

Efeito do tratamento com progesterona sobre a reatividade vascular coronariana dependente do endotélio em ratas espontaneamente hipertensas

Débora Tacon da Costa

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas

**Universidade Federal do Espírito Santo
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas**

Vitória, Agosto de 2020

DÉBORA TACON DA COSTA

Efeito do tratamento com progesterona sobre a reatividade vascular coronariana dependente do endotélio em ratas espontaneamente hipertensas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, como requisito para 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 2020

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: 2018132736

A Comissão Julgadora que examinou a Dissertação de Mestrado, intitulada "Efeito do tratamento com progesterona sobre a reatividade vascular coronariana dependente do endotélio em ratas espontaneamente hipertensas", apresentada e defendida publicamente pela aluna Débora Tacon da Costa, no dia _ de agosto de 2020, às ____hs, 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 – ES, _ de Agosto de 2020.

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Roger Lyrio dos Santos – Orientador
Universidade Federal do Espírito Santo – UFES

Prof. Dr^a Nazaré Souza Bissoli
Universidade Federal do Espírito Santo – UFES (Membro Interno)

Prof^a. Dr^a Maristela de Oliveira Poletini
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG (Membro Externo)

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

D111e Costa, Débora Tacon da, 1989-
Efeitos do tratamento com progesterona sobre a reatividade vascular
coronariana em ratas espontaneamente hipertensas / Débora Tacon da Costa
– 2020.
80f. : 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

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos que ao longo dessa jornada me incentivaram e nunca deixaram de acreditar em mim: meus pais, Seninha e Luiz, meus sogros, Cristina e Vilmar e ao meu parceiro de vida, Wigney.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me abriu caminhos que eu não pensava em desbravar e me deu desafios e obstáculos que achava quase impossíveis de se realizar. Mas quando acreditamos e temos fé, tudo passa, tudo flui, e então nos damos conta de que somos capazes de vencer, que com luta e dedicação, tudo começa a dar certo!

Ao amor da minha vida que há 10 anos sonha os meus sonhos. Wigney, obrigada pela paciência, por nunca deixar que eu desistisse e por sempre me lembrar que quando achamos que não temos mais força para continuar, ainda nos resta 30% rs! Você é o meu norte, meu porto seguro, a minha metade. Te amo!

Aos meus pais, Luiz Carlos e Seninha, que sempre me incentivaram a correr atrás dos meus sonhos e se desdobraram em mil para que tudo fosse possível: graduação, especialização e agora o mestrado. Sem o apoio de vocês eu não estaria aqui, pois, o amor, incentivo e suporte que vocês me dão diariamente me fazem vencer todos os obstáculos. Mais uma conquista meus lindos, toda dedicada a vocês! E aos meus irmãos, Hendrick, Vanêssa e Pablo, e à minha cunhada, Luciana, obrigada pelo carinho e apoio de sempre. Amo muito vocês!

À minha segunda família, Vilmar, Cristina, Jullizze, Pablo e meu amorzinho Giovanna. Vocês foram essenciais nessa jornada, vestiram a camisa comigo e lutaram ao meu lado nessa batalha. Obrigada! Vocês são demais! Amo vocês.

As minhas queridas amigas Mari, Jéssica, Camila, Diana e Déia. Vocês são luz na minha vida, mesmo distante vocês se fizeram presentes nas horas que mais precisei. Obrigada por tanto! Amo vocês.

Ao meu orientador, Prof. Roger Lyrio, que me recebeu de braços abertos, que acreditou no meu potencial e me permitiu ser parte da família LABERV. Serei eternamente grata por cada aprendizado, por cada oportunidade, por cada orientação e por todo seu cuidado, paciência e compreensão. Obrigada!

Aos alunos e ex-alunos do LABERV: Jéssyca, Wender, Nathalie, Tagana e Juan, obrigada por todos os momentos que compartilhamos, dentro e fora do laboratório, jamais esquecerei dos nossos momentos especiais partilhados com café. Sentirei falta da Reativa Runner's!

Ao meu maior presente da pós-graduação, Leticia, que logo no meu primeiro dia de aula segurou em minha mão e nunca mais largou. Esteve comigo nos momentos mais difíceis do mestrado, aliás, estive em todos os momentos, da teoria à prática, do primeiro seminário até a última escrita da dissertação. Amiga, simplesmente obrigada, amo você.

Aos alunos de iniciação científica: Ana Dária, Lara, Jocimar, Lucas, Sunamita, Patricia, Emilly, Matheus, gratidão pela parceria no dia a dia do laboratório. Vocês foram essenciais. Muito obrigada!

Aos queridos da PPGCF: Bruno, Fabrício, Sabrina, Silas, Antônio, Glaucinha, Mariana, Maria Eduarda, Edgar, Eduardo, Charles, Oscar, Ana Catharina, Matheus Cavatti, Matheus Loureiro, Jordana, Christiane, Thaís e Suellen que mesmo na correria do dia-a-dia estavam sempre dispostos a ajudar no que fosse necessário, vocês tornaram esse período mais leve e mais divertido. Obrigada!

À Pollyana Peixoto, por todo o acolhimento desde a minha chegada! Só te levava problema rs! E mesmo assim você sempre tinha conselhos e soluções! Obrigada!

Aos professores da PPGCF-UFES por todo conhecimento que foram essenciais para minha formação acadêmica.

As Professoras Dra. Nazaré e Dra. Maristela, é uma honra tê-las como avaliadoras desta dissertação! Obrigada por aceitarem o convite!

Aos funcionários do PPGCF-UFES e do biotério, em especial ao Rodolpho, por todo suporte durante o mestrado. Obrigada!

Aos animais, meu eterno respeito e gratidão.

À UFES e a CAPES pela bolsa e auxílio financeiro concedido durante a realização do curso de mestrado.

“ Vocês podem calar a minha voz, mas não os meus pensamentos! Vocês podem acorrentar meu corpo, mas não a minha mente! Não serei plateia dessa sociedade doente, serei autor da minha história! Os fracos querem controlar o mundo; os fortes, o seu próprio ser! Os fracos usam as armas; os fortes, as ideias! ”

Augusto Cury (O Futuro da Humanidade)

SUMÁRIO

RESUMO	<u>viii</u>
ABSTRACT	<u>ix</u>
LISTA DE FIGURAS	<u>x</u>
LISTA DE TABELAS.....	<u>xi</u>
LISTA DE ABREVIATURAS.....	<u>xii</u>
1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	33
2.1. Objetivo Geral	33
2.2. Objetivos Específicos	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1. Animais Experimentais.....	34
3.2. Grupos Experimentais.....	34
3.3. Procedimentos Experimentais.....	34
3.3.1. Determinação da Fase do Ciclo Estral.....	35
3.3.2. Ovariectomia	36
3.3.3. Tratamento com Progesterona	37
3.3.4. Avaliação não Invasiva da Pressão Arterial.....	37
3.3.5. Estudos em Coração Isolado (Método Langendorff)	38
3.3.6. Protocolos Experimentais	39
3.3.7 Remoção e Pesagem de órgãos e coxins de gordura.....	40
3.3.8. Microscopia eletrônica de varredura	41
3.4 ANÁLISES DOS DADOS.....	41
4. RESULTADOS	42
4.1 Pressão Arterial Sistólica (PAS).....	42
4.2 Parâmetros Ponderais.....	42
4.3. Pressão de Perfusão Coronariana (PPC) Basal	44
4.4 Reatividade Vascular do Leito Coronariano	45
4.5 Microscopia eletrônica de varredura	49
5. DISCUSSÃO	51
6. CONCLUSÃO	58
7. REFERÊNCIAS	59
APÊNDICE	77

RESUMO

Receptores de progesterona são expressos no endotélio e músculo liso vascular e por meio destes a progesterona produz efeitos importantes como a formação direta e indireta de fatores vasoativos, essenciais para homeostase vascular. Apesar de relevante para o sistema cardiovascular, o papel da progesterona é pouco caracterizado, principalmente no modelo de hipertensão essencial, o SHR (*Spontaneously Hypertensive Rats*). Por isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do tratamento com progesterona sobre a reatividade vascular coronariana dependente do endotélio em ratas hipertensas e ovariectomizadas. Para tal, utilizamos ratas adultas SHR, divididas em 3 grupos: Sham, Ovariectomizada (OVX) e Ovariectomizada + tratamento (2 mg/kg/dia) com progesterona (OVX-P4) por 15 dias. A pressão arterial sistólica (PAS) foi avaliada no início e no final do tratamento por pletismografia de cauda. Microscopia eletrônica de varredura foi utilizado para análise qualitativa do endotélio. A reatividade vascular do leito coronariano foi investigada utilizando o método Langendorff modificado. Após 40 minutos de estabilização, a pressão de perfusão coronariana (PPC) basal foi registrada e a reatividade vascular do leito coronariano foi avaliada por meio da construção de uma curva dose-resposta de bradicinina (BK) administrada em concentrações crescentes (0,1-1000 ng) antes e após a perfusão de inibidores farmacológicos: inibidor inespecífico da enzima óxido nítrico sintase - N^ω-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 100 μM), inibidor inespecífico da enzima ciclooxigenase (COX) - indometacina (INDO; 2,8 μM), inibidor da enzima citocromo P450 (CYP) - clotrimazol (0,75 μM, CLOT), de forma individual ou combinada. Todos os protocolos foram aprovados pela CEUA-UFES (42/2018). Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média, e analisados por ANOVA 2 vias, seguida de *post hoc* de Tukey ($p < 0,05$). A progesterona não afetou o aumento da PAS em relação aos grupos estudados. Os grupos OVX e OVX-P4 apresentaram PPC basal maior comparada ao grupo SHAM. A BK foi capaz de promover vasodilatação em todos os grupos estudados. Contudo, observamos que o grupo OVX apresentou um prejuízo no relaxamento à BK comparado ao grupo SHAM, além de apresentar perda da arquitetura e áreas de atrofia celular. O tratamento com progesterona foi capaz de prevenir essa redução. A inibição inespecífica da NOS produziu maior prejuízo no grupo Sham, enquanto que a inibição da COX promoveu maior redução no relaxamento do grupo OVX-P4. O principal achado desse estudo foi a capacidade da progesterona em modular a vasodilatação coronariana dependente do endotélio em fêmeas SHR ovariectomizadas. O prejuízo causado pela deficiência hormonal foi prevenido pela progesterona e parece que uma das vias envolvidas é a dos prostanoídes.

Palavras-chave: progesterona, ovariectomia, artérias coronárias, reatividade vascular, prostanoídes, SHR

ABSTRACT

Progesterone receptors are expressed in the endothelium and vascular smooth muscle and through them progesterone produces important effects such as the direct and indirect formation of vasoactive factors, essential for vascular homeostasis. Although relevant to the cardiovascular system, the role of progesterone is poorly characterized, especially in the essential hypertension model, the SHR (*Spontaneously Hypertensive Rats*). Therefore, the aim of this study was to evaluate the effects of progesterone treatment on endothelium-dependent coronary vascular reactivity in hypertensive and ovariectomized rats. For this, we used adult SHR rats, divided into 3 groups: Sham, Ovariectomized (OVX) and Ovariectomized + treatment (2 mg / kg / day) with progesterone (OVX-P4) for 15 days. Systolic blood pressure was assessed at the beginning and at the end of treatment by tail plethysmography. The vascular reactivity of the coronary bed was investigated using the modified Langendorff method. After 40 minutes of stabilization, the baseline coronary perfusion pressure (CPP) was recorded and the vascular reactivity of the coronary bed was assessed by constructing a bradykinin (BK) dose-response curve administered in increasing concentrations (0.1- 1000 ng) before and after the infusion of pharmacological inhibitors: non-specific inhibitor of the nitric oxide synthase enzyme - N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 100 μM), non-specific inhibitor of the enzyme cyclooxygenase (COX) - indomethacin (INDO; 2.8 μM), inhibitor of cytochrome P450 (CYP) - clotrimazole (0.75 μM, CLOT), individually or in combination. All protocols were approved by CEUA-UFES (42/2018). Data were expressed as mean ± standard error of the mean, and analyzed by 2-way ANOVA, followed by Tukey's post hoc (p <0.05). Progesterone did not affect the increase in SBP. The OVX and OVX-P4 groups had higher baseline CPP compared to the SHAM group. BK was able to promote vasodilation in all groups studied. However, we observed that the OVX group showed impairment in BK relaxation compared to the SHAM group and that treatment with progesterone was able to prevent this reduction. The non-specific inhibition of NOS produced greater damage in the Sham group, while the inhibition of COX promoted a greater reduction in relaxation in the OVX-P4 group. The main finding of this study was the ability of progesterone to modulate endothelium-dependent coronary vasodilation in SHR ovariectomized females. The damage caused by hormonal deficiency was prevented by progesterone and it seems that one of the pathways involved is prostanoids.

Keywords: *progesterone, ovariectomy, coronary arteries, vascular reactivity, prostanoids, SHR*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas químicas da progesterona e testosterona e dos seus derivados sintéticos (traduzido de HOUSHDARAN et al., 2020).....	22
Figura 2. Formação da progesterona (Erickson & Chang 2007, modificado).	24
Figura 3. Linha do tempo dos procedimentos experimentais realizados.	35
Figura 4. Avaliação citológica de esfregaços vaginais usada para identificar as fases do ciclo estral. Três tipos principais de células são detectados em amostras de esfregaço vaginal: células epiteliais nucleadas, células epiteliais cornificadas e leucócitos. A proporção desses tipos de células presentes no esfregaço pode ser usada para identificar (A) proestro, (B) estro, (C) metaestro ou (D) diestro. Pontas de flecha pretas em B, C e D apontam para células epiteliais cornificadas representativas. As setas pretas em C e D apontam para os leucócitos representativos. As setas brancas em A e D destacam células epiteliais nucleadas representativas (Mclean et al. 2012; modificado).....	36
Figura 5. Representação dos protocolos experimentais de reatividade vascular.....	40
Figura 6. Pressão arterial sistólica em ratas SHR. SHAM (n = 15), OVX (n = 15), OVX-P4 (n = 15). Os dados foram expressos como média ± EPM. Utilizamos para análise dos dados one-way ANOVA e post hoc de Tukey. *p < 0,05 comparado com seus respectivos controles no dia 0.	42
Figura 7. Pressão de perfusão coronariana basal em ratas SHR. SHAM (n = 9), OVX (n = 9), OVX-P4 (n = 9). Os dados foram expressos como média ± EPM. A análise estatística foi realizada por meio de one-way ANOVA e post hoc de Tukey. *p<0,05 vs SHAM.	44
Figura 8. Resposta vasodilatadora a concentrações crescentes de bradicinina (BK, 0,1-1000 ng) (a) AUC da curva basal (b). Os dados foram expressos como média ± EPM. Foi usado two-way ANOVA (a), one-way ANOVA (b) e post hoc de Tukey. *p <0,05 em relação ao grupo SHAM, #p < 0,05 em relação ao grupo OVX-P4.	45
Figura 9. Resposta vasodilatadora a concentrações crescentes de bradicinina (BK, 0,1-1000 ng) após inibição com L-NAME nos grupos SHAM (a), OVX (b), OVX-P4 (c). Diferença da área abaixo da curva (d). Os dados foram expressos como média ± EPM. A análise estatística foi realizada por meio de one-way ANOVA e post hoc de Tukey. *p <0,05 em relação ao seu controle na curva basal. +p < 0,05 em relação ao SHAM. #p < 0,05 em relação ao OVX. \$ p < 0,05 em relação ao OVX-P4.....	46
Figura 10. Resposta vasodilatadora a concentrações crescentes de bradicinina (BK, 0,1-1000 ng) após inibição com indometacina nos grupos SHAM (a), OVX (b), OVX-P4 (c). Diferença	

da área abaixo da curva (d). Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM. A análise estatística foi realizada por meio de one-way ANOVA e post hoc de Tukey. *p < 0,05 em relação ao seu controle na curva basal. ⁺p < 0,05 em relação ao SHAM. [#]p < 0,05 em relação ao OVX. ^{\$}p < 0,05 em relação ao OVX-P4..... 47

Figura 11. Resposta vasodilatadora a concentrações crescentes de bradicinina (BK, 0,1-1000 ng) após inibição com L-NAME + indo nos grupos SHAM (a), OVX (b), OVX-P4 (c). Diferença da área abaixo da curva (d). Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM. A análise estatística foi realizada por meio de one-way ANOVA e post hoc de Tukey. *p < 0,05 em relação ao seu controle na curva basal. ⁺p < 0,05 em relação ao SHAM. [#]p < 0,05 em relação ao OVX. ^{\$}p < 0,05 em relação ao OVX-P4..... 48

Figura 12. Resposta vasodilatadora a concentrações crescentes de bradicinina (BK, 0,1-1000 ng) após inibição com L-NAME + indo + clotrimazol nos grupos SHAM (a), OVX (b), OVX-P4 (c). Diferença da área abaixo da curva (d). Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM. A análise estatística foi realizada por meio de one-way ANOVA e post hoc de Tukey. *p < 0,05 em relação ao seu controle na curva basal. ⁺p < 0,05 em relação ao SHAM. [#]p < 0,05 em relação ao OVX. ^{\$}p < 0,05 em relação ao OVX-P4..... 49

Figura 13. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos ramos descendente anterior da artéria coronária esquerda e septal dos grupos SHAM, OVX e OVX-P4. Cada imagem foi obtida com 1,500X de magnificação (barra = 10 μ m). 50

Figura 14: Esquema com os principais resultados obtidos em ratas SHR do grupo tratado com progesterona. 57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de peso corporal dos grupos estudados	43
Tabela 2. Valores das gorduras intra-abdominais dos grupos estudados	43
Tabela 3. Valores dos pesos dos órgãos dos grupos estudados	44

LISTA DE ABREVIATURAS

3 β -HSD: 3 β hidroxioesteroide

Acetil-CoA: Acetilcoenzima A

ACh: Acetilcolina

cAMP: 3', 5'-adenosina monofosfato cíclico

ANOVA: Análise de variância

AUC: Área abaixo da curva

dAUC: Diferença da área abaixo da curva

BH₄: (6R)-5,6,7,8-tetrahidrobiopterin

BK: Bradicinina

Ca²⁺ (Ca⁺⁺): Íon cálcio

Ca²⁺/CaM: Complexo cálcio-calmodulina

CLOT: Clotrimazol

COX: Ciclooxygenase

CYP: Citocromo P450

DCVs: Doenças cardiovasculares

EDH: Hiperpolarização dependente do endotélio

EDRF: Fator de relaxamento derivado do endotélio

EETs: Ácido epoxieicosatrienoico

eNOS: Óxido nítrico sintase endotelial

EPM: Erro padrão da média

ERO: Espécie reativa de oxigênio

FAD: Flavina adenina dinucleotídeo

FMN: Flavina mononucleotídeo

FSH: Hormônio folículo estimulante

cGMP: 3' 5' – guanosina monofosfato cíclico

GM: Gordura mesentérica

GnRH: Hormônio liberador de gonadotrofinas

GPm: Gordura parametrial

GPr: Gordura perirrenal

GR: Gordura retoperitoneal

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

H₂S: Sulfeto de hidrogênio

Heme: Protoporfirina de ferro IX

IK_{Ca}: Canais para potássio dependentes de cálcio de condutância intermediária

INDO: Indometacina

iNOS: Óxido nítrico sintase induzível

IP: Receptores de prostaciclina

K⁺: Íon potássio

LH: Hormônio luteinizante

L-NAME: N^o-nitro-L-arginina metil éster

LNG: Levonorgestrel

MEV: Microscopia eletrônica de varredura

MLV: Músculo liso vascular

MPA: Acetato de medroxiprogesterona

Na⁺/K⁺ -ATPase: Na⁺ /K⁺ -Adenosinatrifosfatase

NADPH: Fosfato de nicotinamida adeninadinucleotídeo

NETA: Acetato de noretindrona

NHA: N^o-hidroxi-L-arginina

nNOS: Óxido nítrico sintase neuronal

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintase

O₂: Oxigênio Molecular

O₂^{•-}: Ânion superóxido

ONOO⁻: Peroxinitrito

P4: Progesterona natural

PA: Pressão arterial

PAS: Pressão arterial sistólica

PAQRs: Receptores sete-transmembranas de progesterona adipoQ

PGI₂: Prostaciclina

PKG: Proteína cinase dependente de GMP

PMO: Progesterona micronizada oral

PNs: Prostanoides

PPC: Pressão de perfusão coronariana

PREs: Elementos de resposta a progesterona

mPR (α , β , γ): Receptores de membrana de progesterona

PGRMC (1, 2): Componente 1 e 2 da membrana do receptor de progesterona

PRn (A, B, C): Receptor nuclear de progesterona

SHR: *Spontaneously Hypertensive Rats* (Ratos espontaneamente hipertensos)

SK_{Ca}: Canais para potássio dependentes de cálcio de baixa condutância

VE: Ventrículo esquerdo

VD: Ventrículo direito

1. INTRODUÇÃO

O conhecimento científico atual sobre a progesterona pode ser atribuído a uma longa história iniciada no século XVII por Regnier de Graaf. Considerado pai da biologia reprodutiva moderna, ficou conhecido por seu trabalho científico sobre órgãos reprodutivos (Setchell 1974; Houtzager 1981). Nos dias atuais seu nome ainda é associado ao corpo lúteo, às trompas de Falópio e aos folículos ovarianos (Houtzager 2000). Além de ser pioneiro ao publicar as descrições do sistema reprodutor feminino e do corpo lúteo em 1672, De Graaf foi o primeiro a observar a mudança na estrutura do ovário antes e após o acasalamento (Mann 1976). Apesar de se basear em uma teoria infundada, seu palpite sobre a função do corpo lúteo foi perspicaz para a época, pois pensava que todo o conteúdo do folículo constituía o óvulo e dessa forma deduziu que o desenvolvimento da camada lútea era para extrair o óvulo do folículo. Em anos subsequentes outros pesquisadores tentaram designar uma função ao corpo lúteo, mas não houve uma conclusão (Corner 1974).

Foi então que em 1898, mais de 200 anos após a publicação do livro de Graaf, o histologista Louis-Auguste Prenant e o embriologista Gustav Born, sugeriram a função de secreção interna ao corpo lúteo. Ambos tinham concepções diferentes em relação a essa função endócrina. Prenant acreditava que era para suprimir a ovulação durante a gravidez e Born acreditava que era para proteger o embrião e facilitar sua implantação no útero. Devido as dificuldades experimentais, Prenant não conseguiu provar sua teoria. Born também não conseguiu testar sua hipótese devido uma doença fatal, mas em seu leito de morte exigiu que o ex-aluno ginecologista, Ludwig Fraenkel, continuasse os experimentos (Corner 1974).

Em 1910, Fraenkel conseguiu provar a teoria de Gustav Born (Fraenkel 1903), seus experimentos constituíram a primeira evidência real apontando para o corpo lúteo como glândula de secreção interna (Allen 1970) necessária para a transformação da mucosa uterina da fase proliferativa para a secretória (Slotta 1975), além disso, expos que os ovários

contribuíam para a gravidez e não somente com o fornecimento de óvulos. Os anos seguintes apenas deram evidências adicionais de que o corpo lúteo era de fato uma glândula de secreção interna (Allen 1970).

Na mesma época, Paul Ancel e Paul Bouin, ambos pesquisadores franceses, estudaram outro aspecto da fisiologia do corpo lúteo, a histologia do endométrio do coelho na gestação e fizeram a suposição que alterações histológicas do endométrio eram produzidas pela atividade endócrina do corpo lúteo (Corner 1974).

As descobertas feitas por Fraenkel, Ancel e Bouin forneciam instruções precisas que permitiam identificar e isolar o hormônio do corpo lúteo, no entanto, devido a primeira guerra mundial não foi possível reunir os fatos descobertos. Somente em 1926, Willard Allen, médico e químico orgânico, convidado a se juntar ao professor George Corner na Universidade de Rochester, conseguiram reunir as pesquisas realizadas até o momento e assim, iniciaram os experimentos (Corner 1974).

Após dois anos incessantes de experimentos, Allen e Corner finalmente conseguiram constatar que nos extratos do corpo lúteo havia um hormônio especial que preparava o útero para receber o embrião e induzia a proliferação do endométrio preparando para a gestação (Allen & Corner 1929a, b; Corner 1974).

O próximo passo consistia em extrair o hormônio para sua forma mais pura. A corrida pelo isolamento era clara, pois, cinco laboratórios (1. Karl Slotta, Erich Fels e Hans Ruschig; 2. Fevold e Hisaw; 3. Allen e Winterstein; 4. Hartmann e Wettstein; 5. Butenandt e Westphal) haviam anunciado a obtenção da fração cristalina por meio dos extratos do corpo lúteo, mas nenhum detalhe definitivo das propriedades físicas havia sido fornecido (Allen & Wintersteiner 1934; Slotta 1975).

Em 1930, durante o processo de obtenção do hormônio em forma cristalina, Allen e Corner resolveram nomear o hormônio do corpo lúteo de progestina (Corner 1974) e durante 5

anos o termo foi usado na literatura evidenciando o significado literal da palavra de hormônio que suporta ou auxilia a gravidez (Allen 1970).

Para ajudar no trabalho químico Allen convidou Oskar Wintersteiner, da Universidade de Columbia, a se juntar em suas pesquisas. Wintersteiner era treinado na técnica de microanálise e identificação, e assim, juntos conseguiram obter o hormônio na forma cristalina em 1933 e no mesmo ano completaram a purificação e a fórmula empírica (Allen & Wintersteiner 1934; Allen 1974). Em 1934 os grupos de pesquisadores envolvidos anunciaram o hormônio na forma cristalina (Allen & Wintersteiner 1934; Butenandt & Westphal 1934; Hartmann & Wettstein 1934; Slotta *et al.* 1934; Allen 1974). Em sua publicação Allen e Winterstein continuaram a utilizar o nome progestina para se tratar do hormônio descoberto e agora isolado, Butenandt não selecionou nenhum nome em seu artigo, no entanto, Karl Slotta decidiu intitular de *luteosterone*, devido o prefixo '*luteo*' se referir ao corpo lúteo e o '*sterone*' identificar o hormônio como um cetosteróide (Allen 1970).

No mesmo ano, Aldoph Butenandt determinou a fórmula estrutural e em poucos meses produziram o hormônio sinteticamente ao converter o pregnanodiol em uma forma quimicamente pura (Butenandt & Schmidt 1934; Fernholz 1934; Allen 1974; Corner 1974).

Em 1935, Allen foi convidado para ser delegado oficial de uma Conferência Especial da Organização da Saúde da Liga das Nações, em Londres, responsável por estabelecer padrões internacionais para hormônios sexuais. Nesse evento o nome progesterona foi concretizado com a ajuda de Alan Parkes, conhecido pelas contribuições em fisiologia reprodutiva, Guy Marrian conhecido por isolar estriol e pregnanodiol da urina de grávidas e Willard Allen. Em busca de um nome ideal, consideraram as palavras progestenona e progesterona, nomes que Corner e Allen já haviam sugerido a Slotta alguns meses antes via correspondência. Parkes e Marrian convenceram Allen de que progesterona era uma palavra mais eufônica que progestenona, além de descrever melhor as propriedades biológicas e químicas do hormônio (Allen 1970, 1974).

Alguns dias depois durante um jantar dado pelo presidente da conferência, com o objetivo de tentar convencer os cientistas a utilizarem o nome progesterona, Allen e seu grupo propuseram o nome à Butenandt e à Karl Slotta. Para que houvesse concordância, foi enfatizado que a progesterona possuía o "progest" de progestina e o "sterone" de *luteosterone*. Assim, mediante aprovação dos pesquisadores envolvidos, foi recomendado durante a conferência a adoção do nome progesterona para o hormônio progestacional cristalino puro, ademais, os nomes testosterona, estrona, estradiol, estriol e androsterona emergiram desta conferência e ainda são utilizados mundialmente (Allen 1970; Slotta 1983). Prontamente em 1935, Allen, Butenandt, Corner e Slotta publicaram juntos o nome progesterona para unificação e utilização na literatura científica (Allen *et al.* 1935).

Logo a progesterona (P4) foi considerada para aplicação em terapia humana, principalmente para reposição hormonal (Korenshevsky & Jones 1948) e contracepção oral (Pincus *et al.* 1958; Goldzieher 1964), no entanto, a síntese desse hormônio a partir do colesterol realizada por Butenandt em 1939 consistia em um processo de alto custo e pequena quantidade (Butenandt & Westphal 1934; Norris 1987). E então, Russel Marker em 1943 ao utilizar uma planta mexicana, *Dioscorea*, como matéria-prima, gerou menores custos no processo de produção do hormônio, assim, além da produção em larga escala ser estimulada por esse processo, a progesterona sintetizada se tornou precursora preferencial na preparação industrial da cortisona (Marker *et al.* 1947; Diczfalusy 1979).

Apesar da produção em larga escala, a progesterona não havia sido administrada via oral devido as suas características de má absorção e liberação rápida (Maxson & Hargrove 1985; Sitruk-ware *et al.* 1987), em razão disso, foram disponibilizados derivados sintéticos, com o objetivo de imitar as funções biológicas do hormônio natural, porém com biodisponibilidade maior (Sitruk-ware *et al.* 1987). Essas substâncias são conhecidas como progestinas sintéticas, sua síntese procede de moléculas semelhantes à progesterona ou testosterona (Figura 1) e entre os compostos mais conhecidos estão o acetato de medroxiprogesterona (MPA), o levonorgestrel (LNG) e o acetato de noretidrona (NETA) (Maxson & Hargrove 1985; Sitruk-ware *et al.* 1987; Stanczyk *et al.* 2013; Trabert *et al.* 2020).

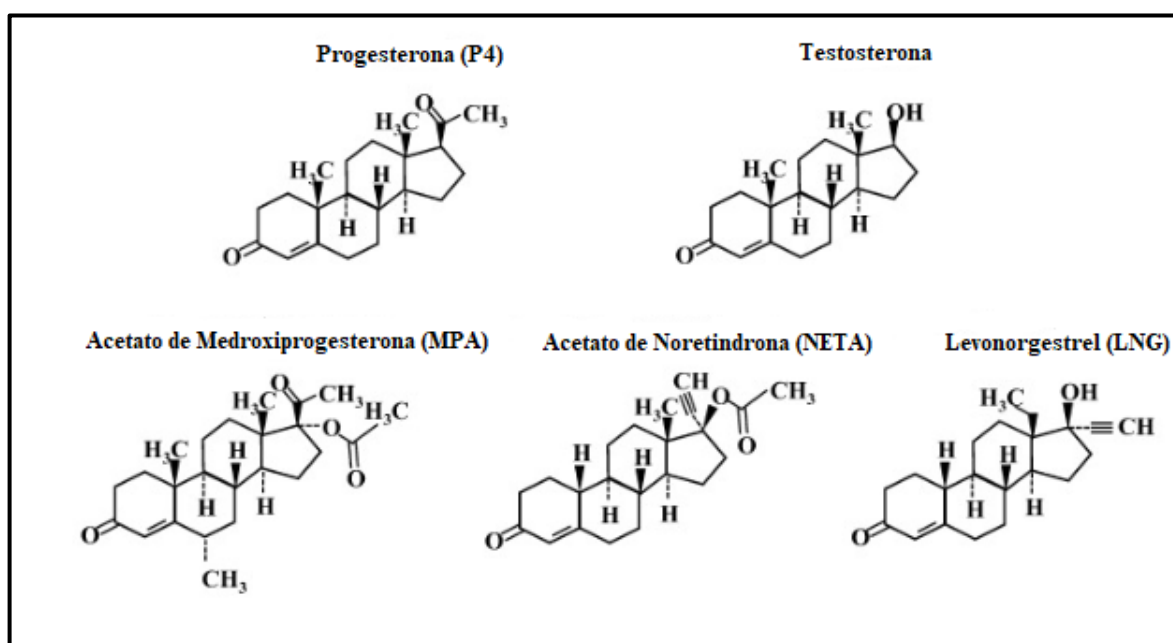


Figura 1. Estruturas químicas da progesterona e testosterona e dos seus derivados sintéticos (traduzido de HOUSHDARAN *et al.*, 2020)

Quando comparados a P4, esses compostos se diferem não só na estrutura química como também em propriedades farmacológicas e podem se ligar a outros receptores da família dos esteroides e assim produzir efeitos antiandrogênicos ou androgênicos, antiestrogênicos ou estrogênicos, antimineralocorticoides ou similar a glicocorticoides (Sitruk-ware *et al.* 1987).

Embora apresentem biodisponibilidade maior que a P4, as progestinas sintéticas apresentavam diversas desvantagens e não eram capazes de reproduzir por completo a atividade

biológica do hormônio natural (Maxson & Hargrove 1985). Assim, pesquisas foram iniciadas na tentativa de gerar uma forma oral ativa de P4 e então, no final dos anos 70, foi demonstrado que a diminuição do tamanho das partículas de progesterona abaixo de 10 mm através da micronização aumentava substancialmente a biodisponibilidade do hormônio. E nos anos 80 uma forma micronizada oral suspensa em óleo tornou-se disponível na França (Maxson & Hargrove 1985; De Lignières 1999).

A progesterona micronizada oral (PMO) é idêntica a progesterona natural (Lieberman & Curtis 2017). A P4 é produzida de forma genuína e preponderante pelo corpo lúteo nos ovários durante o ciclo sexual mensal feminino (Graham & Clarke 1997) Outros órgãos como os testículos, suprarrenais e a placenta, são capazes de produzir a P4, mas em menor quantidade comparada aos ovários (Graham & Clarke 1997; Kaore *et al.* 2012; Lieberman & Curtis 2017).

A síntese e secreção de P4 em mulheres é controlada pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-ovariano e este por sua vez é regulada por um mecanismo de retroalimentação negativa. Os componentes essenciais para funcionamento do eixo incluem o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), as gonadotrofinas e os ovários. Assim, o neurônio parvicelular situado no hipotálamo sintetiza e libera o GnRH que estimula a liberação da gonadotrofina, o hormônio luteinizante (LH) e este estimula a produção da P4 a partir dos ovários (Schally *et al.* 1971; Hall & Gomez-pan 1976).

O LH se liga ao seu receptor acoplado a proteína G_{α} , este ativa a adenilil ciclase que gera cAMP e estimula uma cascata de sinalização que acarreta em captação de colesterol que pode ser originado via acetil co-A e via captação de lipoproteína plasmática (Carr *et al.* 1982). Por meio da enzima citocromo P450, o colesterol é convertido em pregnenolona e a enzima 3β -hidroxidesidrogenase (3β -HSD) converte a pregnenolona em progesterona (Rondell 1974), como demonstrado na figura 2.

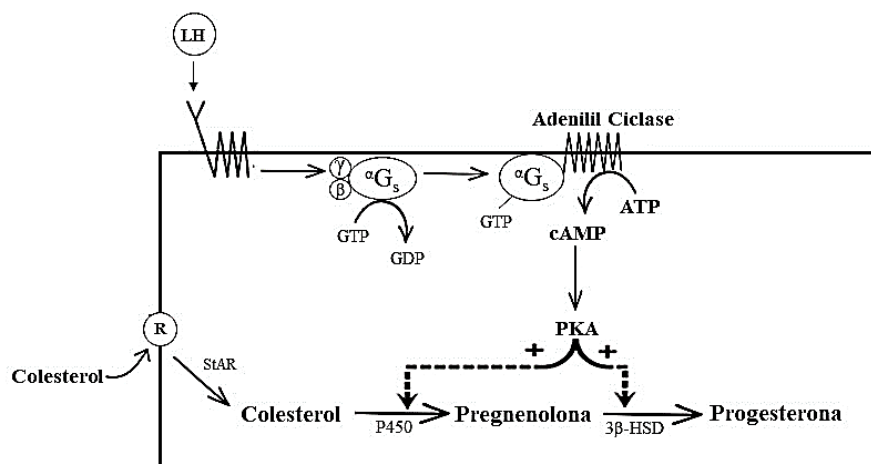


Figura 2. Formação da progesterona (Erickson & Chang 2007, modificado).

A P4 proveniente dos ovários é liberada no sangue para exercer seus efeitos fisiológicos, sendo que 17 % se liga com alta afinidade a transcortina (globulina de ligação ao corticosteroide) (Graham & Clarke 1997) com meia-vida de 6 minutos e 80 % se liga com baixa afinidade à albumina apresentando meia-vida de 42 minutos (Kuhl 2005). A progesterona de origem suprarrenal é convertida em andrógenos, glicocorticoides e mineralocorticoides (Taraborrelli 2015) enquanto que a de origem placentária é convertida apenas em glicocorticoides e mineralocorticoides (Sanderson 2009).

A P4 livre circulante modula seus efeitos fisiológicos principalmente por meio de sinalizações denominadas clássicas ou do tipo genômico (Garg *et al.* 2017). Essa via é mediada por um receptor de progesterona nuclear (PRn) que foi inicialmente caracterizado em aves e mamíferos na década de 70 (Milgrom *et al.* 1970; Sherman & Corvol 1970; Leavitt & Blaha 1972; O'Malley & Buller 1977), na época foi demonstrado que o PRn era um dímero composto por duas proteínas, A e B.

O mecanismo de ação via sinalização clássica ocorre de forma lenta, em um prazo de horas ou dias (Thomas 2008) e inicia com a P4 difundindo pela membrana celular, visto sua característica lipofílica, com o objetivo de alcançar o núcleo e interagir com os receptores PR-A e PR-B. Quando a P4 se liga ao PR ocorre dimerização do receptor e autofosforilação, o que permite formar e ativar o complexo hormônio-receptor e dessa forma se ligar aos elementos de

resposta a progesterona (PREs), o que possibilita regular a transcrição e expressão gênica (Tsai & Malley 1994; Jacobsen & Horwitz 2012). Existe uma terceira isoforma do receptor de progesterona, o tipo C (Wei *et al.* 1990), encontrada de forma abundante no miométrio (Condon *et al.* 2006; Scarpin *et al.* 2009). Estudos sugerem que o receptor PR-C pode melhorar ou gerar efeitos antagonistas das isoformas A e B (Wei *et al.* 1996, 1997; Condon *et al.* 2006).

No entanto, a P4 também pode gerar efeitos hormonais rápidos sem ativação transcricional, esta forma é chamada de sinalização não clássica, não-genômica ou ainda extra-nuclear (Garg *et al.* 2017). Essa via foi caracterizada em 1942, quando Hans Selye, obteve um efeito anestésico imediato em ratos em decorrência da administração aguda de P4, demonstrando pela primeira vez, em nível tecidual, a ação rápida do esteroide (Selye 1942). As ações dessa via são mediadas por receptores de membrana (mPRs) (Zhu *et al.* 2003; Thomas 2008; Pang *et al.* 2015) com três principais isoformas mPR α , mPR β e mPR γ , pertencentes à família de receptores de progesterona e adiponectina Q de sete domínios transmembrans (PAQRs) (Thomas 2008). Em tese, a ligação entre a P4 e o mPR ocorre na superfície celular e de forma ágil gera segundos mensageiros (Smith *et al.* 2008). A sinalização não-genômica também pode ser mediada por outros receptores de membrana, denominados de componente 1 e 2 da membrana do receptor de progesterona (PGRMC1 e PGRMC2) (Garg *et al.* 2017; Mittelman-smith *et al.* 2017), esses receptores podem ser expressos em tecidos reprodutivos (Mittelman-smith *et al.* 2017) e em regiões hipotalâmicas, incluindo os locais de projeção, pressupondo dessa forma, envolvimento no controle das funções neuroendócrinas (Krebs *et al.* 2000; Intlekofer & Petersen 2012). Ademais, a ação não genômica também pode ocorrer via PR citoplasmático ou por meio de sinalização intracelular independentes de receptor (Falkenstein *et al.* 2000; Garg *et al.* 2017).

Os mPRs são expressos em vários tecidos humanos como o útero, ovário, intestino, rim e tecido nervoso (Zhu *et al.* 2003; Thomas *et al.* 2007). Da mesma forma, os PRn também são

amplamente expressos no sistema reprodutor feminino, hipófise, pâncreas, testículos, fígado, adrenais e diversos outros órgãos, mostrando a capacidade da progesterona de atuar tanto em tecidos reprodutivos como não reprodutivos (Asavasupreechar *et al.* 2020). Ademais, alguns estudos mostraram a expressão desses receptores em células do músculo liso vascular da aorta (Nakamura *et al.* 2005), em vasos uterinos (Bergqvist *et al.* 1993), em células vasculares endoteliais e musculares (Vázquez *et al.* 1999; Thomas & Pang 2013), evidenciando um papel significativo da P4 sobre o sistema vascular que inclui, de forma geral, a formação de mediadores endoteliais que são importantes para a homeostase vascular (Qiao *et al.* 2008; Santos *et al.* 2014).

A homeostase vascular é preservada devido as ações realizadas por uma monocamada de células: o endotélio. Essa monocamada reveste a parte interna dos vasos sanguíneos e linfáticos, sendo que até o início da década de 70 era vista apenas como uma barreira física entre as células sanguíneas e os tecidos circundantes (Furchgott & Zawadzki 1980; Aird 2007). Atualmente, sabe-se que o endotélio é de extrema importância na fisiologia vascular e desempenha funções essenciais que incluem a participação das respostas do sistema imune (Aird 2007) e a regulação do deslocamento de substâncias devido sua característica de barreira semipermeável (Florey 1966; Minshall & Malik 2006). Além disso, também impede a adesão, agregação e ativação plaquetária (Vanhoutte 1991; Michiels 2003; Verhamme & Hoylaerts 2006) por meio de vários mecanismos, dentre eles, a geração de forças repulsivas que afastam as plaquetas do endotélio, por apresentarem carga eletronegativa, e a síntese e liberação de óxido nítrico (NO) e prostaciclina (PGI₂) que inibem a ativação plaquetária (Ruggeri 2003). Além da função antiplaquetária, são atribuídos ao NO e a PGI₂, a ação vasodilatadora que juntamente com outras substâncias produzidas e liberadas pelo endotélio, controlam o tônus vascular (Busse *et al.* 1985; Aird 2007).

O controle do tônus vascular, definido como a capacidade de modular o grau de contração do músculo liso adjacente, pôde ser comprovado por Furchgott & Zawadzki ao demonstrar que a vasodilatação induzida por acetilcolina (ACh) em anéis de aorta de coelhos exigia a presença de células endoteliais para que ocorresse o relaxamento do músculo liso vascular (Furchgott & Zawadzki 1980). Assim como a ACh, em várias artérias isoladas, a bradicinina (BK), umas das primeiras substâncias vasodilatadoras dependentes do endotélio descritas, também provoca o relaxamento do músculo liso vascular (MLV) (Cherry *et al.* 1982; Furchgott 1983; Shimokawa *et al.* 1987; Vanhoutte 1989). Semelhante a essas substâncias, a P4 também possui capacidade de promover a vasodilatação em vários leitos vasculares (Molinari *et al.* 2001; Minshall *et al.* 2002; Pang *et al.* 2015; Giesen *et al.* 2020).

Ao demonstrar que o endotélio apresentava uma função essencial para o relaxamento do MLV, Furchgott & Zawadzki mostraram que essa resposta ocorria devido a liberação de uma substância, que inicialmente denominaram de fator relaxante derivado do endotélio (EDRF) (Furchgott & Zawadzki 1980) e mais tarde identificaram como óxido nítrico (NO) (Ignarro *et al.* 1987; Palmer *et al.* 1987).

O NO é um radical livre lipofílico gasoso que pode ser sintetizado por uma enzima conhecida como óxido nítrico sintase (NOS) (Kone *et al.* 2003), sendo descritas três isoformas: a isoforma I ou NO-sintase neuronal (nNOS) (Bredt & Snyder 1990), expressa principalmente no tecido nervoso (Moncada & Higgs 1993; Palmer 1993), a isoforma II ou NO-sintase induzível (iNOS) (Lyons *et al.* 1992), presente em tecidos submetidos a estímulos inflamatórios (Kone *et al.* 2003; Oess *et al.* 2006) e a isoforma III ou NO-sintase endotelial (eNOS) (Sessa *et al.* 1992), expressa de forma predominante no endotélio. A eNOS e a nNOS são constitutivas, enquanto que a iNOS é induzível (Moncada & Higgs 1993; Palmer 1993; Stevens-Truss *et al.* 1997). De forma geral, as 3 isoformas da NOS apresentam estruturas semelhantes e são

sintetizadas como monômeros, no entanto é necessário a formação de homodímeros para produzir NO (Kone *et al.* 2003; Förstermann & Münzel 2006; Oess *et al.* 2006).

Os monômeros possuem um domínio funcional redutase que está ligado a um domínio oxigenase, estes domínios apresentam regiões de ligação que reconhecem os cofatores importantes para a formação de NO (Stevens-Truss *et al.* 1997; Förstermann & Münzel 2006) que incluem fosfato de nicotinamida adeninadinucleotídeo (NADPH), flavina mononucleotídeo (FMN) e flavina adenina dinucleotídeo (FAD) (Bredt *et al.* 1991; Moncada & Higgs 1993; Stevens-Truss *et al.* 1997; Kone *et al.* 2003; Förstermann & Münzel 2006) no domínio redutase e sítios de ligação para o substrato L-arginina, oxigênio molecular (O_2), protoporfirina de ferro IX (grupo heme) e (6R)-5,6,7,8-tetrahidrobiopterin (BH_4) no domínio oxigenase (Stevens-Truss *et al.* 1997; Ghosh & Salerno 2003; Kone *et al.* 2003; Förstermann & Münzel 2006).

A presença do grupo heme permite a interação entre os domínios e juntamente com a BH_4 e a L-arginina promove a dimerização da NOS e após, a sua estabilidade como dímero (Alderton *et al.* 2001). Assim, as flavinas FAD e FMN do domínio redutase transferem elétrons derivados do NADPH para o grupo heme do domínio oxigenase. Nesta etapa é necessário a presença do complexo cálcio-calmodulina (Ca^{2+}/CaM) ligado para que o fluxo de elétrons seja facilitado entre os domínios (Alderton *et al.* 2001). Então, esses elétrons por sua vez, são utilizados para ativar e reduzir o O_2 . A seguir, duas etapas ocorrem para formar o NO: em um primeiro momento a NOS hidroxila seu precursor fisiológico, a L-arginina (Sakuma *et al.* 1988; Moncada & Higgs 1993; Palmer 1993), em N^{ω} -hidroxi-L-arginina (NHA) e em seguida, o NHA é oxidado em L-citrulina e NO (Cohen & Vanhoutte 1995; Stevens-Truss *et al.* 1997; Alderton *et al.* 2001).

O NO formado estimula a guanilil ciclase solúvel no MLV, o que ocasiona em aumento da concentração de monofosfato de guanosina cíclico (cGMP). Em seguida, o cGMP ativa a proteína cinase G (PKG) e esta por sua vez, altera o estado de fosforilação da cadeia leve da

miosina provocando um relaxamento do MLV subjacente (Rapoport & Murad 1983; Ignarro *et al.* 1987; Furchgott, RF; Vanhoutte 1989; Cohen & Vanhoutte 1995). Além disso, o relaxamento do MLV via NO também pode ocorrer gerando hiperpolarização, seja por meio da ativação de canais para potássio como pelo estímulo da atividade da bomba Na^+/K^+ -ATPase (Archer *et al.* 1994; Cohen & Vanhoutte 1995).

O NO produzido pela eNOS tem como efeitos fisiológicos inibir agregação e adesão plaquetárias (Radomski *et al.* 1987), inibir a ativação de leucócitos (Kubes *et al.* 1991) e a proliferação celular do MLV (Garg & Hassid 1989), atuar em reações imunológicas (Moncada 1997), além de agir como cardioprotetor visto que atenua a aterosclerose, principalmente na circulação coronariana (Curtis & Pabla 1997). A progesterona estimula a atividade da eNOS em vários leitos vasculares como na aorta (Selles *et al.* 2001; Mendiberri *et al.* 2006; Cutini *et al.* 2014), em artérias mesentéricas de ratos (Chataigneau *et al.* 2004) bem como em células endoteliais da veia umbilical humana (Pang *et al.* 2015). Além disso, Molinari e colaboradores administraram a P4 de forma aguda em artérias coronárias de porcos e tiveram como resultado um relaxamento dependente do endotélio por meio de um mecanismo que envolvia a liberação de NO (Molinari *et al.* 2001).

Assim como há liberação de NO pelo endotélio, há também liberação de prostaciclina (PGI_2), principal prostaglandina vasodilatadora, que inicialmente foi descoberta pelo seu potencial antitrombótico e antiplaquetário (Moncada *et al.* 1976, 1977; Tateson *et al.* 1977), mas que também desempenha um papel importante no relaxamento dependente do endotélio em leitos vasculares (Bunting *et al.* 1976; Dusting *et al.* 1977). A PGI_2 é o principal metabólito derivado da ciclooxygenase (COX) e seus efeitos vasodilatadores resultam de sua ligação com seu receptor preferencial IP, que ao ser ativado causa aumento da cAMP intracelular via estimulação da adenilil ciclase (Armstrong *et al.* 1989; Boie *et al.* 1994; Wise & Jones 1996). A estimulação da produção de PGI_2 pode ser induzida pela P4 (Makila *et al.* 1982; Selles *et al.*

2002; Hermenegildo *et al.* 2005; Mendiberri *et al.* 2006) e dessa forma pode ativar os efeitos protetores da PGI₂ que inclui a prevenção doenças coronarianas, graças a potente função antitrombótica, e a capacidade de redução da pressão arterial sistêmica e vasodilatação de artérias isoladas (Henderson *et al.* 1983; Cheng *et al.* 2002; Smyth *et al.* 2009; Chu *et al.* 2015).

Apesar de considerados os principais fatores liberados pelo endotélio, o NO e a PGI₂ não explicam todas as repostas de relaxamento vascular dependente do endotélio. Vários estudos demonstraram a existência de outras vias que causam relaxamento do músculo liso subjacente ao gerar hiperpolarização (Chen *et al.* 1988; Feletou & Vanhoutte 1988; Taylor & Weston 1988; Cohen & Vanhoutte 1995; Edwards *et al.* 1998). Essa via, denominada de hiperpolarização dependente do endotélio (EDH) (Félétou & Vanhoutte 2006a, 2009; Vanhoutte 2016) engloba muitos sinais possíveis que podem gerar hiperpolarização e, assim, relaxar o músculo liso vascular (Vanhoutte 2016).

Vários estudos apontam o íon potássio (K⁺) como um dos candidatos que induz repostas do tipo EDH (Edwards *et al.* 1998, 1999; Bény & Schaad 2000; Dora & Garland 2001), ademais, há outros fatores como ativação dos canais endoteliais para potássio sensíveis a cálcio, de baixa condutância (SK_{Ca}) e de condutância intermediária (IK_{Ca}) (Edwards *et al.* 1998, 2010; Absi *et al.* 2007), junções comunicantes (Kühberger *et al.* 1994; Griffith 2004) sulfeto de hidrogênio (H₂S) (Zhao *et al.* 2001; Bianca *et al.* 2011), o próprio NO (Tare *et al.* 1990; Edwards *et al.* 2001) e PGI₂ (Corriu *et al.* 1996; Parkinson *et al.* 2004), além do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Sobey *et al.* 1997; Matoba *et al.* 2000) e ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs) (Fleming 2000; Campbell & Falck 2007; Campbell & Fleming 2010).

Os EETs são derivados do citocromo P450 (CYP) e hiperpolarizam o MLV ativando canais para potássio sensíveis ao Ca²⁺ (Félétou & Vanhoutte 2000; Zeldin 2001). Vários estudos mostram sua ação vasodilatadora (Proctor *et al.* 1987; Rosolowsky & Campbell 1993; Eckman *et al.* 1998; Gebremedhin *et al.* 1998; Miura & Gutterman 1998). Já o H₂O₂, espécie reativa de

oxigênio (ERO), pode ser produzido pelas células endoteliais de forma direta ou como subproduto da liberação do ânion superóxido (Heinzel *et al.* 1992; Matoba *et al.* 2000; Shimokawa 2010) e causar hiperpolarização e consequente relaxamento em vários leitos vasculares (Matoba *et al.* 2002; Miura *et al.* 2003; Yada *et al.* 2003; Liu *et al.* 2011). No entanto, o H₂O₂ em altas concentrações, induz o leito arterial a contrações (Sotníková 1998; Shen *et al.* 2000; Ardanaz *et al.* 2008). Da mesma forma, quando em concentrações elevadas, outras ERO, como o ânion superóxido (O₂^{•-}) e de nitrogênio, como o peróxido nitrito (ONOO⁻), são considerados as principais causas de estresse oxidativo e podem inibir as vias vasodilatadoras dependentes do endotélio (Vanhoutte *et al.* 1986; Münzel *et al.* 2005), gerando uma disfunção endotelial (Griendling & Fitzgerald 2003; Touyz 2004; Félétou & Vanhoutte 2006b).

Uma função primordial do endotélio é regular a homeostase vascular, mantendo o equilíbrio entre os fatores que geram vasoconstrição e vasodilatação. Quando a liberação de NO e outros fatores que levam a hiperpolarização dependentes do endotélio é prejudicada, e somado a isso, há uma produção de agentes vasoconstritores aumentada, ocorre a disfunção endotelial (Félétou & Vanhoutte 2006b; Vanhoutte 2009) que além de ser associada a processos fisiopatológicos como hipertensão, aterosclerose, doença coronariana, entre outras, é considerada precursora comum no desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV) (Busse & Fleming 1996; John & Schmieder 2000; Vanhoutte *et al.* 2009).

Sendo considerada uma das principais causas de morte no mundo, em 2016, cerca de 17,6 milhões de pessoas morreram por DCV, representando 31 % da população global e em 2030 este número poderá chegar a 23,6 milhões (Benjamin *et al.* 2019). A hipertensão, definida como aumento da pressão arterial (PA), é um dos principais fatores de risco para desenvolver as DCV (Vasan *et al.* 2001; Kim *et al.* 2006; Ong *et al.* 2008; Pérez-López *et al.* 2009; Yanes & Reckelhoff 2011), afeta cerca de 72 milhões de adultos norte-americanos (Chobanian *et al.*

2003; United States 2010) e 36 milhões de adultos brasileiros (Malachias *et al.* 2016) sendo o principal fator de risco global para mortalidade (Ezzati *et al.* 2002; Mosca *et al.* 2007).

Muitos estudos apontam que no período reprodutivo ou fase pré-menopausa, as mulheres apresentam baixa incidência de DCV, incluindo a hipertensão arterial, comparado a homens da mesma idade (Atsma *et al.* 2006; Polotsky & Polotsky 2010; Khalil 2013; Boese *et al.* 2017). Após essa fase, na pós-menopausa, estudos apontam que as mulheres podem apresentar elevação da pressão arterial, aumentando assim a incidência de DCV (Dubey *et al.* 2002; Benjamin *et al.* 2019). Além disso, entre a sexta e a sétima década de vida das mulheres, a prevalência de hipertensão e a incidência de DCV, se tornam mais elevadas comparados a homens na mesma faixa etária (Boese *et al.* 2017; Benjamin *et al.* 2019). A cardioproteção que ocorre na fase pré-menopausa é atribuída aos hormônios sexuais, progesterona e os estrogênios, que ao reduzir durante a pós menopausa aumenta o risco de DCV (Brandin *et al.* 2003; Santos *et al.* 2004; Cutini *et al.* 2014; Boese *et al.* 2017).

O efeito da progesterona e sua relação com a função endotelial ainda permanece escasso na literatura. Nossa hipótese é que a progesterona apresente efeitos benéficos ao sistema vascular e previna uma possível disfunção endotelial causados pela ovariectomia em ratas hipertensas. Tendo em vista que a disfunção endotelial é um denominador comum para o desenvolvimento de DCV, o conhecimento dos possíveis benefícios relacionados ao tratamento com progesterona nesse contexto torna-se de suma importância para a compreensão dos mecanismos envolvidos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

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

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Analisar os efeitos do tratamento com progesterona sobre a pressão arterial sistólica (PAS) em ratas SHR ovariectomizadas
- ✓ Verificar a pressão de perfusão coronariana (PPC) de SHR ovariectomizadas e ovariectomizadas tratadas com progesterona
- ✓ Avaliar a participação de NO, prostanoídes (PNs) e hiperpolarização dependente do endotélio (EDH) na reatividade coronariana dependente do endotélio em ratas SHR com e sem tratamento com progesterona
- ✓ Averiguar os parâmetros ponderais em ratas SHR com e sem tratamento com progesterona
- ✓ Investigar a morfologia endotelial de ratas SHR com e sem tratamento com progesterona

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais Experimentais

Foram utilizadas ratas adultas da linhagem *SHR (Spontaneously Hypertensive Rats)*, com 8 semanas de idade. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Os protocolos de pesquisa foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do CCS da UFES sob o número 42/2018. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (5 animais por gaiola), com livre acesso à água e à ração (Purina Labina, SP – Brasil), em ambiente sob condições de temperatura (22 °C a 24 °C) e umidade relativa do ar (40 % a 60 %) controladas. O ciclo de luz foi regulado para períodos de 12/12 horas, alternando-se entre claro e escuro.

3.2. Grupos Experimentais

Os animais foram aleatoriamente separados em três diferentes grupos experimentais:

- Grupo 1: Controle (SHAM)
- Grupo 2: Ovariectomizadas (OVX)
- Grupo 3: Ovariectomizadas tratadas com progesterona (OVX-P4)

3.3 Procedimentos Experimentais

A figura 3 resume em uma linha do tempo os procedimentos experimentais realizados.

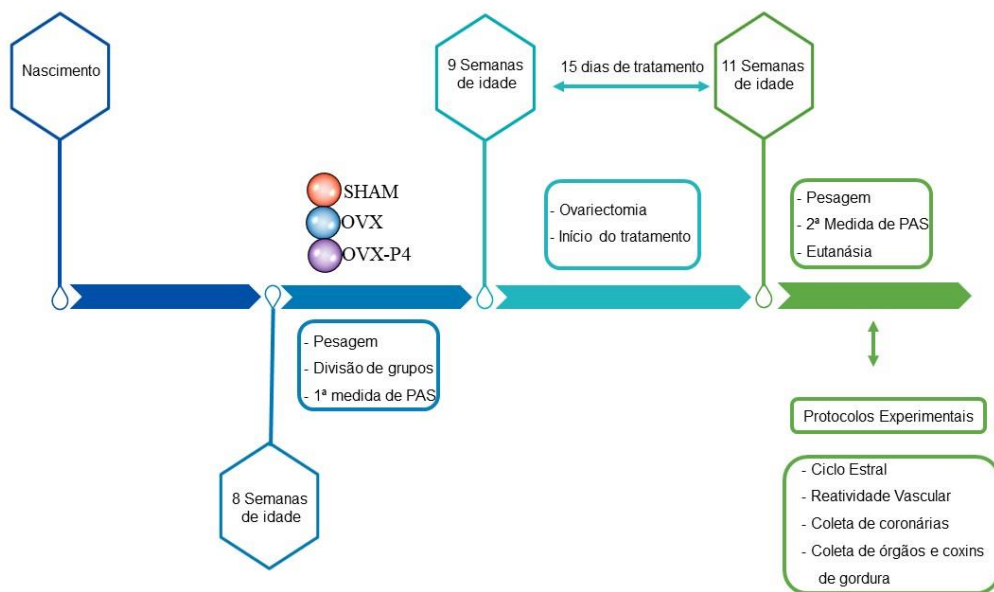


Figura 3. Linha do tempo dos procedimentos experimentais realizados.

3.3.1. Determinação da Fase do Ciclo Estral

O ciclo estral consiste em mudanças morfológicas nos ovários, útero e vagina que são observadas durante 4 a 6 dias. Constituído por 4 fases: proestro, estro, metaestro e diestro, que são caracterizadas por diferentes tipos de células (Mandl 1951; Mendonça *et al.* 2002; Yener *et al.* 2007). Dessa forma, para a identificação da ciclicidade normal e das fases das ratas foram realizados esfregaços vaginais, que consistem na utilização de 10 microlitros de solução salina (NaCl 0,9 %) introduzidos gentilmente na cavidade vaginal das ratas com o auxílio de uma micropipeta, e realizados movimentos circulares suaves para retirada do conteúdo vaginal. Este procedimento foi realizado diariamente entre as 08:00h e 09:00h e as amostras de células epiteliais vaginais foram examinadas sob microscópio óptico conforme descrito em estudos anteriores (Long & Evans 1922; Mandl 1951; Marcondes *et al.* 2002). As ratas que passaram pela ovariectomia permaneceram na fase de diestro (Montes & Luque 1988), dessa forma, para padronizar e assim minimizar a influência da variação hormonal nos diferentes parâmetros estudados, as ratas SHAM eram utilizadas apenas durante a fase diestro.

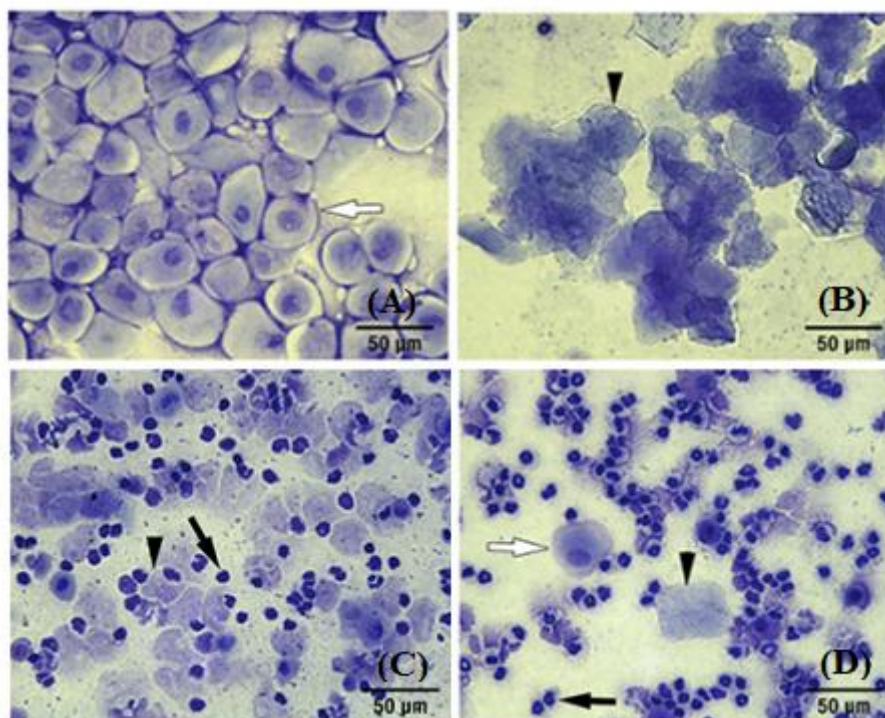


Figura 4. Avaliação citológica de esfregaços vaginais usada para identificar as fases do ciclo estral. Três tipos principais de células são detectados em amostras de esfregaço vaginal: células epiteliais nucleadas, células epiteliais cornificadas e leucócitos. A proporção desses tipos de células presentes no esfregaço pode ser usada para identificar (A) proestro, (B) estro, (C) metaestro ou (D) diestro. Pontas de flecha pretas em B, C e D apontam para células epiteliais cornificadas representativas. As setas pretas em C e D apontam para os leucócitos representativos. As setas brancas em A e D destacam células epiteliais nucleadas representativas (McClean *et al.* 2012; modificado).

3.3.2. Ovariectomia

Após anestesia intraperitoneal com uma mistura de quetamina (70 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) as ratas foram fixadas em camas cirúrgicas em decúbito lateral. Prontamente à tricotomia, as fêmeas foram submetidas a uma incisão de 1 cm a 1,5 cm na pele, entre a última costela e a coxa, a 1 cm da linha mediana. Em seguida foi realizada uma incisão na musculatura abdominal até o alcance da cavidade peritoneal, e por meio desta, ovários e trompas foram exteriorizados para posterior ligadura da tuba uterina e remoção dos ovários. Uma linha de sutura foi utilizada para ligadura da tuba uterina e posterior excisão do ovário. Após esse procedimento a tuba uterina foi recolocada na cavidade abdominal, o músculo foi suturado e em seguida a pele. O mesmo processo foi realizado no lado oposto. Ao final do procedimento, os animais receberam 0,1 ml do antibiótico Enrofloxacina 2,5 % (Flotril®) e 0,01 ml do analgésico Flunixinina 5 % por via intramuscular em dose única e retornaram as gaiolas. As

fêmeas do grupo SHAM foram submetidas à uma cirurgia fictícia, seguindo os mesmos procedimentos e em tempo equivalente, porém sem a retirada dos ovários e sem a ligadura.

3.3.3. Tratamento com Progesterona

O tratamento com progesterona (Progesterona micronizada – Iberoquímica) foi iniciado no mesmo dia da ovariectomia (para evitar a baixa hormonal pós-cirurgia) e realizado durante o período de 15 dias via injeções subcutâneas na concentração: 2 mg/kg/dia, mimetizando as concentrações fisiológicas de P4 observadas na fase diestro do ciclo estral (Karatepe *et al.* 2012; Aksoy *et al.* 2014). Volumes iguais de veículo (óleo de girassol) foram administrados nos animais dos grupos SHAM e OVX, pelo mesmo período.

3.3.4. Avaliação não Invasiva da Pressão Arterial

A pressão arterial sistólica foi avaliada nos animais, antes do início do tratamento (Dia 0) e no dia anterior do protocolo de reatividade vascular (Dia 15), pelo método de pletismografia de cauda. Os animais foram previamente climatizados, durante três dias, antes da mensuração oficial por 10 minutos no equipamento, para adaptarem-se ao pletismógrafo e, desta forma, minimizar a influência do estresse frente ao procedimento e assim, diminuir alterações na resposta pressórica.

No dia do registro os animais foram aquecidos em uma câmara de retenção com um cuff de pulso pneumático acoplado na região próxima a cauda. Um esfigmomanômetro foi insuflado e desinsuflado automaticamente e o valor de pressão arterial sistólica foi coletado automaticamente usando um aparelho (IITC INC/Life Science, 23924 Victory Blvd, Woodland Hills, Ca 91367 – 1253 USA) acoplado a um computador (Baldo *et al.* 2011). A temperatura da sala foi controlada entre 35 °C e 37 °C durante todo o tempo que o animal permaneceu no equipamento. Foi obtida a média de, no mínimo, 5 registros com diferença máxima de 10 mmHg, sendo descartados os registros associados às influências causadas por movimentos dos animais.

3.3.5. Estudos em Coração Isolado (Método Langendorff)

Neste experimento, foi investigada a reatividade vascular do leito coronariano em resposta a doses de BK. Para tanto, ao 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 coleta sanguínea, esses animais tiveram sua 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, ao nível de sua curvatura. Em seguida, a perfusão retrógrada é realizada pelo método de Langerdorff modificado (Hugo Sachs Electronics, March-Hugstetten, Alemanha) sendo que, para a perfusão foi utilizada uma solução nutritora composta de NaCl, 120 mM, CaCl₂ 2H₂O, 1,25 mM, KCl, 5,4 mM, MgSO₄.7H₂O, 2,5 mM, NaH₂PO₄.H₂O, 2,0 mM, NaHCO₃, 27,0 mM, Na₂SO₄, 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 % O₂ e 5 % CO₂) 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 pressão de perfusão coronariana (PPC) basal foi avaliada por meio de um transdutor de pressão (ADInstrument MLT0380/A Reusable BP Transducer), 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). Para leitura dos registros obtidos pelo sistema de aquisição de dados foi utilizado software LabChart 7.3.1 (Copyright © 1994-2011 ADInstruments). Como o fluxo será mantido constante em 10 mL/min, por meio da bomba de rolete, as alterações da PPC podem 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, é 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). Uma vez dentro do VE, o balão é pressurizado, com água, com auxílio de uma seringa de vidro visando manter uma pressão diastólica intraventricular de 10 mmHg. Após 40 minutos de estabilização da preparação de coração isolado, a PPC basal foi determinada e inicia-se o estudo da reatividade coronariana por meio da construção de uma curva dose-resposta de BK (Sigma, St. Louis, MO) administrada 10 *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 (Figura 5).

Após a avaliação funcional, os corações tiveram suas câmaras cardíacas cuidadosamente separadas e pesadas em balança de precisão (SHIMADZU AUY 220) após 24 horas de secagem em estufa a 100 °C para obtenção do peso seco.

3.3.6. Protocolos Experimentais

Protocolo 1

Com objetivo de avaliar a participação do NO na resposta vasodilatadora da BK nos vasos coronarianos, um inibidor inespecífico da NOS, N^o-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 (Santos *et al.* 2004, 2010).

Protocolo 2

Com objetivo de avaliar a participação da PGI₂, 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 (Santos *et al.* 2004, 2010).

Protocolo 3

Com objetivo de avaliar a reposta vasodilatadora independente de NO/PGI₂ 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 ser construída (Santos *et al.* 2004, 2010).

Protocolo 4

Com objetivo de avaliar a resposta vasodilatadora independente de NO/PGI₂/EDH induzida pela BK nos vasos coronarianos, foi realizada inibição combinada das enzimas NOS, COX e CYP com L-NAME (100 μ M), Indometacina (2,8 μ M) e clotrimazol (CLOT; 0,75 μ M) respectivamente. Todos inibidores foram adicionados, simultaneamente, à solução de perfusão pelo menos 20 minutos antes da curva dose-resposta à BK ser construída (Santos *et al.* 2004, 2010).

Para análise dos resultados de reatividade vascular, a resposta vasodilatadora foi expressa como porcentagem da resposta máxima (R_{máx}) induzida pela BK antes e após o bloqueio com agentes farmacológicos. Para cada curva dose-resposta basal foi calculado a área abaixo da curva (AUC) e com o objetivo de comparar a magnitude de efeito dos fármacos sobre a resposta vasodilatadora à BK dos grupos estudados, os resultados foram expressos como diferença da área abaixo da curva (dAUC), calculado como diferença entre as AUCs em relação a AUC da curva controle.

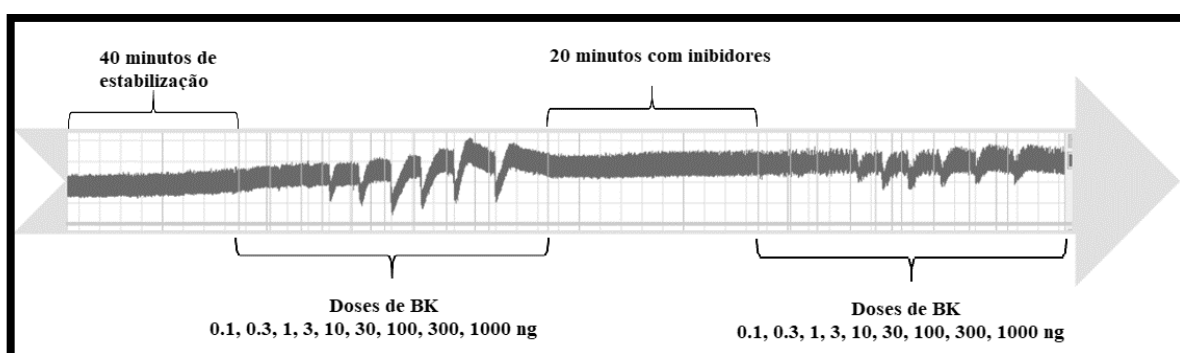


Figura 5. Representação dos protocolos experimentais de reatividade vascular.

3.3.7 Remoção e Pesagem de órgãos e coxins de gordura

Após remoção do coração para o método de Langendorff, todos os coxins de gordura

intra-abdominal, incluindo mesentérico, parametrial, perirrenal e retroperitonal, foram dissecados e pesados imediatamente após a dissecação, assim como, útero, pâncreas, rins, suprarrenais, hipófise e fígado. Após a dissecação e pesagem, o útero era levado para estufa a 100 °C no período de 24 horas para obtenção do peso seco. Todos os pesos dos órgãos e coxins de gordura foram corrigidos pela tibia.

3.3.8. Microscopia eletrônica de varredura

Os ramos descendente anterior da artéria coronária esquerda e septal foram coletados, lavados e abertos longitudinalmente com PBS, e fixados em solução Karnovisk (glutaraldeído 2,5 %, paraformaldeído 2 %, tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2) por 24 horas. As artérias foram, posteriormente, lavadas em tampão cacodilato (0,1 M, pH 7,2), desidratadas em gradiente crescente de etanol e submetidas a secagem por ponto crítico em CO₂ (Autosandri-815, Tousimis). Após montagem em suporte metálico, com o endotélio exposto, as amostras foram revestidas com 10 nm de ouro puro em um revestidor por pulverização a vácuo (Desk V, Denton Vacuum). As imagens das amostras foram obtidas utilizando um microscópio eletrônico de varredura (Jeol, JEM6610 LV).

3.4 ANÁLISES DOS DADOS

As análises estatísticas foram realizadas pelo software GraphPad Prism versão 8.0.0 (San Diego, California, USA). A normalidade dos dados foi confirmada pelo teste de Shapiro-Wilk. Para identificação de *outliers* foi utilizado o ROUT *test* do software GraphPad Prism. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As médias referentes aos dados ponderais e PAS foram avaliadas pela análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA). As curvas dose-resposta foram analisadas pela ANOVA de duas vias (*two-way* ANOVA). Para as comparações entre as médias, utilizamos o teste *post-hoc* de Tukey, e o nível de significância foi estabelecido para valores de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Pressão Arterial Sistólica (PAS)

Na figura 6 podemos observar que tanto no dia 0, quanto no dia 15, a PAS foi similar entre os grupos (Dia 0 – SHAM $155,5 \pm 2,4$ mmHg, OVX $155,4 \pm 0,8$ mmHg, OVX-P4 $158,5 \pm 2,7$ mmHg; Dia 15 – SHAM $165,8 \pm 1,9$ mmHg, OVX $169,1 \pm 1,4$ mmHg, OVX-P4 $170,1 \pm 2$ mmHg), entretanto, foi possível observar o aumento da PAS com a progressão da idade, mas as intervenções realizadas em cada grupo, como a ovariectomia e o tratamento com a progesterona, não afetaram a elevação da PAS.

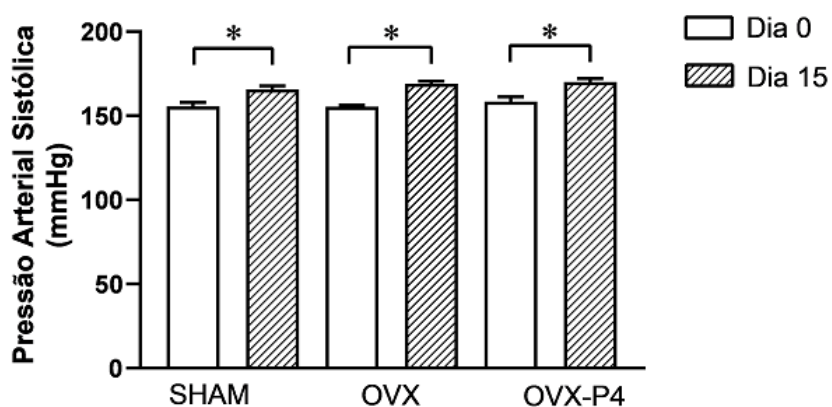


Figura 6. Pressão arterial sistólica em ratas SHR. SHAM (n = 15), OVX (n = 15), OVX-P4 (n = 15). Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM. Utilizamos para análise dos dados *one-way* ANOVA e *post hoc* de Tukey. *p < 0,05 comparado com seus respectivos controles no dia 0.

4.2 Parâmetros Ponderais

Como mostrado na tabela 1, os animais foram pesados no dia da ovariectomia (Dia 0) e no dia da eutanásia (Dia 15) e foi observado que houve aumento do peso corporal em todos os grupos de forma semelhante.

Tabela 1. Valores do peso corporal dos grupos estudados

Peso Corporal (g)			
	SHAM (n = 54)	OVX (n = 53)	OVX-P4 (n = 56)
Dia 0	134 ± 2	137 ± 3	128 ± 2
Dia 15	147 ± 2*	159 ± 4*	153 ± 3*

Os valores foram expressos com média ± EPM. A análise estatística foi realizada por meio de *one-way* ANOVA e *post hoc* de Tukey. *p < 0,05 vs seu controle.

Em relação as gorduras intra-abdominais, o grupo OVX apresentou maiores médias das gorduras perirrenal e retroperitoneal comparado aos outros grupos. Da mesma forma, o grupo OVX-P4 apresentou maior depósito de gordura retroperitoneal comparado ao grupo SHAM. Para verificar a composição total de massa gorda, os valores das gorduras intra-abdominais foram somados e dessa forma foi observado que o grupo OVX obteve maior deposição em relação aos outros grupos. O tratamento com progesterona parece prevenir a deposição de gordura intra-abdominal, visto que, apresentou peso similar ao do grupo SHAM (tabela 2).

Tabela 2. Valores das gorduras intra-abdominais dos grupos estudados

Peso das gorduras intra-abdominais			
	SHAM (n = 54)	OVX (n = 53)	OVX-P4 (n = 56)
Σ Gorduras (mg) / tíbia (mm)	59 ± 2	66 ± 2*#	57 ± 2
GM (mg) / tíbia (mm)	43 ± 2	40 ± 2	39 ± 1
GPr (mg) / tíbia (mm)	6,5 ± 0,5	8,2 ± 0,5*#	6,6 ± 0,4
GPm (mg) / tíbia (mm)	7,5 ± 0,7	8,3 ± 0,6	7,2 ± 0,5
GR (mg) / tíbia (mm)	4,9 ± 0,5	6,7 ± 0,5*#	5,2 ± 0,3*

GM: gordura mesentérica; GPr: gordura perirrenal; GPm: gordura parametrial; GR: gordura retroperitoneal; Σ: somatório. Os pesos foram analisados pela razão gorduras (mg) pelo comprimento da tíbia (mm). Os valores foram expressos com média ± EPM. A análise estatística foi realizada por meio de *one-way* ANOVA e *post hoc* de Tukey. *p < 0,05 vs Sham; #p < 0,05 vs OVX-P4.

Como podemos observar, na tabela 3, após a ovariectomia, os grupos OVX e OVX-P4 tiveram o peso do útero úmido e seco diminuído quando comparados ao grupo SHAM. Em relação ao peso de outros órgãos, observamos que o pâncreas teve um peso maior no grupo

tratado com progesterona. E os ventrículos tiveram os pesos maiores no grupo OVX em relação aos outros grupos. Os demais órgãos apresentados na tabela 3 obtiveram pesos similares entre os grupos.

Tabela 3. Valores dos pesos dos órgãos dos grupos estudados

Peso dos órgãos				
	(n)	SHAM	OVX	OVX-P4
Útero Úmido (mg) / tíbia (mm)	(23)	5 ± 0,5	2 ± 0,3*	2 ± 0,1*
Útero Seco (mg) / tíbia (mm)	(23)	1 ± 0,1	0,5 ± 0,07*	0,5 ± 0,04*
Adrenais (mg) / tíbia (mm)	(22)	0,8 ± 0,03	0,7 ± 0,02	0,8 ± 0,02
Hipófise (mg) / tíbia (mm)	(10)	0,19 ± 0,02	0,23 ± 0,01	0,21 ± 0,00
Pâncreas (mg) / tíbia (mm)	(10)	18 ± 2,0	18 ± 1,0	23 ± 1,0*+
VD Seco (mg) / tíbia (mm)	(10)	0,53 ± 0,01	0,66 ± 0,04*	0,58 ± 0,03
VE Seco (mg) / tíbia (mm)	(10)	2,3 ± 0,03	2,5 ± 0,07*	2,3 ± 0,04

VD: ventrículo direito; VE: ventrículo esquerdo. Os pesos foram analisados pela razão peso visceral (mg) pelo comprimento da tíbia (mm). Os valores foram expressos com média ± EPM. A análise estatística foi realizada por meio de *one-way* ANOVA e *post hoc* de Tukey. *p < 0,05 vs Sham; +p < 0,05 vs OVX; #p < 0,05 vs OVX-P4.

4.3. Pressão de Perfusão Coronariana (PPC) Basal

Conforme mostrado na figura 7, observamos que a PPC basal foi maior no grupo OVX (145 ± 1,7 mmHg) e OVX-P4 (OVX-P4: 145 ± 2,3 mmHg) quando comparado ao grupo SHAM (130 ± 3,8 mmHg).

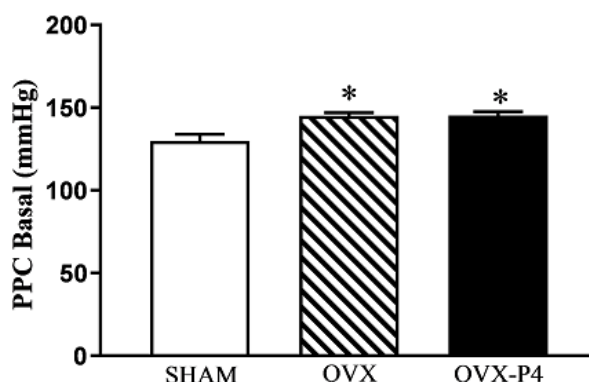


Figura 7. Pressão de perfusão coronariana basal em ratos SHR. SHAM (n = 9), OVX (n = 9), OVX-P4 (n = 9). Os dados foram expressos como média ± EPM. A análise estatística foi realizada por meio de *one-way* ANOVA e *post hoc* de Tukey. *p < 0,05 vs SHAM.

4.4 Reatividade Vascular do Leito Coronariano

A reatividade vascular foi realizada por meio de curvas dose-resposta com concentrações crescentes de BK. O gráfico (figura 8a) mostra a curva basal dos grupos SHAM, OVX e OVX-P4. Como pode ser observado a BK foi capaz de promover vasodilatação em todos os grupos estudados. Contudo, podemos observar que o grupo OVX apresentou um prejuízo no relaxamento da BK e uma menor AUC (figura 8b) comparado ao grupo SHAM ($R_{\text{máx}}$; SHAM: 10 ± 1 %; OVX: 7 ± 1 %). O tratamento com progesterona ($R_{\text{máx}}$; OVX-P4: 11 ± 1 %) foi capaz de prevenir a redução do relaxamento ocorrido pela castração no grupo OVX, apresentando AUC similar ao grupo SHAM.

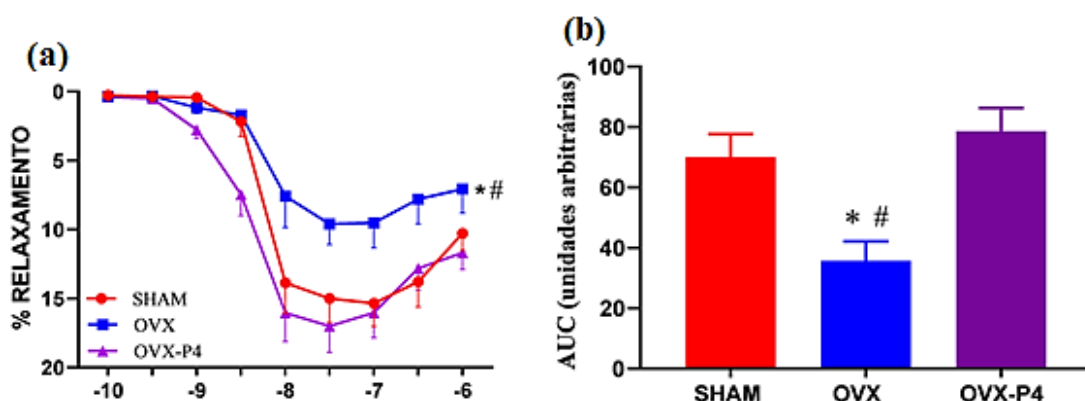


Figura 8. Resposta vasodilatadora a concentrações crescentes de bradicinina (BK, 0,1-1000 ng) (a) AUC da curva basal (b). Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM. Foi usado *two-way* ANOVA (a), *one-way* ANOVA (b) e *post hoc* de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao grupo SHAM, # $p < 0,05$ em relação ao grupo OVX-P4.

Investigando a participação dos mediadores endoteliais na resposta de relaxamento encontrada com a curva dose-resposta de BK nos grupos, observamos que após a inibição inespecífica da óxido nítrico sintase com L-NAME (Fig. 9), a resposta vasodilatadora foi reduzida nos grupos SHAM e OVX-P4 ($R_{\text{máx}}$; SHAM = $5,8 \pm 0,9$ %; OVX-P4 = $6 \pm 0,6$ %), enquanto no grupo OVX não houve alteração na resposta vasodilatadora ($R_{\text{máx}}$; OVX = 8 ± 2 %). Avaliando o dAUC (figura 9d), foi possível observar que o NO não é responsável pela resposta vasodilatadora no grupo OVX, apesar deste grupo apresentar menor relaxamento comparado aos demais, essa resposta não foi alterada após a inibição com L-NAME.

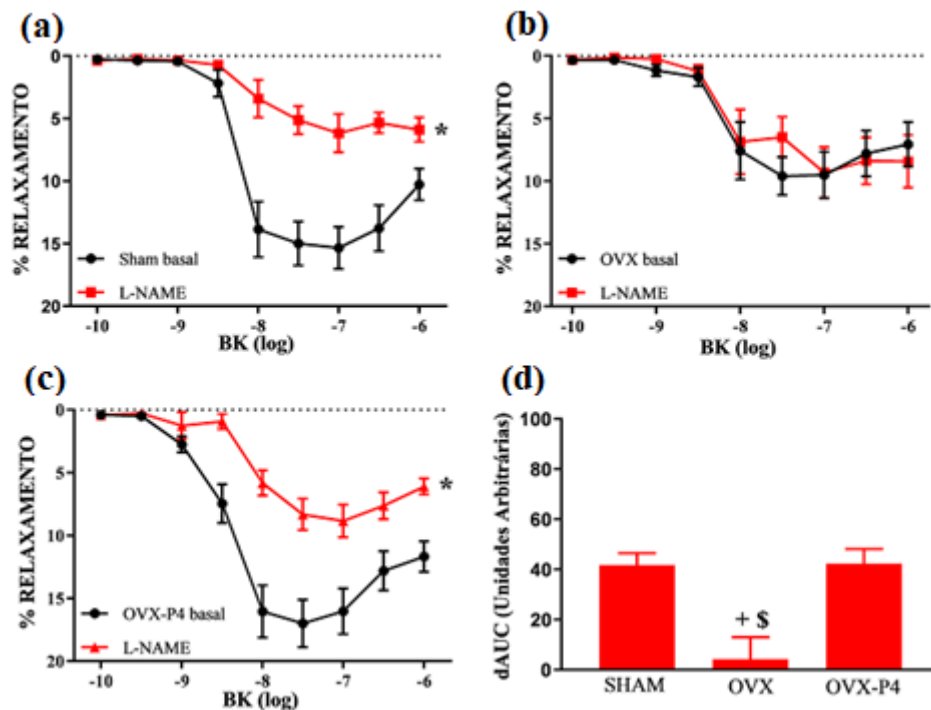


Figura 9. Resposta vasodilatadora a concentrações crescentes de bradicinina (BK, 0,1-1000 ng) após inibição com L-NAME nos grupos SHAM (a), OVX (b), OVX-P4 (c). Diferença da área abaixo da curva (d). Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM. A análise estatística foi realizada por meio de *one-way* ANOVA e *post hoc* de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao seu controle na curva basal. $^{\dagger}p < 0,05$ em relação ao SHAM. $^{\#}p < 0,05$ em relação ao OVX. $^{\S}p < 0,05$ em relação ao OVX-P4.

Após inibição inespecífica da via de formação dos prostanoídeos (PNs) endoteliais com indometacina (Figura 10), observamos que a progesterona pôde modular esta via, uma vez que, os animais do grupo tratado com P4 tiveram a resposta vasodilatadora reduzida ($R_{\text{máx}}$; OVX-P4: $3 \pm 0,5$ %) quando comparado aos outros grupos ($R_{\text{máx}}$; SHAM: 10 ± 1 %; OVX: $5 \pm 0,2$ %). Ao avaliar a magnitude de efeito da indometacina entre os grupos (figura 10d), observamos maior magnitude no grupo tratado com P4, sugerindo que a resposta vasodilatadora à BK nesse grupo possui maior influência dos PNs.

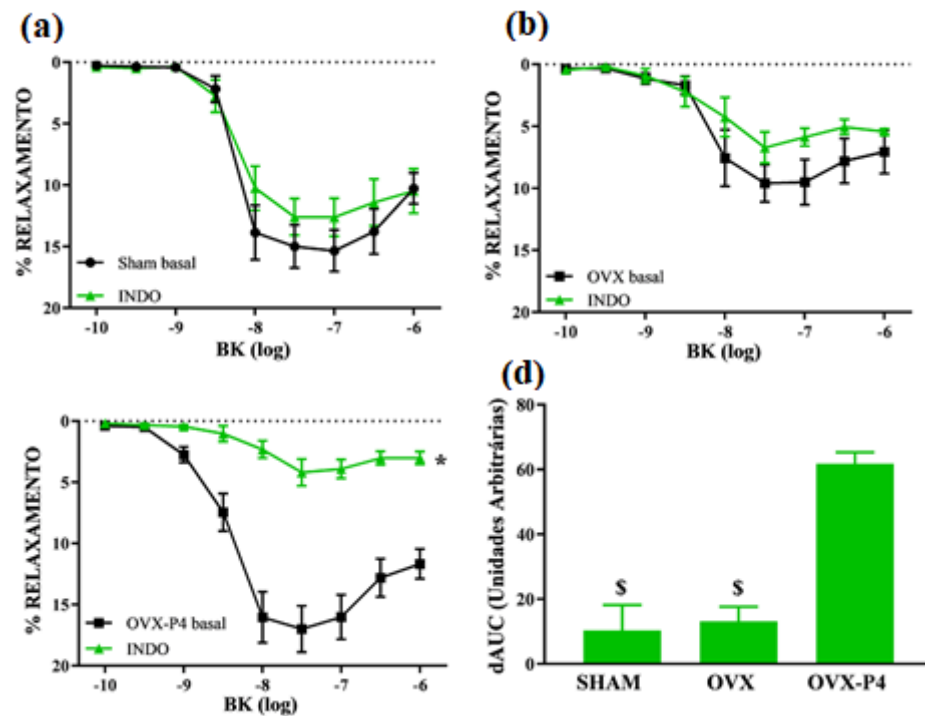


Figura 10. Resposta vasodilatadora a concentrações crescentes de bradicinina (BK, 0,1-1000 ng) após inibição com indometacina nos grupos SHAM (a), OVX (b), OVX-P4 (c). Diferença da área abaixo da curva (d). Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM. A análise estatística foi realizada por meio de *one-way* ANOVA e *post hoc* de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao seu controle na curva basal. $^{\dagger}p < 0,05$ em relação ao SHAM. $^{\#}p < 0,05$ em relação ao OVX. $^{\$}p < 0,05$ em relação ao OVX-P4.

Realizando inibição simultânea da via do NO e PNs (L-NAME e Indometacina) (Figura 11), observamos que todos os grupos tiveram as respostas reduzidas ($R_{\text{máx}}$; SHAM: $3 \pm 0,4$ %; OVX: $3,6 \pm 0,7$ %; OVX-P4: $3,8 \pm 0,7$ %). Contudo, mesmo com redução na vasodilatação, esta resposta não foi completamente abolida, levando a suposição de uma possível participação da EDH. Ao comparar os grupos com a dAUC (figura 11d), observamos que o grupo OVX apresentou menor magnitude de efeito em relação aos outros grupos, mas a progesterona foi capaz de prevenir as alterações da via da EDH nesse grupo.

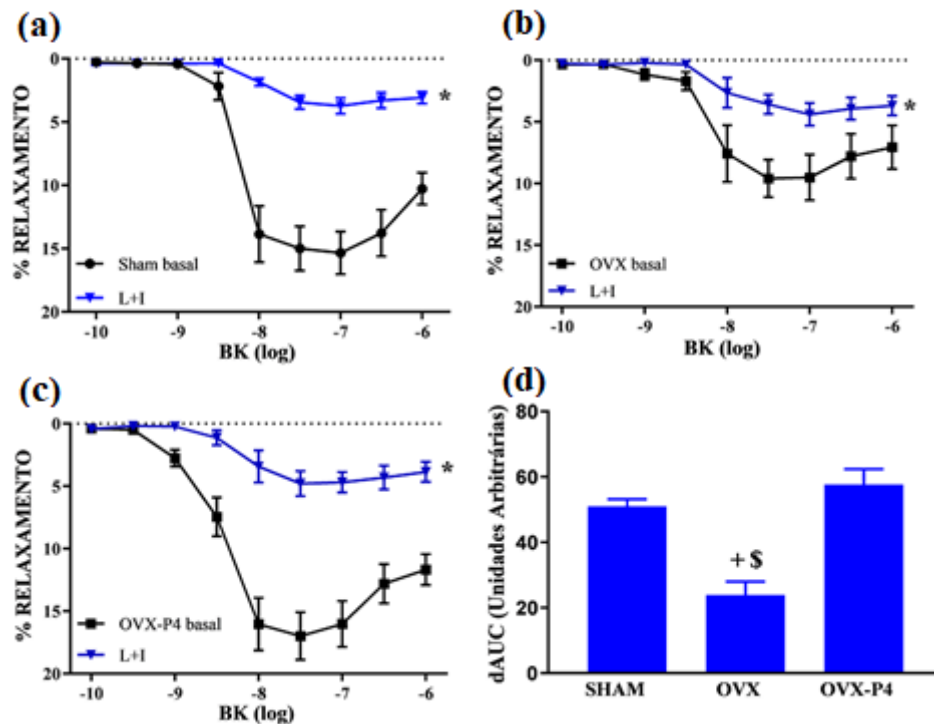


Figura 11. Resposta vasodilatadora a concentrações crescentes de bradicinina (BK, 0,1-1000 ng) após inibição com L-NAME + indo nos grupos SHAM (a), OVX (b), OVX-P4 (c). Diferença da área abaixo da curva (d). Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM. A análise estatística foi realizada por meio de *one-way* ANOVA e *post hoc* de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao seu controle na curva basal. $^+p < 0,05$ em relação ao SHAM. $^{\#}p < 0,05$ em relação ao OVX. $^{\$}p < 0,05$ em relação ao OVX-P4.

Dessa forma, investigamos a possível participação dos ácidos epoxieicosatrienóicos (EETs) na hiperpolarização dependente do endotélio com a inibição simultânea da via do óxido nítrico, PNs e EETs (L-NAME, Indometacina e Clotrimazol) (Figura 12) e observamos redução na resposta vasodilatadora em todos os grupos ($R_{\text{máx}}$; SHAM: $0,7 \pm 0,2$ %; OVX: $0,7 \pm 0,2$ %; OVX-P4: $2,3 \pm 0,5$ %). No entanto, observamos que no grupo OVX-P4 a resposta vasodilatadora não foi totalmente abolida. Ao comparar os grupos com a dAUC, notamos que a modulação pelos EETs foi reduzida no grupo OVX, no entanto, a progesterona foi capaz de prevenir as alterações dessa via.

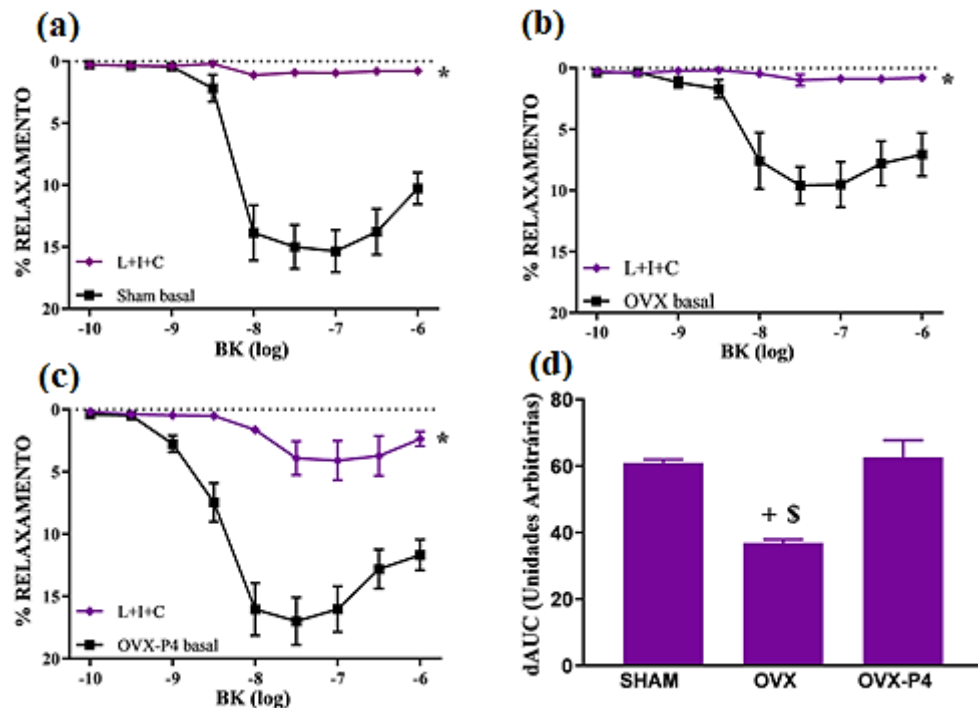


Figura 12. Resposta vasodilatadora a concentrações crescentes de bradicinina (BK, 0,1-1000 ng) após inibição com L-NAME + indo + clotrimazol nos grupos SHAM (a), OVX (b), OVX-P4 (c). Diferença da área abaixo da curva (d). Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM. A análise estatística foi realizada por meio de *one-way* ANOVA e *post hoc* de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao seu controle na curva basal. $^{\#}p < 0,05$ em relação ao SHAM. $^{\$}p < 0,05$ em relação ao OVX. $^{\$}p < 0,05$ em relação ao OVX-P4.

4.5 Microscopia eletrônica de varredura

Para confirmar os resultados da disfunção endotelial encontrada no grupo OVX e observar possíveis alterações morfológicas utilizamos a análise qualitativa da camada íntima, dos ramos descendente anterior da artéria coronária esquerda e septal, por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Figura 13). Esta análise revelou que a superfície endotelial do grupo SHAM apresentava aparência regular com células que acompanhavam a superfície longitudinal do vaso. No grupo OVX, foi observado um endotélio anormal com aspecto contraído, com uma ligeira desordem na superfície da camada íntima, com perda da arquitetura e disposição atípica das células endoteliais e áreas de atrofia celular. Por outro lado, no grupo OVX-P4, observou-se uma camada endotelial similar ao grupo SHAM.

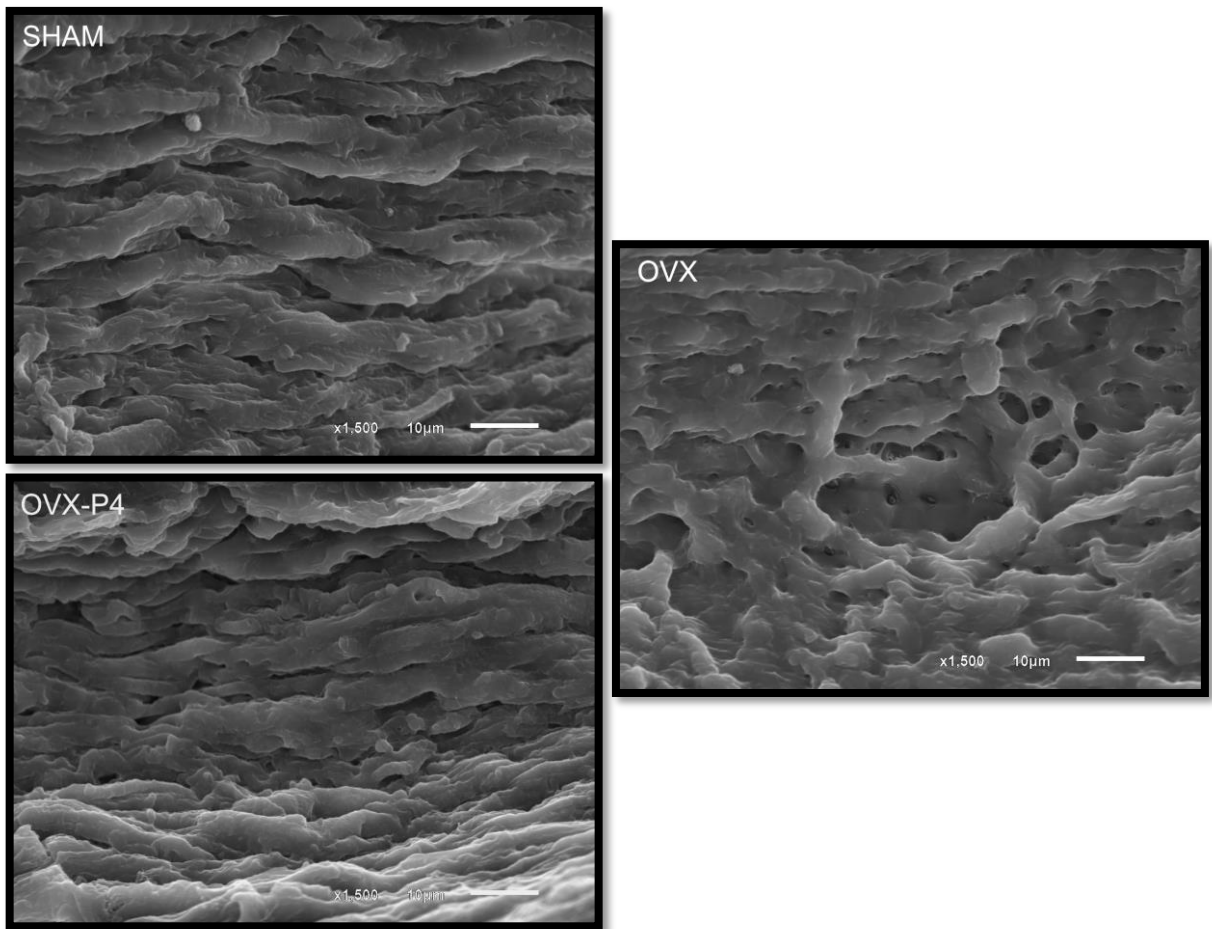


Figura 13. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos ramos descendente anterior da artéria coronária esquerda e septal dos grupos SHAM, OVX e OVX-P4. Cada imagem foi obtida com 1,500X de magnificação (barra = 10 µm).

5. DISCUSSÃO

O principal achado desse estudo foi a capacidade da progesterona em modular a vasodilatação coronariana dependente do endotélio em fêmeas SHR ovariectomizadas. Os danos estruturais e funcionais causados pela deficiência hormonal foi evitado pela progesterona e parece que a via dos prostanoídes está envolvida.

Inicialmente, observamos redução do peso uterino no grupo OVX, o que já era esperado, visto que a ausência de estimulação hormonal causado pela ovariectomia resulta na atrofia uterina encontrada, como visto em estudos anteriores (Tambouret & Wilbur 2003; Delgado *et al.* 2017). O tratamento com progesterona não foi capaz de evitar essa atrofia. Alguns estudos mostram que no útero a progesterona antagoniza os efeitos dos estrogênios, enquanto o estradiol estimula a proliferação epitelial endometrial, a progesterona possui ação antiproliferativa (Martin *et al.* 1973; Graham & Clarke 1997; Chwalisz *et al.* 1998; Yuan *et al.* 2015).

Observamos que, quanto à gordura intra-abdominal, apenas o grupo OVX apresentou aumento em relação ao SHAM, sem alteração do peso corporal, corroborando estudos prévios (Ainslie *et al.* 2001; Babaei *et al.* 2010). Nossos resultados mostraram que a gordura intra-abdominal do grupo tratado com progesterona foi similar ao grupo SHAM, evidenciando que possivelmente a progesterona previne a deposição de gordura visceral. O papel da progesterona sobre o metabolismo lipídico ainda não foi completamente elucidado, no entanto, existem estudos que mostram que receptores de progesterona são expressos no tecido adiposo (O'Brien *et al.* 1998; Rodriguez-Cuenca *et al.* 2005) e que a progesterona pode participar na captação e metabolismo da glicose, síntese lipídica e lipogênese (Shirling *et al.* 1981; Sutter-Dub *et al.* 1983; Lacasa *et al.* 2001). Stelmanska e colaboradores estudaram o efeito da progesterona em ratas fêmeas intactas e concluíram que a P4 aumenta a expressão gênica da leptina e a resistina, e reduz a expressão do gene da adiponectina, o que resulta em um tecido adiposo hipertrofiado (Stelmanska *et al.* 2012). Entretanto, esses resultados não estão em conformidade com os dados

encontrados no nosso trabalho, e adicionalmente, realizamos nossos protocolos em ratas ovariectomizadas, o que poderia ter contribuído para gerar uma resposta diferente da que encontramos na literatura, no entanto, por ser um tema escasso, sugerimos que novas investigações sejam realizadas para avaliar o mecanismo de uma forma mais específica.

Por outro lado, na literatura é bem descrito o papel do estrogênio na regulação do metabolismo lipídico, exercendo função importante na deposição e distribuição do tecido adiposo em mulheres e em roedores (Andersson *et al.* 2010; Babaei *et al.* 2010). A deficiência estrogênica causada por exemplo, pela ovariectomia, acelera a deposição de gordura abdominal e acúmulo de gordura visceral (Babaei *et al.* 2010). Tchernof e colaboradores compararam mulheres com e sem deficiência hormonal, na qual não foi encontrada nenhuma diferença significativa em relação ao peso corporal, no entanto, tecido adiposo visceral foi significativamente maior em mulheres com deficiência hormonal ovariana (Tchernof *et al.* 2004).

Nossos resultados mostraram que os pesos dos ventrículos nos grupos SHAM e OVX-P4 foram similares, indicando que possivelmente a progesterona pode ter um efeito protetor na hipertrofia ventricular. De fato, muitos estudos mostram o papel do estrogênio atenuando a hipertrofia e impedindo sua progressão (Lim *et al.* 1999; Eickels *et al.* 2001; Xu *et al.* 2003), enquanto que a progesterona, apesar de poucos estudos relacionados ao assunto, possui algumas funções descritas, como a capacidade de suprimir a síntese de DNA, gerando assim um efeito antiproliferativo no crescimento de fibroblastos cardíacos (Mercier *et al.* 2002), estimulação da síntese de proteínas cardíacas (Goldstein *et al.* 2004) e da expressão de proteínas de choque térmico, que são suficientes para gerar cardioproteção (Knowlton & Sun 2001) e além disso, existe evidências crescentes de que a sinalização dos receptores da progesterona interagem com os de estrogênio, o que poderia explicar a observação de que a progesterona aumenta o efeito inibitório do estrogênio na proliferação cardíaca de fibroblastos (Dubey *et al.* 1998).

Não obstante, encontramos aumento significativo nos pesos secos dos ventrículos no grupo OVX comparado aos outros grupos estudados. A ovariectomia altera a arquitetura miocárdica, aumenta o espaço intersticial cardíaco, gera fibrose e apoptose cardíaca, além de ocasionar aumento da razão peso total do coração ou peso dos ventrículos pelo comprimento da tíbia (Lee *et al.* 2008; Liou *et al.* 2010; Dalpiaz *et al.* 2015; Lin *et al.* 2016).

Na linhagem SHR algumas complicações cardiovasculares como a hipertrofia cardíaca, podem estar presentes e acompanhar o desenvolvimento da hipertensão espontânea (Yamori *et al.* 1979; Iliev *et al.* 2018). A hipertrofia pode ser encontrada em diferentes estágios ao longo da vida do animal, como foi relatado por Yamori, que encontrou peso cardíaco significativamente maior, em SHR com 30 dias de vida comparado a Wistar-Kyoto da mesma idade (Yamori 1974). Possivelmente a hipertrofia ventricular pode estar ligada a predisposição genética à hipertensão em SHR, mesmo que a hipertensão não esteja totalmente instalada, já que se trata de animais muito jovens (Sen *et al.* 1974; Yamori *et al.* 1979).

Ademais, alguns estudos mostram que em ratos SHR, alterações estruturais vasculares e cardíacas são encontradas antes mesmo do aumento da pressão arterial (Lee 1985; Rizzoni *et al.* 1994; Dickhout & Lee 1997). Assim, ao verificar se houve alteração da pressão arterial nos grupos estudados, notamos que houve aumento da pressão arterial com a progressão da idade, mas não encontramos relação com as intervenções realizadas em cada grupo. De fato, há dados controversos a respeito da progesterona e seu efeito na pressão arterial, há estudos que mostram tanto efeito neutro como efeito depressor (Rylance *et al.* 1985; Barbagallo *et al.* 2001; Kristiansson & Wang 2001). Da mesma forma, a ovariectomia não influenciou a pressão arterial, corroborando com alguns estudos (Reckelhoff *et al.* 1998; Pelzer *et al.* 2005; Dalpiaz *et al.* 2015). No entanto, é importante considerar que, o tempo de castração de 15 dias e a idade dos animais, pode ter contribuído para o resultado encontrado. Por via de regra, ratos espontaneamente hipertensos manifestam aumento da pressão arterial sistólica a partir da 5ª

semana de vida e começam de fato a desenvolver a hipertensão espontânea entre a 6ª e 8ª semanas de vida e o platô é atingido apenas entre a 20ª e 28ª semanas (Yamori 1984).

Em relação a PPC basal, notamos que a ovariectomia promoveu um aumento da PPC basal e o tratamento com progesterona não foi capaz de reverter este aumento. Estes resultados diferem de estudo prévio realizado em nosso laboratório em animais normotensos, onde a ovariectomia promoveu redução da PPC e o tratamento com progesterona foi capaz de prevenir esta redução (Cunha *et al.* 2020). No entanto, é importante considerarmos que os hormônios sexuais podem apresentar diferenças relacionadas ao controle da PPC. Alguns artigos relacionam a redução da PPC com a ovariectomia, como ocorreu nos trabalhos de Borgo e colaboradores, que estudaram animais SHR, com 90 dias de ovariectomia e de Santos e colaboradores, que encontraram redução da PPC após 7 dias de ovariectomia em ratas wistar (Borgo *et al.* 2011; Santos *et al.* 2016). Por outro lado, os resultados descritos por Delgado e colaboradores, mostraram que a ovariectomia em SHR com 8 semanas de idade e 30 dias pós ovariectomia não alterou a PPC comparado ao SHAM, e de Rouver e colaboradores, estudaram ratos wistar machos gonadectomizados e observaram que após 15 dias de castração não houve diferença na PPC basal entre os grupos estudados (Rouver *et al.* 2015; Delgado *et al.* 2017).

Embora tenhamos observados diferenças na PPC basal, nosso principal objetivo foi avaliar a capacidade da progesterona em modular a vasodilatação dependente do endotélio em ratas hipertensas ovariectomizadas. No presente estudo, a bradicinina promoveu relaxamento em todos os grupos estudados. Porém, um menor relaxamento foi encontrado no grupo OVX comparado ao grupo SHAM.

Este dado era esperado visto que na literatura está bem evidenciado que a ovariectomia induz a disfunção endotelial (Borgo *et al.* 2016; Cheng *et al.* 2016; Claudio *et al.* 2017). A disfunção endotelial causada pela ovariectomia pôde ser confirmada com as imagens de microscopia eletrônica de varredura (Fig. 13) que mostraram perda da arquitetura e uma

disposição atípica das células endoteliais, bem como pelo prejuízo na vasodilatação induzida pela BK no grupo OVX-P4. Contudo, o tratamento com progesterona foi capaz de prevenir esses danos. Além disso, um outro estudo, usando outro leito vascular, já havia demonstrado que a administração crônica de progesterona em ratas ovariectomizadas restaura o controle endotelial do tônus vascular nos anéis da artéria mesentérica por meio da formação endotelial de NO (Chataigneau *et al.* 2004).

Avaliamos a participação da via do óxido nítrico e observamos que no grupo SHAM esta via parece modular o relaxamento induzido por BK, pois, após a inibição com L-NAME ocorreu uma redução significativa da resposta vasodilatadora. De fato, Kelm e colaboradores demonstraram que SHR, comparados a Wistar Kyoto, apresentam maior sensibilidade a BK na reatividade vascular com maior liberação de NO na circulação coronariana e sugeriram que essa diferença pode ocorrer por um mecanismo compensatório que visa contrarregular mudanças na reatividade vascular resultantes da hipertensão arterial (Kelm *et al.* 1992).

Não obstante, nossos dados indicam que a ovariectomia aboliu a participação de NO, demonstrado pelo uso do L-NAME, que não alterou a resposta vasodilatadora a BK no grupo OVX, enquanto o tratamento com progesterona restaurou sua participação. Levantamos a hipótese que a progesterona tenha sido capaz de estimular a via de formação do NO, uma vez que, a capacidade da progesterona em modular a via do NO foi demonstrada em estudos anteriores (Selles *et al.* 2001, 2002; Cutini *et al.* 2009, 2012, 2014; Cunha *et al.* 2020). Chataigneau e colaboradores também demonstraram que o tratamento com progesterona restaura o tônus vascular de artérias mesentéricas de ratas Wistar ovariectomizadas, e atribuíram esse resultado ao aumento na síntese de NO (Chataigneau *et al.* 2004).

Além da participação do NO, nossos resultados indicam que o tratamento com progesterona estimulou a via dos prostanoídes, com possível participação da prostaciclina no relaxamento induzido por bradicinina. A capacidade da progesterona em estimular a produção

de vasodilatadores derivados do ácido araquidônico, como a prostaciclina, foi demonstrada em cultura de células de veia umbilical humana (Hermenegildo *et al.* 2005; Oviedo *et al.* 2011), e em aorta de ratas Wistar (Mendiberri *et al.* 2006), além da diminuição do tromboxano, potente vasoconstritor (Oviedo *et al.* 2011), pode promover aumento de atividade das ciclooxigenases (Hermenegildo *et al.* 2005). Quando realizamos inibição combinada com L-NAME e indometacina, a resposta vasodilatadora foi reduzida no grupo SHAM, semelhante à encontrada com inibição individual com L-NAME, confirmando que os metabólitos da ciclooxigenase (COX) não parecem estar envolvidos na resposta vasodilatadora nesse grupo. Curiosamente, o oposto ocorreu no grupo OVX-P4, no qual houve a redução da vasodilatação, mas essa resposta foi diferente daquela observada na inibição individual com L-NAME, mostrando que possivelmente a redução observada na inibição combinada possa ser devida a um importante papel da via dos prostanoídes na vasodilatação induzida pela BK.

No grupo OVX, as inibições individuais das vias do NO e PGI₂ foram similares à curva basal deste grupo, no entanto, a inibição combinada reduziu a resposta vasodilatadora, sugerindo a presença de uma EDH. Estudos do nosso grupo demonstraram que os EETs são fortes candidatos a participação na EDH no leito coronariano de ratos hipertensos (Santos *et al.* 2010). Assim, verificamos a participação dessa via de origem endotelial na vasodilatação induzida pela BK com a inibição combinada das enzimas NOS, COX e CYP. Observamos que no grupo SHAM e OVX, a resposta vasodilatadora foi abolida, no entanto no grupo OVX-P4 o relaxamento foi similar ao encontrado na inibição combinada de NO e PGI₂, sugerindo que outro fator, diferente do EETs poderia atuar na vasodilatação induzida pela BK.

Acreditamos que o peróxido de hidrogênio é um possível candidato a participar da EDH no grupo OVX-P4. Estudos mostram que o H₂O₂ é um regulador importante do tônus vascular coronariano (Yada *et al.* 2003), promove respostas do tipo EDH em vários leitos vasculares (Matoba *et al.* 2000, 2002, 2003; Yada *et al.* 2003) e além disso, em situações patológicas,

quando há redução da participação de NO, a participação de H_2O_2 se torna proeminente (Cosentino *et al.* 2001; Miura *et al.* 2003; Schenkel *et al.* 2014; Shimokawa 2020).

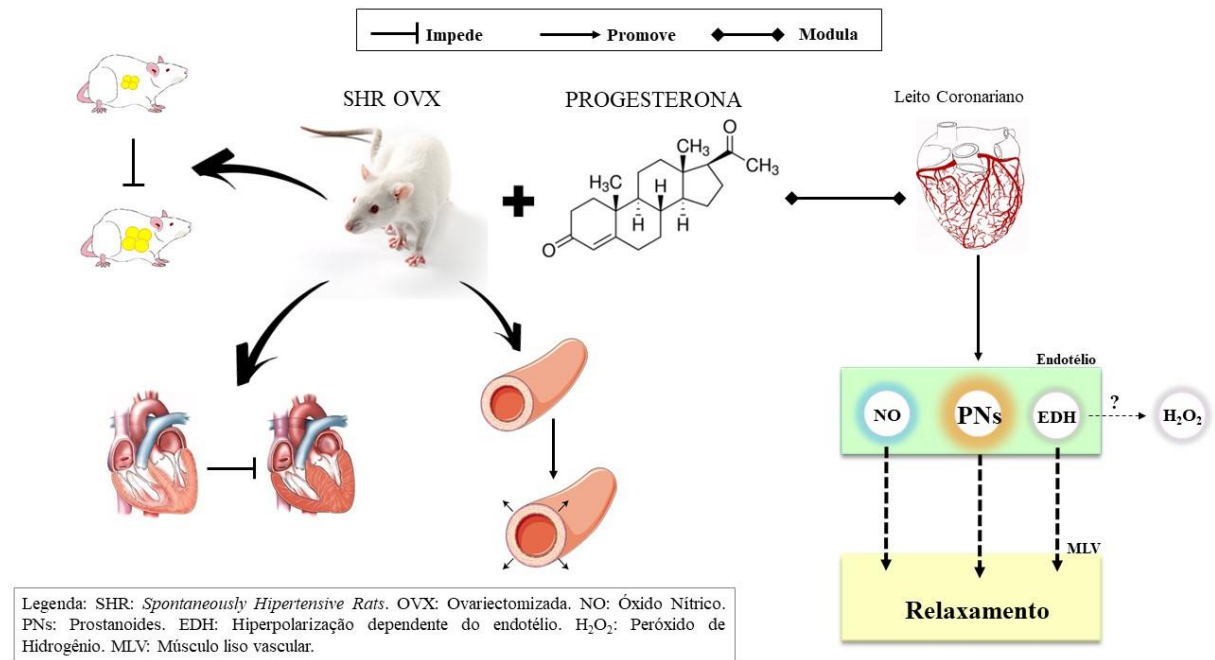


Figura 14: Esquema com os principais resultados obtidos em ratos SHR do grupo tratado com progesterona.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstra que a progesterona é capaz de modular a reatividade vascular dependente do endotélio em artérias coronárias. Nossos resultados mostram que o NO é um mediador importante na resposta vasodilatadora à BK para o grupo SHAM, os prostanoídes são essenciais para o relaxamento do grupo OVX-P4, enquanto que no grupo OVX, os EETs se mostram primordiais na vasodilatação. Apesar de existir essa predominância entre os grupos, o NO também contribui de forma significativa no relaxamento do grupo OVX-P4 e os EETs no grupo SHAM. Esses resultados sugerem que a progesterona pode beneficiar o leito coronariano em situação de deficiência hormonal. A compreensão dos mecanismos que levam a progesterona a gerar vasodilatação poderá contribuir para o entendimento da atuação da progesterona no leito coronariano e assim auxiliar no desenvolvimento de terapias para prevenir doenças cardiovasculares.

7. REFERÊNCIAS

- Absi M, Burnham MP, Weston AH, Harno E, Rogers M & Edwards G 2007 Effects of methyl β -cyclodextrin on EDHF responses in pig and rat arteries; association between SKCa channels and caveolin-rich domains. *British Journal of Pharmacology* **151** 332–340. (doi:10.1038/sj.bjp.0707222)
- Ainslie DA, Morris MJ, Wittert G, Turnbull H, Proietto J & Thorburn AW 2001 Estrogen deficiency causes central leptin insensitivity and increased hypothalamic neuropeptide Y. *International Journal of Obesity* **25** 1680–1688. (doi:10.1038/sj.ijo.0801806)
- Aird WC 2007 Phenotypic Heterogeneity of the Endothelium: I. Structure, Function and Mechanisms. *Circulation Research* **100** 158–173. (doi:10.1161/01.RES.0000255691.76142.4a)
- Aksoy AN, Toker A, Celik M, Aksoy M, Halici Z & Aksoy H 2014 The effect of progesterone on systemic inflammation and oxidative stress in the rat model of sepsis. *Indian Journal of Pharmacology* **46** 622–627. (doi:10.4103/0253-7613.144922)
- Alderton WK, Cooper CE & Knowles RG 2001 Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* **357** 593–615. (doi:10.1042/0264-6021:3570593.)
- Allen WM 1970 Progesterone: How did the name originate? *Southern Medical Journal* **63** 1151–1155. (doi:10.1097/00007611-197010000-00012)
- Allen WM 1974 Recollections of my life with progesterone. *Gynecologic and Obstetric Investigation* **5** 142–182. (doi:10.1159/000301649)
- Allen WM & Corner GW 1929a Physiology of the corpus luteum. II. Production of a Special Uterine Reaction (Progestational Proliferation) by Extracts of the Corpus Luteum. *American Journal of Physiology* 326–339. (doi:10.1152/ajplegacy.1929.88.2.326)
- Allen WM & Corner GW 1929b Physiology of the corpus luteum. III. Normal Growth and Implantation of Embryos After very early ablation of the ovaries, Under the Influence of Extracts of the Corpus Luteum. *American Journal of Physiology* 340–346. (doi:doi.org/10.1152/ajplegacy.1929.88.2.340)
- Allen WM & Wintersteiner O 1934 Crystalline Progestin. *Journal of Biological Chemistry* **107** 321–336. (doi:10.1126/science.80.2069.190-a)
- Allen W, Butenandt A, Corner G & Slotta K 1935 Nomenclature of Corpus Luteum Hormone. *Nature* **136** 303. (doi:https://doi.org/10.1038/136303a0)
- Andersson T, Söderström I, Simonyté K & Olsson T 2010 Estrogen Reduces 11 β - Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 in Liver and Visceral, but Not Subcutaneous, Adipose Tissue in Rats. *Obesity* **18** 470–475. (doi:10.1038/oby.2009.294)
- Archer SL, Huang JMC, Hampl V, Nelson DP, Shultz PJ & Weir EK 1994 Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91** 7583–7587. (doi:10.1073/pnas.91.16.7583)
- Ardanaz N, Beierwaltes WH & Pagano PJ 2008 Distinct hydrogen peroxide-induced constriction in multiple mouse arteries: potential influence of vascular polarization. *Pharmacological Reports* **60** 61–67.
- Armstrong RA, Lawrence RA, Jones RL, Wilson NH & Collier A 1989 Functional and ligand binding studies suggest heterogeneity of platelet prostacyclin receptors. *British Journal of*

- Pharmacology* **97** 657–668. (doi:10.1111/j.1476-5381.1989.tb12001.x.)
- Asavasupreechar T, Saito R, Miki Y, Edwards DP, Boonyaratanakornkit V & Sasano H 2020 Systemic distribution of progesterone receptor subtypes in human tissues. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 1–28. (doi:10.1016/j.jsbmb.2020.105599)
- Atsma F, Bartelink MEL, Grobbee DE & Schouw YT Van Der 2006 Postmenopausal status and early menopause as independent risk factors for cardiovascular disease: a meta-analysis. *Menopause* **13** 265–279. (doi:10.1097/01.gme.0000218683.97338.ea)
- Babaei P, Mehdizadeh R, Ansar MM & Damirchi A 2010 The effect of ovariectomy and Estrogen replacement on body weight and visceral adipose tissue in rats. *Menopause International* **16** 100–104.
- Baldo MP, Forechi L, Morra EAS, Zaniqueli D, Machado RC, Lunz W, Rodrigues SL & Mill G 2011 Long-term use of low-dose spironolactone in spontaneously hypertensive rats: Effects on left ventricular hypertrophy and stiffness. *Pharmacological Reports* **63** 975–982. (doi:10.1016/s1734-1140(11)70613-2.)
- Barbagallo M, Dominguez LJ, Licata G, Shan J, Bing L, Karpinski E, Pang PKT & Resnick LM 2001 Vascular effects of progesterone. Role of Cellular Calcium Regulation. *Hypertension* **37** 142–147. (doi:10.1161 / 01.hyp.37.1.142)
- Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, Chamberlain AM, Chang AR, Cheng S, Das SR *et al.* 2019 *Heart Disease and Stroke Statistics—2019 Update: A Report From the American Heart Association.* (doi:10.1161/CIR.0000000000000659)
- Bény J & Schaad O 2000 An evaluation of potassium ions as endothelium-derived hyperpolarizing factor in porcine coronary arteries. *British Journal of Pharmacology* **131** 965–973. (doi:10.1038/sj.bjp.0703658.)
- Bergqvist A, Bergqvist D & Ferno M 1993 Estrogen and progesterone receptors in vessel walls. Biochemical and immunochemical assays. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* **72** 10–16. (doi:10.3109/00016349309013341.)
- Bianca R d'Emmanuele di V, Sorrentino R, Coletta C, Mitidieri E, Rossi A, Vellecco V, Pinto A, Cirino G & Sorrentino R 2011 Hydrogen Sulfide-Induced Dual Vascular Effect Involves Arachidonic Acid Cascade in Rat Mesenteric Arterial Bed. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **337** 59–64. (doi:10.1124/jpet.110.176016.than)
- Boese AC, Kim SC, Yin K, Lee J & Hamblin MH 2017 Sex Differences in Vascular Physiology and Pathophysiology: Estrogen and Androgen Signaling in Health and Disease. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 2–60. (doi:10.1152/ajpheart.00217.2016)
- Boie Y, Rushmore TH, Darmon-goodwin A, Grygorczyk R, Slipetz DM, Metters KM & Abramovitzs M 1994 Cloning and Expression of a cDNA for the Human Prostanoid IP Receptor. *The Journal of Biological Chemistry* **269** 12173–12178.
- Borgo M V., Lopes AB, Gouvêa SA, Romero WG, Moyses MR, Bissoli NS & Abreu GR 2011 Effect of tamoxifen on the coronary vascular reactivity of spontaneously hypertensive female rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **44** 786–792. (doi:10.1590/S0100-879X2011007500099)
- Borgo M V, Claudio ERG, Silva FB, Romero WG, Gouvea SA, Moysés MR, Santos RL, Almeida SA, Podratz PL, Graceli JB *et al.* 2016 Hormonal therapy with estradiol and

- drospirenone improves endothelium-dependent vasodilation in the coronary bed of ovariectomized spontaneously hypertensive rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **49** 1–9. (doi:10.1590/1414-431X20154655)
- Brandin L, Bergstrom G, Manhem K & Gustafsson H 2003 Oestrogen modulates vascular adrenergic reactivity of the spontaneously hypertensive rat. *Journal of Hypertension* **21** 1695–1702. (doi:10.1097/01.hjh.0000084736.53355.9f)
- Bredt DS & Snyder SH 1990 Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **87** 682–685. (doi:10.1073/pnas.87.2.682.)
- Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR & Snyder SH 1991 Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* **351** 714–718. (doi:10.1038/351714a0.)
- Bunting S, Gryglewski R, Moncada S & Vane JR 1976 Arterial walls generate from prostaglandin endoperoxides a substance (Prostaglandin X) which relaxes strips of mesenteric and coeliac arteries and inhibits platelet aggregation. *Prostaglandins* **12** 897–913. (doi:10.1016/0090-6980(76)90125-8)
- Busse R & Fleming I 1996 Endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Journal of Vascular Research* **33** 181–194.
- Busse R, Trogisch G & Bassenge E 1985 The role of endothelium in the control of vascular tone. *Basic Research in Cardiology* **80** 475–490. (doi:10.1007/bf01907912)
- Butenandt A & Schmidt J 1934 Über Pregnanol-(20)-on-(3). *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft (A and B Series)* **67** 1893–1896. (doi:10.1002/cber.19340671124 10.1002/cber.19340671124)
- Butenandt A & Westphal U 1934 Zur Isolierung und Charakterisierung des Corpus-luteum-Hormons. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)* **67** 1440–1442. (doi:10.1002/cber.19340670831)
- Campbell WB & Falck JR 2007 Arachidonic Acid Metabolites as Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factors. *Hypertension* **49** 590–597. (doi:10.1161/01.HYP.0000255173.50317.fc)
- Campbell WB & Fleming I 2010 Epoxyeicosatrienoic acids and endothelium-dependent responses. *European Journal of Physiology* **459** 881–895. (doi:10.1007/s00424-010-0804-6)
- Carr BR, Macdonald PC & Simpson ER 1982 The role of lipoproteins in the regulation of progesterone secretion by the human corpus luteum. *Fertility and Sterility* **38** 303–311. (doi:10.1016/S0015-0282(16)46511-8)
- Chataigneau T, Zerr M, Chataigneau M, Hudlett F, Hirn C, Pernot F & Schini-Kerth VB 2004 Chronic treatment with progesterone but not medroxyprogesterone acetate restores the endothelial control of vascular tone in the mesenteric artery of ovariectomized rats. *Menopause* **11** 255–263. (doi:10.1097/01.GME.0000097847.95550.E3)
- Chen G, Suzuki H & Weston AH 1988 Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. *British Journal of Pharmacology* **95** 1165–1174. (doi:10.1111/j.1476-5381.1988.tb11752.x.)
- Cheng Y, Austin SC, Rocca B, Koller BH, Coffman TM, Grosser T, Lawson JA & Fitzgerald GA 2002 Role of Prostacyclin in the Cardiovascular Response to Thromboxane A₂.

- Science* **296** 539–541. (doi:10.1126/science.1068711)
- Cheng T, Lin Y, Su C, Hu C & Yang A 2016 Improvement of Acetylcholine-Induced Vasodilation by Acute Exercise in Ovariectomized Hypertensive Rats. *Chinese Journal of Physiology* **59** 165–172. (doi:10.4077/CJP.2016.BAE387)
- Cherry PD, Furchgott RF, Zawadzki J V & Jothianandan D 1982 Role of endothelial cells in relaxation of isolated arteries by bradykinin. *Physiological Sciences* **79** 2106–2110. (doi:10.1073/pnas.79.6.2106)
- Chobanian A V, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo Jr. JL, Jones DW, Materson BJ, Oparil S & Wright Jr. JT 2003 The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA* **289** 2560–2572. (doi:10.1001/jama.289.19.2560)
- Chu L, Liou J & Wu KK 2015 Prostacyclin protects vascular integrity via PPAR/14-3-3 pathway. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* 1–9. (doi:10.1016/j.prostaglandins.2015.04.006)
- Chwalisz K, Stöckemann K, Fritzemeier K & Fuhrmann U 1998 Modulation of oestrogenic effects by progesterone antagonists in the rat uterus. *Human Reproduction* **4** 570–583.
- Claudio ERG, Almeida SA, Mengal V, Brasil GA, Santuzzi CH, Tiradentes R V, Gouvea SA, Bissoli NS, Santos RL & Abreu GR 2017 Swimming training prevents coronary endothelial dysfunction in ovariectomized spontaneously hypertensive rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **50** 1–8. (doi:10.1590/1414-431X20165495)
- Cohen RA & Vanhoutte PM 1995 Endothelium-Dependent Hyperpolarization. Beyond Nitric Oxide and Cyclic GMP. *Circulation* **92** 3337–3349. (doi:https://doi.org/10.1161/01.CIR.92.11.3337)
- Condon JC, Hardy DB, Kovaric K & Mendelson CR 2006 Up-Regulation of the Progesterone Receptor (PR) -C Isoform in Laboring Myometrium by Activation of Nuclear Factor- κ B May Contribute to the Onset of Labor through Inhibition of PR Function. *Molecular Endocrinology* **20** 764–775. (doi:10.1210/me.2005-0242)
- Corner GW 1974 The early history of progesterone. *Gynecologic and Obstetric Investigation* **5** 106–112. (doi:10.1159/000301641)
- Corriu C, Feletou M, Canet E & Vanhoutte PM 1996 Endothelium-derived factors and hyperpolarization of the carotid artery of the guinea-pig. *British Journal of Pharmacology* **119** 959–964. (doi:10.1111/j.1476-5381.1996.tb15765.x.)
- Cosentino F, Barker JE, Brand MP, Heales SJ, Werner ER, Tippins JR, West N, Channon KM, Volpe M & Lüscher TF 2001 Reactive Oxygen Species Mediate Endothelium-Dependent Relaxations in Tetrahydrobiopterin-Deficient Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **21** 496–503.
- Cunha TR, Giesen JAS, Rouver WN, Costa ED, Grando MD, Lemos VS, Bendhack LM & Santos RL 2020 Effects of progesterone treatment on endothelium-dependent coronary relaxation in ovariectomized rats. *Life Sciences* **247**. (doi:10.1016/j.lfs.2020.117391)
- Curtis MJ & Pabla R 1997 Nitric oxide supplementation or synthesis block – which is the better approach to treatment of heart disease ? *Trends in Pharmacological Sciences* **18** 239–244. (doi:10.1016/s0165-6147(97)01080-8)
- Cutini P, Sellés J & Massheimer V 2009 Cross-talk between rapid and long term effects of progesterone on vascular tissue. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*

- 115 36–43. (doi:10.1016/j.jsbmb.2009.02.014)
- Cutini PH, Campelo AE, Agriello E, Sandoval MJ, Rauschemberger MB & Massheimer VL 2012 The role of sex steroids on cellular events involved in vascular disease. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **132** 322–330. (doi:10.1016/j.jsbmb.2012.08.001)
- Cutini PH, Campelo AE & Massheimer VL 2014 Differential regulation of endothelium behavior by progesterone and medroxyprogesterone acetate. *Journal of Endocrinology* **220** 179–193. (doi:10.1530/JOE-13-0263)
- Dalpia PLM, Lamas AZ, Caliman IF, Ribeiro RF, Abreu GR, Moyses MR, Andrade TU, Gouvea SA, Alves MF, Carmona AK *et al.* 2015 Sex hormones promote opposite effects on ACE and ACE2 activity, hypertrophy and cardiac contractility in spontaneously hypertensive rats. *PLoS ONE* **10** 1–15. (doi:10.1371/journal.pone.0127515)
- Delgado NTB, Rouver W do N, Freitas-Lima LC, de Paula TDC, Duarte A, Silva JF, Lemos VS, Santos AMC, Mauad H, Santos RL *et al.* 2017 Pomegranate extract enhances endothelium-dependent coronary relaxation in isolated perfused hearts from spontaneously hypertensive ovariectomized rats. *Frontiers in Pharmacology* **7** 1–12. (doi:10.3389/fphar.2016.00522)
- Dickhout JG & Lee RMKW 1997 Structural and functional analysis of small arteries from young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **29** 781–789. (doi:10.1161/01.HYP.29.3.781)
- Diczfalusy E 1979 Gregoy Pincus and Steroidal Contraception: A New Departure in the History of mankind. *Journal of Steroid Biochemistry* **II** 3–11. (doi:10.1016/B978-0-08-023796-1.50006-2)
- Dora KA & Garland CJ 2001 Properties of smooth muscle hyperpolarization and relaxation to K⁺ in the rat isolated mesenteric artery. *American Journal Physiology Heart and Circulatory Physiology* **280** 2424–2429. (doi:10.1152/ajpheart.2001.280.6.H2424.)
- Dubey RK, Gillespie DG, Jackson EK & Keller PJ 1998 17 β -Estradiol, Its Metabolites, and Progesterone Inhibit Cardiac Fibroblast Growth. *Hypertension* **31** 522–528.
- Dubey RK, Oparil S, Imthurn B & Jackson EK 2002 Sex hormones and hypertension. *Cardiovascular Research* **53** 688–708. (doi:10.1016/S0008-6363(01)00527-2)
- Dusting GJ, Moncada S & Vane JR 1977 Prostacyclin (PGX) is the endogenous metabolite responsible for relaxation of coronary arteries induced by arachidonic acid. *Prostaglandins* **13** 3–15. (doi:10.1016/0090-6980(77)90037-5.)
- Eckman DM, Hopkins N, McBride C & Keef KD 1998 Endothelium-dependent relaxation and hyperpolarization in guinea-pig coronary artery : role of epoxyeicosatrienoic acid. *British Journal of Pharmacology* **124** 181–189. (doi:10.1038/sj.bjp.0701778.)
- Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, Garland CJ & Weston AH 1998 K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature* **396** 269–272. (doi:10.1038/24388.)
- Edwards G, Gardener MJ, Félétou M, Brady G, Vanhoutte PM & Weston AH 1999 Further investigation of endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) in rat hepatic artery : studies using 1-EBIO and ouabain. *British Journal of Pharmacology* **128** 1064–1070. (doi:10.1038 / sj.bjp.0702916.)
- Edwards G, Félétou M, Gardener MJ, Glen CD, Richards GR, Vanhoutte PM & Weston AH 2001 Further investigations into the endothelium-dependent hyperpolarizing effects of

- bradykinin and substance P in porcine coronary artery. *British Journal of Pharmacology* **133** 1145–1153. (doi:10.1038/sj.bjp.0704157.)
- Edwards G, Félétou M & Weston AH 2010 Endothelium-derived hyperpolarising factors and associated pathways: a synopsis. *European Journal of Physiology* **459** 863–879. (doi:10.1007/s00424-010-0817-1)
- Eickels M Van, Grohé C, Cleutjens JPM, Janssen BJ, Wellens HJJ & Doevendans PA 2001 17 B-Estradiol Attenuates the Development of pressure-overload hypertrophy. *Circulation* **104** 1419–1423.
- Erickson GF & Chang RJ 2007 Basic Biology: Ovarian Anatomy and Physiology. In *Treatment of the Postmenopausal Woman: Basic and Clinical Aspects*, Third Edit, p 49–66. Elsevier Inc. (doi:10.1016/B978-0-12-369443-0.50006-5)
- Ezzati M, Lopez AD, Rodgers A, Hoorn S Vander & Murray CJL 2002 Selected major risk factors and global and regional burden of disease. *The Lancet* **360** 1347–1360. (doi:10.1016/S0140-6736(02)11403-6.)
- Falkenstein E, Tillmann H, Christ M, Feuring M & Wehling M 2000 Multiple Actions of Steroid Hormones — A Focus on Rapid, Nongenomic Effects. *Pharmacological Reviews* **52** 513–556.
- Feletou M & Vanhoutte PM 1988 Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *British Journal of Pharmacology* **93** 515–524. (doi:10.1111/j.1476-5381.1988.tb10306.x.)
- Félétou M & Vanhoutte PM 2000 Endothelium-dependent hyperpolarization of vascular smooth muscle cells. *Acta pharmacologica Sinica* **21** 1–18.
- Félétou M & Vanhoutte PM 2006a Endothelium-derived hyperpolarizing factor: Where are we now? *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **26** 1215–1225. (doi:10.1161/01.ATV.0000217611.81085.c5)
- Félétou M & Vanhoutte PM 2006b Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **291** H985–1002. (doi:10.1152/ajpheart.00292.2006)
- Félétou M & Vanhoutte PM 2009 EDHF: an update. *Clinical Science* **117** 139–155. (doi:10.1042/cs20090096)
- Fernholz E 1934 Zur Synthese des Corpus-luteum-Hormons (Vorläuf. Mitteil.). *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft (A and B Series)* **67** 1855–1855. (doi:10.1002/cber.19340671118)
- Fleming I 2000 Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Trends in Cardiovascular Medicine* **10** 166–170. (doi:10.1016/S1050-1738(00)00065-7)
- Florey, Lord 1966 The Endothelial Cell. *British Medical Journal* **2** 487–490. (doi:10.1136/bmj.2.5512.487)
- Förstermann U & Münzel T 2006 Endothelial Nitric Oxide Synthase in Vascular Disease: From Marvel to Menace. *Circulation* **113** 1708–1714. (doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.602532)
- Fraenkel L 1903 Die Function des Corpus luteum. *Archiv fur Gynakologie* **68** 438–545. (doi:10.1007/BF01669987)
- Furchgott, RF; Vanhoutte P 1989 Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *The*

- FASEB Journal* **3** 2007–2018. (doi:10.1096/fasebj.3.9.2545495)
- Furchgott RF 1983 Role of Endothelium in Responses of Vascular Smooth Muscle. *Circulation Research* **53** 557–573. (doi:10.1161/01.RES.53.5.557)
- Furchgott RF & Zawadzki J V. 1980 The Obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288** 373–376. (doi:doi.org/10.1038/288373a0)
- Garg UC & Hassid A 1989 Nitric Oxide-generating Vasodilators and 8-Bromo-Cyclic Guanosine Monophosphate Inhibit Mitogenesis and Proliferation of Cultured Rat Vascular Smooth Muscle Cells. *Journal of Clinical Investigation* **83** 1774–1777. (doi:10.1172/JCI114081.)
- Garg D, Man Ng SS, Baig KM, Driggers P & Segars J 2017 Progesterone-Mediated Non-Classical Signaling. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **xx** 1–13. (doi:10.1016/j.tem.2017.05.006)
- Gebremedhin D, Lange AR, Narayanan J, Aebly MR, Jacobs ER & Harder DR 1998 Cat cerebral arterial smooth muscle cells express cytochrome P450 4A2 enzyme and produce the vasoconstrictor 20-HETE which enhances L-type Ca²⁺ current. *Journal of Physiology* **507** 771–781. (doi:10.1111/j.1469-7793.1998.771bs.x.)
- Ghosh D & Salerno JC 2003 Nitric Oxide Synthases: Domain structure and alignment in enzyme function and control. *Frontiers in Bioscience* **8** 193–209. (doi:10.2741/959)
- Giesen JAS, Rouver WN, Costa ED, Lemos VS & Santos RL 2020 Sex differences in progesterone-induced relaxation in the coronary bed from normotensive rats. *Journal of Molecular Endocrinology* **64** 91–102.
- Goldstein J, Sites CK & Toth MJ 2004 Progesterone stimulates cardiac muscle protein synthesis via receptor-dependent pathway. *Fertility and Sterility* **82** 430–436. (doi:10.1016/j.fertnstert.2004.03.018)
- Goldzieher JW 1964 Newer Drugs in Oral Contraception. *The Medical clinics of North America* **48** 529–545. (doi:10.1016/S0025-7125(16)33479-4)
- Graham JD & Clarke CL 1997 Physiological Action of Progesterone in Target Tissues. *Endocrine Reviews* **18** 502–519. (doi:10.1210/edrv.18.4.0308.)
- Griendling KK & Fitzgerald GA 2003 Oxidative Stress and Cardiovascular Injury: Part I: Basic Mechanisms and In Vivo Monitoring of ROS. *Circulation* **108** 1912–1916. (doi:10.1161/01.CIR.0000093660.86242.BB)
- Griffith TM 2004 Endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization : do gap junctions provide a unifying hypothesis ? *Nature* **141** 881–903. (doi:10.1038/sj.bjp.0705698)
- Hall R & Gomez-pan A 1976 The Hypothalamic Regulatory Hormones and their Clinical Applications. *Advances in Clinical Chemistry* **18** 173–212. (doi:doi.org/10.1016/S0065-2423(08)60298-X)
- Hartmann M & Wettstein A 1934 Ein krystallisiertes Hormon aus Corpus luteum. (Vorläufige Mitteilung). *Helvetica Chimica Acta* **17** 878–882. (doi:10.1002/hlca.193401701111)
- Heinzel B, John M, Klatt P, Bohme E & Mayer B 1992 Ca²⁺ / calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase. *Biochemical Journal* **281** 627–630. (doi:10.1042/bj2810627)
- Henderson KM, Willcox DL & Bruce NW 1983 Effect of infusion of PGI-2, 6-keto-PGF-1 α

- and PGF-2 α on luteal function in the pregnant rat. *Journal of Reproduction and Fertility* **69** 11–16. (doi:10.1530/jrf.0.0690011.)
- Hermenegildo C, Oviedo PJ, García-Martínez MC, García-Pérez MA, Tarín JJ & Cano A 2005 Progesterone stimulates prostacyclin production by human endothelial cells. *Human Reproduction* **20** 1554–1561. (doi:10.1093/humrep/deh803)
- Houshdaran S, Chen JC, Vallvé-Juanico J, Balayan S, Vo KC, Smith-McCune K, Greenblatt RM, Irwin JC & Giudice LC 2020 Progesterone Related to Progesterone and Testosterone Elicit Divergent Human Endometrial Transcriptomes and Biofunctions. *International Journal of Molecular Sciences* **21** 1–22. (doi:10.3390/ijms21072625)
- Houtzager HL 1981 Reinier de Graaf. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* **12** 385–387. (doi:10.1016/0028-2243(81)90083-6)
- Houtzager HL 2000 Reinier De Graaf and his contribution to reproductive biology. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* **90** 125–127. (doi:10.1016/S0301-2115(00)00258-X)
- Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE & Chaudhuri G 1987 Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Medical Sciences* **84** 9265–9269. (doi:10.1073/pnas.84.24.9265.)
- Iliev AA, Kotov GN, Landzhov B V, Jelev LS, Kirkov VK & Hinova-Palova D V 2018 A comparative morphometric study of the myocardium during the postnatal development in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Folia Morphologica* **77** 253–265. (doi:10.5603/FM.a2017.0094)
- Intlekofer KA & Petersen SL 2012 Distribution of mRNAs Encoding Classical Progesterone Receptor, Progesterone Membrane Components 1 and 2, Serpine mRNA Binding Protein 1, and Progesterone and AdipoQ Receptor Family Members 7 and 8 in Rat Forebrain. *Neuroscience* **172** 55–65. (doi:10.1016/j.neuroscience.2010.10.051.Distribution)
- Jacobsen BM & Horwitz KB 2012 Progesterone receptors, their isoforms and progesterone regulated transcription. *Molecular and Cellular Endocrinology* **357** 18–29. (doi:10.1016/j.mce.2011.09.016)
- John S & Schmieder RE 2000 Impaired endothelial function in arterial hypertension and hypercholesterolemia: potential mechanisms and differences. *Journal of Hypertension* **18** 363–374. (doi:10.1097/00004872-200018040-00002)
- Kaore S, Langade D, Yadav V, Sharma P, Thawani V & Sharma R 2012 Novel actions of progesterone: what we know today and what will be the scenario in the future? *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **64** 1040–1062. (doi:10.1111/j.2042-7158.2012.01464.x)
- Karatepe O, Altıok M, Battal M, Kamali G, Kemik A, Aydın T & Karahan S 2012 The effect of progesterone in the prevention of the chemically induced experimental colitis. *Acta Cirúrgica Brasileira* **27** 23–29. (doi:10.1590/S0102-86502012000100005)
- Kelm M, Feelisch M, Krebber T, Motz W & Strauer BE 1992 The role of nitric oxide in the regulation of coronary vascular resistance in arterial hypertension: comparison of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **20**. (doi:10.1097 / 00005344-199204002-00051)
- Khalil RA 2013 Estrogen, Vascular Estrogen Receptor and Hormone Therapy in Postmenopausal Vascular Disease. *Biochemical Pharmacology* **86** 1–36. (doi:10.2217/FON.09.6.Dendritic)

- Kim JK, Alley D, Seeman T, Karlamangla A & Crimmins E 2006 Recent Changes in Cardiovascular Risk Factors among Women and Men. *Journal of Women's Health* **15** 734–746. (doi:10.1089/jwh.2006.15.734.)
- Knowlton AA & Sun L 2001 Heat-shock factor-1 , steroid hormones , and regulation of heat-shock protein expression in the heart. *American Journal Physiology Heart and Circulatory Physiology* **280** H455–H464.
- Kone BC, Kuncewicz T, Zhang W & Yu Z 2003 Protein interactions with nitric oxide synthases : controlling the right time , the right place , and the right amount of nitric oxide. *American Journal Physiology Renal Physiology* **285** F178–F190. (doi:10.1152/ajprenal.00048.2003. invited review Protein)
- Korenshevsky V & Jones VE 1948 The effects of progesterone, oestradiol, thyroid hormone, and androsterone on the artificial premature climacteric of pure gonadal origin produced by ovariectomy in rats. *Journal of gerontology* **3** 21–39. (doi:10.1093/geronj/3.1.21)
- Krebs CJ, Jarvis ED, Chan J, Lydon JP, Ogawa S & Pfaff DW 2000 A membrane-associated progesterone-binding protein , 25-Dx , is regulated by progesterone in brain regions involved in female reproductive behaviors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97** 12816–12821.
- Kristiansson P & Wang JX 2001 Reproductive hormones and blood pressure during pregnancy. *Human Reproduction* **16** 13–17. (doi:10.1093/humrep/16.1.13)
- Kubes P, Suzuki M & Granger DN 1991 Nitric oxide : An endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88** 4651–4655. (doi:10.1073/pnas.88.11.4651.)
- Kühberger E, Groschner K, Kukovetz WR & Brunner F 1994 The role of myoendothelial cell contact in non-nitric oxide- , non-prostanoid-mediated endothelium-dependent relaxation of porcine coronary artery. *British Journal of Pharmacology* **113** 1289–1294. (doi:10.1111/j.1476-5381.1994.tb17138.x.)
- Kuhl H 2005 Pharmacology of estrogens and progestogens: Influence of different routes of administration. *Climacteric* **8** 3–63. (doi:10.1080/13697130500148875)
- Lacasa D, Liepvre X Le, Ferre P & Dugail I 2001 Progesterone Stimulates Adipocyte Determination and Differentiation 1 / Sterol Regulatory Element-binding Protein 1c Gene Expression. *The Journal of Biological Chemistry* **276** 11512–11516. (doi:10.1074/jbc.M008556200)
- Leavitt WW & Blaha GC 1972 An Estrogen-Stimulated, Progesterone-Binding System in the Hamster Uterus and Vagina. *Steroids* **19** 263–274. (doi:10.1016/0039-128x(72)90010-4)
- Lee RM 1985 Vascular changes at the prehypertensive phase in the mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. *Blood Vessels* **22** 105–126. (doi:10.1159/000158589)
- Lee S Da, Kuo WW, Ho YJ, Lin AC, Tsai CH, Wang HF, Kuo CH, Yang AL, Huang CY & Hwang JM 2008 Cardiac Fas-dependent and mitochondria-dependent apoptosis in ovariectomized rats. *Maturitas* **61** 268–277. (doi:10.1016/j.maturitas.2008.07.004)
- Lieberman A & Curtis L 2017 In Defense of Progesterone : A Review of the Literature. *Alternative Therapies in Health and Medicine* **23** 24–32.
- De Lignières B 1999 Oral micronized progesterone. *Clinical Therapeutics* **21** 41–60. (doi:10.1016/S0149-2918(00)88267-3)
- Lim WK, Wren B, Jepson N, Roy S & Caplan G 1999 Effect of Hormone Replacement Therapy

- on Left Ventricular Hypertrophy. *American Journal of Cardiology* **83** 1132-A9. (doi:10.1016/s0002-9149(99)00029-6)
- Lin Y, Cheng Y, Hu J, Chu L, Shyu W, Kao C, Lin T-B, Kuo C-H, Yang A-L & Lee S-D 2016 The Coexistence of Hypertension and Ovariectomy Additively Increases Cardiac Apoptosis. *International Journal of Molecular Sciences* **17**20361–16. (doi:10.3390/ijms17122036)
- Liou C-M, Yang A-L, Kuo C-H, Tin H, Huang C-Y & Lee S-D 2010 Effects of 17beta-estradiol on cardiac apoptosis in ovariectomized rats. *Cell Biochemistry and Function* **28** 521–528. (doi:10.1002/cbf.1687 Effects)
- Liu Y, Bubolz AH, Mendoza S, Zhang DX & Gutterman DD 2011 H₂O₂ is the transferrable factor mediating flow-induced dilation in human coronary arterioles. *Circulation Research* **108** 566–573. (doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.237636.H)
- Long JA & Evans HM 1922 *The estrous cycle in the rat and its associated phenomena. Memories of University of California*. Berkeley, California.
- Lyons CR, Orloff GJ & Cunningham JM 1992 Molecular Cloning and Functional Expression of an Inducible Nitric Oxide Synthase from a Murine Macrophage Cell Line. *The Journal of Biological Chemistry* **267** 6370–6374.
- Makila UM, Wahlberg L, Viinikka L & Ylikorkala O 1982 Regulation of Prostacyclin and Thromboxane production by human umbilical vessels: the effect estradiol and progesterone in a superfusion model. *Prostaglandins Leukotrienes and Medicine* **8** 115–124. (doi:10.1016/s0262-1746(82)80003-6.)
- Malachias M, Plavnik F, Machado C, Malta D, Scala L & Fuchs S 2016 7th Brazilian Guideline of Arterial Hypertension. Chapter 1 - Concept, Epidemiology and Primary Prevention. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* **107** 1–6. (doi:10.5935/abc.20160151)
- Mandl AM 1951 The phases of the oestrous cycle in the adult white rat. *The Journal of Experimental Biology* **28** 576–584.
- Mann RJ 1976 Regnier de Graaf, 1641-1673, investigator. *Fertility and Sterility* **27** 466–468. (doi:10.1016/S0015-0282(16)41788-7)
- Marcondes F, Bianchi F & Tanno A 2002 Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology* **62** 609–614. (doi:10.1590/s1519-69842002000400008)
- Marker RE, Wagner R, Ulshafer PR, Wittbecker EL, Goldsmith DPJ & Ruof CH 1947 New Sources for Saponins. *Journal of the American Chemical Society* **69** 2242. (doi:https://doi.org/10.1021/ja01201a515)
- Martin L, Das RM & Finn CA 1973 The inhibition by progesterone of uterine epithelial proliferation in the mouse. *Journal of Endocrinology* **57** 549–554.
- Matoba T, Shimokawa H, Nakashima M, Hirakawa Y, Mukai Y, Hirano K, Kanaide H & Takeshita A 2000 Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *The Journal of Clinical Investigation* **106** 1521–1530. (doi:10.1172/JCI10506.)
- Matoba T, Shimokawa H, Kubota H, Morikawa K, Fujiki T, Kunihiro I, Mukai Y, Hirakawa Y & Takeshita A 2002 Hydrogen Peroxide Is an Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor in Human Mesenteric Arteries. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **290** 909–913. (doi:10.1006/bbrc.2001.6278)
- Matoba T, Shimokawa H, Morikawa K, Kubota H, Kunihiro I, Urakami-harasawa L, Mukai Y,

- Hirakawa Y, Akaike T & Takeshita A 2003 Electron Spin Resonance Detection of Hydrogen Peroxide as an Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor in Porcine Coronary Microvessels. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **23** 1224–1231. (doi:10.1161/01.ATV.0000078601.79536.6C)
- Maxson WS & Hargrove JT 1985 Bioavailability of oral micronized progesterone. *Fertility and Sterility* **44** 622–626. (doi:10.1016/S0015-0282(16)48977-6)
- McClean AC, Valenzuela N, Fai S & Bennett SAL 2012 Performing Vaginal Lavage, Crystal Violet Staining, and Vaginal Cytological Evaluation for Mouse Estrous Cycle Staging Identification. *Journal of Visualized Experiments* **67** e4389. (doi:10.3791/4389)
- Mendiberry J, Selles J & Massheimer V 2006 Involvement of phosphoinositide-3-kinase and phospholipase C transduction systems in the non-genomic action of progesterone in vascular tissue. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **38** 288–296. (doi:10.1016/j.biocel.2005.09.012)
- Mendonça F, Evêncio-Neto J, Baratella-Evêncio L, Teixeira A, Wanderley-Teixeira V, Mendonça J, Medeiros J, Melo A & Soares A 2002 Avaliação do ciclo estral de ratas (*Rattus norvegicus albinus*) pinealectomizadas e submetidas à ausência de luz. *Arquivos do Instituto Biológico* **69** 105–107.
- Mercier I, Colombo F, Mader S & Calderone A 2002 Ovarian hormones induce TGF- β 3 and fibronectin mRNAs but exhibit a disparate action on cardiac fibroblast proliferation. *Cardiovascular Research* **53** 728–739.
- Michiels C 2003 Endothelial Cell Functions. *Journal of Cellular Physiology* **196** 430–443. (doi:10.1002/jcp.10333)
- Milgrom E, Atger M & Baulieu E-E 1970 Progesterone in Uterus and Plasma. IV - Progesterone Receptor(s) in Guinea Pig Uterus Cytosol. *Steroids* **16** 741–754. (doi:10.1016/s0039-128x(70)80152-0)
- Minshall RD & Malik AB 2006 Transport Across the Endothelium: Regulation of Endothelial Permeability. *Handbook of Experimental Pharmacology* **176** 107–144. (doi:10.1007/3-540-32967-6_4)
- Minshall RD, Pavcnik D, Browne DL & Hermsmeyer K 2002 Nongenomic vasodilator action of progesterone on primate coronary arteries. *Journal of Applied Physiology* **92** 701–708. (doi:10.1152/japplphysiol.00689.2001.)
- Mittelman-smith MA, Rudolph LM, Mohr MA & Micevych PE 2017 Rodent Models of Non-classical Progesterone Action Regulating Ovulation. *Frontiers in Endocrinology* **8** 1–13. (doi:10.3389/fendo.2017.00165)
- Miura H & Gutterman DD 1998 Human Coronary Arteriolar Dilation to Arachidonic Acid Depends on Cytochrome P-450 Monooxygenase and Ca²⁺-Activated K⁺ Channels. *Circulation Research* **83** 501–507. (doi:10.1161/01.res.83.5.501.)
- Miura H, Bosnjak JJ, Ning G, Saito T, Miura M & Gutterman DD 2003 Role for Hydrogen Peroxide in Flow-Induced Dilation of Human Coronary Arterioles. *Circulation Research* **92** e31–e40. (doi:10.1161/01.RES.0000054200.44505.AB)
- Molinari C, Battaglia A, Grossini E, Mary DASG, Stoker JB, Surico N, Vacca G, Fisiologia L, Mediche S, Avogadro OA *et al.* 2001 The effect of progesterone on coronary blood flow in anaesthetized pigs. *Experimental Physiology* **86** 101–108. (doi:10.1113/eph8602076)
- Moncada S 1997 Nitric Oxide in the Vasculature: Physiology and Pathophysiology. *Annals*

- New York Academy of Sciences* **811** 60–69. (doi:10.1111 / j.1749-6632.1997.tb51989.x)
- Moncada S & Higgs A 1993 The L-arginine-Nitric oxide pathway. *The New England Journal of Medicine* **329** 2002–2012. (doi:10.1056/NEJM199312303292706.)
- Moncada S, Gryglewski R, Bunting S & Vane JR 1976 An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* **263** 663–665. (doi:10.1038/263663a0)
- Moncada S, Vane JR & Higgs EA 1977 Human arterial and venous tissues generate prostacyclin, a potent inhibitor of platelet aggregation. *The Lancet* **1** 18–20. (doi:10.1016/s0140-6736(77)91655-5.)
- Montes GS & Luque EH 1988 Effects of ovarian steroids on vaginal smears in the rat. *Acta Anatomica* **133** 192–199. (doi:10.1159/000146639)
- Mosca L, Banka CL, Benjamin EJ, Berra K, Bushnell C, Dolor RJ, Ganiats TG, Gomes AS, Gornik HL, Gracia C *et al.* 2007 Evidence-Based Guidelines for Cardiovascular Disease Prevention in Women: 2007 Update. *Circulation* **115** 1481–1501. (doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.181546)
- Münzel T, Daiber A, Ullrich V & Mülsch A 2005 Vascular Consequences of Endothelial Nitric Oxide Synthase Guanylyl Cyclase and the cGMP-Dependent Protein Kinase. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **25** 1551–1557. (doi:10.1161/01.ATV.0000168896.64927.bb)
- Nakamura Y, Suzuki T, Inoue T, Tazawa C, Ono K, Moriya T, Saito H, Ishibashi T, Takahashi S, Yamada S *et al.* 2005 Progesterone Receptor Subtypes in Vascular Smooth Muscle Cells of Human Aorta. *Endocrine Journal* **52** 245–252. (doi:10.1507/endocrj.52.245.)
- Norris R V. 1987 Historical Development of Progesterone Therapy. In *Premenstrual Syndrome*, Springer, p 273–285. Orgs B Ginsburg & B Carter. Boston. (doi:10.1016/B978-032303506-4.10264-0)
- O'Brien SN, Welter BH, Mantzke KA & Price TM 1998 Identification of Progesterone Receptor in Human Subcutaneous Adipose Tissue. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **83** 509–513.
- O'Malley BW & Buller RE 1977 Mechanisms of steroid hormone action. *Journal of Investigative Dermatology* **68** 1–4. (doi:10.1111/1523-1747.ep12485116)
- Oess S, Icking A, Fulton D, Govers R & Müller-Esterl W 2006 Subcellular targeting and trafficking of nitric oxide synthases. *Biochemical Journal* **396** 401–409. (doi:10.1042/BJ20060321)
- Ong KL, Tso AWK, Lam KSL & Cheung BMY 2008 Gender Difference in Blood Pressure Control and Cardiovascular Risk Factors in Americans With Diagnosed Hypertension. *Hypertension* **51** 1142–1148. (doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.105205)
- Oviedo PJ, Sobrino A, Novella S, Rius C, Laguna-Fernandez A, García-Perez MA, Tarín JJ, Cano A & Hermenegildo C 2011 Progestogens reduce thromboxane production by cultured human endothelial cells. *Climacteric* **14** 41–48. (doi:10.3109/13697131003602496)
- Palmer RMJ 1993 The L-arginine: nitric oxide pathway. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* **2** 122–128. (doi:10.1097/00041552-199301000-00018)
- Palmer RMJ, Ferrige AG & Moncada S 1987 Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327** 524–526.

(doi:10.1038/327524a0)

- Pang Y, Dong J & Thomas P 2015 Progesterone increases nitric oxide synthesis in human vascular endothelial cells through activation of membrane progesterone receptor- α . *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* **308** 899–911. (doi:10.1152/ajpendo.00527.2014)
- Parkington HC, Coleman HA & Tare M 2004 Prostacyclin and endothelium-dependent hyperpolarization. *Pharmacological Research* **49** 509–514. (doi:10.1016/j.phrs.2003.11.012)
- Pelzer T, Jazbutyte V, Hu K, Segerer S, Nahrendorf M, Nordbeck P, Bonz AW, Muck J, Fritzemeier KH, Hegele-Hartung C *et al.* 2005 The estrogen receptor- α agonist 16 α -LE2 inhibits cardiac hypertrophy and improves hemodynamic function in estrogen-deficient spontaneously hypertensive rats. *Cardiovascular Research* **67** 604–612. (doi:10.1016/j.cardiores.2005.04.035)
- Pérez-López FR, Chedraui P, Gilbert JJ & Pérez-Roncero G 2009 Cardiovascular risk in menopausal women and prevalent related co-morbid conditions : facing the post-Women's Health Initiative era. *Fertility and Sterility* **92** 1171–1186. (doi:10.1016/j.fertnstert.2009.06.032)
- Pincus G, Rock J, Garcia CR, Rice-Wray E, Paniagua M & Rodriguez I 1958 Fertility control with oral medication. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **75** 1333–1346. (doi:10.1016/0002-9378(58)90722-1)
- Polotsky HN & Polotsky AJ 2010 Metabolic Implications of Menopause. *Seminars in Reproductive Medicine* **28** 426–434. (doi:10.1055/s-0030-1262902)
- Proctor KG, Falck JR & Capdevila J 1987 Intestinal Vasodilation by Epoxyeicosatrienoic Acids : Arachidonic Acid Metabolites Produced by a Cytochrome P450 Monooxygenase. *Circulation Research* **60** 50–59. (doi:10.1161/01.res.60.1.50.)
- Qiao X, McConnell KR & Khalil RA 2008 Sex steroids and vascular responses in hypertension and aging. *Gender Medicine* **5** 46–64. (doi:10.1016/j.genm.2008.03.006)
- Radomski M, Palmer R & Moncada S 1987 Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *The Lancet* **2** 1057–1058. (doi:10.1016/s0140-6736(87)91481-4.)
- Rapoport RM & Murad F 1983 Endothelium-dependent and nitrovasodilator-induced relaxation of vascular smooth muscle: role of cyclic GMP. *Journal of Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Research* **9** 281–296.
- Reckelhoff JF, Zhang H & Granger JP 1998 Testosterone exacerbates hypertension and reduces pressure-natriuresis in male spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **31** 435–439.
- Rizzoni D, Castellano M, Porteri E, Bettoni G, Muiesan ML & Agabiti-Rosei E 1994 Vascular structural and functional alterations before and after the development of hypertension in SHR. *American Journal of Hypertension* **7** 193–200. (doi:10.1093/ajh/7.2.193)
- Rodriguez-Cuenca S, Monjo M, Proenza AM & Roca P 2005 Depot differences in steroid receptor expression in adipose tissue : possible role of the local steroid milieu. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* **288** E200–E207. (doi:10.1152/ajpendo.00270.2004.)
- Rondell P 1974 Role of Steroid Synthesis in the Process of Ovulation. *Biology of Reproduction* **10** 199–215. (doi:10.1095/biolreprod10.2.199)

- Rosolowsky M & Campbell WB 1993 Role of PGI₂ and epoxyeicosatrienoic acids in relaxation of bovine coronary arteries to arachidonic acid. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **264** H327–H335. (doi:10.1152/ajpheart.1993.264.2.h327)
- Rouver WN, Delgado NTB, Menezes JB, Santos RL & Moyses MR 2015 Testosterone replacement therapy prevents alterations of coronary vascular reactivity caused by hormone deficiency induced by castration. *PLoS ONE* **10**. (doi:10.1371/journal.pone.0137111)
- Ruggeri ZM 2003 Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **1** 1335–1342. (doi:10.1046/j.1538-7836.2003.00260.x)
- Rylance PB, Lafferty K & Studd JWW 1985 Natural progesterone and antihypertensive action. *British Medical Journal (Clinical research ed.)* **290** 1288. (doi:10.1136/bmj.290.6477.1288-a)
- Sakuma I, Stuehr DJ, Gross SS, Nathan C & Levi R 1988 Identification of arginine as a precursor of endothelium-derived relaxing factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85** 8664–8667. (doi:10.1073/pnas.85.22.8664)
- Sanderson TJ 2009 Placental and Fetal Steroidogenesis. *Methods in Molecular Biology* **550** 127–136. (doi:10.1007/978-1-60327-009-0)
- Santos RL, Abreu GR, Bissoli NS & Moysés MR 2004 Endothelial mediators of 17 β -estradiol-induced coronary vasodilation in the isolated rat heart. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **37** 569–575. (doi:10.1590/s0100-879x2004000400014)
- Santos RL, Marin EB, Gonçalves WLS, Bissoli NS, Abreu GR & Moysés MR 2010 Sex differences in the coronary vasodilation induced by 17 β -oestradiol in the isolated perfused heart from spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiologica* **200** 203–210. (doi:10.1111/j.1748-1716.2010.02140.x)
- Santos RL, Da Silva FB, Ribeiro RF & Stefanon I 2014 Sex hormones in the cardiovascular system. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation* **18** 89–103. (doi:10.1515/hmbci-2013-0048)
- Santos RL, Lima JT, Rouver WN & Moysés MR 2016 Deficiency of sex hormones does not affect 17- β -estradiol-induced coronary vasodilation in the isolated rat heart. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **49** 1–9. (doi:10.1590/1414-431X20165058)
- Scarpin KM, Graham JD, Mote PA & Clarke CL 2009 Progesterone action in human tissues : regulation by progesterone receptor (PR) isoform expression , nuclear positioning and coregulator expression. *Nuclear Receptor Signaling* **7** 1–13. (doi:10.1621/nrs.07009)
- Schally A V., Arimura A, Kastin AJ, Matsuo H, Baba Y, Redding TW, Nair RMG, Debeljuk L & White WF 1971 Gonadotropin-releasing hormone: One polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones. *Science* **173** 1036–1038. (doi:10.1126/science.173.4001.1036)
- Schenkel PC, Fernandes RO, Viegas VU, Campos C, Fernandes TRG, Sander A & Belló-klein A 2014 Catalase Influence in the Regulation of Coronary Resistance by Estrogen : Joint Action of Nitric Oxide and Hydrogen Peroxide. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2014** 6 pages. (doi:10.1155/2014/159852)
- Selles J, Polini N, Alvarez C & Massheimer V 2001 Progesterone and 17-estradiol acutely stimulate nitric oxide synthase activity in rat aorta and inhibit platelet aggregation. *Life Sciences* **69** 815–827. (doi:doi.org/10.1016/S0024-3205(01)01174-2)

- Selles J, Polini N, Alvarez C & Massheimer V 2002 Nongenomic action of progesterone in rat aorta: Role of nitric oxide and prostaglandins. *Cellular Signalling* **14** 431–436. (doi:10.1016/s0898-6568(01)00265-0.)
- Selye H 1942 Correlations between the chemical structure and the pharmacological actions of the steroids. *Endocrinology* **30** 437–453. (doi:10.1210/endo-30-3-437)
- Sen BS, Tarazi RC, Khairallah PA & Bumpus FM 1974 Cardiac Hypertrophy in Spontaneously Hypertensive Rats. *Circulation Research* **35** 775–782. (doi:DOI: 10.1161 / 01.res.35.5.775)
- Sessa WC, Harrison JK, Barber CM, Zeng D, Durieux ME, D'Angelo DD, Lynch KR & Peach MJ 1992 Molecular Cloning and Expression of a cDNA Encoding Endothelial Cell Nitric Oxide Synthase. *The Journal of Biological Chemistry* **267** 15274–15276.
- Setchell BP 1974 The contributions of Regnier de Graaf to reproductive biology. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* **4** 1–13. (doi:10.1016/0028-2243(74)90003-3)
- Shen J, Zheng X & Kwan C 2000 Evidence for P2 -purinoceptors contribution in H₂O₂-induced contraction of rat aorta in the absence of endothelium. *Cardiovascular Research* **47** 574–585. (doi:doi.org/10.1016/S0008-6363(00)00123-1)
- Sherman MR & Corvol PL 1970 Progesterone-binding Components of Chick Oviduct. I. Preliminary Characterization of Cytoplasmic Components. *The Journal of Biological Chemistry* **245** 6085–6096.
- Shimokawa H 2010 Hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* **459** 915–922. (doi:10.1007/s00424-010-0790-8)
- Shimokawa H 2020 Reactive oxygen species in cardiovascular health and disease : special references to nitric oxide , hydrogen peroxide , and Rho kinase. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* **66** 83–91. (doi:10.3164/jcbn.19)
- Shimokawa H, Aarhus LL & Vanhoutte PM 1987 Porcine Coronary Arteries With Regenerated Endothelium Have a Reduced Endothelium-Dependent Responsiveness to Aggregating Platelets and Serotonin. *Circulation Research* **61** 256–270. (doi:10.1161/01.res.61.2.256.)
- Shirling D, Ashby J & Baird J 1981 Effect of Progesterone on Lipid Metabolism in the Intact Rat. *Journal of Endo* **90** 285–294.
- Sitruk-ware R, Bricaire C, Lignieres B, Yaneva H & Mauvais-Jarvis P 1987 Oral Micronized Progesterone. Bioavailability pharmacokinetics, pharmacological and therapeutic implications: a review. *Contraception* **36** 373–402. (doi:10.1016/0010-7824(87)90088-6)
- Slotta KH 1975 The isolation of progesterone. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **121** 428. (doi:10.1016/0002-9378(75)90028-9)
- Slotta KH 1983 Progesterone. *Trends in Biochemical Sciences* **8** 417–419. (doi:https://doi.org/10.1016/0968-0004(83)90309-2)
- Slotta KH, Rusching H & Fels E 1934 Reindarstellung der Hormone aus dem Corpus Luteum. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **67** 1270–1273. (doi:https://doi.org/10.1002/cber.19340670729)
- Smith JL, Kupchak BR, Garitaonandia I, Hoang LK, Andrew S, Regalla LM & Lyons TJ 2008 Heterologous expression of human mPR α , mPR β and mPR γ in yeast confirms their ability to function as membrane progesterone receptors. *Steroids* **73** 1160–1173.

- (doi:10.1016/j.steroids.2008.05.003.Heterologous)
- Smyth EM, Grosser T, Wang M, Yu Y & Fitzgerald GA 2009 Prostanoids in health and disease. *Journal of Lipid Research* **50 suppl** 423–428. (doi:10.1194/jlr.R800094-JLR200)
- Sobey C, Heistad D & Faraci F 1997 Mechanisms of bradykinin-induced cerebral vasodilatation in rats. Evidence that reactive oxygen species activate K⁺ channels. *Stroke* **28** 2290–2295. (doi:10.1161/01.str.28.11.2290)
- Sotníková R 1998 Investigation of the Mechanisms Underlying H₂O₂-Evoked Contraction in the Isolated Rat Aorta. *General Pharmacology* **31** 115–119. (doi:10.1016/s0306-3623(97)00392-3.)
- Stanczyk FZ, Hapgood JP, Winer S & Mishell Jr DR 2013 Progestogens used in postmenopausal hormone therapy: Differences in their pharmacological properties, intracellular actions, and clinical effects. *Endocrine Reviews* **34** 171–208. (doi:10.1210/er.2012)
- Stelmanska E, Kmiec Z & Swierczynski J 2012 The gender- and fat depot-specific regulation of leptin , resistin and adiponectin genes expression by progesterone in rat. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **132** 160–167. (doi:10.1016/j.jsbmb.2012.05.005)
- Stevens-Truss R, Beckingham K & Marletta MA 1997 Calcium Binding Sites of Calmodulin and Electron Transfer by Neuronal Nitric Oxide Synthase. *Biochemistry* **36** 12337–12345. (doi:10.1021/bi970973k.)
- Sutter-Dub M-T, Sfaxi A & Strozza P 1983 Glucose metabolism in the female rat adipocyte: lipid synthesis from glucose during pregnancy and progesterone treatment. *Journal of Endocrinology* **97** 207–212.
- Tambouret RH & Wilbur DC 2003 The many faces of atrophy in gynecologic cytology. *Clinics in Laboratory Medicine* **23** 659–679. (doi:10.1016/S0272-2712(03)00059-3)
- Taraborrelli S 2015 Physiology , production and action of progesterone. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* **94** 8–16. (doi:10.1111/aogs.12771)
- Tare M, Parkinson HC, Coleman HA, Neild TO & Dusting GJ 1990 Hyperpolarization and relaxation of arterial smooth muscle caused by nitric oxide derived from the endothelium. *Nature* **346** 69–71. (doi:10.1038/346069a0.)
- Tateson J, Moncada S & Vane J 1977 Effects of Prostacyclin (PGX) on Cyclic AMP concentrations in human platelets. *Prostaglandins* **13** 389–397. (doi:10.1016/0090-6980(77)90019-3)
- Taylor SG & Weston AH 1988 Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a new endogenous inhibitor from the vascular endothelium. *Trends in Pharmacological Sciences* **9** 272–274. (doi:10.1016/0165-6147(88)90003-x)
- Tchernof A, Desmeules A, Richard C, Laberge P, Daris M, Mailloux J, Rhéaume C & Dupont P 2004 Ovarian hormone status and abdominal visceral adipose tissue metabolism. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **89** 3425–3430. (doi:10.1210/jc.2003-031561)
- Thomas P 2008 Characteristics of membrane progestin receptor alpha (mPR α) and progesterone membrane receptor component one (PGRMC1) and their roles in mediating rapid progestin actions. *Frontiers in Neuroendocrinology* **29** 292–312. (doi:10.1016/j.yfrne.2008.01.001.Characteristics)

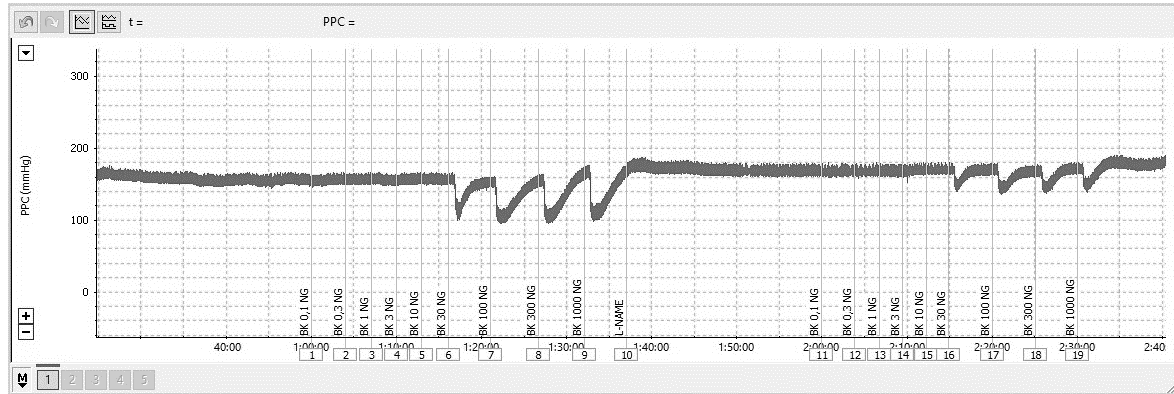
- Thomas P & Pang Y 2013 Protective actions of progesterone in the cardiovascular system : Potential role of membrane progesterone receptors (mPRs) in mediating rapid effects. *Steroids* **78** 583–588. (doi:10.1016/j.steroids.2013.01.003)
- Thomas P, Pang Y, Dong J, Groenen P, Kelder J, Vlieg J De, Zhu Y & Tubbs C 2007 Steroid and G Protein Binding Characteristics of the Seatrout and Human Progesterone Membrane Receptor — Subtypes and Their Evolutionary Origins. *Endocrinology* **148** 705–718. (doi:10.1210/en.2006-0974)
- Touyz RM 2004 Reactive Oxygen Species, Vascular Oxidative Stress, and Redox Signaling in Hypertension: What Is the Clinical Significance? *Hypertension* **44** 248–252. (doi:10.1161/01.HYP.0000138070.47616.9d)
- Trabert B, Sherman ME, Kannan N & Stanczyk FZ 2020 Progesterone and breast cancer. *Endocrine Reviews* **41** 320–344. (doi:10.1210/endrev/bnz001)
- Tsai M & Malley BWO 1994 Molecular Mechanisms of action of Steroid/Thyroid receptor superfamily members. *Annual Review of Biochemistry* **63** 451–486. (doi:10.1146/annurev.bi.63.070194.002315)
- United States H 2010 National Center for Health Statistics. In *With Special Feature on Death and Dying*. Hyattsville, MD.
- Vanhoutte PM 1989 Endothelium and Control of Vascular Function. State of the Art lecture. *Hypertension* **13** 658–667. (doi:10.1161/01.HYP.13.6.658)
- Vanhoutte PM 1991 Hypercholesterolaemia, atherosclerosis and release of endothelium-derived relaxing factor by aggregating platelets. *European Heart Journal* **12** 25–32. (doi:10.1093/eurheartj/12.suppl_e.25.)
- Vanhoutte PM 2009 Endothelial dysfunction: the first step toward coronary arteriosclerosis. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* **73** 595–601.
- Vanhoutte PM 2016 Endothelial Lessons. *Current Vascular Pharmacology* **14** 175–180. (doi:10.2174/1570161114666151202204754)
- Vanhoutte PM, Rubanyi GM, Miller VM & Houston DS 1986 Modulation of vascular smooth muscle contraction by the endothelium. *Annual Review of Physiology* **48** 307–320. (doi:10.1146/annurev.ph.48.030186.001515)
- Vanhoutte PM, Shimokawa H, Tang EHC & Feletou M 2009 Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiologica* **196** 193–222. (doi:10.1111/j.1748-1716.2009.01964.x)
- Vasan RS, Larson MG, Leip EP, Evans JC, O'Donnell CJ, Kannel WB & Levy D 2001 Impact of high-normal blood pressure on the risk of cardiovascular disease. *The New England Journal of Medicine* **345** 1291–1297. (doi:10.1056/NEJMoa003417.)
- Vázquez F, Rodríguez-Manzanique JC, Lydon JP, Edwards DP, O'Malley BW & Iruela-Arispe ML 1999 Progesterone regulates proliferation of endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry* **274** 2185–2192. (doi:10.1074/jbc.274.4.2185)
- Verhamme P & Hoylaerts MF 2006 The Pivotal role of the endothelium in haemostasis and thrombosis. *Acta Clinica Belgica* **61** 213–219. (doi:10.1179/acb.2006.036)
- Wei LL, Gonzalez-aller C, Wood WM, Miller LA & Horwitz KB 1990 5' - Heterogeneity in Human Progesterone Receptor Transcripts Predicts a New Amino-Terminal Truncated " C " -Receptor and Unique A-Receptor Messages. *Molecular Endocrinology* **412** 1883–1840.

- Wei LL, Hawkins P, Baker C, Norris B, Sheridan PL & Quinn PG 1996 An Amino-Terminal Truncated Progesterone Receptor Isoform, PRC, Enhances Progestin-Induced Transcriptional Activity. *Molecular Endocrinology* **10** 1379–1387.
- Wei LL, Norris BM & Baker CJ 1997 An N-terminally Truncated Third Progesterone Receptor Protein, PRC, Forms Heterodimers with PRB but Interferes in PRB - DNA Binding. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **62** 287–297.
- Wise H & Jones RL 1996 Focus on prostacyclin and its novel mimetics. *Trends in Pharmacological Sciences* **17** 17–21. (doi:10.1016/0165-6147(96)81565-3)
- Xu Y, Arenas IA, Armstrong SJ & Davidge ST 2003 Estrogen modulation of left ventricular remodeling in the aged heart. *Cardiovascular Research* **57** 388–394.
- Yada T, Shimokawa H, Hiramatsu O, Kajita T, Shigeto F, Goto M, Ogasawara Y & Kajiya F 2003 Hydrogen Peroxide, an Endogenous Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor, Plays an Important Role in Coronary Autoregulation In Vivo. *Circulation* **107** 1040–1045. (doi:10.1161/01.CIR.0000050145.25589.65)
- Yamori Y 1974 Contribution of cardiovascular factors to the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. A preliminary report. *Japanese Heart Journal* **15** 194–196. (doi:https://doi.org/10.1536/ihj.15.194)
- Yamori Y 1984 Development of the spontaneously hypertensive rat (SHR) and of various spontaneous rat models, and their implications. In *Experimental and Genetic Models of Hypertension. Handbook of Hypertension*, p 224–239. Org W De Jong.
- Yamori Y, Mori C, Nishio T, Ooshima A, Horie R, Ohtaka M, Soeda T, Saito M, Abe K, Nara Y *et al.* 1979 Cardiac Hypertrophy in Early Hypertension. *The American Journal of Cardiology* **44** 964–969.
- Yanes LL & Reckelhoff JF 2011 Postmenopausal Hypertension. *American Journal of Hypertension* **24** 1–18. (doi:10.1038/ajh.2011.71.Postmenopausal)
- Yener T, Turkkan i TA, Aslan H, Aytan H & Caliskan AC 2007 Determination of oestrous cycle of the rats by direct examination: How reliable? *Anatomia, Histologia, Embryology* **36** 75–77. (doi:10.1111/j.1439-0264.2006.00743.x)
- Yuan D, Yu L, Qu T, Zhang S, Zhao Y, Pan J, Xu Q, He Y, Zhang J & Yue L 2015 Identification and Characterization of Progesterone- and Estrogen-Regulated MicroRNAs in Mouse Endometrial Epithelial Cells. *Reproductive Sciences* **22** 223–234. (doi:10.1177/1933719114537714)
- Zeldin DC 2001 Epoxygenase Pathways of Arachidonic Acid Metabolism. *The Journal of Biological Chemistry* **276** 36059–36062. (doi:10.1074/jbc.R100030200)
- Zhao W, Zhang J, Lu Y & Wang R 2001 The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K⁺ ATP channel opener. *The EMBO Journal* **20** 6008–6016. (doi:10.1093/emboj/20.21.6008)
- Zhu Y, Bond J & Thomas P 2003 Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progestin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100** 2237–2242. (doi:10.1073/pnas.0436133100)

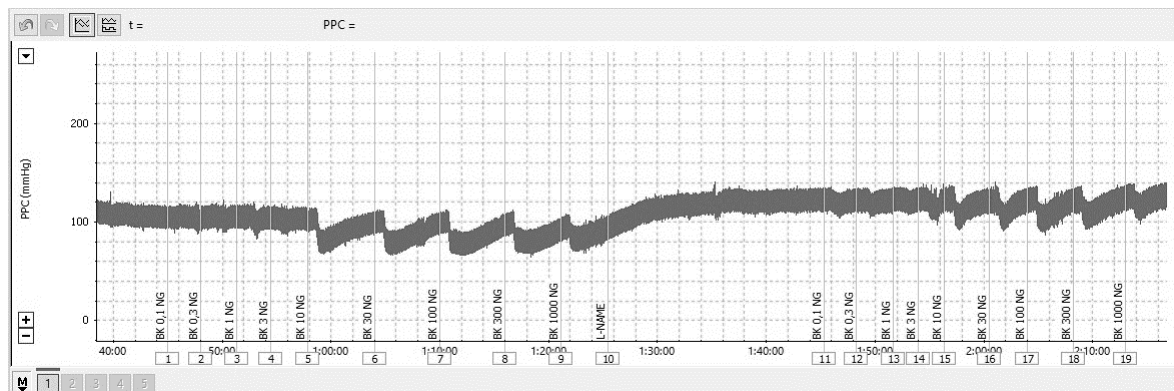
APÊNDICE

Apêndice A: Registro típico da curva de relaxamento induzida pela bradicinina no leito coronariano de ratos seguida pela inibição com L-NAME

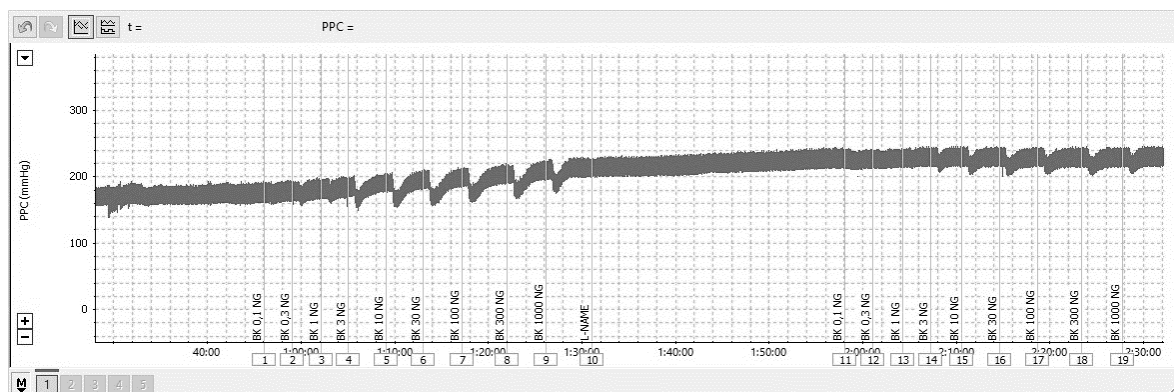
SHAM



OVX

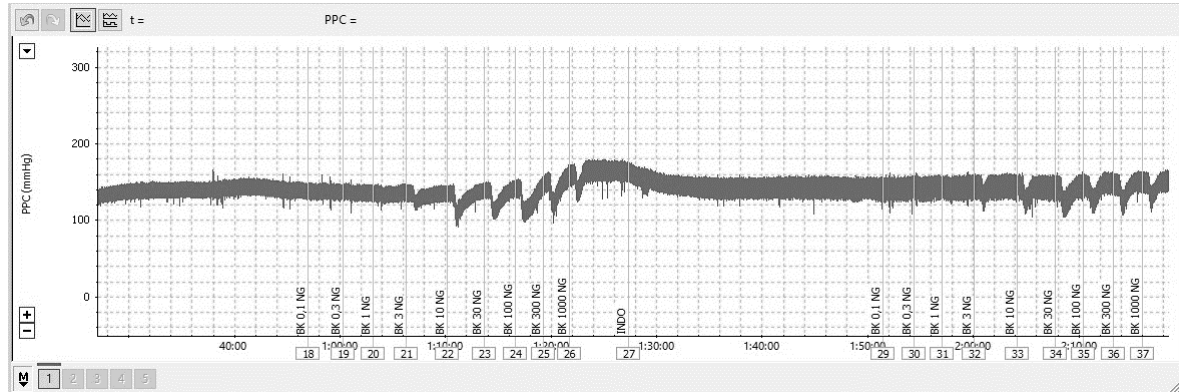


OVX-P4

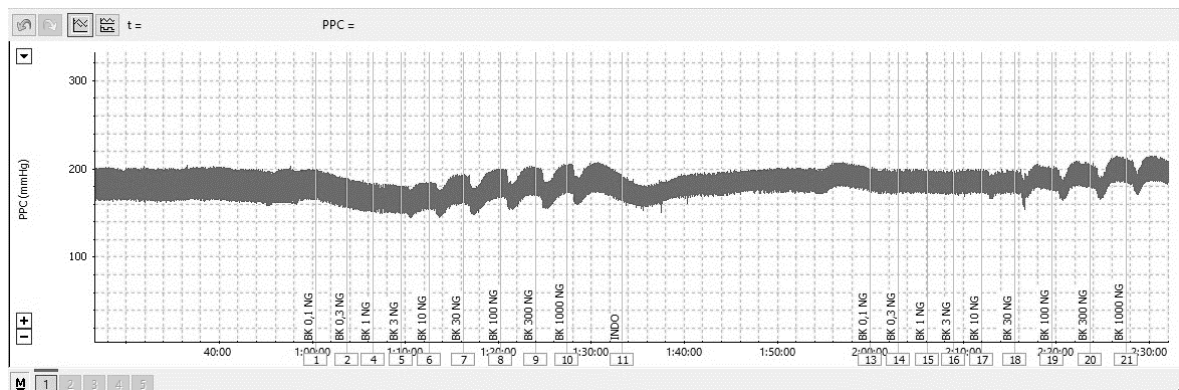


Apêndice B: Registro típico da curva de relaxamento induzida pela bradicinina no leito coronariano de ratos seguida pela inibição com indometacina

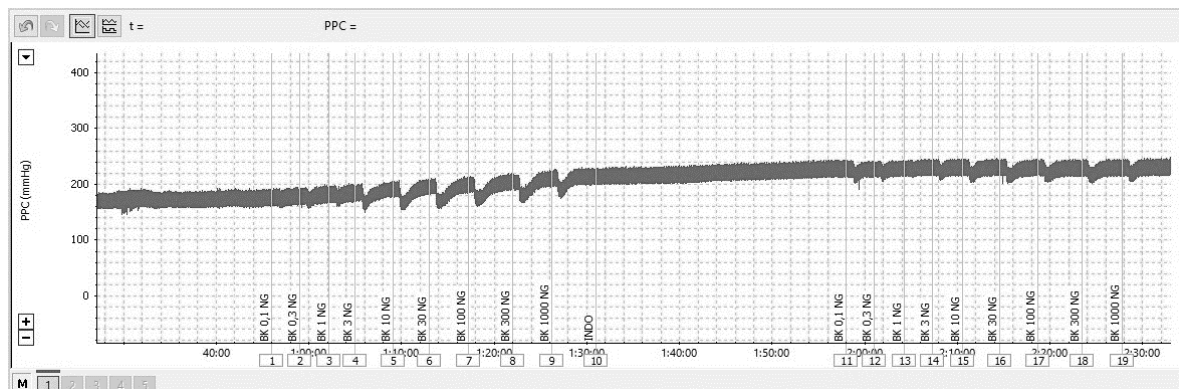
SHAM



OVX

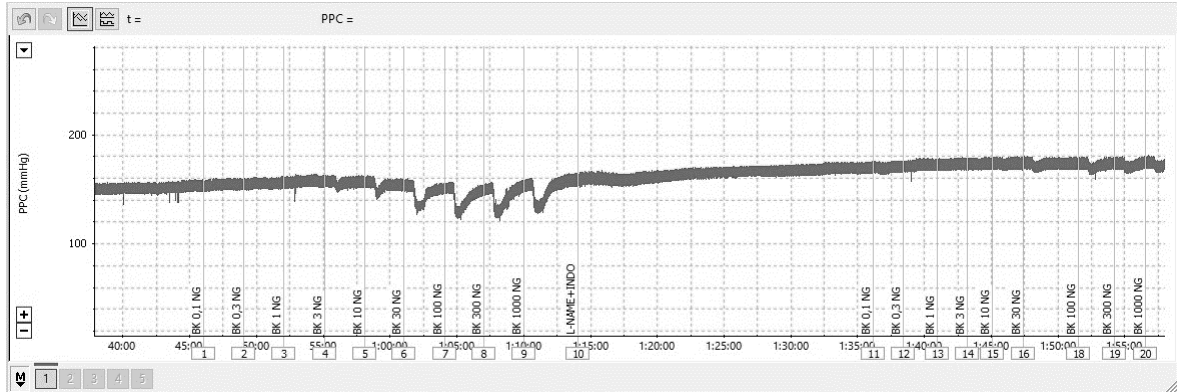


OVX-P4

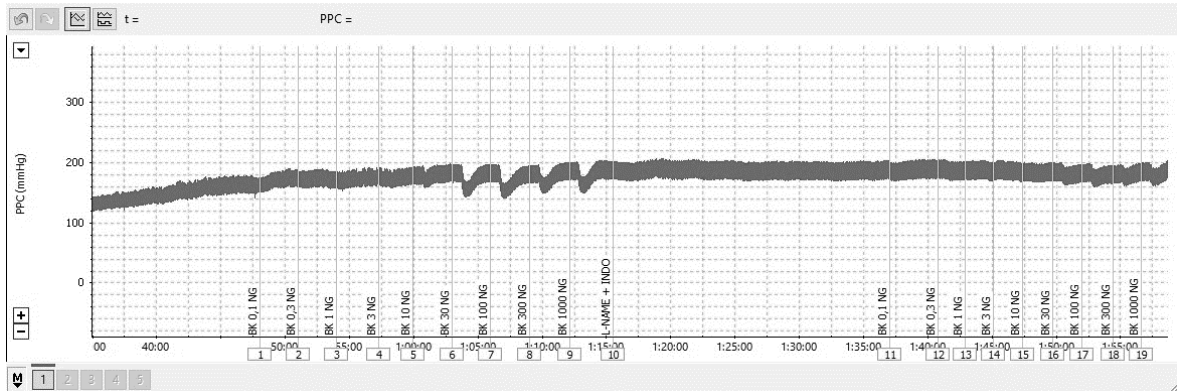


Apêndice C: Registro típico da curva de relaxamento induzida pela bradicinina no leito coronariano de ratos seguida pela inibição combinada de L-NAME + indometacina

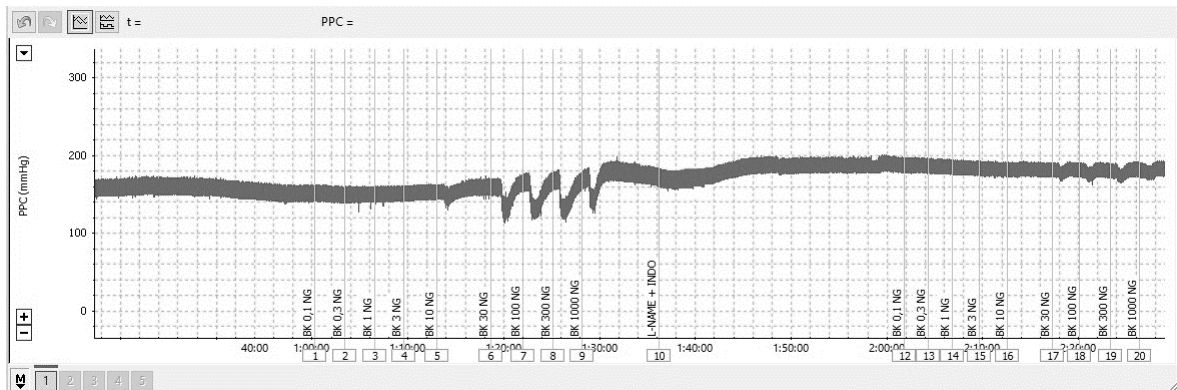
SHAM



OVX

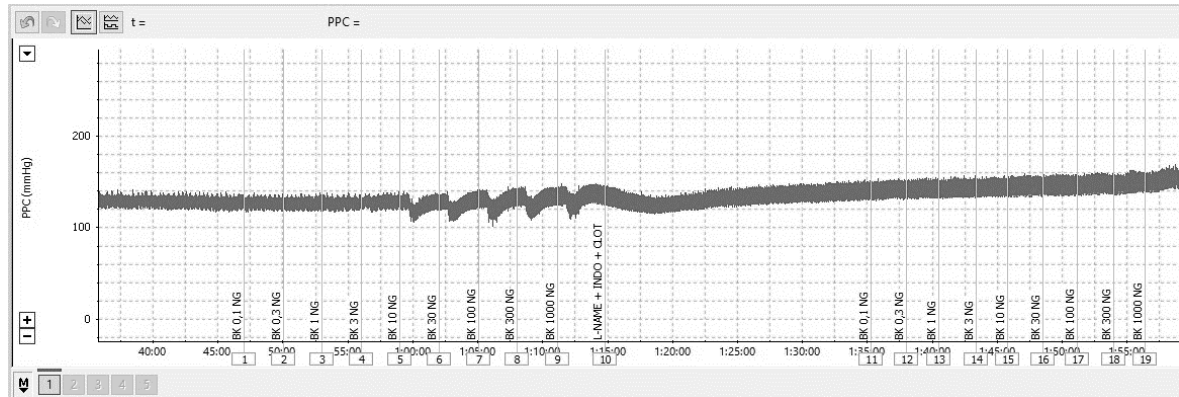


OVX-P4

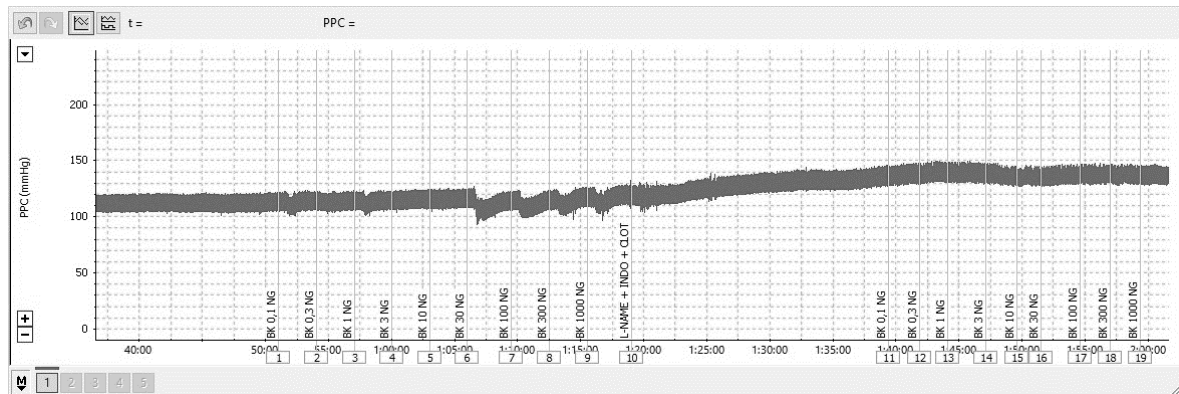


Apêndice D: Registro típico da curva de relaxamento induzida pela bradicinina no leito coronariano de ratos seguida pela inibição combinada de L-NAME + indometacina + clotrimazol

SHAM



OVX



OVX-P4

