

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**IZABELA MOREIRA BONFIM**

**DIFERENÇAS SEXUAIS NO RELAXAMENTO INDUZIDO PELA  
PROGESTERONA EM ARTÉRIAS MESENTÉRICAS DE RESISTÊNCIA**

Dissertação de Mestrado

VITÓRIA – ES  
2022

IZABELA MOREIRA BONFIM

**DIFERENÇAS SEXUAIS NO RELAXAMENTO INDUZIDO PELA  
PROGESTERONA EM ARTÉRIAS MESENTÉRICAS DE RESISTÊNCIA**

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

VITÓRIA – ES  
2022

Izabela Moreira Bonfim

**Diferenças sexuais no relaxamento induzido pela progesterona em artérias mesentéricas de resistência**

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.

Aprovada em: \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Prof. Dra. Alessandra Simão Padilha  
Universidade Federal do Espírito Santo – UFES

---

Prof. Dra. Nathalie Tristão Banhos Delgado de Lima – Centro Universitário Multivix

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

---

B713d Bonfim, Izabela Moreira, 1989-  
Diferenças sexuais no relaxamento induzido pela  
progesterona em artérias mesentéricas de resistência / Izabela  
Moreira Bonfim. - 2022.  
84 f. : il.

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

1. Progesterona. 2. Artéria mesentérica. I. Santos, Roger  
Lyrio dos. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de  
Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 612

---

## DEDICATÓRIA

À Deus, aos meus pais e meus irmãos.

## **AGRADECIMENTOS**

Minha imensa gratidão a Deus, por ser o meu sustento durante toda essa jornada. Obrigada por me conduzir a cada dia e ser minha fortaleza e refrigério nos momentos difíceis. Grata, pois até aqui o Senhor me ajudou.

Agradeço aos meus pais Maria das Dores e José, por serem meu sustento e sempre me incentivarem. Obrigada por todo amor, generosidade, paciência e incentivo, para que eu não desistisse. Aos meus irmãos Elísio e Fábio, agradeço por todo apoio.

Aos meus familiares, amigos, conselho arquidiocesano e meus irmãos do grupo de oração Divina Luz por todo companheirismo e me sustentarem com suas orações.

Ao meu orientador, Professor Dr. Roger Lyrio dos Santos, por me aceitar como aluna no período da iniciação científica em 2012 e agora por me conceder este projeto de mestrado. Sou grata pela confiança, dedicação, empenho e por todo conhecimento adquirido.

Aos membros e ex-membros do Laboratório de Estudos em Reatividade Vascular – LABERV: Nathalie Tristão, Jéssyca Giesen, Tagana Rosa, Letícia Tinoco, Jocimar Pitol, Ana Dária, André Lucas, Lara Amaro e Priscila Cruz. A todos os demais colegas do PPGCF, em especial a Victoria Maia, pelo companheirismo durante todo período do mestrado e a Rakel Simões pela disponibilidade e dedicação ao me ensinar uma nova técnica (análise de fluorescência), meus agradecimentos!

Aos professores do PPGCF – UFES, por todo conhecimento adquirido, por me inspirarem a ser uma profissional melhor.

Aos profissionais técnicos do PPGCF, em especial, Enildo Broetto Pimentel, Rodolpho José da Silva Barros, Rodrigo Coffler Batista, que me

ajudaram nas demandas diárias durante a execução do mestrado. A Danielle Lessa Junger e Mário Armando Dantas, responsáveis técnicos do LHMI, por todo auxílio e disponibilidade, que contribuíram para que pudesse finalizar esse trabalho. Obrigada a todos!

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

A todos que me ajudaram de forma direta ou indireta o meu sincero agradecimento, recebam minha imensa gratidão!

*“É justo que muito custe o que muito vale.”*

Santa Teresa D'Ávila



## RESUMO

A progesterona desempenha um papel importante nos processos fisiológicos relacionados aos órgãos reprodutivos, mas já se sabe que pode atuar em outros sistemas, como o cardiovascular. No entanto, pouco se conhece sobre seu papel nos diferentes leitos vasculares, especificamente nas artérias de resistência. O objetivo deste estudo foi avaliar possíveis diferenças sexuais na vasodilatação induzida pela progesterona em artérias mesentéricas de resistência em ratos de ambos os sexos. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFES) da Universidade Federal do Espírito Santo (nº 18/2020). Curvas concentração-resposta à progesterona (10 nM - 10 µM) foram realizadas em artérias mesentéricas de Wistar (10 – 12 semanas) de ambos os sexos antes e após a remoção endotelial ou incubação com os inibidores não seletivos das enzimas óxido nítrico sintase (NOS) (N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginina metil ester - L-NAME 300 µM), ciclooxigenase (COX) (Indometacina, INDO - 10 µM) sozinhos ou conjugados com inibidor não seletivo da citocromo P450 (CYP) (Clotrimazol, CLOT - 0,75 µM) ou um degradador do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Catalase, CAT - 1000 unidades/mL). Avaliamos também, o efeito do bloqueio não seletivo dos canais para potássio (Tetraetilamônio, TEA - 5 mM) e a participação do receptor de estrogênio acoplado à proteína G (GPER), usando um antagonista seletivo do GPER (G36 - 1 µM). Além disso, investigamos a participação do cálcio por meio de curvas concentração-resposta com CaCl<sub>2</sub> (10 µM – 30 mM) antes e após incubação com progesterona (50 mM) ou nifedipina (1 µM). Nossos resultados demonstraram que a ação aguda da progesterona promoveu relaxamento em artérias mesentéricas de resistência de forma similar entre os sexos. A resposta de relaxamento parece não depender dos mediadores endoteliais [óxido nítrico (NO), prostanóides (PNs) e a hiperpolarização dependente do endotélio (EDH)]. A vasodilatação induzida pela progesterona foi mediada por uma via extra endotelial no músculo liso vascular (MLV), com a participação do cálcio e não dos canais para potássio e do GPER. Esses achados são importantes para uma melhor compreensão das ações vasculares da progesterona em ambos os sexos. Além disso, podem auxiliar no entendimento das ações provenientes das terapias hormonais na peri e pós menopausa.

**Palavras-chave:** Progesterona, artérias mesentéricas de resistência, reatividade vascular, músculo liso vascular, íon cálcio.

## ABSTRACT

Progesterone plays an important role in physiological processes related to reproductive organs, but it is already known that it can act in other systems, such as the cardiovascular system. However, little is known about its role in different vascular beds, specifically in resistance arteries. The aim of this study was to evaluate possible sex differences in progesterone-induced vasodilation in mesenteric resistance arteries in rats of both sexes. The study was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the Federal University of Espírito Santo (nº 18/2020). Concentration-response curves to progesterone (10 nM-10 µM) were performed in mesenteric arteries of Wistar (10 – 12 weeks) of both sexes before and after endothelial removal or incubation with nitric oxide synthase (NOS) enzyme inhibitors ( N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine methyl ester - L-NAME 300 µM), cyclooxygenase (COX) (Indomethacin, INDO - 10 µM) alone or conjugated with non-selective cytochrome P450 (CYP) inhibitor (Clotrimazole, CLOT - 0.75 µM ) or a hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) degradant (Catalase, CAT - 1000 units/mL). We also evaluated the effect of nonspecific blockade of potassium channels (Tetraethylammonium, TEA - 5 mM) and the participation of the G protein-coupled estrogen receptor (GPER), using a selective GPER antagonist (G36 - 1 µM). And we investigated the participation of calcium by concentration-response curves with CaCl<sub>2</sub> (10 µM – 30 mM) before and after incubation with progesterone (50 mM) or nifedipine (1 µM). Our results demonstrated that the acute action of progesterone promoted relaxation in mesenteric resistance arteries of male and female rats in a similar way between the sexes. This relaxation response does not appear to depend on endothelial mediators [nitric oxide (NO), prostanoids (PNs) and endothelium-dependent hyperpolarization (EDH)]. The action of progesterone appears to be more dependent of an extra-endothelial pathway in the vascular smooth muscle (VSM), with the participation of calcium, instead of potassium channels and the GPER. These findings are important for a better understanding of the vascular actions promoted by progesterone in both sexes. Moreover, it can help to understand the actions of hormonal therapies in peri and post menopause.

**Keywords:** progesterone, mesenteric resistance arteries, vascular reactivity, vascular smooth muscle, calcium ion

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Efeitos da progesterona nos diferentes sistemas do organismo feminino.....	21
<b>Figura 2:</b> Representação esquemática das ações genômicas e não genômicas da progesterona.....	24
<b>Figura 3:</b> Esquema representativo do processo de dissecação dos segmentos mesentéricos de terceira ordem. (A) Disposição do leito mesentérico, (B) identificação e dissecação dos segmentos de terceira ordem.....	30
<b>Figura 4:</b> Esquema representativo da fixação do segmento de artéria mesentérica de resistência no miógrafo de arame. (A) Fixação do primeiro fio de tungstênio, acoplado a uma haste fixa, (B) passando o segundo fio, (C) segundo fio fixo e acoplado a uma haste móvel conectada a um transdutor de força isométrica.....	31
<b>Figura 5:</b> Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da resposta induzida pela progesterona em artérias mesentéricas. (A) Primeira curva de progesterona após a avaliação da integridade do endotélio. (B) Segunda curva de progesterona após a pré contração com PE (3 $\mu$ M) e incubação por 30 minutos com inibidores ou bloqueadores.....	32
<b>Figura 6:</b> Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da resposta da progesterona sobre as contrações induzidas por concentrações cumulativas de CaCl <sub>2</sub> (10 $\mu$ M – 30 mM) em meio com solução livre de cálcio com KCl 50 mM.....	33
<b>Figura 7:</b> Curvas concentração-resposta a progesterona (10 nM- 10 $\mu$ M) em artérias mesentéricas de resistência de fêmeas (n = 35) e machos (n = 37). Os valores foram expressos como média $\pm$ EPM. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias ( <i>two-way ANOVA</i> ) seguida pelo teste <i>post hoc de Sidak</i> . ....	37

**Figura 8:** Curvas concentração-resposta a progesterona (10 nM- 10  $\mu$ M) em artérias mesentéricas de resistência antes e após curva controle de fêmeas (n = 8) e machos (n = 7). Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo teste *post hoc* de Sidak. ....38

**Figura 9:** Resposta vasodilatadora a concentrações crescentes e cumulativas de progesterona (10 nM- 10  $\mu$ M) antes e após a remoção endotelial em artérias mesentéricas de resistência de (A) fêmeas (n = 14) e (B) machos (n = 18). Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo teste *post hoc* de Sidak. ....39

**Figura 10:** Resposta vasodilatadora a concentrações crescentes e cumulativas de progesterona (10 nM- 10  $\mu$ M) antes e após inibição com L-NAME (300  $\mu$ M) em artérias mesentéricas de (A) fêmeas (n = 12) e (B) machos (n = 11). Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM. \* P < 0.05 comparado com a mesma concentração da curva controle. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo teste *post hoc* de Sidak. ....40

**Figura 11:** Resposta vasodilatadora a concentrações crescentes e cumulativas de progesterona (10 nM- 10  $\mu$ M) antes e após remoção endotelial e inibição com L-NAME (300  $\mu$ M) em artérias mesentéricas de (A) fêmeas (n = 9) e (B) machos (n = 9). Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM. \* P < 0.05 comparado com a mesma concentração da curva controle. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo teste *post hoc* de Sidak. ....41

**Figura 12:** Resposta vasodilatadora a concentrações crescentes e cumulativas de progesterona (10 nM- 10  $\mu$ M) antes e após inibição com Indometacina (10  $\mu$ M) em artérias mesentéricas de (A) fêmeas (n = 5) e (B) machos (n = 5). Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo Sidak *post hoc* test. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância

de 1 via (*one-way* ANOVA) seguida pelo teste *post hoc* de Tukey.  
.....42

**Figura 13:** Resposta vasodilatadora a concentrações crescentes e cumulativas de progesterona (10 nM- 10  $\mu$ M) antes e após inibição dupla com L-NAME (300  $\mu$ M) + Indometacina (10  $\mu$ M) em artérias mesentéricas de (A) fêmeas (n = 9) e (B) machos (n = 8). Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM. \* P < 0.05 comparado com a mesma concentração da curva controle. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way* ANOVA) seguida pelo teste *post hoc* de Sidak.....43

**Figura 14:** Resposta vasodilatadora a concentrações crescentes e cumulativas de progesterona (10 nM- 10  $\mu$ M) antes e após inibição tripla com L-NAME (300  $\mu$ M) + Indometacina (10  $\mu$ M) + Clotrimazol em artérias mesentéricas de (A) fêmeas (n = 1) e (B) machos (n = 1). Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM. \* P < 0.05 comparado com a mesma concentração da curva controle. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way* ANOVA) seguida pelo Sidak *post hoc* test. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 1 via (*one-way* ANOVA) seguida pelo teste *post hoc* de Tukey.....44

**Figura 15:** Resposta vasodilatadora a concentrações crescentes e cumulativas de progesterona (10 nM- 10  $\mu$ M) antes e após inibição tripla com L-NAME (300  $\mu$ M) + Indometacina (10  $\mu$ M) + Catalase em artérias mesentéricas de (A) fêmeas (n = 1) e (B) machos (n = 1). Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM. \* P < 0.05 comparado com a mesma concentração da curva controle do grupo Macho. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way* ANOVA) seguida pelo teste *post hoc* de Sidak.....45

**Figura 16:** Resposta vasodilatadora a concentrações crescentes e cumulativas de progesterona (10 nM- 10  $\mu$ M) antes e após inibição com Catalase em artérias mesentéricas de (A) fêmeas (n = 1) e (B) machos (n = 1). Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way* ANOVA) seguida pelo teste *post hoc* de Sidak.....46

**Figura 17:** Efeito do bloqueio não seletivo de canais para potássio com tetraetilamônio (TEA, 5 mM) no relaxamento induzido pela progesterona em artérias mesentéricas de resistência (A) fêmeas (n = 7) e (B) machos (n = 8). Os valores foram expressos como média ± EPM. \* P < 0.05 comparado com a curva controle. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo teste *post hoc* de Sidak.....47

**Figura 18:** Efeito do bloqueio não seletivo de canais para potássio com tetraetilamônio (TEA, 5 mM) após remoção endotelial no relaxamento induzido pela progesterona em artérias mesentéricas de resistência (A) fêmeas (n = 7) e (B) machos (n = 7). Os valores foram expressos como média ± EPM. \* P < 0.05 comparado com a mesma concentração da curva controle. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo teste *post hoc* de Sidak.....48

**Figura 19:** Curva concentração resposta de CaCl<sub>2</sub> (10 μM – 30 mM) em artérias mesentéricas de resistência mantidas em solução despolarizante livre de Ca<sup>2+</sup>, na ausência (fêmea n = 10 e macho n = 8) e na presença de progesterona (fêmea n = 10 e macho n = 6) e nifedipina (fêmea n = 7 e macho n = 5). Os valores foram expressos como média ± EPM. \* P < 0.05 quando comparado a curva controle. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo teste *post hoc* de Tukey.....49

**Figura 20:** Resposta vasodilatadora a concentrações crescentes e cumulativas de progesterona (10 nM- 10 μM) antes e após na presença do inibidor seletivo do GPER (G36) em artérias mesentéricas de (A) fêmeas (n = 5) e (B) machos (n = 5). Os valores foram expressos como média ± EPM. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo teste *post hoc* de Sidak.....50

**Figura 21:** Análise representativa da microscopia de fluorescência emitida por DHE em artérias mesentéricas de (A) fêmeas (n = 4) e (B) machos (n = 4) na ausência ou presença de estímulos com quantificação da fluorescência produzida. Barra de escala = 20 μm. Os valores foram expressos com média ±

EPM. A análise estatística foi realizada por meio de *two-way* ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Tukey.....52

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Efeito do relaxamento induzido pela progesterona em artérias mesentéricas de resistência de fêmeas e machos e participação dos mediadores endoteliais sobre o  $EC_{50}$  e relaxamento máximo ( $R_{Máx}$ ).....50

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ACh:** Acetilcolina
- Akt:** Proteína quinase B
- ANOVA:** Análise de variância
- ATP:** Adenosina trifosfato
- BK<sub>Ca</sub>:** Canal para potássio sensível ao Ca<sup>2+</sup> de grande condutância
- Ca<sup>2+</sup>:** Íon cálcio
- CAT:** Catalase
- Cav:** Canais de Ca<sup>2+</sup> operados por voltagem
- CEUA:** Comissão de Ética no Uso de Animais
- CL:** Corpo lúteo
- CLOT:** Clotrimazol
- COX:** Ciclooxygenase
- CYP:** Citocromo P450
- DCVs:** Doenças cardiovasculares
- DMSO:** Dimetilsulfóxido
- EDCFs:** Fatores de contração derivados do endotélio
- EDH:** Hiperpolarização dependente do endotélio
- EDRFs:** Fatores de relaxamento derivados do endotélio
- EETs:** Ácidos epoxieicosatrienoicos
- eNOS:** Óxido nítrico sintase endotelial
- EPM:** Erro padrão da média
- ET-1:** Endotelina-1
- cGMP:** 3', 5' - Guanosina monofosfato cíclica
- GPER:** Receptor de estrogênio acoplado à proteína G
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peróxido de hidrogênio
- HERS:** *Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study*
- IK<sub>Ca</sub>:** Canais para potássio dependentes de cálcio de condutância intermediária
- INDO:** Indometacina
- IP<sub>3</sub>:** 1,4,5-trifosfato de Inositol
- K<sup>+</sup>:** Íon potássio
- K<sub>ATP</sub>:** Canais para potássio sensíveis à ATP
- K<sub>Ca</sub>:** Canais para potássio dependentes de cálcio



**K<sub>IR</sub>**: Canais para potássio retificadores de influxo  
**K<sub>v</sub>**: Canais para potássio dependentes de voltagem  
**L-NAME**: N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginina metil éster  
**MPA**: Acetato de medroxiprogesterona  
**mPR (α, β, γ, δ, ε)**: Receptores de membrana de progesterona  
**MLCP**: Proteína fosfatase da cadeia leve da Miosina  
**MLV**: Músculo liso vascular  
**MP**: Membrana plasmática  
**NO**: Óxido nítrico  
**NOS**: Óxido nítrico sintase  
**NOX/NADPH**: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase  
**PGI<sub>2</sub>**: Prostaciclina  
**PI3K**: Fosfatidilinositol-3-quinase  
**PR**: Receptor nuclear de progesterona  
**PE**: Fenilefrina  
**PNs**: Prostanoides  
**PPGCF**: Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas  
**RS**: Retículo sarcoplasmático  
**SK<sub>Ca</sub>**: Canais para potássio dependentes de cálcio de baixa condutância  
**SOD**: Superóxido dismutase  
**TEA**: Tetraetilamônio  
**TRH**: Terapia de reposição hormonal  
**TXA<sub>2</sub>**: Tromboxano A<sub>2</sub>  
**U.A.**: Unidades arbitrárias  
**UFES**: Universidade Federal do Espírito Santo  
**WHI**: *Women's Health Initiative*

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	27
2.1 OBJETIVOS GERAL.....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	29
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	29
3.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	29
3.2.1 Determinação da Fase do Ciclo Estral.....	29
3.2.2 Reatividade Vascular.....	30
3.2.3 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs).....	34
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
<b>4 RESULTADOS</b> .....	37
4.1 REATIVIDADE VASCULAR.....	37
4.2 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs).....	51
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	54
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	62
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	64
<b>APÊNDICE</b> .....	78

# INTRODUÇÃO



## 1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCVs) representam um grande grupo de distúrbios que afetam o coração e vasos sanguíneos, dentre eles encontram-se doenças coronárias, cerebrovasculares, cardíacas, reumáticas e outras condições (WHO, 2017). Além disso, as DCVs são consideradas a principal causa de mortalidade global (GDB, 2018) sendo maior que o número das demais mortes por outras doenças não transmissíveis, como câncer e doenças respiratórias crônicas (WHO, 2011). Estima-se que em 2016, mais de 17,9 milhões de pessoas morreram de DCVs, o equivalente a 31 % de todas as mortes no mundo. Desse total, 85 % ocorreram por ataques cardíacos e derrame (WHO, 2017), sendo um importante fator para a redução da qualidade de vida na população (GDB, 2018).

Quando comparado entre os sexos, a taxa de mortalidade por DCVs é maior em homens do que em mulheres na pré-menopausa (MOSCA *et al.*, 2016; KUZNETSOVA, 2018), revelando uma ação cardioprotetora dos hormônios sexuais femininos (BARTON & MEYER, 2009; YANG & RECKELHOFF, 2011). Porém, ao comparar mulheres na pós-menopausa com homens o risco cardiovascular se torna semelhante (ROSAMOND *et al.*, 2007), evidenciando ainda mais o aumento do risco cardiovascular a partir da sétima década de vida em mulheres (BENJAMIN *et al.*, 2019). Esses dados epidemiológicos indicam que a redução nos níveis de hormônios sexuais ovarianos, característico da fase pós-menopausa, faz com que as mulheres sejam mais suscetíveis ao desenvolvimento de DCVs (ANAND *et al.*, 2008; SCHENKEL *et al.*, 2014). Classicamente, é demonstrado que o efeito protetor sobre o sistema cardiovascular observado nas mulheres na pré-menopausa é atribuído principalmente ao estrogênio (MACLENNAN, 2009). Porém, na menopausa é observada uma depleção dos folículos ovarianos, sendo assim, ocorre também uma redução na síntese de progesterona, outro hormônio ovariano cujos efeitos cardioprotetores são pobremente discutidos em comparação com os efeitos estrogênicos (DALAL; AGARWAL, 2015).

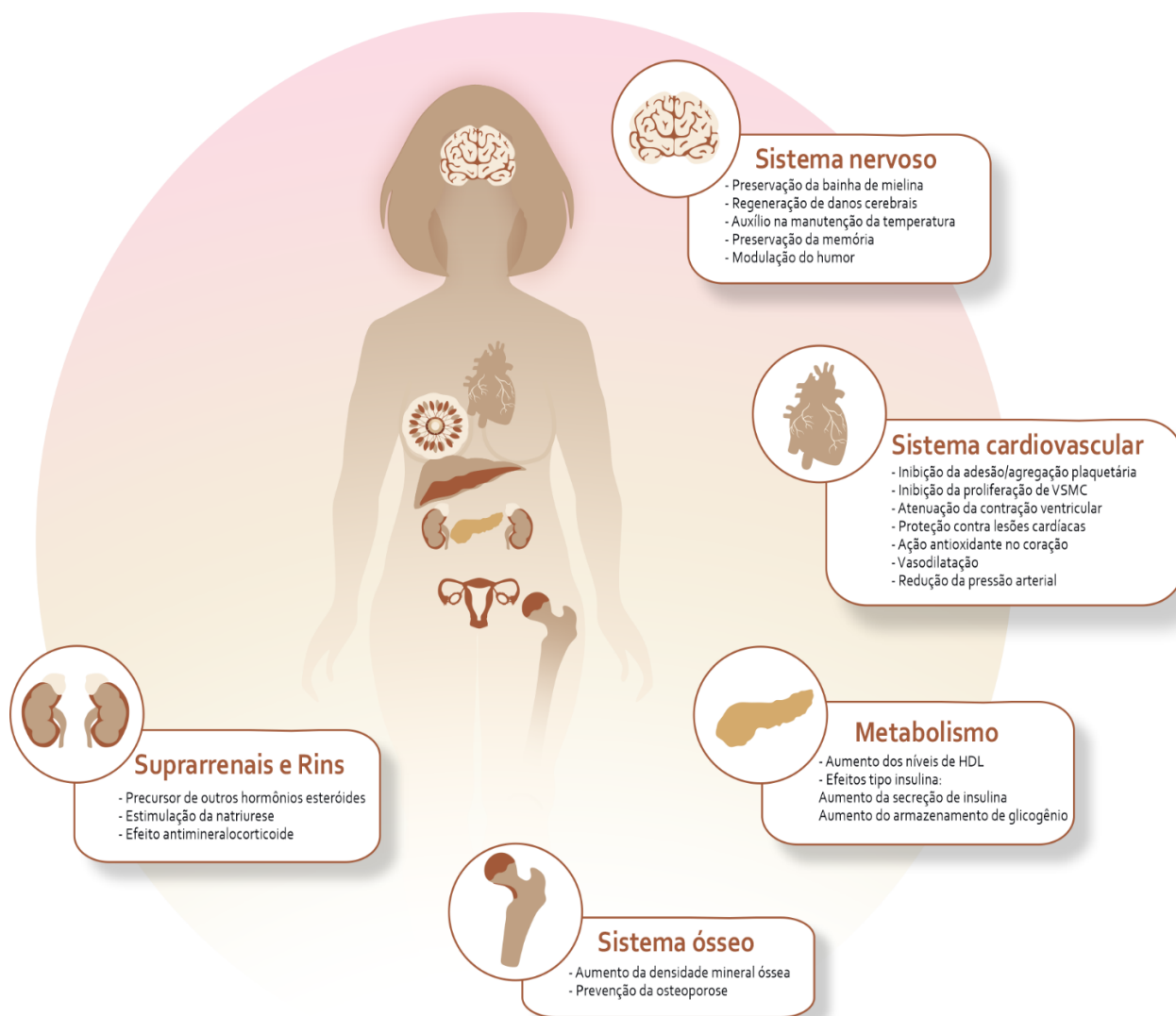
Com objetivo de esclarecer os efeitos dos hormônios sexuais femininos no organismo, no final dos anos 80, estudos *in vitro* mostraram os inúmeros benefícios do uso da terapia de reposição hormonal (TRH), dentre eles a prevenção de osteoporose, doença coronariana e demência (HENDERSON *et al.*, 1991; STAMPFER *et al.*, 1991; GRADY *et al.*, 1992; GRODSTEIN *et al.*, 1997; YAFFE *et al.*, 1998). Além disso, foram realizados estudos com ampla e complexa investigação clínica de estratégias para prevenção e controle de algumas das causas mais comuns de morbidade e mortalidade entre mulheres na pós-menopausa. Porém, estudos como o *Heart and Estrogen-Progestin Replacement Study* (HERS) (HULLEY *et al.*, 1998) e *Women's Health Initiative* (WHI) (ROSSOUW *et al.*, 2002) mostraram que não houve efeito benéfico da reposição hormonal, indicando aumento do risco cardiovascular (HULLEY *et al.*, 1998; GRIMES, LOBO, 2002; ROSSOUW *et al.*, 2002; DUBEY *et al.*, 2004), o que restringiu o seu uso (LOBO *et al.*, 2016). Vale salientar que esses estudos apresentaram vários vieses tais como, a idade avançada das participantes para início da TRH e o tipo de reposição que associou progestinas (acetato de medroxiprogesterona - MPA) ao estrogênio.

Os efeitos deletérios causados pelas progestinas no sistema cardiovascular foram erroneamente atribuídos à progesterona (SIMONCINI, 2004; BOSCHITSCH, MAYERHOFER, MAGOMETSCHNIGG, 2010), uma vez que há diferentes progestágenos e estes apresentam efeitos distintos sobre o sistema cardiovascular (HERMSMEYER *et al.*, 2008). Para um melhor entendimento, o termo progestágenos é usado para se referir a qualquer agente progestacional, seja ele sintético ou natural. A progesterona é o progestágeno natural produzido nos ovários, ou composto qualificado como bioidêntico. A progestina é o progestágeno sintético (STANCZYK, HENZL, 2001; DI RENZO, TOSTO, TSIBIZOVA, 2020). Não obstante, estudo de Wharton e colaboradores (2013), demonstrou que a progesterona bioidêntica ou micronizada apresenta efeitos benéficos sobre o sistema cardiovascular, diferentes daqueles observados com progestinas, como o MPA (WHARTON *et al.*, 2013).

Embora a progesterona seja um dos hormônios com relatos históricos mais antigos (DI RENZO, TOSTO, TSIBIZOVA, 2020), ainda há muito a ser descoberto sobre ela. Em 1672, pela publicação de Regner de Graaf, temos os

primeiros relatos detalhados sobre o corpo lúteo (CL) em seu livro (CORNER, 1974). Em 1898, estudos consideraram o CL como uma glândula endócrina e sua relação com a gestação, por proteger o embrião e facilitar a implantação no útero (CORNER, 1974). Ao longo das descobertas, em 1929, Corner e Allen conseguiram identificar a progesterona como o principal produto secretado pelo CL. Entretanto, apenas em 1934, numa corrida científica entre grupos de pesquisadores independentes, a progesterona foi isolada (WINTERSTEINER E ALLEN, 1934). Finalmente, durante a segunda Conferência Internacional sobre Padronização de Hormônios Sexuais, em 1935, que o nome “progesterona” se tornou oficial, porém existem duas versões para a sua origem. A primeira versão seria que o termo vem da fusão dos nomes dado ao hormônio pelos nortes americanos e europeus, "progest" de progestina e o "sterone" de luteosterona (ALLEN, 1974). A segunda versão relata que a escolha do nome “progesterona” teve relação com as evidências biológicas e bioquímicas adquiridas pelas pesquisas referentes a este hormônio até aquele momento, **progestational steroidal ketone**. (ALLEN, 1974; CORNER, 1974). Conhecida principalmente por sua atuação no sistema reprodutor feminino, a progesterona prepara o endométrio para a implantação do óvulo, atuando na sua maturação e vascularização na fase pré-implantação (SCHNEIDER; DAVIES; HONOUR, 1993). Além de suas ações sobre o sistema reprodutor, a progesterona também atua em outros sistemas, como o sistema nervoso (ROSSETTI *et al.*, 2016), sistema esquelético (XIU *et al.*, 2016) e sistema cardiovascular (PANG; DONG; THOMAS, 2015) (Figura 1).

A camada íntima é composta por células endoteliais sobrepostas em uma membrana basal, que formam o endotélio vascular (MARTINEZ-LEMUS, 2012; FORTIER; GULLAPALLI; MIRSHAMS, 2014). Já está bem estabelecido que o endotélio vascular desempenha um papel importante sobre a reatividade vascular (FURCHGOTT, ZAWADZKI, 1980) e a integridade destas células tem um papel importante para a manutenção do tônus vascular (TENNANT; MCGEACHIE, 1990), sendo também responsável pela liberação de fatores de relaxamento derivados do endotélio (*Endothelium Derived Relaxing Factors – EDRFs*), tais como o óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e a hiperpolarização



**Figura 1:** Efeitos da progesterona nos diferentes sistemas do organismo feminino. Modificado de Santos, Cunha, Giesen (2021).

dependente do endotélio (EDH), assim como fatores de contração derivados do endotélio (*Endothelium Derived Contracting Factors – EDCFs*), como tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) e a endotelina-1 (ET-1) (ORSHAL; KHALIL, 2004; SANDOO *et al.*, 2010).

A camada média, que é formada pelo MLV, pode alterar o diâmetro do vaso ao promover contração ou relaxamento (KHALIL, 2001). A contratilidade do MLV é um processo mediado pela concentração de cálcio intracelular [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (KATOUE, KHAN, ORIOWO, 2006). Esse processo de acoplamento-excitação- contração do músculo liso é regulado por influxo de Ca<sup>2+</sup> pelos canais para Ca<sup>2+</sup>

operados por voltagem (VOC), canais de cálcio operados por estoque (SOC) da membrana plasmática (MP) ou nas suas invaginações (cavéolas) (JACKSON, 2000; POBURKO *et al.*, 2004), canais de cálcio operados por receptor (ROC) (PUTNEY, 1986), bem como pela liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático (RS) (POBURKO *et al.*, 2004) e aqueles sensíveis a estiramento (JACKSON, 2000). Conseqüentemente, essa liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS, juntamente com a entrada desses íons pelos VOC nas células do MLV promovem o aumento do  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . O  $\text{Ca}^{2+}$  irá se ligar a calmodulina, formando o complexo cálcio-calmodulina. Este complexo ativa uma quinase da cadeia leve da miosina, a mesma quinase fosforila o caldesmon (retirando o bloqueio do sítio ativo na actina) e miosina. A miosina no estado fosforilado se liga a actina promovendo a contração. Então, quando a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  reduz (pela remoção do estímulo), não haverá mais o complexo cálcio-calmodulina, logo, não teremos atividade da quinase. Assim, com a redução da atividade da quinase, a fosfatase fica “livre” para desfosforilar a miosina e o caldesmon retorna bloqueando o sítio ativo na actina, promovendo o relaxamento (WEBB, 2003; KOU, EHRLICH, 2015). Essa resposta de relaxamento ou contração também pode acontecer pela ação de agentes vasodilatadores e vasoconstritores. Os EDRFs exercem seus efeitos por diminuir a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , enquanto os EDCFs aumentam a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (LEDOUX *et al.*, 2006).

Já se tem conhecimento que os hormônios sexuais podem estimular a produção de fatores vasoativos ao interagir com o endotélio, via receptores nucleares e extranucleares e/ou segundos mensageiros (MENDELSON; KARAS, 2005). Estudos demonstraram em homens e mulheres, a presença de receptores de progesterona em células endoteliais (INGEGNO *et al.*, 1988; VÁZQUEZ *et al.*, 1999; ORSHAL; KHALIL, 2004), sugerindo que esse hormônio possa desempenhar papel importante na manutenção dos processos vasculares (THOMPSON; KHALIL, 2003). Todavia, ainda temos pouco conhecimento acerca dos efeitos da progesterona sobre os diferentes leitos vasculares (SELLES *et al.*, 2001).

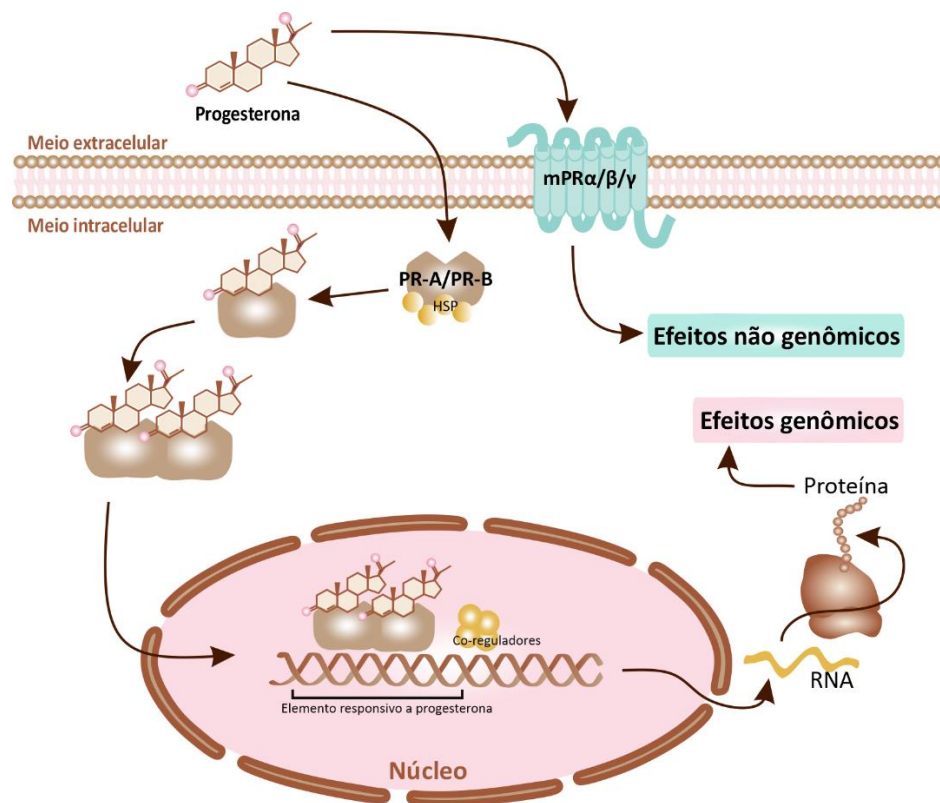
A progesterona pode induzir suas ações de forma genômica (clássica) ou não genômica (não clássica) (Figura 2). Por via genômica, a ação da progesterona é mediada por receptores de progesterona nucleares (PRs)



específicos, PR-A e PR-B. Embora esses receptores compartilhem vários domínios estruturais, sua atividade transcricional é distinta, sendo capazes de reconhecer promotores totalmente diferentes (SCARPIN *et al.*, 2009). Ambos os PRs foram identificados no músculo liso e no endotélio vascular de humanos, camundongos, ratos, coelhos e primatas (GOLETIANI, KEITH, GORSKY, 2007). O mecanismo de ação por via clássica ocorre de forma lenta, em horas ou dias (THOMAS, 2008), e se inicia com a progesterona se difundindo pela membrana celular, visto sua característica lipofílica, para alcançar o núcleo e interagir com os receptores PR-A e PR-B. Quando a progesterona se liga ao PR ocorre dimerização do receptor e autofosforilação, promovendo a formação e ativação do complexo hormônio-receptor. A seguir, este complexo se liga à elementos responsivos à progesterona (PREs) no DNA, o que induz o processo de transcrição gênica, seguido pelo processo de tradução, formando proteínas específicas que vão levar a uma resposta celular (TSAI; MALLEY, 1994; JACOBSEN; HORWITZ, 2012). Pela via não genômica, a progesterona desempenha suas ações de forma rápida ou não clássica ao ativar receptores de membrana para a progesterona (mPR) (THOMAS, PANG, 2013), sem a princípio envolver ativação transcricional (GARG *et al.*, 2017). Os mPR são expressos em 5 subtipos: mPR $\alpha$ , mPR $\beta$ , mPR $\gamma$ , mPR $\delta$  and mPR $\epsilon$  presentes em humanos, sendo que o mPR $\alpha$ , mPR $\beta$  e mPR $\gamma$  já foram descritos em células do sistema cardiovascular (THOMAS *et al.*, 2007; TANG *et al.*, 2005; SMITH *et al.*, 2008). Por essa via não clássica, a progesterona interage com os vasos sanguíneos, promovendo a liberação de EDRFs (CUTINI; SELLÉS; MASSHEIMER, 2009; PANG; DONG; THOMAS, 2015). Ademais, estudos tem demonstrado que a progesterona também pode desempenhar suas ações via receptor GPER, apesar de apresentar alta afinidade pelo estrogênio, também pode desenvolver sua atividade quando estimulado pela progesterona em concentrações abaixo de 1  $\mu$ M em cultura de célula humana (THOMAS *et al.*, 2005) e em concentrações acima de 1  $\mu$ M no leito coronariano de ratos (GIESEN, 2019).

Cabe ressaltar que tanto de forma genômica quanto não-genômica, a progesterona pode estimular a produção de mediadores endoteliais, como o NO, que pode modular de forma positiva a via de sinalização da fosfatidilinositol-3-

quinase/proteína quinase B (PI3K/Akt) (CUTINI; SÉLLES; MASSHEIMER, 2009; PANG; DONG; THOMAS, 2015; CUNHA *et al.*, 2020). A progesterona pode levar a um aumento na atividade da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), por ativar o receptor nuclear PR-A (YOU *et al.*, 2020). Além disso, a progesterona pode modular a vasodilatação por induzir a EDH (CUNHA *et al.*, 2020). Além das ações endoteliais, a progesterona pode interagir com o MLV promovendo uma rápida diminuição do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  em coelhos, porcos e humanos (MURPHY; KHALIL, 1999; MINSHALL *et al.*, 2002; CAIRRÃO *et al.*, 2012).



**Figura 2:** Representação esquemática das ações genômicas e não genômicas da progesterona. Modificado de Santos, Cunha, Giesen (2021).

Os estudos têm demonstrado que a progesterona pode atuar de forma direta e indireta sobre o sistema cardiovascular (MORRISSY *et al.*, 2010; PANG, DONG, THOMAS, 2015; CUNHA *et al.*, 2020; GIESEN *et al.*, 2020; COSTA *et al.*, 2021). Indiretamente pode modular o perfil lipídico, reduzir a resposta inflamatória, inibir a agregação plaquetária e proliferação de células do MLV. Todavia, pode agir de forma direta sobre o miocárdio e os vasos sanguíneos (SANTOS, CUNHA, GIESEN, 2021). Sabemos que sobre as células do

miocárdio, a progesterona induz suas respostas agudamente ou a longo prazo, sendo que a administração aguda de progesterona, em níveis fisiológicos, pode reduzir a duração do potencial de ação e atenuar o pico de contração ventricular (MENDONZA, MELLO, 1974; RUBIN, SALTER, 1952; ZHANG *et al.*, 2016). A atuação da progesterona sobre o vaso sanguíneo ocorre pela estimulação de fatores vasoativos, como o NO (COSTA *et al.*, 2021; CUNHA *et al.*, 2020), produtos da COX (COSTA *et al.*, 2021) e pela hiperpolarização dependente do endotélio (EDH), via EET (CUNHA *et al.*, 2020), e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (COSTA *et al.*, 2021; CUNHA *et al.*, 2020). Além da sua ação direta sobre o endotélio vascular, acredita-se que a progesterona pode modular negativamente os VOC no músculo liso vascular, inibindo o influxo de Ca<sup>2+</sup> (BARBAGALLO *et al.*, 2001).

De forma geral, os resultados encontrados em alguns estudos sugerem um potencial efeito vasodilatador exercido pela progesterona. No entanto, ainda não se sabe quais são os efeitos desse hormônio sobre o principal local de controle da resistência vascular periférica e pressão arterial, que são as artérias mesentéricas de resistência. Dentro desse contexto, o presente trabalho busca investigar os efeitos da progesterona sobre as artérias mesentéricas de resistência e se há diferenças sexuais nessa resposta. Portanto, hipotetizamos que a progesterona promova vasodilatação em artérias mesentéricas de resistência de ratos *Wistar*, e que essa resposta seja diferente entre os sexos.

# OBJETIVOS



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar possíveis diferenças sexuais na vasodilatação induzida pela progesterona em artérias mesentéricas de resistência de ratos normotensos de ambos os sexos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a participação do endotélio na vasodilatação induzida pela progesterona em artérias mesentéricas de resistência de ratos normotensos de ambos os sexos;
- Avaliar a contribuição dos principais mediadores endoteliais envolvidos na resposta de relaxamento induzido pela progesterona (NO, prostanoídes - PNs, EDH);
- Investigar a participação dos canais para potássio na resposta de relaxamento induzido pela progesterona;
- Investigar a participação do íon cálcio na resposta de relaxamento induzido pela progesterona;
- Verificar a participação do receptor de estrogênio acoplado à proteína G (GPER) na ação da progesterona em ratos de ambos os sexos;
- Avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) após estimulação com progesterona em artérias mesentéricas de resistência.

# MATERIAL E MÉTODOS



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados ratos adultos (10 – 12 semanas) de ambos os sexos da linhagem *Wistar (Rattus norvegicus)*. Esses animais foram fornecidos pelo Biotério Central do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo. Todos os procedimentos foram realizados seguindo as diretrizes do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA) (CONCEA-MCT, 2016). Os animais foram mantidos em ambiente com iluminação artificial (ciclo claro-escuro de 12 h), temperatura de 20–24 °C e umidade de 40–60 % de acordo com o recomendado para biotérios e acomodados em gaiolas coletivas com no máximo de 04 animais por gaiola, o que permitiu o livre acesso à ingestão de água e ração padrão para biotérios (Purina Labina, SP - Brasil). A manipulação dos animais foi realizada sempre no mesmo período do dia para evitar a influência de variações hormonais que podem ocorrer ao longo do ciclo estral nas fêmeas. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo – CEUA-UFES (nº 18/2020).

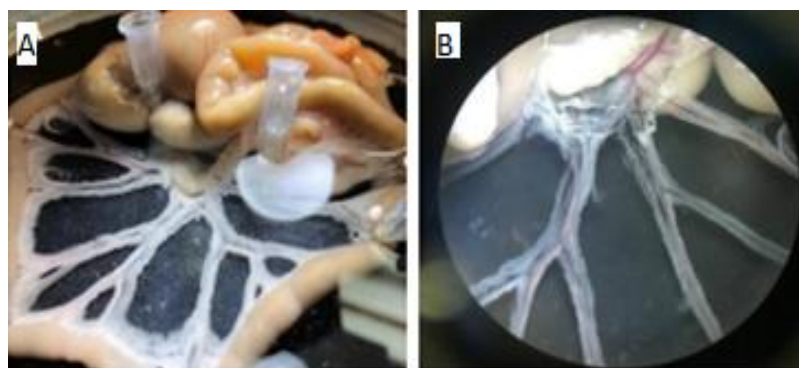
#### 3.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

##### 3.2.1 Determinação da Fase do Ciclo Estral

Os animais foram aleatoriamente separados em dois grupos experimentais: fêmeas e machos. Antes de iniciar os protocolos nas fêmeas avaliamos o ciclo estral por meio de esfregaços vaginais. As células epiteliais vaginais foram coletadas diariamente pela manhã e examinadas de acordo com o protocolo de Marcondes *et al.* (2002). Optamos por realizar os protocolos apenas com as fêmeas que estavam no diestro II, fase que apresenta concentrações basais de hormônios femininos (BERNARD; WOODRUFF, 2001; GOLDMAN; MURR; COOPER, 2007), para que fossem mantidas as mesmas condições experimentais.

### 3.2.2 Reatividade Vascular

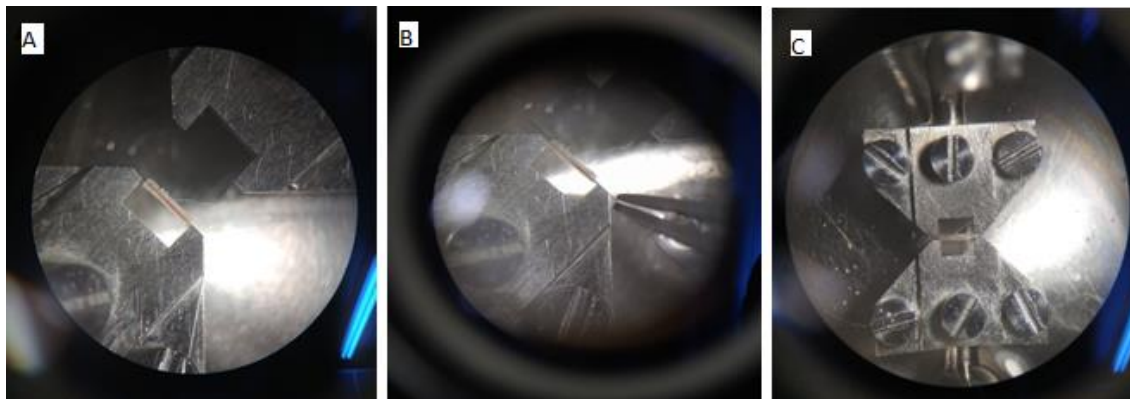
A reatividade vascular das artérias mesentéricas de terceira ordem foi avaliada por meio de miógrafo de arame (620 M; Danish Myo Technology, Aarhus, Denmark). Os protocolos foram realizados de acordo com método previamente descrito por Mulvany & Halpern (1977). Os animais foram eutanasiados por decapitação sem utilização de anestésicos, a fim de evitar a interferência nos padrões de resposta (Hatano *et al.*, 1989) e posteriormente as artérias mesentéricas de terceira ordem foram identificadas, isoladas e dissecadas dos tecidos circundantes não vasculares (Figura 3).



**Figura 3:** Esquema representativo do processo de dissecação dos segmentos mesentéricos de terceira ordem. (A) Disposição do leito mesentérico, (B) identificação e dissecação dos segmentos de terceira ordem.

Os segmentos arteriais foram seccionados em anéis de 2 mm de comprimento e montados entre dois fios de tungstênio (40  $\mu\text{m}$  de diâmetro) dentro das câmaras do miógrafo de arame (Figura 4). As artérias foram mantidas em solução de Krebs (composição em mM): NaCl (119), KCl (4,7),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,4),  $\text{NaHCO}_3$  (14,9),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1,17),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (2,5) e glicose (5,5) a 37 °C e gaseificada com mistura carbogênica (5 %  $\text{CO}_2$  e 95 %  $\text{O}_2$ ). A circunferência interna foi normalizada para 0,9·IC100, onde os anéis foram gradualmente estirados até que o diâmetro interno corresponda a uma pressão transmural de 100 mmHg.



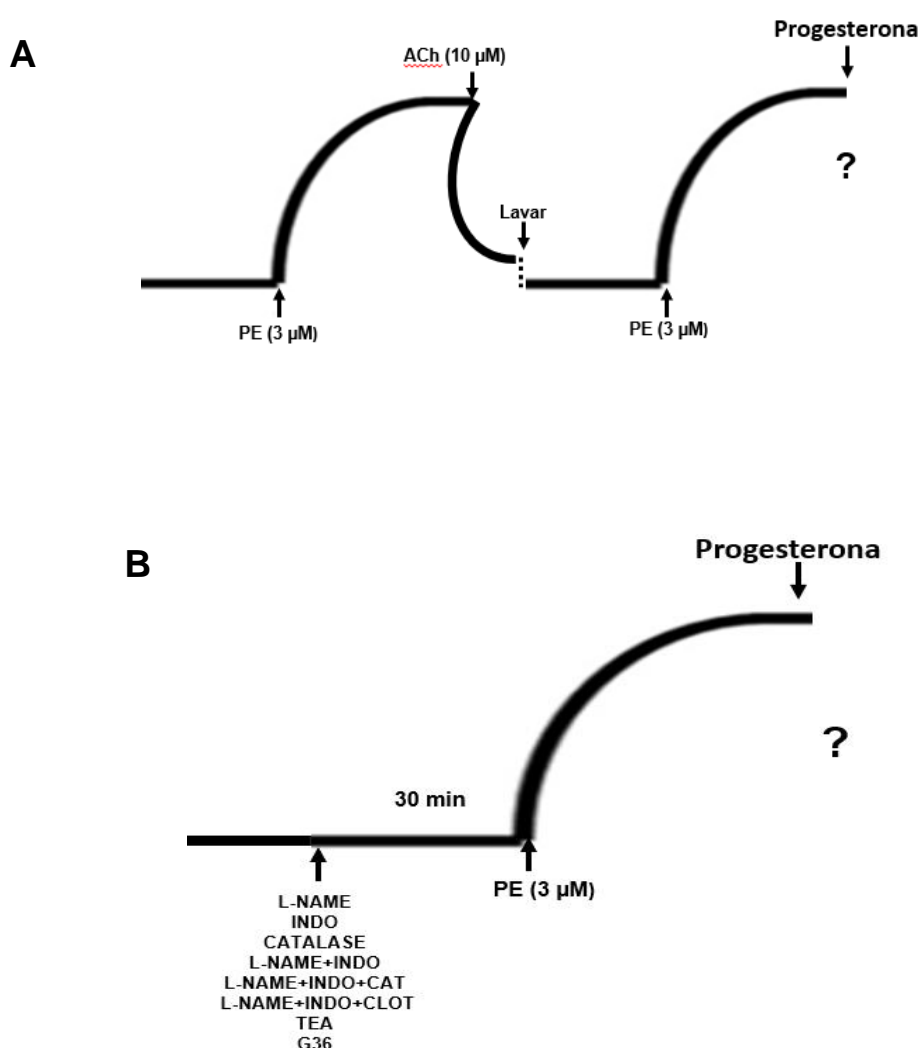


**Figura 4:** Esquema representativo da fixação do segmento de artéria mesentérica de resistência no miógrafo de arame. (A) Fixação do primeiro fio de tungstênio, acoplado a uma haste fixa, (B) passando o segundo fio, (C) segundo fio fixo e acoplado a uma haste móvel conectada a um transdutor de força isométrica.

A viabilidade e integridade do endotélio foram testadas em resposta a administração de acetilcolina (ACh, 10  $\mu$ M), nos anéis previamente contraídos com fenilefrina (PE, 3  $\mu$ M). Consideramos os anéis com endotélio intacto quando o relaxamento obtido foi > 80 % em resposta a ACh. Por outro lado, foram considerados sem endotélio vasos cujo relaxamento à ACh foi < 10 % após a sua remoção mecânica, que foi realizada por meio de uma leve fricção na camada interna do vaso, com fio de cabelo. As respostas foram registradas por meio de um sistema de aquisição de dados acoplado a transdutores isométricos e o percentual de relaxamento foi determinado utilizando um sistema de aquisição de dados LabChart 8 (AD Instruments Pty Ltd., Nova South Wales, Austrália).

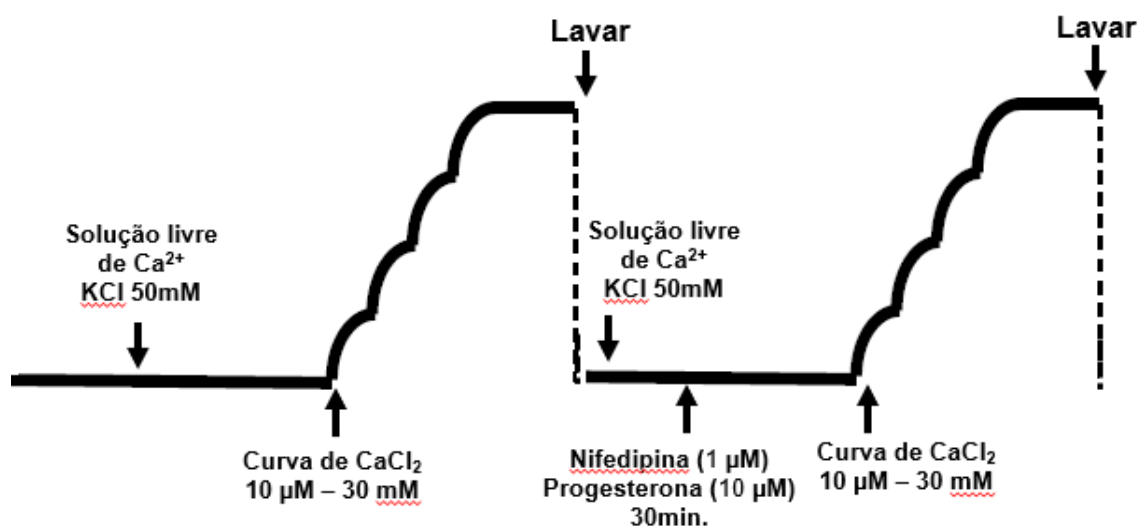
Após teste do endotélio os vasos passaram por um período de 15 minutos de estabilização e curvas concentração-resposta foram obtidas por meio de doses cumulativas de progesterona (10 nM,- 10  $\mu$ M), após a indução prévia de contração com PE (3  $\mu$ M). O efeito vasodilatador da progesterona foi investigado antes e após utilização de inibidor não-seletivo para NOS, *N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginina methyl ester* (L-NAME, 300  $\mu$ M; Sigma, St. Louis, MO – USA), inibidor não-seletivo para ciclooxigenase (COX), indometacina (INDO, 10  $\mu$ M; Sigma, St. Louis, MO – USA), catalase, enzima que degrada o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (CAT, 1000 unidades/mL; Sigma, St. Louis, MO – USA), inibições conjugadas com L-NAME, INDO; L-NAME, INDO e clotrimazol, inibidor da citocromo P450 (CYP) (CLOT,

0,75  $\mu\text{M}$  Sigma, St. Louis, MO – USA), L-NAME, INDO e catalase. Além dessas inibições, realizamos incubações com tetraetilamônio em concentração na qual atua como bloqueador não-seletivo dos canais para potássio (TEA, 5 mM; Sigma, St. Louis, MO – USA) e G36, antagonista seletivo do GPER (1  $\mu\text{M}$ ; Cayman Chemical, MI - USA). Após 30 minutos de incubação com os inibidores e bloqueador descritos acima, a curva de relaxamento induzida pela progesterona foi repetida. Os protocolos de reatividade vascular estão esquematicamente representados na Figura 5.



**Figura 5:** Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da resposta induzida pela progesterona em artérias mesentéricas. (A) Primeira curva de progesterona pós avaliação da integridade do endotélio. (B) Segunda curva de progesterona após a pré contração com PE (3  $\mu\text{M}$ ) e incubação por 30 minutos com inibidores ou bloqueadores.

Após seguir os procedimentos iniciais de montagem dos vasos no miógrafo de arame e realização do teste do endotélio utilizando a solução nutritora conforme citado acima (item 3.2.2), seguimos com a avaliação da participação do cálcio na resposta de relaxamento induzida pela progesterona, a qual foi realizada da seguinte forma: após a lavagem com solução nutritora livre de cálcio com KCl a 4,7 mM foi mantido período de estabilização. Posteriormente a solução foi substituída por solução nutritora com KCl a 50 mM. Com essa solução despolarizante, curvas concentração-resposta foram obtidas por meio de concentrações cumulativas de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) (10  $\mu\text{M}$  – 30 mM). Após a primeira curva de  $\text{CaCl}_2$ , os vasos foram incubados com nifedipina (1  $\mu\text{M}$ ), um bloqueador dos canais para cálcio do tipo L ou progesterona (10  $\mu\text{M}$ ), durante 30 minutos, e em seguida foi realizada uma nova curva de  $\text{CaCl}_2$  similar a citada anteriormente (Figura 6) (SILVA *et al.*, 2013). O protocolo experimental de avaliação da participação do cálcio foi representado na Figura 6.



**Figura 6:** Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da resposta da progesterona sobre as contrações induzidas por concentrações cumulativas de  $\text{CaCl}_2$  (10  $\mu\text{M}$  – 30 mM) em meio com solução livre de cálcio com KCl 50 mM.

### 3.2.3 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)

Após realização dos cortes das artérias mesentéricas (10  $\mu\text{m}$ ), as lâminas foram incubadas com a sonda dihidroetidina (DHE; Invitrogen™), que é permeável à membrana celular. É postulado que o DHE reage com o superóxido e forma dois produtos fluorescentes, etídio e 2-hidroxi-etídio que se intercalam com o DNA da célula e podem ser visualizados com a fluorescência vermelha. Sendo assim, através de um microscópio de fluorescência com comprimentos de onda de excitação e emissão de 518 e 605 nm, respectivamente, esta sonda é utilizada como um marcador indireto da presença dessa espécie reativa (FERNANDES *et al.*, 2007).

O protocolo foi realizado de acordo com Silva et al. (2016), com algumas modificações. Brevemente, foram incubadas 4 lâminas para cada animal (fêmea ou macho) ao abrigo da luz. A primeira lâmina foi incubada com DHE (5  $\mu\text{M}$ ) por 30 minutos, em 37 °C, para investigar a produção basal de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . A segunda lâmina foi incubada com DHE + Tiron (10  $\mu\text{M}$ ), por 30 minutos, sendo um controle negativo da produção basal de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . A terceira lâmina foi incubada com DHE + progesterona (10  $\mu\text{M}$ ) pelo mesmo tempo, para investigar se a incubação com progesterona induzia alteração na produção de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . A quarta lâmina foi incubada com DHE+ progesterona +Tiron por 30 minutos, sendo um controle de que a fluorescência observada era proveniente do  $\text{O}_2^{\bullet-}$ .

Foram obtidas imagens digitais na objetiva de 40x, usando o Fotomicroscópio de fluorescência invertido Leica DM 2500. As imagens foram analisadas no programa Image J (National Institutes of Health, EUA). A média da densidade das fluorescências foi calculada a partir de cinco imagens dos segmentos de mesentérica de cada animal. Foi utilizado número amostral de 4 animais por grupo experimental.

### 3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados foi realizada pelo software estatístico Graph-PadPrism 6. Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Para confirmar a normalidade dos dados foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk. Para a análise da resposta vasodilatadora foi utilizada a análise de variância de duas vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo *post-hoc* de Sidak. Para análise das variáveis R<sub>máx</sub> e EC<sub>50</sub> foi utilizada a análise de variância de uma via (*one-way ANOVA*) seguida pelo teste de *post-hoc* de *Tukey* ou *Student t test*. O nível de significância foi estabelecido para valores de  $p < 0,05$ .

# RESULTADOS

---

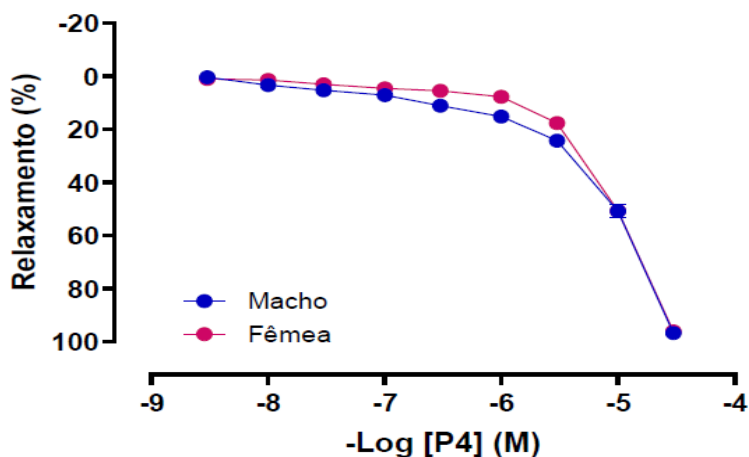
---

---

## 4. RESULTADOS

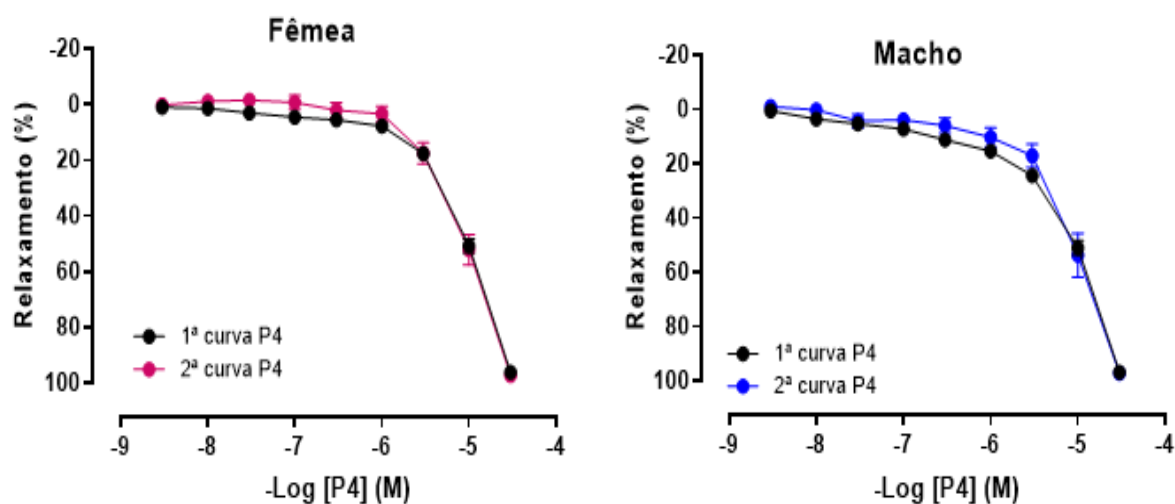
### 4.1 REATIVIDADE VASCULAR

O nosso primeiro resultado é que concentrações crescentes e cumulativas de progesterona promoveram relaxamento nos segmentos arteriais de resistência de forma similar entre fêmeas ( $96 \pm 0,3 \%$ ) e machos ( $94 \pm 1,3 \%$ ) (Figura 7) (Tabela 1).



**Figura 7:** Curvas concentração-resposta a progesterona (10 nM - 10  $\mu$ M) em artérias mesentéricas de resistência de fêmeas (n = 35) e machos (n = 37). Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo teste *post hoc* de Sidak.

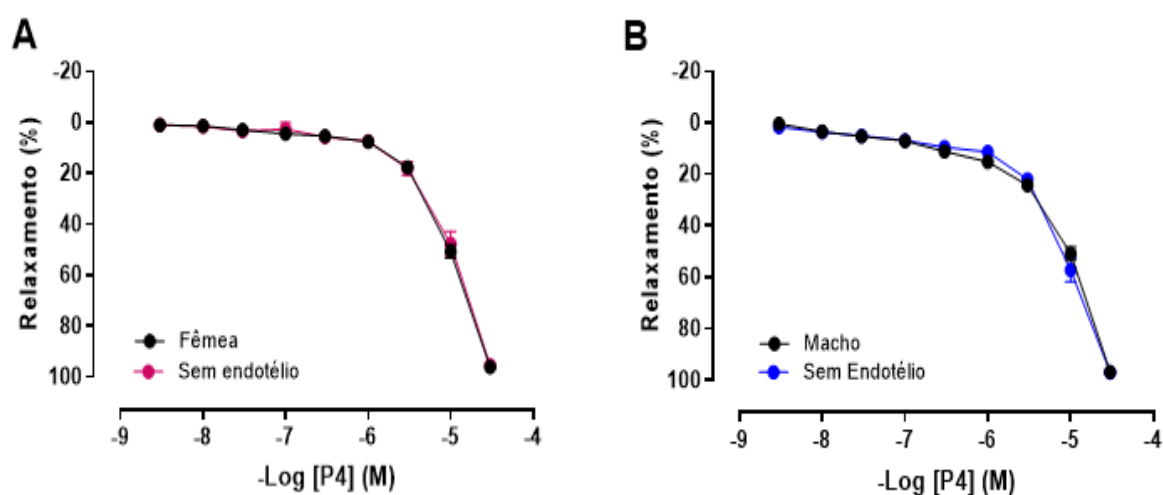
Para se obter um controle de cada vaso, foram realizadas duas curvas de progesterona, sendo a primeira curva controle da segunda. O resultado encontrado demonstrou que a segunda curva foi similar a primeira (Figura 8), mostrando que o vaso manteve sua capacidade de resposta sem a ocorrência de taquifilaxia com concentrações crescentes de progesterona [(Fêmea:  $96 \pm 0,3$  % e  $97 \pm 0,6$  %), (Macho:  $94 \pm 1,3$  % e  $96 \pm 0,7$  %)] (Tabela 1).



**Figura 8:** Curvas concentração-resposta a progesterona (10 nM- 10  $\mu$ M) em artérias mesentéricas de resistência antes e após curva controle de fêmeas (n = 8) e machos (n = 7). Os 6 valores foram expressos como média  $\pm$  EPM. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo teste *post hoc* de Sidak.



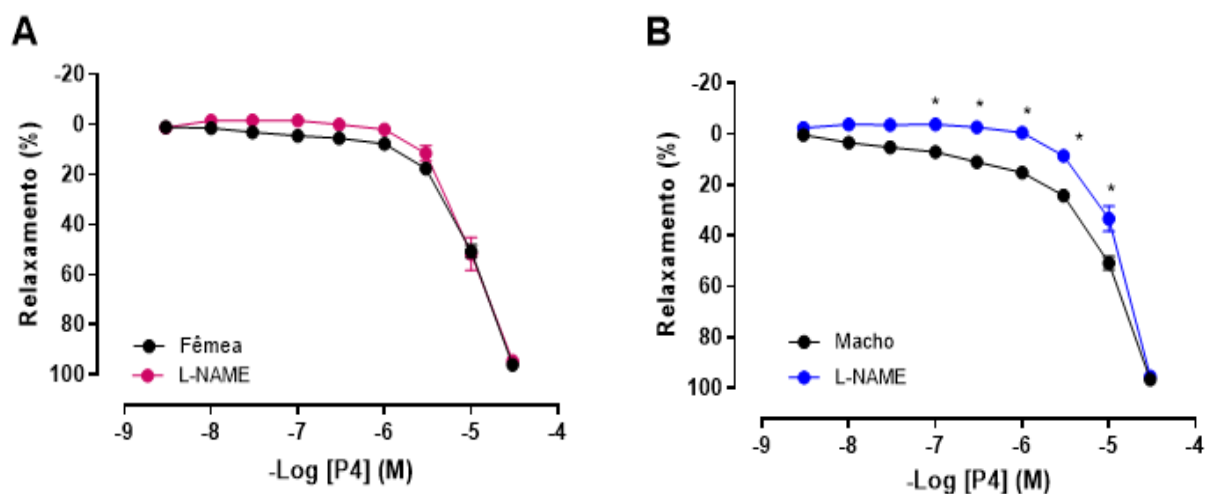
Posteriormente, verificamos a participação do endotélio no relaxamento induzido pela progesterona em artérias mesentéricas de resistência (Figura 9). Após realizar a remoção mecânica do endotélio, observamos que não houve alterações na resposta de relaxamento induzida pela progesterona em ambos os sexos, indicando que o endotélio não tem participação na resposta vasodilatadora induzida pela progesterona (Fêmea:  $96 \pm 0,3$  % para  $86 \pm 6,4$  % e Macho:  $94 \pm 1,3$  % para  $93 \pm 2,7$  %) (Tabela 1).



**Figura 9:** Resposta vasodilatadora a concentrações crescentes e cumulativas de progesterona (10 nM - 10  $\mu$ M) antes e após a remoção endotelial em artérias mesentéricas de resistência de (A) fêmeas ( $n = 14$ ) e (B) machos ( $n = 18$ ). Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo teste *post hoc* de Sidak.

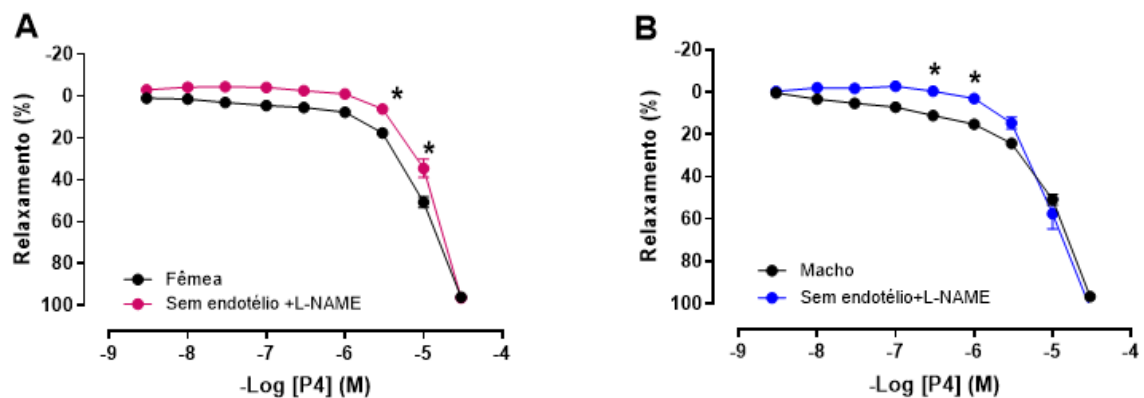
Ainda que não tenhamos observado a participação do endotélio nas respostas de relaxamento induzidas pela progesterona, avaliamos a participação do NO, PNs e a EDH, uma vez que existem vias extra endoteliais de NO (MOLLACE et al., 1991) e a EDH pode ser potencializada quando há inibição das demais vias de relaxamento do endotélio (NO e PNs) (OHASHI et al., 2012).

Assim, primeiramente verificamos a participação do NO na resposta vasodilatadora induzida pela progesterona. Nas fêmeas não foi observada diferença na resposta de relaxamento máximo (Fêmea:  $96 \pm 0,3$  % vs.  $85 \pm 4,4$  %) (Figura 10A). Nos machos não observamos alteração na resposta de relaxamento máximo após a incubação com L-NAME (Macho:  $94 \pm 1,3$  % vs.  $93 \pm 2,3$  %,  $P < 0,05$ ), mas modulou alguns pontos da curva (Figura 10B) (Tabela 1), mostrando que o NO não está envolvida na resposta de relaxamento máximo induzida pela progesterona em ambos os sexos



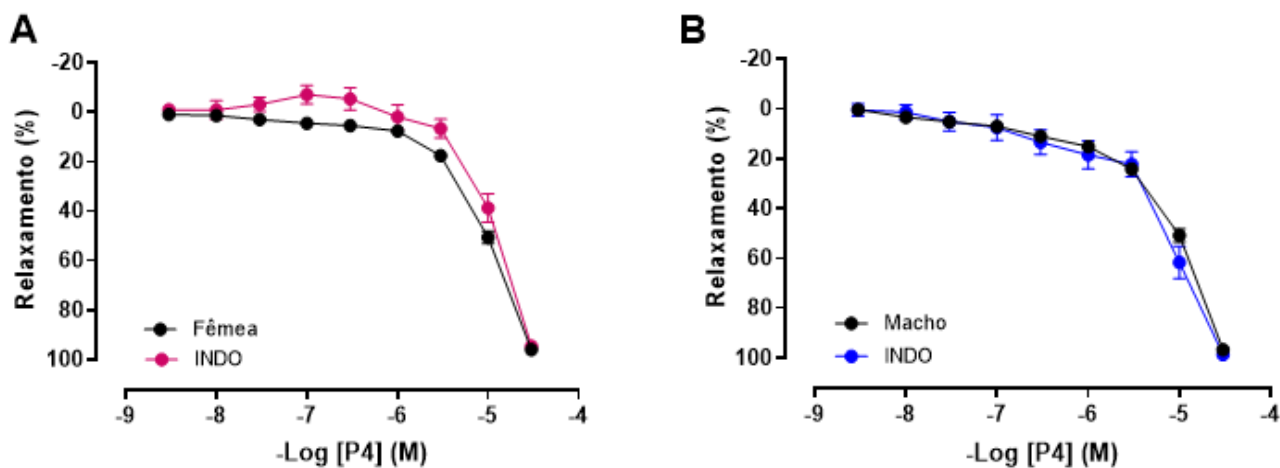
**Figura 10:** Resposta vasodilatadora a concentrações crescentes e cumulativas de progesterona (10 nM - 10  $\mu$ M) antes e após inibição com L-NAME (300  $\mu$ M) em artérias mesentéricas de (A) fêmeas (n = 12) e (B) machos (n = 11). Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM. \*  $P < 0.05$  comparado com a mesma concentração da curva controle. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo teste *post hoc* de Sidak.

Tendo em vista que observamos diferença na sensibilidade em alguns pontos da curva concentração resposta à progesterona em machos após incubação com L-NAME, um inibidor não seletivo das isoformas de NOS (tanto endotelial quanto do MLV) decidimos verificar a participação de vias extra endoteliais de geração de NO, realizando a mesma inibição após a remoção endotelial. Como resultado, verificamos que não houve diferença da resposta de relaxamento máximo em ambos os sexos (Fêmea:  $96 \pm 0,3\%$  para  $89 \pm 6,8\%$  e Macho:  $94 \pm 1,3\%$  para  $93 \pm 7,6\%$ ), mas apenas modulou alguns pontos (Figura 11 A e B) (Tabela 1), sugerindo que não há participação do NO extra endotelial na resposta de vasodilatação máxima induzida pela progesterona.



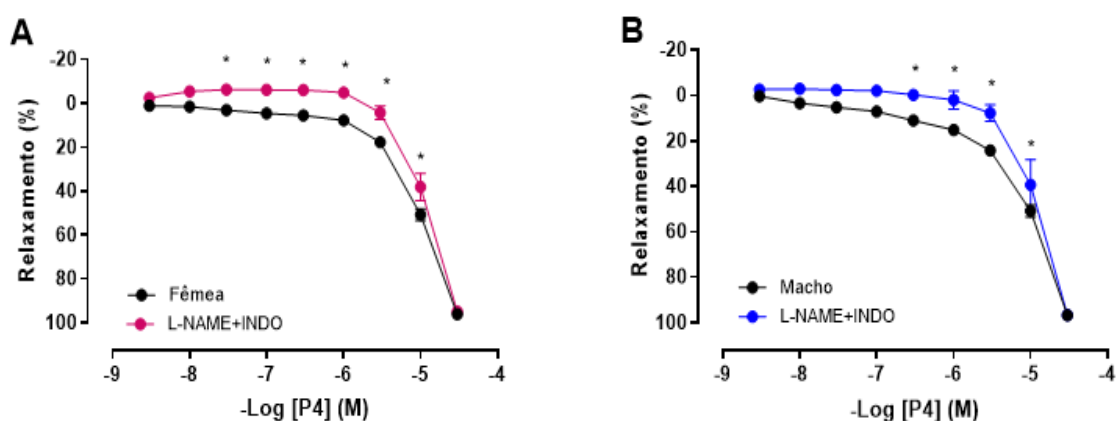
**Figura 11:** Resposta vasodilatadora a concentrações crescentes e cumulativas de progesterona (10 nM - 10  $\mu$ M) antes e após remoção endotelial e inibição com L-NAME (300  $\mu$ M) em artérias mesentéricas de (A) fêmeas (n = 9) e (B) machos (n = 9). Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM. \* P < 0.05 comparado com a mesma concentração da curva controle. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo teste *post hoc* de Sidak.

Após a inibição da síntese de PNs com indometacina, inibidor não seletivo da COX, observamos que fêmeas e machos não apresentaram comprometimento na resposta de relaxamento máxima, não estando os PNs envolvidos nessa resposta de relaxamento (Fêmea:  $96 \pm 0,3$  % para  $94 \pm 0,9$  % e Macho:  $94 \pm 1,3$  % para  $97 \pm 2$  %) (Figura 12 A e B) (Tabela 1).



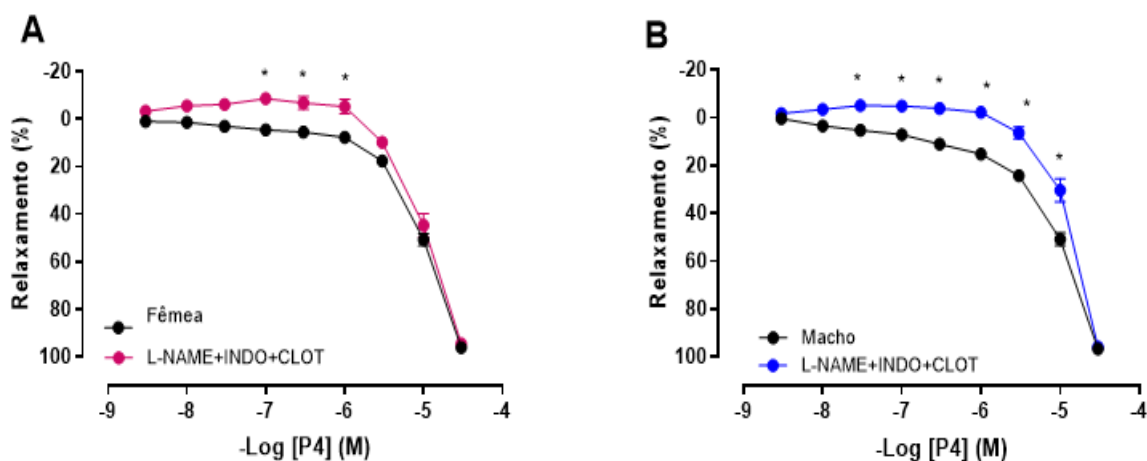
**Figura 12:** Resposta vasodilatadora a concentrações crescentes e cumulativas de progesterona (10 nM - 10  $\mu$ M) antes e após inibição com Indometacina (10  $\mu$ M) em artérias mesentéricas de (A) fêmeas (n = 8) e (B) machos (n = 8). Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (two-way ANOVA) seguida pelo Sidak *post hoc* test. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 1 via (*one-way* ANOVA) seguida pelo teste *post hoc de Tukey*.

De acordo com Matoba et al. (2000) e outros autores (MORIKAWA et al, 2004; SHIMOKAWA, MORIKAWA, 2005; MORI et al., 2006), há uma forte participação da EDH nas respostas de relaxamento das artérias de resistência. Portanto, para avaliar a sua participação realizamos incubações conjuntas com L-NAME e indometacina e observamos prejuízos na resposta em alguns pontos da curva, porém sem alteração na resposta máxima induzidas pela progesterona em ambos os sexos (Fêmea:  $96 \pm 0,3 \%$  para  $94 \pm 1,4 \%$  e Macho:  $94 \pm 1,3 \%$  para  $96 \pm 0,5\%$ ) (Figura 13 A e B) (Tabela 1). A resposta remanescente após a inibição das vias da NOS e COX poderia estar relacionada a um outro fator ou via endotelial de relaxamento (como a EDH) ou por ações diretas da progesterona no MLV, ou ambos. Em virtude disso, nosso próximo passo foi investigar se outro fator ou via endotelial além do NO e PNs poderia participar dessa resposta.



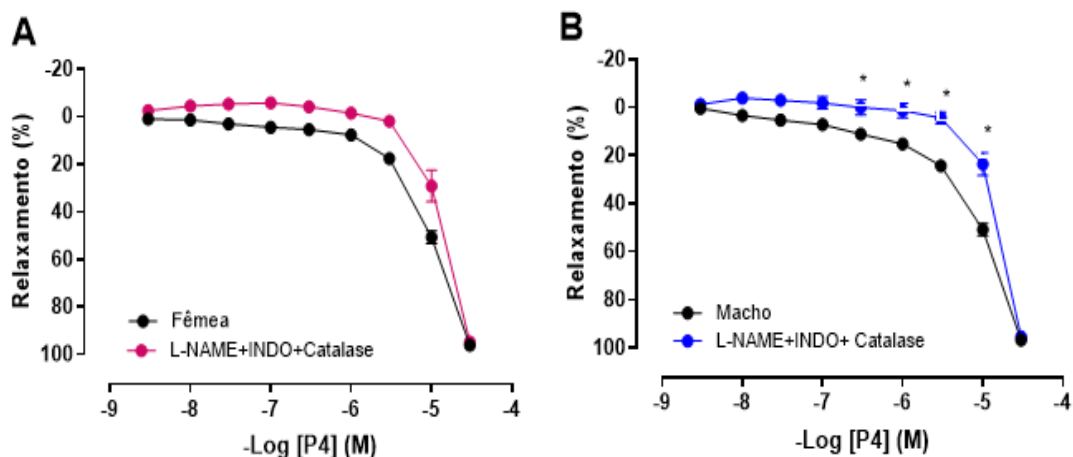
**Figura 13:** Resposta vasodilatadora a concentrações crescentes e cumulativas de progesterona (10 nM - 10  $\mu$ M) antes e após inibição dupla com L-NAME (300  $\mu$ M) + Indometacina (10  $\mu$ M) em artérias mesentéricas de (A) fêmeas (n = 9) e (B) machos (n = 8). Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM. \* P < 0.05 comparado com a mesma concentração da curva controle. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo Sidak *post hoc test*.

Entre os candidatos envolvidos na EDH, estudamos a participação dos produtos do citocromo P450. Observamos que após a inibição de NO, PNs e ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs), metabólitos do ácido araquidônico produzidos pela atividade da enzima citocromo P450, não houve diferença na resposta vasodilatadora induzida pela progesterona (Fêmea:  $96 \pm 0,3\%$  para  $94 \pm 1,2\%$  e Macho:  $94 \pm 1,3\%$  para  $95 \pm 0,8\%$ ), e sim apenas a modulação em alguns pontos da curva maior nos machos, que nas fêmeas, mostrando que os EETs não estão envolvidos resposta de relaxamento promovida pela progesterona (Fig. 14 A e B) (Tabela 1).



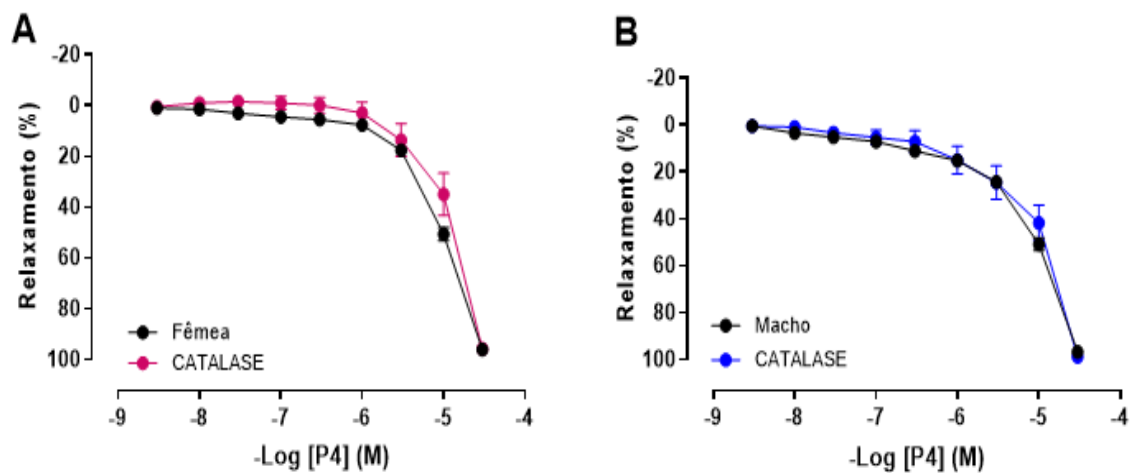
**Figura 14:** Resposta vasodilatadora a concentrações crescentes e cumulativas de progesterona (10 nM - 10  $\mu$ M) antes e após inibição tripla com L-NAME (300  $\mu$ M) + Indometacina (10  $\mu$ M) + Clotrimazol em artérias mesentéricas de (A) fêmeas (n = 8) e (B) machos (n = 8). Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM. \* P < 0.05 comparado com a mesma concentração da curva controle. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo Sidak *post hoc* test. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 1 via (*one-way ANOVA*) seguida pelo teste *post hoc* de Tukey.

Estudo de Silva et al. (2017) observou que o  $H_2O_2$  tem um papel importante no *cross-talk* entre NOS e COX, dependendo de sua concentração. Assim, analisamos a participação do  $H_2O_2$  na resposta vasodilatadora induzida pela progesterona em associação com inibidores da formação de NO e PNs. Embora tenhamos observado redução na sensibilidade da resposta de relaxamento nos machos, não houve alteração na resposta máxima em ambos os sexos. (Fêmea:  $96 \pm 0,3$  % para  $94 \pm 1,2$  % e Macho:  $94 \pm 1,3$  % para  $95 \pm 1,1$  %) (Figura 15 A e B) (Tabela 1).



**Figura 15:** Resposta vasodilatadora a concentrações crescentes e cumulativas de progesterona (10 nM - 10  $\mu$ M) antes e após inibição tripla com L-NAME (300  $\mu$ M) + Indometacina (10  $\mu$ M) + Catalase em artérias mesentéricas de (A) fêmeas (n = 8) e (B) machos (n = 8). Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM. \* P < 0.05 comparado com a mesma concentração da curva controle do grupo Macho. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo Sidak *post hoc* test.

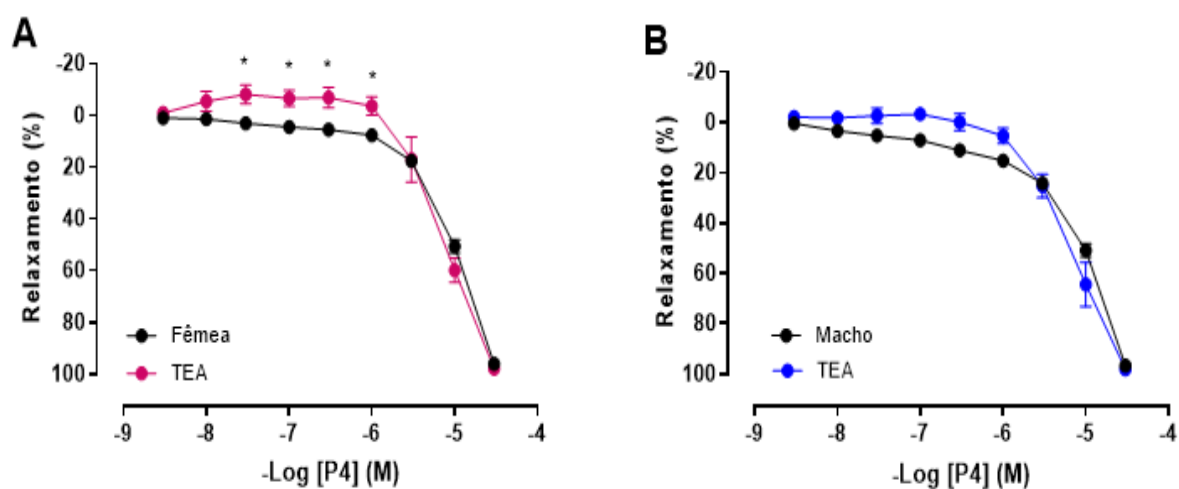
Para verificar a participação do  $H_2O_2$  na resposta vasodilatadora induzida pela progesterona, utilizamos uma enzima que degrada o  $H_2O_2$  (catalase). Após incubação isolada com catalase, observamos que não houve alteração da resposta máxima na curva concentração resposta induzida pela progesterona em ambos os grupos, indicando que o  $H_2O_2$  não é responsável por mediar a resposta de vasodilatação advinda da progesterona (Fêmea:  $96 \pm 0,3\%$  para  $95 \pm 1,6\%$  e Macho:  $94 \pm 1,3\%$  para  $98 \pm 0,8\%$ ) (Figura 16 A e B) (Tabela 1).



**Figura 16:** Resposta vasodilatadora a concentrações crescentes e cumulativas de progesterona (10 nM - 10  $\mu$ M) antes e após inibição com Catalase em artérias mesentéricas de (A) fêmeas (n = 8) e (B) machos (n = 10). Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo Sidak *post hoc* test.

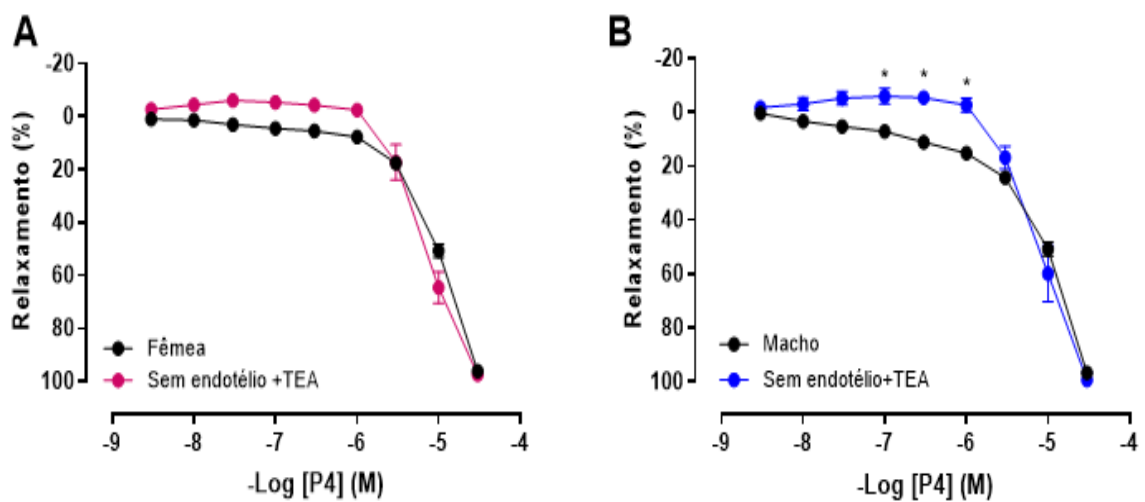


Após observar que não há a participação dos mediadores endoteliais de relaxamento, investigamos a participação do MLV na resposta induzida pela progesterona. Porém, primeiramente, avaliamos o papel dos canais para  $K^+$  na resposta de relaxamento induzida pela progesterona (Figura 17). Observamos que após a incubação com TEA, a resposta de relaxamento máxima não foi alterada em ambos os grupos, revelando que os canais para  $K^+$  não participam da vasodilatação promovida pela progesterona (Fêmea:  $96 \pm 0,3\%$  para  $96 \pm 1,4\%$  e Macho:  $94 \pm 1,3\%$  para  $98 \pm 0,4\%$ ) (Figura 17 A e B) (Tabela 1).



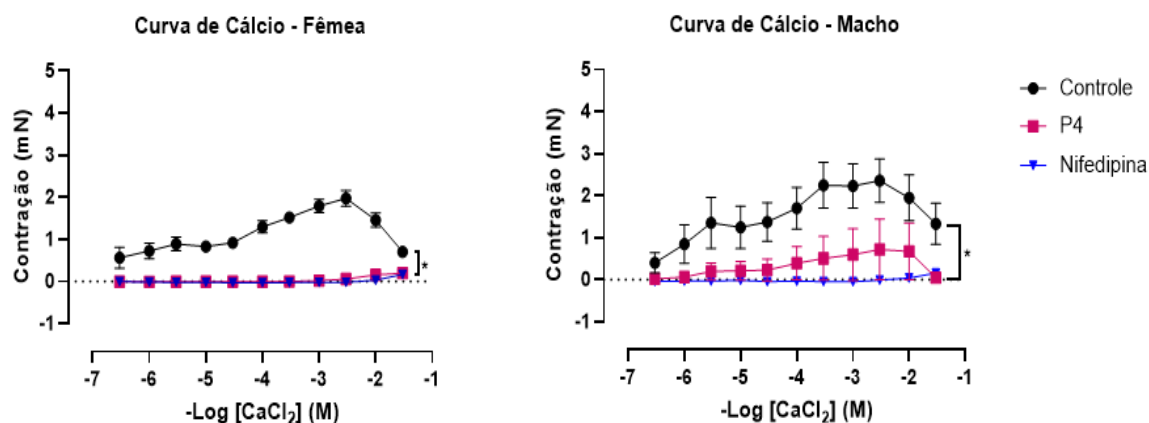
**Figura 17:** Efeito do bloqueio não seletivo de canais para potássio com tetraetilamônio (TEA, 5 mM) no relaxamento induzido pela progesterona em artérias mesentéricas de resistência (A) fêmeas ( $n = 7$ ) e (B) machos ( $n = 8$ ). Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM. \*  $P < 0.05$  comparado com a curva controle. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo teste *post hoc* de Sidak.

Analizamos também a participação extra endotelial dos canais para potássio na resposta de relaxamento induzida pela progesterona. Após remoção mecânica do endotélio e incubação com TEA, observamos que a resposta de relaxamento não mostrou alterações para ambos os grupos, sugerindo que os canais para potássio extra endoteliais não estão envolvidos na resposta de relaxamento mediada pela progesterona (Fêmea:  $96 \pm 0,3$  % para  $97 \pm 0,8$  % e Macho:  $94 \pm 1,3$  % para  $99 \pm 2,5$  %) (Figura 18 A e B) (Tabela 1).



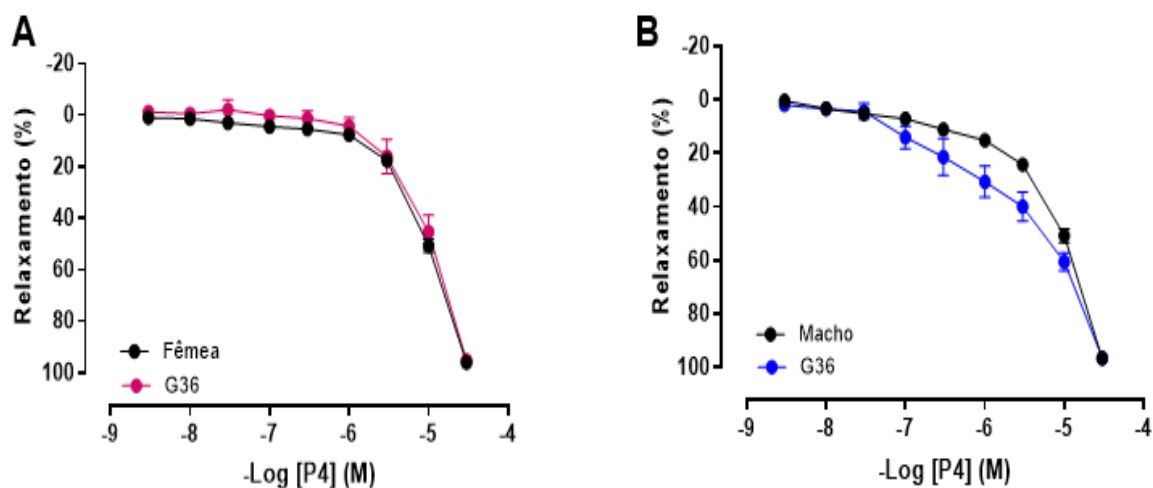
**Figura 18:** Efeito do bloqueio não seletivo de canais para potássio com tetraetilamônio (TEA, 5 mM) após remoção endotelial no relaxamento induzido pela progesterona em artérias mesentéricas de resistência (A) fêmeas ( $n = 7$ ) e (B) machos ( $n = 7$ ). Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM. \*  $P < 0.05$  comparado com a mesma concentração da curva controle. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo teste *post hoc* de Sidak.

Analizamos a participação do cálcio como outra possível via extra endotelial que pudesse estar mediando a vasodilatação induzida pela progesterona. Assim, as artérias mesentéricas foram submetidas a concentrações cumulativas de cloreto de cálcio, em solução despolarizante livre de  $\text{Ca}^{2+}$  e na presença da progesterona ( $10 \mu\text{M}$ ) e da nifedipina ( $1 \mu\text{M}$ ), seu controle positivo em ambos os sexos. Observamos que houve redução significativa da resposta contrátil na presença da progesterona e da nifedipina em fêmeas (controle:  $0,7 \pm 0,1 \%$ , progesterona:  $0,1 \pm 0 \%$ , nifedipina:  $0,1 \pm 0 \%$ ) e machos (controle:  $1,3 \pm 0,4\%$ , progesterona:  $0,04 \pm 0 \%$ , nifedipina:  $0,1 \pm 0 \%$ ) (Figura 19).



**Figura 19:** Curva concentração resposta de  $\text{CaCl}_2$  ( $10 \mu\text{M}$  –  $30 \text{mM}$ ) em artérias mesentéricas de resistência mantidas em solução despolarizante livre de  $\text{Ca}^{2+}$ , na ausência (fêmea  $n = 10$  e macho  $n = 8$ ) e na presença de progesterona (fêmea  $n = 10$  e macho  $n = 6$ ) e nifedipina (fêmea  $n = 7$  e macho  $n = 5$ ). Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM. \*  $P < 0.05$  quando comparado a curva controle. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo teste *post hoc* de *Tukey*.

Para averiguar se o GPER seria um possível receptor envolvido na vasodilatação induzida pela progesterona em artérias mesentéricas, foi utilizado o G36 (antagonista seletivo do GPER). Observamos que em ambos os grupos não houve diferença na resposta de relaxamento mediada pela progesterona (Fêmea:  $96 \pm 0,3$  % para  $95 \pm 1,3$  % e Macho:  $94 \pm 1,3$  % para  $96 \pm 0,9$  %), sugerindo que este receptor não está envolvido na resposta vasodilatadora (Figura 20 A e B) (Tabela 1).



**Figura 20:** Resposta vasodilatadora a concentrações crescentes e cumulativas de progesterona (10 nM- 10  $\mu$ M) antes e após na presença do inibidor seletivo do GPER (G36) em artérias mesentéricas de (A) fêmeas (n = 5) e (B) machos (n = 5). Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo Sidak *post hoc* test.

Resumimos alguns dados de reatividade na tabela 1, sendo eles o EC50 e RM<sub>áx</sub>.

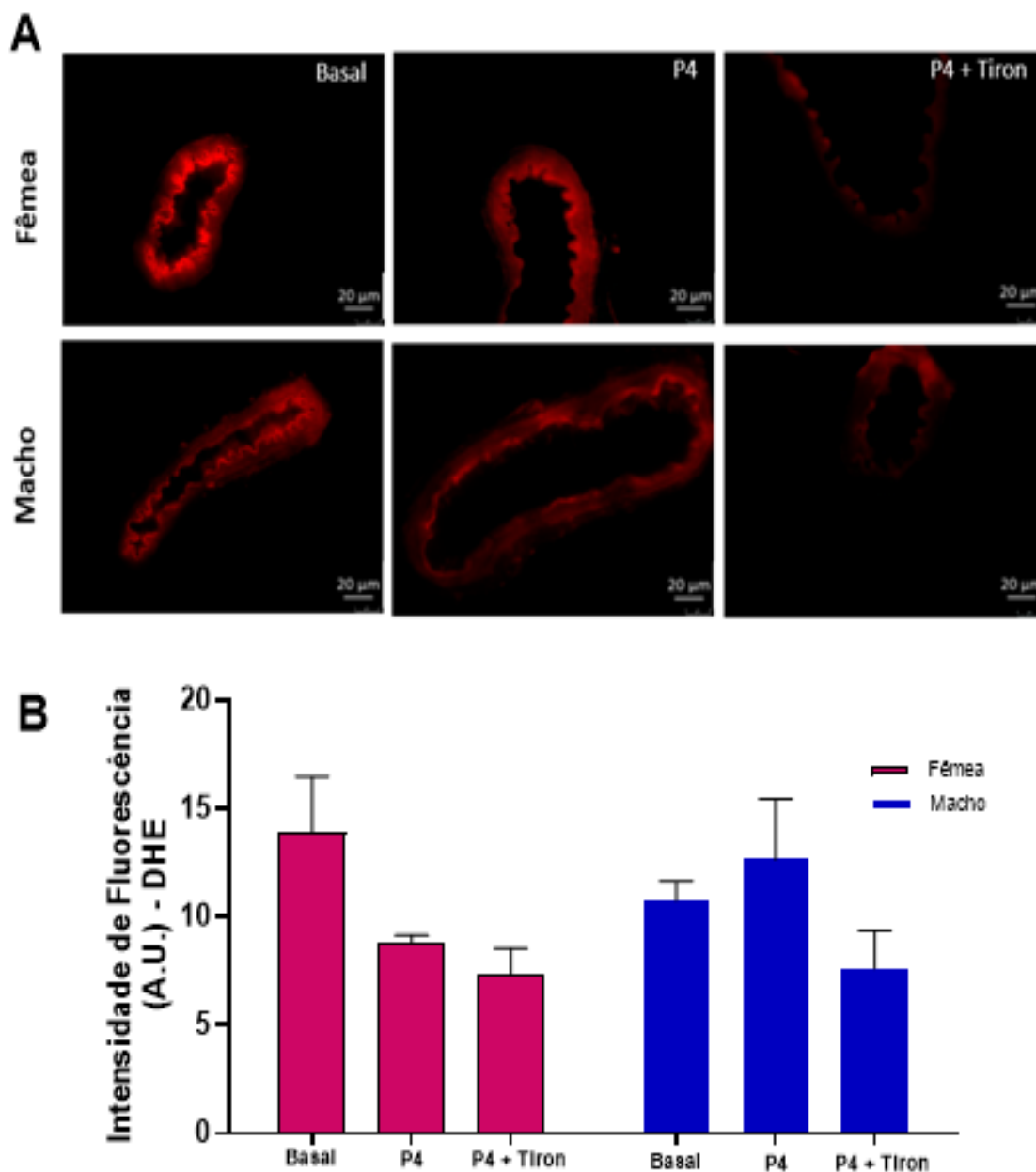
**Tabela 1:** Efeito do relaxamento induzido pela progesterona (P4) em artérias mesentéricas de resistência de fêmeas e machos e participação dos mediadores endoteliais sobre o EC<sub>50</sub> e relaxamento máximo (R<sub>Máx</sub>).

P4	Fêmea			Macho		
	n	EC50 (μM)	RM <sub>áx</sub> . (%)	n	EC50 (μM)	RM <sub>áx</sub> . (%)
Controle	<b>35</b>	4 ± 0,2	96 ± 0,3	<b>37</b>	4,7 ± 0,2	94 ± 1,3
2ª CURVA	<b>8</b>	4,1 ± 0,5	97 ± 0,6	<b>7</b>	2,8 ± 0,7	96 ± 0,7
SEM ENDOTÉLIO	<b>14</b>	4 ± 0,4	86 ± 6,4	<b>18</b>	3,5 ± 0,4	93 ± 2,7
L-NAME	<b>12</b>	3,3 ± 0,4	85 ± 4,4	<b>10</b>	3 ± 0,6	93 ± 2,3
SEM ENDOTÉLIO+L-NAME	<b>9</b>	2,8 ± 0,5	89 ± 6,8	<b>9</b>	2,5 ± 0,6	93 ± 7,6
INDO	<b>8</b>	3,4 ± 0,6	94 ± 0,9	<b>8</b>	4,3 ± 0,8	97 ± 2
L-NAME + INDO	<b>9</b>	2,7 ± 0,7	94 ± 1,4	<b>8</b>	2,3 ± 0,7	96 ± 0,5
L-NAME + INDO + CLOT	<b>8</b>	3 ± 1,1	94 ± 1,2	<b>8</b>	2,7 ± 0,7	95 ± 0,8
L-NAME + INDO + CAT	<b>8</b>	2 ± 0,7	94 ± 1,2	<b>8</b>	0,8 ± 1,7	95 ± 1,1
CATALASE	<b>8</b>	2,6 ± 0,7	95 ± 1,6	<b>10</b>	5,2 ± 0,6	98 ± 0,8
TEA	<b>7</b>	4,7 ± 0,1	96 ± 1,4	<b>8</b>	3,4 ± 0,9	98 ± 0,4
SEM ENDOTÉLIO+ TEA	<b>7</b>	4,8 ± 0,1	97 ± 0,8	<b>7</b>	3,1 ± 1,6	99 ± 2,5
G36	<b>5</b>	3,7 ± 0,7	95 ± 1,3	<b>5</b>	5,8 ± 4,8	96 ± 0,9

Os valores foram expressos como média ± EPM. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 1 via (one-way ANOVA) seguida pelo teste *post hoc* de Tukey.

#### 4.2 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs)

A análise de fluorescência para detecção de EROs em artérias mesentéricas não indicou diferenças entre os sexos (Fêmea: 14 ± 2,5 e Macho: 11 ± 0,9 U.A.) em condições basais. Da mesma forma, a fluorescência produzida após estimulação com progesterona (Fêmea: 8,8 ± 0,3 e Macho: 12,6 ± 2,7 U.A.) não foi diferente entre machos e fêmeas. Além disso, na presença de Tiron, controle negativo, a intensidade da fluorescência foi reduzida em ambos os grupos (Fêmea: 7 ± 1,2 e Macho: 7,6 ± 1,7 U.A.) (Figura 21 A e B).



**Figura 21:** Análise representativa da microscopia de fluorescência emitida por DHE em artérias mesentéricas de (A) fêmeas ( $n = 4$ ) e (B) machos ( $n = 4$ ) na ausência ou presença de estímulos com quantificação da fluorescência produzida. Barra de escala =  $20 \mu\text{m}$ . Os valores foram expressos com média  $\pm$  EPM. A análise estatística foi realizada por meio de *two-way* ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Tukey.

# DISCUSSÃO



## 5. DISCUSSÃO

O principal achado deste estudo foi que a progesterona, agindo de forma aguda, promoveu relaxamento em artérias mesentéricas de resistência de ratos normotensos de ambos os sexos e essa resposta foi similar entre os sexos. Além disso, o relaxamento induzido pela progesterona parece ser dependente de via extra endotelial (no MLV) mediada por cálcio.

Nossa primeira observação foi que concentrações crescentes e cumulativas de progesterona foram capazes de promover relaxamento em segmentos arteriais de mesentérica de animais normotensos. O relaxamento induzido pela progesterona também já foi observado em outros segmentos arteriais em diferentes espécies, como em aorta de ratos machos *Sprague-Dawley* (BARBAGALLO et al., 2001), coronárias de suínos (MOLINARI et al., 2001) e coronárias de primatas fêmeas (MINSHALL et al., 2002). Nossa segunda observação foi que não houve diferença sexual na resposta de relaxamento promovida pela progesterona. Resposta similar foi encontrada em estudo prévio do nosso laboratório, porém em leito vascular coronariano de animais normotensos (GIESEN et al., 2020). Contudo, precisamos de mais estudos que investiguem a diferença sexual no relaxamento mediado pela progesterona nesses diferentes segmentos arteriais.

Um outro achado importante deste estudo foi que a resposta de relaxamento induzida pela progesterona não foi alterada após a remoção endotelial em ambos os sexos, corroborando com estudos que avaliaram artéria coronária de coelho e artérias placentárias humanas, nos quais o relaxamento promovido pela progesterona foi similar na presença ou na ausência do endotélio (JIANG et al., 1992; OMAR et al., 1995). Resultados divergentes foram encontrados em estudos com aorta (CUTINI, SÉLLES, MASSHEIMER, 2009) e no leito coronariano (CUNHA et al., 2020; GIESEN et al., 2020; COSTA et al., 2021), na qual a resposta vasodilatadora induzida pela progesterona foi mediada por fatores endoteliais de relaxamento. Estes resultados mostram que a progesterona pode apresentar diferentes vias de relaxamento dependendo do seu local de ação e da espécie estudada.



Já é conhecido que o endotélio exerce um importante papel na manutenção do tônus vascular, sintetizando e liberando EDRFs, como, NO, PNs e EDH (FÉLÉTOU, HUANG, VANHOUTTE, 2011; LEUNG, VANHOUTTE, 2017; VANHOUTTE et al., 2017), sendo o NO, um dos principais responsáveis por esse controle do tônus vascular e da pressão arterial, uma vez que é liberado em resposta à simples passagem do sangue (*shear stress*) promovendo assim o relaxamento do MLV (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980; GILES et al., 2012). O NO pode ser sintetizado pelo endotélio vascular e também de forma extra endotelial, como por exemplo pelos fibroblastos da camada adventícia (ZHANG et al., 1999, CIFUENTES et al., 2000) e pelas células musculares lisas (MOLLACE et al., 1991).

No presente estudo não foi observada diferença na resposta de relaxamento, após inibição com L-NAME em artérias com endotélio intacto em ambos os sexos. Diferindo da resposta encontrada por Chan et al. (2001), no qual a inibição do NO, com L-NAME, atenuou a resposta de relaxamento induzida pela progesterona em anéis de artéria mesentérica e aorta de machos *Sprague-Dawley*. Não obstante, em estudo prévio realizado por nosso grupo em artérias coronárias, o efeito vasodilatador da progesterona foi potencializado em ambos os sexos após inibição com L-NAME, o que foi atribuído a uma inibição da produção de  $O_2^{\bullet-}$  pela NOS e consequente inibição da formação de  $ONOO^-$  (produto da reação entre NO e  $O_2^{\bullet-}$ ), o que explicaria a potencialização da resposta após o uso do L-NAME (GIESEN et al, 2020).

Ainda que não tenhamos encontrado participação do endotélio mediando as respostas de relaxamento induzidas pela progesterona, avaliamos a participação do NO, uma vez que existem vias extra endoteliais de formação de NO (MOLLACE et al, 1991). Assim, em nosso estudo após a remoção endotelial foi realizado incubação com L-NAME e não observamos prejuízo da resposta de relaxamento máximo, o que indicou que o NO extra endotelial parece não participar da resposta mediada pela progesterona e que essa resposta de relaxamento poderia estar ligada a um mediador não dependente do endotélio.

Uma outra via endotelial avaliada, cuja inibição poderia indicar eventual diferença sexual ainda que com a remoção endotelial a resposta não tenha sido alterada, foi a via dos PNs. Ao avaliar essa via, após inibição com indometacina

(inibidor não-seletivo da COX), pudemos observar que não ocorreram diferenças entre os sexos na vasodilatação induzida pela progesterona. Estudo prévio do nosso grupo mostrou que essa via tem participação na ação vasodilatadora da progesterona nos machos, mas não em fêmeas no leito coronariano (GIESEN et al, 2020). Já em anéis de aorta de fêmeas jovens, foi demonstrado que a progesterona pode atuar modulando positivamente a atividade da COX, dessa forma, aumentando a disponibilidade de PNs (CUTINI; CAMPELO; MASSHEIMER, 2014). Portanto, a participação de PNs como mediadores do relaxamento induzido pela progesterona não está completamente elucidada.

Ao analisar a inibição conjunta com L-NAME e indometacina, observamos que não houve prejuízo no relaxamento induzido pela progesterona em ambos os sexos, ou seja, algum candidato a EDH poderia estar atuando sobre o relaxamento produzido pela progesterona ou a resposta remanescente seria fruto da ação direta da progesterona no MLV, ou ambos. Testamos primeiramente a participação da EDH, uma vez que em artérias de resistência, a EDH apresenta um papel importante na regulação da resistência vascular periférica (OHASHI et al., 2012; SHIMOKAWA et al., 1996) e, conseqüentemente, na perfusão tecidual local. Cabe ressaltar, que as respostas mediadas pelo NO são dominantes nas artérias de condutância, enquanto a EDH se tornaria mais importante à medida que o calibre das artérias reduz (COR DE WIT, WOLFLE, 2007; SHIMOKAWA et al., 1996).

Em vista disso, no ano de 1988, Taylor e Weston descreveram pela primeira vez o EDHF (hoje EDH) e revelaram que o endotélio era capaz de sintetizar uma substância que promovia hiperpolarização no MLV (TAYLOR; WESTON, 1988). As vias envolvidas na EDH incluem o peptídeo natriurético do tipo C (CHAUHAN et al., 2003), ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs) (FISSITHALER et al., 1999; FLEMING, 2000), sulfato de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) (ZHAO et al., 2001), íons potássio (K<sup>+</sup>) (EDWARDS et al., 1998), e comunicação elétrica através das junções mioendoteliais (KÜHBERGER et al., 1994). Esses mecanismos ativam diferentes famílias de canais de K<sup>+</sup>, levando à hiperpolarização das células do MLV, contribuindo para mecanismos que promovem o relaxamento (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2009; SHIMOKAWA; MORIKAWA, 2005).

Portanto, analisamos se a EDH estaria envolvida na resposta de relaxamento promovida pela progesterona. A primeira via de EDH avaliada foi a via dos ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs), metabólitos da enzima citocromo P450 (CYP). Observamos que não houve participação dos EETs no relaxamento induzido pela progesterona em ambos os sexos. Embora, estudos do nosso grupo tivessem demonstrado que os metabólitos derivados da CYP participassem da EDH no leito coronariano de animais, tanto normotensos (SANTOS *et al.*, 2004; ROUVER *et al.*, 2015) quanto hipertensos (SANTOS *et al.*, 2010) para outros hormônios sexuais (estradiol e testosterona), essa participação não foi observada no relaxamento induzido pela progesterona em artérias mesentéricas de animais normotensos de ambos os sexos.

O  $H_2O_2$ , outro candidato que poderia estar envolvido na EDH, foi avaliado e pudemos observar que a resposta vasodilatadora máxima não foi prejudicada após incubações conjugadas com L-NAME, indometacina e catalase, em ambos os grupos. Segundo Matoba e Shimokawa (2003), em segmentos de artérias mesentéricas de resistência, o  $H_2O_2$  é considerado uma via de EDH. Embora não tenhamos observado diferenças sexuais nestas respostas, Wong *et al.* (2015) encontraram menor participação da via de EDH em machos, ao contrário das fêmeas, em que a via de EDH foi predominante. Essa maior predominância nas fêmeas pode ser explicada pela maior expressão da superóxido dismutase (SOD), melhor ação das junções comunicantes e uma maior probabilidade de abertura dos canais para potássio ativados por cálcio de condutância intermediária ( $IK_{Ca}$ ) (RAY *et al.*, 2011). Outro estudo também demonstrou que o  $H_2O_2$  exerce um importante papel no *cross-talk* entre NOS e COX. Quando encontrado em baixas concentrações, o  $H_2O_2$  aumenta a atividade de NOS, já em altas concentrações aumenta principalmente a atividade de COX endotelial (SILVA *et al.*, 2017). Ainda que a resposta encontrada por nós em relação ao  $H_2O_2$  seja diferente dos estudos citados, cabe ressaltar que os mesmos foram realizados em outros leitos vasculares e não utilizaram a progesterona com indutor do relaxamento.

Analisamos também, de forma individual a inibição apenas com a catalase, degradador do  $H_2O_2$ , em artérias mesentéricas de resistência em ambos os sexos. Observamos que a resposta de relaxamento máximo se

manteve inalterada em ambos os grupos. Diferente do que foi encontrado no leito coronariano, onde o relaxamento induzido pela progesterona foi reduzido apenas em fêmeas após incubação com catalase e que a análise de DCF mostrou aumento dos níveis de  $H_2O_2$  na presença de progesterona nesse grupo (GIESEN et al, 2020), no presente estudo não observamos participação do  $H_2O_2$  no relaxamento induzido pela progesterona em artérias mesentéricas de resistências de animais de ambos os sexos.

Ao avaliar a participação dos canais para  $K^+$  observamos que a presença de um bloqueador não seletivo desses canais, o TEA, não alterou a resposta de relaxamento induzida pela progesterona em artérias mesentéricas de resistência na presença ou na ausência de endotélio, em ambos os sexos. Dado semelhante, porém, em leito mesentérico, foi encontrado no estudo de Tsang, et al. (2003), que comparou a contribuição dos canais para  $K^+$  na vasodilatação induzida pela progesterona. Neste estudo, eles encontraram que a resposta de relaxamento induzida pela progesterona também não contou com a contribuição dos canais para  $K^+$ .

Os canais para potássio desempenham um papel importante para o estabelecimento e controle do tônus vascular, pois tem participação direta na regulação do potencial de membrana celular (CLIMENT, SIMONSEN, RIVERA, 2014; AFSAR et al., 2016). A ativação dos canais para  $K^+$  promove hiperpolarização da membrana de células do MLV e conseqüentemente vasodilatação, enquanto a inibição desses canais leva a despolarização da membrana e, tem como resposta a vasoconstrição (GOLLASCH et al, 1996; MARINKO et al, 2015; WHIDDEN et al, 2016). As células do MLV podem expressar diferentes canais para potássio e foram identificadas quatro classes diferentes: 1) canais para potássio dependentes de voltagem ( $K_V$ ); 2) Canais para potássio ativados por  $Ca^{2+}$  ( $K_{Ca}$ ), incluindo canais para potássio ativados por  $Ca^{2+}$  de grande – ( $BK_{Ca}$ ), intermediária – ( $IK_{Ca}$ ) e pequena condutância ( $SK_{Ca}$ ); 3) canais para potássio sensíveis a ATP ( $K_{ATP}$ ); e 4) canais para potássio retificadores de influxo ( $K_{IR}$ ) (NELSON, QUAYLE, 1995; NILIUS, DROOGMANS, 2001). Contudo, os achados do presente estudo demonstraram que os canais para  $K^+$  não participam da resposta de relaxamento induzida pela progesterona, sendo necessária a investigação de outras vias extra endoteliais.

Ao analisar a vasodilatação induzida pela progesterona, observamos que a mesma poderia estar associada a uma via extra endotelial. Diante desse dado, avaliamos se o íon cálcio estaria ligado as respostas induzidas pela progesterona. De fato, pudemos averiguar que em meio com solução despolarizante (KCl 50 mM) e livre de cálcio, a progesterona foi capaz de atenuar a curva de contração obtida por doses cumulativas de  $\text{CaCl}_2$ . Resultados semelhantes foram encontrados em estudos que avaliaram a ação anti-hipertensiva da riparina em leito mesentérico de camundongos (GARCIA et al., 2016), e outro que avaliou a ação da tiliroside em leito mesentérico de machos normotensos (SILVA et al., 2013), ambos fármacos fitoterápicos, e como resultado observaram que resposta de vasodilatação foi mediada por canais para cálcio voltagem dependentes (SILVA et al., 2013; GARCIA et al., 2016).

Quando a concentração externa de potássio se eleva, acontece então despolarização da membrana celular, inibindo a EDH e permitindo a abertura dos canais para cálcio dependentes de voltagem (tipo L e T), o que promove um aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  de forma sustentada (BUUS et al., 2006). Logo, sabemos que existe uma relação importante entre potencial de membrana, influxo de cálcio, concentração de cálcio intracelular e manutenção da força contrátil do músculo liso (COX, 1996). As respostas de contração no MLV podem ser mediadas por influxo do cálcio extracelular via canais para cálcio dependentes de voltagem, pela liberação de cálcio induzida por cálcio pelos canais de rianodina ou por liberação de cálcio pelos receptores para 1,4,5-trifosfato de Inositol ( $\text{IP}_3$ ), estoques localizados no retículo sarcoplasmático (GRAYSON et al., 2004). Quando há ausência do cálcio extracelular se observa apenas as contrações transitórias, mediadas pelos estoques intracelulares, uma vez que é necessário o influxo de cálcio para a manutenção da fase tônica da contração do MLV (VAN ZWIETEN et al., 1983; WANG et al., 2002).

Assim, diante dos resultados encontrados até o momento, no qual apenas a via extra endotelial com participação do íon cálcio parece estar envolvida na resposta de relaxamento máximo induzida pela progesterona, buscamos investigar também se o GPER poderia estar envolvido nessa resposta, como foi encontrado em estudo prévio do nosso grupo no leito coronariano de animais normotensos (GIESEN, 2019). Dessa forma, sabemos que esse receptor foi

identificado em meados da década de 1990, sendo considerado um receptor órfão acoplado à proteína G, sem nenhum ligante conhecido, e assim nomeado primariamente como GPR30 (OWMAN et al., 1996; CARMECI et al., 1997; TAKADA et al., 1997). Posteriormente, o GPR30 passou a ser designado de GPER, por possuir boa afinidade e induzir sinalização rápida em resposta a ligação do estrogênio (ALEXANDER et al., 2008).

Alguns estudos mostraram que o GPER, apresenta alta afinidade pelo estrogênio e uma menor afinidade para outros hormônios esteroides, como a testosterona e a progesterona (THOMAS et al., 2005; PANG, DONG, THOMAS, 2008). Contudo, estudos do nosso grupo em leito coronariano de animais normotensos de ambos os sexos, mostraram que o efeito vasodilatador da progesterona, mesmo em concentrações acima de 1  $\mu$ M, foi abolido em ambos os sexos após incubação com G36, sugerindo que a progesterona, ao desencadear suas ações rápidas, também poderia envolver a participação do GPER (GIESEN, 2019). Estudo prévio do laboratório demonstrou que o GPER é expresso igualmente em ambos os sexos em artérias coronárias de ratos normotensos (DEBORTOLI et al., 2017). Já em artérias mesentéricas de resistência há uma maior expressão do GPER em machos em comparação com as fêmeas. No entanto, por meio da técnica de imunolocalização foi demonstrado níveis elevados de GPER no endotélio do que no MLV em fêmeas (PEIXOTO et al., 2017, 2018). Com base nesses estudos anteriores do laboratório, era esperado que parte da resposta de relaxamento poderia ser proveniente da ativação do GPER. Todavia, nossos resultados mostraram que em artérias mesentéricas de resistência, a vasodilatação promovida pela progesterona parece não depender de sua ação sobre o GPER.

# CONCLUSÃO



## 6. CONCLUSÃO

Nossos resultados permitem concluir que a progesterona induz relaxamento em artérias mesentéricas de resistência de forma similar em ambos os sexos, por uma via extra endotelial, no MLV, com a participação do cálcio em ambos. Além disso, os mediadores endoteliais e o GPER, não participam dessa resposta. Esses achados são importantes para uma melhor compreensão das ações vasculares promovidas pela progesterona em ambos os sexos, e podem auxiliar no desenvolvimento de melhores formas de terapia na peri e pós menopausa.



# REFERÊNCIA



## 7. REFERÊNCIA

AFSAR, S.; HEMSINLI, D.; OZYAZGAN, S., AKKAN, A.G.; ARSLAN, C. The Effects of Potassium Channels in Human Internal Mammary Artery. **Pharmacology**; 97(1-2):72-7, 2016.

AHOLA, T. M. et al. G Protein-Coupled Receptor 30 Is Critical for a Progestin-Induced Growth Inhibition in MCF-7 Breast Cancer Cells. **Endocrinology**, v. 143, n. 9, p. 3376–3384, 2002.

ALEXANDER, S P H; MATHIE, A; PETERS, J A. Guide to receptors and channels (GRAC), 3rd edition. **British journal of pharmacology**, v. 153, n. S2, p. S1-S209, 2008.

ALLEN, W. M. Recollections of my Life with Progesterone. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, v. 5, n. 3, p. 142–182, 1974.

ANAND, S.S. et al. A Risk factors for myocardial infarction in women and men: insights from the INTERHEART study. **European Heart Journal**, v. 29, n.7, p. 932-940, 2008.

BARBAGALLO, M. et al. **Vascular Effects of Progesterone: Role of Cellular Calcium Regulation. Hypertension**, 37(1):142-147, 2001.

BARTON, M.; MEYER, M.R. Postmenopausal Hypertension Mechanisms and Therapy. **Hypertension**, v. 54, n. 1, p. 11-18, 2009.

BENJAMIN, E.J. et al. Heart disease and stroke statistics - 2019 update: A report from the American Heart Association. **Circulation**, v. 139, p. e257–e280, 2019.

BERNARD, D.J.; WOODRUFF, T.K. Inhibin Binding Protein in Rats: Alternative Transcripts and Regulation in the Pituitary across the Estrous Cycle. **Molecular Endocrinology**, v. 15, n. 4, p. 654–667, 2001.

BOSCHITSCH, E.; MAYERHOFER, S.; MAGOMETSCHNIGG, D. Hypertension in women: The role of progesterone and aldosterone. **Climacteric**, v. 13, n. 4, p. 307–313, 2010.

BUUS, N.H.; SIMONSEN, U.; PILEGAARD, H.K.; MULVANY, M.J. Intracellular smooth muscle [Ca<sup>2+</sup>] in acetylcholine and nitric oxide-mediated relaxation of human small arteries. **European Journal of Pharmacology**, Mar 27;535(1-3):243-7, 2006.

CAIRRÃO, E. et al. Non-genomic vasorelaxant effects of 17 $\beta$ -estradiol and progesterone on rat aorta are mediated by L- type Ca<sup>2+</sup> current inhibition. **Acta Pharmacologica Sinica**, p. 615–624, 2012.

CARMECI, C. et al. Identification of a Gene (GPR30) with Homology to the G-Protein-Coupled Receptor Superfamily Associated with Estrogen Receptor Expression in Breast Cancer. **Genomics**, v. 45, n. 3, p. 607–617, 1997.

CHAN, H.Y. et al. Different role of endothelium/nitric oxide in 17beta-estradiol- and progesterone-induced relaxation in rat arteries. **Life Sciences**, 24;69(14):1609-17, 2001.

CHAUHAN, S.D. et al. Release of C-type natriuretic peptide accounts for the biological activity of endothelium-derived hyperpolarizing factor. **National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 3, p. 1426–1431, 2003.

CIFUENTES, M.E.; REY, F.E.; CARRETERO, O.A.; PAGANO, P.J. Upregulation of p67phox and gp91phox in aortas from angiotensin II-infused mice. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, 279, H2234–H2240, 2000.

CLIMENT, B.; SIMONSEN, U.; RIVERA, L. Effects of obesity on vascular potassium channels. **Current Vascular Pharmacology**, 12 438–452, 2014.

CONCEA-MCT. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação-Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica – DBCA. **In Brazilian Government**, p. 1–50, 2016.

COR DE WIT; WOLFLE, S.E. EDHF and Gap Junctions: Important Regulators of Vascular Tone Within the Microcirculation. **Current Pharmaceutical, Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 11–25, 2007.

CORNER, G.W. The Early History of Progesterone. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, v. 5, n. 2, p. 106–112, 1974.

COSTA, D.T.; GONÇALVES, L.T.; GIESEN, J.A.S.; SANTOS, R.L. Progesterone modulates endothelium-dependent coronary vascular reactivity in SHR. **Journal of Molecular Endocrinology**, 66(2):171-180, 2021.

COX, R.H. Comparison of K<sup>+</sup> channel properties in freshly isolated myocytes from thoracic aorta of WKY and SHR. **American Journal of Hypertension**, Sep;9(9):884-94, 1996.

CUNHA, T.R.D et al. Effects of progesterone treatment on endothelium-dependent coronary relaxation in ovariectomized rats. **Life Sciences**, 15; 247:117391, 2020.

CUTINI, P. H.; CAMPELO, A. E.; MASSHEIMER, V. L. Differential regulation of endothelium behavior by progesterone and medroxyprogesterone acetate. **Journal of Endocrinology**, v. 220, n. 3, p. 179–193, 2014.

CUTINI, P.; SELLÉS, J.; MASSHEIMER, V. Cross-talk between rapid and long-term effects of progesterone on vascular tissue. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 115, p. 36–43, 2009.

DALAL, P.K.; AGARWAL, M. Postmenopausal syndrome. **Indian Journal of Psychiatry**, v. 57, p. S222-232, 2015.

DEBORTOLI, A. R. et al. GPER modulates tone and coronary vascular reactivity in male and female rats. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 59, n. 2, p. 171–180, 1 ago., 2017.

DI RENZO, G.C.; TOSTO, V, TSIBIZOVA, V. Progesterone: History, facts, and artifacts. **Best Practice & Research: Clinical Obstetrics & Gynaecology**, 69:2-12, 2020.

DUBEY, R.K. et al. Hormone Replacement Therapy and Cardiovascular Disease What Went Wrong and Where Do We Go From Here? **Hypertension**, v. 44, n. 6, p. 789–795, 2004.

EDWARDS, G. et al. K<sup>+</sup> is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. **Nature**, v. 396, n. 6708, p. 269–272, 19 nov. 1998.

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

FÉLÉTOU, M.; HUANG, Y.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. **British Journal of Pharmacology**, v. 164, n. 3, p. 894–912, 2011.

FERNANDES, D.C. et al. Analysis of DHE-derived oxidation products by HPLC in the assessment of superoxide production and NADPH oxidase activity in vascular systems. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 292, n. 1, p. C413-C422, 2007.

FISSITHALER, B. et al. Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. **Nature**, v. 401, n. 6752, p. 493–497, 30 set. 1999.

FLEMING, I. Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 10, n. 4, p. 166–170, 2000.

FORTIER, A.; GULLAPALLI, V.; MIRSHAMS, R. A. Review of biomechanical studies of arteries and their effect on stent performance. **International Journal of Cardiology: Heart & Vessels**, v. 4, p. 12–18, 2014.

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

GARCIA, D.C.; PEREIRA, A.C.; GUTIERREZ, S.J.; BARBOSA-FILHO, J.M; LEMOS, V.S.; CÔRTEZ, S.F. Structure-related blockage of calcium channels by vasodilator alkamides in mice mesenteric artery. **Vascular Pharmacology**, Jul;82:60-5, 2016.

GARG, D.; MAN NG, S.S.; BAIG, K.M., DRIGGERS, P.; SEGARS, J. Progesterone-Mediated NonClassical Signaling. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, 1–13, 2017.

GARG, U.C.; HASSID, A. 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, 1989.

GBD 2017 CAUSES OF DEATH COLLABORATORS. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **Lancet**, v. 392, p. 1736-1788, 2018.

GBD 2017 DALYS AND HALE COLLABORATORS. Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 359 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **Lancet**, v. 392, pp. 1859-1922, 2018.

GIESEN, J. **Diferenças sexuais no relaxamento induzido pela progesterona no leito coronariano de ratos normotensos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Programa de pós graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2019.

GIESEN, J.A.S. et al. Sex differences in progesterone-induced relaxation in the coronary bed from normotensive rats. **Journal of Molecular Endocrinology**, 64(2):91-102, 2020.

GILES, T.D.; SANDER, G.E.; NOSSAMAN, B.D.; KADOWITZ, P.J. Impaired vasodilation in the pathogenesis of hypertension: focus on nitric oxide,

endothelial-derived hyperpolarizing factors, and prostaglandins. **Journal of Clinical Hypertension (Greenwich)**;14(4):198-205, 2012.

GOLETIANI, N. V.; KEITH, D. R.; GORSKY, S. J. Progesterone: Review of safety for clinical studies. **Experimental and Clinical Psychopharmacology**, v. 15, n. 5, p. 427–444, 2007.

GOLDMAN, J.M.; MURR, A. S.; COOPER, R. L. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. **Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 80, n. 2, p. 84–97, 2007.

GOLLASCH, M.; RIED, C.; BYCHKOV, R.; LUFT, F.C.; HALLER, H. K<sup>+</sup> currents in human coronary artery vascular smooth muscle cells. **Circulation research**, 78 676–688, 1996.

GRADY, D. et al., Hormone therapy to prevent disease and prolong life in postmenopausal women. **Annals of Internal Medicine**, v. 117, p. 1016-1037, 1992.

GRAYSON, T.H.; HADDOCK, R.E.; MURRAY, T.P.; WOJCIKIEWICZ, R.J.; HILL, C.E. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor subtypes are differentially distributed between smooth muscle and endothelial layers of rat arteries. **Cell Calcium**, dec;36(6):447-58, 2004.

GRIMES, D. A.; LOBO, R. A. Perspectives on the Women's Health Initiative Trial of Hormone Replacement Therapy. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 101, n. 4, p. 811–814, 2002.

GRODSTEIN, F. et al. Postmenopausal hormone therapy and mortality. **The New England Journal of Medicine**, v. 336, p. 1769-1775, 1997.

KATOUE, M.G; KHAN I; ORIOWO, M.A. Pregnancy-induced modulation of calcium mobilization and down-regulation of Rho-kinase expression contribute to attenuated vasopressin-induced contraction of the rat aorta. **Vascular Pharmacology**, Mar;44(3):170-6, 2006.

KHALIL, R.A. Mechanisms of Vascular smooth muscle contraction in hypertension. High Blood Pressure Council Newsletter. **Spring**, v.2, n.1, 2001.

KOBUCHI, S. et al. Nitric oxide modulation of endothelium-derived hyperpolarizing factor in agonist-induced depressor responses in anesthetized rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 762, p. 26–34, 5 set. 2015.

HATANO, Y et al. The contractile responses of isolated dog cerebral and extracerebral arteries to oxybarbiturates and thiobarbiturates. **Anesthesiology**, v. 71, n. 1, p. 80-86, 1989.

HENDERSON, B.E. et al. Decreased mortality in users of estrogen replacement therapy. **Archives of Internal Medicine**, V. 151, p. 75-78, 1991.

HERMSMEYER, R.K.; THOMPSON, T.L.; POHOST, G.M.; KASKI JC. Cardiovascular effects of medroxyprogesterone acetate and progesterone: a case of mistaken identity? **Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine**, 5(7):387-95, 2008.

KÜHBERGER, E. et al. The role of myoendothelial cell contact in non-nitric oxide-, non-prostanoid-mediated endothelium-dependent relaxation of porcine coronary artery. **British Journal of Pharmacology**, v. 113, n. 4, p. 1289–1294, 1 dez. 1994.

HULLEY, S. et al. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. **JAMA**, v. 280, p. 605-13, 1998.

INGEGNO, M. D. et al. Progesterone receptors in the human heart and great vessels. **Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology**, v. 59, n. 3, p. 353–356, 1988.

JACOBSEN, B.M.; HORWITZ, K.B. Progesterone receptors, their isoforms and progesterone regulated transcription. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 357 18–29, 2012.

JACKSON, W.F. Ion channels and vascular tone. **Hypertension**, jan; 35 (1 Pt 2):173-8, 2000.

JIANG. C.W. et al. Progesterone induces endothelium-independent relaxation of rabbit coronary artery in vitro. **European Journal of Pharmacology**, 211:163–167.17, 1992.

KATSUYAMA, H.; WANG, C. L.; MORGAN, K. G. Regulation of vascular smooth muscle tone by caldesmon. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 21, p.14555-14558, 1992.

KUMAR V; ABBAS A; FAUSTO N. Blood Vessels. 9. ed. In: **Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease**. 2014.

KUO IY, EHRLICH BE. Signaling in muscle contraction. **Cold Spring Harb Perspect Biol.** Feb 2;7(2):a006023, 2015.

KUZNETSOVA, T. Sex differences in epidemiology of cardiac and vascular disease. Sex-Specific Analysis of Cardiovascular Function. Advances in Experimental Medicine and Biology. **Springer-Cham**, v. 1065, p. 61–70, 2018.

LEDOUX, J; WERNER, M.E; BRAYDEN, J.E; NELSON, M.T. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. **Physiology (Bethesda)**, Feb; 21:69-78, 2006.

LEUNG, S. W. S.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent hyperpolarization: age, gender and blood pressure, do they matter? **Acta Physiologica**, v. 219, n. 1, p. 108–123, 2017.

LOBO, R.A. et al. Back to the future: Hormone replacement therapy as part of a prevention strategy for women at the onset of menopause. **Atherosclerosis**, p. 1-9, 2016.

MACLENNAN, A.H. Evidence-based review of therapies at the menopause. International **Journal of Evidence-Based Healthcare**, v. 7, n. 2, p. 112-123, 2009.

MATOBA, T et al. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. **The Journal of clinical investigation**, v. 106, n. 12, p. 1521-1530, 2000.

MATOBA, T.; SHIMOKAWA, H. Hydrogen Peroxide Is an Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor in Animals and Humans. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 92, n. 1, p. 1–6, 2003.

MARCONDES, F K; BIANCHI, F J; TANNO, A P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 4A, p. 609-614, 2002.

MARINKO, M.; NOVAKOVIC, A.; NENEZIC, D. et al. Nicorandil directly and cyclic GMP-dependently opens K<sup>+</sup> channels in human bypass grafts. **Journal of Pharmacological Sciences**. 128 59–64, 2015.

MARTINEZ-LEMUS, L. A. The Dynamic Structure of Arterioles. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 110, n. 1, p. 5–11, 2012.

MENDELSON, M. E.; KARAS, R. H. Molecular and Cellular Basis of Cardiovascular Gender Differences. **Science**, v. 308, n. 5728, p. 1583–1587, 2005.



MENDOZA, J., MELLO, W.C. Influence of progesterone on membrane potential and peak tension of myocardial fibres, **Cardiovascular Research**, v.8, issue 3, p. 352–361, May, 1974.

MINSHALL, R.D. et al. Nongenomic vasodilator action of progesterone on primate coronary arteries. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, n. 2, p. 701–708, 2002.

MOLINARI, C. et al. The Effect of Progesterone on Coronary Blood Flow in Anaesthetized Pigs. **Experimental Physiology**, v. 86, n. 1, p. 101–108, 2001.

MOLLACE, V.; SALVEMINI, D.; ANGGARD, E.; VANE, J. Nitric oxide from vascular smooth muscle cells: regulation of platelet reactivity and smooth muscle cell guanylate cyclase. **British Journal of Pharmacology**, 104:633-8, 1991.

MORI, Y. et al. Effects of endothelium-derived hyperpolarizing factor and nitric oxide on endothelial function in femoral resistance arteries of spontaneously hypertensive rats. **Hypertension research: official journal of the Japanese Society of Hypertension**, v. 29, n. 3, p. 187–95, mar. 2006

MORIKAWA, K. et al. Important role of superoxide dismutase in EDHF-mediated responses of human mesenteric arteries. **J Cardiovasc Pharmacol**, Nov;44(5):552-6, 2004.

MORRISSY, S. et al. Inhibition of apoptosis by progesterone in cardiomyocytes. **Ageing Cell**, 9(5):799-809, 2010.

MOSCA, L.; BARRETT-CONNOR, E.; WENGER N.K. Sex/Gender differences in cardiovascular disease prevention what a difference a decade makes. **Circulation**, v.124, n.19, p. 2145-2154, 2011.

MULVANY, M.J.; HALPERN, W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. **Circulation Research**, v. 41, n. 1, p. 19-26, 1977.

MURPHY, J.G.; KHALIL, R.A. Decreased [Ca (2+)] (i) during inhibition of coronary smooth muscle contraction by 17beta-estradiol, progesterone, and testosterone. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 291, n. 1, p. 44–52, 1999.

NELSON, M.T.; QUAYLE, J.M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. **American Journal of Physiology**, 268: C799–C822, 1995.

NILIUS, B.; DROOGMANS, G. Ion channels and their functional role in vascular endothelium. **Physiological Reviews**, 81: 1415–1459, 2001.

OMAR, H.A.; RAMIREZ, R.; GIBSON, M. Properties of a progesterone-induced relaxation in human placental arteries and veins. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**; 80: 370–373, 1995.

OWMAN, C. et al. Cloning of Human cDNA Encoding a Novel Heptahelix Receptor Expressed in Burkitt's Lymphoma and Widely Distributed in Brain and Peripheral Tissues. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 228, n. 2, p. 285–292, 1996.

OPIE, L. H. **Control of circulation. In: Heart Physiology: From Cell to Circulation.** 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins: 16-41. 2004.

ORSHAL, J. M.; KHALIL, R. A. Gender, sex hormones, and vascular tone. **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 286, p. R233–R249, 2004.

OHASHI, J. et al. Mechanisms for enhanced endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated responses in microvessels in mice. **Circulation Journal**, 76(7):1768-79, 2012.

PANG, Y.; DONG, J.; THOMAS, P. Estrogen signaling characteristics of Atlantic croaker G protein-coupled receptor 30 (GPR30) and evidence it is involved in maintenance of oocyte meiotic arrest. **Endocrinology**, Jul;149(7):3410-26, 2008.

PANG, Y.; DONG, J.; THOMAS, P. Progesterone increases nitric oxide synthesis in human vascular endothelial cells through activation of membrane progesterone receptor- $\alpha$ . **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 308, n. 10, p. E899–E911, 2015.

PEIXOTO, P. et al. GPER agonist dilates mesenteric arteries via PI3K-Akt-eNOS and potassium channels in both sexes. **Life Sciences**, v. 183, p. 21–27, 2017.

PEIXOTO, P. et al. Sex difference in GPER expression does not change vascular relaxation or reactive oxygen species generation in rat mesenteric resistance arteries. **Life Sciences**, v. 211, p. 198–205, 15 out. 2018.

POBURKO, D. et al. Ca<sup>2+</sup> signaling in smooth muscle: TRPC6, NCX and LNats in nanodomains. **Channels (Austin)**, v. 2, n. 1, p. 10-2, 2008 Jan-Feb 2008.

PUTNEY, J.W.JR. A model for receptor-regulated calcium entry. **Cell Calcium**, feb;7(1):1-12, 1986.

RAY, R. et al. Endothelial Nox4 NADPH oxidase enhances vasodilatation and reduces blood pressure in vivo. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 31, n. 6, p. 1368–1376, 2011.

ROSAMOND, W. et al. Heart disease and stroke statistics-2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. **Circulation**, n. 115, v. 6, p. e69–e171, 2007.

ROSSETTI, M. F. et al. Oestrogens and Progestagens: Synthesis and Action in the Brain. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 28, n. 7, p. 1-11, 2016.

ROSSOUW, J.E. et al. Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. **JAMA**, v. 288, p. 321-33, 2002.

ROUVER, W. N. et al. Testosterone replacement therapy prevents alterations of coronary vascular reactivity caused by hormone deficiency induced by castration. **PLOS ONE**, v 10, n. 8, p. e0137111, 2015.

RUBIN, B., SALTER, W.T. The effects of progesterone and some related steroids on the contraction of isolated myocardium. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 105 (4) 443-449, August, 1952.

SANDOO, A. et al. The endothelium and its role in regulating vascular tone. **The Open Cardiovascular Medicine Journal**, v. 4, p. 302–312, 2010.

SANTOS, R. L. et al. Endothelial mediators of 17 beta-estradiol-induced coronary vasodilation in the isolated rat heart. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 4, p. 569–575, abr. 2004.

SANTOS, R. L. et al. Sex differences in the coronary vasodilation induced by 17  $\beta$ -oestradiol in the isolated perfused heart from spontaneously hypertensive rats. **Acta physiologica (Oxford, England)**, v. 200, n. 3, p. 203–10, nov. 2010.

SANTOS, R.L.; CUNHA, T.R.D; GIESEN, J.A.S. Discoveries and advances in the effects of progesterone on the cardiovascular system. **Horizons in world cardiovascular research**. Nova medicine and health New York, p. 1-51, 2021.

SELLES, J. et al. Progesterone and 17-estradiol acutely stimulate nitric oxide synthase activity in rat aorta and inhibit platelet aggregation. **Life Sciences**, v. 69, n. 7, p. 815–827, 2001.

SCARPIN, K. M. et al. Progesterone action in human tissues: regulation by progesterone receptor (PR) isoform expression, nuclear positioning and coregulator expression. **Nuclear Receptor Signaling**, v. 7, p. e009, 2009

SCHENKEL, P.C. et al. Catalase Influence in the Regulation of Coronary Resistance by Estrogen: Joint Action of Nitric Oxide and Hydrogen Peroxide. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2014, 2014.

SCHNEIDER, M.A.; DAVIES, M.C.; HONOUR, J.W. The timing of placental competence in pregnancy after oocyte donation. **Fertility and Sterility**, v. 59, n. 5, p. 1059–1064, 1993.

SHIMOKAWA, H. et al. The Importance of the Hyperpolarizing Mechanism Increases as the Vessel Size Decreases in Endothelium-Dependent Relaxations in Rat Mesenteric Circulation. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 28, n. 1, p. 703–711, 1996.

SHIMOKAWA, H.; MORIKAWA, K. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in animals and humans. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 39, n. 5, p. 725–732, 2005.

SILVA, J. F. et al. Mechanisms of vascular dysfunction in acute phase of Trypanosoma cruzi infection in mice. **Vascular Pharmacology**, v. 82, p. 73–81, 2016.

SILVA, B. R. et al. Endothelial nitric oxide synthase and cyclooxygenase are activated by hydrogen peroxide in renal hypertensive rat aorta. **European Journal of Pharmacology**, v. 814, n. March, p. 87–94, 2017.

SILVA, G. C et al. Mechanism of the antihypertensive and vasorelaxant effects of the flavonoid tiliroside in resistance arteries. **Planta Medica**, aug;79(12):1003-8, 2013.

SIMONCINI, T., et al. Differential signal transduction of progesterone and medroxyprogesterone acetate in human endothelial cells. **Endocrinology**, 145(12):5745-56, 2004.

SMITH, J. L. et al. Heterologous expression of human mPR $\alpha$ , mPR $\beta$  and mPR $\gamma$  in yeast confirms their ability to function as membrane progesterone receptors. **Steroids**, v. 73, n. 11, p. 1160–1173, 2008.

STAMPFER, M.J. et al. Estrogen replacement therapy and coronary heart disease: a quantitative assessment of the epidemiologic evidence. **Preventive Medicine**, v. 20, n. 1, p. 47-63, 1991.

STANCZYK, F.Z.; HENZL, M.R. Use of the name "Progestin". **Contraception**, 64(1):1-2, 2001.

TAKADA, Y. et al. Cloning of cDNAs Encoding G Protein-Coupled Receptor Expressed in Human Endothelial Cells Exposed to Fluid Shear Stress. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 240, n. 3, p. 737–741, 1997.

TANG, Y.T. et al. PAQR Proteins: A Novel Membrane Receptor Family Defined by an Ancient 7-Transmembrane Pass Motif. **Journal of Molecular Evolution**, v. 61, n. 3, p. 372–380, 2005.

TSAI, M.; MALLEY, B.W.O. Molecular Mechanisms of action of Steroid/Thyroid receptor superfamily members. **Annual Review of Biochemistry**, 63 451–486, 1994.

TSANG, S.Y. et al. Contribution of K<sup>+</sup> channels to relaxation induced by 17β-estradiol but not by progesterone in isolated rat mesenteric artery rings. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, 41(1):4-13, 2003.

TAYLOR, S.; WESTON, A. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a new endogenous inhibitor from the vascular endothelium. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 9, n. 8, p. 272–274, 1988.

TENNANT, M.; MCGEACHIE, J. K. Blood Vessel Structure and Function: A Brief Update on Recent Advances. **ANZ Journal of Surgery**, v. 60, n. 10, p. 747–753, 1990.

THOMAS, P. et al. Identity of an Estrogen Membrane Receptor Coupled to a G Protein in Human Breast Cancer Cells. **Endocrinology**, v. 146, n. 2, p. 624–632, 2005.

THOMAS P. Characteristics of membrane progesterin receptor alpha (mPR $\alpha$ ) and progesterone membrane receptor component one (PGRMC1) and their roles in mediating rapid progesterin actions. **Frontiers in Neuroendocrinology**, 29, 292–312, 2008.

THOMAS, P. et al. Steroid and G Protein Binding Characteristics of the Seatrout and Human Progesterin Membrane Receptor  $\alpha$  Subtypes and Their Evolutionary Origins. **Endocrinology**, v. 148, n. 2, p. 705–718, 2007.

THOMAS, P., PANG, Y. Protective actions of progesterone in the cardiovascular system: potential role of membrane progesterone receptors (mPRs) in mediating rapid effects. **Steroids**, 78(6):583-8, 2013.

THOMPSON, J.; KHALIL, R. A. Gender differences in the regulation of vascular tone. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 30, n. 1–2, p. 1–15, 2003.

VAN ZWIETEN, P.A.; VAN MEEL, J.C.; TIMMERMANS, P.B. Pharmacology of calcium entry blockers: interaction with vascular alpha-adrenoceptors. **Hypertension**, Jul-Aug;5(4 Pt 2): 118-17 1983.

VANHOUTTE, P. M. et al. Endothelial dysfunction and vascular disease – a 30th anniversary update. **Acta Physiologica**, v. 219, n. 1, p. 22–96, 2017.

VÁZQUEZ, F. et al. Progesterone regulates proliferation of endothelial cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 4, p. 2185–92, 1999.

WANG, G.J. et al. Ca<sup>2+</sup> channel blocking effect of iso-S-petasin in rat aortic smooth muscle cells. **European Journal of Pharmacology**, jun 12;445(3):239-45, 2002.

WEBB, R.C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in Physiology Education**, V. 27, n. 4, p. 201-206, 2003.

WHARTON, W. et al. Rationale and design of the Kronos Early Estrogen Prevention Study (KEEPS) and the KEEPS cognitive and affective sub study (KEEPS Cog). **Brain Research**, v. 1514, p. 12–17, 13 jun. 2013.

WHIDDEN, M.A.; BASGUT, B.; KIRICHENKO, N.; ERDOS, B.; T€UMER, N. Altered potassium ATP channel signaling in mesenteric arteries of old high salt-fed rats. **Journal of exercise nutrition & biochemistry**, 20 58–64, 2016.

WHO, World Health Organization. **Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control**. Geneva, 2011.

WHO, World Health Organization. **Cardiovascular diseases (CVDs)**. 2017. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-cvds>>. Acesso em: 14 de junho de 2020.

WINTERSTEINER, O.; ALLEN, W.M. Crystalline progestin. **Science**, 24;80(2069):190-1, 1934, 1934.

WONG, P. S.; RANDALL, M. D.; ROBERTS, R. E. Sex differences in the role of NADPH oxidases in endothelium-dependent vasorelaxation in porcine isolated coronary arteries. **Vascular Pharmacology**, v. 72, p. 83–92, 2015.

XIU, F. et al. High Physiological Concentrations of Progesterone Reverse Estradiol1Mediated Changes in Differentiation and Functions of Bone Marrow Derived Dendritic Cells. **PLOS ONE**, v. 11, n. 4, p. e0153304, 2016.

YAFFE, K. et al. Estrogen therapy in postmenopausal women: effects on cognitive function and dementia. **JAMA**, v. 279, p. 688-695, 1998.

YANG, X.P.; RECKELHOFF, J.F. Estrogen, hormonal replacement therapy and cardiovascular disease. **Current opinion in nephrology and hypertension**, v. 20, n. 2, p. 133-138, 2011.

YOU, Y. et al. Progesterone promotes endothelial nitric oxide synthase expression through enhancing nuclear progesterone receptor-SP-1 formation. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, 1;319(2):H341-H348, 2020.

ZHANG, H.; DU, Y.; CHOBANIAN, A.V.; BRECHER, P. Adventitia as a source of inducible nitric oxide synthase in the rat aorta. **American Journal of Hypertension**, 12, 467–475, 1999.

ZHANG, Y. et al. Effects of sex hormones on action potential and contraction of guinea pig papillary muscle. **Acta Pharmacologica Sinica**, 19(3), 1998.

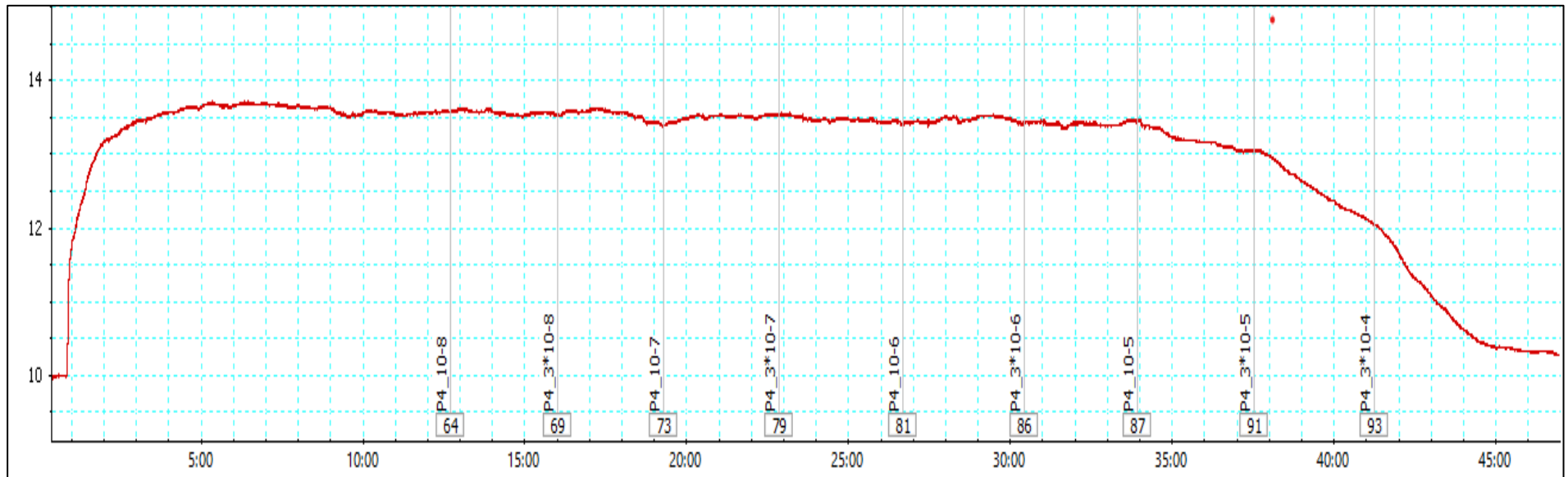
ZHAO, W. et al. The vasorelaxant effect of H<sub>2</sub>S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener. **EMBO Journal**, v. 20, n. 21, p. 6008–6016, 1 nov. 2001.

# APÊNDICE

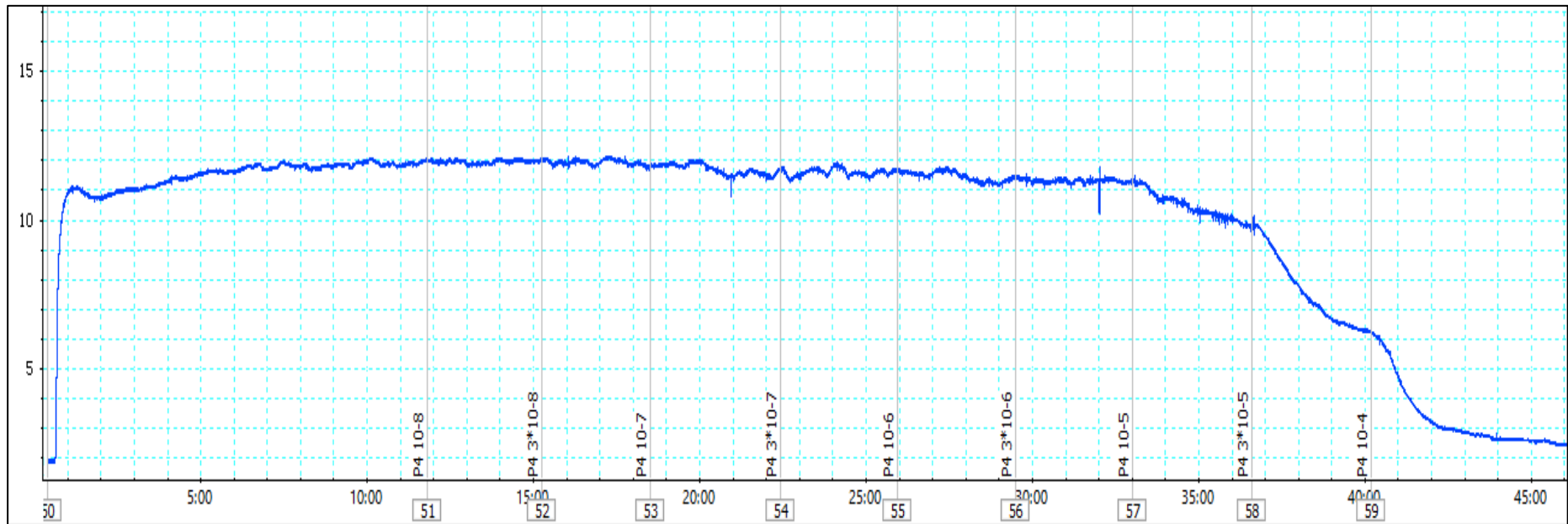




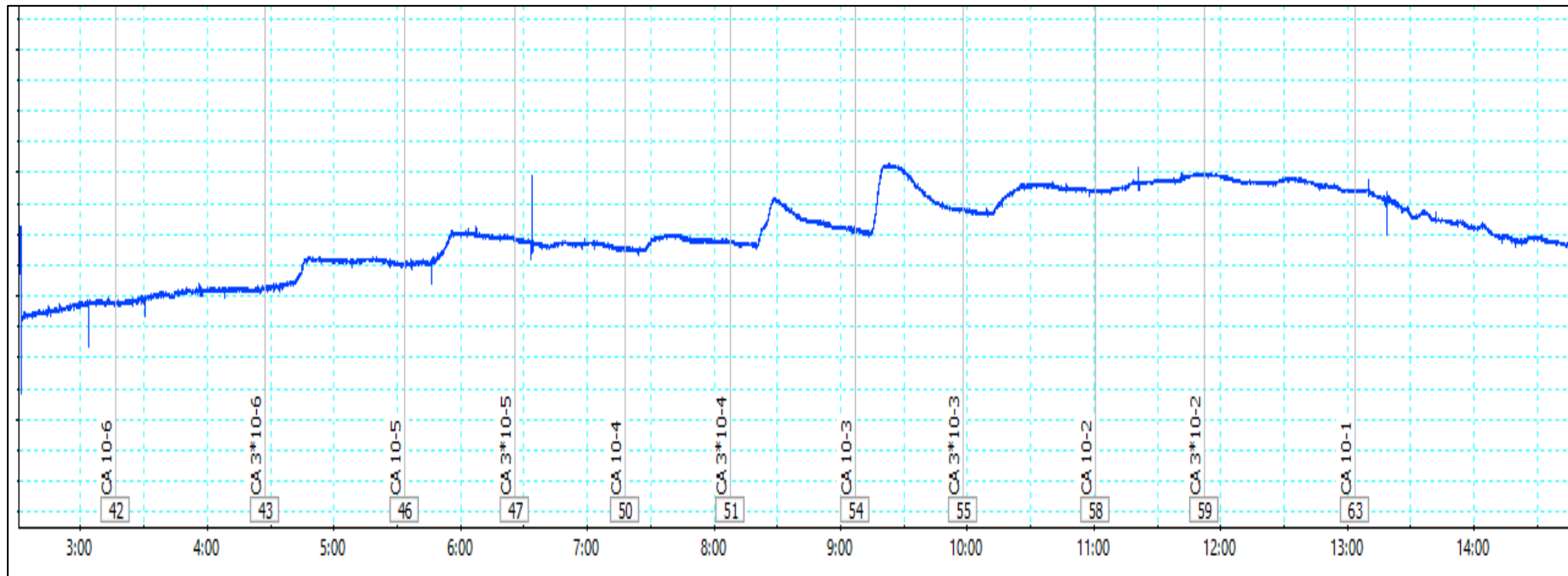
**APÊNDICE A - REGISTRO TÍPICO DA CURVA DE RELAXAMENTO INDUZIDA PELA PROGESTERONA EM ARTÉRIA MESENTÉRICA DE RESISTÊNCIA EM FÊMEA**



**APÊNDICE B - REGISTRO TÍPICO DA CURVA DE RELAXAMENTO INDUZIDA PELA PROGESTERONA EM ARTÉRIA MESENTÉRICA DE RESISTÊNCIA EM MACHO**



**APÊNDICE C - REGISTRO TÍPICO DA CURVA DE CONTRAÇÃO POR CONCETRAÇÕES CUMULATIVA DE  $\text{CaCl}_2$  EM ARTÉRIA MESENTÉRICA DE RESISTÊNCIA EM FÊMEA**



**APÊNDICE D - REGISTRO TÍPICO DA CURVA DE CONTRAÇÃO POR CONCETRAÇÕES CUMULATIVA DE  $\text{CaCl}_2$  EM ARTÉRIA MESENTÉRICA DE RESISTÊNCIA EM MACHO**

