

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM PROGESTERONA SOBRE A REATIVIDADE  
VASCULAR CORONARIANA DEPENDENTE DO ENDOTÉLIO EM RATAS  
OVARIECTOMIZADAS**

**TAGANA ROSA DA CUNHA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**Universidade Federal do Espírito Santo**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas**

**Vitória, Agosto de 2019**

**TAGANA ROSA DA CUNHA**

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM PROGESTERONA SOBRE A REATIVIDADE  
VASCULAR CORONARIANA DEPENDENTE DO ENDOTÉLIO EM RATAS  
OVARIECTOMIZADAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr Roger Lyrio dos Santos

**Universidade Federal do Espírito Santo**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas**

**Vitória, Agosto de 2019**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**REGISTRO DE JULGAMENTO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DA CANDIDATA AO  
GRAU DE MESTRE PELO PPGCF/CCS/UFES**

**Nº. Matrícula da Candidata: 2017132577**

A Comissão Julgadora que examinou a Dissertação de Mestrado, intitulada "Efeitos do tratamento com progesterona sobre a reatividade vascular coronariana dependente do endotélio em ratas ovariectomizadas", apresentada e defendida publicamente pela aluna Tagana Rosa da Cunha, no dia 27 de agosto de 2019, às 10:30 horas, decidiu, por unanimidade, aprovar a referida Dissertação de Mestrado e, portanto, declara que a aluna faz jus à obtenção do Grau de Mestre em Ciências Fisiológicas

Vitória, 27 de Agosto de 2019.

**COMISSÃO JULGADORA**

**Prof. Dr. Roger Lyrio dos Santos – Orientador**

Universidade Federal do Espírito Santo - UFES

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sônia Alves Gouvea – Membro interno**

Universidade Federal do Espírito Santo – UFES

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Girlandia Alexandre Brasil Amorim– Membro externo**

Universidade Vila Velha - UVV

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

---

R788e Rosa da Cunha, Tagana, 1984-  
Efeitos do tratamento com progesterona sobre a reatividade vascular coronariana dependente do endotélio em ratas ovariectomizadas / Tagana Rosa da Cunha. - 2019.  
70 f. : il.

Orientador: Roger Lyrio dos Santos.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Sistema cardiovascular - Doenças. 2. Artérias coronárias.  
3. Hormônios sexuais. 4. Progesterona. 5. Endotélio. I. dos Santos, Roger Lyrio. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

---

CDU: 612

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcuta)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço em primeiro lugar a DEUS pelo dom da Vida, por estar sempre ao meu lado nos momentos fáceis e difíceis me dando força, cuidado de mim, me intuindo e me protegendo. Obrigada Senhor por esta vida maravilhosa, plena e abundante que tenho! Obrigada aos meus mentores espirituais.

A minha mãe, Carmen Rosa da Cunha, pelo exemplo de vida, por todo incentivo, amor e amizade. Ao meu pai, Marcos Aurélio da Cunha, pela paciência, pelo carinho em todos os momentos. A meu irmão Marquito, Marcos Aurélio da Cunha Filho, pela amizade e ajuda sem hesitação nas situações mais adversas. E a todos os meus familiares que contribuíram para a construção da minha subjetividade. Agradeço principalmente por ter sido recebida com tanto amor pela minha família e familiares nessa jornada chamada vida!

Ao Prof. Dr. Roger Lyrio, por ter me convidado para ser sua orientada. Agradeço tudo que aprendi e estou ainda aprendendo, o que permitiu um crescimento e um amadurecimento tanto acadêmico como pessoal. Obrigada pela amizade, carinho atenção, confiança e compreensão. E principalmente, obrigada por ser mais do que um orientador, um verdadeiro pai pesquisador.

A minha grandessíssima pequena amiga Jéssica Aparecida Soares Giesen, pela ajuda valiosa sem a qual este trabalho não teria sido possível. Agradeço pela amizade e alegria que sempre prevaleceram em nossos dias de trabalho.

A minha querida amiga Nathalie Tristão Banhos Delgado por me dar força naqueles dias em que tudo deu errado e por me ajudar a seguir sempre adiante, por ter me proporcionado momentos maravilhosos!

Ao meu querido amigo Wender do Nascimento Rouver, pela sua amizade de longa data, e ajuda em diversos momentos dessa jornada. Obrigada, por sempre me inspirar calma e esperança.

Ao Fabrício Bragança da Silva, pela amizade incondicional, um verdadeiro irmão, que me apoiou durante todo o mestrado. Obrigada pelos conselhos valorosos e por sua alegria contagiante, que me proporcionou dias mais leves.

Aos colegas de laboratório Juan Carlos Arapa Diaz, Débora Tacon, e Letícia Tinoco, e alunos de iniciação científica, Emilly Vila Real, Matheus Zucolotto Homem, Hugo Pessoti, Jocimar José Pitol, Ana Dária Bissoli e Lara Caroline Amaro, muito obrigado por toda ajuda.

As Professoras Dr<sup>a</sup>. Sônia Alves Gouvea e Dr<sup>a</sup>. Girlandia Alexandre Brasil Amorim, por aceitarem o convite para avaliação deste trabalho.

A CAPES pela bolsa de estudo concedida.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PPGCF) da UFES, aos professores e profissionais técnicos.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2.OBJETIVOS</b> .....	<b>29</b>
2.1 GERAL.....	29
2.2 ESPECÍFICOS.....	29
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>30</b>
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS .....	30
3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	30
3.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS .....	30
3.4 ANÁLISES DOS DADOS .....	38
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>39</b>
4.1 PARÂMETROS PONDERAIS.....	39
4.2 PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA (PAS).....	40
4.3 PRESSÃO DE PERFUSÃO CORONARIANA (PPC).....	41
4.4 REATIVIDADE VASCULAR CORONRIANA .....	42
4.5 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNA (WESTERN BLOTTING) .....	44
4.6 ANÁLISE DO ÂNION SUPERÓXIDO .....	45
4.7 ANÁLISE DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO .....	46
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>48</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>55</b>

<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>56</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>67</b>

## RESUMO

As doenças cardiovasculares representam a principal causa de morte no mundo. Diversos estudos têm demonstrado que a incidência de doenças cardiovasculares em mulheres no período fértil é menor que em homens da mesma faixa etária. Essa diferença parece estar relacionada à ação dos hormônios femininos que conferem cardioproteção às mulheres. A terapia de reposição hormonal clássica é composta por estrogênio e progesterona, e os efeitos benéficos do estrogênio são bem estabelecidos. Por outro lado, a progesterona (P4) possui efeitos ainda controversos dependendo do leito vascular estudado. Devido a essa variabilidade da resposta em diferentes leitos vasculares à progesterona, o presente trabalho investigou os efeitos do tratamento com progesterona sobre a reatividade vascular coronariana dependente do endotélio em ratas Wistar ovariectomizadas. Para esse estudo foram selecionadas ratas adultas com 8 semanas de vida divididas em SHAM, Ovariectomizadas (OVX) e Ovariectomizadas tratadas com progesterona (OVX P4). Ao final do tratamento, a pressão arterial sistólica foi avaliada por pletismografia de cauda. Após eutanásia os corações foram removidos e a reatividade vascular coronariana foi avaliada pela técnica de Langendorff modificada. A Curva dose resposta de bradicinina (BK) foi construída seguida por inibições com 100  $\mu$ M L-NAME, 2,8  $\mu$ M indometacina (INDO), L-NAME + INDO ou L-NAME + INDO + 0,75  $\mu$ M clotrimazol (CLOT). A densidade protéica da eNOS total, Akt e gp91fox, foi quantificada pelo método de Western blotting. O protocolo de dihidroetídio (DHE) foi usado para quantificar a concentração de ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), assim como a análise de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) foi realizada pelo protocolo de marcação para 2', 7'-diclorofluoresceína (DCF). Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM e a comparação entre os grupos foi realizada por ANOVA de 1 ou 2 vias, seguida de *post hoc* de Tukey ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença entre os grupos em relação a pressão arterial sistólica. A pressão de perfusão coronariana (PPC) basal foi reduzida pela ovariectomia, e o tratamento com P4 foi capaz de prevenir essa redução (SHAM =  $88 \pm 3$ ; OVX =  $70 \pm 8$ ; OVX P4 =  $96 \pm 8$  mmHg). Observamos que a vasodilatação coronariana dependente do endotélio, induzida pela BK, no grupo OVX foi menor e mantida no grupo OVX P4. Após inibição isolada, ou conjugada dos fatores de relaxamento dependente do endotélio (NO, PGI<sub>2</sub> e EDHF), observamos que a vasodilatação induzida por BK foi maior no grupo OVX P4 do que nos demais grupos, e apenas a inibição combinada dos três fatores

relaxamento aboliu essa resposta. O tratamento com progesterona preveniu o estresse oxidativo induzido pela ovariectomia. Estes resultados sugerem que a progesterona possui ação benéfica sobre o leito vascular coronariano, impedindo os efeitos deletérios sobre o endotélio provocados pela deficiência de hormônios sexuais ovarianos promovida pela ovariectomia.

**Palavras Chaves:** Progesterona, Artérias coronárias, Reposição hormonal, Endotélio, Vasodilatação.

## ABSTRACT

Cardiovascular diseases are a leading cause of death in the world. Several studies have shown that the incidence of cardiovascular diseases in women in the fertile period is lower than in men of same the age group. This question seems to be related to the action of the female hormones that confer cardioprotection to the women. Classic hormone replacement therapy is made by estrogen and progesterone, and the beneficial effects of estrogen are well established. On the other hand, progesterone (P4) has different effect depending on the bed studied. For this reason, in the present study we investigated the effect of the progesterone treatment on endothelium-dependent coronary vascular reactivity in female Wistar rats. For this study were selected adult rats with 8 weeks of life divided into SHAM, Ovariectomized (OVX), Ovariectomized and progesterone treated (OVX P4). The systolic blood pressure was measured by plethysmography. After euthanasia the hearts were removed and coronary vascular reactivity was assessed by modified Langendorff technique. Curve dose response of bradykinin (BK) was constructed followed by inhibitions with 100  $\mu$ M L-NAME, 2.8  $\mu$ M indomethacin (INDO), L-NAME + INDO or L-NAME + INDO + 0.75  $\mu$ M clotrimazole (CLOT). Expression of the proteins, eNOS, Akt and gp91fox, was quantified by the Western blotting method. The dihydroethyde (DHE) protocol was used to quantify the superoxide anion concentration ( $O_2^{\bullet-}$ ), as well as the hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) production was evaluated by 2', 7'-dichlorofluorescein (DCF) protocol. Data were expressed as mean  $\pm$  SEM and the comparison between groups was performed by 1 or 2-way ANOVA, followed by Tukey post hoc ( $p < 0.05$ ). There was no statistical difference regarding systolic blood pressure. Baseline coronary perfusion pressure (CPP) was reduced by ovariectomy, although P4 treatment was able to prevent this reduction (SHAM =  $88 \pm 3$ , OVX =  $70 \pm 8$ , OVX P4 =  $96 \pm 8$  mmHg). We observed that BK-induced endothelium-dependent coronary vasodilatation was impaired in the OVX group and maintained in the OVX P4 group. After isolated or conjugated inhibition of endothelium-dependent relaxation factors (NO,  $PGI_2$  and EDHF), we observed that BK-induced vasodilatation was greater in the OVX P4 group than in the other groups, and only the combined inhibition of the three relaxation factors abolished this response. Treatment with progesterone prevented oxidative stress induced by ovariectomy. These results suggest that progesterone has a beneficial

action on the coronary vascular bed, preventing deleterious effects on the endothelium induced by the ovarian sex hormone deficiency promoted by ovariectomy.

**Key words:** Progesterone, Coronary arteries, Hormonal replacement, Endothelium, Vasodilation.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Representação esquemática da via de sinalização genômica da progesterona. ....21
- Figura 2:** Esquema ilustrativo da síntese de vasodilatadores endoteliais e interação com o músculo liso vascular (Shimokawa, 2010). ....23
- Figura 3:** Esquema representativo do protocolo experimental de reatividade vascular. ....34
- Figura 4:** Peso corporal de ratas SHAM (n = 20), OVX (n = 20), OVX P4 (n = 20). Os valores foram expressos com média ± EPM, \*p < 0,05 comparado com SHAM. As análises foram realizadas por ANOVA de uma via seguido de *post hoc* de Tukey. ...39
- Figura 5:** Pressão de perfusão coronariana (PPC) basal de ratos normotensos nos grupos: SHAM (n = 15); OVX (n = 15); OVX P4 (n = 15). Os valores foram expressos com média ± EPM. As análises foram realizadas por ANOVA de uma via seguida pelo *post hoc* de Tukey. ....41
- Figura 6:** Pressão de perfusão coronariana (PPC) basal de ratas normotensas dos grupos: SHAM (n = 15); OVX (n = 15); OVX P4 (n = 15). Os valores foram expressos com média ± EPM, \*p < 0,05 comparado com SHAM, #p < 0,05 comparado com OVX. As análises foram realizadas por ANOVA de uma via seguida de *post hoc* de Tukey. ....41
- Figura 7:** Resposta vasodilatadora a concentrações crescentes de bradicinina (BK 10<sup>-10</sup> – 10<sup>-6</sup> M). Curva de bradicinina antes (A, n = 15) e após inibição com L-NAME (B, n = 8), Indometacina (C, n = 8), L-NAME + Indometacina (D, n = 8) e LNAME + Indometacina + Clotrimazol (E, n = 7). Os valores foram expressos com média ± EPM \*p < 0,05 comparado a diferença entre os grupos. As análises foram realizadas por ANOVA de duas vias seguido de *post hoc* de Tukey. ....43
- Figura 8:** Resposta vasodilatadora a concentrações crescentes de bradicinina (BK 10<sup>-10</sup> – 10<sup>-6</sup> M) antes (A) e após o bloqueio com TEA (B), nos grupos: SHAM (n = 8); OVX (n = 8); OVX P4 (n = 8). Os valores foram expressos com média ± EPM. #p < 0,05

quando comparado do grupo OVX. As análises foram realizadas por ANOVA de duas vias seguido de *post hoc* de Tukey. ....44

**Figura 9:** Análise da expressão proteica nos grupos: SHAM, OVX e OVX P4. A figura mostra a expressão proteica da eNOS, Akt, e gp91phox. Cada amostra foi obtida a partir de artérias coronária septal e as análises de diferentes proteínas foram realizadas nos mesmos géis. Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM; n = 4 por grupo. Utilizamos ANOVA de uma via seguida do teste *post hoc* de Tukey. \*p < 0,05 em comparação com o grupo SHAM.....44

**Figura 10:** Influência do tratamento com progesterona na produção de ânion superóxido nas artérias coronárias. Os painéis indicam intensidade de fluorescência (vermelho) nas artérias coronárias dos ratos dos grupos SHAM, OVX e OVX P4 utilizando coloração com di-hidroetidio (DHE). O gráfico de barras indicando a fluorescência média de DHE (UA: unidades arbitrárias) (n = 4). Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM. \* p < 0,05. As análises foram realizadas por ANOVA uma via seguida pelo *post hoc* de Tukey. Barra de escala: 20  $\mu$ m. ....45

**Figura 11:** Influência do tratamento com progesterona na produção de peróxido de hidrogênio nas artérias coronárias. Os painéis indicam a intensidade de fluorescência (verde) nas artérias coronárias dos ratos dos grupos Sham, OVX e OVX P4 usando coloração com 2', 7'-diclorofluoresceína (DCF). O gráfico de barras indicando a fluorescência média do DCF (UA: unidades arbitrárias) (n = 4). Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM. \* p <0,05. As análises foram realizadas por ANOVA uma via seguido pelo *post hoc* de Tukey. Barra de escala: 20  $\mu$ m. ....46

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>Akt</b> Proteína cinase B	<b>EROs</b> Espécies reativas de oxigênio
<b>cAMP</b> 3',5' Monofosfato de adenosina cíclico	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> Peróxido de Hidrogênio
<b>ANOVA</b> Análise de variância	<b>HDL</b> Lipoproteína de alta densidade
<b>ATP</b> Adenosina Trifosfato	<b>INDO</b> Indometacina
<b>BH4</b> (6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterina	<b>K<sup>+</sup> Íon</b> potássio
<b>Ca<sup>2+</sup></b> Íon cálcio	<b>Kca</b> Canal de potássio ativado por cálcio
<b>cGMP</b> 3',5'-Guanosina monofosfato cíclico	<b>LDL</b> Lipoproteína de baixa densidade
<b>CLOT</b> Clotrimazol	<b>L-NAME</b> N <sup>ω</sup> -nitro-L-Arginina Metil Éster – Inibidor não seletivo da eNOS
<b>CMLV</b> Celulas do músculo liso vascular	<b>NADPH</b> Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
<b>COX</b> Ciclooxygenase	<b>NO</b> Óxido nítrico
<b>CYP</b> Citocromo P450	<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b> Ânion superóxido
<b>DCVs</b> Doenças cardiovasculares	<b>OH·</b> Radical hidroxil
<b>DCF</b> Diacetato de diclorofluoresceína	<b>ONOO·</b> Peroxinitrito
<b>DHE</b> Dihidroetídio	<b>OVX</b> Ovariectomizada
<b>E2</b> 17-β estradiol	<b>MAPK</b> Proteínacinasas ativadas por mitógenos
<b>EDHF</b> Fator hiperpolarizante derivado do endotélio	<b>P4</b> Progesterona
<b>EETs</b> Ácidos epoxieicosatrienóicos	<b>PAS</b> Pressão arterial sistólica
<b>EPM:</b> Erro padrão da média	<b>PGI<sub>2</sub></b> Prostaciclina
<b>eNOS</b> Óxido nítrico sintase endotelial	

**PI3K** Fosfatidilinositol-3-cinase

**PPC** Pressão de perfusão coronariana

**SOD** Superóxido dismutase

**TEA** Tetraetilamônio

## 1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas a maioria dos países ocidentais tem melhorado a atenção e os cuidados à saúde. Essas mudanças culminaram no aumento da expectativa de vida (North; Sinclair, 2012). Dessa forma, a preocupação com a qualidade de vida durante o processo de envelhecimento aumentou (Dawalibi et al., 2013). O envelhecimento é um processo natural ocasionado por um declínio fisiológico, bioquímico e funcional dos órgãos, o que aumenta a susceptibilidade às doenças crônico-degenerativas, exibindo características próprias em diferentes indivíduos (McHugh; Gil, 2018).

Nos países desenvolvidos a expectativa de vida da mulher é de 80 anos, dessa forma a mulher pode passar cerca de um terço da sua vida na pós-menopausa (Benjamin et al., 2019). A menopausa é caracterizada pela interrupção definitiva dos ciclos menstruais, ocasionada pela depleção dos folículos ovarianos, com consequente falência funcional dos ovários (Paoletti; Wenger, 2003). Portanto, o entendimento do climatério, que se configura na fase de transição entre o período reprodutivo e não reprodutivo da mulher, ganhou relevância nos últimos anos (Chalouhi, 2017).

Embora o climatério seja um processo fisiológico, ele desencadeia várias modificações no organismo da mulher, trazendo, diversos sintomas clínicos, além de tornar a mulher propensa ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCVs), osteoporose, declínio cognitivo, depressão e a doença de Alzheimer (Xu et al., 2005).

Dentre as doenças que podem ser desenvolvidas na pós-menopausa é importante destacar as DCVs, pois mesmo com os avanços tecnológicos no diagnóstico e no entendimento dos mecanismos e no tratamento, as DCVs ainda são a principal causa de mortalidade no mundo (Benjamin et al., 2019). No Brasil as doenças cardiovasculares são responsáveis por aproximadamente 30% de todas as mortes registradas em um ano (Brasil, 2017). Além disso, as DCVs representam uma das principais causas de morte em mulheres na pós-menopausa no mundo ocidental (Tsai; Stefanick; Stafford et al, 2011), dentre as quais a doença arterial coronariana assume grande importância (Benjamin et al., 2019).

Esse aumento a propensão ao desenvolvimento de DCVs na pós-menopausa pode ter relação com a redução ou cessação da produção dos hormônios sexuais femininos. Estudos clínicos têm demonstrado que hormônios sexuais femininos

exercem efeitos benéficos sobre as funções cardiovasculares (Wenner; Stachenfeld, 2012). Além disso, durante a gravidez, em que os níveis de estrogênio e progesterona são elevados na circulação, a pressão arterial da mulher reduz (Wilson et al., 1980) o que indica um papel desses hormônios na regulação da pressão arterial. Consoante, estudos clínicos têm demonstrado que hormônios sexuais femininos exercem efeitos benéficos sobre as funções cardiovasculares (Wenner; Stachenfeld, 2012).

Portanto, com objetivo de melhorar a qualidade de vida, e diminuir o risco do desenvolvimento DCVs para a mulher na pós-menopausa, foram propostas as terapias de reposição hormonal (TRH) (Chalouhi, 2017). As primeiras formas de terapia foram propostas apenas com estrogênio, uma vez que esse hormônio exerce papel importante no sistema cardiovascular, bem como possui ação benéfica em diversos outros sistemas do organismo. (Rozenberg et al., 2013). Dentre todas as ações cardiovasculares do estrogênio, em especial o 17 $\beta$ -estradiol (E2), está a sua atuação direta sobre o vaso que caracteriza um dos principais fatores de proteção atribuídos a esse hormônio. O E2 modula o tônus vascular, e é ativo tanto no músculo liso vascular quanto nas células endoteliais. Além disso, o E2 possui ação antioxidante por reduzir a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), e devido à sua estrutura fenólica é capaz de sequestrar radicais livres como o ânion superóxido (Pang; Dong; Thomas, 2013). O efeito cardioprotetor do E2 se estende à inibição da agregação plaquetária e à inibição da proliferação de músculo liso vascular (Tostes et al., 2003).

Outro fator importante, que confere ao estrogênio característica cardioprotetora é a modulação benéfica do perfil lipídico, pois ele atua no metabolismo das lipoproteínas, aumentando a síntese de lipoproteína de alta densidade (HDL) e a degradação de lipoproteína de baixa densidade (LDL) (Tostes et al., 2003), além de ser capaz de modular o sistema renina-angiotensina-aldosterona, diminuindo a expressão de receptor da angiotensina tipo 1 (Fisher; Baessler; Schunkert, 2002), inibindo a atividade da renina, dessa forma diminuindo a conversão de angiotensinogênio em angiotensina (Gragasin et al., 2003).

Apesar das ações benéficas do E2 sobre o sistema cardiovascular, as terapias estrogênicas causaram complicações principalmente em nível endometrial, aumentando a predisposição de câncer de útero, bem como a proliferação celular nas

glândulas mamárias favorecendo o desenvolvimento de câncer de mama (Rozenberg et al., 2013). Para sanar esses inconvenientes, foi proposta a THR clássica, na qual foi adicionada progesterona (P4) com o intuito de impedir os efeitos colaterais promovidos pelo E2 (Utianab, 1997). Entretanto, alguns estudos clínicos demonstraram efeitos adversos desta terapia conjugada, uma vez que houve aumento na incidência de eventos cardiovasculares e tromboembólicos (Grady et al., 1998).

Esse foi o caso do *Heart and Estrogen-Progestin Replacement Study* (HERS), que possuiu duas fases, na primeira fase do estudo foram incluídas 2763 mulheres com idade média de 66,7 anos, todas apresentavam doenças coronárias prévias e útero intacto. Essas mulheres foram acompanhadas por um período de 4,1 anos, a cada quatro meses eram realizadas avaliações parciais dos resultados. Posteriormente, esse estudo foi ampliado para um novo seguimento (HERS II), nessa segunda fase foram admitidas 2321 mulheres, acompanhadas por um período de 2,7 anos (Grady et al., 1998).

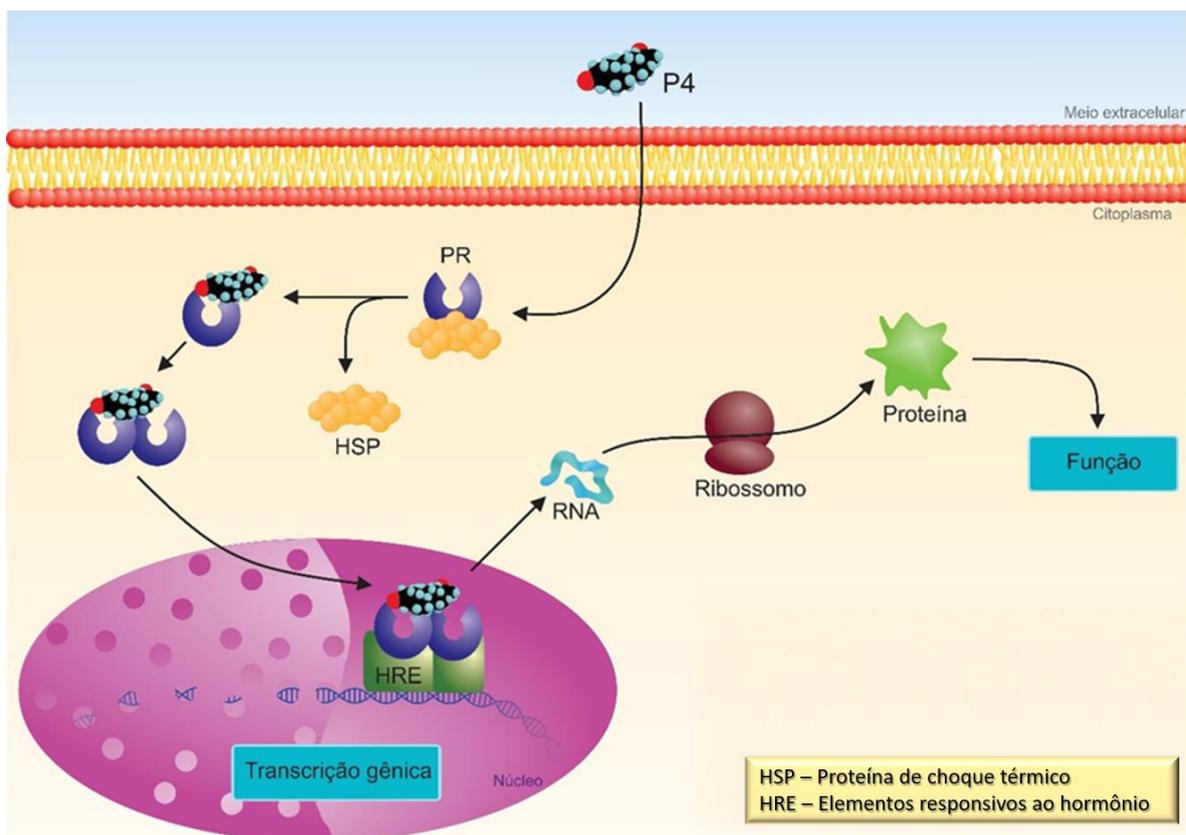
Nesse estudo foi concluído que a TRH não foi capaz de reduzir os riscos de doenças coronarianas, em contrapartida foi observado aumento dos riscos cardiovasculares no primeiro ano. Ademais, houve elevação de eventos de tromboembolismo. Em decorrências dos fatos ocorrido com as integrantes do estudo, o HERS foi interrompido, não permitindo avaliação da TRH em longo prazo (Grady et al., 2002).

Outro estudo denominado *Women's Health Initiative* (WHI), que teve como um dos objetivos avaliar os riscos e benefícios da TRH para a redução da incidência de doenças cardiovasculares e câncer de mama, também não teve um desfecho positivo. O WHI incluiu participantes com idades entre 50 e 79 anos sem doença coronárias prévias. O seguimento do estudo que comparou a utilização de TRH com placebo foi interrompida antes do final planejado, pois o comitê de segurança do estudo constatou excesso de risco de câncer de mama invasivo após média de 5,2 anos de seguimento (Stefanick et al., 2003).

Esses achados negativos quanto aos efeitos da TRH sobre o sistema cardiovascular podem estar relacionados com diversas questões contidas nos desenhos experimentais desses estudos. No caso do HERS, as participantes, já possuíam doença coronariana. Uma outra questão que deve ser destacada, foi a idade

avançada das integrantes, e principalmente o tipo de progestina utilizada. Tanto no HERS quanto no WHI, foi utilizado o acetato de medroxiprogesterona (MPA), uma progestina sintética, com estrutura molecular parecida com a P4 que, no entanto, pode apresentar efeitos fisiológicos diferentes aos observados com a P4.

A P4 é um hormônio esteroide produzido pelas gônadas, suprarrenais, sistema nervoso central e periférico bem como pela placenta. Nos ovários a P4 é secretada pelas células foliculares do ovário antes da ovulação e também em maiores quantidades pelo corpo lúteo, que se forma após a ovulação, sob estimulação do hormônio luteinizante (LH). Tem como precursor o colesterol que é transformado em pregnenolona, para posteriormente ser convertido em progesterona (Taraborrelli, 2015). A progesterona circula na corrente sanguínea ligada geralmente à albumina sérica ou à globulina de ligação ao cortisol, mas uma pequena percentagem encontra-se na sua forma livre bioativa (Scarpin et al., 2009). Uma vez no tecido alvo, a P4 atravessa a membrana celular e se liga ao seu respectivo receptor citosólico. Quando ocorre a interação hormônio-receptor começa o processo de mudança conformacional precedendo a dissociação das proteínas de choque térmico (Allan et al., 1992), resultando na dimerização desse receptor (Tsai et al., 1988; Tsai; O'Malley 1991). Após a formação de um homodímero o complexo hormônio receptor se liga em sequências específicas do DNA denominadas elementos responsivos ao hormônio. O complexo hormônio-receptor atua como um fator de transcrição, modulando a síntese de mRNA e de proteínas responsáveis pelos efeitos finais da P4 (Brys et al., 2009). Os efeitos da P4 são mediados pela ligação ao receptor de progesterona nuclear (PR). Os receptores nucleares para progesterona são expressos em duas isoformas distintas, PR-A e PR-B (Scarpin et al., 2009). Por meio desse mecanismo a P4 afeta o desenvolvimento e o comportamento sexual e uma variedade de outras funções reprodutivas e não reprodutivas (Taraborrelli, 2015).



**Figura 1:** Representação esquemática da via de sinalização genômica da progesterona.

Além do modelo clássico de mecanismo de ação da P4, também conhecido como modelo genômico ou nuclear, a P4 também pode atuar de forma rápida e não-genômica (extranuclear), por meio de receptores de membrana, não alterando a expressão gênica e síntese de proteínas (Karteris et al., 2006). Recentemente foi descoberto uma nova classe de receptores de progesterona localizada na membrana plasmática. Os receptores de membrana para progesterona (mPR) possuem cinco isoformas (mPR $\alpha$ , mPR $\beta$ , mPR $\gamma$ , mPR $\delta$  e mPR $\epsilon$ ) e apresentam características típicas dos receptores acoplados à proteína G (Thomas; Pang; 2013).

Apesar das progestinas serem moléculas parecidas com a P4, e atuarem nos mesmos receptores, estudos têm demonstrado que as ações desencadeadas pelas progestinas, em algumas ocasiões, parecem ser diferentes ou até opostas às da P4 (Clarkson, 1999; Fournier, 2005; Schumacher, 2008; Cutini et al., 2009; Cutini et al., 2014). Tanto no estudo HERS quanto no WHI a progestina utilizada foi o MPA. Estudos demonstraram que o uso dessa progestina na TRH foi um importante fator para os resultados negativos, uma vez que o MPA parece ter efeitos deletérios no aparelho cardiovascular, como: aumento da progressão da aterosclerose, redução do

efeito vasodilatador promovido pelos estrogênios, aumento da deposição de LDL na placa de aterosclerose, aumento do potencial trombogênico da placa e aumento da resistência periférica a insulina (Clarkson, 1999).

Além disso, a regulação da função vascular ocorre de maneira diferente em relação ao MPA e a P4, devido ao fato de a P4 estimular a produção de óxido nítrico (NO), enquanto o MPA inibe sua síntese nas células endoteliais. Em estudo de Chataigneau et al. (2004), a administração crônica de P4 em ratas ovariectomizadas restaurou o controle endotelial do tônus vascular em anéis da artéria mesentérica por meio da formação de NO endotelial, no entanto o MPA não desempenhou a mesma ação. Essa resposta oposta do MPA em relação à P4 também ocorre sob condições inflamatórias. A P4 previne a adesão de plaquetas às células endoteliais, enquanto o MPA potencializa a adesão de plaquetas (Cutini et al, 2014). Além disso, MPA, também se liga a receptores de glicocorticóides que inibem a transcrição gênica da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e a sua atividade enzimática (Zerr-Fouineau et al., 2007).

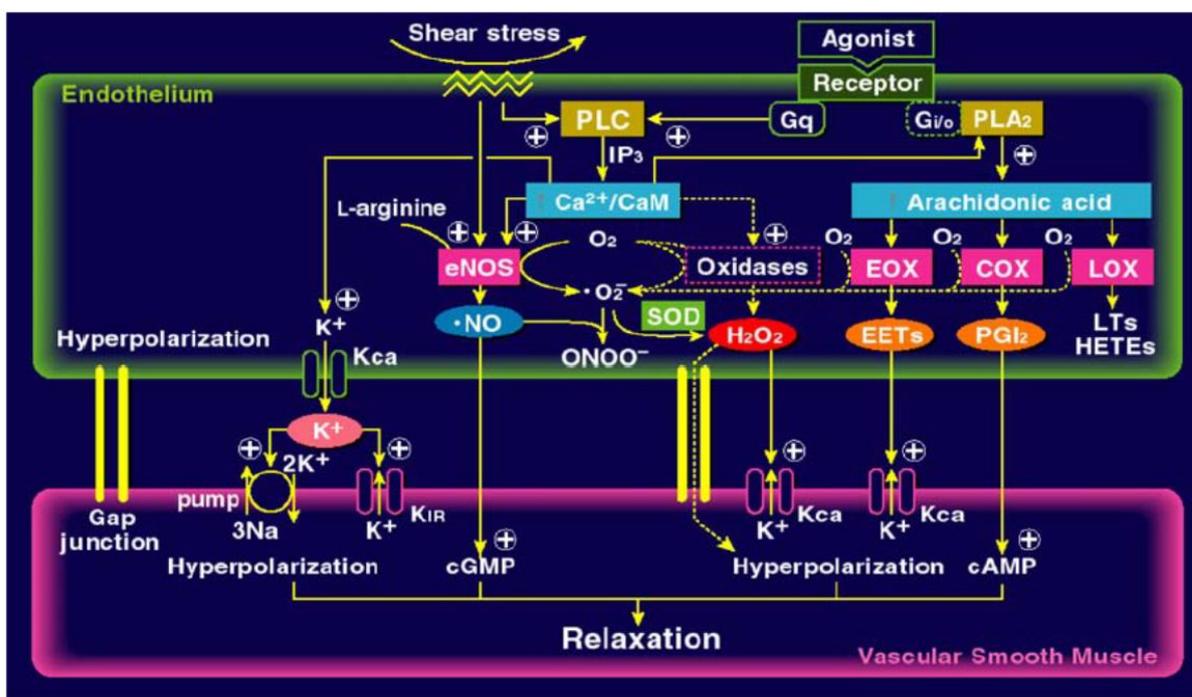
Devido aos efeitos negativos do uso do MPA, alguns estudos recomendam o uso da progesterona micronizada na TRH, pelo fato deste progestágeno ter uma estrutura química idêntica à da progesterona natural, tendo assim os mesmos efeitos biológicos, e não os efeitos deletérios sobre o metabolismo lipídeos e aparelho cardiovascular do MPA (Lignieres, 1999; Lange et al., 2006; Francieli, 2011). Esses efeitos incluem regulação do perfil lipídico e ação direta sobre o sistema cardiovascular.

Sobre o perfil lipídico, a progesterona natural promove a elevação da síntese lipoproteína de alta densidade (HDL) e o catabolismo de lipoproteína de baixa densidade (LDL), diminuindo assim os níveis de LDL, e aumentando os níveis de HDL (Kamada et al., 2001). Dessa forma, podemos observar a participação da P4 de forma benéfica na regulação do perfil lipídico, uma vez que na pós menopausa, em que ocorre diminuição dos hormônios sexuais, a mulher desenvolve um perfil lipídico mais propenso a aterogênese com elevação dos níveis de LDL e diminuição de HDL (Keaney et al., 1994).

Em se tratando do sistema cardiovascular, evidências sugerem que o P4 exerce seus efeitos por ação direta sobre o coração promovendo um efeito antiarrítmico acelerando a repolarização cardíaca e tem papel preventivo na lesão de isquemia,

reduzindo a resposta inflamatória (Dhote; Balaraman, 2007). Além disso, a P4 demonstrou a capacidade de inibir a apoptose de cardiomiócitos (Morrissy et al., 2010). Seu efeito cardioprotetor parece envolver, também, a modulação da pressão arterial, já que a P4 diminui a pressão arterial em homens hipertensos e em mulheres na pós-menopausa (Paszkowski, 2011). A P4 também é capaz de diminuir a resistência vascular sistêmica em mulheres normotensas (Cheng et al., 2012).

Outro benefício da P4 sobre o sistema cardiovascular é a sua ação direta sobre os vasos sanguíneos (Regidor, 2014). Os vasos sanguíneos são, geralmente, compostos das seguintes camadas ou túnicas: adventícia, média e íntima (Pignoli et al., 1986). Sendo adventícia a camada mais externa composta por fibroblastos, fibras de colágeno e fibras elásticas, a túnica média formada, essencialmente, por células musculares lisas, e a íntima por células endoteliais pavimentosas dispostas sobre uma camada de tecido subendotelial que formam o endotélio (Borysenko; Beringer, 1984). O endotélio desempenha um papel funcional sobre a reatividade vascular (Furchgott; Zawadzki, 1980) por meio da produção e liberação equilibrada de fatores vasoativos que agem sobre o músculo liso e regulam o tônus vascular (Donato et al., 2009)



**Figura 2:** Esquema ilustrativo da síntese de vasodilatadores endoteliais e interação com o músculo liso vascular (Shimokawa, 2010).

A P4 age no vaso inibindo a proliferação de células do músculo liso vascular (CMLV) protegendo os vasos sanguíneos do desenvolvimento de aterosclerose (Regidor, 2014), inibe a agregação plaquetária (Cutini et al., 2014) e por fim, é capaz de promover relaxamento de leitos vasculares (Miller; Vanhoutte, 1991; Gerhard et al., 1998). Esse efeito se dá por ação direta no músculo liso vascular, e um efeito dependente do endotélio, onde a progesterona estimularia a liberação de agentes vasodilatadores (Regidor, 2014).

A P4 age no vaso inibindo a proliferação de células do músculo liso vascular (CMLV) protegendo os vasos sanguíneos do desenvolvimento de aterosclerose (Regidor, 2014), inibe a agregação plaquetária (Cutini et al., 2014) e por fim, é capaz de promover relaxamento de leitos vasculares (Miller; Vanhoutte, 1991; Gerhard et al., 1998). Esse efeito se dá por ação direta no músculo liso vascular ou por ação indireta por meio da liberação de agentes vasodilatadores dependentes do endotélio (Regidor, 2014).

No músculo liso, a progesterona atua sobre o canal para cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) tipo L, inibindo o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , o que leva a redução na concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  e consequentemente ao relaxamento (Barbagallo et al., 2001). No que diz respeito às ações da P4 sobre o endotélio vascular, inúmeros estudos têm demonstrado que a P4, tanto por mecanismos genômicos quanto não genômicos, nos dois casos envolvendo ativação da via de sinalização PI3K / Akt, leva à ativação da eNOS, consequentemente estimulando a produção de NO (Simoncini et al., 2004; Cutini et al., 2014; Pang; Dong, Thomas, 2015). Desta forma, a P4 contribui na regulação do tônus vascular, uma vez que o NO é considerado o principal agente vasodilatador em diversas artérias (Vanhoutte, 2000).

O NO é produzido pelas células endoteliais por ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), a partir do aminoácido L-arginina, produzindo a L-citrulina como subproduto (Moncada; Higgs, 1993). O NO é instável com meia-vida curta, de aproximadamente 4 segundos em soluções biológicas. Nestes tecidos, ele é oxidado em nitrito e depois em nitrato pela hemoglobina oxigenada antes de ser excretado na urina (Moncada, 1993). Vários co-fatores são necessários para a biossíntese do óxido nítrico, estes incluem fosfato de nicotinamida adenina dinucleotideo (NADPH), mononucleotideo de flavina (FMN), dinucleotideo de flavina adenina (FAD), tetra-hidrobiopterina (BH4) e

calmodulina. Uma vez sintetizado, o NO se difunde e entra nas células musculares lisas vasculares, onde ativa a guanilato ciclase (GC), levando ao aumento nas concentrações intracelulares cíclicas de guanosina-3', 5-monofosfato (cGMP) (Vallance et al., 1989). Como segundo mensageiro, o cGMP medeia muitos dos efeitos biológicos do NO, incluindo o controle do tônus vascular e da função plaquetária (Moncada; Higgs, 1993).

Além do aumento na síntese de NO, a P4 também é capaz de modular a função endotelial interferindo na síntese de prostaglandinas (Cutini et al., 2009). A progesterona modula respostas vasculares mediadas pelos produtos da ciclooxigenase (COX). Dentre eles, a prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) que é membro da família de prostanóides endógenos, e é produzida a partir do ácido araquidônico por ação da enzima da COX. A progesterona é capaz de modular a atividade da COX por um mecanismo de ação que envolve as vias de sinalização MAPK PI3K, e um sistema de *cross talk* entre eNOS e COX (Cutini et al., 2009). A PGI<sub>2</sub> é um forte vasodilatador, bem como inibidor endógeno muito potente da agregação plaquetária, além de também inibir o crescimento de células musculares lisas vasculares. A PGI<sub>2</sub> é liberada pelas células endoteliais, e se liga a um receptor acoplado à proteína G na célula do músculo liso, que desencadeia aumento nos níveis de adenosina monofosfato cíclica (cAMP) intracelular, que ativa a proteína quinase A causando vasodilatação (Shimokawa et al., 1988).

Além do NO e PGI<sub>2</sub>, os hormônios sexuais também modulam vasodilatação mediada pelo fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (Santos et al., 2004; Rouver et al., 2015). Contudo, a relação entre P4 e EDHF ainda não foi totalmente elucidada. São considerados EDHFs substâncias capazes de promover relaxamento vascular dependente do endotélio, após a inibição combinada da NOS e COX (Campbell; Harder, 2001). Alguns candidatos foram propostos como EDHFs, dentre eles: i) íon K<sup>+</sup> (Mcguire et al., 2001); ii) anandamida (Randall et al., 1996; Randall; Kendall, 1997; Randall et al., 1997); iii) peptídeo natriurético C (Ahluwalia; Hobbs, 2005); iv) monóxido de carbono (Stone; Yang, 2006); v) radicais hidroxil (Stone; Yang, 2006); vi) peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Matoba et al., 2000); vii) junções comunicantes (Griffith, 2004) e viii) ácidos epoxieicosatrienóicos (EETs) (Campbell; Harder 2001).

Dentre os possíveis EDHF, estudos demonstraram que nas artérias coronárias os EETs são fortes candidatos (Fisslthaler et al., 1999; Edwards et al., 2000; Santos et al., 2004; Rouver et al., 2015). Os EETs são derivados do ácido araquidônico e são formados pela enzima citocromo P450 (CYP) (Fleming et al., 2001). Uma vez sintetizados, difundem-se para células musculares lisas e ativam canais para potássio ativados por cálcio de condutância intermediária ( $IK_{Ca}$ ) e/ou canais para potássio ativados por cálcio de baixa condutância ( $SK_{Ca}$ ) promovendo hiperpolarização e consequente relaxamento do músculo liso vascular (Fleming et al., 2001).

Sabendo das ações da progesterona, principalmente no endotélio, sugere-se que este hormônio exerça efeitos benéficos por estimular a síntese de vasodilatadores. Entretanto, esse efeito benéfico é controverso, uma vez que Wassmann et al. (2005) demonstraram que a P4 pode estimular a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), por meio do complexo enzimático NADPH oxidase. Além disso, a P4 diminuiu a atividade de enzimas antioxidantes, tais como superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT).

Sabe-se que um dos principais fatores que aumentam o risco de DCVs após a menopausa, é o aumento da produção de EROs, o que pode levar ao estresse oxidativo (Sanchez-Rodriguez et al., 2012). O estresse oxidativo é uma condição biológica em que ocorre desequilíbrio entre a produção de EROs e a sua remoção através de sistemas antioxidantes (Schneider; Oliveira, 2004; Halliwell, 2006).

Em estudos experimentais realizados com ratas ovariectomizadas (OVX), utilizados como modelo deficiência endógena de hormônios sexuais, observa-se que a diminuição da produção dos hormônios sexuais pode reduzir a biodisponibilidade de NO, o que leva a uma disfunção endotelial e promove efeitos deletérios sobre o sistema vascular. Kang et al. (2011), em arteríolas coronarianas de ratas OVX com idade avançada, relataram uma redução da vasodilatação dependente do endotélio relacionada a uma diminuição na produção de NO. Além disso, o efeito foi associado a uma redução na expressão da enzima antioxidante (SOD), e consequente aumento no estresse oxidativo.

As EROs são produzidas naturalmente no organismo por meio de processos metabólicos oxidativos (Schneider; Oliveira, 2004), e possuem papel importante em

diversos processos fisiológicos como sinalização celular, sistema de defesa imunológico, síntese de hormônios, inflamação, fertilização, sinalização celular, entre outros (Paravicini; Touyz, 2008; Elahi et al., 2009). Essas espécies são compostos químicos que compreendem dois principais grupos, um deles são os radicais livres, como o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hidroxil ( $OH^{\cdot}$ ), radicais lipídicos ( $ROO^{\cdot}$ ) e o óxido nítrico (NO) (Halliwell, 2006). O outro grupo, é composto pelos derivados de oxigênio não radicalares, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot-}$ ) e o ácido hipocloroso (HOCL), estes são mais estáveis e com meia-vida maior do que os radicais livres, porém, também contribuem para o estresse oxidativo (Elahi et al, 2009; Paravicini; Touyz, 2008).

O  $O_2^{\cdot-}$  é a espécie reativa precursora, e é produzida por diversas fontes a partir do oxigênio. Essa fontes incluem a eNOS, funcional ou desacoplada (Shimokawa et al, 2010), a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, ciclooxigenase e lipoxigenase, citocromo P450, as enzimas xantina oxidase e a NADPH oxidase. Esta última é um complexo enzimático e é a maior fonte vascular de  $O_2^{\cdot-}$  (Cai; Harrison, 2000; Elahi et al., 2009; Frey et al, 2009).

O  $O_2^{\cdot-}$  pode ser convertido em  $H_2O_2$  espontaneamente em baixo pH, pela ação da enzima SOD, ou formar peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot-}$ ) quando reage com NO, e pode também formar o radical livre hidroxil ( $OH^{\cdot}$ ), que possui a maior reatividade nos sistemas biológicos. O  $H_2O_2$  pode formar  $OH^{\cdot}$  quando reage com metais de transição, geralmente ferro ou cobre (Schneider e Oliveira, 2004; Frey et al, 2009).

Existem mecanismos celulares que se contrapõem a produção de EROs, e são conhecidos como sistemas antioxidantes. As principais enzimas antioxidantes vasculares são a SOD, CAT e glutatona peroxidase (GPx) (Paravicini e Touyz, 2008). Dentre os hormônios sexuais, os estrógenos são considerados como compostos antioxidantes devido à sua estrutura fenólica, a qual sequestra radicais livres prevenindo o dano oxidativo, bem como modulando a ação das enzimas antioxidante (Sanchez-Rodriguez et al., 2012). A progesterona, por sua vez, parece melhorar a capacidade antioxidante de camundongos ovariectomizados (Lu et al., 2009). No entanto, outro estudo demonstrou aumento do estresse oxidativo promovido por esse hormônio, diminuindo a expressão e a atividade da SOD usando mecanismos transcricionais em cultura de célula (Wassmann et al., 2005). Desta forma, a

modulação da progesterona sobre o sistema antioxidante e na geração de EROs é controversa.

O conhecimento atual sobre a ação da P4 em nível vascular é bastante reduzido, em comparação com a grande quantidade de evidências relatadas sobre E2, sobretudo no leito coronariano, que possui grande importância. A circulação coronariana é essencial para o coração, provendo condições de trabalho ideais para a célula miocárdica, fornecendo oxigênio, transportando substratos e removendo metabólitos (Berne; Rubio, 1975).

Apesar do parco conhecimento sobre a ação da P4 no leito coronariano, estudos têm demonstrado que a progesterona modula o tônus vascular por meio da liberação de fatores endoteliais vasodilatadores em artérias coronarianas (Miller; Vanhoutte, 1991; Gerhard et al., 1998). Contudo, a participação de cada vasodilatador endotelial nessa resposta ainda não foi totalmente esclarecida. Assim, o presente estudo pretendeu investigar a ação da progesterona sobre o leito coronariano. Nossa hipótese é que o tratamento com progesterona seja capaz de prevenir uma possível disfunção endotelial promovida pela ovariectomia, mantendo a resposta vasodilatadora dependente do endotélio.

## 2.OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Avaliar os efeitos do tratamento com progesterona sobre a reatividade vascular coronariana dependente do endotélio em ratas Wistar ovariectomizadas.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos do tratamento com progesterona sobre a pressão arterial sistólica (PAS) e pressão de perfusão coronariana (PPC) em ratas Wistar;
- Avaliar o efeito do tratamento com progesterona sobre a liberação dos principais mediadores endoteliais de relaxamento (NO, PGI<sub>2</sub> e EDHF);
- Avaliar o efeito do tratamento com progesterona sobre a participação dos canais para potássio no relaxamento coronariano dependente do endotélio;
- Avaliar aspectos ponderais de ratas com e sem tratamento com progesterona
- Quantificar a expressão das proteínas eNOS, Akt, gp91phox (Subunidade da NADPH oxidase);
- Quantificar a produção de ânions superóxidos vascular;
- Quantificar a produção de peróxido de hidrogênio vascular

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizadas ratas adultas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), com idade entre 8 e 10 semanas. Os animais foram fornecidos pelo biotério do Centro de Ciências da Saúde - CCS da Universidade Federal do Espírito Santo. O protocolo de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFES (CEUA-UFES) sob o número de protocolo 063/2017. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, com cinco animais por gaiola, com livre acesso à água e ração (Purina Labina, SP-Brasil), em ambiente sob condições de temperatura (22-24 °C) e umidade (40-60 %) controladas. Os animais foram submetidos a um ciclo de luz de 12/12 horas alternando entre claro e escuro.

#### 3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

- Controle (SHAM);
- Ovariectomizadas (OVX);
- Ovariectomizadas + Tratamento com progesterona (OVX P4);

#### 3.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

- Identificação das fases do ciclo estral;
- Ovariectomia;
- Tratamento por 15 dias com progesterona;
- Aferição da PAS por pletismografia de cauda;
- Aferição da PPC basal;
- Estudo da reatividade vascular em coração isolado (método de Langendorff);
- Remoção dos coxins de gordura;
- Quantificação de ânions superóxido por marcação com dihidroetídeo (DHE);
- Quantificação de peróxido de hidrogênio por marcação com diclorofluoresceína (DCF);
- Análise do conteúdo proteico (Western Blotting).

### 3.3.1 Identificação das fases do ciclo estral

O ciclo estral das fêmeas foi monitorado por meio de esfregaços vaginais. A secreção vaginal de cada animal foi recolhida diariamente entre 08:00 h e 09:00 h e as células epiteliais vaginais examinadas sob microscópio óptico conforme descrito por Marcondes et al. (2002). Os protocolos experimentais foram realizados nas fêmeas com ciclo estral normal, durante a fase do diestro, que é a fase mais longa do ciclo, e onde os níveis de progesterona se encontram em níveis basais, procurando mimetizar o que ocorre em um ciclo estral regular (Goldman; Murr; Cooper, 2007).

### 3.3.2 Ovariectomia

A cirurgia de ovariectomia foi realizada conforme protocolo descrito por Claudio et al. (2013), no qual as ratas passaram pela cirurgia de ovariectomia após completarem 8 semanas de vida. Para tal, as ratas foram submetidas a anestesia geral com quetamina (70 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). Após anestesia, as ratas foram fixadas em camas cirúrgicas em decúbito lateral, uma gaze úmida com água filtrada era colocada sobre os olhos dos animais, afim de evitar o ressecamento do globo ocular. Em seguida foi realizada a tricotomia. As ratas foram submetidas a uma incisão de 1 a 1,5 cm na pele, entre a última costela e a coxa, a 1 cm da linha mediana, seguida de uma incisão na camada muscular, abrindo a cavidade peritoneal para posterior ligadura da trompa uterina e remoção dos ovários. Uma linha de algodão foi amarrada a tuba uterina, e só então a excisão do ovário pode ser realizada. Após esse procedimento recolocamos a tuba uterina na cavidade abdominal e realizamos a sutura do músculo, com linha absorvível, e posteriormente foi realizada a sutura da pele. O mesmo processo foi realizado no lado oposto. Ao final do procedimento, ainda sob o efeito da anestesia, os animais receberam 0,1 mL do antibiótico enrofloxacina 2,5 % (Flotril®, SP-Brasil), por via intramuscular e retornaram as gaiolas. As fêmeas do grupo SHAM foram submetidas ao mesmo procedimento cirúrgico, exceto a remoção dos ovários. O antibiótico foi administrado nos três dias seguintes a cirurgia.

### 3.3.3 Tratamento com Progesterona.

O tratamento com reposição de progesterona (Progesterona micronizada – Atymed) foi realizado durante período de 15 dias via injeções subcutâneas na concentração de 2 mg/kg/dia, para mimetizar concentrações fisiológicas do hormônio (Bernardis et al.,

2006). Os grupos que não receberam o tratamento com progesterona tiveram o mesmo volume administrado contendo somente veículo utilizado para diluir a progesterona (óleo de girassol). Os animais que foram tratados com progesterona receberam a primeira dose no mesmo dia da cirurgia de ovariectomia para evitar a baixa hormonal pós-cirurgia.

#### 3.3.4 Avaliação não Invasiva da Pressão arterial (Pletismografia de cauda)

A medida da pressão arterial sistólica (PAS) por pletismografia de cauda foi realizada no dia anterior aos procedimentos de reatividade vascular no Langendorff. Antes da realização dos registros foi necessário familiarizar os animais no equipamento (IITC INC/Life Science, 23924 Victory Blvd, Woodland Hills, Ca 91367-1253 USA) nos 3 dias anteriores a data do registro.

Para aquisição dos dados os animais foram acomodados em câmara aquecida, dentro de um contensor com um *cuff* de pulso pneumático acoplado na região proximal da cauda. Um esfigmomanômetro foi insuflado e desinsuflado automaticamente e o valor de PAS foi obtido por meio de sinais do transdutor acoplado a um computador como descrito por Baldo et al. (2011).

A temperatura foi controlada numa faixa entre 29 e 32 °C durante a coleta dos dados, que não extrapolaram o tempo de 20 minutos em que o animal permaneceu no equipamento. Os valores foram obtidos a partir de uma média de três aferições consideradas válidas sendo descartados os registros associados a interferências do movimento do animal.

#### 3.3.5 Estudos em Coração Isolado (Método Langendorff)

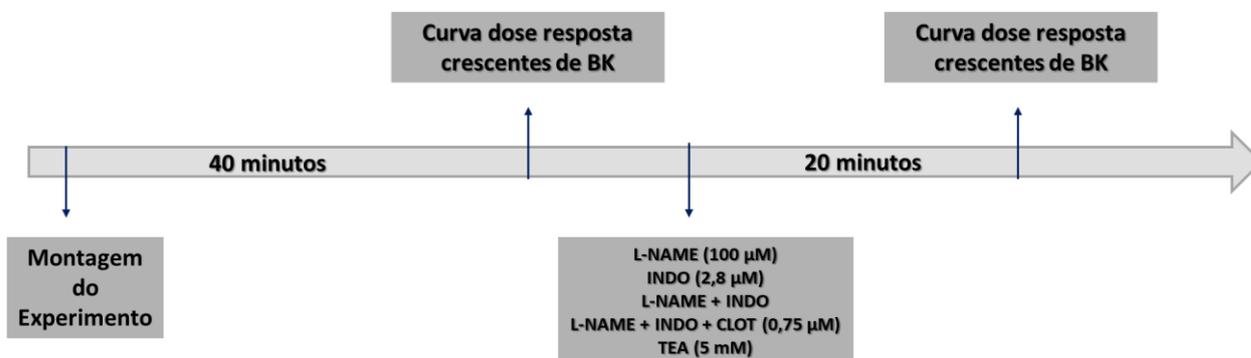
Neste experimento, investigamos a reatividade vascular do leito coronariano em resposta a doses de BK. Para tanto, após o final do tratamento, os animais foram anestesiados com quetamina (70 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e eutanasiados por decapitação para coleta de sangue. Imediatamente após a coleta sanguínea, esses animais tiveram a cavidade torácica aberta, o coração exposto e dissecado de suas conexões e rapidamente transferido para o aparelho de perfusão isolada por meio da canulação da aorta. Em seguida, a perfusão retrógrada foi realizada pelo método de Langerdorff modificado (Hugo Sachs Electronics, March-Hugstetten, Germany) sendo

que, para a perfusão foi utilizada uma solução nutritora composta de NaCl, 120 mM; CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O, 1,25 mM; KCl, 5,4 mM; MgSO<sub>4</sub> .7H<sub>2</sub>O, 2,5 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> .H<sub>2</sub>O, 2,0 mM; NaHCO<sub>3</sub> , 27,0 mM; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> , 1,2 mM; EDTA, 0,03 mM e glicose 11,0 mM, mantida a 37 °C por meio de um banho-maria, e continuamente pressurizada por mistura carbogênica (95 % O<sub>2</sub> e 5 % CO<sub>2</sub>) na câmara de saturação, mantendo um pH estável em 7,4. O fluxo coronariano foi mantido constante em 10 mL/min por uma bomba de rolete (Hugo Sachs, Germany).

A PPC basal foi avaliada por meio de um transdutor de pressão (AD Instrument MLT0380/A Reusable BP Transducer, Germany), conectado imediatamente próximo da cânula de perfusão aórtica, através da qual foi perfundido o leito coronariano, ligado a um sistema digital de aquisição de dados (PowerLab System - ADInstruments). Como o fluxo foi mantido constante em 10 mL/min, por meio da bomba de rolete, as alterações da PPC puderam ser diretamente relacionadas às mudanças na resistência vascular.

A pressão isovolumétrica do ventrículo esquerdo foi mantida por meio de um balão de látex que, ainda vazio, foi inserido no interior do ventrículo esquerdo (VE) por meio de uma cânula de aço conectada a um transdutor de pressão (AD Instrument MLT0380/A Reusable BP Transducer, Germany). Uma vez dentro do VE, o balão foi pressurizado, com água, com auxílio de uma seringa de vidro de forma a manter uma pressão diastólica intraventricular de 10 mmHg.

Após 40 minutos de estabilização da preparação de coração isolado, a PPC basal foi determinada e iniciado o estudo da reatividade coronariana por meio da construção de uma curva dose-resposta de BK (Sigma, St. Louis, MO) administrada *in bolus* (0,1 mL) em concentrações crescentes de (0,1 - 1000 ng) antes e após a perfusão com inibição individual ou combinada dos EDRFs, conforme protocolo experimental, bem como bloqueio dos canais para potássio.



**Figura 3:** Esquema representativo do protocolo experimental de reatividade vascular.

### 3.3.6 Protocolo Experimental:

#### Protocolo 1

Com objetivo de avaliar a participação do NO na resposta vasodilatadora da BK nos vasos coronarianos, um inibidor inespecífico da NOS, N<sup>ω</sup>-nitro-L-Arginina Metil Éster (L-NAME, 100 µM), foi adicionado à solução de perfusão durante pelo menos 20 minutos e a curva dose-resposta à BK foi realizada (Rouver et al., 2015).

#### Protocolo 2

Com objetivo de avaliar a participação dos prostanoídeos (ex: PGI<sub>2</sub>), na resposta vasodilatadora da BK nos vasos coronarianos, um inibidor inespecífico da enzima COX, indometacina (INDO, 2,8 µM), foi adicionado à solução de perfusão durante pelo menos 20 minutos e a curva dose-resposta à BK foi realizada (Rouver et al., 2015).

#### Protocolo 3

Com objetivo de avaliar a resposta vasodilatadora dos EDHFs induzida pela BK nos vasos coronarianos, foi realizada a inibição combinada das enzimas NOS e COX com L-NAME (100 µM) e INDO (2,8 µM) respectivamente. Ambos inibidores foram adicionados, simultaneamente, à solução de perfusão pelo menos 20 minutos antes da curva dose-resposta à BK foi realizada (Santos et al., 2004).

#### Protocolo 4

Com objetivo de avaliar a participação do endotélio na resposta vasodilatadora induzida por BK nos vasos coronarianos, foi realizada inibição combinada das enzimas NOS, COX e CYP com L-NAME (100  $\mu$ M), Indometacina (2,8  $\mu$ M) e clotrimazol (CLOT; 0,75  $\mu$ M) respectivamente. Todos inibidores foram adicionados, simultaneamente, à solução de perfusão pelo menos 20 minutos antes da curva dose-resposta à BK foi realizada (Rouver et al., 2015).

#### Protocolo 5

Para avaliar a participação dos canais para potássio na resposta vasodilatadora induzida por BK no leito coronariano, realizamos o bloqueio não específico dos canais para K<sup>+</sup> com tetraetilamônio (TEA, 5 mM). O TEA foi adicionado à solução de perfusão durante 20 minutos e a curva dose-resposta à BK foi realizada (Peixoto et al., 2017).

#### 3.3.7- Remoção e pesagem dos coxins de gordura

Após remoção do coração e coleta de sangue dos animais, foi realizada a abertura da cavidade abdominal, dessa forma expondo os órgãos internos dando acesso aos coxins gordurosos, para sua extração. Inicialmente, para retirar a gordura mesentérica, o intestino foi separado do estômago e cuidadosamente toda a gordura que envolve o intestino foi removida. Em seguida, a gordura parametrial foi isolada dos tecidos adjacentes e cuidadosamente removida. Para retirar a gordura perirenal, os rins foram isolados e a gordura removida do órgão, as glândulas adrenais foram extraídas da gordura perirenal. Em seguida foi realizada a remoção da gordura retroperitoneal. Após a retirada dos coxins de gordura, os mesmos foram pesados em uma balança de precisão (AUW-220D – Shimadzu, SP, Brasil).

#### 3.3.8 - Quantificação de ânions superóxido por marcação com dihidroetídeo (DHE)

O protocolo de dissecação de artérias coronárias foi realizado de acordo com Debortoli et al. (2017). Os animais foram anestesiados com quetamina (70 mg/Kg,) e xilazina (10 mg/Kg). O tórax foi aberto, o coração retirado e mantido em solução nutritiva modificada, composta de: NaCl, 120 mM; CaCl<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O, 1.25 mM; KCl, 5.4 mM; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 2.5 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 2.0 mM; NaHCO<sub>3</sub>, 27.0 mM; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.2 mM; EDTA, 0.03 mM e glicose 11.0 mM. O ramo descendente anterior da artéria coronária esquerda e septal foram isolados, com o auxílio de um estereomicroscópio

(BEL Photonics, SZ-B LED, SP, Brasil), livres de tecido muscular ventricular circundante e congelados em líquido de crioproteção (Tissue Tek - OCT) a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  até a análise.

Após realização dos cortes das artérias coronárias, as lâminas foram incubadas com a sonda dihidroetidina (DHE; Invitrogen™), que é permeável à membrana celular. Postula-se que o DHE reaja com o ânion superóxido e forme dois produtos fluorescentes, etídio e 2-hidroxi-etídio que se intercalam com o DNA da célula e podem ser visualizados com a fluorescência vermelha. Sendo assim, por meio de um microscópio de fluorescência com comprimentos de onda de excitação e emissão de 518 e 605 nm, respectivamente, esta sonda é utilizada como um marcador indireto da presença de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ .

O protocolo foi realizado de acordo com Silva et al. (2016), com algumas modificações. Brevemente, foram incubadas 2 lâminas para cada animal ao abrigo da luz. A primeira lâmina foi incubada com DHE ( $5\text{ }\mu\text{M}$ ) por 30 minutos, em  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para investigar a produção basal de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . A segunda lâmina foi incubada com DHE + Tiron ( $10\text{ }\mu\text{M}$ ), por 30 minutos, sendo um controle negativo da produção basal de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ .

Foram obtidas imagens digitais na objetiva de 40x, usando o microscópio de fluorescência Zeiss Axio Imager - Apotome (Germany) do Centro de Aquisição e Processamento de Imagens do ICB/UFMG. As imagens foram analisadas no programa Image J 1.48, usando a função de análise de densidade óptica de fluorescência da área de interesse (ROI manager). Dez áreas de interesse foram selecionadas em cada corte analisado, sendo que 3 cortes de cada animal foram analisados. Foi utilizado número amostral de 4 animais por grupo experimental.

### 3.3.9 Quantificação de peróxido de hidrogênio por marcação com diclorofluoresceína (DCF)

A análise da produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  nas artérias coronárias por microscopia de fluorescência foi realizada de maneira indireta, por meio da utilização da sonda 2',7' diclorodihidrofluoresceína-diacetato (DCF-DA; Invitrogen™). O DCF-DA é uma sonda permeável à membrana celular e não fluorescente. Contudo na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , este composto é oxidado no interior da célula e produz o composto fluorescente 2',

7'-diclorofluoresceína (DCF) que permanece intracelular. Os comprimentos de onda de excitação e emissão utilizados foram de 480 e 530 nm, respectivamente.

Esse protocolo foi descrito anteriormente por Somberg et al. (2017), com algumas modificações. Resumidamente, foram incubadas 2 lâminas para cada animal ao abrigo da luz. A primeira lâmina foi incubada com DCF (10  $\mu$ M) por 30 minutos, em 37 °C, para investigar a produção basal de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A segunda lâmina foi incubada DCF + catalase (1000 u/mL) pelo mesmo tempo, sendo um controle negativo para a produção basal de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Imagens digitais foram obtidas na objetiva de 40x, usando o microscópio de fluorescência Zeiss Axio Imager - Apotome (Germany) do Centro de Aquisição e Processamento de Imagens do ICB/UFMG. As imagens foram analisadas no programa Image J 1.48, usando a função de análise de densidade óptica de fluorescência da área de interesse (ROI manager). Dez áreas de interesse foram selecionadas em cada corte analisado, sendo que 3 cortes de cada animal foram analisados. Foi utilizado número amostral de 4 animais por grupo experimental.

### 3.3.10 Análise do conteúdo proteico (*Western Blotting*)

Coronárias de ratas dos grupos SHAM, OVX e OVX P4 foram coletadas, o ramo descendente anterior da artéria coronária esquerda e o ramo septal foram isolados com o auxílio de um microscópio de dissecação (BEL Photonics, SZ-B LED, SP, Brasil), imediatamente foram congeladas e armazenadas em freezer -80 °C. Em seguida cada coronária foi macerada em 25  $\mu$ L de RIPA suplementado com inibidores de protease e de fosfatase (Tris-HCl 65.2 mmol/L; NaCl 154 mmol/L; NP-40 1 %; deoxicolato de sódio 0.25 %; EDTA 0.8 mmol/L; PMSF 1 mM; ortovanadato de sódio 10mM; fluoreto de sódio 100 mM; pirofosfato de sódio 10 mM e inibidor de protease). Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 rpm, por 10 minutos a 4 °C, para a remoção de debris.

A concentração proteica das amostras foi determinada por método colorimétrico (*Bio Rad DC Protein assay, USA*). Alíquotas do lisado, contendo 20  $\mu$ g de proteína total, foram misturadas com tampão de amostra para concentração final de 1x. Em seguida, foram fervidas por 5 minutos e aplicadas no gel. A separação de proteínas foi feita por eletroforese em gel de poliacrilamida 10 %, a 4 °C, por aproximadamente 2 horas, a 150 V.

O padrão de peso molecular utilizado foi o *Prestained Protein Ladder – extra broad molecular weight* (Abcam, USA). Após a corrida do gel, as proteínas foram eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose e esta foi bloqueada com leite desnatado 5% em TBS-T (0,13M NaCl; 20mM tris; pH 7,6; 0,1% tween 20) por duas horas. Em seguida, a solução de bloqueio foi retirada e as membranas foram lavadas com TBS-T 6 vezes por 5 minutos. Depois foram incubadas com anticorpo primário diluído em TBS-T com BSA 3%.

Foram usados anticorpo de camundongo para eNOS (diluição 1:1000) e para gp91phox (diluição 1:1000) e anticorpo de coelho para Akt (diluição 1:1000) (Sigma, St. Louis, MO). As membranas ficaram incubadas overnight, a 4°C. Seguiram-se 6 lavagens de 5 minutos com TBS-T. Os anticorpos secundários conjugados com peroxidase anti-camundongo (1:2000) ou anti-coelho (1:2000) foram diluídos em BSA 1% e aplicados a membrana por uma hora à temperatura ambiente. Depois foram feitas mais 6 lavagens de 5 minutos e então procedeu-se a detecção por quimioluminescência utilizando-se o reagente luminol (Santa Cruz biotechnology) seguida de exposição a filme radiográfico. A quantificação das proteínas foi feita por densitometria, utilizando-se o software ImageJ.

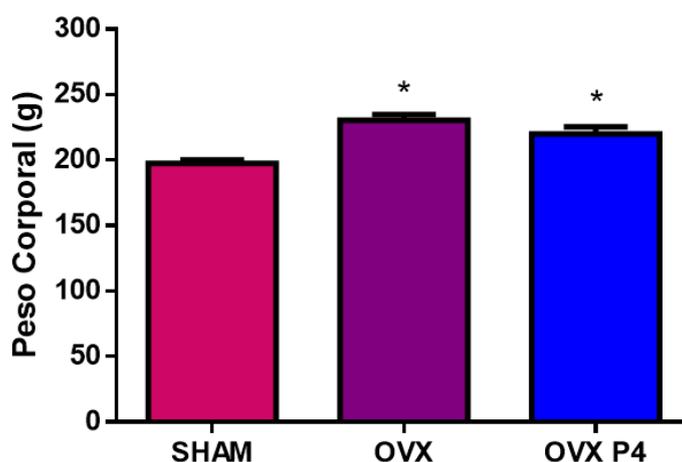
### 3.4 ANÁLISES DOS DADOS

A análise dos dados foi realizada com auxílio do programa estatístico Graph-Pad Prism 6. A normalidade dos dados foi avaliada por meio do teste de Shapiro-Wilk. Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). A comparação entre os grupos foi realizada por meio da análise de variância de uma via (one-way ANOVA). Para a análise da resposta vasodilatadora à BK, foi utilizada a análise de variância de duas vias (two-way ANOVA). Nos dois casos, o teste *post hoc* utilizado foi o de Tukey, e o nível de significância estabelecido foi  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 PARÂMETROS PONDERAIS

O peso corporal foi maior no grupo OVX ( $230 \pm 15$  g) do que no grupo SHAM ( $197 \pm 8$  g). No entanto, o tratamento com progesterona não impediu o aumento de peso induzido pela ovariectomia no grupo OVX P4 ( $220 \pm 18$  g).



**Figura 4:** Peso corporal de ratas SHAM (n = 20), OVX (n = 20), OVX P4 (n = 20). Os valores foram expressos com média  $\pm$  EPM, \*p < 0,05 comparado com SHAM. As análises foram realizadas por ANOVA de uma via seguido de *post hoc* de Tukey.

Na tabela 1 podemos observar que o peso corporal corrigido pelo comprimento da tíbia teve o mesmo comportamento que o peso corporal em g (Figura 1), onde ocorreu um aumento do peso corporal devido a ovariectomia (SHAM =  $56,7 \pm 2$  para OVX =  $65,8 \pm 4$  g) não revertido pelo tratamento com OVX P4 ( $60,7 \pm 5$  g). O peso do útero reduziu após a ovariectomia (SHAM =  $0,32 \pm 0,2$ , OVX =  $0,11 \pm 0,6$  mg/g), confirmando a ausência de hormônios produzidos pelos ovários. Contudo, o tratamento com progesterona não impediu essa redução de peso (OVX P4 =  $0,13 \pm 0,2$  mg/g). A ovariectomia levou ao aumento de todos os coxins de gordura, o tratamento com progesterona foi capaz de prevenir esse aumento.

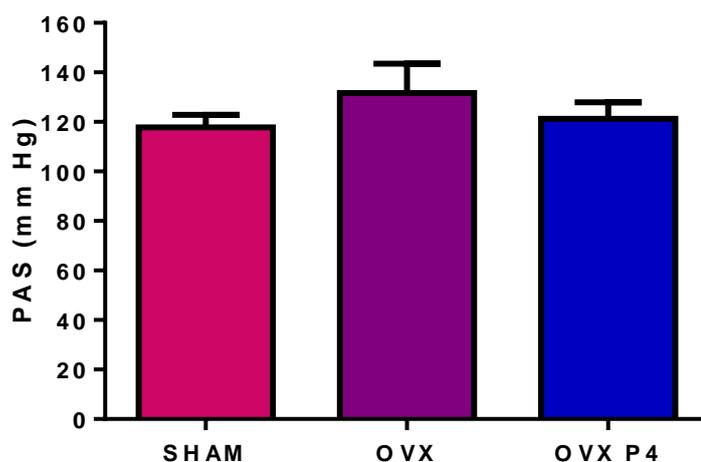
**Tabela 1:** Peso corporal relativo, peso do útero e do útero relativo, peso dos coxins de gordura.

<b>Parâmetros</b>	<b>SHAM</b>	<b>OVX</b>	<b>OVX P4</b>
Peso inicial (g)	171,7 ± 13	175,7 ± 11	177,7 ± 15
Peso corporal Final (g)	197,5 ± 8	230,4 ± 15*	220 ± 18*
Peso corporal corrigido pela tibia	56,7 ± 2	65,8 ± 4 *	60,7 ± 5*
Peso útero seco (mg)	67 ± 4	30 ± 2*	30 ± 4*
Peso relativo do útero seco (mg/g)	0,32 ± 0,2	0,11 ± 0,6*	0,13 ± 0,2*
<b>Peso da gordura</b>			
Mesentérica (mg/g)	33,2 ± 3	38,4 ± 2*	30 ± 3*
Perirenal (mg/g)	5,2 ± 1	10, 2± 1*	5,6 ± 0,7
Retroabdominal (mg/g)	77,7 ± 7	93,4 ± 1*	73,9 ± 8
Parametrial (mg/g)	11,1 ± 2	12,6 ± 1	13,2 ± 2

Todos os valores foram expressos com média ± EPM. \*p < 0,05, comparado com o grupo SHAM. n= 10 animais por grupo.

#### 4.2 PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA (PAS)

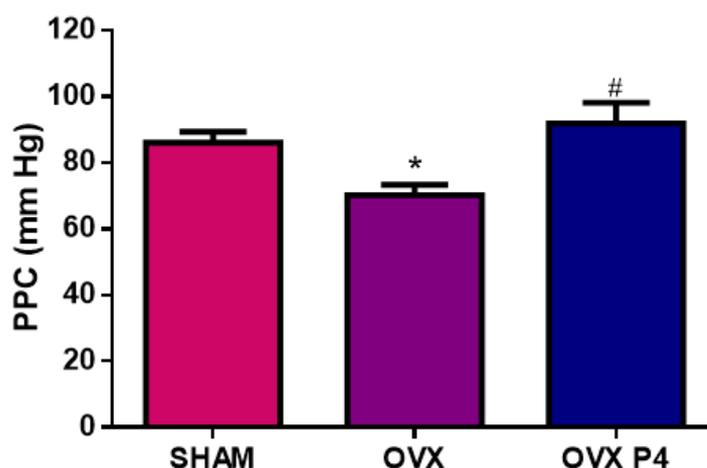
Na figura 2 pode ser observado valores referentes a PAS nos grupos estudados, assim, nota-se que a ovariectomia, bem como o tratamento não alteraram os valores da PAS. SHAM (117,8 ± 5 mmHg), OVX (131 ± 11 mmHg), OVX P4 (121,2 ± 6 mmHg).



**Figura 5:** Pressão de perfusão coronariana (PPC) basal de ratos normotensos nos grupos: SHAM (n = 15); OVX (n = 15); OVX P4 (n = 15). Os valores foram expressos com média  $\pm$  EPM. As análises foram realizadas por ANOVA de uma via seguida pelo *post hoc* de Tukey.

#### 4.3 PRESSÃO DE PERFUSÃO CORONARIANA (PPC)

A PPC foi reduzida no grupo OVX (SHAM =  $88 \pm 3$ ; OVX =  $70 \pm 8$ ; OVX P4 =  $96 \pm 8$  mmHg), como mostrado na figura 3. A diminuição dos hormônios sexuais séricos induzida pela ovariectomia promoveu uma diminuição da PPC basal, e o tratamento com P4 foi capaz de prevenir essa redução.



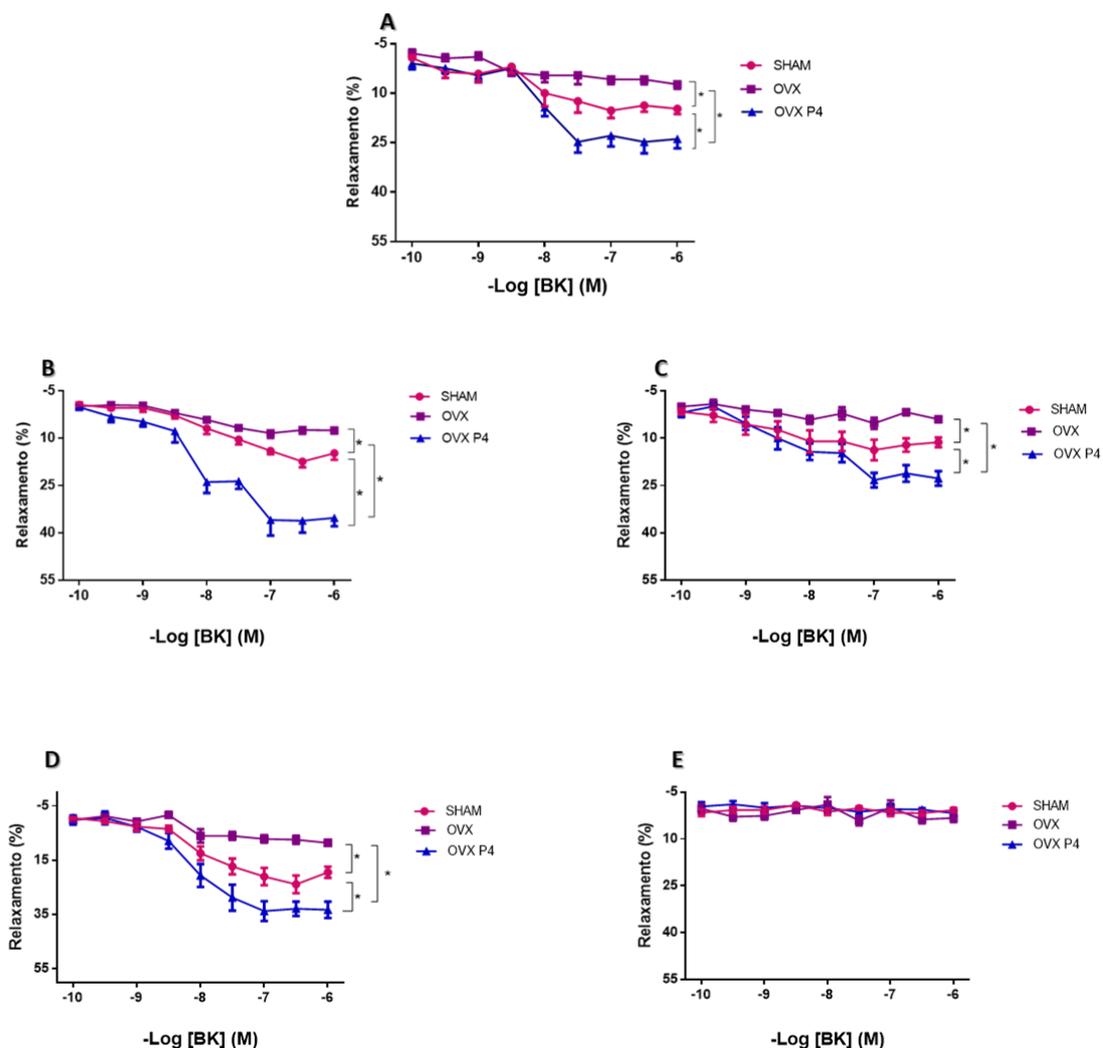
**Figura 6:** Pressão de perfusão coronariana (PPC) basal de ratas normotensas dos grupos: SHAM (n = 15); OVX (n = 15); OVX P4 (n = 15). Os valores foram expressos com média  $\pm$  EPM, \* $p < 0,05$  comparado com SHAM, # $p < 0,05$  comparado com OVX. As análises foram realizadas por ANOVA de uma via seguida de *post hoc* de Tukey.

#### 4.4 REATIVIDADE VASCULAR CORONARIANA

Ao analisarmos a funcionalidade do endotélio por meio da resposta vasodilatadora induzida pela bradicinina pode-se observar que nossos dados sugerem aumento substancial na vasodilatação dependente do endotélio nas ratas tratadas com P4 (SHAM =  $14,7 \pm 1,6$  %; OVX =  $8,3 \pm 1,3$  % OVX P4 =  $23,9 \pm 2,8$  %), mostrando que a progesterona não foi apenas capaz de impedir a redução do relaxamento induzidos pela ovariectomia, mas também de potencializar a vasodilatação induzida pela BK nesse leito se compararmos com o grupo SHAM (figura 4A).

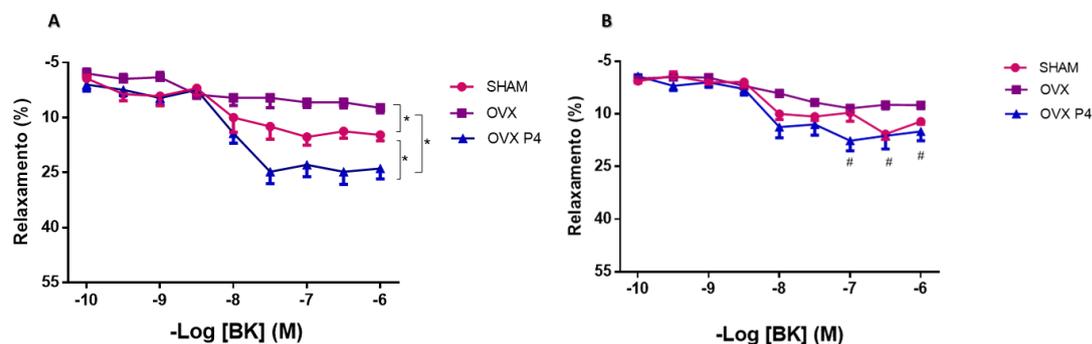
Após a inibição inespecífica da enzima NOS com L-NAME (figura 4B), a resposta vasodilatadora induzida por BK foi potencializada no grupo OVX P4 ( $23,9 \pm 2,8$  % para  $35,2 \pm 2,6$  %). No entanto, após a inibição da via prostanoide (figura 4C), a resposta relaxante à BK também foi maior no grupo OVX P4 (SHAM:  $11,3 \pm 1,5$  %; OVX:  $4 \pm 0,7$  %; OVX P4:  $26,8 \pm 0,4$  %), semelhante ao observado na curva de bradicinina (figura 4A). Estes resultados sugerem que a via prostanoide não participa na vasodilatação induzida por BK.

Em relação à inibição combinada das enzimas NOS e COX (figura 4D), o grupo tratado com progesterona apresentou maior resposta relaxante (SHAM =  $19,4 \pm 2$  %; OVX =  $8,5 \pm 1,1$  %; OVX P4 =  $33,2 \pm 3$  %). Esse resultado foi semelhante ao encontrado com a inibição individual da NOS, sugerindo que a principal via envolvida nessa resposta é a via do NO. Quando a inibição combinada das enzimas NOS, COX e CYP foi realizada, a resposta vasodilatadora induzida pela BK foi abolida em todos os grupos estudados (figura 4E), mostrando que, como esperado, a vasodilatação observada neste estudo era dependente do endotélio.



**Figura 7:** Resposta vasodilatadora a concentrações crescentes de bradicinina (BK 10<sup>-10</sup> – 10<sup>-6</sup> M). Curva de bradicinina antes (A, n = 15) e após inibição com L-NAME (B, n = 8), Indometacina (C, n = 8), L-NAME + Indometacina (D, n = 8) e LNAME + Indometacina + Clotrimazol (E, n = 7). Os valores foram expressos com média ± EPM \*p < 0,05 comparado a diferença entre os grupos. As análises foram realizadas por ANOVA de duas vias seguido de post hoc de Tukey.

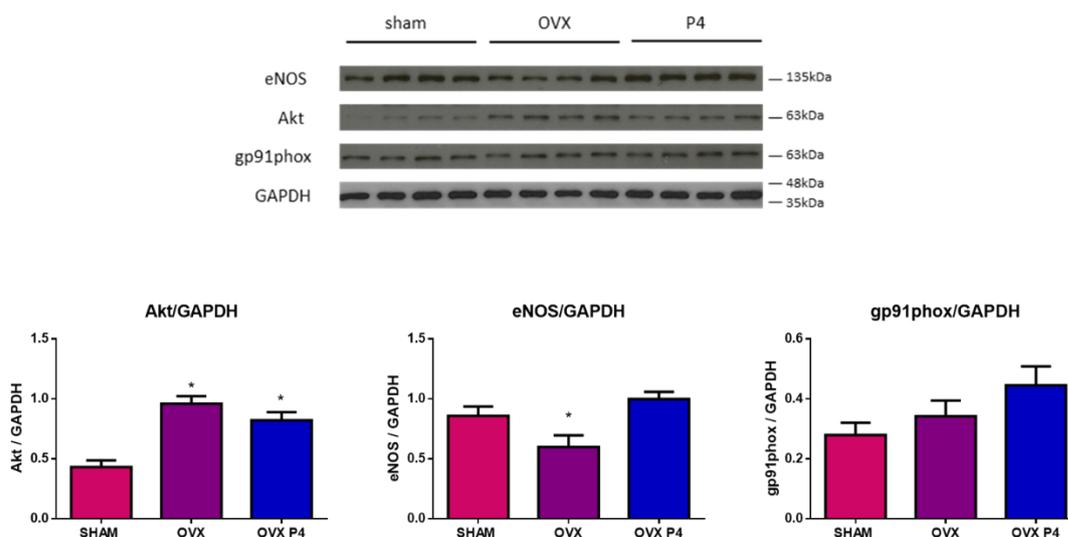
Também analisamos a participação dos canais para K<sup>+</sup> na resposta vasodilatadora induzida por BK, realizando o bloqueio não específico com tetraetilamônio (TEA). Resposta vasodilatadora induzida foi reduzida nos grupos OVX (14,7 ± 1,6 vs 12,1 ± 0,7) e OVX P4 (23,9 ± 2,8 vs 15 ± 2,6) (Figura 5).



**Figura 8:** Resposta vasodilatadora a concentrações crescentes de bradicinina (BK  $10^{-10}$  –  $10^{-6}$  M) antes (A) e após o bloqueio com TEA (B), nos grupos: SHAM (n = 8); OVX (n = 8); OVX P4 (n = 8). Os valores foram expressos com média  $\pm$  EPM. #p < 0,05 quando comparado do grupo OVX. As análises foram realizadas por ANOVA de duas vias seguido de *post hoc* de Tukey.

#### 4.5 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNA (WESTERN BLOTTING)

Ao analisarmos a expressão protéica da eNOS, é possível observar na figura 7 que a sua expressão está reduzida no grupo OVX. No entanto a Akt, uma proteína que faz parte de uma das vias de formação de NO, se apresentou aumentada nos grupos OVX e OVX P4. No entanto, não houve diferença na expressão da subunidade da NADPH oxidase (gp91phox) entre os grupos.

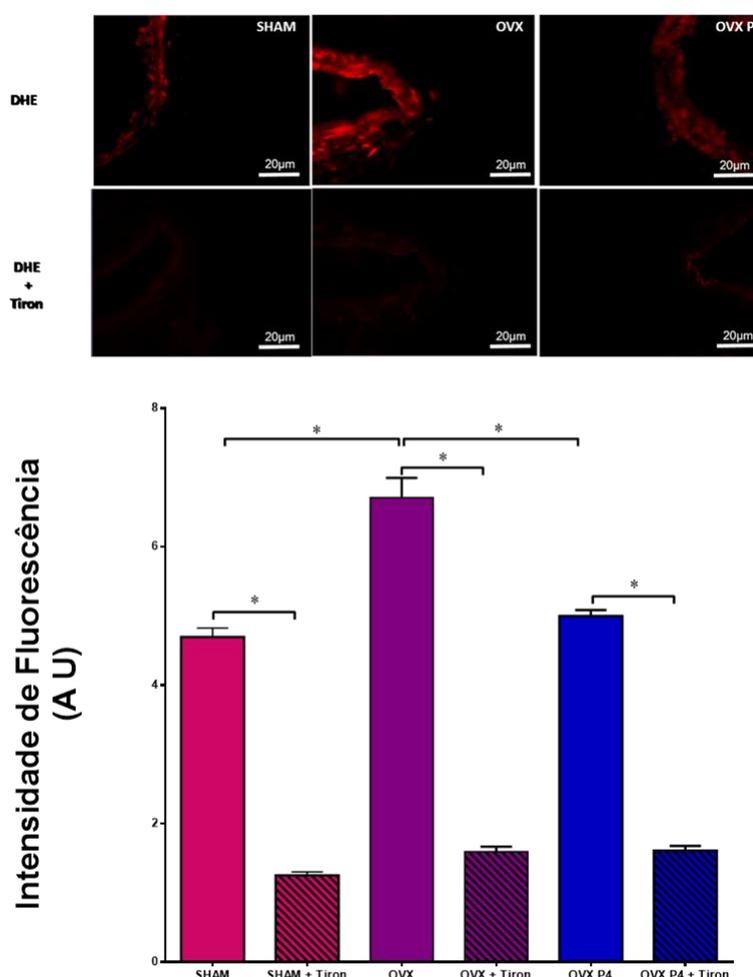


**Figura 9:** Análise da expressão protéica nos grupos: SHAM, OVX e OVX P4. A figura mostra a expressão proteica da eNOS, Akt, e gp91phox. Cada amostra foi obtida a partir de artérias coronária septal e as análises de diferentes proteínas foram realizadas nos mesmos géis. Os dados foram

expressos como média  $\pm$  EPM;  $n = 4$  por grupo. Utilizamos ANOVA de uma via seguida do teste *post hoc* de Tukey. \* $p < 0,05$  em comparação com o grupo SHAM.

#### 4.6 ANÁLISE DO ÂNION SUPERÓXIDO

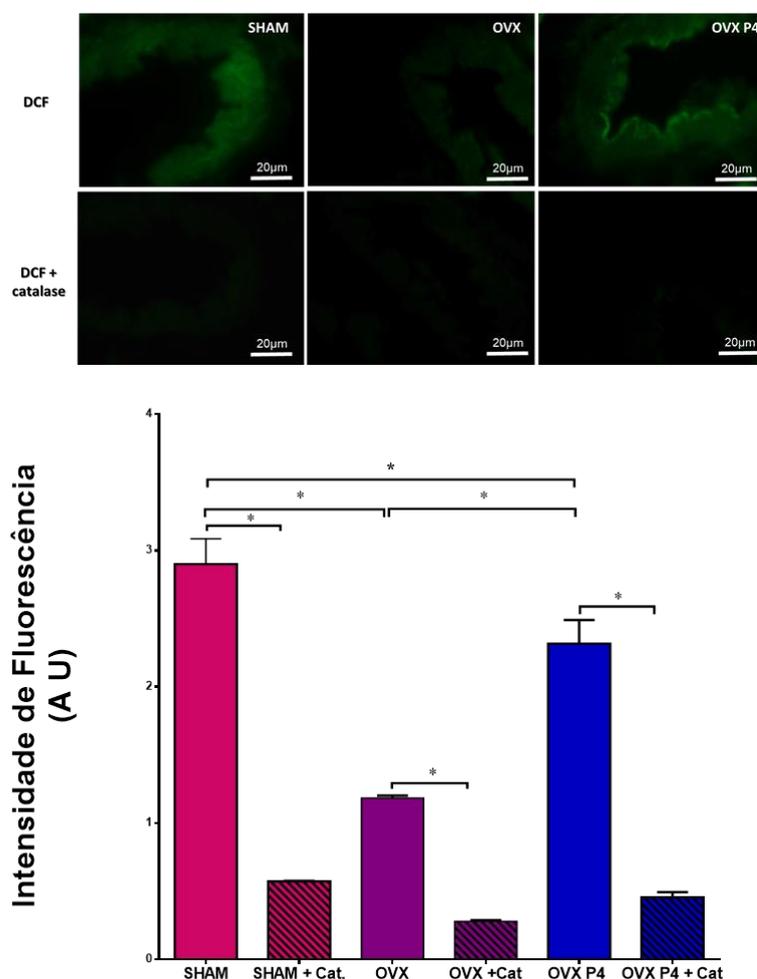
A análise da fluorescência produzida pela oxidação com dihidroetídio em artérias coronárias revelou fluorescência intensa no grupo OVX quando comparado com os animais SHAM e OVX P4. Isso mostra que o tratamento com P4 foi capaz de prevenir o aumento da produção de ânion superóxido.



**Figura 10:** Influência do tratamento com progesterona na produção de ânion superóxido nas artérias coronárias. Os painéis indicam intensidade de fluorescência (vermelho) nas artérias coronárias dos ratos dos grupos SHAM, OVX e OVX P4 utilizando coloração com di-hidroetídio (DHE). O gráfico de barras indicando a fluorescência média de DHE (UA: unidades arbitrárias) ( $n = 4$ ). Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$ . As análises foram realizadas por ANOVA uma via seguida pelo *post hoc* de Tukey. Barra de escala: 20  $\mu$ m.

#### 4.7 ANÁLISE DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

Ao analisarmos a fluorescência produzida pela oxidação com diclorofluoresceína em artérias coronárias observamos que o grupo SHAM apresentou maior fluorescência que os demais grupos. Podemos observar que o tratamento com P4 minimizou a redução da produção de peróxido de hidrogênio induzida pela ovariectomia.



**Figura 11:** Influência do tratamento com progesterona na produção de peróxido de hidrogênio nas artérias coronárias. Os painéis indicam a intensidade de fluorescência (verde) nas artérias coronárias dos ratos dos grupos Sham, OVX e OVX P4 usando coloração com 2', 7'-diclorofluoresceína (DCF). O gráfico de barras indicando a fluorescência média do DCF (UA: unidades arbitrárias) (n = 4). Os

dados foram expressos como média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$ . As análises foram realizadas por ANOVA uma via seguido pelo *post hoc* de Tukey. Barra de escala: 20  $\mu\text{m}$ .

## 5. DISCUSSÃO

O principal achado desta pesquisa é que o tratamento com P4 foi eficaz em prevenir a redução da vasodilatação coronariana dependente do endotélio induzida pela BK causada pela deficiência hormonal. É importante destacar que o grupo tratado com a P4 teve maior resposta vasodilatadora comparada ao grupo SHAM. Além disso, a P4 preveniu, parcialmente, o estresse oxidativo proveniente da ovariectomia.

Além da reatividade vascular analisamos também a influência do tratamento com P4 sobre o peso corporal e tecido adiposo, uma vez que vários estudos (Anderson et al., 2001; Price et al., 1998; Roncari; Van, 1978) sugerem que os hormônios sexuais podem ser considerados moduladores importantes na deposição de tecido adiposo, por meio regulação da proliferação e/ou diferenciação de pré-adipócitos, bem como lipogênese e/ou lipólise de adipócitos maduros.

Observamos que o peso corporal aumentou no grupo OVX, e o tratamento de quinze dias não impediu esse aumento. Vários autores demonstraram o aumento do peso em ratas ovariectomizadas, inclusive associado a uma série de alterações metabólicas (Latour et al, 2001; Shinoda et al, 2002; Corriveau et al, 2008; Xu et al, 2008; Zoth et al, 2010; Pighon et al, 2011). O aumento de peso corporal do grupo OVX teve relação com aumento dos coxins de gordura. O mesmo não aconteceu com o grupo OVX P4, apesar do peso corporal deste grupo ser maior que o SHAM, não houve diferença entre o peso dos coxins de gordura entre os dois grupos. Esse resultado pode ter relação com o fato de a progesterona provocar aumento na deposição de gordura subcutânea (Wade; Gray, 1979). A reposição com E2 após a ovariectomia impede esse aumento (Richard, 1986), no entanto a reposição com P4 não tem o mesmo resultado (Wade; Gray, 1979).

Uma outra observação importante, a ser destacada entre os resultados, foi a existência de uma diferença na pressão de perfusão coronariana (PPC) basal nos grupos SHAM e OVX P4 comparado ao grupo OVX. O tratamento com P4 foi capaz de impedir a redução da PPC basal induzida pela ovariectomia, sugerindo, assim, que os hormônios sexuais femininos modulem a PPC basal. Em estudos realizados pelo nosso grupo, a PPC basal de fêmeas foi maior que a de machos (Moysés et al., 2001). Acredita-se que a maior PPC nas fêmeas possa estar relacionada ao efeito cardioprotetor, uma vez que, em fêmeas gonadectomizadas, a PPC basal das

mesmas se igualou a de machos (Moysés et al., 2001). Santos et al. (2016) sugere que uma PPC aumentada permita uma maior vasodilatação quando o suprimento de oxigênio e/ou nutrientes é reduzido. Os motivos dessas diferenças, ainda não foram completamente elucidados, entretanto o estrogênio atua sobre o sistema renina-angiotensina aumentando de maneira indireta a atividade da angiotensina II, o que poderia modular o controle do tônus coronariano (Xu et al., 2008). Além disso, sabe-se que o estrogênio também pode promover o aumento dos níveis de cálcio por meio da ativação do canal de cálcio do tipo L por um mecanismo molecular não genômico, contribuindo para o aumento da PPC (Figuroa-Valverde et al. 2011). Talvez a progesterona possa ter um papel semelhante ao do estrogênio na modulação do tônus coronariano, no entanto, essa questão precisa ser investigada.

É sabido que a deficiência de hormônios sexuais pode ocasionar estresse oxidativo, e conseqüentemente a diminuição da biodisponibilidade do NO vascular (Kang et al., 2011; Yung et al., 2011). Isso leva ao aumento da resistência vascular sistêmica e, assim, aumento da pressão arterial (Vaziri, 2004). Entretanto, em nosso estudo não foi observada diferença na PAS entre os grupos.

Em relação a resposta induzida por BK, observamos que o grupo tratado com P4 teve uma resposta vasodilatadora maior que o grupo SHAM. É importante destacar que o tratamento com P4 foi realizado com o intuito de mimetizar concentrações fisiológicas do hormônio conforme o protocolo realizado por Bernardis et al. (2006). Portanto, uma diferença importante entre o grupo SHAM e o OVX P4 é a diminuição do estrogênio circulante no grupo OVX P4. Essa resposta sugere que a progesterona também parece modular positivamente a síntese de vasodilatadores endoteliais, ação que é geralmente atribuída apenas ao estrogênio, visto que a BK promove suas ações vasodilatadoras via endotélio. Inicialmente ocorre a interação da BK com seu receptor endotelial (B2), que, posteriormente, promove liberação de NO, PGI<sub>2</sub> e EDHF (O'Kane et al., 1994). Logo, a resposta vasodilatadora maior induzida por BK no grupo OVX P4 poderia indicar uma maior produção/liberação de vasodilatadores endoteliais.

O relaxamento maior induzido por BK no grupo OVX P4 sugere que a P4 exerce modulação negativa a ação do E2 em induzir a formação de vasodilatadores, e vice-versa. Num estudo utilizando artérias coronárias de cadelas ovariectomizadas e tratadas com estrogênio, progesterona, ou os dois hormônios combinados, em uma

curva dose resposta a acetilcolina, o grupo tratado apenas com estrogênio demonstrou a melhor resposta vasodilatadora, seguido do grupo tratado com progesterona e o grupo com tratamento combinado dos dois hormônios teve a menor resposta vasodilatadora. Esse estudo sugere que pode haver uma interação negativa entre os dois hormônios, de modo que, ocorre uma diminuição no efeito vasodilatador quando da presença endógena ou pela administração conjunta de ambos (Miller; Vanhoutte 1991).

Sabe-se que o E2 exerce efeito antioxidante na vasculatura, no entanto, o tratamento combinado com P4 pode reduzir este efeito (Wassmann et al., 2005). Contudo, não podemos classificar essa interação entre os dois hormônios como deletéria ao vaso. Possivelmente, essa interação tem relação com homeostase e equilíbrio do tônus do vaso, uma vez que mulheres que estão no período reprodutivo têm risco cardiovascular menor quando comparado com homens na mesma idade ou mulheres na pós-menopausa (Mccubbin et al. 2002; Benjamin et al., 2019).

Dentre os fatores endoteliais envolvidos no relaxamento induzido pela BK nos grupos estudados, analisamos a participação do NO, PGI<sub>2</sub> e do EDHF, por meio de inibições da síntese desses mediadores. Após realizarmos a inibição da via de NO, a resposta à BK no grupo OVX P4 foi potencializada, mostrando que o NO parece modular negativamente a resposta vasodilatadora induzida por BK. Existem evidências que a progesterona estimula a síntese de NO, num estudo de Chataigneau et al. (2004), o tratamento com P4 em ratas ovariectomizadas restaurou a homeostase endotelial nos anéis da artéria mesentérica por meio da síntese endotelial de NO. No entanto em nosso trabalho pudemos observar que de alguma forma o processo de síntese de NO estava reduzindo a resposta vasodilatadora induzida por BK.

Esse aumento na resposta vasodilatadora no grupo OVX P4 poderia ter relação com a inibição da NOS que por si só produz EROs. Uma vez que esta enzima é inibida, independente da isoforma, a produção de ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) decorrente da própria ação da NOS, quando sintetiza NO a partir de L-arginina (Shimokawa, 2010), é também inibida. Dessa forma, talvez a redução da disponibilidade do O<sub>2</sub><sup>•-</sup> poderia estar potencializando a resposta vasodilatadora nesse grupo.

Após verificada a participação da via de formação de NO na vasodilatação induzida pela BK, foi realizada a inibição inespecífica da via de formação dos prostanoídes, tendo em vista que a progesterona modula a atividade da COX (Simoncini et al., 2004, Cutini et al., 2014). Entretanto, em nosso estudo, não observamos a participação desta via na resposta vasodilatadora à BK. O que nos levou a investigar a participação de outros mediadores, como EDHFs, na resposta vasodilatadora à BK.

A vasodilatação independente de NO e COX é observada em numerosos leitos vasculares, e é tipicamente atribuída aos EDHFs, uma classe de fatores que causam vasodilatação por hiperpolarização do músculo liso vascular. Embora existam outros mecanismos, a maioria dos EDHFs atua estimulando os canais para potássio ativado por cálcio ( $K_{Ca}$ ). Canais  $K_{Ca}$  ( $BK_{Ca}$ ) de grande condutância são encontrados na membrana do músculo liso e hiperpolarizam diretamente o músculo liso, enquanto canais para  $K_{Ca}$  de condutância intermediária ( $IK_{Ca}$ ) e os de baixa condutância ( $SK_{Ca}$ ) são encontrados na membrana da célula endotelial. A hiperpolarização das células endoteliais se espalha através de junções comunicantes para a musculatura lisa, contribuindo também para a sua vasodilatação (Félétou; Vanhoutte, 2009)

O EDHF é sugerido como um mecanismo crucial compensatório ou de reserva para a manutenção do fluxo sanguíneo, quando a síntese ou ação do NO é reduzida como em situações patológicas (Garland et al., 1995). No leito coronariano estudos têm demonstrado que os EETs, são os candidatos mais prováveis a EDHF nestes vasos (Fisslthaler et al., 2000, Edwards et al., 2000; Fleming, 2002).

Portanto, para analisarmos a participação dos EDHFs, realizamos a inibição combinada da síntese NO, prostanoídes e dos EETs, conseqüentemente, a resposta vasodilatadora de BK no leito vascular coronariano foi completamente abolida em todos os grupos estudados. Esses dados fornecem evidências da participação de EDHF no relaxamento induzido pela BK, bem como confirma que os EETs atuam como EDHF neste leito.

Uma vez que os canais para  $K^+$  podem participar do relaxamento proveniente dos mediadores endoteliais, avaliamos a participação desses canais por meio da utilização de tetraetilamônio (TEA), que é um bloqueador não específico de canais para  $K^+$  quando usado a altas concentrações (Fozard; Manley, 2001). Na presença do TEA, o

efeito vasodilatador produzido por BK foi reduzido significativamente nos grupos SHAM e OVX P4 após o bloqueio. Estes resultados sugerem que a ativação de canais para  $K^+$  operado por  $Ca^{+}$  parecem ser a principal via mediadora da vasodilatação induzida pelos EETs no leito coronariano.

Pudemos observar o grupo OVX apresentou uma resposta vasodilatadora reduzida em todos os protocolos realizados, o que pode ter relação com um quadro de estresse oxidativo, onde ocorre o aumento de produção EROs dentre elas o peroxinitrito, que poderia inibir a atividade de canais  $K_{Ca}$  nas células do músculo liso vascular, contribuindo para a diminuição do relaxamento mediado por EDHF (Liu et al., 2002). Portanto, investigamos a capacidade da progesterona em impedir uma possível disfunção endotelial promovida pela ovariectomia, uma vez que a resposta vasodilatadora foi reduzida após a ovariectomia, e potencializada no grupo tratado com P4. Dessa forma, realizamos análises para entendermos a modulação da P4 na geração de espécies reativas de oxigênio no leito coronariano.

Ao investigar a expressão da NADPH oxidase, não encontramos diferença na expressão da subunidade gp91phox entre os grupos. Talvez o tempo de tratamento de 15 dias não tenha sido suficiente para promover alguma alteração, visto que no estudo de Wassmann et al. (2005), onde o tratamento realizado por quatro semanas, em camundongo, promoveu o aumento da expressão NADPH oxidase. A NADPH oxidase é um complexo enzimático, e é o principal responsável pela formação de ânion superóxido, o qual possui grande citotoxicidade e tem atividade envolvida na gênese de vários processos fisiopatológicos (Cai e Harrison, 2000).

O tratamento com progesterona foi capaz de impedir a redução na expressão da eNOS, induzida pela ovariectomia. A progesterona tem demonstrado elevar a síntese de NO nas células endoteliais vasculares devido a ativação das vias PI3K / Akt e MAPK por meio de suas ações não genômicas (Simoncini et al., 2004, Pang; Thomas, 2015). Em nosso estudo, podemos observar que o tratamento com P4 parece aumentar a ativação dessa via por ação genômica.

No grupo ovariectomizado parece ter ocorrido o aumento da atividade da via PI3K/Akt, entretanto esse aumento parece ter relação com uma possível disfunção endotelial, uma vez que essa via é precursora na formação de NO e a expressão da eNOS está

reduzida nesse grupo. Além disso, a fluorescência emitida pelo DHE também foi maior neste grupo, mostrando uma maior produção de ânion superóxido. Como a atividade da NADPH oxidase não se encontrou aumentada no grupo OVX, o aumento na disponibilidade do ânion superóxido pode ter relação com a disfuncionalidade da eNOS e redução na expressão da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD).

Em um estudo Kang et al (2011), mostrou uma diminuição na vasodilatação dependente do endotélio devido a redução na produção de NO, em arteríolas coronarianas de ratas OVX. Esse efeito foi associado a uma redução na expressão da SOD. A SOD realiza a dismutação do  $O_2^{\bullet-}$  em  $H_2O_2$ , que posteriormente é convertido em  $H_2O$  e  $O_2$  pelas enzimas peroxidases catalase e glutathione. Portanto, essas enzimas evitam o acúmulo de  $O_2^{\bullet-}$  e  $H_2O_2$  na célula (Schneider; Oliveira, 2004). No grupo OVX ocorreu um aumento na geração de  $O_2^{\bullet-}$ , que pode estar relacionado a redução da expressão da SOD. O  $O_2^{\bullet-}$ , pode reagir com o NO e formar o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), que por sua vez podem diminuir a disponibilidade da tetrahydrobiopterina ( $BH_4$ ), que é um cofator importante para a funcionalidade da NOS, provocando assim o desacoplamento da eNOS, o que conseqüentemente conduz à diminuição da formação do NO, e aumento da produção de  $O_2^{\bullet-}$ , dessa forma, contribuindo para o aumento do estresse oxidativo (Vaziri, 2004; Paravicini; Touyz, 2008; Elahi et al, 2009). Mais uma evidência que a expressão da SOD pode estar reduzida no grupo OVX, é a diminuição na disponibilidade  $H_2O_2$  neste grupo em relação ao grupo SHAM.

Atualmente o  $H_2O_2$  é reconhecido como um EDHF, visto que promove vasodilatação agindo em canais no musculo liso, aumentando a condutância ao  $K^+$ , o que levaria a hiperpolarização e relaxamento (Matoba et al, 2000; Morikawa et al., 2003). O  $H_2O_2$  atua como um fator hiperpolarizante derivado do endotélio em alguns leitos vasculares de várias espécies (Matoba et al, 2000; Shimokawa, 2010), atuando também em arteríolas coronariana de humanos (Liu et al, 2011). Além disso, o  $H_2O_2$  é um dos principais fatores de relaxamento derivado do endotélio vascular em resposta a acetilcolina, em aorta de camundongos (Capettini et al., 2008).

Uma das ações atribuídas a P4 nas células endoteliais, é a redução da expressão da SOD e conseqüentemente a diminuição da biodisponibilidade  $H_2O_2$  (Wassmann et al. 2005). Apesar do tratamento com P4 reduzir a biodisponibilidade de  $H_2O_2$ , o grupo OVX P4 apresentou níveis maiores de  $H_2O_2$  do que o grupo OVX. Mostrando que o

tratamento de 15 dias com progesterona foi capaz de impedir, em parte, o aumento dos níveis de  $H_2O_2$ , bem como o estresse oxidativo, mantendo a resposta vasodilatadora derivada do endotélio e funcionalidade endotelial.

## 6. CONCLUSÃO

A P4 parece ter um papel protetor na circulação coronariana uma vez que aumenta, por vias genômicas, a vasodilatação induzida pela BK por meio da liberação de vasodilatadores derivados do endotélio. Dentre os fatores endoteliais, os EETs bem como os canais para potássio participam do relaxamento induzido por BK. O tratamento com P4 não promove alteração na PAS, entretanto modula a PPC basal, e é capaz de prevenir o estresse oxidativo induzido pela ovariectomia. Esses achados sugerem que P4 tem ação benéfica sobre leito coronariano e poderia prevenir o desenvolvimento de doença arterial coronariana após a deficiência ou cessação da produção dos hormônios sexuais. Dessa forma, consideramos que o papel da P4 na terapia de reposição hormonal pode ir além de inibir efeitos colaterais do E2.

## 7. REFERÊNCIAS

ALLAN G F, et al. Ligand-dependent conformational changes in the progesterone receptor are necessary for events that follow DNA binding. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 89, n. 24, p. 11750-1174, 1992.

ANDERSON L A, et al. The effects of androgens and estrogens on preadipocyte proliferation in human adipose tissue: influence of gender and site. **J. Clin. Endocrinol Metab**, v. 86, p. 5045–5051, 2001.

AHLUWALIA A; HOBBS A J. Endothelium-derived C-type natriuretic peptide: more than just a hyperpolarizing factor. **Trends Pharmacol Sci**, v.26, n.3, p. 162-167, 2005.

BALDO M P, et al. Long-term use of low-dose spironolactone in spontaneously hypertensive rats: effects on left ventricular hypertrophy and stiffness. **Pharmacol Rep**, v. 63, n. 4, p. 975–982, 2011.

BARBAGALLO M, et al. Vascular Effects of Progesterone Role of Cellular Calcium Regulation. **Hypertension**, v. 37, p. 142–147, 2001.

BENJAMIN, et al. Heart disease and stroke statistics--2019 update: a report from the American Heart Association. **Circulation**, v. 1391, n. 104, p. 56-528, 2019.

BERNARDIS F, et al. Progesterone and medroxyprogesterone acetate effects on central and peripheral allopregnanolone and beta-endorphin levels. **Neuroendocrinology**, v. 83, n. 5-6, p. 348-359, 2006.

BERNE R M, RUBIO R. Regulation of coronary blood flow. **Prog Cardiovasc Dis**, v. 18, n. 2, p. 105-122, 1975.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. DEPARTAMENTO DE INFORMAÇÃO E INFORMÁTICA DO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE (DATASUS) 2017. Informações sobre mortalidade e informações demográficas. [on line]. Acessado em julho de 2019 Disponível em URL: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cv/e10f.def>.

BRYS M, et al. Expression of estrogen and progesterone receptor genes in endometrium, myometrium and vagina of postmenopausal women treated with estriol. **Sao Paulo Med J**, v. 127, n. 3, p. 128-133, 2009.

CAI H; HARRISON D G. Endothelial dysfunction in cardiovascular disease: The role of oxidant stress. **Circ Res**, v. 87, p. 840-844, 2000.

CAPETTINI L S A, et al. Neuronal nitric oxide synthase-derived hydrogen peroxide is a major endothelium-dependent relaxing factor. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 295, p. 2503-2511, 2008.

CAMPBELL W B; HARDER D R. EDHF—what is it? **Physiol Heart Circ Physiol**, v.280, p. 2441–2450, 2001.

CAUGHEY G E, et al. Roles of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in prostanoid production by human endothelial cells: selective up-regulation of prostacyclin synthesis by COX-2. **J Immunol**, v. 167, n. 5, p. 2831-2838, 2001.

CHALOUHI S. Menopause: A complex and controversial journey. **Post Reprod Health**, v. 23, n. 3, p. 128-131, 2017.

CHATAIGNEAU T, et al. Chronic treatment with progesterone but not medroxyprogesterone acetate restores the endothelial control of vascular tone in the mesenteric artery of ovariectomized rats. **Menopause**, v. 11, n. 3, p. 255-263, 2004.

CHENG J, et al. Frequency-dependent acceleration of cardiac repolarization by progesterone underlying its cardiac protection against drug-induced proarrhythmic effects in female rabbits. **Eur J Pharmacol**, v. 689, p. 172–178, 2012.

CLARKSON T B. Progestogens and cardiovascular disease. A critical review. **J Reprod Med**, v. 44, p. 180-184, 1999.

CLAUDIO, E R G et al. Effects of Chronic Swimming Training and Oestrogen Therapy on Coronary Vascular Reactivity and Expression of Antioxidant Enzymes in Ovariectomized Rats. **Plos One** , v. 8, n.6, 2013.

CORRIVEAU P, et al. Resistance training prevents liver fat accumulation in ovariectomized rats. **Maturitas**, v. 59, p. 259–267, 2008.

CUTINI P H, et al. Cross-talk between rapid and long term effects of progesterone on vascular tissue. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v115, p. 36–43, 2009.

CUTINI P H, et al. Differential regulation of endothelium behavior by progesterone and medroxyprogesterone acetate. **J Endocrinol**, v. 220, n. 3, p. 179-193, 2014.

DAWALIBI N W, et al. Envelhecimento e qualidade de vida: análise da produção científica da SciELO. **Estud Psicol**, v.30, n.3, p. 393-403, 2013.

DEBORTOLI, A R et al. GPER modulates tone and coronary vascular reactivity in male and female rats. **J Mol Endocrinol**, v. 59, n. 2, p. 171–180, 2017.

DHOTE V V, BALARAMAN R. Gender specific effect of progesterone on myocardial ischemia/reperfusion injury in rats. **Life Sci**, v. 81, p. 188–197, 2007.

DONATO, A J et al. Role of NFκB in age-related vascular endothelial dysfunction in humans. **Aging (Albany NY)**, v. 1, n. 8, p. 678-680, 2009.

EDWARDS G, et al. Role of gap junctions and EETs in endothelium- dependent hyperpolarization of porcine coronary artery. **Br J Pharmacol**, v. 129, n. 6, p.1145-1154, 2000.

ELAHI M M, et al. Oxidative stress as a mediator of cardiovascular disease. **Oxid Med Cell Long**, v. 2, n. 5, p.259-269, 2009.

ETTINGER B. Rationale for use of lower estrogen doses for postmenopausal hormone therapy. **Maturitas**, v. 57, p. 81–84, 2007.

FÉLÉTOU, M; VANHOUTTE, P M. EDHF: an update. **Clinical science**, v. 117, n. 4, p. 139-155, 2009.

FELMEDEN D C; LIP G Y. Hormone replacement therapy and hypertension, *Blood Press*. **Blood Press**, v. 9, p. 246-249, 2000.

FISHER M, BAESSLER A, SCHUNKERT H. Renin angiotensin Systems and gender differences in the cardiovascular system. **Cardiovasc Res**, v. 53, 672–677, 2002.

FISSLTHALER B, et al. Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. **Nature**, v. 401, p. 493–497, 1999.

FIGUEROUA-VALVERDE L, et al. Changes induced by estradiol-ethylenediamine derivative on perfusion pressure and coronary resistance in isolated rat heart: L-type calcium channel. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**, v. 155, p. 27-32, 2011.

FLEMING I, et al. The coronary EDHF stimulates multiple signalling pathways and proliferation in vascular cells. **Pflugers Arch**, v. 442, n. 4, p. 511-518, 2001.

FRANCIELI, V. Progestágenos: farmacologia e uso clínico. **Femina**, v. 39, n. 3, p. 127-137, 2011.

FREY R S, et al. NADPH oxidase-dependent signaling in endothelial cells: role in physiology and pathophysiology. **Antioxid Redox Signal**, v. 11, n. 4, p. 791-810, 2009.

FOUNIER A. et al. Breast cancer risk in relation to different types of hormone replacement therapy in the E3N-EDIC cohort. **Int J Cancer**, v. 114, n. 3, p. 448-454, 2005.

FURCHGOTT, R F; ZAWADZKI, J V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373-376, 1980.

FUSTER V et al. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2). **N Engl J Med**, v. 326, n. 5, 310-318, 1992.

GERHARD M, et al. Estradiol therapy combined with progesterone and endothelium-dependent vasodilation in postmenopausal women. **Circulation**, v. 98, n.12, p. 1158-1163, 1998.

GOLDMAN J M; MURR A S; COOPER R L. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. **Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol**, v.80. n. 2, p. 84-97, 2007.

GRADY D, et al. Heart and Estrogen/progestin replacement study (HERS): design, methods and baseline characteristics. **Controlled Clin Trials**, v. 19, p. 314-335, 1998.

GRADY D, et al. Cardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II). **JAMA**, v. 288, n. 1, p. 49-57, 2002.

GRAGASIN F S, et al. Estrogen Reduces Angiotensin II Induced Nitric Oxide Synthase and NAD(P)H Oxidase Expression in Endothelial Cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 23, n. 1, p. 38-44, 2003.

GROHÉ C, et al. Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors. **FEBS Lett**, v. 13, p. 107–121, 1997.

HALLIWELL B. Reactive species and antioxidants. redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiol**, v.141, p. 312-322, 2006.

JOHNSON B D, et al. Increased expression of the cardiac L-type calcium channel in estrogen receptor-deficient mice. **J Gen Physiol**, v. 110, p. 135–140, 1997.

KANG L S, et al. Aging and estrogen alter endothelial reactivity to reactive oxygen species in coronary arterioles. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 300, p. 2105-2115, 2011.

KAMADA M, et al. Postmenopausal changes in serum cytokine levels and hormone replacement therapy. **Am J Obstet Gynecol**, v. 184, n. 3, p. 309-314, 2001.

KEANEY J F, et al. 17 $\beta$ -Estradiol preserves endothelial vasodilator function and limits low-density lipoprotein oxidation in hypercholesterolemic swine. **Circulation**, v. 89, p. 2251–2259, 1994.

LANGE, V. et al. Cardiac Allograft Vasculopathy after Cardiac Transplantation and Hormone Therapy: Positive Effects? **Transplantation**, v. 82, n. 2, p. 234-240, 2006.

LATOUR M G, et al. Metabolic effects of physical training in ovariectomized and hyperestrogenic rats. **J Appl Physiol**, v. 90, p. 235–241, 2001.

LIGNIERES, B. Micronized progesterone. **Clin Ther**, v. 21, n. 1, p.41-60, 1999.

LIU Y, et al. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is the transferrable factor mediating flow-induced dilation in human coronary arterioles. **Circ Res**, v. 108, p. 566-573, 2011.

MATOBA T, et al. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. **J Clin Invest**, v. 106, n. 12, p. 1521-1530, 2000.

MCCUBBIN J A, et al. Blood pressure control and hormone replacement therapy in postmenopausal women at risk for coronary heart disease. **Am Heart J**, v. 143, p. 711–717, 2002.

MCGUIRE J, et al. Endothelium-derived relaxing factors: a focus on endothelium-derived hyperpolarizing factor(s). **Can J Physiol Pharmacol**, v.79, n.6, p.443–470, 2001.

MCHUGH D, GIL J Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. **J Cell Bio**, v. 217 n.1, p. 65-77, 2018.

MILLER V M, VANHOUTTE P M. Progesterone and modulation of endothelium-dependent responses in canine coronary arteries. **Am. J. Physiol**, v. 261, 1022–1027, 1991.

MARCONDES FK, et al. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Braz. J. Biol**, v. 62, n. 4, p. 609-614, 2002.

MATOBA T, et al. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. **J Clin Invest**, v. 106, n. 12, p. 1521-1530, 2000.

MONCADA S; HIGGS E A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **N Engl J Med**, v. 329, p. 2002–2012 1993.

MORIKAWA K, et al. Pivotal role of Cu,Zn-superoxide dismutase in endothelium-dependent hyperpolarization. **J Clin Invest**, v. 112, p. 1871–1879, 2003.

MORRISSY S, et al. Inhibition of apoptosis by progesterone in cardiomyocytes. **Aging Cell**, v. 9, p. 799–809, 2010.

NORTH B J; SINCLAIR D A. The intersection between aging and cardiovascular disease. **Circ Res**, v. 110, n. 8, p. 1097-1108, 2012

O'KANE KP, et al. Local L-NG-monomethylarginine attenuates the vasodilator action of bradykinin in the human forearm **Br J Clin Pharmacol**, v. 38, n. 4, p. 311–315, 1994.

PANG Y, DONG J, THOMAS P. Characterization, Neurosteroid Binding and Brain Distribution of Human Membrane Progesterone Receptors  $\delta$  and  $\epsilon$  (mPR $\delta$  and mPR $\epsilon$ ) and mPR $\delta$  Involvement in Neurosteroid Inhibition of Apoptosis. **Endocrinology**, v. 154, n. 1, p. 283–295, 2013.

PANG Y, DONG J, THOMAS P. Progesterone increases nitric oxide synthesis in human vascular endothelial cells through activation of membrane progesterone receptor- $\alpha$ . **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 308, n. 10, p. 899-911, 2015.

PAOLETTI R; WENGER N K. Review of the international position paper on women's health and menopause. **Circulation**, v.107, p. 1336-1339, 2003.

PARAVICINI T M, TOUYZ R M. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension. **Diabetes Care**, v. 31, n. 2, p.170–180, 2008.

PASZKOWSKI T. Renaissance of the clinical applications of a progesterone. **Gin Politec Project**, v. 19, p. 41–47, 2011.

PEIXOTO P, et al. GPER agonist dilates mesenteric arteries via PI3K-Akt-eNOS and potassium channels in both sexes. **Life Sci**, v. 83, p. 21-27, 2017.

PIGHON A, et al. Exercise training in ovariectomized rats stimulates estrogenic-like effects on expression of genes involved in lipid accumulation and subclinical inflammation in liver. **Metabolism**, v. 60, p. 629–639, 2011.

PIGNOLI, P. et al. Intimal plus medial thickness of the arterial wall: a direct measurement with ultrasound imaging. **Circulation**, Baltimore, v. 74, n. 6, p. 1399–406, 1986.

PRICE, T M, et al. Estrogen regulation of adipose tissue lipoprotein lipase—possible mechanism of body fat distribution. **Am. J. Obstet Gynecol**, v. 178, p. 101–107, 1998.

RANDALL, M D, et al. An endogenous cannabinoid as an endothelium-derived vasorelaxant. **Biochem Biophys Res Commun**, v .229, n. 1, p. 114-20, 1996.

RANDALL, M D, KENDALL, D A. Involvement of a cannabinoid in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated coronary vasorelaxation. **Eur J Pharmacol**, v. 335, n. 2, p. 205-9, 1997.

RANDALL M D, et al. Comparative pharmacology of endothelium-derived hyperpolarizing factor and anandamide in rat. **Eur J Pharmacol**, v.333, p.191-197,1997.

REGIDOR P A. Progesterone in Peri- and Postmenopause: A Review. **Geburtshilfe Frauenheilkd**, v. 74, n. 11, p. 995–1002, 2014.

RICHARD D. Effects of ovarian hormones on energy balance and brown adipose tissue thermogenesis. **Am. J. Physiol**, v. 250, p. 245–249, 1986.

RONCARI D A; VAN R L. Promotion of human adipocyte precursor replication by 17beta-estradiol in culture. **J. Clin. Invest**, v. 62 p. 503–508, 1978.

ROUVER, W N et al. Testosterone Replacement Therapy Prevents Alterations of Coronary Vascular Reactivity Caused by Hormone Deficiency Induced by Castration. **PLoS One** , v. 10, n.8, 2015.

ROZENBERG S et al. Postmenopausal hormone therapy: risks and benefits. **Nat Rev Endocrinol**, v. 9, p. 216-227, 2013.

SANCHEZ-RODRIGUEZ M A, et al. Menopause as risk factor for oxidative stress. **Menopause**, v. 9, n. 3, p .361-367 2012.

SANTOS R L, et al. Endothelial mediators of 17  $\beta$  - estradiol-induced coronary vasodilation in the isolated rat heart. **Braz J Med Biol Res**, v. 37, n. 4, p. 569-575, 2004.

SANTOS R L, et al. Sex hormones in the cardiovascular system **Horm Mol Biol Clin Investig**, v.18, n.2, p. 89-100, 2014.

SANTOS R L, et al. Deficiency of sex hormones does not affect 17- $\beta$ -estradiol-induced coronary vasodilation in the isolated rat heart. **Braz J Med Biol Res**, v. 49, n. 5 p. 1-9, 2016.

SCARPIN K M, et al. Progesterone action in human tissues: regulation by progesterone receptor (PR) isoform expression, nuclear positioning and coregulator expression. **NURSA**, v. 7, n. 1–13, 2009.

SCHNEIDER C D, OLIVEIRA A R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Rev Bras Med Esporte**, v. 10, n. 4, p. 308-313, 2004.

SCHUMACHER, M. et al. Progesterone and progestins: neuroprotection and myelin repair. **Curr Opin Pharmacol**, v. 8, n. 6, p. 740–746, 2008.

SHIMOKAWA H, et al. Prostacyclin releases endothelium-derived relaxing factor and potentiates its action in coronary arteries of the pig. **Br J Pharmacol**, v. 95, n. 4, p. 1197–1203, 1998.

SHIMOKAWA H. Hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor. **Pflugers Arch**, v. 459, n. 6, p. 915-922, 2010.

SHINODA M, et al. Effects of physical training on body composition and organ weights in ovariectomized and hyperestrogenic rats. **Int J Obes**, v. 26, p. 335-343, 2002.

SIMONCINI T, et al. Differential signal transduction of progesterone and medroxyprogesterone acetate in human endothelial cells. **Endocrinology**, v. 145, p. 5745–5756, 2004.

SOMBERG, L B et al. Shock associated with endothelial dysfunction in omental microvessels. **Eur J Clin Invest**, v. 47, n. 1, p. 30-37, 2017.

STEFANICK M L, et al. Women's Health Initiative postmenopausal hormone trials: overview and baseline characteristics of participants. **Ann Epidemiol**, v. 13, n. 9, p. 78-86, 2003.

STONE J R, YANG S. Hydrogen peroxide: a signaling messenger. **Antioxid Redox Signa**, v. 8, p. 243–270, 2006.

TARABORRELLI S. Physiology, production and action of progesterone. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 94, p. 8-16, 2015.

TOSTES R C, et al. Effects of estrogen on the vascular system. **Braz J Med Biol Res**, v. 36, n.9, p. 1143-1158 2003.

TSAI M J; O'MALLEY BW. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. **Annu Rev Biochem**, v. 63, 451-486, 1994.

TSAI S A; STEFANICK M L; STAFFORD R S. Trends in menopausal hormone therapy use of US office-based physicians, 2000–2009. **Menopause**, v.18, 385–392, 2011.

TSAI S Y, et al. Molecular interactions of steroid hormone receptor with its enhancer element: evidence for receptor dimer formation. **Cell**, v. 55, n. 2, p. 361-369, 1988.

UTIANAB W H. Menopause — a modern perspective from a controversial history. **Maturitas**, v, 26, n. 2, p. 73-82, 1997.

VASSALE C, et al. Oxidative status and cardiovascular risk in women: Keeping pink at heart. **World J Cardiol**, v. 1, n. 1, p. 26-30, 2009.

VANHOUTTE P M. Endothelial dysfunction and inhibition of converting enzyme. **Eur Heart J**, v. 7, n. 1, p. 14-23, 2000.

VAZIRI N D. Roles of oxidative stress and antioxidant therapy in chronic kidney disease and hypertension.. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v. 13, n. 1, p. 93-99, 2004.

WADE G N; GRAY J M. Gonadal effects on food intake and adiposity: a metabolic hypothesis. **Physiol. Behav**, v. 22, p. 583–593, 1979

WASSMANN K, et al. Progesterone antagonizes the vasoprotective effect of estrogen on antioxidant enzyme expression and function. **Circ Res**, v. 97, n. 10, p. 1046-1054, 2005.

WASSMAN S, et al. Endothelial dysfunction and oxidative stress during estrogen deficiency in spontaneously hypertensive rats. **Circulation**, v. 103, p. 435-441, 2001.

WENNER M M; STACHENFELD N S. Blood pressure and water regulation understanding sex hormone effects within and between men and women. **J Physiol**, v. 590, p. 5949–5961, 2012.

WENNER M M; STACHENFELD N S. Blood pressure and water regulation understanding sex hormone effects within and between men and women. **J Physiol**, v. 590, p. 5949–5961, 2012.

WILSON M. et al. Blood pressure, the renin-aldosterone system and sex steroids throughout normal pregnancy. **Am J Med**, v. 68, n. 1, p. 97–104, 1980.

XU, J et al. Natural history of menopause symptoms in primary care patients: a MetroNet study. **J Am Board Fam Pract**, v. 18, n. 5, 374-382, 2005.

XU X, et al. Effects of ovariectomy and 17  $\beta$ -estradiol treatment on the renin – angiotensin system, blood pressure, and endothelial ultrastructure. **Int J Cardiol**, n. 130, p. 196-204, 2008.

YU X, et al. Activation of G protein-coupled estrogen receptor induces endothelium-independent relaxation of coronary artery smooth muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 301, p. 882–888, 2011.

YUNG L M, et al. Inhibition of renin-angiotensin system reverses endothelial dysfunction and oxidative stress in estrogen deficient rats. **PLoS ONE**, v. 6, n. 3, p. 1-9, 2011.

ZERR-FOUINEAU M, et al. Progestins overcome inhibition of platelet aggregation by endothelial cells by down-regulating endothelial NO synthase via glucocorticoid receptors. **FASEB J**, v. 21, p. 265–273, 2007.

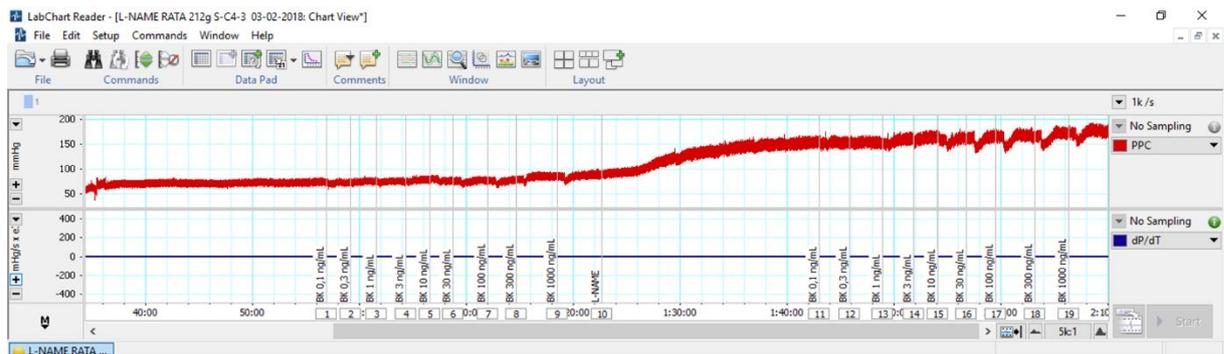
ZERR-FOUINEAU M, et al. Certain progestins prevent the enhancing effect of 17 $\beta$ -estradiol on NO-mediated inhibition of platelet aggregation by endothelial cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 29, p. 586–593, 2009.

ZOTH N, et al. Physical activity and estrogen treatment reduce visceral body fat and serum levels of leptin in an additive manner in a diet induced animal model of obesity. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 122, p. 100-105, 2010.

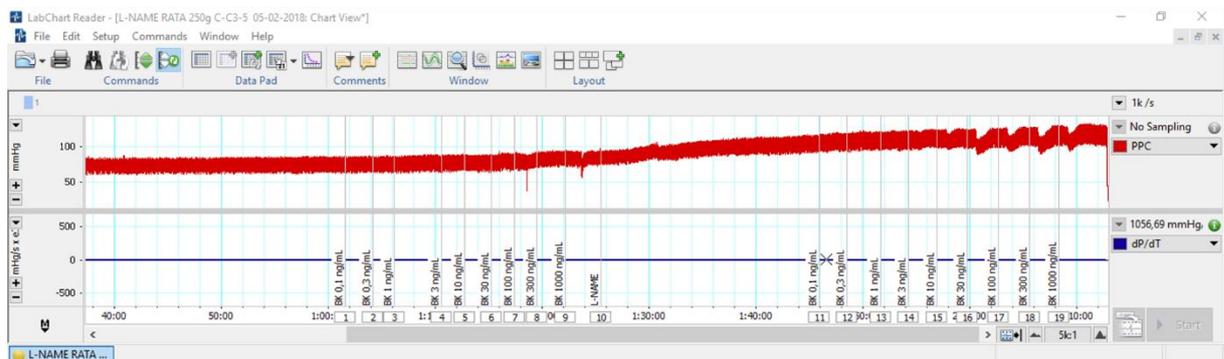
## APÊNDICES

A – Registro típico da curva de relaxamento induzida pela bradicinina no leito coronariano de ratas seguida pela inibição com L-NAME.

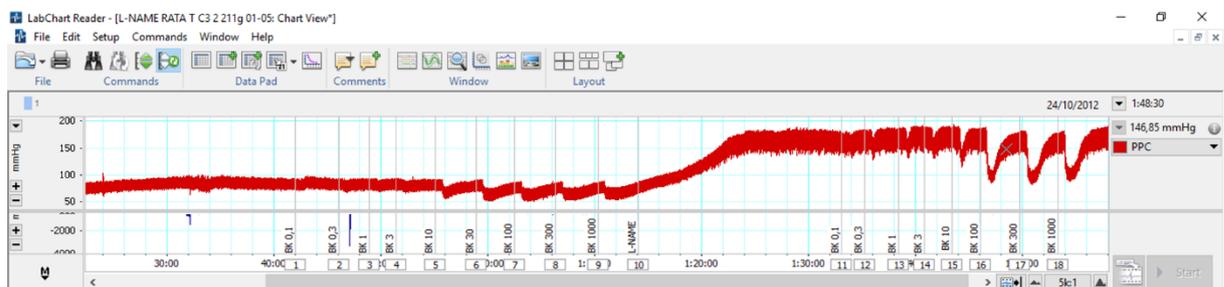
### SHAM



### OVX

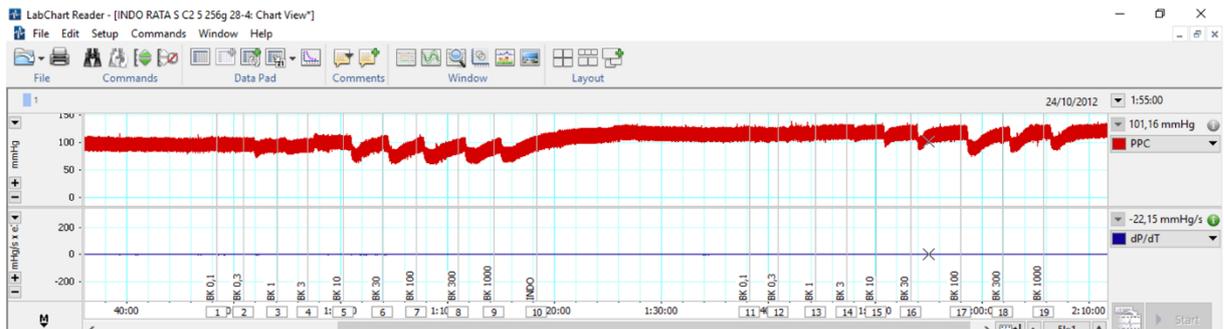


### OVX P4

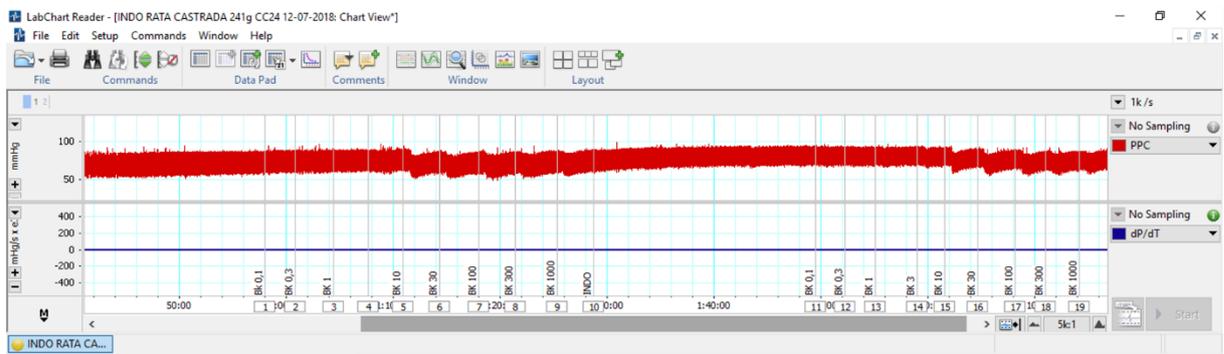


B – Registro típico da curva de relaxamento induzida pela bradicinina no leito coronariano de ratos seguida pela inibição com indometacina.

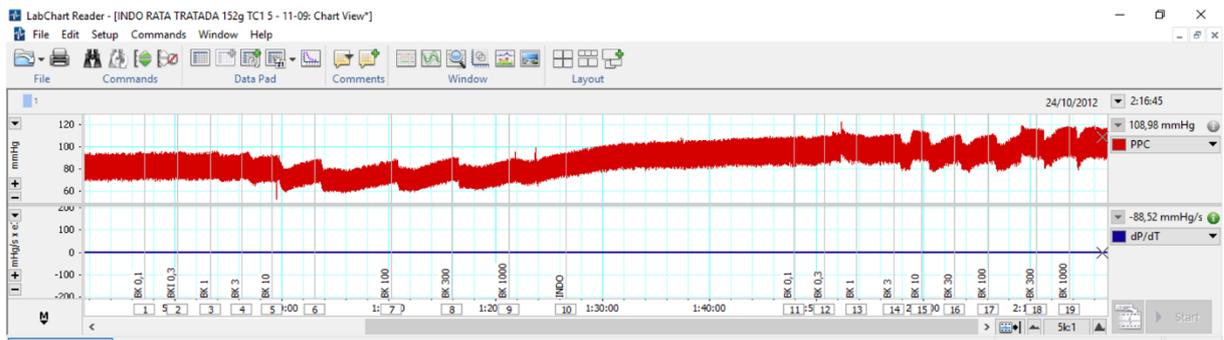
## SHAM



## OVX

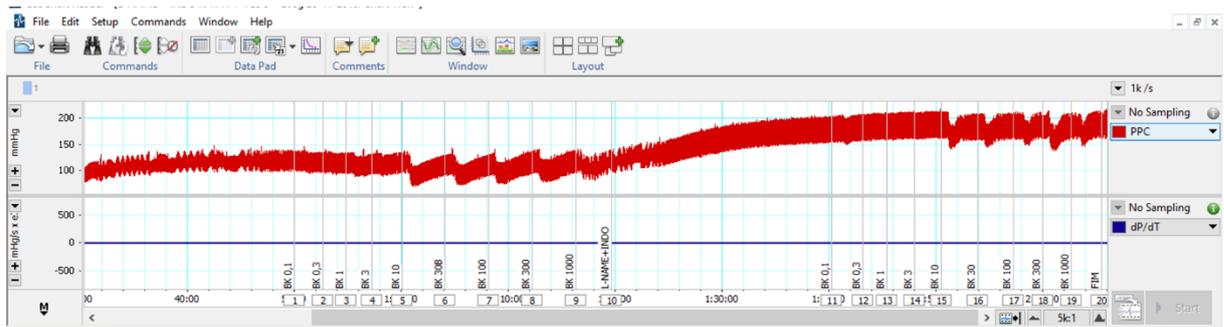


## OVX P4

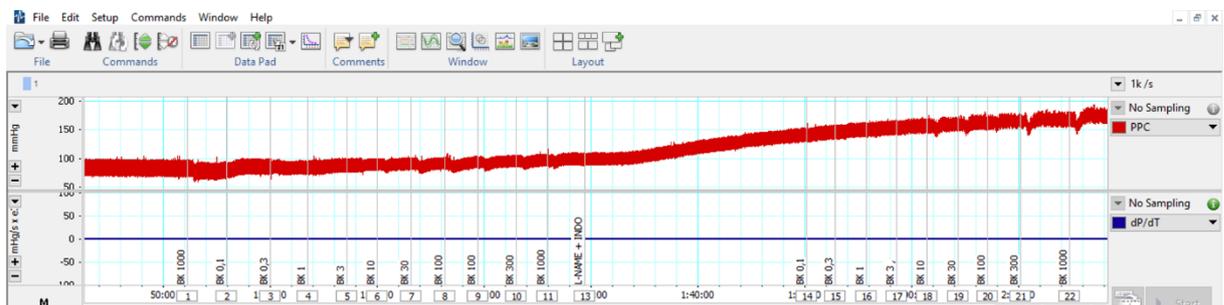


C – Registro típico da curva de relaxamento induzida pela bradicinina no leito coronariano de ratos seguida pela inibição combinada de L-NAME e indometacina.

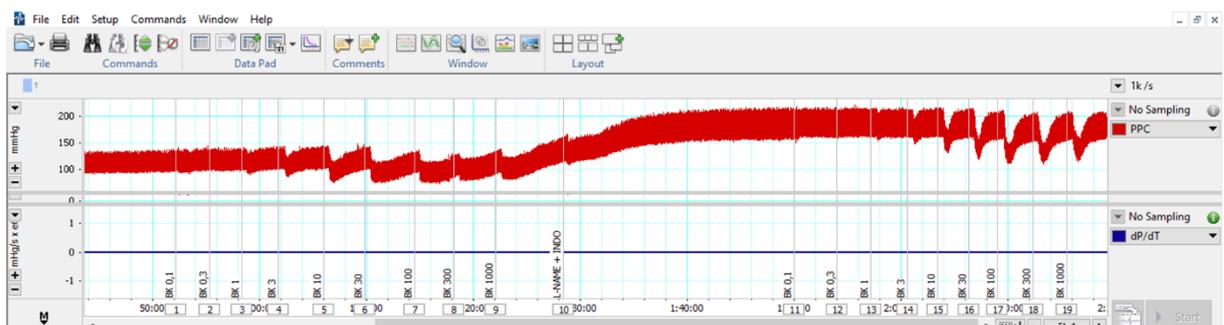
## SHAM



## OVX

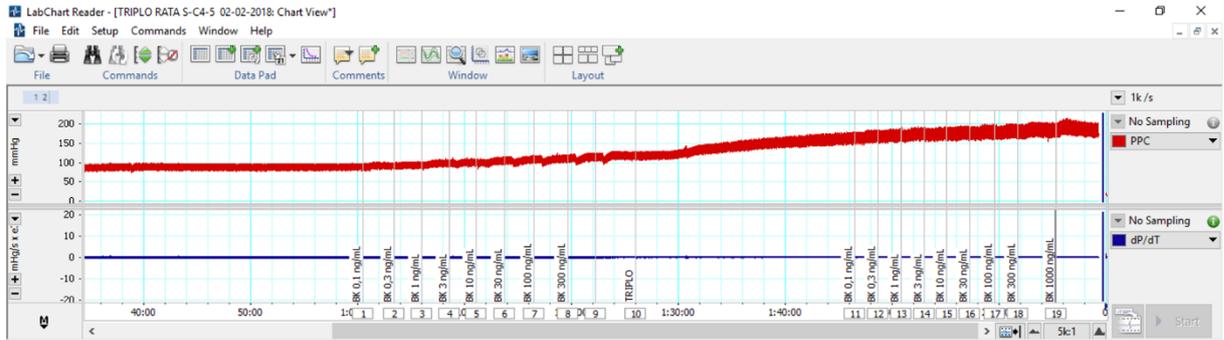


## OVX P4

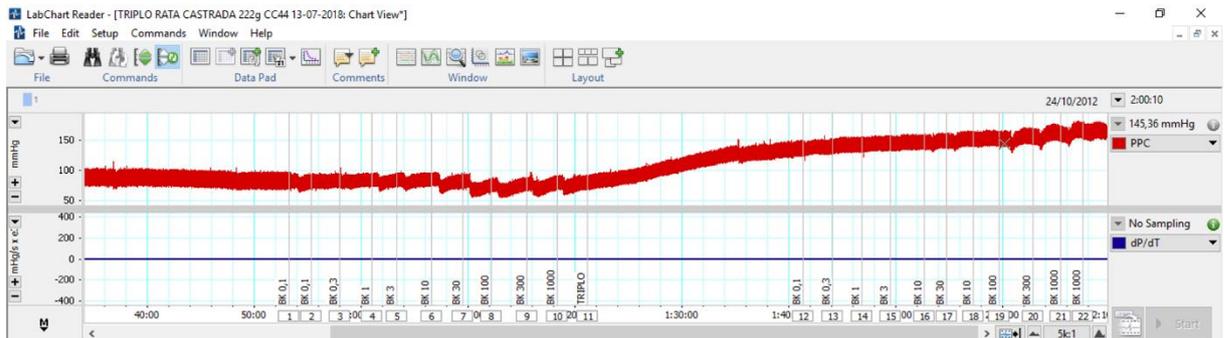


D – Registro típico da curva de relaxamento induzida pela bradicinina no leito coronariano de ratos seguida pela inibição combinada de L-NAME, indometacina e clotrimazol.

## SHAM



## OVX



## OVX P4

