeitos vasculares rápidos, que ocorrem em frações de segundos ou minutos, e que diferem temporalmente de sua via clássica de ação (genômica), onde os efeitos surgem horas ou dias depois (28).

Este efeito rápido está relacionado com a ligação dos estrogênios aos receptores de superfície celular, como os receptores de estrogênios (ER's) ou ainda, pelo receptor de estrogênios acoplado à proteína G (GPER ou GPR30) (29). As respostas biológicas deflagradas por estes receptores são mediadas por uma grande variedade de transdutores de sinais, tais como: proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), complexo cálcio-calmodulina (Ca^{2+} -CaM), inibição de NADPH oxidase, eNOS, adenilato ciclase (AC) e EDHF (30).

Exemplificando as ações destes mediadores, descreve-se, a seguir, as vias de sinalização relacionadas à eNOS, à AC e ao EDHF.

A modulação do tônus vascular feita através do óxido nítrico (NO) inicia no endotélio pela ação da NOS endotelial (eNOS), a isoforma enzimática predominante e responsável pela produção da maior parte de NO (31). Após sua formação, o NO se difunde das células endoteliais para as células musculares lisas vasculares causando a estimulação da guanilato ciclase solúvel (GCs), com consequente aumento da produção de 3',5' guanosina monofosfato cíclico (GMPc). Nas células musculares lisas, o GMPc ativa a proteína quinase dependente de GMPc (PKG) (32), a qual promove a fosforilação de diversas proteínas responsáveis pela redução na concentração de Ca^{2+} livre intracelular e a sensibilidade da maquinaria contrátil ao Ca^{2+} , ocasionando o efeito vasorelaxante (33). Nesse sentido, a PKG ativa canais de K^+ dependentes de Ca^{2+} , promovendo hiperpolarização da membrana celular e inibição do influxo de Ca^{2+} através dos canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes. Estes canais podem ainda ser fosforilados diretamente pela PKG, impedindo o influxo de Ca^{2+} por eles. A PKG atua também nas proteínas Ca^{2+} -ATPases da membrana plasmática e do retículo sarcoplasmático (SERCA), sua atuação nas proteínas da membrana plasmática celular promove a saída de Ca^{2+} , enquanto que sua ação na membrana do retículo desencadeia a receptação do Ca^{2+} para o interior do mesmo. Adicionalmente, a PKG pode fosforilar o receptor IP_3 na membrana do retículo sarcoplasmático, desencadeando a saída do Ca^{2+} para o citoplasma e consequentemente reduzindo a atividade deste receptor. Nas proteínas contráteis, a PKG é responsável pela desfosforilação e inativação da quinase das cadeias leves de miosina (MLCK), favorecendo a perda do tônus muscular através da redução na fosforilação das cadeias leves de miosina (MLC) e consequentemente levando à vasodilatação (31, 33-35).

A ação vascular da AC inicia quando os fosfolipídios de membrana liberam o ácido araquidônico que os compõe. Através da ação da enzima ciclooxigenase (COX), o ácido araquidônico é convertido em prostaglandina H_2 (PGH_2) que através de sintases específicas é convertida em PGI_2 , PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGD_2 ou tromboxano A_2 (TXA_2) (36-38). A PGI_2 é também conhecida como prostaciclina, sendo esta o produto mais abundante produzido a partir do ácido araquidônico e responsável pelo efeito vasodilatador, além de ser um inibidor endógeno da agregação plaquetária

(39, 40). A PGI_2 após ser produzida e liberada, estimula a AC, levando ao aumento do monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), um segundo mensageiro que ativa a proteína quinase dependente de AMPc (PKA). A PKA faz com que ocorra a diminuição da sensibilidade do aparelho contrátil da musculatura lisa vascular através da redução dos níveis de cálcio citoplasmático, podendo este mecanismo ser através da ativação de canais de potássio sensíveis ao ATP, ocasionando hiperpolarização e estimulando a saída de Ca^{2+} do citosol, impedindo assim a interação actina-miosina e, conseqüentemente, promovendo o relaxamento do músculo liso vascular (41-43).

O EDHF é liberado através da estimulação de diferentes agentes, em geral, seu mecanismo de ação se dá através da abertura de canais de potássio (44), levando à hiperpolarização de células do músculo liso vascular (45). Foi visto ainda que EDRF como NO e PGI_2 , induzem vasodilatação por ativação de canais de potássio na membrana celular, permitindo um efluxo de K^+ da célula, redução do potencial de membrana, e hiperpolarização (46). É também demonstrado que a abertura de canais de potássio pode estar envolvida na vasodilatação independente de NO ou de PGI_2 mediada por compostos estrogênicos (45, 47). Como consequência da hiperpolarização promovida pela abertura dos canais de potássio, ocorre o fechamento de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem na membrana celular e o relaxamento do músculo liso vascular, produzindo a vasodilatação (46, 48).

Pela via genômica, os estrogênios exercem sua função biológica através de transcrição gênica. Este mecanismo ocorre através da ativação dos ER's citosólicos e nucleares (subtipos α e β) os quais podem formar homo ou heterodímeros de ER α e ER β . Nesta via, os receptores ligados aos estrogênios dimerizam e passam a funcionar como fatores de transcrição que se ligam a sequências específicas no DNA, conhecidas como elementos responsivos ao estrogênio, e presentes na região promotora ou potencializadora do gene alvo, desencadeando a ativação da cascata de sinalização que culmina nos efeitos biológicos deflagrados pelos estrogênios (49, 50).

Um resumo dos mecanismos celulares envolvidos no efeito relaxante promovido pelos estrogênios no sistema vascular e das vias envolvidas neste efeito é apresentado na Figura 1.

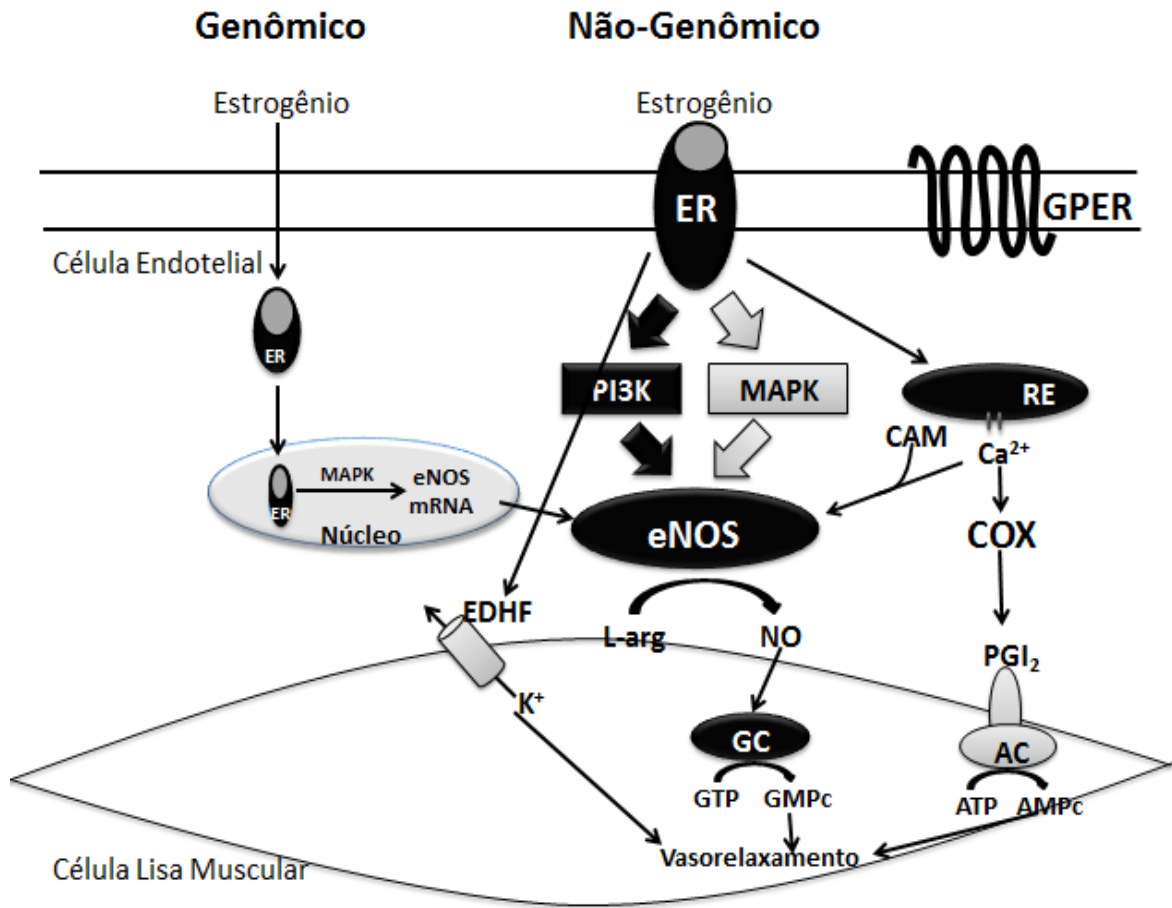


Figura 1: Mecanismos de vasorelaxamento dependentes do endotélio induzidos pelos estrogênios. No mecanismo genômico, o estrogênio liga em receptores citosólicos/nucleares levando à ativação da MAPK, à transcrição de genes e ao aumento da produção da eNOS. Na via não genômica, os estrogênios se ligam aos ERs presentes na membrana de superfície endotelial, que estão acoplados à liberação de cálcio do retículo endoplasmático e à estimulação da via MAPK ou PI3K, levando a ativação da eNOS e à produção de NO. O NO, por sua vez, difunde para as células do músculo liso vascular e estimula a guanilato ciclase, ocasionando o aumento do GMPc. O GMPc causa o relaxamento do músculo liso vascular através da diminuição da $[Ca^{2+}]$; e da sensibilidade dos miofilamentos a este íon. ER também podem inibir a produção de NADPH, impedindo assim a inativação de NO e a formação de peroxinitritos ($ONOO^-$). O ER endotelial pode também ativar COX e aumentar a produção de PGI_2 , as quais ligam em receptores presentes no músculo liso vascular e promovem a ativação da adenilato ciclase (AC) e o aumento da formação de AMPc. O AMPc promove vasorelaxamento por mecanismos semelhantes aos do GMPc. ER também pode aumentar a produção de EDHF, que ativa canais de potássio e promove o fechamento canais de Ca^{2+} ocasionando o relaxamento vascular (Adaptado de Orshal e Khalil, 2004).

Os receptores de estrogênios (ER α e ER β) estão distribuídos em diferentes tipos de tecidos. ER α é expresso no útero, fígado, mamas e rins. ER β é predominantemente encontrado em tecidos reprodutivos, mas também é visto em muitos tecidos não reprodutivos, incluindo cérebro, ossos, trato urinário e sistema vascular. Ovário, útero, mama, ossos, cérebro e sistema cardiovascular contêm ambos ER α e ER β (51).

No sistema vascular ocorre a expressão desses dois receptores tanto no músculo liso (52) como no endotélio (53). No entanto, é o ER α que medeia a maioria das ações vasculares dos estrogênios (54) influenciando principalmente na biodisponibilidade de NO (27). Os níveis proteicos de ER α estão relacionados com a intensidade da dilatação promovida pelo endotélio e são menores em mulheres pós-menopausa quando comparado com aquelas em idade fértil (55).

1.3. Estrona

A estrona é o hormônio circulante predominante durante a menopausa devido a queda nos níveis hormonais de outros estrogênios, mantendo suas concentrações séricas no período pós-menopausa na proporção 2:1 em relação ao estradiol (Kuhl, 2005). Este hormônio compreende uma molécula de 18 átomos de carbono e no organismo é sintetizada a partir do colesterol, sendo produzida nos ovários, testículos e glândulas adrenais (56).

Conforme ilustrado na Figura 2, a síntese da estrona é realizada a partir do colesterol por ação de células esteroideogênicas nos sítios de síntese de esteroides. Posteriormente, nas mitocôndrias de tecidos formadores de hormônios esteroides, acontece a clivagem da cadeia lateral que se projeta do anel D do colesterol – reduzindo o número de átomos de carbono de 27 para 18. Todas as reações de hidroxilação e oxigenação que ocorrem durante a biossíntese de esteróides, são catalisadas por oxidases de função mista (citocromo P450 mitocondrial), que utilizam NADPH e O₂ como cofatores (57). A última etapa do processo de síntese da estrona é a aromatização, catalisada pelas aromatases do complexo enzimático citocromo P450 (CYP450), que funcionam como desmetilases e estão presentes no retículo endoplasmático liso. Essa etapa converte testosterona em estradiol e androstenediona em estrona (58). A estrona pode ainda ser um metabólito do

estradiol, destacando-se entre os principais estrogênios produzidos no organismo juntamente com o estradiol e o estriol.

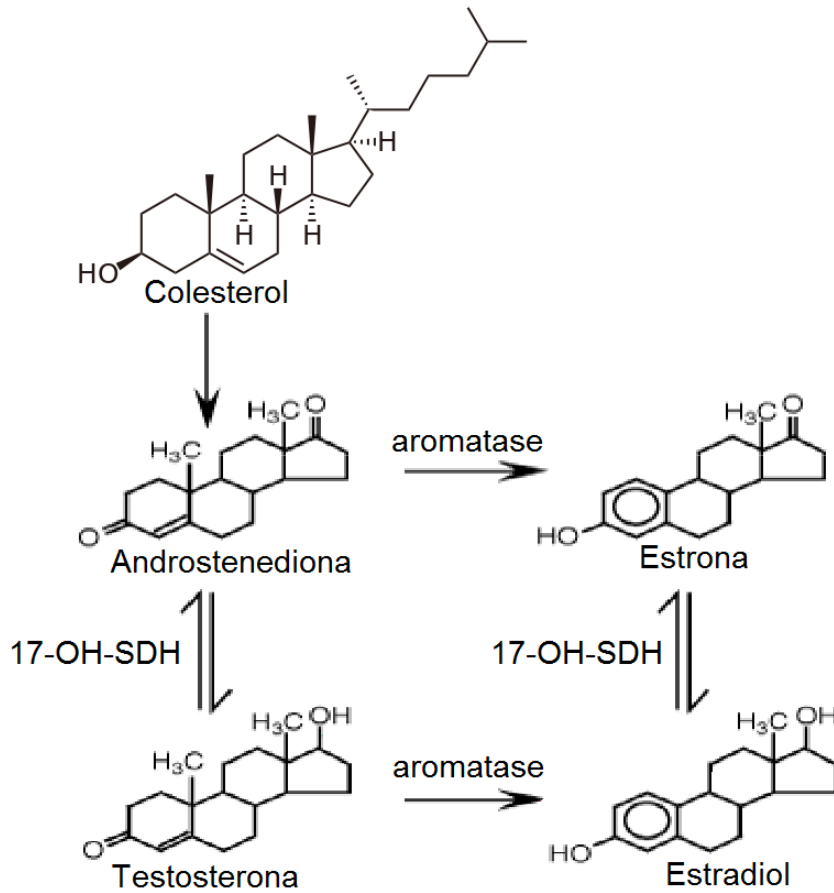


Figura 2: Estrutura e produção de estrona e estradiol. O colesterol, através da ação de enzimas do citocromo P450, é convertido em androstenediona que, por ação da aromatase é convertida em estrona. A androstenediona através da 17-Hidroxiesteroide dehidrogenase (17-OH-SDH) pode ainda ser convertida em testosterona que, por ação da aromatase dá origem estradiol. O estradiol por sua vez, pode ser convertido em estrona pela 17-OH-SDH (Adaptado de Meinhardt e Mullis, 2002).

O estradiol é o hormônio estrogênico mais abundante além de ser o mais potente (51, 56), sendo assim o hormônio mais bem caracterizado quanto as ações cardiovasculares. A estrona, no entanto, tem aumentado o interesse de pesquisas que visem à elucidação de seu efeito vascular, uma vez que há poucos dados na literatura e também pelo fato de ser o hormônio majoritário em preparações utilizadas na TRH.

2. Justificativa

Segundo a Organização Mundial da Saúde, a menopausa é definida como “o fim definitivo da menstruação resultante da perda da atividade folicular ovariana” (59). Entre as consequências da diminuição dos níveis estrogênicos que ocorrem após a menopausa, está o aumento na incidência das DCV's, que é a principal causa de morte em mulheres nesta condição (25).

A TRH tem sido uma prática clínica durante as últimas décadas e é indicada para a prevenção e o tratamento dos sintomas crônicos relacionados à menopausa. No entanto, quando os primeiros resultados de grandes estudos clínicos conduzidos com o objetivo de avaliar os riscos e benefícios da TRH a longo prazo foram publicados, eles contradisseram estudos anteriores, mostrando risco aumentado de ocorrência de eventos cardiovasculares e de câncer de mama em mulheres sob reposição hormonal (22).

Entre as preparações farmacêuticas utilizadas como repositores estrogênicos na TRH tem-se o Premarin® como um dos mais prescritos. Esta preparação é um CEE contendo, entre eles, o 17β -estradiol e a estrona, que são dois dos principais estrogênios fisiológicos humanos. Apesar de não serem considerados bioidênticos, a potência do CEE é considerada maior que a do 17β -estradiol, que é o estrogênio humano mais potente e que diminui consideravelmente seus níveis após a menopausa (60).

Em virtude do questionamento sobre os benefícios da TRH, faz-se necessário aumentar o conhecimento dos efeitos dos estrogênios sobre os tecidos biológicos. Em especial, estudos sobre as ações destes hormônios no sistema cardiovascular são imprescindíveis, haja vista que a incidência de eventos patológicos neste sistema torna-se mais frequente em mulheres pós-menopausa, sendo a principal causa de morte nestes indivíduos.

Como o 17β -estradiol é considerado o principal estrogênio relacionado aos efeitos biológicos, os estudos tem-se concentrado na elucidação dos efeitos vasculares deste hormônio. Entretanto, a estrona é o hormônio circulante predominante após a menopausa e também o componente majoritário da preparação Premarin®, representando 48% do total de estrogênios presentes na fórmula, enquanto o 17β -estradiol perfaz 0,68% da composição.

Diante destas evidências, torna-se necessário a realização de estudos que visem determinar os efeitos vasculares exercidos pela estrona com o objetivo de contribuir para o entendimento da ação vascular e da real contribuição que este hormônio emprega em preparações utilizadas na TRH.

3. Objetivos

Geral:

Avaliar o efeito não genômico da estrona sobre a musculatura lisa vascular de aorta torácica de ratos Wistar e determinar os mecanismos de ação envolvidos neste efeito.

Específicos:

- 1) Avaliar a participação do endotélio no efeito vascular promovido pela estrona.
- 2) Avaliar a participação do músculo liso no efeito vascular promovido pela estrona.
- 3) Determinar o(s) mecanismo(s) de ação celulares envolvido(s) no efeito vascular promovido pela estrona utilizando antagonistas farmacológicos como ferramentas de investigação.
- 4) Comparar a eficácia do efeito vascular e os mecanismos de ação da estrona com aqueles promovidos pelo 17β -estradiol.

4. Materiais e Métodos

4.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos adultos (modelo experimental que descarta qualquer possibilidade de alteração que poderia ser vista em fêmeas), com 12 semanas, pesando entre 200 e 300 gramas. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Goiás (UFG) e mantidos no Biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas 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 do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e de acordo com as normas institucionais do Comitê de Ética em Pesquisa da UFG através de projeto aprovado por este mesmo comitê (CEP/UFG 20/2013).

4.2. Drogas e Reagentes

Para execução dos protocolos experimentais foram utilizadas as seguintes drogas e reagentes: cloreto de sódio (Synth - Brasil), cloreto de potássio (Synth - Brasil), cloreto de cálcio dihidratado (Vetec - Brasil), sulfato de magnésio (Synth - Brasil), fosfato de potássio monobásico (Impex - Brasil), bicarbonato de sódio (Vetec - Brasil), glicose (Synth - Brasil), EDTA sal dissódico (Synth - Brasil), Etanol (Vetec - Brasil), dimetilsulfóxido (DMSO) (Synth - Brasil), estrona (Sigma - USA), 17β -estradiol (Sigma - USA), fenilefrina (Phe) (Sigma - USA), acetilcolina (ACh) (Sigma - USA), N ω -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (Sigma - USA), indometacina (Sigma - USA), tetraetilamônio (TEA) (Sigma - USA), 1H-[1,2,4]-oxadiazole-[4,3- α]-quinoxalin-1-one (ODQ) (Sigma - USA), nitroprussiato de sódio (NPS) (Sigma - USA), ICI 182,780 (Sigma - USA), Calmidazolium (Sigma - USA), Wortmannin (Sigma - USA), SB 203580 (Sigma - USA), G-1 (Caymann - USA) e G-15 (Caymann - USA). Indometacina, estrona e 17β -estradiol foram dissolvidos em etanol; ODQ, ICI 182,780, Wortmannin, SB 203580, G-1 e G-15 foram dissolvidos em DMSO e as

outras soluções, incluindo a solução Krebs-Henseleit modificada, foram preparadas em água destilada.

4.3. Reatividade Vascular

Os ratos foram eutanasiados por decapitação, as aortas torácicas foram 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 do gancho foi conectada a um transdutor de força que acoplado a um sistema computadorizado permitindo o registro das contrações (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 responsividade 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, para anéis sem endotélio, aqueles cujo relaxamento máximo produzido correspondeu a 10% (61).

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.

4.4. Protocolos experimentais

4.4.1. Avaliação do efeito da estrona frente à contração induzida por Phe em preparações de anéis de aorta de rato com e sem endotélio

Após o período de estabilização, uma segunda resposta a Phe (1 μ M) foi obtida e, durante a fase tônica da contração resultante, foram construídas curvas concentração efeito (CCE) cumulativas para a estrona ou para o 17 β -estradiol (controle do estudo) nas concentrações de 0,1 μ M; 0,3 μ M; 1 μ M; 3 μ M; 10 μ M e 100 μ M. Cerca de 60 minutos após o término deste procedimento, induziu-se uma nova contração com Phe, seguida pela adição de ACh (10 μ M), com o objetivo de avaliar se a estrona ou o 17 β -estradiol comprometia a viabilidade tecidual. O veículo (etanol) também foi testado e a concentração final nas cubas não excedeu 1%.

Com o objetivo de avaliar o papel do endotélio no efeito da estrona ou do 17 β -estradiol, investigamos a capacidade destas substâncias causarem relaxamento vascular em anéis com e sem endotélio vascular. Ambas preparações foram previamente contraídas com Phe (1 μ M) e em seguida CCE para a estrona ou estradiol foram constituídas. Ao final deste procedimento, nas preparações sem endotélio foi adicionado nitroprussiato de sódio (NPS - 1 μ M), um doador de óxido nítrico, para que fosse produzido relaxamento independente do endotélio, a fim de avaliar a viabilidade da preparação.

4.4.2. Avaliação da participação dos receptores de estrogênios (ER's) no efeito vasorelaxante da estrona

Após avaliação da presença de endotélio vascular funcional, os tecidos aórticos foram previamente incubados durante 30 minutos com ICI 182,780 (100 μ M – um inibidor não seletivo dos ER's). Após o período de incubação, induziu-se uma contração com Phe (1 μ M) e na fase tônica desta contração adicionou-se a estrona ou 17 β -estradiol (0,1 μ M – 100 μ M) cumulativamente.

4.4.3. Avaliação da participação dos receptores de estrogênios acoplados a proteína G (GPER) no efeito vasorelaxante da estrona

Após avaliação da presença de endotélio vascular funcional, os tecidos aórticos foram previamente incubados durante 30 minutos com G-15 (30 μ M – um inibidor do GPER). Após o período de incubação, induziu-se uma contração com Phe (1 μ M) e na fase tônica desta contração adicionou-se a estrona ou 17 β -estradiol (0,1 μ M – 100 μ M) cumulativamente.

4.4.4. Avaliação da participação da via PI3K no efeito vasorelaxante da estrona e do 17 β -estradiol

Anéis de aorta com endotélio funcional foram previamente incubados com wortmannin (10 μ M – inibidor da PI3K) durante 30 minutos avaliando assim o envolvimento da PI3K. Após o período de incubação do antagonista, as preparações foram pré-contraídas com Phe (1 μ M) e, quando a resposta contrátil atingiu o platô, CCE para a estrona ou para o 17 β -estradiol (0,1 μ M – 100 μ M) foram construídas.

4.4.5. Avaliação da participação do complexo Ca²⁺-CaM no efeito vasorelaxante da estrona e do 17 β -estradiol

Anéis de aorta com endotélio funcional foram previamente incubados com calmidazolium (10 μ M – inibidor do complexo Ca²⁺-CaM) durante 30 minutos avaliando assim o envolvimento do complexo Ca²⁺-CaM. Após o período de incubação do antagonista, as preparações foram pré-contraídas com Phe (1 μ M) e, quando a resposta contrátil atingiu o platô, CCE para a estrona ou para o 17 β -estradiol (0,1 μ M – 100 μ M) foram construídas.

4.4.6. Avaliação da participação da p38MAPK no efeito vasorelaxante da estrona e do 17 β -estradiol

Anéis de aorta com endotélio funcional foram previamente incubados com SB 203580 (10 μ M – inibidor da p38MAPK) durante 30 minutos avaliando assim o envolvimento da via p38MAPK. Após o período de incubação do antagonista, as preparações foram pré-contraídas com Phe (1 μ M) e, quando a resposta contrátil atingiu o platô, CCE para a estrona ou para o 17 β -estradiol (0,1 μ M – 100 μ M) foram construídas.

4.4.7. Avaliação da participação da via NO/GMPc no efeito vasorelaxante da estrona

Anéis de aorta com endotélio funcional foram previamente incubados com N ω -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME - 100 μ M; inibidor não seletivo da eNOS) durante 30 minutos para avaliação da participação do NO. Para avaliar a participação do GMPc, anéis aórticos com endotélio funcional foram previamente incubados durante 30 minutos com 1H-[1,2,4]-oxadiazole-[4,3- α]-quinoxalin-1-one (ODQ - 10 μ M; inibidor da GCs). Após o período de incubação dos antagonistas, as preparações foram pré-contraídas com Phe (1 μ M) e, quando a resposta contrátil atingiu o platô, CCE para a estrona ou para o 17 β -estradiol (0,1 μ M – 100 μ M) foram construídas.

4.4.8. Avaliação da participação de prostanóides vasodilatadores no efeito vasorelaxante da estrona e do 17 β -estradiol

Após avaliação da presença de endotélio vascular funcional, os tecidos aórticos foram previamente incubados durante 30 minutos com indometacina (10 μ M – um inibidor não seletivo da COX). Após o período de incubação, induziu-se contração com Phe (1 μ M) e a seguir adicionou-se a estrona ou 17 β -estradiol (0,1 μ M – 100 μ M) cumulativamente.

4.4.9. Avaliação da participação canais de potássio no efeito vasorelaxante da estrona e do 17 β -estradiol

Após avaliação da presença de endotélio funcional, os tecidos aórticos foram previamente incubados durante 30 minutos com tetraetilamônio (TEA, 1mM; inibidor não seletivo dos canais de potássio). Após o período de incubação e da contração com Phe (1 μ M), adicionou-se a estrona ou 17 β -estradiol (0,1 μ M – 100 μ M) cumulativamente.

4.5. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (epm) do percentual de relaxamento vascular relativo à redução da contração máxima obtida com a Phe (E_{max}) de 5 a 7 preparações por grupo.

Para a comparação entre mais de dois grupos, os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey-Kramer. Quando a comparação foi realizada entre dois grupos, os resultados foram submetidos ao teste “t” de Student (bicaudal não pareado).

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).

5. Resultados

5.1. Efeito da estrona frente à contração induzida por Phe em preparações de anéis de aorta de rato com e sem endotélio

Em anéis de aorta torácica de ratos com endotélio, a estrona produziu efeito vasodilatador dependente de concentração (0,1–100 μM), apresentando relaxamento máximo (E_{max}) de $42,38 \pm 2,46\%$. Este efeito foi significativamente diferente quando comparado ao relaxamento promovido pelo veículo ($E_{\text{max}} = 8,70 \pm 3,05\%$) ou pelo 17β -estradiol ($E_{\text{max}} = 94,23 \pm 3,67\%$) (Fig. 3 A). Os valores de CE_{50} determinados para a estrona e para o estradiol foram $16,25 \pm 4,65$ e $22,97 \pm 6,57$ μM , respectivamente. Nas condições experimentais deste estudo, o 17β -estradiol apresentou eficácia 2,2 vezes maior em relação à estrona (Tabela 1).

Em preparações desprovidas de endotélio, a estrona não apresentou ação vasodilatadora significativa quando comparada ao controle (veículo) ($E_{\text{max}} = 10,84 \pm 0,97$ e $5,83 \pm 1,59$ %, respectivamente). Entretanto, o 17β -estradiol apresentou efeito vasodilatador ($E_{\text{max}} = 44,68 \pm 3,97$) significativamente diferente quando comparado ao do veículo (Fig. 3B). A CE_{50} determinada para o estradiol foi $24,38 \pm 15,27$ μM .

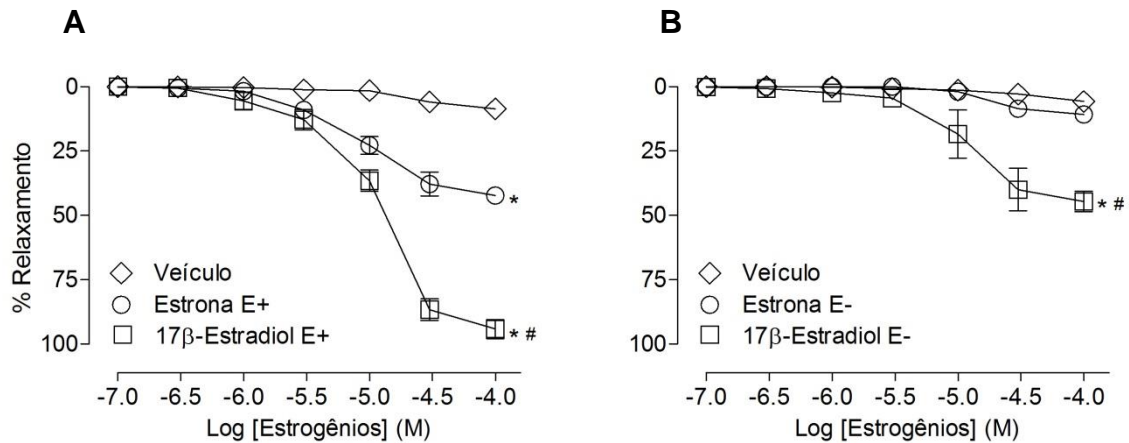


Figura 3: Curvas concentração efeito (CCE) da estrona e do 17β -estradiol (0,1 – 100 μ M) em aortas torácicas de ratos Wistar com endotélio (E+) (A) e sem endotélio (E-) (B) pré-contraídas com Phe (1 μ M). Os símbolos e linhas verticais representam a média \pm epm de 5-7 preparações por grupo. * $P < 0,05$ quando comparado ao veículo. # $P < 0,05$ quando comparado à estrona

Tabela 1 – Valores do efeito máximo (E_{max}) (%) e E_{max} subtraído do veículo ($E_{max} - V$) para a estrona e para o 17β -estradiol em preparações de aorta torácica de ratos Wistar com (E+) ou sem endotélio (E-) pré-contraídas com fenilefrina (Phe). Os dados são apresentados em percentual de redução da contração máxima obtida com a Phe (E_{max}).

	Estrona		17β -estradiol	
	E_{max} (%)	$E_{max} - V$ (%)	E_{max} (%)	$E_{max} - V$ (%)
E+	42,38 \pm 2,46*	33,68 \pm 2,46	94,23 \pm 3,67	85,53 \pm 3,67
E-	10,84 \pm 0,97#	5,01 \pm 0,97	44,68 \pm 3,97*	38,85 \pm 3,97

Os valores de E_{max} (Efeito máximo) representam a média \pm epm de 5-7 preparações por grupo.

* $P < 0,05$ quando comparado ao E_{max} do estradiol em preparações E+.

$P < 0,05$ quando comparado ao E_{max} do estradiol em preparações E-.

5.2. Avaliação da participação de receptores estrogênicos no efeito vasorelaxante da estrona

A incubação por 30 minutos com o antagonista de receptores de estrogênios não-específico ICI 182,780 (100 μ M) diminuiu o relaxamento induzido pela estrona ($E_{\max} = 13,39 \pm 3,64\%$) quando comparado com o efeito promovido em preparações de anéis de aorta torácicas de ratos Wistar na ausência do inibidor ($E_{\max} = 42,58 \pm 2,99\%$) (Figura 4A). Nas mesmas condições experimentais, o relaxamento promovido pelo 17 β -estradiol (94,53 \pm 2,86%) foi reduzido para 23,94 \pm 3,99% (Figura 4B).

Comparando-se os resultados obtidos com a estrona e com o 17 β -estradiol na presença do antagonista ICI 182,780 (100 μ M), observa-se que a inibição do relaxamento vascular não diferiu entre os mesmos (68,56 \pm 7,20 e 74,68 \pm 4,22%, respectivamente).

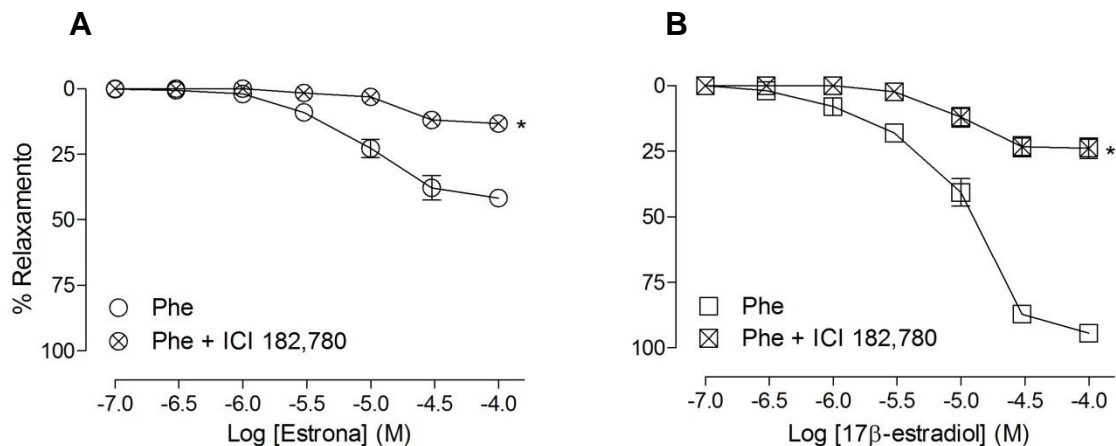


Figura 4: Efeito da incubação com ICI 182,780 (100 μ M – 30 min) sobre o efeito relaxante da estrona (A) e do 17 β -estradiol (B) (0,1 – 100 μ M) em aorta torácica de ratos pré-contraídas com fenilefrina (Phe - 1 μ M). Os valores estão representados como média \pm epm de 5-7 preparações por grupo. * $P < 0,05$ quando comparado ao E_{\max} na ausência do inibidor.

Tabela 2 – Valores do E_{max} e de inibição de E_{max} obtidos em preparações de anéis de aorta de ratos Wistar com a estrona ou com o 17β -estradiol na ausência e na presença do antagonista de receptores de estrogênios ICI 182,780 ($100\mu\text{M}$). Os dados são apresentados em percentual de redução da contração máxima obtida com a Phe (E_{max}) e em percentual de inibição do relaxamento promovido pelo antagonista.

	Estrona		17β -estradiol	
	E_{max} (%)	Inibição (%)	E_{max} (%)	Inibição (%)
Phe	$42,58 \pm 2,99$	----	$94,53 \pm 2,86$	----
+ ICI 182,70	$13,39 \pm 3,06^*$	$68,56 \pm 7,20$	$23,94 \pm 3,99^\#$	$74,68 \pm 4,22$

Os valores de E_{max} (Efeito máximo) representam a média \pm epm de 5-7 preparações por grupo.

* $P < 0,05$ quando comparado à estrona na ausência do inibidor.

$P < 0,05$ quando comparado ao 17β -estradiol na ausência do inibidor.

5.3. Avaliação da participação dos receptores GPER no efeito vasorelaxante da estrona

Em anéis de aorta com endotélio intacto pré-contraídos com Phe (1 μ M), a pré-incubação por 30 minutos com o antagonista dos receptores GPER G-15 (30 μ M), não inibiu o vasorelaxamento induzido pela estrona ($E_{max} = 46,57 \pm 4,36\%$) (Figura 5A) ou pelo 17 β -estradiol ($E_{max} = 81,68 \pm 4,21\%$) (Figura 5B). A incubação com G-15, no entanto, inibiu o relaxamento promovido pelo agonista seletivo destes receptores G1 de 45,73 \pm 10,74% para 8,91 \pm 0,79% (Figura 5C) (Tabela 3).

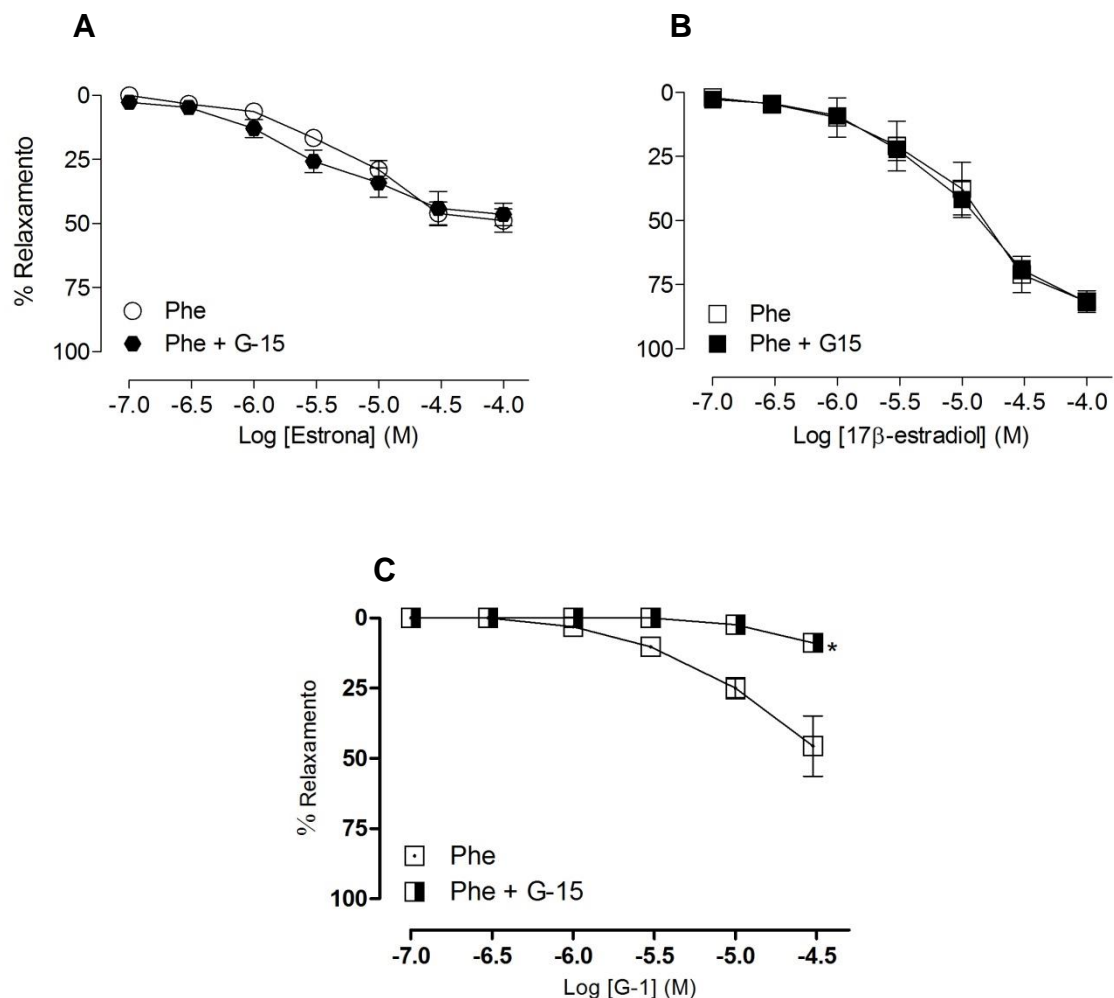


Figura 5: Efeito da incubação do antagonista de GPER (G-15) (30 μ M - 30 min) sobre o efeito relaxante da estrona (0,1 – 100 μ M) (A), do 17 β -estradiol (B) (0,1 – 100 μ M) e do agonista de GPER (G-1) (C) (0,1 – 30 μ M) em aorta torácica de ratos pré-contraídas com fenilefrina (Phe - 1 μ M). Os valores estão representados como média \pm epm de 4-7 preparações por grupo.

Tabela 3 – Valores do E_{max} e de inibição de E_{max} obtidos em preparações de anéis de aorta de ratos Wistar com a estrona ou com o 17β -estradiol na ausência e na presença do inibidor de receptores GPER com G-15 ($30\mu\text{M}$). Os dados são apresentados em percentual de redução da contração máxima obtida com a Phe (E_{max}) e em percentual de inibição do relaxamento promovido pelo antagonista.

	G-1		Estrona		17 β -estradiol	
	E_{max} (%)	Inibição (%)	E_{max} (%)	Inibição (%)	E_{max} (%)	Inibição (%)
Sem Inibidor	45,73 \pm 10,74	----	48,95 \pm 4,51	----	81,94 \pm 3,05	----
+ G-15	8,91 \pm 0,79*	80,51 \pm 1,73	46,57 \pm 4,36	----	81,68 \pm 4,21	----

Os valores de E_{max} (Efeito máximo) representam a média \pm epm de 4-7 preparações por grupo.

* $P < 0,05$ quando comparado ao efeito de G-1 na ausência do inibidor.

5.4. Avaliação da participação da via PI3K no efeito vasorelaxante promovido pela estrona

A incubação por 30 minutos com o inibidor da PI3K (wortmannin; 1 μ M) diminuiu o relaxamento induzido pela estrona de $41,73 \pm 4,15\%$ para $12,37 \pm 1,25\%$, valor semelhante ao efeito promovido pelo veículo na ausência de estrona ($8,70 \pm 3,05\%$). Este mesmo inibidor diminuiu o relaxamento promovido pelo 17 β -estradiol de $94,87 \pm 2,26\%$ para $49,55 \pm 2,09\%$ (Figura 6).

Comparando-se os resultados obtidos com a estrona e com o 17 β -estradiol na presença do antagonista wortmannin (1 μ M), observa-se que a inibição do relaxamento vascular diferiu entre os mesmos ($70,36 \pm 3,00$ e $47,77 \pm 2,21\%$, respectivamente) (Tabela 4).

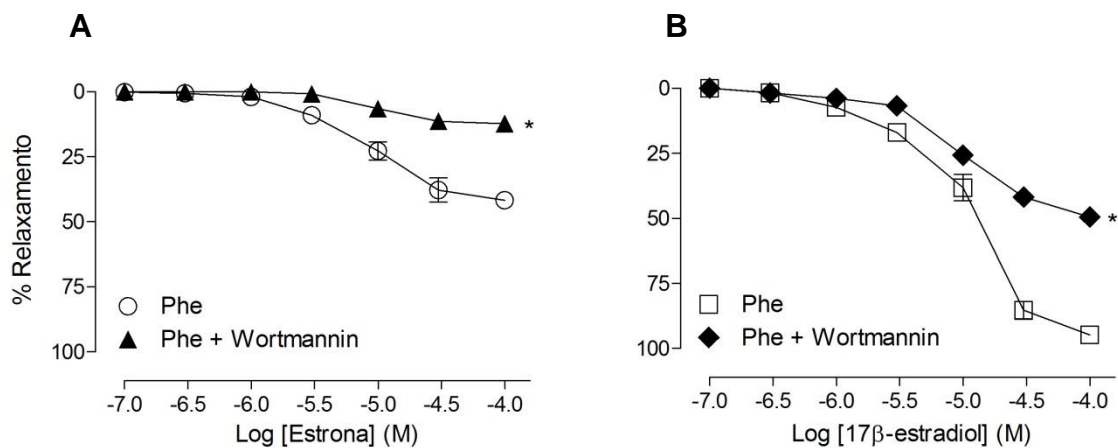


Figura 6: Vasorelaxamento produzido pela estrona (A) ou pelo 17 β -estradiol (B) em anéis aórticos de ratos com endotélio intacto pré-contraídos com Phe (1 μ M) na ausência ou na presença de wortmannin (inibidor da PI3K – 1 μ M). Os valores estão representados como média \pm epm de 5-7 preparações por grupo. * $P < 0,05$ quando comparado ao relaxamento na ausência do inibidor.

Tabela 4 – Valores do E_{max} e de inibição de E_{max} obtidos em preparações de anéis de aorta de ratos Wistar com a estrona ou com o 17β -estradiol na ausência e na presença de Wortmannin ($1\mu\text{M}$; inibidor de PI3K). Os dados são apresentados em percentual de redução da contração máxima obtida com a Phe (E_{max}) e em percentual de inibição do relaxamento promovido pelo antagonista.

	Estrona		17β -estradiol	
	E_{max} (%)	Inibição (%)	E_{max} (%)	Inibição (%)
Sem Inibidor	$41,73 \pm 4,15$	----	$94,87 \pm 2,26$	----
+ wortmannin	$12,37 \pm 1,25^*$	$70,36 \pm 3,00$	$49,55 \pm 2,09^\#$	$47,77 \pm 2,21$

Os valores de E_{max} (Efeito máximo) representam a média \pm epm de 5-7 preparações por grupo.

* $P < 0,05$ quando comparado à estrona na ausência do inibidor.

$P < 0,05$ quando comparado ao 17β -estradiol na ausência do inibidor.

5.5. Avaliação da participação do complexo Ca^{2+} -CaM no efeito vasorelaxante promovido pela estrona

A incubação por 30 minutos com o inibidor do complexo Ca^{2+} -CaM (calmidazolium; $10\mu\text{M}$) diminuiu o relaxamento induzido pela estrona de $40,94 \pm 2,96\%$ para $30,34 \pm 1,72\%$. Este mesmo inibidor diminuiu o relaxamento promovido pelo 17β -estradiol de $94,98 \pm 2,22\%$ para $60,36 \pm 6,00\%$ (Figura 7).

Comparando-se os resultados obtidos com a estrona e com o 17β -estradiol na presença do antagonista calmidazolium ($10\mu\text{M}$), observa-se que a inibição do relaxamento vascular diferiu entre os mesmos ($25,89 \pm 4,20$ e $36,45 \pm 6,32\%$, respectivamente) (Tabela 5).

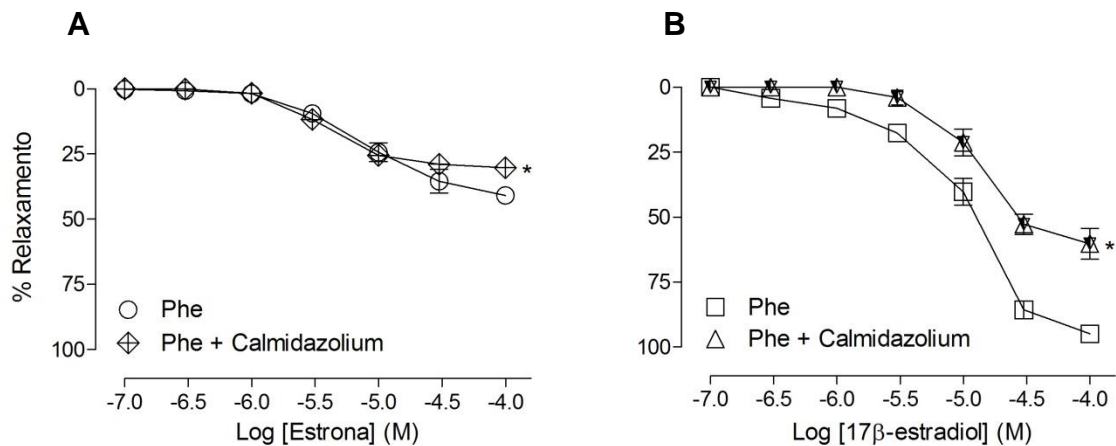


Figura 7: Vasorelaxamento produzido pela estrona ou pelo 17β -estradiol em anéis aórticos de ratos com endotélio intacto pré-contraídos com Phe ($1\mu\text{M}$) na ausência ou na presença de calmidazolium (inibidor da CaM – $10\mu\text{M}$). Os valores estão representados como média \pm epm de 5-7 preparações por grupo. * $P < 0,05$ quando comparado ao relaxamento na ausência do inibidor.

Tabela 5 – Valores do E_{max} e de inibição de E_{max} obtidos em preparações de anéis de aorta de ratos Wistar com a estrona ou com o 17β -estradiol na ausência e na presença de Calmidazolium ($10\mu\text{M}$; inibidor da CaM). Os dados são apresentados em percentual de redução da contração máxima obtida com a Phe (E_{max}) e em percentual de inibição do relaxamento promovido pelo antagonista.

	Estrona		17β -estradiol	
	E_{max} (%)	Inibição (%)	E_{max} (%)	Inibição (%)
Sem Inibidor	$40,94 \pm 2,96$	----	$94,98 \pm 2,22$	----
+ Calmidazolium	$30,34 \pm 1,72^*$	$25,89 \pm 4,20$	$60,36 \pm 6,00^\#$	$36,45 \pm 6,32$

Os valores de E_{max} (Efeito máximo) representam a média \pm epm de 5-7 preparações por grupo.

* $P < 0,05$ quando comparado à estrona na ausência do inibidor.

$P < 0,05$ quando comparado ao 17β -estradiol na ausência do inibidor.

5.6. Avaliação da participação da p38MAPK no efeito vasorelaxante promovido pela estrona

Em anéis de aorta com endotélio intacto pré-contraídos com Phe (1 μ M), a pré-incubação com SB 203580 (10 μ M), não inibiu o vasorelaxamento induzido pela estrona ($E_{max} = 37,68 \pm 3,22\%$) (Figura 8A) ou pelo 17 β -estradiol ($E_{max} = 70,15 \pm 4,31\%$) (Figura 8B).

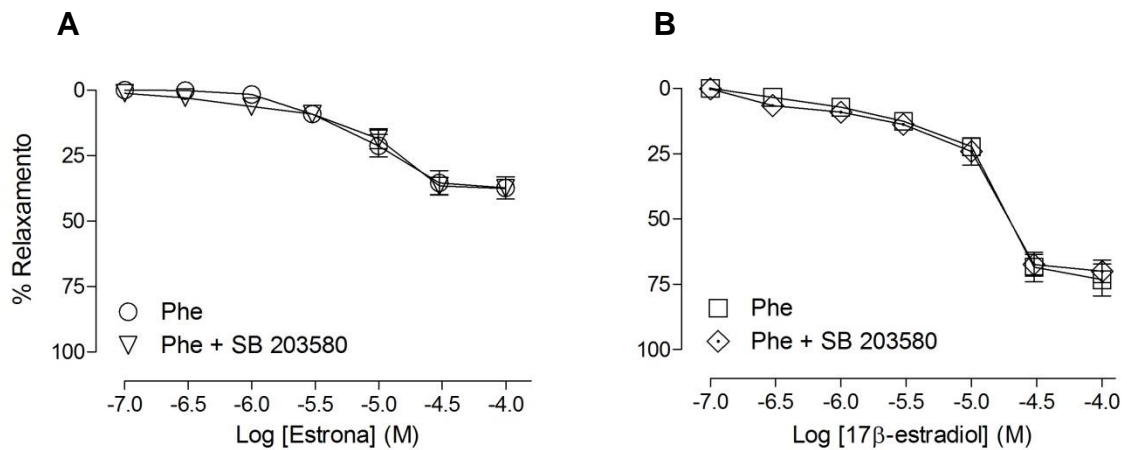


Figura 8: Vasorelaxamento produzido pela estrona ou pelo 17 β -estradiol em anéis aórticos de ratos com endotélio intacto pré-contraídos com Phe (1 μ M) na ausência ou na presença de SB203580 (inibidor da p38-MAPK – 10 μ M). Os valores estão representados como média \pm epm de 5-7 preparações por grupo.

Tabela 6 – Valores do E_{max} obtidos em preparações de anéis de aorta de ratos Wistar com a estrona ou com o 17β -estradiol na ausência e na presença do inibidor da p38-MAPK SB203580 ($10\mu\text{M}$). Os dados são apresentados em percentual de redução da contração máxima obtida com a Phe (E_{max}).

	Estrona		17 β -estradiol	
	E_{max} (%)	Inibição (%)	E_{max} (%)	Inibição (%)
Sem Inibidor	37,47 \pm 4,25	----	73,41 \pm 6,13	----
+ SB 203580	37,68 \pm 3,22	----	70,15 \pm 4,31	----

Os valores de E_{max} (Efeito máximo) representam a média \pm epm de 5-7 preparações por grupo.

5.7. Avaliação da participação da via NO/GMPc no efeito vasorelaxante da estrona

A incubação por 30 minutos com L-NAME (100 μ M) ou com ODQ (10 μ M) inibiu o vasorelaxamento induzido pela estrona ($E_{max} = 5,73 \pm 1,55\%$ e $7,11 \pm 1,37\%$, respectivamente) (Figura 9A) e pelo 17 β -estradiol ($E_{max} = 44,42 \pm 4,01\%$ e $46,51 \pm 4,51\%$, respectivamente) (Figura 9B), valores estatisticamente diferentes daqueles promovidos pela estrona ($E_{max} = 41,90 \pm 1,99\%$) ou pelo 17 β -estradiol ($E_{max} = 91,86 \pm 1,31\%$) na ausência destes inibidores.

Comparando-se os resultados obtidos com a estrona e com o 17 β -estradiol na presença do antagonista L-NAME (100 μ M), observa-se que a inibição do relaxamento vascular diferiu entre os mesmos ($86,31 \pm 3,71$ e $50,88 \pm 5,27\%$, respectivamente). Esses valores foram semelhantes aos obtidos na presença do antagonista ODQ (10 μ M) ($81,21 \pm 3,31$ para a estrona e $49,84 \pm 5,99\%$ para o estradiol).

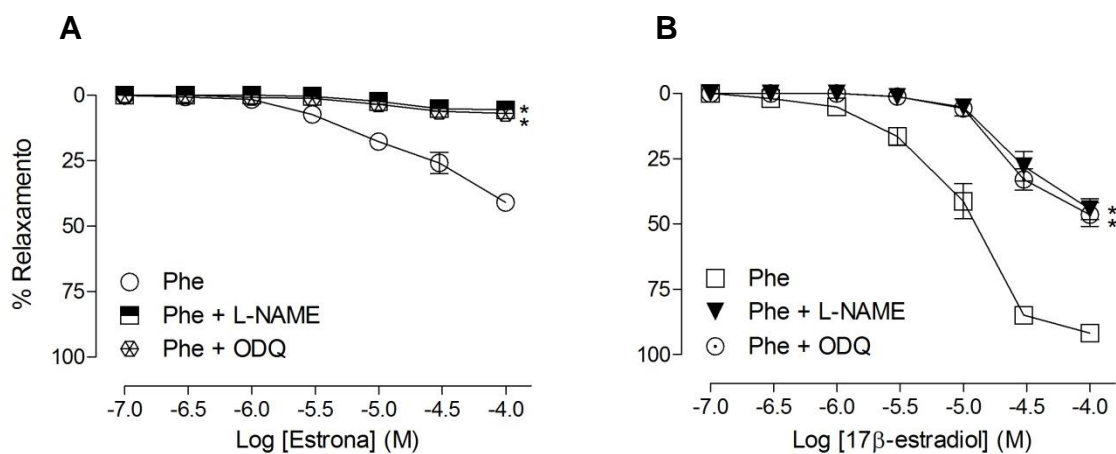


Figura 9: Vasorelaxamento produzido pela estrona ou pelo 17 β -estradiol em anéis aórticos de ratos com endotélio intacto pré-contraídos com Phe (1 μ M) na ausência ou na presença de L-NAME (inibidor da óxido nítrico sintase – 100 μ M) ou ODQ (inibidor da guanilato ciclase – 10 μ M). Os valores estão representados como média \pm epm de 5-7 animais por grupo. * $P < 0,05$ quando comparado ao relaxamento na ausência do inibidor.

Tabela 7 – Valores do E_{max} e de inibição de E_{max} obtidos em preparações de anéis de aorta de ratos Wistar com a estrona ou com o 17β -estradiol mediante o bloqueio da enzima óxido nítrico sintase com L-NAME ($100\mu\text{M}$) ou bloqueio da enzima guanilato ciclase com ODQ ($10\mu\text{M}$). Os dados são apresentados em percentual de redução da contração máxima obtida com a Phe (E_{max}) e em percentual de inibição do relaxamento promovido pelo antagonista.

	Estrona		17β -estradiol	
	E_{max} (%)	Inibição (%)	E_{max} (%)	Inibição (%)
Sem Inibidor	$41,90 \pm 1,99$	----	$91,86 \pm 1,31$	----
+ L-Name	$5,73 \pm 1,55^*$	$86,31 \pm 3,71$	$44,42 \pm 4,01^\#$	$50,88 \pm 5,27$
+ ODQ	$7,11 \pm 1,37^*$	$81,21 \pm 3,31$	$46,51 \pm 4,51^\#$	$49,84 \pm 5,99$

Os valores de E_{max} (Efeito máximo) representam a média \pm epm de 5-7 preparações por grupo.

* $P < 0,05$ quando comparado à estrona na ausência do inibidor.

$P < 0,05$ quando comparado ao 17β -estradiol na ausência do inibidor.

5.8. Avaliação da participação de prostanóides vasodilatadores no efeito vasorelaxante promovido pela estrona

Em anéis de aorta com endotélio intacto pré-contraídos com Phe (1 μ M), a pré-incubação com indometacina (10 μ M), não inibiu o vasorelaxamento induzido pela estrona ($E_{max} = 40,92 \pm 4,35\%$) (Figura 10A) ou pelo 17 β -estradiol ($E_{max} = 78,76 \pm 11,55\%$) (Figura 10B).

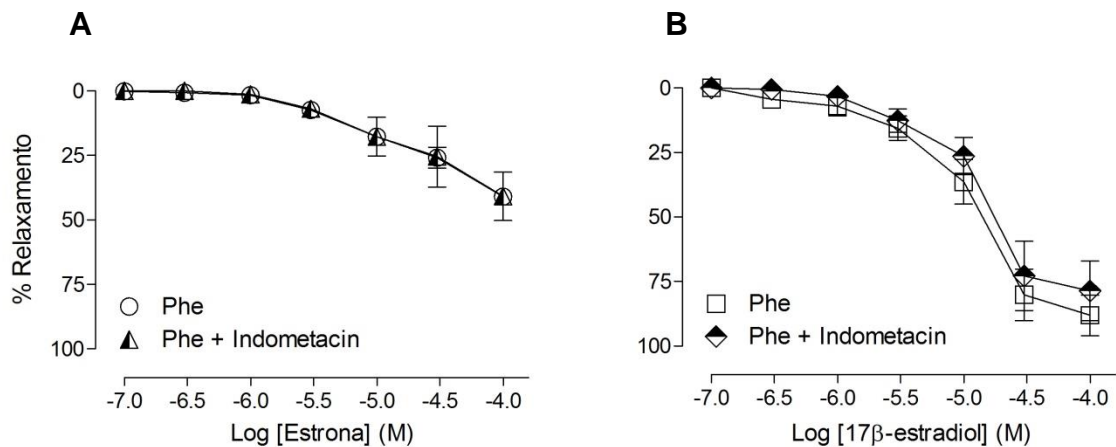


Figura 10: Vasorelaxamento produzido pela estrona (A) ou pelo 17 β -estradiol (B) (0,1 - 100 μ M) na ausência ou na presença de indometacina (inibidor da COX – 10 μ M) em preparações aórticas com endotélio intacto previamente contraídas com Phe (1 μ M). Os valores estão representados como média \pm epm de 5-7 preparações por grupo.

Tabela 8 – Valores do E_{max} obtidos em preparações de anéis de aorta de ratos Wistar com a estrona ou com o 17β -estradiol na ausência e na presença do inibidor de prostanóides vasodilatadores Indometacina ($10\mu\text{M}$). Os dados são apresentados em percentual de redução da contração máxima obtida com a Phe (E_{max}).

	Estrona		17 β -estradiol	
	E_{max} (%)	Inibição (%)	E_{max} (%)	Inibição (%)
Sem Inibidor	41,06 \pm 1,73	----	88,21 \pm 7,89	----
+ Indometacina	40,92 \pm 9,36	----	78,76 \pm 11,55	----

Os valores de E_{max} (Efeito máximo) representam a média \pm epm de 5-7 preparações por grupo.

5.9. Avaliação da participação de canais de potássio no efeito vasorelaxante promovido pela estrona

Em anéis de aorta com endotélio intacto pré-contraídos com Phe (1 μ M), a incubação com TEA (1mM) não alterou significativamente o vasorelaxamento induzido pela estrona ($E_{max} = 45,53 \pm 4,34\%$ - Figura 11A) ou pelo 17 β -estradiol ($E_{max} = 84,86 \pm 4,08\%$ - Figura 11B).

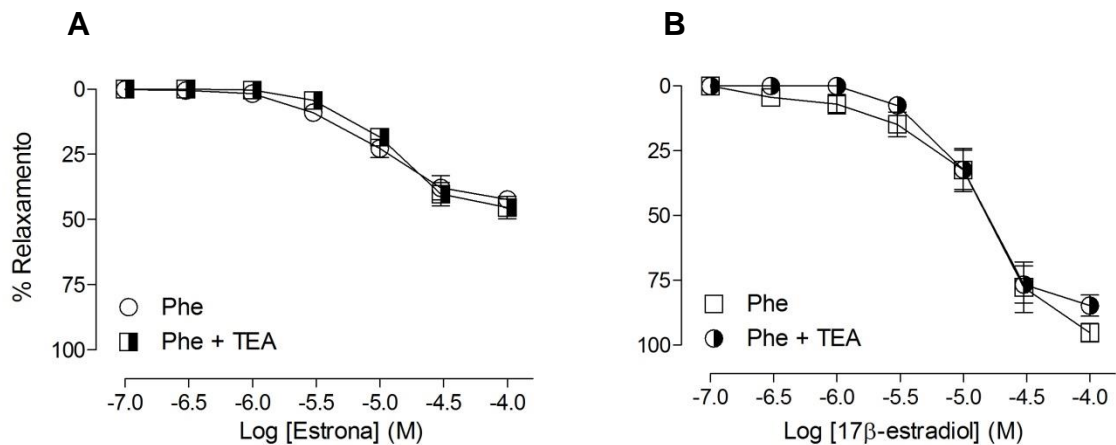


Figura 11: Vasorelaxamento produzido pela estrona ou pelo 17 β -estradiol (0,1 - 100 μ M) na ausência ou na presença de TEA (bloqueador não seletivo de canal de potássio – 1 mM) em preparações aórticas com endotélio intacto previamente contraídas com Phe (1 μ M). Os valores estão representados como média \pm epm de 5-7 preparações por grupo.

Tabela 9 – Valores do E_{max} obtidos em preparações de anéis de aorta de ratos Wistar com a estrona ou com o 17β -estradiol na ausência e na presença do inibidor de canais de potássio TEA (1mM). Os dados são apresentados em percentual de redução da contração máxima obtida com a Phe (E_{max}).

	Estrona		17 β -estradiol	
	E_{max} (%)	Inibição (%)	E_{max} (%)	Inibição (%)
Sem Inibidor	41,84 \pm 3,13	----	95,37 \pm 3,53	----
+ TEA	45,53 \pm 4,34	----	84,86 \pm 4,08	----

Os valores de E_{max} (Efeito máximo) representam a média \pm epm de 5-7 preparações por grupo.

6. Discussão

Este estudo buscou contribuir na elucidação dos efeitos vasculares da estrona, colaborando na compreensão de sua ação não-genômica visto que este hormônio é o componente majoritário do Premarin®, uma alternativa medicamentosa natural utilizada rotineiramente na clínica, sendo um dos medicamentos mais prescrito para tratamento dos sintomas advindos com a menopausa (11, 19, 51, 62).

Como hormônio comparativo do presente estudo, foi utilizado o 17 β -estradiol, estrogênio também presente no Premarin® que é utilizado em outros estudos como padrão, pois seus efeitos vasculares são mais estudados e melhor compreendidos (19, 63-66).

Na avaliação dos efeitos vasculares da estrona foi verificado que o efeito vasorelaxante promovido por este hormônio em aorta torácica de ratos é do tipo agudo, sendo este efeito dependente do endotélio envolvendo a ativação do ER que posteriormente ativa a PI3K e o complexo Ca²⁺-CaM. Foi visto ainda que estas vias estão relacionados com ativação da eNOS, culminando então na formação do óxido nítrico (NO) que ativa a guanilato ciclase (GC) e por sua vez converte GTP em GMPc, responsável pelo relaxamento vascular.

A ação da estrona ou do 17 β -estradiol foram avaliados pela eficácia do efeito, sendo os resultados apresentados pelo percentual de relaxamento máximo (E_{max}). Nas condições experimentais deste estudo, a estrona mostrou possuir efeito vasorelaxante, no entanto este efeito foi menos intenso que aquele promovido pelo 17 β -estradiol (Figura 3A). Foi visto ainda que a remoção mecânica do endotélio e posterior curva de concentração efeito (CCE) para o 17 β -estradiol fez com que fosse visto um efeito independente do endotélio para este hormônio, efeito este que foi menor em relação ao promovido na presença do endotélio, e que se difere do mecanismo apresentado pela estrona, a qual não mostrou relaxamento significativo na ausência do endotélio (Figura 3B).

Filgueira (2012) avaliou o efeito vasorelaxante da estrona em artérias mesentéricas de ratas, comparando seus efeitos aos promovidos pelo 17 β -estradiol. Ainda investigando o efeito relaxante promovidos pela estrona, Teoh et al. (2009) avaliaram a resposta relaxante em artérias coronárias de porcos. Estes autores, embora não tenham avaliado os mecanismos envolvidos na ação vascular direta da

estrona, demonstraram que ela apresentou um efeito vasodilatador, mas que o efeito de aumentar a resposta vasodilatadora e diminuir a resposta contrátil a diferentes agentes farmacológicos era maior com o 17β -estradiol. No estudo de Filgueira (2012), o efeito vasorelaxante promovido pela estrona foi de 41% e do 17β -estradiol de 93%, estes achados mostram semelhança com os presentes resultados onde a estrona apresentou relaxamento de 42% e o 17β -estradiol de 94% (Tabela 1). Em acréscimo, os dados obtidos por Teoh et al. (2009) mostraram relaxamento de 34% para estrona e de 100% para o 17β -estradiol, corroborando também como os dados do presente estudo. Deste modo, sugere-se que a ação vascular apresentada por este hormônio ocorre independente da preparação vascular, espécie animal e/ou gênero, porém a estrona apresenta eficácia inferior à do 17β -estradiol.

Os compostos presentes no Premarin® são biologicamente ativos e podem interagir com os ER's, receptores estes que estão presentes nos vasos sanguíneos (54, 56, 67, 68). Diante disso, é de grande importância ressaltar estudos prévios demonstrando que o 17β -estradiol é capaz de promover diferentes respostas por mecanismos dependentes dos ER's, incluindo o fato de que este hormônio é capaz de modular o sistema vascular (69, 70). Com base nestas evidências, o presente trabalho investigou a capacidade da estrona em promover vasodilatação por vias dependentes do ER, visto que está bem caracterizado a ação do 17β -estradiol neste receptor. Os resultados demonstraram que a incubação prévia com o antagonista dos ER's (ICI 182,780) e posterior administração aguda da estrona em aorta torácica de ratos, foi capaz de antagonizar o efeito vasorelaxante promovido por este hormônio (Figura 4). Adicionalmente, percebe-se semelhança na porcentagem de inibição quando se compara o antagonismo promovido pela estrona e pelo 17β -estradiol, mostrando consistentemente a participação dos ER's nos efeitos promovidos pelos estrogênios testados. Diante destes resultados, os experimentos posteriores foram realizados mediante a investigação de vias de sinalização dependentes dos ER's.

Conforme comentado anteriormente, os receptores clássicos são capazes de modular a maior parte dos efeitos biológicos promovidos pelos estrogênios, no entanto existem outros receptores capazes de modular os efeitos dos hormônios estrogênicos. Neste sentido, foi visto na literatura relatos que mostram a ação do 17β -estradiol em diversos órgãos mediante a ação do GPER/GPR30 (54), no

entanto já era evidenciado que em aorta torácica de ratos, este hormônio não promove seu efeito vasorelaxante mediante a ação neste receptor (71). Este receptor é uma descoberta relativamente recente, que inclusive abriu uma nova linha para avaliação do mecanismo de ação vascular dos hormônios sexuais femininos. Os resultados encontrados neste estudo mostraram que o antagonista do GPER G-15, não interferiu no vasorelaxamento promovido pela estrona (Figura 5), demonstrando que este receptor não participa dos efeitos promovidos pela estrona, resultados semelhantes aos encontrados com o 17β -estradiol. Com isso, foi demonstrado pela primeira vez que o efeito vasorelaxante promovido pela estrona é independente deste receptor, e ainda, confirmado os achados de Seok et al. (2012) quanto ao efeito promovido pelo 17β -estradiol.

Dentre as vias de sinalização que promovem relaxamento vascular mediado pelo ER, por mecanismos dependentes do endotélio, está a via da PI3K, que após receber o sinal iniciado na membrana com a ligação do 17β -estradiol é ativada e desencadeia uma cascata de sinais (72). A participação desta via de sinalização no efeito vasorelaxante induzido pela estrona foi avaliada utilizando o Wortmannin, um antagonista da PI3K. Os resultados mostraram que esta via de sinalização está envolvida na vasodilatação promovida pela estrona (Figura 6A), semelhante ao observado com o 17β -estradiol (Figura 6B). A importância desta via se deve ao fato dela ser capaz de ativar a eNOS, enzima responsável pela transformação de L-arginina em NO, e que de acordo com os trabalho de White et al. (2002), o estrogênio é capaz de aumentar a intensidade de fluorescência induzida pelo NO em cultura de células musculares lisas, portanto aumentar a produção de NO. Sendo assim, a elucidação desta via pode proporcionar um mecanismo para explicar o efeito relaxante da estrona por meio de um mecanismo dependente do endotélio envolvendo a formação do NO.

Outro mecanismo responsável pela ativação da eNOS através do ER é o complexo Ca^{2+} -CaM, uma vez que a ação do agonista no ER faz com que seja formado o inositol trifosfato, o qual estimula a liberação do Ca^{2+} no retículo endoplasmático, aumentando assim a concentração de cálcio intracelular que ao ligar à CaM formam o complexo Ca^{2+} -CaM (30). A participação deste complexo no efeito vasorelaxante induzido pela estrona foi avaliada com o uso do Calmidazolium, um antagonista da CaM. Assim, foi mostrado que este complexo tem participação no

vasorelaxamento promovido pela estrona (Figura 7), semelhante ao que observamos com o 17 β -estradiol. Desta forma mostramos que o cálcio está envolvido no vasorelaxamento promovido pela estrona ou pelo 17 β -estradiol, através de sua ligação com a CaM, formando o complexo Ca²⁺-CaM, que juntamente com a PI3K contribui na elucidação do mecanismos celulares envolvidos no vasorelaxamento promovido por estes hormônios.

A ativação da via p38MAPK é sugerida como uma via crucial em mecanismos de proteção contra eventos cardiovasculares (73-75), como é o caso do 17 β -estradiol endógeno que tem o potencial de ativar p38MAPK, via envolvida na diferenciação, proliferação, migração e fibrinólise. Para avaliar o envolvimento desta via de sinalização no efeito vasorelaxante promovido pela estrona foi utilizado o inibidor SB 203580, entretanto nenhum efeito inibitório foi observado (Figura 8A). Semelhantemente, o 17 β -estradiol também não teve seu efeito vasorelaxante afetado (Figura 8B). Os resultados encontrados com este inibidor mostram que em aorta torácica de ratos machos o vasorelaxamento promovido pela estrona ou pelo 17 β -estradiol não envolve a via p38MAPK.

Sellés et al. (2005) mostrou que o tratamento “in vitro” com estrona em ratas, aumentou significativamente a produção de NO através da estimulação da NOS, efeito similar ao que o mesmo grupo havia demonstrado fazendo o tratamento com 17 β -estradiol (76, 77). Estes achados amparam os resultados encontrados no presente estudo, onde através da reatividade vascular foi visto que a incubação prévia da preparação com L-NAME inibiu o relaxamento vascular promovido pela estrona (Figura 9A). Desta forma, foi evidenciado que a resposta vascular direta da estrona envolve a produção de NO. Posteriormente com o inibidor ODQ (antagonista da GC), foi verificado a capacidade da estrona em mediar a produção GMPc, sendo que o relaxamento anteriormente visto na ausência do inibidor foi antagonizado, percebendo então que após a formação do NO, este se difunde no músculo liso vascular e promove a ativação da GC, a responsável pela conversão de GTP em GMPc.

Quando se compara o efeito promovido pelo 17 β -estradiol percebe-se que os resultados deste estudo corroboram com os achados de Selles et al. (2001), uma vez que a incubação com L-NAME/ODQ influencia no efeito relaxante promovido pelo 17 β -estradiol (Figura 9B), mas que diferentemente da estrona, o antagonismo é

apenas parcial, mostrando que a via inibida é aquela dependente do endotélio (Tabela 1). Com isso percebe-se que apesar de ser utilizado ratos machos e os protocolos do presente estudo avaliarem o efeito vascular direto, ao passo que nos estudos citados anteriormente terem utilizado fêmeas e avaliarem somente a produção de NO, a estrona é capaz de estimular a produção de NO em ambos.

Além do NO, outro responsável por promover ação através da ligação dos estrogênios aos ER's são os prostanóides vasodilatadores, sendo evidenciada a liberação PGI₂, portanto outra via responsável pelos mecanismos de ação dos estrogênios através deste receptor (77). Para avaliar a participação de PGI₂ no relaxamento vascular induzido pela estrona, preparações de aorta torácica foram previamente incubadas com indometacina, uma vez que este inibidor fará com que seja antagonizada a COX e conseqüentemente seja inibida a formação de PGI₂. Nas condições experimentais deste estudo, a indometacina não modificou o efeito vasodilatador promovido pela estrona ou pelo 17β-estradiol (Figura 10), sugerindo ausência de participação desta via no efeito induzido por estes hormônios. As diferenças encontradas entre os resultados de Selles et al. (2005) e aqueles obtidos neste trabalho, podem ser explicados pela diferença sexual, bem como pela técnica experimental utilizada, uma vez que há evidências de uma garantia da manutenção do tônus vascular através de inter-relação complexa e bem integrada dos prostanóides vasodilatadores e o NO, podendo também ocorrer como mecanismo compensatório que é ativado quando a expressão ou atividade de um dos mediadores está diminuída.

Outro mediador em que pode promover vasodilatação são os canais de potássio, sendo demonstrado que os estrogênios atuam promovendo a abertura destes canais e hiperpolarizando o músculo liso através do aumento da condutância ao cálcio (78). A partir destas evidências, foi descoberto que a resposta vasorelaxante do 17β-estradiol em artérias de porcos, artérias uterinas de ovelhas e artéria mesentérica de ratos envolve canais de K⁺ (45, 79, 80). Entretanto, no presente estudo, foi demonstrado que o efeito da estrona não está relacionado com aumento do efluxo de K⁺ através de canais voltagem dependente, uma vez que o bloqueio destes canais de K⁺ com TEA (bloqueador inespecífico destes canais) não alterou o efeito vasorelaxante promovido pela estrona (Figura 11). Os mesmos resultados foram observados com o 17β-estradiol, novamente indicando mecanismo

de ação semelhante para ambos os hormônios. Apesar dos resultados demonstrados com o 17β -estradiol serem divergentes daqueles relatados anteriormente, são amparados pelos resultados de Filgueira (2012), que em artéria mesentérica de ratas que também demonstrou ausência de efeito com TEA, deste modo, o presente achado mostra o efeito deste hormônio em outro modelo animal e/ou diferente tipo de preparação, evidenciando que em aorta torácica de ratos os canais de potássio dependentes de voltagem não estão envolvidos no efeito vasorelaxante da estrona e do 17β -estradiol.

Os dados aqui apresentados demonstram pela primeira vez, o mecanismo de ação vascular da estrona através da reatividade vascular, um método funcional e clássico da farmacologia. Além disso, foi elucidado o efeito vascular e o mecanismo de ação do componente majoritário do Premarin®, a estrona. Assim, tem-se a oportunidade de acrescentar a estrona como estrogênio conjugado equino (CEE) capaz de promover efeito vasorelaxante em aorta torácica de ratos. Diante da relevância e controvérsias a respeito dos efeitos benéficos promovidos pelos CEE's, os presentes resultados contribuem para elucidação do mecanismo de ação vascular de mais um componente desta preparação, oferecendo novas descobertas e perspectivas sobre o efeito vascular dos estrogênios.

É importante mencionar que o efeito promovido pelo 17β -estradiol foi semelhante ao induzido pela estrona. Confirmando diversos estudos no qual demonstraram que o efeito vasorelaxante promovido pelo 17β -estradiol envolve a ativação dos ER's, sendo ainda evidenciado a participação deste hormônio nas vias PI3K, Ca^{2+} -CaM e NO/GPMc (69, 70, 72, 76).

7. Conclusões

- ✓ A estrona possui efeito vasorelaxante sobre a musculatura lisa vascular de aorta torácica de ratos Wistar.
- ✓ O efeito vasorelaxante da estrona é dependente do endotélio.
- ✓ O efeito vasorelaxante da estrona está relacionado aos receptores de estrogênios e envolve a participação da via NO/GMPc.
- ✓ A participação da via NO/GMPc envolve os mediadores PI3K e Ca²⁺-CaM.

Em relação ao 17β-estradiol:

- ✓ A eficácia do efeito vasorelaxante da estrona em aorta torácica de ratos é inferior.
- ✓ A estrona não possui efeito independente de endotélio.
- ✓ Os mecanismos envolvidos no efeito vasorelaxante dependente de endotélio são semelhantes.

Referências Bibliográficas

1. McKinlay SM. The normal menopause transition: an overview. *Maturitas* 1996 Mar;23(2):137-45.
2. Mishra GD, Kuh D. Health symptoms during midlife in relation to menopausal transition: British prospective cohort study. *BMJ* 2012;344:e402.
3. 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.
4. Al-Azzawi F, Palacios S. Hormonal changes during menopause. *Maturitas* 2009 Jun 20;63(2):135-7.
5. 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.
6. Ozdemir S, Celik C, Gorkemli H, Kiyici A, Kaya B. Compared effects of surgical and natural menopause on climacteric symptoms, osteoporosis, and metabolic syndrome. *Int J Gynaecol Obstet* 2009 Jul;106(1):57-61.
7. Frackiewicz EJ, Cutler NR. Women's health care during the perimenopause. *J Am Pharm Assoc (Wash)* 2000 Nov-Dec;40(6):800-11.
8. Engberding N, Wenger NK. Management of hypertension in women. *Hypertens Res* 2012 Mar;35(3):251-60.
9. Loose DS, Stancel GM. Estrogênios e Progestogênios. In: Goodman e Gilman. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 11^a ed: Porto Alegre: Artmed; 2010.
10. Smiley DA, Khalil RA. Estrogenic compounds, estrogen receptors and vascular cell signaling in the aging blood vessels. *Curr Med Chem* 2009;16(15):1863-87.

11. Scambia G, Mango D, Signorelle 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.
12. Ansbacher R. The pharmacokinetics and efficacy of different estrogens are not equivalent. *Am J Obstet Gynecol* 2001 Feb;184(3):255-63.
13. Bush TL, Barrett-Connor E, Cowan LD, Criqui MH, Wallace RB, Suchindran CM, et al. Cardiovascular mortality and noncontraceptive use of estrogen in women: results from the Lipid Research Clinics Program Follow-up Study. *Circulation* 1987 Jun;75(6):1102-9.
14. Varas-Lorenzo C, Garcia-Rodriguez LA, Perez-Gutthann S, Duque-Oliart A. Hormone replacement therapy and incidence of acute myocardial infarction. A population-based nested case-control study. *Circulation* 2000 Jun 6;101(22):2572-8.
15. Mosca L, Manson JE, Sutherland SE, Langer RD, Manolio T, Barrett-Connor E. Cardiovascular disease in women: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. Writing Group. *Circulation* 1997 Oct 7;96(7):2468-82.
16. Stampfer MJ, Colditz GA. Estrogen replacement therapy and coronary heart disease: a quantitative assessment of the epidemiologic evidence. *Prev Med* 1991 Jan;20(1):47-63.
17. 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.
18. Barha CK, Galea LA. The hormone therapy, Premarin, impairs hippocampus-dependent spatial learning and memory and reduces activation of new granule neurons in response to memory in female rats. *Neurobiol Aging* 2013 Mar;34(3):986-1004.
19. 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.
20. Novensa L, Selent J, Pastor M, Sandberg K, Heras M, Dantas AP. Equine estrogens impair nitric oxide production and endothelial nitric oxide synthase transcription in human endothelial cells compared with the natural 17 β -estradiol. *Hypertension* 2010 Sep;56(3):405-11.
21. 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.
22. 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.
23. Canez MS, Lee KJ, Olive DL. Progestogens and estrogens. *Infertil Reprod Med Clin North Am* 1992(3):59-77.
24. Watson CS, Jeng YJ, Kochukov MY. Nongenomic actions of estradiol compared with estrone and estriol in pituitary tumor cell signaling and proliferation. *FASEB J* 2008 Sep;22(9):3328-36.
25. Voican A, Francou B, Novac L, Chabbert-Buffet N, Canonico M, Meduri G, et al. Pharmacology of Hormone Replacement Therapy in Menopause. In: Gallelli L, editor. *Pharmacology*: InTech; 2012. p. 720.
26. Sobrino A, Oviedo PJ, Novella S, Laguna-Fernandez A, Bueno C, Garcia-Perez MA, et al. Estradiol selectively stimulates endothelial prostacyclin production through estrogen receptor- α . *J Mol Endocrinol* 2010 Apr;44(4):237-46.
27. Mendelsohn ME, Karas RH. HRT and the young at heart. *N Engl J Med* 2007 Jun 21;356(25):2639-41.

28. Farhat MY, Abi-Younes S, Ramwell PW. Non-genomic effects of estrogen and the vessel wall. *Biochem Pharmacol* 1996 Mar 8;51(5):571-6.
29. Prossnitz ER, Maggiolini M. Mechanisms of estrogen signaling and gene expression via GPR30. *Mol Cell Endocrinol* 2009 Sep 24;308(1-2):32-8.
30. Orshal JM, Khalil RA. Gender, sex hormones, and vascular tone. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004 Feb;286(2):R233-49.
31. Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res* 1987 Dec;61(6):866-79.
32. Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990 Jan;87(2):682-5.
33. Rapoport RM, Murad F. Endothelium-dependent and nitrovasodilator-induced relaxation of vascular smooth muscle: role of cyclic GMP. *J Cyclic Nucleotide Protein Phosphor Res* 1983;9(4-5):281-96.
34. Rapoport RM, Draznin MB, Murad F. Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature* 1983 Nov 10-16;306(5939):174-6.
35. Forstermann U, Mulsch A, Bohme E, Busse R. Stimulation of soluble guanylate cyclase by an acetylcholine-induced endothelium-derived factor from rabbit and canine arteries. *Circ Res* 1986 Apr;58(4):531-8.
36. Mardini IA, FitzGerald GA. Selective inhibitors of cyclooxygenase-2: a growing class of anti-inflammatory drugs. *Mol Interv* 2001 Apr;1(1):30-8.
37. Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 1976 Oct 21;263(5579):663-5.
38. Zelis R. Mechanisms of vasodilation. *Am J Med* 1983 Jun 27;74(6B):3-12.

39. Moncada S, Vane JR. The role of prostacyclin in vascular tissue. *Fed Proc* 1979 Jan;38(1):66-71.
40. Vane JR, Anggard EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 1990 Jul 5;323(1):27-36.
41. Morgado M, Cairrao E, Santos-Silva AJ, Verde I. Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle. *Cell Mol Life Sci* 2012 Jan;69(2):247-66.
42. Hopkins NK, Gorman RR. Regulation of endothelial cell cyclic nucleotide metabolism by prostacyclin. *J Clin Invest* 1981 Feb;67(2):540-6.
43. Salvemini D, Seibert K, Masferrer JL, Misko TP, Currie MG, Needleman P. Endogenous nitric oxide enhances prostaglandin production in a model of renal inflammation. *J Clin Invest* 1994 May;93(5):1940-7.
44. Feletou M, Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006 Jun;26(6):1215-25.
45. 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.
46. Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol* 1995 Apr;268(4 Pt 1):C799-822.
47. 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.
48. Coleman HA, Tare M, Parkington HC. Endothelial potassium channels, endothelium-dependent hyperpolarization and the regulation of vascular tone in health and disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2004 Sep;31(9):641-9.
49. Smith CL, O'Malley BW. Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. *Endocr Rev* 2004 Feb;25(1):45-71.

50. Anzick SL, Kononen J, Walker RL, Azorsa DO, Tanner MM, Guan XY, et al. AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science* 1997 Aug 15;277(5328):965-8.
51. Ruggiero RJ, Likis FE. Estrogen: physiology, pharmacology, and formulations for replacement therapy. *J Midwifery Womens Health* 2002 May-Jun;47(3):130-8.
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. Colburn P, Buonassisi V. Estrogen-binding sites in endothelial cell cultures. *Science* 1978 Sep 1;201(4358):817-9.
54. Khalil RA. Estrogen, vascular estrogen receptor and hormone therapy in postmenopausal vascular disease. *Biochem Pharmacol* 2013 Dec 15;86(12):1627-42.
55. 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.
56. Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC. Production and actions of estrogens. *N Engl J Med* 2002 Jan 31;346(5):340-52.
57. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry*: Nova York: Worth Publishers; 2000.
58. Meinhardt U, Mullis PE. The aromatase cytochrome P-450 and its clinical impact. *Horm Res* 2002;57(5-6):145-52.
59. Organização Mundial de Saúde. *Fighting disease Fostering development*. Geneva: WHO; 1996.
60. Kuhl H. Pharmacology of estrogens and progestogens: influence of different routes of administration. *Climacteric* 2005 Aug;8 Suppl 1:3-63.

61. 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.
62. Ancelin ML, Ritchie K. Lifelong endocrine fluctuations and related cognitive disorders. *Curr Pharm Des* 2005;11(32):4229-52.
63. Naderali EK, Walker AB, Doyle P, Williams G. Comparable vasorelaxant effects of 17alpha- and 17beta-oestradiol on rat mesenteric resistance arteries: an action independent of the oestrogen receptor. *Clin Sci (Lond)* 1999 Dec;97(6):649-55.
64. Montgomery S, Shaw L, Pantelides N, Taggart M, Austin C. Acute effects of oestrogen receptor subtype-specific agonists on vascular contractility. *Br J Pharmacol* 2003 Aug;139(7):1249-53.
65. Figueira FP. Caracterização da resposta vasorelaxante do equilin em artérias mesentéricas de ratas espontaneamente hipertensas. São Paulo. Tese [Doutorado em Ciências] – USP; 2012.
66. 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.
67. Bhavnani BR. Estrogens and menopause: pharmacology of conjugated equine estrogens and their potential role in the prevention of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003 Jun;85(2-5):473-82.
68. Lin AL, Shain SA. Estrogen-mediated cytoplasmic and nuclear distribution of rat cardiovascular estrogen receptors. *Arteriosclerosis* 1985 Nov-Dec;5(6):668-77.
69. Ihionkhan CE, Chambliss KL, Gibson LL, Hahner LD, Mendelsohn ME, Shaul PW. Estrogen causes dynamic alterations in endothelial estrogen receptor expression. *Circ Res* 2002 Nov 1;91(9):814-20.
70. Shaw L, Taggart M, Austin C. Effects of the oestrous cycle and gender on acute vasodilatory responses of isolated pressurized rat mesenteric arteries to 17 beta-oestradiol. *Br J Pharmacol* 2001 Mar;132(5):1055-62.

71. Seok YM, Jang EJ, Reiser O, Hager M, Kim IK. 17beta-Estradiol induces vasorelaxation in a G-protein-coupled receptor 30-independent manner. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2012 Sep;385(9):945-8.
72. Guo X, Razandi M, Pedram A, Kassab G, Levin ER. Estrogen induces vascular wall dilation: mediation through kinase signaling to nitric oxide and estrogen receptors alpha and beta. *J Biol Chem* 2005 May 20;280(20):19704-10.
73. Fujimoto H, Ohno M, Ayabe S, Kobayashi H, Ishizaka N, Kimura H, et al. Carbon monoxide protects against cardiac ischemia--reperfusion injury in vivo via MAPK and Akt--eNOS pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004 Oct;24(10):1848-53.
74. Jaswal JS, Gandhi M, Finegan BA, Dyck JR, Clanachan AS. Inhibition of p38 MAPK and AMPK restores adenosine-induced cardioprotection in hearts stressed by antecedent ischemia by altering glucose utilization. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007 Aug;293(2):H1107-14.
75. Weinbrenner C, Liu GS, Cohen MV, Downey JM. Phosphorylation of tyrosine 182 of p38 mitogen-activated protein kinase correlates with the protection of preconditioning in the rabbit heart. *J Mol Cell Cardiol* 1997 Sep;29(9):2383-91.
76. Selles J, Polini N, Alvarez C, Massheimer V. Progesterone and 17 beta-estradiol acutely stimulate nitric oxide synthase activity in rat aorta and inhibit platelet aggregation. *Life Sci* 2001 Jul 6;69(7):815-27.
77. 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.
78. Harder DR, Coulson PB. Estrogen receptors and effects of estrogen on membrane electrical properties of coronary vascular smooth muscle. *J Cell Physiol* 1979 Aug;100(2):375-82.
79. Rosenfeld CR, White RE, Roy T, Cox BE. Calcium-activated potassium channels and nitric oxide coregulate estrogen-induced vasodilation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000 Jul;279(1):H319-28.

80. Tep-areenan P, Kendall DA, Randall MD. Mechanisms of vasorelaxation to 17beta-oestradiol in rat arteries. *Eur J Pharmacol* 2003 Aug 22;476(1-2):139-49.