

**AÇÃO MODULADORA DA TIBOLONA NO SISTEMA DE  
PEPTÍDEOS NATRIURÉTICOS: IMPLICAÇÕES  
CARDIOVASCULARES E IMUNOLÓGICAS**

**ANA RAQUEL SANTOS DE MEDEIROS GARCIA**

**TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

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

**Vitória, ES Novembro de 2010**

**ANA RAQUEL SANTOS DE MEDEIROS GARCIA**

**AÇÃO MODULADORA DA TIBOLONA NO SISTEMA DE  
PEPTÍDEOS NATRIURÉTICOS: IMPLICAÇÕES  
CARDIOVASCULARES E IMUNOLÓGICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da  
Universidade Federal do Espírito Santo, para obtenção do título de Doutor.

**Orientadora**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nazaré Souza Bissoli

**Co-Orientador**

Prof. Dr. Tadeu Uggere de Andrade

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

**Vitória, ES Novembro de 2010**

***Garcia, Ana Raquel Santos de Medeiros, 2010***

Ação moduladora da tibolona no sistema de peptídeos natriuréticos: implicações cardiovasculares e imunológicas. Ana Raquel Santos de Medeiros – Vitória, novembro de 2010, 132 p.

Tese de Doutorado – Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nazaré Souza Bissoli

1.Tibolona 2.Peptídeo natriurético atrial 3.Citocinas 4.Reatividade vascular

**AÇÃO MODULADORA DA TIBOLONA NO SISTEMA DE PEPTÍDEOS  
NATRIURÉTICOS: IMPLICAÇÕES CARDIOVASCULARES E  
IMUNOLÓGICAS**

**ANA RAQUEL SANTOS DE MEDEIROS GARCIA**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em \_\_\_/\_\_\_/2010.

---

Profª Drª Adelina Martha dos Reis  
Departamento de Fisiologia e Biofísica do  
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

---

Profª Drª Giovanna Assis Pereira Boechät  
Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas - UVV

---

Profª Drª Alessandra Simão Padilha  
Departamento de Ciências Fisiológicas - UFES

---

Prof. Dr. Tadeu Uggere de Andrade (Co-orientador)  
Departamento de Ciência Farmacêuticas UFES

---

Profª Drª Nazaré Souza Bissoli (Orientadora)  
Departamento de Ciências Fisiológicas - UFES

---

Prof Dr Luiz Carlos Shenberg  
Coordenador do PPGCF-UFES

Universidade Federal do Espírito Santo  
**Vitória, novembro de 2010**

*"Enquanto estiver vivo, sinta-se vivo. Se sentir saudades do que fazia, volte a fazê-lo. Não viva de fotografias amareladas... Continue, quando todos esperam que desistas. Não deixe que enferruje o ferro que existe em você. Faça com que em vez de pena, tenham respeito por você. Quando não conseguir correr através dos anos, trote. Quando não conseguir trotar, caminhe. Quando não conseguir caminhar, use uma bengala."*

*Madre Teresa de Calcutá*

*Dedico este trabalho  
àqueles que me  
proporcionaram  
conhecimento, em especial  
meus pais e minha  
orientadora.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus criador que me fortalece todos os dias nessa longa caminhada da vida. Não esquecendo da mãe de Jesus por quem intercedo e me acolhe em todos os momentos.

Aos meus pais, Luiz Gonzaga e Aparecida, que souberam encaminhar meus irmãos e eu aos estudos, acompanhando e incentivando a conquista de cada grau. Aos meus irmãos, Rodolfo e Lygia, e ao meu sobrinho querido Gabriel, pelas horas de descontração e companheirismo.

Ao meu marido que esteve comigo em todos os instantes, desde a graduação até mais essa vitória. Obrigada pela dedicação, amor e carinho.

À Profª Drª Nazaré Souza Bissoli, por mais de oito anos de convivência. As páginas dessa tese não dariam para expressar o quanto sou agradecida pela oportunidade de ser sua aluna. Com você apreendi muito mais do que os conhecimentos acadêmicos e levo comigo um pouco dos seus ensinamentos para minha vida pessoal e profissional. Obrigada pela paciência e pelo convívio. Obrigada pela dedicação ao seu trabalho que tem proporcionado oportunidades, não só a mim, mas a todos seus alunos. MUITO OBRIGADA!!!

Ao Prof. Dr. Tadeu Uggere Andrade, que vem me orientando desde a iniciação científica e por fazer parte de mais essa etapa. Obrigada Tadeu pelo carinho e amizade.

À Profª Drª Adelina Martha dos Reis que me recebeu gentilmente em seu laboratório e me permitiu realizar parte do protocolo experimental proposto neste estudo.

À Luciana Barbosa Firmes pelo acolhimento e dedicação. Obrigada Luciana pela amizade e paciência que teve comigo na UFMG. Agradeço também a Janine e a todos os outros colegas do laboratório pela ajuda e momentos de descontração.

Às professoras Drª Margareth, Drª Gláucia e Drª Sônia pela disposição em ajudar sempre que precisei.

À Profª Drª Elenice Moreira Lemos, que foi minha professora na graduação, que também me auxiliou nessa tese permitindo acesso em seu laboratório.

Aos professores Dr<sup>a</sup> Márcia e Dr. Hélder por me auxiliar nos procedimentos de reatividade vascular, sempre dispostos a ajudar.

Ao Prof. Dr. Jones pelo auxílio na técnica de *western blotting* e momentos de descontração.

À Aline pela amizade e parceria em todas as fases desse trabalho.

Aos amigos do laboratório de hipertensão experimental Poliana, Elaine, Luciane, João Vicente, Leonardo, Pablo, Pablo Gava e Hélio pelos momentos de convivência e cumplicidade.

Às alunas de iniciação científica Isabela e Poliana pela dedicação, paciência e momentos de descontração. Obrigada meninas!

Ao amigo Marcos pelo auxílio na reta final desta tese, a quem tenho muito carinho.

Ao Patrick pelo convívio alegre e pela ajuda, principalmente, lá na UFMG.

Aos alunos do programa que me auxiliaram neste trabalho e pelas conversas nos intervalos para descanso Rogério, Fabiana, Eduardo F., Eduardo, Edna, Fernanda, Walckiria e Washington.

Aos meus amigos Danielle, Danielly e José Venícios pela torcida, apoio e também pelas risadas.

A todos os professores deste Programa de Pós-Graduação.

A equipe de secretaria, Fonseca e Cláudia, pela atenção dispensada nos momentos que os procurei.

Aos funcionários Édson e Marildo pelo apoio técnico dispensado para execução deste estudo.



A todos os meus mestres da graduação do curso de Farmácia e Bioquímica da UFES que com certeza contribuíram para esse momento.

À todos aqueles que, neste instante não recordo, mas que somaram para tornar possível esse momento.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
Lista de tabelas.....	10
Lista de figuras.....	12
Lista de abreviaturas e/ou siglas.....	15
<b>RESUMO.....</b>	<b>17</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>19</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
1.1 DOENÇA CARDIOVASCULAR (DCV) E DEFICIÊNCIA ESTROGÊNICA.....	21
1.2 SISTEMA IMUNOLÓGICO E DEFICIÊNCIA ESTROGÊNICA.....	22
1.3 PEPTÍDEOS NATRIURÉTICOS.....	25
1.4 ESTROGÊNIO.....	29
1.5 TIBOLONA.....	34
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>38</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	38
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	39
3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	39
3.3 OVARECTOMIA.....	40
3.4 TRATAMENTOS HORMONAIS.....	40
3.5 REGISTROS HEMODINÂMICOS.....	41
3.6 PESO CORPORAL E RAZÃO DE PESO SECO PELO PESO CORPORAL DO ÚTERO, DAS CÂMARAS CARDÍACAS E DOS RINS.....	41
3.7 DOSAGEM DE ANP E DE NPR.....	42
<b>3.7.1 Iodação de ANP.....</b>	<b>43</b>
<b>3.7.2 Radioimunoensaio para ANP.....</b>	<b>43</b>
<b>3.7.3 Dosagem de proteína total.....</b>	<b>43</b>
<b>3.7.4 Análise de RNA.....</b>	<b>44</b>
3.7.4.a Extração de RNAm.....	44

3.7.4.b Síntese do DNA complementar (cDNA) - transcrição reversa.....	45
3.7.4.c Reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real time - PCR).....	45
3.8 DOSAGEM DE CITOCINAS SÉRICAS.....	47
3.9 DOSAGEM DA EXPRESSÃO PROTÉICA DA eNOS.....	48
3.10 REATIVIDADE VASCULAR EM ANÉIS DE AORTA ISOLADO.....	50
3.11 EXCREÇÃO DE SÓDIO E VOLUME URINÁRIO.....	51
3.12 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	52
<b>3.12.1 Bloco A.....</b>	<b>52</b>
<b>3.12.2 Bloco B.....</b>	<b>52</b>
3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>54</b>
4.1 PESO CORPORAL E RAZÃO DE PESO SECO PELO PESO CORPORAL DO ÚTERO, DAS CÂMARAS CARDÍACAS E DOS RINS.....	54
4.2 TRATAMENTO COM 17 $\beta$ -ESTRADIOL OU TIBOLONA E DADOS HEMODINÂMICOS.....	57
4.3 TRATAMENTO COM 17 $\beta$ -ESTRADIOL OU TIBOLONA SOBRE O SISTEMA DE PEPTÍDEOS NATRIURÉTICOS.....	57
4.4 TRATAMENTO COM 17 $\beta$ -ESTRADIOL OU TIBOLONA SOBRE AS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS.....	62
4.5 REATIVIDADE VASCULAR E EXPRESSÃO DA eNOS EM ANÉIS DE AORTA.....	64
4.6 AVALIAÇÃO DA EXCREÇÃO DE SÓDIO E VOLUME URINÁRIO.....	69
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>71</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>100</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>102</b>

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1:</b> Peso corporal das fêmeas em gramas (g) observados no 1 <sup>o</sup> (peso inicial), 21 <sup>o</sup> (peso de início dos tratamentos) e 35 <sup>o</sup> (peso final) dias do protocolo experimental dos grupos SHAM, ovariectomizadas (OVX), ovariectomizadas tratadas com 17 $\beta$ -estradiol (EST) e ovariectomizadas tratadas com tibolona (TIB).	54
<b>Tabela 2:</b> Razão de peso seco (RPS) do útero, átrio direito e esquerdo, ventrículo direito e esquerdo, rim direito e esquerdo pelo peso corporal (PC, mg/g) dos grupos SHAM, ovariectomizadas (OVX), ovariectomizadas tratadas com 17 $\beta$ -estradiol (EST) e com tibolona (TIB).	56
<b>Tabela 3:</b> Pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) dos grupos SHAM, ovariectomizadas (OVX), ovariectomizadas tratadas com 17 $\beta$ -estradiol (EST) ou com tibolona (TIB).	57
<b>Tabela 4:</b> Dosagens do conteúdo de peptídeo natriurético atrial (ANP) no átrio direito (AD) e esquerdo (AE) em $\mu$ g/mg de proteína total (Prot) e dos níveis do RNAm para o ANP no AD e AE em unidades arbitrárias (UA) através da técnica de PCR real time dos grupos SHAM, ovariectomizadas (OVX), ovariectomizadas tratadas com 17 $\beta$ -estradiol (EST) e com tibolona (TIB).	59
<b>Tabela 5:</b> Níveis renais de RNAm do receptor de ANP do tipo A (NPR-A) e do tipo C (NPR-C) em unidades arbitrárias (UA) através da técnica de PCR real time dos grupos SHAM, ovariectomizadas (OVX), ovariectomizadas tratadas com 17 $\beta$ -estradiol (EST) ou com tibolona (TIB).	61
<b>Tabela 6:</b> Marcadores da Inflamação. O impacto da terapia hormonal nas fêmeas SHAM, ovariectomizadas (OVX), ovariectomizadas tratadas com 17 $\beta$ -estradiol (EST) ou tibolona (TIB) sobre os níveis de IL-6 e TNF- $\alpha$ .	63

**Tabela 7:** Valor da resposta máxima ( $E_{máx}$ ) e do log da concentração da droga para produzir 50% da resposta máxima ( $pD_2$ ) nos anéis de aorta em resposta a injeções de concentrações crescentes de fenilefrina (Phe) nos grupos SHAM, ovariectomizada (OVX), OVX tratadas com  $17\beta$ -estradiol (EST) ou OVX tratada com tibolona (TIB).

66

**Tabela 8:** Valor da resposta máxima ( $E_{máx}$ ) e do log da concentração da droga para produzir 50% da resposta máxima ( $pD_2$ ) nos anéis de aorta em resposta a administração de concentrações crescentes de acetilcolina (Ach) nos grupos SHAM, ovariectomizada (OVX), OVX tratada com  $17\beta$ -estradiol (EST) ou OVX tratada com Tibolona (TIB).

67

**Tabela 9:** Valores médios da excreção de sódio (mEq/l) e volume urinário (ml) dos grupos SHAM, ovariectomizadas (OVX), ovariectomizadas tratadas com  $17\beta$ -estradiol (EST) ou com tibolona (TIB).

69

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<p><b>Figura 1:</b> Resposta das células Th1 e Th2 pelo estímulo de células T CD4<sup>+</sup> e a liberação de citocinas. Linhas contínuas indicam estimulação da via, linhas pontilhadas indicam inibição. APC: célula apresentadora de antígeno. MHC II: Complexo principal de histocompatibilidade classe II.</p>	23
<p><b>Figura 2:</b> Estrutura molecular dos peptídeos natriuréticos.</p>	26
<p><b>Figura 3.</b> Receptores de membrana dos peptídeos natriuréticos do tipo A (NPR-A) e tipo C (NPR-C).</p>	28
<p><b>Figura 4:</b> Envolvimento do TNF-<math>\alpha</math> na disfunção endotelial. AA: ácido araquidônico</p>	33
<p><b>Figura 5:</b> Peso corporal das fêmeas em gramas (g) observado no 1<sup>o</sup> (peso inicial), 21<sup>o</sup> (peso de início dos tratamentos) e 35<sup>o</sup> (peso final) dias do protocolo experimental dos grupos SHAM, ovariectomizadas (OVX), ovariectomizadas tratadas com 17<math>\beta</math>-estradiol (EST) e ovariectomizadas tratadas com tibolona (TIB).</p>	55
<p><b>Figura 6:</b> Razão de peso seco (RPS) do útero pelo peso corporal (PC, mg/g) dos grupos SHAM, ovariectomizadas (OVX), ovariectomizadas tratadas com 17<math>\beta</math>-estradiol (EST) ou com tibolona (TIB).</p>	56
<p><b>Figura 7:</b> Valores dos níveis plasmáticos de ANP (pg/ml) nos grupos SHAM (n=5), ovariectomizadas (OVX, n=6), ovariectomizadas tratadas com 17<math>\beta</math>-estradiol (EST, n=7) e com tibolona (TIB, n=5).</p>	28
<p><b>Figura 8:</b> Conteúdo de ANP do átrio direito (AD - A) e átrio esquerdo (AE - B) em <math>\mu</math>g/mg de proteína (<math>\mu</math>g/mg de prot) dos grupos SHAM, ovariectomizadas (OVX), ovariectomizadas tratadas com 17<math>\beta</math>-estradiol (EST) ou tratadas com tibolona (TIB).</p>	60

**Figura 9:** Níveis do RNAm do ANP no AE em unidades arbitrárias (UA) através da técnica de PCR real time dos grupos SHAM, ovariectomizadas (OVX), ovariectomizadas tratadas com 17 $\beta$ -estradiol (EST) ou com tibolona (TIB). 61

**Figura 10:** Níveis renais de RNAm do receptor de ANP do tipo A (NPR-A; A) e do tipo C (NPR-C; B) em unidades arbitrárias (UA) através da técnica de PCR real time dos grupos SHAM, ovariectomizadas (OVX), ovariectomizadas tratadas com 17 $\beta$ -estradiol (EST) ou com tibolona (TIB). 62

**Figura 11:** Valores dos níveis séricos de IL-6 (A) e TNF- $\alpha$  (B) em pg/ml dos grupos SHAM, ovariectomizadas (OVX), ovariectomizadas tratadas com 17 $\beta$ -estradiol (EST) ou tratadas com tibolona (TIB). 64

**Figura 12:** Curva de concentração dose-resposta à fenilefrina (Phe) em anéis de aorta com endotélio intacto obtido a partir de ratas SHAM, ovariectomizadas (OVX), OVX tratada com 17 $\beta$ -estradiol (EST) ou OVX tratada com tibolona (TIB). 65

**Figura 13:** Curva de concentração dose-resposta à acetilcolina (Ach) em anéis de aorta com endotélio intacto obtido a partir de ratas SHAM, ovariectomizadas (OVX), OVX tratada com 17 $\beta$ -estradiol (EST) ou OVX tratada com Tibolona (TIB). 67

**Figura 14:** Expressão de óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) no segmento de aorta torácica superior em unidades arbitrárias (UA) dos grupos SHAM (n=6), Ovariectomizada (OVX, n=6), OVX tratada com 17 $\beta$ -estradiol (EST, n=6) ou OVX tratada com Tibolona (TIB, n=6) através da técnica de *Western Blotting*. 68

**Figura 15:** Valores médios do volume urinário (ml) diário, dos grupos SHAM, ovariectomizadas (OVX), ovariectomizadas tratadas com 17 $\beta$ -estradiol (EST) ou com tibolona (TIB). 70

**Figura 16:** Valores médios da excreção de sódio (mEq/l) diário, dos grupos 70

SHAM, ovariectomizadas (OVX), ovariectomizadas tratadas com  $17\beta$ -estradiol (EST) ou com tibolona (TIB).

**Figura 17:** Mecanismo inibitório do ANP sobre o TNF- $\alpha$  via NF- $\kappa$ B. 87

**Figura 18:** Os mecanismos pelos qual o tratamento com estradiol (E2) atenua a via de sinalização pró-inflamatória. TNF- $\alpha$ , fator de necrose tumoral alfa; I $\kappa$ B $\beta$ , proteína I $\kappa$ apaB; IKK, complexo I $\kappa$ apaB quinase; NF- $\kappa$ B, fator nuclear  $\kappa$ apaB; JNK, c-jun N-terminal quinase . 88

**Figura 19:** Mecanismo proposto para ação inibitória do ANP,  $17\beta$ -estradiol (E2) e da tibolona (TI) sobre o TNF- $\alpha$  via NF- $\kappa$ B e modulação do E2 e da TI sobre a síntese e liberação de ANP pelo coração. 89

**Figura 20:** Principais efeitos dos hormônios esteróides nas células imunes. 91



## LISTA DE ABREVIATURAS E/OU SIGLAS

AD: Átrio direito  
AE: Átrio esquerdo  
Ang II: Angiotensina II  
ANP: Peptídeo natriurético atrial  
AT1: Receptores de angiotensina tipo I  
AT2: Receptores de angiotensina tipo II  
BNP: Peptídeo natriurético tipo B  
CNP: Peptídeo natriurético tipo C  
DVC: Doença cardiovascular  
EDHF: Fator hiperpolarizante derivado do endotélio  
FC: Frequência cardíaca  
GMPc: Monofosfato de guanosina cíclico  
IL-6: Interleucina-6  
PA: Pressão Arterial  
PAD: Pressão arterial diastólica  
PAM: Pressão Arterial Média  
NO: Óxido nítrico  
NOS: óxido nítrico sintase  
eNOS: óxido nítrico sintase endotelial  
iNOS: óxido nítrico sintase induzível  
NPR: Receptor de peptídeo natriurético  
NPR-A: Receptor de peptídeo natriurético tipo A  
NPR-B: Receptor de peptídeo natriurético tipo B  
NPR-C: Receptor de peptídeo natriurético tipo C  
PGI<sub>2</sub>: Prostaciclina  
RE: Receptor de estrogênio  
RE $\alpha$ : Receptor de estrogênio subtipo alfa  
RE $\beta$ : Receptor estrogênio subtipo beta  
RP: Receptor de progesterona  
RNAm: Ácido ribonucléico mensageiro  
SRA: Sistema renina angiotensina  
SRAA: Sistema renina angiotensina aldosterona  
VD: Ventrículo direito

VE: Ventrículo esquerdo

TH: Terapia hormonal

TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral alfa

## RESUMO

Alterações deletérias no sistema cardiovascular e imunológico são encontradas em fêmeas com deficiência estrogênica, porém, é questionado se os estrógenos exógenos possuem a capacidade de anular esses efeitos na pós-menopausa. Assim, estudos que avaliam mecanismos de interação entre o sistema cardiovascular e imunológico com às terapias hormonais são de grande interesse.

Objetivo: determinar alterações no sistema de peptídeos natriuréticos e relacioná-las com parâmetros cardiovasculares e imunológicos em ratas ovariectomizadas e tratadas com tibolona.

Materiais e Métodos: foram utilizadas fêmeas Wistar com peso corporal entre 160 a 180 g, divididos em 4 grupos (n=7): SHAM, Ovariectomizada (OVX), OVX tratadas com 17 $\beta$ -estradiol (EST) e OVX tratadas com tibolona (TIB). O tratamento foi realizado por 14 dias com TIB (1,5 $\mu$ g/Kg/dia) e EST (0,5 $\mu$ g/Kg/dia), após 21 dias decorridos do processo de ovariectomia. Ao final do tratamento, animais foram sacrificados, a aorta torácica foi isolada e foram retirados anéis de 4 a 5 mm. Os anéis íntegros, com endotélio, foram montados em cuba para órgão isolado com solução de Krebs para obtenção de curvas dose-resposta à fenilefrina (PHE) e à acetilcolina (ACH) para avaliação da reatividade vascular. Segmento da aorta torácica superior foi utilizado para análise da expressão protéica de eNOS através de Western Blotting. Os rins, átrios e sangue foram coletados para as demais análises. Níveis plasmáticos de peptídeo natriurético atrial (ANP) foram dosados por radioimunoensaio (RIA) e níveis séricos de citocinas (IL- 6 e TNF- $\alpha$ ) por ELISA. Os átrios foram retirados para análise do ANP atrial por RIA e RNAm do ANP por RT-PCR. Os rins foram utilizados para análise de RNAm de receptor tipo A (NPR-A) e C (NPR-C) por RT-PCR. Os dados foram apresentados como média  $\pm$  EPM. Para análise estatística da reatividade dos anéis de aorta foi realizada por análise de variância (ANOVA), uma e/ou duas vias, seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey. Na análise dos dados do sistema de peptídeos foi efetuada análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls e para eNOS análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste *post hoc* de Fisher. Os níveis de significância estabelecidos foram  $p < 0,05$ .

Resultados: O grupo OVX apresentou aumento da resposta contrátil a PHE comparado ao grupo SHAM, contudo, os grupos EST e TIB foram capazes de normalizar esta resposta (Em<sub>ax</sub> - SHAM:  $91,0 \pm 3,9$ ; OVX:  $140,0 \pm 5,5$ ; EST:  $115,4 \pm 3,7$ ; TIB:  $113,2 \pm 5,1$  - % tensão). O relaxamento dependente do endotélio (curvas dose-resposta à ACH) foi similar para todos os grupos. Os animais OVX e os grupos EST e TIB não apresentaram diferença nos níveis de expressão protéica de eNOS comparados ao grupo SHAM, contudo, os níveis séricos de citocinas IL-6 e TNF- $\alpha$  estavam aumentadas nas fêmeas ovariectomizadas. Já os tratamentos com EST e TIB foram capazes de diminuir esses níveis comparados ao do grupo SHAM, exceto os níveis de IL-6 que permaneceram altos no grupo TIB (TNF- $\alpha$ : SHAM  $20.3 \pm 2.0$ ; OVX  $31.0 \pm 5.0$ ; EST  $17.6 \pm 2.0$ ; TIB:  $20.5 \pm 3.1$ / IL-6: SHAM  $19.3 \pm 6.0$ ; OVX  $32.8 \pm 5.0$ ; EST  $20.0 \pm 3.0$ ; TIB:  $34.4 \pm 2.8$  pg/ml). Em relação ao sistema de peptídeos natriuréticos a ovariectomia deprimiu os níveis de ANP plasmático e atrial esquerdo (ANP plasmático: SHAM  $263.3 \pm 53.3$ ; OVX  $92.5 \pm 19.5$ ; EST  $247.3 \pm 29.9$ ; TIB:  $285.7 \pm 60.4$  pg/ml /ANP atrial esquerdo: SHAM  $5.68 \pm 0.35$ ; OVX  $3,48 \pm 0,40$ ; EST  $6.48 \pm 0.97$ ; TIB:  $3.59 \pm 0.25$   $\mu$ g/mg de proteína); a expressão de RNAm do ANP atrial esquerdo (SHAM  $91.3 \pm 4.4$ ; OVX  $40.0 \pm 10.1$ ; EST  $122.3 \pm 12.0$ ; TIB:  $167.9 \pm 25.7$  UA) e NPR-A (SHAM  $12.00 \pm 5.20$ ; OVX  $0.68 \pm 0.11$ ; EST  $0.92 \pm 0.28$ ; TIB:  $2.04 \pm 1.04$  UA), mas não alterou NPR-C. Os tratamentos normalizaram esses parâmetros, exceto, o grupo TIB que não normalizou os níveis de ANP atrial.

Conclusão: Estes dados evidenciam de modo inédito a influência da tibolona no sistema de peptídeo natriurético e sobre as citocinas inflamatórias. A tibolona foi capaz de normalizar os níveis de ANP e sua expressão atrial, assim como, reduzir os níveis de TNF- $\alpha$ . Adicionalmente, os resultados mostram que a TH utilizada neste estudo normalizou parcialmente as alterações da reatividade vascular, possivelmente, via regulação do sistema de peptídeo e citocinas inflamatórias.

## ABSTRACT

Cardiovascular and immune system abnormalities have been reported in females with estrogen deficiency. Nevertheless, the capacity of the exogenous estrogen therapy to manage these hazard effects in postmenopausal women is still to be better investigated.

Objective: this study is addressed to determine the abnormalities on the natriuretic peptide system in ovariectomized rats with and without tibolone reposition therapy, and if these changes are or not related with cardiovascular and immunological parameters.

Materials and Methods: female rats with the average weight of 160-180 g were used and divided into four groups (n = 7 per group): SHAM, ovariectomized (OVX), OVX treated with 17 $\beta$ -estradiol (EST) and OVX treated with tibolone (TIB). The treatment period was 14 days with TIB (1.5 mg / kg / day) and EST (0.5 mg / kg / day), after 21 days of the ovariectomy procedure. At the end of treatment, the animals were euthanized, the thoracic aorta was isolated, and rings of 4-5 mm were removed. Rings with endothelium, were placed in an isolated organ tank with Krebs solution. Dose-response curves to phenylephrine (PHE) and acetylcholine (ACH) were obtained for assessment of vascular reactivity. Upper segment of the thoracic aorta was used for analysis of protein expression of eNOS by Western Blotting. The kidneys, the atria and blood were collected for further analysis. Plasma levels of atrial natriuretic peptide (ANP) were measured by radioimmunoassay (RIA) and serum cytokines (IL-6 and TNF- $\alpha$ ) by ELISA. Atria were removed for analysis by RIA of ANP and atrial ANP mRNA by RT-PCR. The kidneys were used for analysis of mRNA of type A receptor (NPR-A) and C (NPR-C) by RT-PCR. Data were presented as mean  $\pm$  standard error of mean. Statistical analysis of the reactivity of aortic rings was performed by analysis of variance (ANOVA), and one or two way, followed by *post-hoc* test of Tukey. For the peptides system data it was performed one-way analysis of variance (ANOVA) followed by *post hoc* Newman-Keuls, and for eNOS it was used one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Fisher's *post hoc* test. Significance levels were  $p < 0,05$ .

Results: the OVX group showed increase of contractile response to PHE compared to the SHAM group, and the TIB and EST groups were able to normalize this response (Emax - SHAM: 91,0  $\pm$  3,9; OVX: 140,0  $\pm$  5,5; EST: 115,4  $\pm$  3,7; TIB: 113,2  $\pm$  5,1 - %

Tension). The endothelium-dependent relaxation (dose-response curves to ACH) was similar for all groups. The OVX, EST and TIB groups showed no difference in the eNOS protein expression compared with the SHAM group, however, serum levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  were increased in ovariectomized females. However, the treatments with EST and TIB were able to decrease these levels compared to the SHAM group, except the levels of IL-6 which remained high in the TIB group (TNF- $\alpha$ : SHAM  $20.3 \pm 2.0$ , OVX  $31.0 \pm 5.0$ ,  $17.6 \pm$  EST  $2.0$ ; TIB:  $20.5 \pm 3.1$  / IL-6: SHAM  $19.3 \pm 6.0$ ,  $32.8 \pm 5.0$  OVX, EST  $20.0 \pm 3.0$ ; TIB:  $34.4 \pm 2.8$  pg / ml). The plasmatic and left atrial levels of ANP (ANP plasma:  $263.3 \pm 53.3$  SHAM, OVX  $92.5 \pm 19.5$ ,  $247.3 \pm 29.9$  EST; TIB:  $285.7 \pm 60.4$  pg / ml / left atrial ANP: SHAM  $5.68 \pm 0.35$ ; OVX  $3.48 \pm 0.40$ ,  $0.97 \pm 6:48$  EST; TIB:  $3.59 \pm 0.25$  mg / mg protein), the mRNA expression of ANP left atrial (SHAM  $91.3 \pm 4.4$ , OVX  $40.0 \pm 10.1$ ;  $122.3 \pm 12.0$  EST; TIB:  $167.9 \pm 25.7$  AU) and NPR-A (SHAM  $5.20 \pm 12:00$ ; OVX  $0.68 \pm 0.11$ ; EST  $0.92 \pm 0.28$ ; TIB:  $2.04 \pm 1.4$  AU) were depressed after ovariectomy, and NPR-C did not change. The treatment normalized these parameters, except that the TIB group did not normalize the levels of atrial ANP.

Conclusion: data from this study show, for the first time, that tibolone treatment after ovariectomy influence the natriuretic peptide system and the inflammatory cytokines. Tibolone was able to normalize the levels of ANP and its atrial expression as well as reduce levels of TNF- $\alpha$ . Additionally, the results show that Hormonal Therapy used in this study partially normalized the changes in vascular reactivity, possibly through regulation of the peptide system and inflammatory cytokines.

## 1 INTRODUÇÃO

Com o aumento da expectativa de vida, compreender os mecanismos do processo de envelhecimento é essencial para garantir melhor qualidade de vida, principalmente nas mulheres durante o período pós-menopausa. Alterações deletérias no sistema cardiovascular e imunológico são encontradas em fêmeas com deficiência estrogênica, porém, é questionado se os estrógenos exógenos possuem a capacidade de anular esses efeitos na pós-menopausa. Assim, estudos que avaliam mecanismos de interação entre o sistema cardiovascular e imunológico em fêmeas, associados a modulação estrogênica, podem contribuir para elucidar esses mecanismos e apontar por quais vias, as drogas utilizadas na terapia hormonal (TH) pós-menopausa podem contribuir para benefícios no sistema cardiovascular e imunológico, nesse gênero. A tibolona, droga utilizada na TH, tem metabólitos com efeitos estrogênicos, progestagênicos e/ou androgênicos, como também, metabolismo tecido-específico e, pode ser usada como alternativa a TH clássica com os estrógenos e progestágenos.

Os efeitos cardiovasculares do sistema de peptídeos natriúreticos são bem explorados em diversas situações fisiopatológicas e alguns estudos evidenciam as alterações desse sistema em mulheres e animais com deficiência estrogênica. A interação do sistema de peptídeos natriurético com o sistema imunológico tem sido explorada recentemente, assim, estudos que avaliam a interação desses sistemas em fêmeas ovariectomizadas podem, também, contribuir para elucidar os possíveis mecanismos pelos quais o uso de TH exerce seus efeitos sistêmicos, entre eles, efeitos imunomoduladores e cardiovasculares.

### 1.1 DOENÇA CARDIOVASCULAR (DCV) E DEFICIÊNCIA ESTROGÊNICA

Atualmente, as doenças cardiovasculares estão entre as principais causas de morte (Regitz-Zagrosek et al., 2010) e, estudos epidemiológicos e laboratoriais têm demonstrado que a incidência destas doenças, em mulheres no período fértil, é menor que em homens da mesma faixa etária. Entretanto, em mulheres na fase pós-

menopausa, esses índices se igualam com homens de mesma idade (Lerner & Kannel, 1986; Barrett-Connor, 1997; Dantas et al., 1999; Mendelsohn & Karas, 1999; Dubey et al., 2002). Isso indica que a perda da função ovariana pode ser considerada um fator de risco específico para essas enfermidades (Stevenson, 2000). Estudo realizado por Stampfer & Colditz (1991) sugere que a Terapia Hormonal (TH) com estrógenos em mulheres após a menopausa está associada à redução de até 50% na incidência de eventos cardíacos, evidenciando-se assim, a função cardioprotetora dos hormônios sexuais femininos. Resultado semelhante foi observado em mulheres jovens que sofreram o processo de remoção cirúrgica dos ovários quando receberam tratamento com estrogênio (Eaker et al., 1993), indicando que é a diminuição ou a ausência da produção de hormônios ovarianos que estão envolvidos no aumento das DCV e não o fator idade de maneira isolada. Entretanto, grandes estudos, como o *Women Health Initiated* (WHI) e o *Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study* (HERS) parecem mostrar o contrário, um aumento de eventos cardiovasculares em mulheres que receberam a TH (Hulley et al., 1998; Rossouw et al., 2002; Shumaker et al., 2003; Berg et al., 2006).

## 1.2 SISTEMA IMUNOLÓGICO E DEFICIÊNCIA ESTROGÊNICA

Um importante mecanismo de defesa das células do organismo diante da agressão tecidual é a resposta inflamatória. A inflamação é um componente essencial na resposta imune, e para uma resposta inflamatória adequada, é necessária uma dinâmica do balanço existente entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Entretanto, a regulação da inflamação é um fato complexo, pois há vias redundantes e com múltiplos elementos tendo efeitos fisiológicos similares (Ozaki & Leonard, 2002).

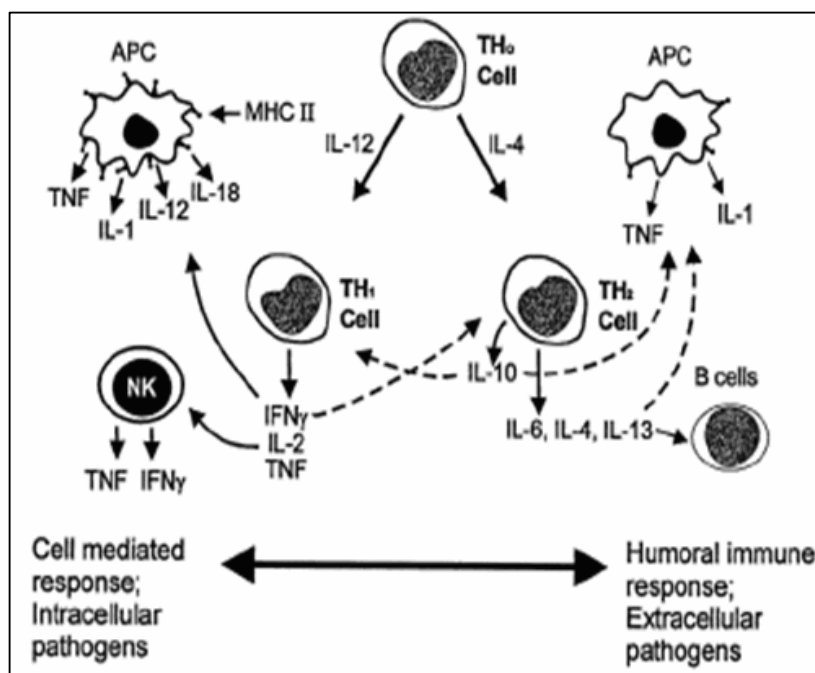
Citocinas são grupos de pequenas proteínas, glicoproteínas e/ou peptídeos produzidas por diversas células do sistema imunológico e células vasculares. Pequenas concentrações, em nível de picomolar e nanomolar são suficientes para ativar receptores específicos e modular as funções das diversas células e tecidos (Arai et al., 1997; Oppenheim, 2001; Dinarello, 2007).

A grande maioria das citocinas pode estar ligada à membrana celular ou presentes na matriz extracelular, ou seja, alternar entre as formas insolúveis e solúveis, respectivamente, podendo esta mudança de solubilidade ser um importante evento



regulatório. Diferentes tipos de células podem secretar o mesmo tipo de citocina, e uma mesma citocina pode atuar em diversos tipos de células (pleiotropia) e produzir múltiplas atividades biológicas, dependendo do tipo de célula, tempo e contexto (Hirano,1999).

Como representado na figura 1, observa-se que as citocinas são produzidas por linfócitos T CD4<sup>+</sup> ou auxiliares, que são diferenciados pelo perfil das citocinas produzidas por cada um, sendo chamados linfócitos T auxiliares 1 e 2 (Th1 ou Th2). Essas células se desenvolvem a partir de um mesmo precursor e podem apresentar função regulatória uma sobre a atividade da outra. As células Th1 secretam altos níveis de interleucina-2 (IL-2), fator de necrose tumoral alfa (TNF-  $\alpha$ ), interferon gama (INF- $\gamma$ ) que promovem a ativação de macrófagos e de outras células envolvidas na resposta imune. Já as células Th2 produzem uma variedade de outras citocinas, incluindo interleucina-4 (IL-4), interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10), que são responsáveis pelos componentes da resposta humoral (Opal & DePalo, 2000).



**Figura 1:** Resposta das células Th1 e Th2 pelo estímulo de células T CD4<sup>+</sup> e a liberação de citocinas. Linhas contínuas indicam estimulação da via, linhas pontilhadas indicam inibição. APC: célula apresentadora de antígeno. MHC II: Complexo principal de histocompatibilidade classe II. Fonte: Opal & DePalo (2000)

Como exposto, as citocinas são produzidas em resposta a estímulos inflamatórios, principalmente por macrófagos e células Th, mas também são produzidas por outras células como fibroblastos, células endoteliais, células epiteliais, entre outras (Cohen et al, 1974).

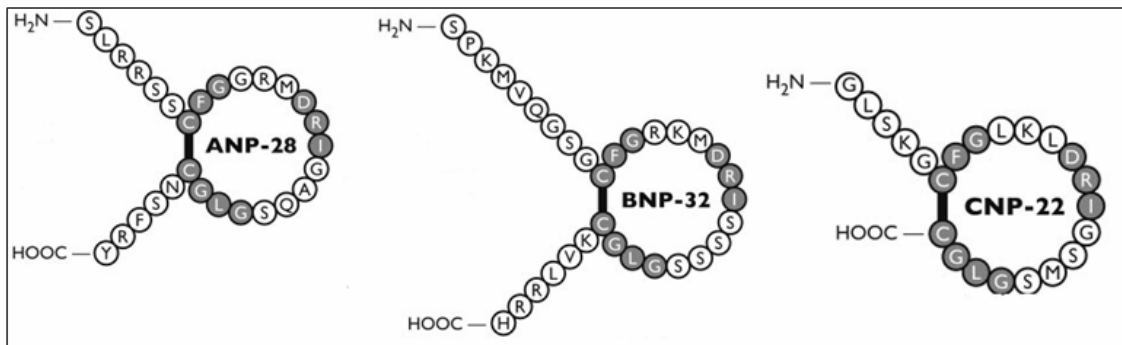
A inflamação apesar de necessária, pode se tornar crônica e levar a prejuízos para o organismo. É bem aceito que a inflamação crônica é a maior condição básica para doenças relacionadas com a idade, como a aterosclerose, artrite, câncer, osteoporose, doenças vasculares, entre outras (Yu & Chung, 2006). Adicionalmente, a perda da função ovariana também pode, ser considerada um fator de risco específico para essas enfermidades (Vural et al., 2006b; Gameiro & Romao, 2010).

O fato de que o gênero influencia o sistema imunológico tem sido reconhecido e o conceito de imunossenescência reflete mudanças em ambas as respostas imunológicas humoral e celular. Além da idade, em mulheres na pós-menopausa, as alterações do sistema imunológico têm sido atribuídas à privação de estrógenos, pois, nessa fase há um aumento na concentração sérica de marcadores pró-inflamatórios, uma diminuição de linfócitos T CD4, linfócitos B e na atividade de células natural killer (NK; Gameiro & Romao, 2010). Vários estudos têm mostrado que as mulheres na pós-menopausa apresentam uma maior expressão gênica e/ou protéica de fator de necrose tumoral alpha (TNF- $\alpha$ ) e/ou interleucina 6 (IL-6; Pacifici, 1996; Vural et al., 2006a; Xing et al., 2009; Gameiro & Romao, 2010). Contudo, o uso da TH por mulheres na pós-menopausa foi capaz de reduzir a expressão gênica e protéica destas citocinas (Morishita et al., 1999; Arenas et al., 2005; Vural et al., 2006b). Portanto, os mecanismos subjacentes ao efeito protetor da TH também poderia ser atribuído a suas propriedades imunomoduladoras que parecem recuperar a homeostase das citocinas em mulheres na pós-menopausa (Gameiro & Romao, 2010).

### 1.3 PEPTÍDEOS NATRIURÉTICOS

Há aproximadamente 30 anos que De Bold e colaboradores (1981) verificaram que a infusão de extratos de tecido atrial em ratos resultou em atividade diurética, natriurética e vasodepressora. Três anos após a descoberta de De Bold e colaboradores (1981), o peptídeo natriurético atrial (ANP) foi identificado e apontado como o primeiro peptídeo da família dos hormônios natriuréticos cardíacos (Seidman *et al.*, 1984). Posteriormente, em 1988, isolado do cérebro de porcos foi identificado o peptídeo natriurético tipo-B (BNP; Sudoh *et al.*, 1988) e em 1990, o terceiro membro da família foi identificado e nomeado peptídeo natriurético tipo-C (CNP; Sudoh *et al.*, 1990). Desde a descoberta, vários estudos demonstram que os peptídeos natriuréticos cardíacos (ANP e BNP) e seus precursores moleculares podem ser utilizados como marcadores úteis de doença cardíaca (Burnett *et al.*, 1986; Yandle *et al.*, 1993; Richards *et al.*, 2004; Doust *et al.*, 2005), devido a importância desses peptídeos no controle cardiovascular, atuando como reguladores da pressão sanguínea e na homeostase de fluidos corporais, por meio de seus efeitos diurético, natriurético e vasodilatador (Espiner *et al.*, 1995; Rubattu & Volpe, 2001). Recentemente, estudos também demonstraram efeito antiinflamatório do ANP (Kierner & Vollmar, 2001; Vollmar, 2005; Ladetzki-Baehs *et al.*, 2007; Vellaichamy *et al.*, 2007).

Os ANP, BNP e CNP são estruturalmente semelhantes, mas geneticamente distintos (Potter *et al.*, 2006) e são sintetizados em lugares diferentes (Pandey, 2005; Potter *et al.*, 2006). O ANP e o BNP são de origem cardíaca e o CNP de origem endotelial, mas também é encontrado no sistema nervoso (Ruskoaho, 2003). Todos os peptídeos natriuréticos são sintetizados como pré-pró-hormônios e apresentam em comum um anel composto por 17 aminoácidos ligados por ponte dissulfeto entre dois resíduos de cisteína (figura 2), sendo essa formação essencial para o reconhecimento do peptídeo pelo receptor de membrana. A principal forma biologicamente ativa ou madura do ANP, que predomina na circulação, é composta por 28 aminoácidos (Potter *et al.*, 2006).



**Figura 2:** Estrutura molecular dos peptídeos natriuréticos.

FONTE: Adaptado de Potter *et al.* (2006).

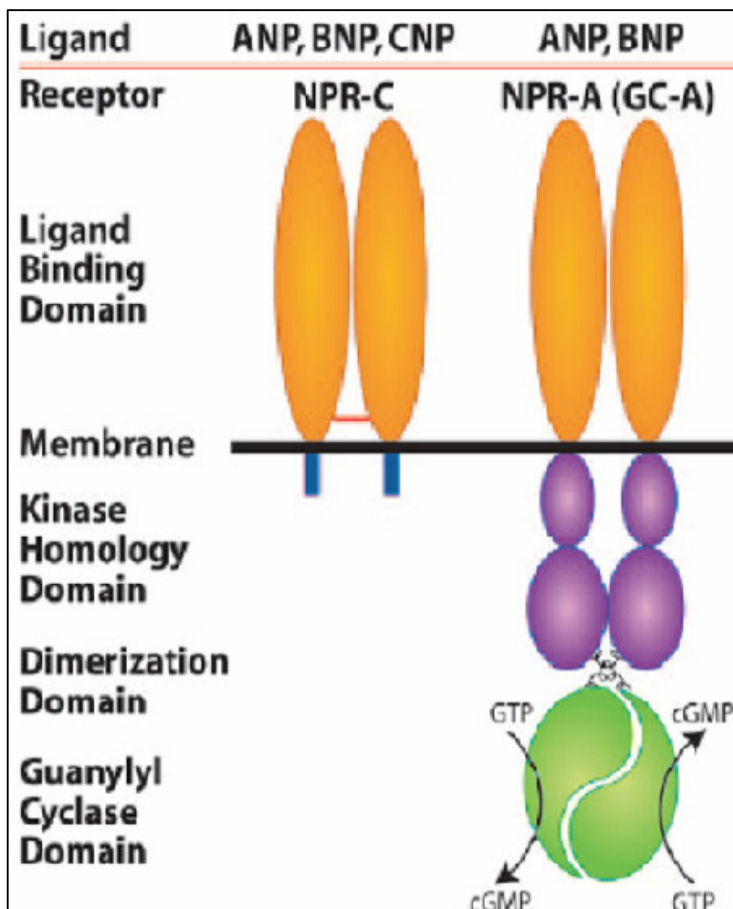
O peptídeo que mais se destaca na regulação do sistema cardiovascular é o ANP (Levin *et al.*, 1998) e dentre os três peptídeos já descritos, o ANP foi o único estudado no presente trabalho.

O ANP é sintetizado a partir de um grande precursor, um peptídeo de 151 aminoácidos, conhecido como pré-pró-ANP. Posteriormente esse precursor é clivado e origina o pró-ANP com 126 aminoácidos. O ANP é primariamente sintetizado e armazenado em grânulos no átrio na forma de seu precursor, o pró-ANP. Esse permanece dentro de grânulos nos cardiócitos atriais até que receba algum estímulo e ocorra sua clivagem pela protease chamada corin. Além dos átrios, em concentrações menores a expressão gênica do ANP está presente em outros tecidos como no ventrículo e nos rins (Potter *et al.*, 2006).

A liberação do ANP pode ocorrer por estímulos mecânicos ou humorais, no qual, o principal estímulo para a sua liberação é a distensão da parede atrial resultante do aumento do retorno venoso. Adicionalmente, imersão em água, vasopressina, endotelina e angiotensina também tem mostrado estimular a liberação do ANP (Pandey, 2005; Potter *et al.*, 2006). Uma vez secretado, o ANP perfunde para o seio coronário onde tem sua distribuição facilitada para vários órgãos alvos (Potter *et al.*, 2006). Por sua vez, os efeitos biológicos do ANP são mediados por ligações aos receptores de peptídeos natriuréticos (NPR) ou chamados de receptores de guanilato ciclase, específicos de membrana localizados na superfície das células alvo (Baxter, 2004).

São conhecidos três tipos de receptores com afinidade aos peptídeos natriuréticos: NPR tipo A (NPR-A), tipo B (NPR-B) e tipo C (NPR-C), este, também chamado de receptor de clearance. Os NPR-A e NPR-B possuem atividade guanilato ciclase e são mediadores das atividades biológicas dos peptídeos natriuréticos. O NPR-C não possui atividade guanilato ciclase e sua função é a remoção dos peptídeos natriuréticos da circulação (Pandey, 2005; Potter et al., 2006). O ANP se liga ao NPR-A e ao NPR-C. Em humanos e em ratos o RNAm do NPR-A é altamente expresso nos rins, adrenal, íleo terminal, tecido adiposo, na aorta e pulmão (Potter et al., 2006) e em células do sistema imunológico (Vollmar, 2005).

O NPR-A é composto por domínios extracelular, intracelular e transmembrana. A parte extracelular liga-se ao ANP e a parte intracelular promove a síntese de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) mediada pela guanilato ciclase a partir da guanosina trifosfato (GTP). O GMPc, chamado de segundo mensageiro, é o responsável pela maioria das ações biológicas do ANP (figura 3; Baxter, 2004).



**Figura 3.** Receptores de membrana dos peptídeos natriuréticos do tipo A (NPR-A) e tipo C (NPR-C).

FONTE: Adaptado de Potter *et al.* (2006).

O NPR-C apresenta um curto domínio intracelular, não apresenta atividade guanilato ciclase e está envolvido na eliminação dos peptídeos natriuréticos, ou seja, no clearance dos peptídeos natriuréticos, inclusive do ANP. Os peptídeos natriuréticos ligam-se a ele, são internalizados e enzimaticamente degradados, posteriormente, retornam a superfície celular (figura 3).

O ANP tem grande importância na regulação do sistema cardiovascular, pois, além de apresentar efeitos sobre os vasos e o coração (Garcia *et al.*, 1984; Gutkowska & Nemer, 1998; Jankowski *et al.*, 2001) atua nos rins, aumentando o ritmo de filtração glomerular (Castro *et al.*, 1989), inibe a secreção de renina e o transporte de sódio pelo segmento medular do ducto coletor (Potter *et al.*, 2006). O ANP é secretado normalmente em

algumas situações fisiológicas, contudo, em situações patológicas o ajuste da síntese e da liberação de ANP parece estar alterado (Tsutamoto et al., 1993; John et al., 1995; Oliver et al., 1997; Belo et al., 2004; Belo et al., 2008). Em mulheres e animais fêmeas com deficiência estrogênica, a alteração do sistema de peptídeos natriuréticos pode estar associada aos prejuízos no sistema cardiovascular que, posteriormente, poderá levar ao desenvolvimento de DCV (Clark et al., 1990; Jankowski et al., 2001; Maffei et al., 2001; Belo et al., 2004; Belo et al., 2008).

#### 1.4 ESTROGÊNIO

Estrogênio é um termo usado para um grupo de hormônios esteróides com dezoito carbonos, que são secretados principalmente pelo ovário e, em menor quantidade, pelas adrenais. O estrogênio engloba três hormônios esteróides estruturalmente semelhantes:  $17\beta$ -estradiol, estrona e estriol. Porém, o período pós-menopausa é associado à deficiência ovariana e redução nos níveis de estrogênio, principalmente, o  $17\beta$ -estradiol, o mais abundante na fase pré-menopausa (Hsueh et al., 1983).

As ações biológicas do estrogênio nos mamíferos incluem os processos reprodutivos, cardiovasculares, relacionados ao metabolismo ósseo, função cognitiva e comportamento. Por isso, alterações nos hormônios estrogênicos, podem estar associadas ao desenvolvimento e progressão de numerosas doenças, como doenças neurodegenerativas, DCV, resistência à insulina, osteoporose, endometriose e obesidade (Korach & Deroo, 2006).

As alterações celulares induzidas pelo estrogênio podem ocorrer por diferentes mecanismos. Quando o estrogênio se difunde para o meio intracelular, devido a sua estrutura esteroidal e sua alta lipofilicidade, ele se liga ao receptor de estrogênio (RE), que está localizado no meio intracelular. Esse mecanismo é chamado de mecanismo clássico ou mecanismo genômico de ação do estrogênio ou ainda via genômica. O complexo nuclear formado estrogênio-RE desencadeia seqüências de respostas ligadas ao estrogênio direta ou indiretamente por meio de interações com proteínas, como a proteína ativadora-1 na região promotora dos genes responsáveis ao estrogênio, resultando em uma co-regulação de proteínas na região promotora, aumentando ou reduzindo os níveis de RNAm, associado à produção de proteínas e a resposta fisiológica (Silbergberg & Magleby, 1999; Korach & Deroo, 2006). Esse mecanismo

tipicamente demora um tempo maior para ocorrer, devido à ativação de enzimas responsáveis pela regulação e síntese de novos constituintes e de rotas metabólicas.

Em contraste a esse mecanismo, o estrogênio pode rapidamente induzir alterações no funcionamento celular, chamado de mecanismo não-genômico ou via não genômica, onde o estrogênio se liga a RE que podem estar localizados no citoplasma ou adjacentes à membrana plasmática que requerem a presença de proteínas adaptadoras. A ativação desses receptores resultaria em respostas celulares como aumento do óxido nítrico (NO; Korach & Deroo, 2006), gerando vasodilatação de alguns leitos, como o leito coronariano (Santos et al, 2004).

Os receptores de estrogênios tipo  $\alpha$  (RE $\alpha$ ) e receptor de estrogênio tipo  $\beta$  (RE $\beta$ ) são amplamente expressos em diferentes tecidos, tanto em humanos, quanto em roedores (Mueller & Korach, 2001). O RE $\alpha$ , primeiro a ser clonado (Green, 1986), pode ser encontrado no útero, testículo, vasos sangüíneos, coração, mama, ovário e epidídimo (Kuiper et al., 1997; Jankowski et al., 2001; Tostes et al., 2003). Já o RE $\beta$  pode ser localizado na próstata, testículos, ovários, útero, bexiga, rim, vasos sangüíneos, coração, cérebro, pulmão, no núcleo supra-ótico e no núcleo paraventricular (Hrabovszky et al., 1997; Kuiper et al., 1997; Jankowski et al., 2001; Tostes et al., 2003). O domínio do local de ligação do RE $\beta$  demonstra grande homologia comparado com o RE $\alpha$ , mas tem sido mencionado que co-reguladores reagem de maneira diferente entre os dois receptores (Paech et al., 1997; Hasenbrink et al., 2006) e que existe uma regulação do RE $\beta$  sobre a atividade do RE $\alpha$  em diferentes tecidos.

Modelos animais nos quais foram retirados os genes responsáveis pela transcrição desses receptores resultaram em diferentes fenótipos e representaram alguns modelos experimentais utilizados para avaliar o papel dos RE na fisiologia normal e nas doenças (Couse & Korach, 1999).

O estrogênio possui efeitos sobre o sistema cardiovascular que podem explicar a possível cardioproteção nas fêmeas, por exemplo, estudos demonstraram que o estrogênio pode aumentar o débito cardíaco, a velocidade do fluxo arterial e diminuir a resistência vascular periférica, alterando assim, o tônus vascular de artérias sistêmicas resultando em vasodilatação e aumento do fluxo sangüíneo (Magness & Rosenfeld, 1989; Riedel et al., 1995). Inclusive o estrogênio possui efeitos diretos sobre o vaso



quando administrado *in bolus* resultando em vasodilatação no leito coronário com ou sem endotélio, resultado demonstrado por Santos e colaboradores (2004).

Sobre o endotélio vascular é bem estabelecido que a disfunção endotelial está envolvida na fisiopatologia de DCV, incluindo as que ocorrem na fase pós-menopausa (Cohen et al., 1983). Em condições normais o endotélio mantém um efeito vasodilatador, antitrombótico e antiinflamatório (Furchgott & Zawadzki, 1980; Nakano et al., 1998; Chakrabarti et al., 2008). Essas células endoteliais desempenham papel fundamental na circulação através da síntese de vasodiladores, como o óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). Durante o processo de disfunção endotelial, a síntese e/ou a bioatividade dos vasodiladores é reduzida, favorecendo o aumento de vasoconstritores derivados do endotélio, como a endotelina e o tromboxano A<sub>2</sub> (Fisher, 2008). Sendo assim, tanto a modulação da função endotelial pelo estrogênio quanto por substâncias que possam apresentar efeitos semelhantes aos estrógenos tem despertado grande interesse na comunidade científica.

Basicamente, existem dois mecanismos principais para explicar os efeitos vasodilatadores do estrogênio: um efeito direto sobre o músculo liso vascular, e um efeito dependente do endotélio, onde o estrogênio estimularia a liberação de agentes vasodilatadores (Farhat et al., 1996).

A ação vasodilatadora direta do estrogênio sobre o músculo liso vascular poderia ocorrer pelo antagonismo de canais de Ca<sup>2+</sup> (Jiang et al., 1991; Sudhir et al., 1995), inibindo assim, o influxo transmembrana de cálcio via canais de Ca<sup>2+</sup> tipo L voltagem-dependente (Zhang et al., 1994; Ruehlmann et al., 1998), o que levaria a redução na concentração intracelular de Ca<sup>2+</sup> e conseqüentemente ao relaxamento; ou ainda pela estimulação de BKCa ("Maxi K" ou "Big K") nas células do músculo liso vascular (Node et al., 1997; Valverde et al., 1999), o que levaria a hiperpolarização dessas células. A hiperpolarização, por sua vez, reduz a probabilidade de canais de Ca<sup>2+</sup> tipo-L, levando ao relaxamento do músculo liso vascular.

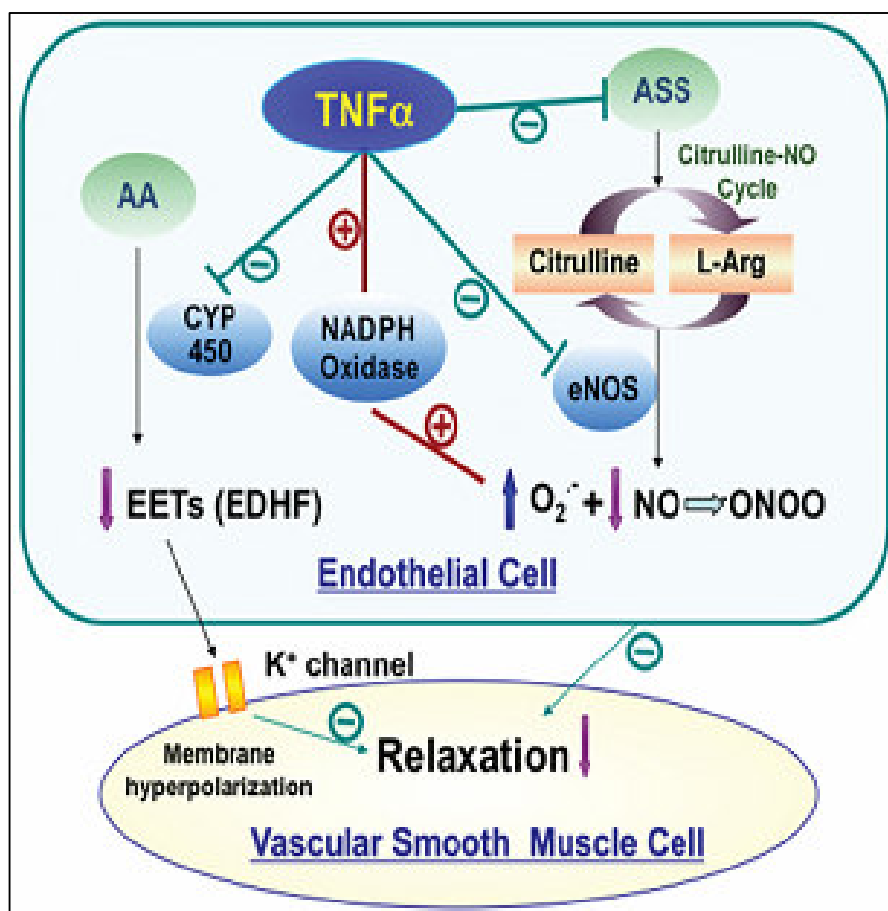
No que diz respeito às ações do estrogênio sobre o endotélio vascular, inúmeros estudos mostram uma forte ligação entre o NO e o estrogênio (Weiner et al., 1994; White et al., 1995). Essas ações estão associadas tanto a mecanismos genômicos quanto a não-genômicos (Weiner et al., 1994; Chen et al., 1999).

O NO, principal agente vasodilatador dos vasos de condutância, como a aorta, é produzido durante a ativação da óxido nítrico sintase (NOS). Duas isoformas da NOS são relevantes nos processos inflamatórios, a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS). A atividade da eNOS é parcialmente regulada por concentrações de íons cálcio intracelular e ela é expressada constitutivamente. A iNOS, normalmente, não é identificada em tecido vascular saudável, mas é expressa por leucócitos em resposta a citocinas (Vila & Salaices, 2005). O mecanismo de ação intracelular do NO é comum para as duas isoformas. Ao se difundir pela membrana, o NO pode atingir a enzima guanilato ciclase solúvel presente nas células musculares lisas, convertendo o GTP em GMPC. Resumidamente, o aumento das concentrações de GMPC ativa proteína quinase G (PKG) acarretando uma diminuição citosólica de  $Ca^{2+}$  em células do músculo liso vascular, induzindo assim, a ação vasodilatadora (Moncada & Higgs 1993; Vanhoutte, 2009). Vale ressaltar que o NO produzido pelas células endoteliais é liberado para o músculo liso vascular e também para a circulação sanguínea, onde o NO exerce o efeito importante de inibidor da agregação plaquetária e agente antioxidante (Vanhoutte, 2000; Vanhoutte, 2009).

Estudos mostram que o estrogênio pode estimular a expressão gênica de NOS, possivelmente por mecanismos genômicos (Weiner et al., 1994) como também aumentar a liberação de NO em células endoteliais, provavelmente por mecanismo não-genômico (Chen et al., 1999). Em aorta de coelhos e artéria mesentérica de ratos dados demonstram que a ovariectomia reduz a formação de níveis de NO (Liu et al., 2001). A elevação basal de NO pelo estrogênio parece envolver a ativação de  $RE\alpha$  (Chen et al., 1999), possivelmente pelo aumento da atividade da NOS (Binko et al., 1998; Chen et al., 1999).

Além das ações do estrogênio sobre o NO, os estrógenos, por ações genômicas e não genômicas, parecem modular o TNF- $\alpha$  diminuindo os níveis e a expressão dessa citocina (Xing et al., 2009). Adicionalmente, muitos estudos demonstram o efeito direto do TNF- $\alpha$  sobre a eNOS, que promove *down-regulation* da expressão desta enzima e, conseqüentemente, diminuição na produção de NO em diversos leitos vasculares (Goodwin et al, 2007). O ciclo citrulina/NO (que faz parte da síntese do NO) é regulado pela argininosuccinato sintase (ASS) demonstrado na figura 4. O NO é sintetizado pela conversão de L-arginina em L-citrulina mediado pela eNOS e catalisado pela ASS. Goodwin e colaboradores (2007), demonstraram que TNF- $\alpha$  diminui a expressão do RNAm para eNOS e da proteína ASS em células endoteliais aórticas, diretamente

reduzindo a produção de NO.



**Figura 4:** Envolvimento do TNF- $\alpha$  na disfunção endotelial. AA: ácido araquidônico.

FONTE: Zhang *et al.* (2009).

Além disso, o TNF- $\alpha$  aumenta a síntese de ânions superóxidos ( $O_2^{\bullet-}$ ), que por sua vez, reage com o NO e forma peróxido nítrico ( $ONOO^-$ ). Como consequência, o TNF- $\alpha$  diminui a biodisponibilidade de NO, prejudicando sua ação vascular. TNF- $\alpha$  também diminui os ácidos epoxieicosatrienóico (EETs), um vasodilatador que funciona como um provável fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), via inibição da atividade da enzima citocromo P450 (CYP 450, Zhang *et al.*, 2009).

### 1.5 TIBOLONA

As THs surgiram como forma de reverter possíveis alterações decorrentes da deficiência ovariana, na tentativa de proteger a mulher de doenças cardiovasculares, prevenir a

osteoporose, o câncer de mama e útero e minimizar os distúrbios da função cognitiva, uma vez que estes são os principais sinais e sintomas na mulher pós-menopausa (Byyny & Speroff, 1996; Wild, 1996). Entre uma destas terapias encontra-se a tibolona, uma substância sintética esteroideal, derivado da 19-nortestosterona e previamente chamado de Org OD-14 (Lindsay et al., 1980; De Visser et al., 1984).

A tibolona, de forma molecular  $C_{21}H_{28}O_2$  é um pó cristalino branco e insolúvel em água. Ela é rapidamente e quase completamente absorvida por administração oral. Em humanos, os níveis plasmáticos são detectados com 30 minutos após a ingestão e a maior parte da tibolona e seus metabólitos se encontram ligados a proteínas plasmáticas (96,3%), principalmente a albumina, devido à baixa afinidade (<2,5%) pela globulina de ligação dos hormônios sexuais (SHBG), resultado contrário do que observado com a testosterona e os outros esteróides, que possuem alta afinidade à SHBG.

A tibolona e seus metabólitos são amplamente distribuídos em todos os tecidos e níveis mais altos são encontrados no fígado e rins. Essa droga possui um alto efeito de primeira passagem e é extensivamente biotransformada no fígado e ao longo do trato gastrointestinal, originando três metabólitos identificados como ativos:  $3\alpha$ -hidroxi-tibolona ( $3\alpha$ -OH),  $3\beta$ -hidroxi-tibolona ( $3\beta$ -OH) e o isômero  $\Delta^4$  tibolona. Existem pelo menos dois caminhos de biotransformação da tibolona através de reações metabólicas de fase 1: redução do grupo 3-ceto em grupos  $3\alpha$ -hidroxi e  $3\beta$ -hidroxi; e a isomerização da ligação dupla. As afinidades de ligação destes metabólitos aos diferentes tecidos determinam os efeitos teciduais específicos da tibolona, classificado-a como uma pró-droga, por ser rapidamente biotransformada nos metabólitos descritos anteriormente. Os metabólitos  $3\alpha$ -OH e  $3\beta$ -OH, que possuem atividade estrogênica, circulam predominantemente na forma inativa (sulfatada), tornando-se estrogenicamente ativos somente quando desulfatados nos tecidos alvos pelas sulfatases (Kloosterboer, 2001). A sulfatação também ocorre no fígado, mas por conjugação através de reações metabólicas de fase 2. Esses metabólitos geram suas respostas por possuírem uma maior afinidade pelo  $RE\alpha$  (De Gooyer et al., 2003).

A meia-vida de eliminação da tibolona em humanos é aproximadamente 45 horas, sendo semelhante aos outros esteróides e bem maior que a de seus metabólitos hidroxilados (aproximadamente 6 horas). Em relação ao isômero  $\Delta^4$ , estudos identificaram níveis plasmáticos muito baixos, indicando tanto uma baixa taxa de

formação como uma meia-vida curta de eliminação. O  $3\beta$ -OH pode ser convertido no isômero  $\Delta^4$ , identificado como sendo responsável pela ligação e ativação do receptor de progesterona gerando assim os efeitos progestogênicos (Kloosterboer, 2000; Kloosterboer, 2001). A maior parte da excreção (60-65%) ocorre pelas fezes, tanto da tibolona quanto dos seus metabólitos.

Atualmente a tibolona é classificada em uma nova classe farmacológica proposta devido ao seu mecanismo de ação, biotransformação e local de ação (principalmente relacionando a ativação específica nos tecidos alvos). Essa classe tem sido chamada de Regulador Seletivo Tecidual da Atividade Estrogênica (STEAR). Esse termo está focado na sua atividade estrogênica, que é expressa na sua seletividade tecidual e no seu metabolismo esteroidal que desempenham um papel importante na determinação da biodisponibilidade para ligação ao tipo de receptor específico (Kloosterboer, 2004).

Os primeiros testes clínicos com tibolona iniciaram no final da década de 70 e ela foi testada inicialmente na prevenção da perda óssea. O primeiro estudo clínico com tibolona em mulheres na pós-menopausa (Lindsay et al., 1980) indicou um efeito positivo no osso e alguns relatos de alívio dos sintomas climatéricos, mas não foram observados efeitos estrogênicos no endométrio. Esses resultados levaram a novos estudos no campo dos sintomas climatéricos e na prevenção da osteoporose (Rymer et al., 1994; Kasugai et al., 1998; Yoshitake et al., 1999).

A tibolona pode apresentar diversos efeitos sobre o organismo, dentre eles, o alívio dos sintomas vasomotores presentes na pós-menopausa (Kicovic et al., 1982; Siseles et al., 1995; Moore, 2001), baixa estimulação do endométrio, sendo atribuído aos efeitos progestogênicos. Em mulheres na pós-menopausa tratadas com tibolona foi observado uma redução significativa de secura vaginal e dispareunia, com normalização da maturação das células vaginais e alívio da sintomatologia atrófica de vaginites (Botsis et al., 1997; Morris et al., 1999). Estudos randomizados indicam que a tibolona tem efeito positivo no humor comparado ao placebo e apresenta um resultado semelhante às terapias hormonais convencionais (Egarter et al., 1996; Morris et al., 1999; Moore, 2001), sendo relacionada com o aumento plasmático de  $\beta$ -endorfina (Genazzani et al., 1987). Já na mama, a tibolona, por inibir a enzima sulfatase, não há ativação dos metabólitos sulfatados, conseqüentemente, os metabólitos  $3\alpha$ -OH e  $3\beta$ -OH não são ativados (Kloosterboer, 2000). A inibição da sulfatase em células endometriais é aparentemente mais fraca do que na mama (Kloosterboer, 2000; Reed & Kloosterboer,

2004). Essa inibição tecido-específica pode reduzir a dessulfuração do sulfato de estrona na mama, com isso a tibolona inibe a proliferação das células mamárias humanas e estimula a apoptose (Gompel et al., 1997), levando a justificar os resultados de uma menor incidência de câncer de mama e o não aumento da densidade mamográfica (Hammar et al., 1998) em contraste com a terapia oral de estrogênio-progesterona (Valdivia & Ortega 2000). Entretanto, resultados de estudos clínicos maiores mostraram maior incidência de câncer de endométrio em usuárias de tibolona (Beral et al., 2005), embora, revisão recente sobre o assunto, tenha concluído que mais estudos são necessários para definir se realmente existe um maior risco de câncer de endométrio com o uso da tibolona (Allen et al., 2010).

Assim, mediante a ligação entre DCV e processo inflamatório existe a necessidade de investigar possíveis THs que possam ser utilizadas na fase pós-menopausa, no intuito de normalizar a disfunção vascular e a inflamação, que geralmente são encontradas em mulheres nesta fase da vida. Entretanto, poucos estudos avaliam os efeitos cardiovasculares e imunológicos em modelos de deficiência estrogênica e as THs. Adicionalmente, devido à existência de dados que sugerem a modulação dos estrógenos e do ANP sobre parâmetros cardiovasculares e sobre citocinas, neste estudo, foi levantada a hipótese que a TH com a tibolona normalizaria o sistema de peptídeos natriurético e este efeito poderia ser acompanhado da melhora dos parâmetros cardiovasculares avaliados e da redução dos níveis séricos de TNF- $\alpha$  e IL-6.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar alterações no sistema de peptídeos natriuréticos e relacioná-las com parâmetros cardiovasculares e imunológicos em ratas ovariectomizadas e tratadas com tibolona ou 17 $\beta$ -estradiol.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar os efeitos da ovariectomia e dos tratamentos sobre o peso corporal, útero, átrios, ventrículos e rins;
- Verificar os efeitos dos tratamentos sobre a pressão arterial média, sistólica, diastólica e frequência cardíaca;
- Investigar os efeitos dos tratamentos sobre os níveis plasmáticos e os conteúdos atriais de ANP, a expressão gênica do ANP atrial e dos NPRs renais;
- Investigar a influência dos tratamentos sobre os níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- $\alpha$ );
- Avaliar se a ovariectomia e os tratamentos são capazes de alterar a reatividade vascular à fenilefrina e à acetilcolina em anéis de aorta torácica isolados e os efeitos desses tratamentos sobre a expressão protéica da eNOS na aorta;
- Verificar os efeitos dos tratamentos sobre a excreção de sódio e volume urinário.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizadas ratas Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), fêmeas com peso corporal variando entre 160-180 gramas. Esses animais foram fornecidos pelo Biotério de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo. O uso e cuidado destes animais experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos da pesquisa com animais, estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa nº 012/2008.

Os animais foram mantidos em ambiente com iluminação artificial (ciclo claro-escuro de 12h) e temperatura de 20-25° C de acordo com o recomendado pelos biotérios de pesquisa (FINEP). As gaiolas individuais permitiam o livre acesso dos animais à ingestão de água e ração (ração Probiotério, Moinho Primor, S.A) *ad libitum*.

#### 3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Dois blocos de tratamentos foram utilizados para avaliar os parâmetros estudados devido ao grande número de protocolos experimentais realizados. Tanto no bloco A quanto no bloco B as fêmeas foram separadas em quatro grupos e receberam os mesmos tratamentos. Nos grupos que fizeram parte do bloco B foram coletados o plasma, o soro, os átrios, os ventrículos, o útero, anéis da aorta torácica superior para a realização da reatividade vascular e análise da expressão protéica da eNOS por *western blotting*. No bloco A, os quatro grupos foram mantidos em gaiolas metabólicas durante todo o protocolo experimental, após um período de adaptação. Nestas fêmeas foi coletado o volume urinário e no último dia do protocolo experimental, foi realizada a medida direta da pressão arterial e a coleta das vísceras.



Em cada bloco as fêmeas foram separadas em quatro grupos experimentais, sendo:

- 1) Fêmea SHAM (n=08, SHAM)
- 2) Fêmea ovariectomizada (n=08, OVX)
- 3) Fêmea ovariectomizada tratada com  $17\beta$ -estradiol 0,5 $\mu$ g/kg/dia (n=08, EST)
- 4) Fêmea ovariectomizada tratada com tibolona 1,5mg/Kg/dia (n=08, TIB)

### 3.3 OVARIECTOMIA

Após anestesia intraperitoneal com hidrato de cloral 10% (Vetec Química Fina LTDA, RJ Brasil), os animais foram submetidos a uma incisão de 1 a 1,5cm na pele, entre a última costela e a coxa, a 1 cm da linha mediana, seguida de uma incisão na camada muscular, abrindo a cavidade peritoneal para posterior remoção dos ovários e ligadura da tuba uterina. Após a retirada dos ovários, foi realizada sutura da musculatura e pele. O mesmo processo foi realizado no lado oposto, realizando-se a ovariectomia bilateral. Ao final do procedimento os animais foram recolocados em gaiolas individuais. No grupo SHAM foi realizada uma cirurgia fictícia de ovariectomia, a fim de estabelecer parâmetros semelhantes em todos os animais deste estudo.

### 3.4 TRATAMENTOS HORMONAIS

Os grupos EST foram tratados por 14 dias com  $17\beta$ -estradiol (Sigma, St. Louis, USA) dissolvido em óleo de milho, numa dose diária de 0,5 $\mu$ g/kg de peso corporal por via parenteral direta (subcutânea), transfixando-se a massa muscular da coxa traseira da rata alternando as patas. O tratamento foi iniciado após 21 dias decorridos do processo de ovariectomia.

Os grupos TIB receberam a TH por 14 dias com Tibolona (Galena, Brasil), por administração via oral da droga (gavagem), na forma de suspensão aquosa, numa dose diária respectivamente de 1,5mg/kg de peso corporal. O tratamento foi iniciado após 21 dias da castração.

O grupo EST recebeu o tratamento por via subcutânea e o veículo por gavagem (água). O grupo TIB recebeu o tratamento por via oral (gavagem) e por via subcutânea o veículo

(óleo de milho). O grupo SHAM recebeu por 21 dias os veículos dos tratamentos por via oral e subcutânea (água e óleo de milho).

### 3.5 REGISTROS HEMODINÂMICOS

No penúltimo dia do protocolo experimental as fêmeas foram cateterizadas para obtenção das medidas hemodinâmicas. Cateteres de polietileno (Clay Adans, USA) foram previamente preparados para cada animal. Foram confeccionados através da conexão pelo aquecimento de um cateter PE 50, de 15 cm de comprimento, a outro do tipo PE 10, medindo 5cm, o qual se destinou à artéria femoral. Sob anestesia pelo pentobarbital sódico (Hypnol, Cristália, Brasil) 50 mg/kg, intraperitoneal, uma incisão na região inguinal, com posterior isolamento do plexo vâsculo-nervoso, possibilitou a cateterização da aorta via artéria femoral. As terminações livres dos cateteres foram mantidas preenchidas com solução salina (0,9%) e ocluídas com pinos de aço inoxidável.

O cateter arterial femoral esquerdo foi conectado a transdutores de pressão (Spectramed – Statham, P23XL, USA) através de um cateter flexível. Os valores de registro da pressão arterial média (PAM), diastólica (PAD), sistólica (PAS) e frequência cardíaca (FC) foram obtidos através de um sistema computadorizado (Pentium MMX 233 MHz) e um programa para aquisição de dados biológicos (BIOPAC – BIOPAC Systems, Inc., Santa Barbara, Califórnia, USA, mod. MP 100A/série 94111065). A frequência de amostragem foi fixada em 200 Hz.

### 3.6 PESO CORPORAL E RAZÃO DE PESO SECO PELO PESO CORPORAL DO ÚTERO, DAS CÂMARAS CARDÍACAS E DOS RINS

As fêmeas foram pesadas no início do protocolo experimental e separadas aleatoriamente entre os grupos SHAM e OVX. Após o período de 21 dias de ovariectomia ou cirurgia fictícia as fêmeas foram pesadas novamente e aleatoriamente separadas entre os grupos EST e TIB. Ao final de 14 dias de TH ou administração de veículo, o peso corporal das fêmeas foi medido novamente, obtendo o peso corporal final.

No último dia do protocolo experimental as fêmeas foram guilhotinadas. O útero, os átrios, os ventrículos e os rins foram retirados, lavados com solução fisiológica e o excesso de líquido foi removido com papel de filtro. O ventrículo direito (VD) foi separado do ventrículo esquerdo (VE) e o septo interventricular foi considerado parte do VE. Para obtenção do peso seco destes órgãos, esses foram colocados em estufa à temperatura de 100°C por 24 horas para eliminação da água e pesados. A diminuição ou o aumento de massa dos órgãos foi estimado dividindo o peso do órgão seco (mg) pelo peso corporal do rato (g), o que chamamos de razão do peso seco pelo peso corporal (RPS/PC).

### 3.7 DOSAGEM DE ANP E DE NPR

As dosagens de ANP foram feitas por radioimunoensaio de duplo-anticorpo (RIE). O plasma foi submetido à extração usando-se colunas Sep-Pak C 18 (Waters Associates, Milford, MA). As colunas de Sep-Pak foram ativadas com 8ml de acetonitrila e lavadas com 8ml de acetato de amônia a 0,2%, pH 4. A seguir, o plasma foi aplicado à coluna. Após lavagem com 5ml de acetato de amônia, o ANP adsorvido foi eluído com 3ml de acetonitrila 60% em acetato de amônia 0,2% e evaporado em Speed-Vac. Após a evaporação, as amostras foram reconstituídas com tampão (fosfato de sódio 0,1 M, NaCl 0,14M, albumina bovina 0,1%, azida sódica 0,01%, triton X-100 0,1% em pH 7,4) e então, dosadas por RIE. O tecido cardíaco, átrios direito e esquerdo, foram homogeneizados em solução de ácido acético 0,1 N, contendo inibidores de proteases (EDTA  $10^{-5}$ M, Pepstatina  $0,5 \times 10^{-5}$ M e PMSF  $10^{-5}$ M). Após centrifugação, alíquotas do sobrenadante foram diluídas em tampão fosfato para determinação do ANP por RIE.

#### 3.7.1 Iodação de ANP

A iodação de ANP de rato (Ser<sup>101</sup>-Tyr<sup>126</sup>) (Peninsula Laboratories Inc, Belmont, CA, USA) foi feita pelo método de Lactoperoxidase com <sup>125</sup>I-sódico como descrito por Gutkowska e colaboradores (1987). A purificação da fração monoiodinada foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

#### 3.7.2 Radioimunoensaio para ANP

ANP imunorreativo foi determinado por radioimunoensaio de acordo com técnica

descrita por Gutkowska e colaboradores (1987). O ANP extraído por Sep-Pak foi reconstituído em 0,5 ml de tampão (fosfato de sódio 0,1 M, NaCl 0,14M, albumina bovina 0,1 %, azida sódica 0,01 %, triton X-100 0,1% - pH 7.4). As amostras de 100µl foram incubadas "overnight" com 100µl de anticorpo anti-ANP a 4°C. Adicionou-se 100µl (8.000cpm) de <sup>125</sup>I-ANP e incubou-se por mais 24 horas. A separação do imunocomplexo foi feita por precipitação com segundo anticorpo (soro de cabra anti gama-globulina de coelho). Após duas horas à temperatura ambiente adicionou-se 0,5ml de polietilenoglicol 6,25% em água. Os tubos foram centrifugados por 20 minutos, 4°C, a 1.500xg. Após aspiração do sobrenadante, a radioatividade do precipitado foi determinada por contador gama (LKB).

### **3.7.3 Dosagem de proteína total**

A determinação do conteúdo de proteína total nos átrios e na aorta foi feita utilizando-se o método de Bradford (Bradford, 1976). Reagente de cor Coomassie Brilliant Blue G-250 (1g) foi dissolvido em 100mL de etanol 95% e em 200 mL de ácido ortofosfórico 85-88%. A solução resultante foi diluída para uso da seguinte forma: 30 mL da solução inicial foram adicionados a 40 mL de etanol 95% e 80 mL de ácido ortofosfórico 85-88%. A solução padrão foi obtida a partir de diluições de albumina bovina em água destilada com concentração estoque final de 20µg/100µl. Essa solução foi diluída para a obtenção da curva padrão, em que as diluições continham de 4 a 20 µg de proteína no volume de 0,1 mL. Alíquotas dos sobrenadantes dos homogenatos dos tecidos foram utilizadas (10µl) como amostra. A seguir foi adicionado 1ml de água destilada e 1,5ml do reagente de cor previamente filtrado. A absorbância foi medida a 595nm depois de 10 minutos.

### **3.7.4 Análise de RNA**

O RNAm perfaz 2% do RNA total extraído e é heterogêneo quanto ao tamanho e composição. Ele pode ser isolado dos outros RNAs devido a uma cauda poly-A que é a denominação dada para 20 a 250 resíduos de adenina na terminação 3' do RNAm. O procedimento mais efetivo para a extração do RNA envolve a homogeneização do tecido em isotiocianato de guanidina. Esse procedimento desagrega rapidamente as estruturas celulares envolvidas, dissocia as nucleoproteínas e leva a uma rápida desnaturação (Chomczynski & Sacchi, 1987).

### 3.7.4.a Extração de RNAm

O RNA dos átrios direito e esquerdo dos animais foi isolado de acordo com o método de tiocianato-fenol-clorofórmio. Após decapitação dos animais, os tecidos foram rapidamente removidos e congelados em nitrogênio líquido. Os tecidos foram armazenados a -80°C. No dia da extração, os tecidos foram colocados em tubos plásticos estéreis contendo solução de fenol e isotiocianato de guanidina (Trizol®, Gibco BRL, Gaithersburg MD, USA), 1ml/100mg de tecido. As amostras foram trituradas por um homogeneizador elétrico Polytron. A adição de clorofórmio (0,2ml/100mg de tecido) seguida de centrifugação (15300xg, 4°C, 15 minutos) separou a solução em três fases, uma fase orgânica no fundo do tubo plástico, uma fase constituída principalmente por DNA que se localizava na parte média e uma fase aquosa contendo RNA total, que se situava no sobrenadante.

A fase aquosa foi transferida cuidadosamente (para não contaminar RNA total com DNA genômico) para novos tubos plásticos estéreis e identificados. Álcool Isopropílico (0,5ml) foi adicionado ao RNA total para promover a sua precipitação e após 10 minutos de repouso, seguiu-se nova centrifugação (15.300xg, 4°C, 15 minutos). O precipitado de RNA foi então lavado com 1ml de etanol a 75% seguido de centrifugação curta (9600xg, 4°C, 5 minutos).

O precipitado de RNA foi ressuspenso em 50µl de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e aquecida a 58°C por 10 minutos para desnaturação. Para a quantificação, alíquotas de 6µl da solução de RNA foram diluídas em 0,3ml de água tratada com dietilpirocarbonato e a solução resultante foi submetida à leitura em espectrofotômetro nas faixas de 260 e 280nm. A pureza do RNA foi considerada satisfatória quando a razão das absorvâncias a 260 e 280nm era superior a 1,7. Considerando que uma unidade de absorvância a 260nm corresponde a 40µg de RNA por ml de solução, a concentração de RNA na solução original foi calculada pela fórmula:

$[RNA] = A_{260} \times D \times 40\mu\text{g/ml}$ , onde A = absorvância e D = diluição da alíquota usada para a quantificação, no caso 100, visto que, 10µl de solução de RNA serão diluídos em 1 ml de água.

Após a extração, 1µg de RNA dos tecidos foram submetidos à transcrição reversa para

posterior realização da PCR como será descrito posteriormente.

#### 3.7.4.b Síntese do DNA complementar (cDNA) - transcrição reversa

O RNA dos átrios, rins e tecido adiposo foi extraído utilizando-se Trizol® como descrito anteriormente. A obtenção do cDNA foi feita através de uma retro-transcrição (RT) a partir do RNAm, utilizando-se oligonucleotídeos complementares a cauda poli-A do RNAm.

Para a transcrição reversa foi adicionado a 1µg de RNA total 4µl de tampão específico (10x), 3µl de dNTP (10mM), 4µl de primer oligo dt (SUPERScript III 1st STRAND - Invitrogen) e 0,2µl de enzima transcriptase reversa *Moloney Murine Leukemia Vírus* (MMLV). A solução foi então mantida a 40°C por 60 minutos para a síntese de c-DNA.

#### 3.7.4.c Reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real time - PCR)

Após a síntese do cDNA, foi realizada reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação do c-DNA para ANP, NPR-A e NPR-C com pares de "primers" baseados em seqüências previamente publicadas. Para amplificar ANP os seguintes "primers" foram utilizados: CAG CAT GGG CTC CTT CTC CA e TCC GCT CTG GGC TCC AAT CCT; para amplificar NPR-A ATC ACA GTG AAT CAC CAG GAG TTC e AGA TGT AGA TAA CTC TGC CCT TTC G. E para amplificar NPR-C, os "primers" foram CCT ACA ATT TCG ACG AGA CCA AA e ACT CGC TCA CTG CCC TGG ATG TA.

A PCR quantitativa em tempo real é uma tecnologia empregada para se detectar os produtos da PCR a cada ciclo da reação. Seus principais atrativos incluem a possibilidade de se gerar dados em duas ou três horas. Além da rapidez, esta tecnologia também reduz as variáveis e o risco de contaminação por ser confeccionada em sistemas fechados.

A técnica que usa o composto *SYBR GREEN* tem como base uma molécula fluorogênica altamente específica ao DNA dupla fita. Essa molécula em solução exibe pouca fluorescência, mas durante a PCR várias moléculas fluorogênicas se ligam ao DNA, em locais formados por depressões da estrutura tridimensional da molécula de DNA (*minor groove*), aumentando consideravelmente a fluorescência emitida tornando possível a detecção dos fragmentos de DNA amplificados por aparelhos adequados.

A análise da expressão diferencial através da PCR em tempo real é feita baseada nos valores de CT (*threshold cycle*), definido como o ponto em que o sinal de fluorescência emitido tem o primeiro registro estatisticamente superior à fluorescência basal, o que sempre ocorre durante a fase exponencial de amplificação (Gibson *et al.*, 1996). Com isso são calculados os valores de quantificação absoluta ou relativa, dependendo do objetivo do estudo e dos dados gerados (Livak & Schmittgen, 2001).

Para a reação de PCR em tempo real foi utilizado um protocolo básico em todas as reações, mantendo as concentrações usuais de reagente num volume final de 25µl. Resumidamente a reação consistiu-se de: 2µl de cDNA e 23µl de uma solução *mix* composta por 3µl do *primer* senso (1 ou 5 pmol/µl), 3µl do *primer* antissenso (1 ou 5 pmol/µl; Invitrogen, Brasil) e por 17µl de *SYBR® Green Master Mix* (Applied Biosystems, Warrington WA, UK). Cada amostra foi feita em duplicata, inclusive os controles negativos que tiveram o cDNA, substituído pelo mesmo volume de água na reação.

A reação em tempo real foi realizada utilizando-se o aparelho *ABI Prism 7000 SDS* (Applied Biosystems, Warrington WA, UK) no seguinte ciclo termal: [estágio 1] um ciclo de 52°C/2 min.; [estágio 2] um ciclo de 95°C/10 min.; [estágio 3] 40 ciclos de 95°C/0,15 min e 50°C/1 min.

O gene que apresenta uma expressão constitutiva constante, não sendo influenciado pelo tratamento ou pela fase do desenvolvimento do tecido em estudo escolhido foi o S26 (gene *housekeeping*) de acordo com a literatura e testes preliminares.

A média dos valores de CT de cada duplicata obtida pelos genes de interesse foi calculada e subtraída a média dos valores de CT das duplicatas obtidas pelo gene normalizador (S26), gerando o delta CT ( $\Delta$ CT). Em seguida, estes valores foram aplicados na seguinte fórmula:  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

### 3.8 DOSAGEM DE CITOCINAS SÉRICAS

Foram realizadas dosagens de citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF $\alpha$ , sendo as determinações analíticas realizadas pelo método de *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA) por meio de kits da *Invitrogen-BioSource International* em parceria com o

Núcleo de Doenças Infecciosas (NDI) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) em amostras de soro dos animais. A técnica se baseia no método sanduíche. Amostras de soro armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  foram previamente descongeladas e colocadas em placas individuais sensibilizadas, uma com anticorpo específico para IL-6 e outra para TNF- $\alpha$  de rato. As amostras, incluindo os padrões de conteúdos conhecidos de IL-6 e TNF- $\alpha$  e espécimes controle foram pipetadas para os diferentes poços, seguidos da adição de um segundo anticorpo monoclonal conjugado. Após esta etapa seguiu-se o período de incubação por 2 horas. Durante a primeira incubação a IL-6 e o TNF- $\alpha$  se ligam simultaneamente ao anticorpo imobilizado (captação) em um sítio, e ao segundo anticorpo conjugado (adicionado) em um segundo sítio. Após a remoção do excesso de segundo anticorpo por 4 sucessivas lavagens, a enzima estreptavidina-peroxidase foi adicionada. Esta se liga ao anticorpo conjugado para completar os quatro membros do sanduíche. Após uma nova incubação por 30 minutos e novamente quatro sucessivas lavagens para remoção de todas as enzimas não ligadas, uma solução substrato (cromógeno) foi adicionada e que reage com a enzima para produção de cor azul. A intensidade do produto colorido é diretamente proporcional à concentração das citocinas presentes.

O procedimento do ELISA foi realizado para duplicatas das amostras e padrões, sendo realizada a média entre as absorvâncias a partir da leitura realizada através do aparelho Dynex Technologies – analisador automático de ELISA, em comprimento de onda de 450nm. Para correções de diluições sofridas durante o procedimento, as médias foram multiplicadas por 2, obtendo-se o valor real da absorvância. As concentrações das citocinas foram calculadas a partir da absorvância real de acordo com o modelo matemático abaixo:

Sendo para IL-6 ( $R^2 = 0,996$ ;  $SE = 0,038$ ;  $P = 10,10\%$ ) a equação de estimativa da

$$\text{concentração descrita pela fórmula: } conc = -\frac{\ln\left(\frac{1,9944 - abs}{1,9072}\right)}{0,0011}$$

Já para TNF- $\alpha$  ( $R^2 = 0,995$ ;  $SE = 0,045$ ;  $P = 5,99\%$ ) a equação de estimativa da

$$\text{concentração descrita pela fórmula: } conc = -\frac{\ln\left(\frac{1,8473 - abs}{1,6231}\right)}{0,0049}$$



### 3.9 DOSAGEM DA EXPRESSÃO PROTÉICA DA eNOS

Após a retirada de um segmento da aorta torácica superior das fêmeas foi obtido homogeneizado protéico das amostras, que foram mantidas refrigeradas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até serem usadas. Dosagem de proteína total foi realizada como descrito acima. As amostras ( $50\mu\text{g}$ ) foram submetidas a uma eletroforese em gel (acrilamida/bisacrilamida 29:1), sendo o gel de separação a 7,5% preparado em tampão contendo 1,5 M tris-HCl pH 8,8 e 0,1% de SDS e o gel de entrada (stacking gel) a 4% em tampão 0,5 M tris-HCl pH 6,8 e 0,1% de SDS. A composição do tampão de eletroforese foi 25 mM de tris-HCl pH 8,3, 200 mM de glicina e 1% de SDS.

A eletroforese das proteínas foi realizada a 80 Volts com duração de 2h30min. Após a eletroforese, as bandas protéicas foram transferidas para a membrana de PVDF utilizando-se tampão com 25 mM de tris, 193 mM de glicina e 20% de metanol. A transferência foi feita em cuba semi-seca (Hoeffer-Scientific), por 55 minutos, sendo a amperagem estabelecida em função da área da membrana.

Após a transferência das bandas de proteínas, a membrana de PVDF, foi incubada por 2 horas em uma solução constituída de leite em pó desnatado a 5% em tampão TBS (10 mM de tris-HCl pH 7,4 e 100 mM de NaCl), à temperatura ambiente sob agitação leve e depois lavada 6 vezes em tampão TBS-tween 0,1% por 5 minutos. Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo monoclonal específico para eNOS (1:2500, BD Transduction Laboratories, Lexington, UK) e para  $\alpha$ -actina (1:2500, Sigma) por 4 horas a temperatura ambiente. Após este período, a membrana foi lavada 6 vezes (5 minutos em cada lavagem) em tampão TBS-tween 0,1%, sob agitação leve em temperatura ambiente e incubada com o anticorpo secundário (IgG, anti-camundongo conjugado para fosfatase alcalina - 1:10000, Abcam Inc.) por 1 hora, à temperatura ambiente, sob agitação suave, e seguida de 6 lavagens (5 minutos em cada lavagem) em tampão TBS-tween.

A banda da proteína eNOS foi revelada utilizando-se o Kit NBT/BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate nitroblue tetrazolium (NBT)/5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP) - Invitrogen). A solução de NBT/BCIP foi colocada sobre a membrana de PVDF e sob agitação, as bandas com a expressão protéica da eNOS da  $\alpha$ -actina foram reveladas. As membranas tiveram suas imagens digitalizadas com o auxílio do *scanner*, as quais foram salvas em arquivo tipo "TIF". Em seguida, as bandas foram quantificas

com o auxílio do programa *ImageJ* (domínio público). Os dados da expressão protéica da eNOS foram mostrados pela razão da densidade da banda da eNOS pela banda da  $\alpha$ -actina (proteína normalizadora) em unidades arbitrárias.

### 3.10 REATIVIDADE VASCULAR EM ANÉIS DE AORTA ISOLADO

No último dia do protocolo experimental o ramo descendente da aorta torácica foi cuidadosamente removido e rapidamente imerso em uma placa de petri contendo solução nutritiva de Krebs-Henseleit. Em seguida, foi removido o tecido conjuntivo e adiposo adjacente à artéria e então, o vaso foi cortado em anéis de 4 a 5 mm de comprimento. Para a obtenção do registro de tensão isométrica, cada anel vascular foi colocado em um banho, contendo solução de Krebs-Henseleit, aerado continuamente com mistura carbogênica, mantido à temperatura de 37° C e pH de 7,4, de acordo com o método descrito por Marin *et al.* (1988). Os anéis isolados foram montados em uma preparação com suportes de acrílico fixados em cubas de vidro. Essa montagem foi realizada de forma que as duas hastes metálicas ficaram paralelas na luz do vaso, sendo assim, qualquer alteração do diâmetro do vaso foi captada pelo transdutor de força que estava acoplado a um sistema de aquisição de dados.

Uma tensão de repouso de 1,0g foi dada aos anéis e a tensão foi ajustada caso houvesse necessidade a cada 15 minutos, durante período de 45 minutos de estabilização e antes da administração de drogas. Após esse procedimento, a preparação foi submetida a um período de estabilização por aproximadamente 45 minutos e, em seguida, foram iniciados os protocolos experimentais.

Após aproximadamente 45 minutos de estabilização, foi adicionado cloreto de potássio (KCl), com concentração final no banho de 75mM, para verificar a atividade contrátil do músculo liso vascular induzida por despolarização e assim, avaliar a viabilidade das artérias. Após atingirem uma variação de um grama de força, os anéis foram lavados três vezes com solução Krebs. Os anéis que não contraíram 1,0g foram descartados. Trinta minutos após a lavagem, uma nova dose de KCl 75mM foi adicionada ao banho e aguardado um tempo até atingir um platô no registro da contração. Isso foi feito para usar o valor máximo de contração ao KCl para normalizar os dados obtidos nos protocolos experimentais. Após o platô, os anéis foram novamente lavados três vezes e submetidos a um período de 30 minutos de estabilização.

Em seguida, foi avaliada a integridade funcional do endotélio. Os anéis foram pré-contraídos com fenilefrina (0,1  $\mu$ M nos segmentos da artéria aorta) até atingir 50-75% da contração máxima ao segundo KCl. Ao final da contração, ao atingir o platô, foi administrada uma dose única de acetilcolina (ACh) 10  $\mu$ M. A integridade funcional do endotélio foi considerada apenas nos anéis onde a acetilcolina foi capaz de induzir mais de 80% de inibição da contração à fenilefrina. Esse procedimento foi realizado em todos os grupos estudados (SHAM, OVX, EST e TIB), antes de iniciar as curvas dose-resposta.

Trinta minutos após a avaliação da integridade do endotélio, a curva dose-resposta cumulativa à fenilefrina (1 nM – 10  $\mu$ M) e à acetilcolina (0,1 nM - 10  $\mu$ M) foi obtida em anéis separados do mesmo animal. As curvas de acetilcolina foram obtidas em anéis de aorta pré-contraída com fenilefrina (0,1 $\mu$ M). A resposta contrátil (tensão isométrica, em g) foi medida usando um transdutor de força (FT03 modelo, Grass Instrumento Co.) acoplado a um sistema de aquisição de dados (MP100, Biopac Systems, Inc., CA) e foi expressa em porcentagens das respostas máximas.

A sensibilidade da aorta foi avaliada pela determinação do valor pD2 (-log EC<sub>50</sub>), que corresponde ao logaritmo negativo da concentração molar do agonista (EC<sub>50</sub>) que determina um efeito igual a 50% da resposta máxima (Emáx) em experimentos individuais.

### 3.11 EXCREÇÃO DE SÓDIO E VOLUME URINÁRIO

As fêmeas do bloco A foram colocadas em gaiolas metabólicas cinco dias antes do início do protocolo experimental para ambientação e permaneceram lá até o fim deste. A partir do início da administração dos veículos e dos tratamentos foi medido o volume urinário em mililitro (ml) e retiradas alíquotas para dosagem do sódio, as quais foram armazenadas em ependorfes e mantidas sob refrigeração até o final do protocolo para posterior dosagem. As concentrações de sódio foram então quantificadas através de um Fotômetro de Chama (Instrumental Laboratories, modelo 943), utilizando amostra de 25  $\mu$ l de urina diluída em 5 ml de água deionizada. O resultado foi multiplicado pelo fator 2 e a unidade de medida foi mEq/L.

## 3.12 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

### 3.12.1 Bloco A

Antes de iniciar o protocolo experimental as fêmeas foram ambientadas nas gaiolas metabólicas por cinco dias. Após esse período elas foram aleatoriamente separadas em grupo SHAM e OVX e, foram realizados os procedimentos cirúrgicos fictícios e as ovariectomias, respectivamente. As fêmeas permaneceram na gaiola por 35 dias, porém, a partir do 21º dia, a TH foi iniciada e o volume urinário foi medido diariamente até o 35º dia. No 34º dia as ratas foram cateterizadas via artéria femoral para possibilitar a medida direta da pressão arterial (PA). No último dia do protocolo experimental foram realizadas medidas da PA e FC nas fêmeas acordadas. O útero, coração e os rins foram retirados para avaliação da massa desses órgãos.

### 3.12.2 Bloco B

1º dia do protocolo:

- Verificação do peso corporal
- Execução da técnica da ovariectomia nos animais, com exceção das fêmeas SHAM, em que foi realizada uma cirurgia fictícia;

7º e 14º dia do protocolo:

- Verificação do peso corporal;

21º dia do protocolo:

- Verificação do peso corporal para cálculo da dose a ser administrada nos animais ovariectomizados tratados com 17 $\beta$ -estradiol (0,5 $\mu$ g/Kg peso corporal), e tibolona (1,5mg/Kg peso corporal). Os animais SHAM e OVX receberam veículo (água e óleo de milho);

28º dia do protocolo:

- Verificação do peso corporal para ajuste da dose a ser administrada a cada animal tratado com 17 $\beta$ -estradiol e tibolona;

35º dia do protocolo:

- Após a verificação do peso corporal as fêmeas foram guilhotinadas. O plasma e o soro foram coletados para posterior análise dos níveis de ANP e citocinas (IL-6 e TNF- $\alpha$ ), respectivamente. Os átrios e os rins foram retirados e conservados a -80°C para análise do conteúdo e expressão gênica atrial e, NPRs renais. Segmento da artéria torácica superior foi retirada para análise da expressão protéica da eNOS e anéis do ramo descendente da artéria torácica foram utilizados na avaliação da reatividade vascular.

### 3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Na análise dos dados do sistema de peptídeos foi efetuada análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls.

As respostas contráteis à fenilefrina e à acetilcolina foram expressas como porcentagem de vasoconstrição e vasorrelaxamento, respectivamente, induzido por estes fármacos. Para a determinação dos valores de resposta máxima ( $E_{máx}$ ) e  $pD_2$  ( $-\log EC_{50}$ ) para fenilefrina, foi realizada uma análise de regressão não-linear, obtida através da análise das curvas concentração-resposta utilizando o programa GraphPad Prism Software (San Diego, CA, USA). A análise estatística desses dados foi realizada por análise de variância (ANOVA), uma e/ou duas vias para medidas repetidas ou completamente randomizada, seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey.

Para as demais variáveis do estudo, foi aplicado análise de variância (ANOVA) uma via seguido pelo teste *post-hoc* de Fisher para múltiplas comparações.

Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 4 RESULTADOS

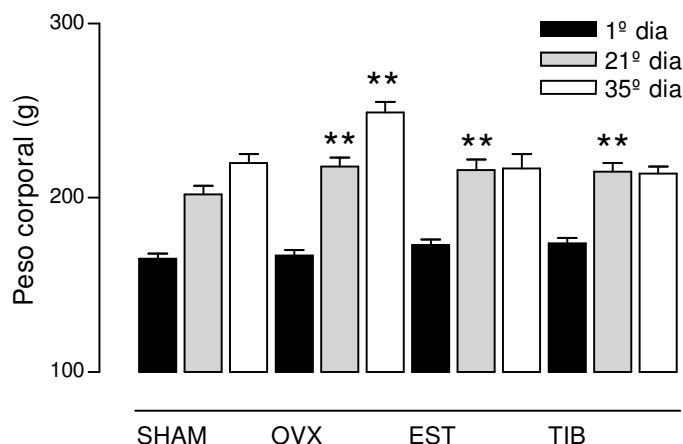
### 4.1 PESO CORPORAL E RAZÃO DE PESO SECO PELO PESO CORPORAL DO ÚTERO, DAS CÂMARAS CARDÍACAS E DOS RINS

O peso corporal dos animais experimentais foi medido ao longo dos 35 dias de protocolo. Na tabela 1 e figura 5 encontram-se os resultados obtidos nos diferentes grupos, com relação ao peso corporal ao iniciar o protocolo experimental (1<sup>o</sup> dia), ao iniciar o tratamento (21<sup>o</sup> dia) e o peso final (35<sup>a</sup> dia) dos grupos controle (SHAM), ovariectomizado (OVX), ovariectomizado tratado com 17 $\beta$ -estradiol (EST) e ovariectomizado tratado com tibolona (TIB). Os dados mostram que não havia diferença de peso entre os grupos no início do protocolo. Contudo, no 21<sup>o</sup> dia de protocolo todos os grupos ovariectomizados apresentaram um ganho de peso corporal. Após 14 dias de tratamento com 17 $\beta$ -estradiol (EST) ou tibolona (TIB), os grupos ovariectomizados e tratados, não apresentaram diferença em relação ao SHAM, porém, as ratas ovariectomizadas (OVX), que receberam apenas veículo como tratamento, apresentaram peso corporal superior aos demais grupos.

**Tabela 1:** Peso corporal das fêmeas em gramas (g) observados no 1<sup>o</sup> (peso inicial), 21<sup>o</sup> (peso de início dos tratamentos) e 35<sup>o</sup> (peso final) dias do protocolo experimental dos grupos SHAM, ovariectomizadas (OVX), ovariectomizadas tratadas com 17 $\beta$ -estradiol (EST) e ovariectomizadas tratadas com tibolona (TIB).

PROTOCLO	GRUPOS (n=8)			
	SHAM	OVX	EST	TIB
1 <sup>o</sup> dia - peso (g)	165 $\pm$ 5	167 $\pm$ 3	173 $\pm$ 4	174 $\pm$ 3
21 <sup>o</sup> dia - peso (g)	202 $\pm$ 5	218 $\pm$ 5**	216 $\pm$ 6**	215 $\pm$ 5**
35 <sup>o</sup> dia - peso (g)	220 $\pm$ 5	249 $\pm$ 6**	217 $\pm$ 8	214 $\pm$ 4

Valores expressos como média  $\pm$  EPM. \*\* $p < 0,01$  quando comparado ao grupo SHAM.



**Figura 5:** Peso corporal das fêmeas em gramas (g) observado no 1º (peso inicial), 21º (peso de início dos tratamentos) e 35º (peso final) dias do protocolo experimental dos grupos SHAM, ovariectomizadas (OVX), ovariectomizadas tratadas com 17β-estradiol (EST) e ovariectomizadas tratadas com tibolona (TIB). \*\* $p < 0,01$  quando comparado ao grupo SHAM.

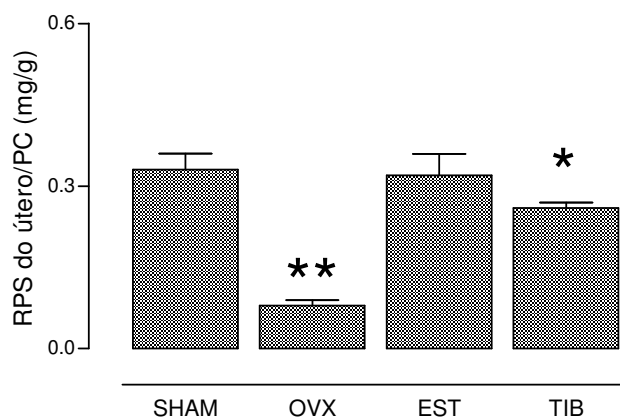
Com o objetivo de avaliar os efeitos do tratamento com 17β-estradiol e tibolona sobre o útero, o coração e os rins, ao final do protocolo experimental, as vísceras foram retiradas e pesadas. Pelos resultados apresentados na tabela 2, a eficácia da ovariectomia pode ser comprovada pela redução significativa dos valores da razão do peso seco do útero (RPS) pelo peso corporal (PC, mg/g), nas fêmeas ovariectomizadas (OVX) quando comparados aos demais grupos. O RPS/PC das fêmeas tratadas com 17β-estradiol (EST) apresentou valores semelhantes ao grupo SHAM. Entretanto, os grupos castrados tratados com tibolona apresentaram um resultado diferente. Houve um aumento desses parâmetros comparados ao grupo OVX, mas que não retornaram aos valores normais, quando comparados ao grupo SHAM. Esses dados podem ser mais bem visualizados na figura 6, que demonstra o resultado da razão de peso seco do útero entre os diferentes grupos.

Em relação à RPS/PC (mg/g) das câmaras cardíacas e dos rins observa-se que não há alteração nesses parâmetros quando as ratas são submetidas à ovariectomia e nem quando essas são tratadas com as drogas propostas no presente estudo, objetivando uma reposição hormonal (tabela 2).

**Tabela 2:** Razão de peso seco (RPS) do útero, átrio direito e esquerdo, ventrículo direito e esquerdo, rim direito e esquerdo pelo peso corporal (PC, mg/g) dos grupos SHAM, ovariectomizadas (OVX), ovariectomizadas tratadas com 17 $\beta$ -estradiol (EST) e com tibolona (TIB).

RPS/PC (mg/g)	GRUPOS (n=8)			
	SHAM	OVX	EST	TIB
Útero	0,33 $\pm$ 0,03	0,08 $\pm$ 0,01**	0,32 $\pm$ 0,04**	0,26 $\pm$ 0,01***
Átrio direito	0,011 $\pm$ 0,001	0,014 $\pm$ 0,002	0,011 $\pm$ 0,001	0,015 $\pm$ 0,004
Átrio esquerdo	0,018 $\pm$ 0,003	0,023 $\pm$ 0,002	0,016 $\pm$ 0,001	0,022 $\pm$ 0,003
Ventrículo direito	0,12 $\pm$ 0,08	0,13 $\pm$ 0,05	0,13 $\pm$ 0,04	0,12 $\pm$ 0,08
Ventrículo Esquerdo	0,43 $\pm$ 0,02	0,43 $\pm$ 0,03	0,41 $\pm$ 0,02	0,45 $\pm$ 0,02
Rim direito	5,42 $\pm$ 0,29	5,34 $\pm$ 0,29	5,15 $\pm$ 0,25	5,48 $\pm$ 0,34
Rim esquerdo	5,42 $\pm$ 0,33	5,51 $\pm$ 0,31	5,04 $\pm$ 0,26	5,63 $\pm$ 0,35

Valores expressos como média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  comparado ao grupo SHAM. \*\*\* $p < 0,01$  comparado ao grupo OVX.



**Figura 6:** Razão de peso seco (RPS) do útero pelo peso corporal (PC, mg/g) dos grupos SHAM, ovariectomizadas (OVX), ovariectomizadas tratadas com 17 $\beta$ -estradiol (EST) ou com tibolona (TIB). \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  comparado ao grupo SHAM.



#### 4.2 TRATAMENTO COM 17 $\beta$ -ESTRADIOL OU TIBOLONA E DADOS HEMODINÂMICOS

A tabela 3 apresenta os resultados da pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), obtidos em ratas acordadas ao final do período experimental. Entretanto, tanto o procedimento de ovariectomia quanto os tratamentos propostos nesse estudo não foram capazes de alterar esses parâmetros hemodinâmicos.

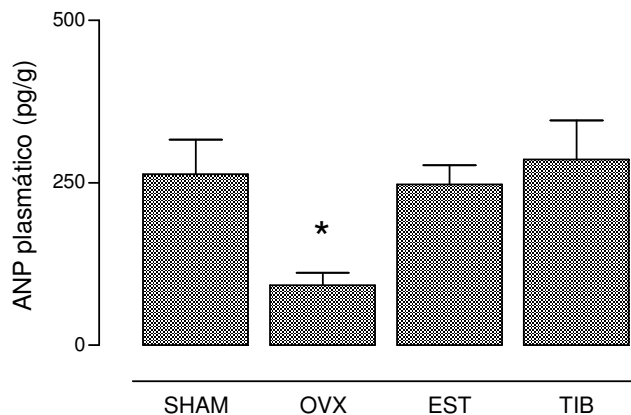
**Tabela 3:** Pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) dos grupos SHAM, ovariectomizadas (OVX), ovariectomizadas tratadas com 17 $\beta$ -estradiol (EST) ou com tibolona (TIB).

DADOS HEMODINÂMICOS	GRUPOS (n=8)			
	SHAM	OVX	EST	TIB
PAS (mm Hg)	120 $\pm$ 3	116 $\pm$ 2	119 $\pm$ 3	118 $\pm$ 2
PAD (mm Hg)	85 $\pm$ 3	80 $\pm$ 2	87 $\pm$ 3	84 $\pm$ 3
PAM (mm Hg)	105 $\pm$ 2	98 $\pm$ 1	101 $\pm$ 2	103 $\pm$ 3
FC (bpm)	373 $\pm$ 7	372 $\pm$ 6	368 $\pm$ 5	364 $\pm$ 9

Valores expressos como média  $\pm$  EPM.

#### 4.3 TRATAMENTO COM 17 $\beta$ -ESTRADIOL OU TIBOLONA SOBRE O SISTEMA DE PEPTÍDEOS NATRIURÉTICOS

Após 35 dias de ovariectomia (OVX) ou 21 dias de ovariectomia seguidos de 14 dias de tratamento com 17 $\beta$ -estradiol (EST) ou tibolona (TIB), o plasma dessas fêmeas foi colhido para comparação dos níveis de ANP com as fêmeas controle (SHAM). Os resultados, apresentados na figura 7, mostram uma redução acentuada nos níveis plasmáticos de ANP no grupo OVX, contudo, após o tratamento hormonal com 17 $\beta$ -estradiol (EST) ou com tibolona (TIB) os níveis plasmáticos de ANP são normalizados ao nível das fêmeas SHAM (SHAM: 263,3  $\pm$  53,3 ; OVX: 92,5  $\pm$  19,5\*; EST: 247,3  $\pm$  29,9; TIB: 285,7  $\pm$  60,4 – pg/ml).



**Figura 7:** Valores dos níveis plasmáticos de ANP (pg/ml) nos grupos SHAM (n=5), ovariectomizadas (OVX, n=8), ovariectomizadas tratadas com  $17\beta$ -estradiol (EST, n=7) e com tibolona (TIB, n=6). \* $p < 0.05$  comparado ao grupo SHAM.

Na tabela 4 são apresentados os resultados das dosagens do conteúdo de ANP no átrio direito (AD) e esquerdo (AE) em  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína total (Prot), assim como, os níveis do RNAm para o ANP no AD e AE em unidades arbitrárias (UA).

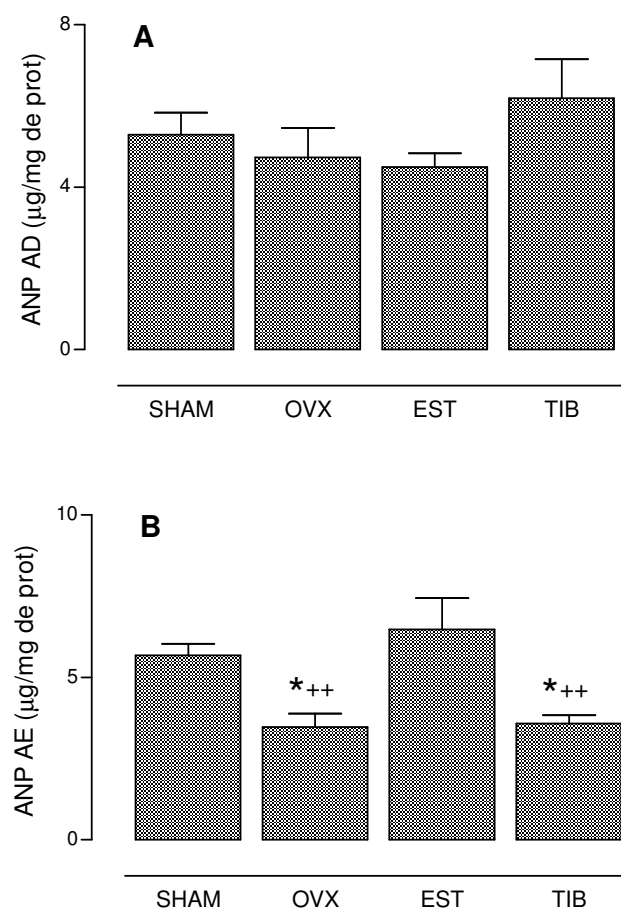
O conteúdo de ANP no átrio esquerdo (figura 8B) foi maior nas ratas SHAM em relação ao grupo OVX, assim, pode-se inferir que a ovariectomia prejudicou os estoques de ANP do átrio esquerdo. Ao comparar o grupo OVX e SHAM com os grupos tratados, observa-se que o grupo EST foi capaz de retornar o conteúdo de ANP do átrio esquerdo ao nível das ratas controles (SHAM), enquanto que, o grupo TIB não normalizou esse parâmetro. Em relação ao átrio direito, não houve diferença no conteúdo de ANP entre os grupos (figura 8A).

Os níveis do RNAm para ANP nos AD e AE foram determinados e os dados mostrados na tabela 4. Assim como os níveis de conteúdo de ANP do AD não apresentaram diferença entre os grupos, os níveis de RNAm para o ANP no AD também não foram diferentes. Em relação aos níveis de RNAm para o ANP no AE, a ovariectomia (OVX) os reduziu e o tratamento com  $17\beta$ -estradiol (EST) ou com tibolona (TIB) normalizou esses níveis quando comparados ao grupo SHAM (figura 9).

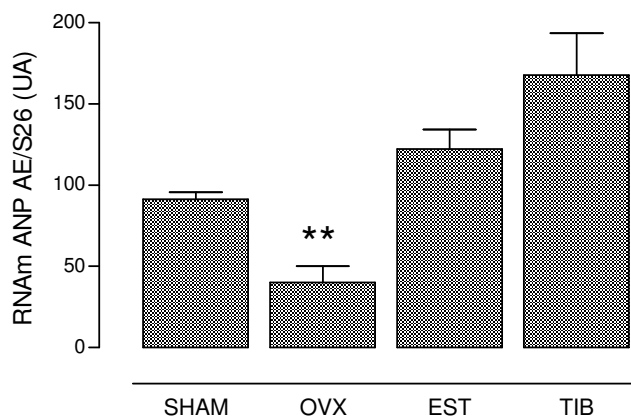
**Tabela 4:** Dosagens do conteúdo de peptídeo natriurético atrial (ANP) no átrio direito (AD) e esquerdo (AE) em  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína total (Prot) e dos níveis do RNAm para o ANP no AD e AE em unidades arbitrárias (UA) através da técnica de PCR real time dos grupos SHAM, ovariectomizadas (OVX), ovariectomizadas tratadas com  $17\beta$ -estradiol (EST) e com tibolona (TIB).

	GRUPOS			
	SHAM (n=8)	OVX (n=6)	EST (n=6)	TIB (n=8)
ANP AD ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ Prot)	5,29 $\pm$ 0,55	4,74 $\pm$ 0,72	4,50 $\pm$ 0,34	6,20 $\pm$ 0,95
ANP AE ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ Prot)	5,68 $\pm$ 0,35	3,48 $\pm$ 0,40 <sup>***</sup>	6,48 $\pm$ 0,97	3,59 $\pm$ 0,25 <sup>***</sup>
RNAm ANP AD/S26 (UA)	255,7 $\pm$ 15,3	287,4 $\pm$ 50,9	284,3 $\pm$ 28,3	486,7 $\pm$ 91,4
RNAm ANP AE/S26 (UA)	91,3 $\pm$ 4,4	40,0 $\pm$ 10,1 <sup>**</sup>	122,3 $\pm$ 12,0	167,9 $\pm$ 25,7

Valores apresentados com media  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  comparado ao SHAM. \*\*\* $p < 0,01$  comparado ao EST.



**Figura 8:** Conteúdo de ANP do átrio direito (AD - A) e átrio esquerdo (AE - B) em µg/mg de proteína (µg/mg de prot) dos grupos SHAM, ovariectomizadas (OVX), ovariectomizadas tratadas com 17β-estradiol (EST) ou tratadas com tibolona (TIB). \* $p < 0.05$  comparado ao grupo SHAM. \*\* $p < 0.01$  comparado ao grupo EST.



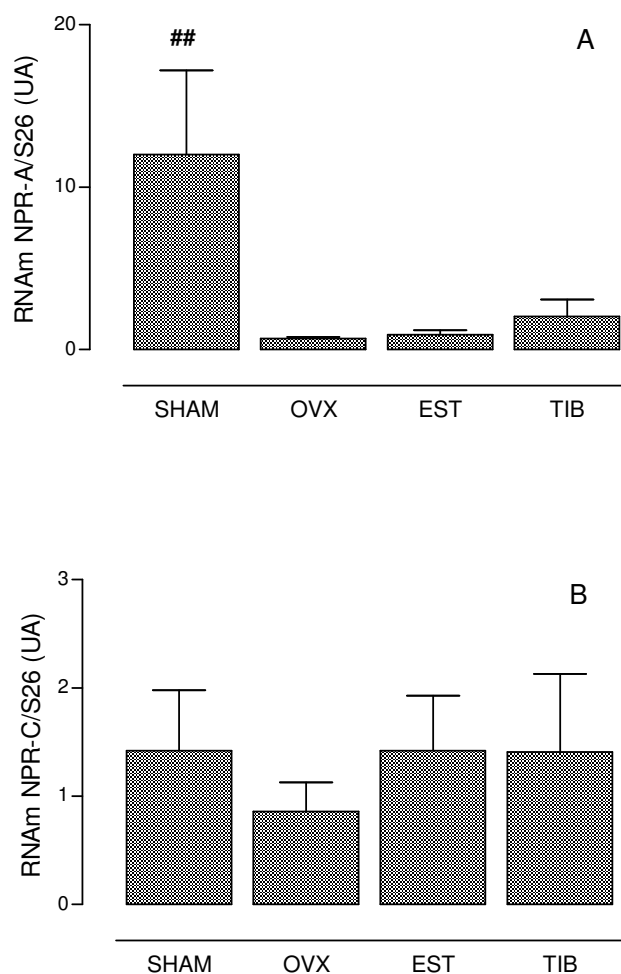
**Figura 9:** Níveis do RNAm do ANP no AE em unidades arbitrárias (UA) através da técnica de PCR real time dos grupos SHAM, ovariectomizadas (OVX), ovariectomizadas tratadas com 17 $\beta$ -estradiol (EST) ou com tibolona (TIB). \*\* $p < 0.01$  comparado ao grupo SHAM.

Em relação aos receptores do ANP nos rins a ovariectomia deprimiu os níveis de RNAm do receptor de ANP do tipo A (NPR-A) e os tratamentos com 17 $\beta$ -estradiol (EST) e tibolona (TIB) não foram capazes de normalizar esse parâmetro. Já em relação aos níveis de RNAm para o receptor de ANP do tipo C (NPR-C), esses não foram alterados nos grupos estudados, ou seja, o grupo SHAM, OVX e os tratados (EST e TIB) apresentaram os mesmos níveis de RNAm para esses receptores (tabela 5 e figuras 10).

**Tabela 5:** Níveis renais de RNAm do receptor de ANP do tipo A (NPR-A) e do tipo C (NPR-C) em unidades arbitrárias (UA) através da técnica de PCR real time dos grupos SHAM, ovariectomizadas (OVX), ovariectomizadas tratadas com 17 $\beta$ -estradiol (EST) ou com tibolona (TIB).

	GRUPOS			
	SHAM (n=8)	OVX (n=6)	EST (n=6)	TIB (n=8)
RNAm NPR-A/S26 (UA)	12,00 $\pm$ 5,20 <sup>\$\$</sup>	0,68 $\pm$ 0,11	0,92 $\pm$ 0,28	2,04 $\pm$ 1,04
RNAm NPR-C/S26 (UA)	1,42 $\pm$ 0,56	0,86 $\pm$ 0,27	1,42 $\pm$ 0,51	1,41 $\pm$ 0,72

Valores apresentados com media  $\pm$  EPM. <sup>\$\$</sup> $p < 0,01$  comparado aos demais grupos.



**Figura 10:** Níveis renais de RNAm do receptor de ANP do tipo A (NPR-A; A) e do tipo C (NPR-C; B) em unidades arbitrárias (UA) através da técnica de PCR real time dos grupos SHAM, ovariectomizadas (OVX), ovariectomizadas tratadas com  $17\beta$ -estradiol (EST) ou com tibolona (TIB).  $##p < 0,01$  comparado aos demais grupos.

#### 4.4 TRATAMENTO COM $17\beta$ -ESTRADIOL OU TIBOLONA SOBRE AS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS

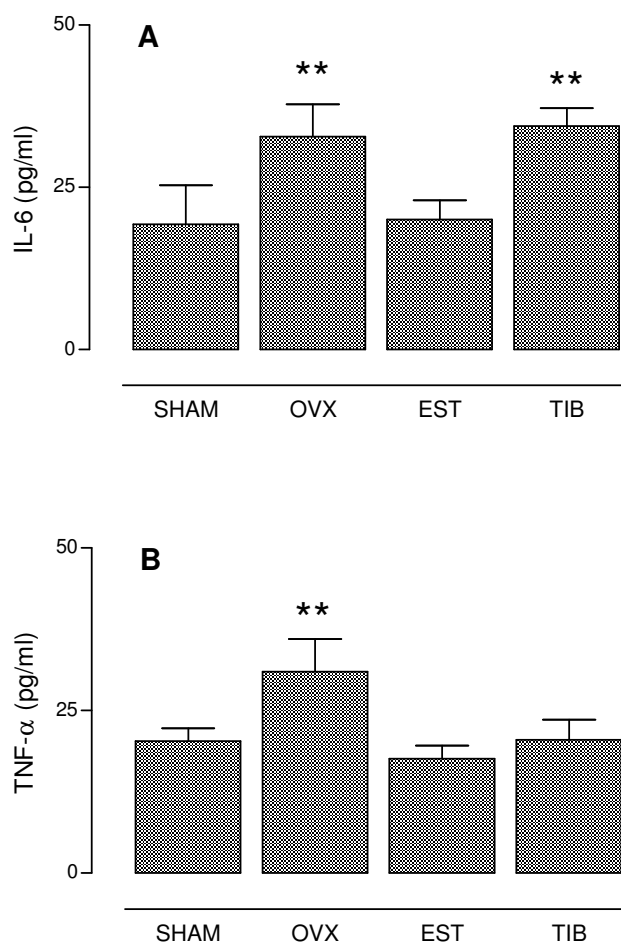
Na tabela 6 e figura 11 estão demonstrados os resultados referentes às dosagens das citocinas pró-inflamatórias no soro das fêmeas do grupo SHAM, ovariectomizadas (OVX), ovariectomizadas tratadas com  $17\beta$ -estradiol (EST) e tratadas com tibolona (TIB). As dosagens foram realizadas pelo método de ELISA descrito anteriormente. Observa-se um aumento significativo nos níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias

(IL-6 e TNF- $\alpha$ ) nas fêmeas OVX quando comparado às fêmeas do grupo controle (SHAM). O tratamento com estrogênio foi capaz de diminuir esses níveis próximos aos valores do SHAM. Já o tratamento com tibolona, apesar de apresentar efeito anti-pró-inflamatório, já que foi eficaz em reduzir os níveis de TNF- $\alpha$ , não diminuiu os níveis de IL-6 ao compará-lo aos níveis do grupo SHAM.

**Tabela 6:** Marcadores da Inflamação. O impacto da terapia hormonal nas fêmeas SHAM, ovariectomizadas (OVX), ovariectomizadas tratadas com 17 $\beta$ -estradiol (EST) ou tibolona (TIB) sobre os níveis de IL-6 e TNF- $\alpha$ .

GRUPOS (n=6)	TNF- $\alpha$ (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)
SHAM	20,3 $\pm$ 2,0	19,3 $\pm$ 6,0
OVX	31,0 $\pm$ 5,0**	32,8 $\pm$ 5,0**
EST	17,6 $\pm$ 2,0	20,0 $\pm$ 3,0
TIB	20,5 $\pm$ 3,1	34,4 $\pm$ 2,8**

Valores apresentados com media  $\pm$  EPM. \*\* $p < 0,01$  comparado ao SHAM.



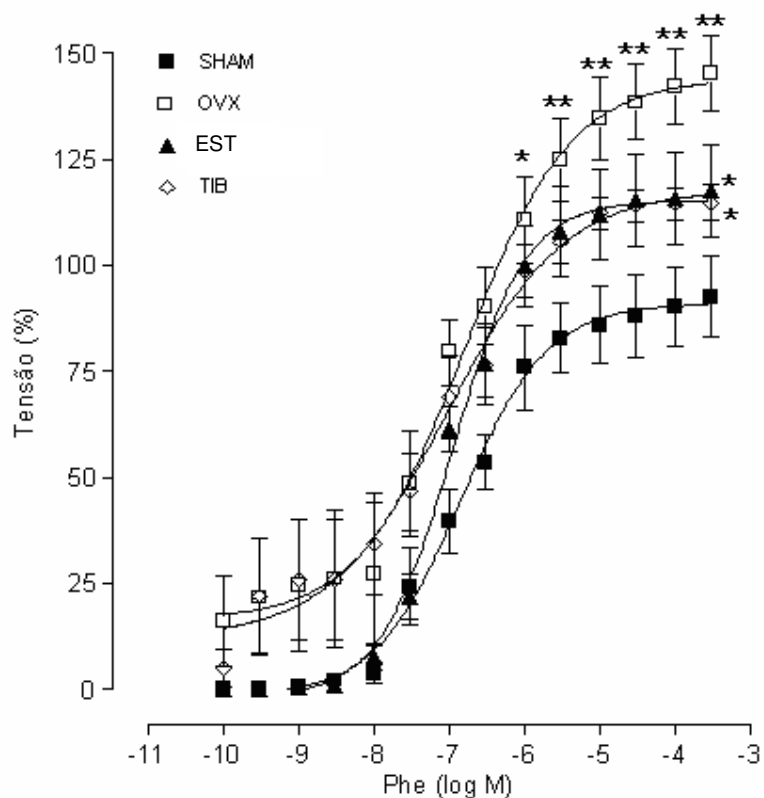
**Figura 11:** Valores dos níveis séricos de IL-6 (A) e TNF- $\alpha$  (B) em pg/ml dos grupos SHAM, ovariectomizadas (OVX), ovariectomizadas tratadas com  $17\beta$ -estradiol (EST) ou tratadas com tibolona (TIB). \*\* $p < 0,01$  comparado ao grupo SHAM.

#### 4.5 REATIVIDADE VASCULAR E EXPRESSÃO DA eNOS EM ANÉIS DE AORTA

Para avaliar a reatividade vascular, frente ao protocolo experimental proposto no estudo, foram utilizados anéis de aorta isolados dos grupos SHAM, OVX, EST e TIB. Para avaliação da resposta vasoconstrictora foi utilizada a fenilefrina (Phe) e para avaliar a resposta vasodilatadora foi utilizada a acetilcolina (Ach), ambas na presença do endotélio.



Como esperado, a Phe promoveu contração dos anéis da aorta dependente da concentração em todos os grupos estudados (figura 12). A ovariectomia (OVX) foi capaz de aumentar a resposta contrátil à Phe comparado ao grupo SHAM, contudo o tratamento de ratas ovariectomizadas com  $17\beta$ -estradiol (EST) ou com tibolona (TIB) foi capaz de normalizar essa resposta. Os valores de  $E_{m\acute{a}x}$  e  $pD_2$  são mostrados na tabela 7. Esses dados mostram a influência da deficiência do estrogênio em aumentar a resposta máxima ( $E_{m\acute{a}x}$ ) contrátil da fenilefrina no vaso estudado, sem, entretanto, alterar a sua sensibilidade ( $pD_2$ ) e a normalização parcial dessa resposta pelos tratamentos,  $17\beta$ -estradiol ou tibolona.



**Figura 12:** Curva de concentração dose-resposta à fenilefrina (Phe) em anéis de aorta com endotélio intacto obtido a partir de ratas SHAM (n=6), ovariectomizadas (OVX, n=5), OVX tratada com  $17\beta$ -estradiol (EST, n=6) ou OVX tratada com tibolona (TIB, n=8). Os valores foram apresentados como média  $\pm$  EPM. \*\* $p < 0,01$  comparado ao OVX.

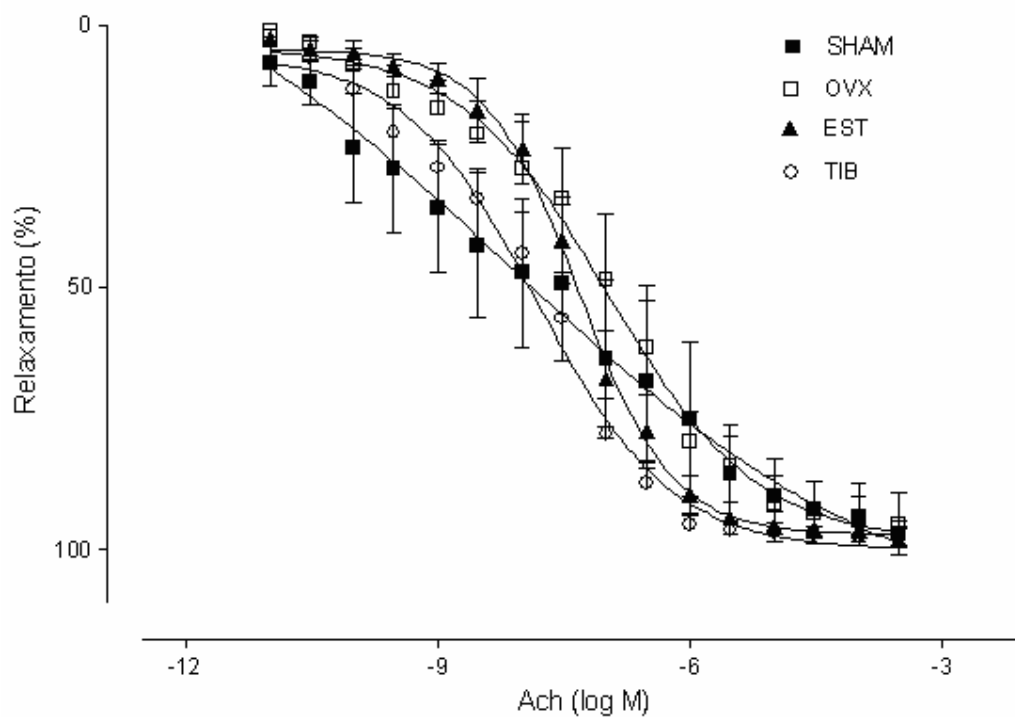
**Tabela 7:** Valor da resposta máxima ( $E_{m\acute{a}x}$ ) e do log da concentração da droga para produzir 50% da resposta máxima ( $pD_2$ ) nos anéis de aorta em resposta a

injeções de concentrações crescentes de fenilefrina (Phe) nos grupos SHAM, ovariectomizada (OVX), OVX tratadas com  $17\beta$ -estradiol (EST) ou OVX tratada com tibolona (TIB).

GRUPOS	Em <sub>áx</sub>	pD <sub>2</sub>
SHAM (n=6)	91,0 ± 3,9**	6,84 ± 0,13
OVX (n=5)	140,0 ± 5,5	6,84 ± 0,20
EST (n=6)	115,4 ± 3,7*	6,95 ± 0,10
TIB (n=8)	113,2 ± 5,1*	6,95 ± 0,22

Valores apresentados como média ± EPM. \*\*p<0,01/\*p<0,05 comparado ao OVX.

O relaxamento dependente do endotélio foi avaliado através das curvas dose-resposta à acetilcolina (figura 13 e tabela 8) e foi similar para todos os grupos, ou seja, não houve diferença significativa entre os grupos aos diferentes tratamentos de quando comparado ao grupo SHAM e ao grupo de ratas ovariectomizadas (OVX). Os valores de Em<sub>áx</sub> e pD<sub>2</sub> são mostrados na tabela 8.



**Figura 13:** Curva de concentração dose-resposta à acetilcolina (Ach) em anéis de aorta com endotélio intacto obtido a partir de ratas SHAM (n=6), ovariectomizadas (OVX, n=5), OVX tratada com 17 $\beta$ -estradiol (EST, n=5) ou OVX tratada com Tibolona (TIB, n=7).

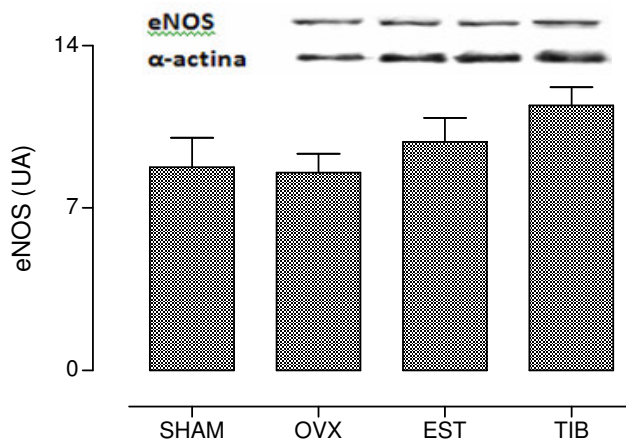
**Tabela 8:** Valor da resposta máxima (Emáx) e do log da concentração da droga para produzir 50% da resposta máxima (pD2) nos anéis de aorta em resposta a administração de concentrações crescentes de acetilcolina (Ach) nos grupos SHAM, ovariectomizada (OVX), OVX tratada com 17 $\beta$ -estradiol (EST) ou OVX tratada com Tibolona (TIB).

GRUPOS	Emáx	pD2
SHAM (n=6)	115,4 $\pm$ 9,9	8,10 $\pm$ 0,9
OVX (n=5)	98,50 $\pm$ 5,6	6,97 $\pm$ 0,19
EST (n=5)	97,07 $\pm$ 2,3	7,32 $\pm$ 0,08
TIB (n=7)	100,0 $\pm$ 2,5	7,82 $\pm$ 0,15

Valores apresentados como média  $\pm$  EPM.

Com objetivo de determinar se a ovariectomia e os tratamentos com 17 $\beta$ -estradiol e tibolona exercem alguma influência sobre a expressão da eNOS nas ratas e, se essa influência pode relacionar-se com a diferença na reatividade vascular em anéis de aorta, foi comparada a expressão protéica da eNOS em anéis de artéria torácica superior dos grupos SHAM, OVX, EST e TIB.

Os resultados da expressão dessa proteína no segmento torácico da aorta nos grupos estudados são mostrados na figura 14. Os animais ovariectomizados e os que receberam o tratamento com as terapias hormonais não apresentaram diferença nos níveis de expressão protéica de eNOS ao serem comparados ao grupo SHAM (SHAM: 8,75  $\pm$  1,28; OVX: 8,52  $\pm$  0,82; EST: 8,97  $\pm$  1,34; TIB: 11,43  $\pm$  0,79 UA).



**Figura 14:** Expressão de óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) no segmento de aorta torácica superior em unidades arbitrárias (UA) dos grupos SHAM (n=6), Ovariectomizada (OVX, n=6), OVX tratada com 17 $\beta$ -estradiol (EST, n=6) ou OVX tratada com Tibolona (TIB, n=6) através da técnica de Western Blotting.

#### 4.6 AVALIAÇÃO DA EXCREÇÃO DE SÓDIO E VOLUME URINÁRIO

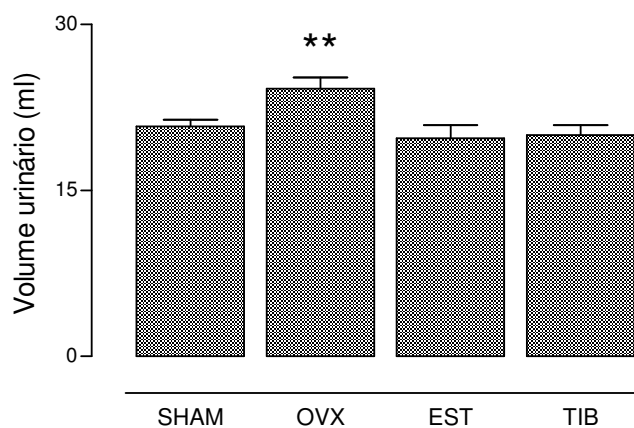
As médias dos valores de volume urinário durante os 14 dias de tratamento estão mostradas na tabela 9 e na figura 15. Os resultados mostram que a castração aumentou o volume urinário excretado no grupo OVX e o tratamento com tibolona (TIB) e 17 $\beta$ -estradiol (EST) retornou aos níveis controles o volume urinário (SHAM).

Ao analisar a excreção de sódio (Na<sup>+</sup>) urinário nos grupos estudados (tabela 9 e figura 16), a ovariectomia também promoveu um aumento da excreção desse íon, porém a administração de 17 $\beta$ -estradiol (EST) ou tibolona (TIB) foi capaz de normalizar a excreção de Na<sup>+</sup> aos valores das fêmeas controles (SHAM).

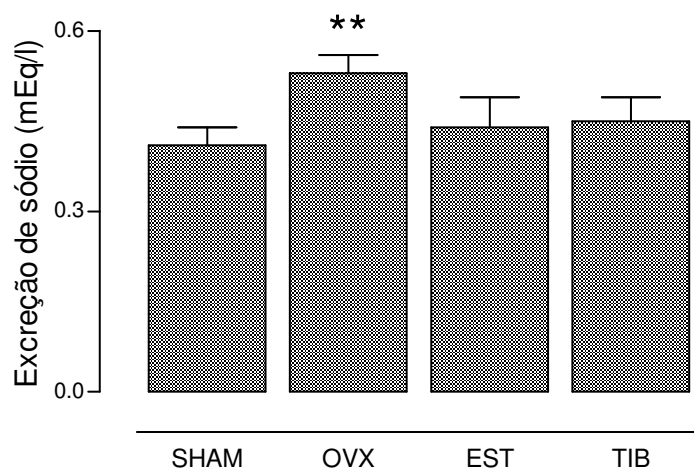
**Tabela 9:** Valores médios da excreção de sódio (mEq/l) e volume urinário (ml) dos grupos SHAM, ovariectomizadas (OVX), ovariectomizadas tratadas com 17 $\beta$ -estradiol (EST) ou com tibolona (TIB).

	GRUPOS (n=8)			
	SHAM	OVX	EST	TIB
Volume urinário (ml)	3,7 $\pm$ 0,2	5,2 $\pm$ 0,3**	3,7 $\pm$ 0,4	4,5 $\pm$ 0,5
Excreção de sódio (mEq/l)	0,41 $\pm$ 0,03	0,53 $\pm$ 0,03**	0,44 $\pm$ 0,05	0,45 $\pm$ 0,04

Valores expressos como média  $\pm$  EPM. \*\* $p < 0,01$  quando comparado ao grupo SHAM.



**Figura 15:** Valores médios do volume urinário (ml) diário, dos grupos SHAM, ovariectomizadas (OVX), ovariectomizadas tratadas com 17 $\beta$ -estradiol (EST) ou com tibolona (TIB). \*\* $p < 0,01$  comparado ao grupo SHAM.



**Figura 16:** Valores médios da excreção de sódio (mEq/l) diário, dos grupos SHAM, ovariectomizadas (OVX), ovariectomizadas tratadas com  $17\beta$ -estradiol (EST) ou com tibolona (TIB).  $**p < 0,01$  comparado ao grupo SHAM.

## 5 DISCUSSÃO

Os dados desse estudo evidenciam pela primeira vez a influência do tratamento com tibolona sobre o ANP em fêmeas ovariectomizadas, simultaneamente, caracterizam parâmetros hemodinâmicos e imunológicos dessas fêmeas, demonstrando que o sistema de peptídeos natriuréticos sofre influência da terapia hormonal (TH).

As fêmeas, após 35 dias de privação de hormônios estrogênicos, apesar de não terem alterações nos parâmetros hemodinâmicos avaliados, apresentaram prejuízo na reatividade vascular da aorta torácica, na pressão de perfusão coronariana e aumento de citocinas pró-inflamatórias. Adicionalmente, acompanhando todas essas alterações, os níveis plasmáticos e atriais de ANP no grupo OVX encontraram-se prejudicados. Dados da literatura apontam funções cardiovasculares e imunológicas para o ANP, portanto, modificações no sistema de peptídeos natriuréticos, poderiam ser um dos responsáveis por essas alterações cardiovasculares e imunológicas nas fêmeas ovariectomizadas. Por outro lado, foi possível verificar que a reposição hormonal com  $17\beta$ -estradiol normalizou os parâmetros alterados no grupo OVX. Isso retrata que o estrogênio influencia esse sistema de peptídeos e a normalização desse sistema, por sua vez, pode ser uma via para esclarecer o papel cardioprotetor e imunológico do estrogênio (Bruce-Keller et al., 2001; Ghisletti et al., 2005; Xing et al., 2009; Gameiro & Romao, 2010).

Como alternativa de reposição hormonal, surge a tibolona, que assim como o  $17\beta$ -estradiol, foi capaz de normalizar a reatividade vascular das ratas e possui papel semelhante a este hormônio sobre o sistema de peptídeo natriurético. Porém, diferente do efeito do  $17\beta$ -estradiol sobre os níveis de citocinas, a tibolona somente normalizou os níveis de TNF- $\alpha$ , não sendo capaz de alterar os níveis séricos de IL-6.

A razão de peso seco pelo peso corporal (RPS/PC) do útero foi realizada como medida indireta da deficiência estrogênica, assim, as alterações encontradas nas fêmeas ovariectomizadas são relacionadas ao menor nível de hormônios estrogênicos neste grupo. Essa deficiência pôde ser comprovada pela menor RPS/PC do útero das fêmeas ovariectomizadas quando comparado ao SHAM, indicando uma atrofia da massa uterina no grupo OVX, explicado pela retirada dos ovários, que, produziram uma redução dos

níveis estrogênicos. Dados da literatura, confirmam, por medidas diretas, que após 30 dias de ovariectomia os níveis plasmáticos de estradiol estão reduzidos (Moysés et al., 2001), como também, após três semanas (Belo et al., 2004), tempo de ovariectomia equivalente ao praticado no presente estudo. Já o tratamento com  $17\beta$ -estradiol normalizou a RPS/PC do útero. Este resultado demonstra um efeito proliferativo do estrogênio neste órgão que também já é conhecido (Nash et al., 1989; Syed et al., 2001; Deroo & Korach, 2006), comprovado pela utilização de antagonista de RE, o qual inibe a hipertrofia dessas células (Syed et al., 2001).

Por outro lado, o tratamento com tibolona, normalizou parcialmente o peso do útero, ou seja, a RPS/PC do útero não retornou aos níveis do grupo SHAM. Esse fato pode ser explicado por três motivos: um efeito estrogênico fraco da tibolona e/ou de seus metabólitos hidroxilados tecido específico; devido à atividade progestogênica de um dos metabólitos conhecidos e, a inibição da sulfatase em células endometriais pela tibolona. O metabólito, o isômero  $\Delta$ -4-tibolona, pode ser convertido pela enzima  $3\beta$ -hidroxiesteróide-desidrogenase-isomerase ( $3\beta$ -HSD-Isomerase) a partir da própria tibolona ou do metabólito  $3\beta$ -OH, sendo o responsável pelas atividades androgênicas e progestogênicas, sendo este último hormônio descrito como um importante atenuador dos efeitos estrogênicos em alguns tecidos, principalmente no tecido uterino (Kloosterboer, 2001; Reed & Kloosterboer, 2004).

O grupo OVX, além das alterações citadas acima, apresentou um ganho de peso corporal após 21 (vinte e um) dias de ovariectomia que se manteve até o 35º dia comparado ao grupo SHAM. As fêmeas ovariectomizadas que iniciaram a TH no 21º dia, por sua vez, tiveram seu peso corporal normalizado ao término do protocolo experimental, ou seja, uma redução substancial do peso corporal foi obtida pela TH nos animais OVX. Esses dados indicam que, a menopausa cirúrgica através da ovariectomia, levou ao aumento do peso das fêmeas, resultados também encontrados em outros estudos (Kasugai et al., 1998; Yoshitake et al., 1999; Jankowski et al., 2001; Kloosterboer & Ederveen, 2003; Reed & Kloosterboer, 2004; Babaei et al., 2010) e com dados prévios em nosso laboratório de pesquisa (Moysés et al., 2001). Alguns estudos sugerem que há uma associação da pós-menopausa e o aumento da massa gorda corporal e declínio da massa magra corporal (Hanggi et al., 1998; Arabi et al., 2003), tendo os estrógenos um importante papel na regulação do desenvolvimento do tecido adiposo. Dados apontam que a TH com estradiol diminui o peso corporal e o tecido adiposo visceral (Munoz et al., 2002; Cooke & Naaz, 2004; Belo et al., 2008; Babaei et



al., 2010). Adicionalmente, modelos genéticos demonstram fortes evidências de que os estrógenos modulam a quantidade de tecido adiposo, pois, fêmeas Knockout para receptor de estrogênio e camundongos fêmeas deficientes de aromatase apresentaram um grande aumento de massa adiposa (Heine et al., 2000; Jones et al., 2000). Um dos mecanismos pelo qual o estrogênio poderia modular a massa adiposa foi proposto por Homma e colaboradores (2000), mostrando que os estrógenos têm ação direta nos adipócitos, diminuindo a lipogênese através da redução da atividade da lipase. Enquanto que, a ação indireta dos estrógenos foi demonstrada por Palin e colaboradores (2003) pela indução da enzima lipolítica lipase hormônio-sensível.

Nas últimas décadas, foi demonstrada a produção de ANP pelo tecido adiposo (Crandall et al., 1992), a presença de receptores de peptídeos natriuréticos neste tecido (Okamura et al., 1988; Sarzani et al., 1996; Dessi-Fulgheri et al., 1997; Sarzani et al., 1999) e sua ação como agente lipolítico (Sengenès et al., 2000; Moro et al., 2004; Langin et al., 2005; Yu et al., 2008), assim como, as ações dos estrógenos sobre o sistema de peptídeos, estimulando a liberação de ANP (Deng & Kaufman, 1993; Zhang & Novak, 1995; Belo et al., 2004), aumentando a expressão gênica e a produção de ANP no coração (Deng & Kaufman 1993; Jankowski et al., 2001). Embora, a massa de gordura visceral das fêmeas no presente estudo, não tenha sido mensurada, a deficiência dos níveis de ANP no grupo OVX, poderia contribuir para o aumento do peso corporal, através do aumento da massa visceral das fêmeas com deficiência de estrogênio. Essa sugestão pode ser sustentada, pelo fato de já ser conhecido que o nível de ANP plasmático é inversamente correlacionado com a massa de gordura e que indivíduos obesos ou sobrepesos apresentam baixos níveis plasmáticos de ANP comparados a indivíduos com índice de massa corporal normal (Wang et al., 2004; Khush et al., 2006). Os resultados do presente estudo apontam deficiência nos níveis de ANP plasmático e atrial esquerdo, diminuição da expressão gênica do ANP atrial esquerdo e deficiência do NPR-A renal nas fêmeas ovariectomizadas comparadas ao grupo SHAM. A reposição hormonal com 17 $\beta$ -estradiol e com tibolona, foi capaz de normalizar o sistema de peptídeos (exceto o RNAm do NPR-A renal), como também o peso corporal, mostrando indicativos de que normalização do sistema de peptídeos contribuiu para a diminuição do peso corporal nas fêmeas ovariectomizadas que receberam a terapia hormonal. Esses achados são semelhantes aos encontrados por Belo e colaboradores (2008), apesar destes terem avaliado a deficiência de estrógenos, o prejuízo no sistema de peptídeos e a obesidade em camundongos fêmeas knockout para receptor de hormônio

folículo estimulante (FORKO). Esses pesquisadores mostram que as fêmeas FORKO com tendência para obesidade têm prejuízo no sistema de peptídeos e que, o curto tratamento com 17 $\beta$ -estradiol melhora essas condições por aumentar a síntese de ANP atrial, bem como, pela diminuição do clearance de ANP, provavelmente mediada pelos NPR-C do tecido adiposo mesentérico.

Outros mecanismos, pelos quais, os estrógenos podem influenciar no peso corporal das fêmeas são também estudados. A leptina, um hormônio produzido pelos adipócitos, tem sido relatado na literatura como um importante fator hormonal ao nível hipotalâmico (Riccioni et al, 2003) e seus níveis têm sido correlacionados positivamente com o peso corporal, com o índice de massa corporal e com a circunferência abdominal (Bednarek-Tupikowska et al., 2006). O estradiol apresenta um pequeno, mas significativo efeito na redução dos níveis séricos de leptina em mulheres na pós-menopausa (Gol et al; 2005), que poderia ser relacionado com o não ganho de peso nessas mulheres quando tratadas com estrógenos. Pantaleão e colaboradores (2010) mostraram um aumento dos níveis de leptina observado em ratas ovariectomizadas e concluíram ser o estradiol necessário para a ação hipotalâmica da leptina. Outros estudos também apontam que o ganho de peso no período de privação de estrógenos está intimamente associado com diminuição da sensibilidade à insulina (Heine et al.,2000; Saengsirisuwan et al., 2009; Babaei et al., 2010); interação entre o estradiol e a colecistocinina (Butera et al., 1993; Asarian & Geary, 1999; Geary et al., 2001), como também, pela interação dos estrógenos com peptídeos orexígenos, grelina (Clegg et al., 2007) e neuropeptídeo Y (Bonavera et al., 1994; Santollo & Eckel, 2008).

A ação estrogênica sobre a ingestão alimentar descrita na literatura, também mostra a influência desse hormônio sobre o peso das fêmeas. Uma evidência em apoio a esta constatação vem de estudos em que a ovariectomia levou a hiperfagia e ganho de peso (Wade & Gray, 1979), os quais foram prevenidos por tratamento com estradiol (Asarian & Geary, 2002). Em estudos recentes, Santollo e colaboradores (2010), utilizando-se de antagonista seletivos de RE  $\alpha$  e  $\beta$ , concluíram que a ativação de RE $\alpha$  é necessária para o efeito anorexígeno do estradiol exógeno e endógeno em ratas. Estudos anteriores sugerem também que a ausência de RE $\alpha$  ou a falta de estrógenos ligantes nesses receptores levam a hipertrofia e hiperplasia de adipócitos (Heine et al., 2000; Pallottini et al., 2008).

Em relação aos efeitos do tratamento com tibolona sobre o peso corporal, os dados são conflitantes, sendo que há autores que relatam não haver alteração (Prelevic et al., 1997; Meeuwssen et al., 2001; Gol et al., 2005) ou que há uma redução desse parâmetro (Kasugai et al., 1998). Todavia, pode-se sugerir que devido aos efeitos estrogênicos da tibolona, esse resultado possa ser semelhante ao observado com o tratamento com  $17\beta$ -estradiol, o que justificaria o não ganho de peso nas ratas ovariectomizadas e tratadas com tibolona. De acordo com os parâmetros avaliados neste estudo, sugere-se que um dos mecanismos, pelos quais a tibolona normalizou o peso das fêmeas também possa ser devido a sua ação ao aumentar os níveis plasmáticos de ANP.

Ao avaliar os resultados do peso das câmaras cardíacas dos diferentes grupos estudados, pode-se observar através da RPS/PC que a ovariectomia não foi capaz de alterar essa razão após 35 dias e o tratamento tanto de tibolona, quanto com  $17\beta$ -estradiol, não alterou esses parâmetros. Ou seja, apesar da influência dos estrógenos sobre o sistema de peptídeos natriuréticos, as RPS/PC das câmaras cardíacas não foram alteradas com a deficiência de estrógenos.

Os resultados deste estudo corroboram com os dados da literatura que mostram alterações no sistema de peptídeos sem alterar a massa do átrio (Gutkowska et al., 2007) e a massa cardíaca (Belo et al., 2008), porém este utilizou um diferente modelo de deficiência de estrogênio em fêmeas. Por outro lado, outros estudos mostram alterações da RPS/PC das câmaras cardíacas na deficiência de estrógenos no átrio (Jankowski et al., 2001) e no ventrículo (Gutkowska et al., 2007). Essas diferenças podem estar relacionadas à espécie ou linhagem do animal estudado, ao tempo de ovariectomia, a dose, ao período e via de administração do tratamento com  $17\beta$ -estradiol, entre outros fatores. As fêmeas OVX não tiveram aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca, que quando aumentados também poderiam levar a hipertrofia cardíaca (Bissoli et al., 2009).

Outro fato que pode influenciar nos resultados da massa cardíaca nesses animais é a forma, pela qual, é realizada a razão das câmaras cardíacas. Estudos recentes, que avaliam a hipertrofia após longo período de ovariectomia mostraram ausência desta, por meio da RPS/PC, contudo, ao analisar a RPS pelo comprimento da tibia esquerda, as fêmeas ovariectomizadas apresentaram hipertrofia cardíaca (Lee et al.; 2008; Liou et al., 2010) e o tratamento com  $17\beta$ -estradiol foi capaz de normalizar esse parâmetro (Liou et al., 2010).

O ANP é amplamente conhecido como regulador da homeostase induzindo a vasodilatação, natriurese e diurese, bem como, opõe-se ao sistema renina-angiotensina-aldosterona (Nakao et al., 1992). A intensidade desse efeito é regulada pelo balanço entre a sua síntese e degradação. Apesar do efeito vasodilatador do ANP, níveis plasmáticos diminuídos nas fêmeas ovariectomizadas, não levaram à alterações hemodinâmicas estudados ao final dos 35 dias de privação de hormônios estrogênicos. A PAS, PAD, PAM e FC mantiveram-se semelhantes entre os grupos, SHAM, OVX, EST e TIB, mostrando a ausência de efeito do  $17\beta$ -estradiol e da tibolona sobre a pressão sanguínea em animais normotensos e pelo período experimental utilizado no presente estudo. Mulheres na pós-menopausa que receberam TH com estradiol e diidrogesterona por três meses, apesar dos níveis de ANP e BNP plasmáticos se elevarem, os valores de PAS e PAD se mantiveram inalterados (Maffei et al., 2001). Outros resultados usando fêmeas normotensas que receberam TH corroboram com os achados atuais (Hoeg et al., 1977; Jankowski et al., 2001; Belo et al., 2004). Em contrapartida, estudo mostra que o tratamento das ratas ovariectomizadas com  $17\beta$ -estradiol aumentou no plasma o estradiol a níveis suprafisiológicas e levou a diminuição da FC (Jankowski et al., 2001).

Em relação à tibolona, Cicinelli e colaboradores (2002) relataram que após o tratamento com esta droga, mulheres saudáveis na pós-menopausa tiveram uma leve redução, mas não significativa, da pressão arterial sistólica e diastólica. Em uma revisão, Albertazzi e colaboradores (1998) mostraram que o uso da tibolona, em mulheres saudáveis na pós-menopausa, aumenta o fluxo sanguíneo periférico sem mudanças na pressão arterial ou no débito cardíaco.

O papel anti-hipertensivo do ANP fica mais evidente em situação de hipertensão. Belo e colaboradores (2004) mostraram que em fêmeas hipertensas (SHR) e ovariectomizadas, a reposição hormonal com o  $17\beta$ -estradiol foi capaz de reduzir a PA com um concomitante aumento na síntese e liberação do ANP, sugerindo a participação do ANP modulado pelo  $17\beta$ -estradiol na pressão arterial em ratas SHR.

A influência da tibolona sobre o sistema de peptídeos natriuréticos pela primeira vez foi estudada. Os dados mostram que o tratamento com essa droga sintética esteroideal, derivado da 19-nortestosterona, aumenta a liberação e síntese de ANP. Entretanto, essa droga não apresentou influência sobre a expressão do RNAm dos NPR-A e NPR-C renais. Respostas semelhantes foram encontradas neste estudo, com a TH utilizando-se

do 17 $\beta$ -estradiol, sugerindo que os metabólitos 3 $\alpha$ -OH e 3 $\beta$ -OH da tibolona agem sobre o coração em receptores estrogênicos e que, ambas as drogas, podem estar atuando por meio de um efeito direto na expressão gênica cardíaca do ANP.

A influência dos hormônios estrogênicos e do ANP sobre o sistema cardiovascular tem sido extensamente estudada. Contudo, pouco se sabe sobre a influência dos estrógenos sobre a síntese, liberação e o clearance de ANP. Em 1977, Stumpf e colaboradores, através de estudos autoradiográficos mostraram a ligação do estradiol em núcleos de células do miocárdio de átrios e aurículas. Posteriormente, a presença de RE, necessários para os efeitos genômicos e síntese de proteínas, foi demonstrada em miócitos cardíacos e fibroblastos (Grohé et al., 1994; Jankowski et al., 2001). Para elucidar por qual subtipo de RE os estrógenos poderiam exercer suas ações no átrio e assim, estudar sua influência sobre o ANP, Jankowski e colaboradores (2001), quantificaram os RNAm dos RE $\alpha$  e RE $\beta$  no coração de ratas recém nascidas e adultas. Eles mostraram uma maior expressão gênica do RE $\alpha$  do que do RE $\beta$  em átrios de ratas adultas e, após a ovariectomia, houve uma diminuição da expressão gênica e protéica do RE $\alpha$ , revertida após a TH com 17 $\beta$ -estradiol. Além da ovariectomia reduzir os RE $\alpha$  no átrio, essas alterações vieram acompanhadas de redução nos níveis de ANP plasmático, no conteúdo de ANP atrial direito e na expressão de RNAm do ANP em ambos os átrios. O tratamento com 17 $\beta$ -estradiol, por sua vez, normalizou a expressão gênica e protéica do RE $\alpha$  e, aumentou a síntese e a liberação de ANP. Esses resultados sugerem que a ovariectomia levou a *down-regulation* de RE $\alpha$  indicando que sua presença é necessária à ação cardioprotetora dos estrógenos mediada pelo ANP.

Em humanos, estudos mostraram que os níveis de ANP em mulheres jovens é em média o dobro dos homens e que essa diferença desaparece após a menopausa (Clark et al., 1990). Em animais o estradiol foi capaz de aumentar a secreção basal de ANP em átrios perfundidos e isolados (Deng & Kaufman, 1993) e aumentar o nível plasmático de ANP durante a gestação (Zhang & Novak, 1995). Entretanto, poucos estudos investigaram os efeitos da TH nos níveis circulantes da ANP em mulheres pós-menopausa e resultados conflitantes têm sido obtidos. Maffei e colaboradores (2001) mostraram níveis elevados de ANP e BNP plasmáticos após 3 meses de TH com estradiol combinado com diidrogesterona em mulheres com idade média de 51,9  $\pm$  4,6 anos, apresentando sintomas do climatério. Por outro lado, Davidson e colaboradores (1988) não observaram alterações nos níveis plasmáticos de ANP em mulheres em

terapia de reposição estrogênica, e outro estudo mostra ainda redução desses níveis em mulheres na pós-menopausa (Spinetti et al., 1997).

Resultados semelhantes sobre a influência dos estrógenos no sistema de peptídeos natriuréticos foram encontrados neste estudo, que corroboram com os dados da literatura (Zhang & Novak, 1995; Belo et al., 2004; Deng & Kaufman, 1993; Hong et al., 1992; Gutkowska et al., 2007). Sugestivamente, as fêmeas ovariectomizadas no presente estudo, possivelmente, tiveram uma *down-regulation* de RE $\alpha$  atrial, que por sua vez, reduziu os níveis plasmáticos de ANP, embora, o conteúdo de ANP atrial direito tenha sido mantido equivalente ao grupo SHAM. As alterações foram mostradas no átrio esquerdo, onde o conteúdo e o RNAm de ANP atrial apresentaram-se reduzidos. O tratamento com 17 $\beta$ -estradiol normalizou todos esses parâmetros. Tanto no grupo OVX quanto no grupo EST, as variações do ANP no plasma foram correlacionadas com as mudanças na concentração do ANP no átrio esquerdo e não no átrio direito, diferentemente, do estudo de Jankowski e colaboradores (2001) que encontrou diferença do conteúdo de ANP apenas no átrio direito. Esses resultados diferentes podem ser atribuídos a diversos fatores, os mais relevantes são referentes à linhagem do animal estudado, ao tempo de ovariectomia, à alta dose de 17 $\beta$ -estradiol (25 $\mu$ g/dia) que elevou o estradiol no plasma a níveis suprafisiológicos, a redução do peso do átrio, encontrada nas fêmeas ovariectomizadas e a bradicardia nas ratas ovariectomizadas tratadas com 17 $\beta$ -estradiol. Estudos mostraram que, em resposta à expansão de volume, o átrio direito de ratos é a principal fonte liberadora de ANP, resultando em redução da frequência cardíaca (Gutkowska et al., 1997; Favaretto et al, 1997). Porém, neste estudo, os níveis e a expressão de RNAm de ANP em ambos os átrios das fêmeas não foram avaliados em resposta à expansão do volume e sim à deficiência estrogênica, além disso, as fêmeas não apresentaram alterações hemodinâmicas.

Belo e colaboradores (2004) após tratar fêmeas ovariectomizadas normotensas e hipertensas por 4 dias com 17 $\beta$ -estradiol, observou nas ratas normotensas aumento nos níveis plasmáticos de ANP, sem alteração do conteúdo atrial e expressão levemente elevada do RNAm do ANP em ambos os átrios das fêmeas tratadas. Enquanto, nas ratas hipertensas, o 17 $\beta$ -estradiol promoveu o aumento da liberação e síntese de ANP atrial, ocasionada pelo aumento da expressão de RNAm do ANP de ambos os átrios, embora, o tratamento tenha induzido um maior aumento do RNAm no átrio esquerdo do que no átrio direito. Devido às divergências dos dados da literatura, esses

pesquisadores sugeriram que alterações na síntese e liberação de ANP nos átrios podem diferir conforme situações fisiopatológicas tempo dependente, como sugerido acima.

A TH com a tibolona nas fêmeas ovariectomizadas, assim como o  $17\beta$ -estradiol, normalizou os níveis plasmáticos de ANP mediado pela normalização da expressão gênica do RNAm do ANP atrial esquerdo, contudo, diferentemente da resposta ao  $17\beta$ -estradiol, o conteúdo de ANP do átrio esquerdo não foi normalizado, ou seja, as fêmeas ovariectomizadas e as tratadas com tibolona apresentaram quantidades equivalentes de ANP no átrio esquerdo. A tibolona, assim como o estradiol e ovariectomia, não influenciou na síntese e na liberação de ANP no átrio direito.

Resultados divergentes da TH com a tibolona versus estradiol podem ser justificados pelo fato da tibolona pertencer a uma classe de compostos classificada como regulador tecido seletivo da atividade estrogênica. A tibolona, como descrito acima, não age somente sobre RE, seus metabólitos atuam também sobre receptores androgênicos e progestagênicos (Rymer et al., 1994; Reed & Kloosterboer, 2004). Os metabólitos  $3\alpha$ -OH e  $3\beta$ -OH da tibolona são, possivelmente, os responsáveis pelos resultados equivalentes da tibolona em relação à TH com  $17\beta$ -estradiol sobre a síntese e a liberação do ANP atrial, provavelmente devido esses metabólitos agirem preferencialmente sobre RE $\alpha$  (De Gooyer et al., 2003). Com relação ao estoque atrial, a divergência de resultados, pode ser devido à presença do isômero  $\Delta^4$ -tibolona identificado como sendo responsável pela ligação e ativação de receptores de progesterona e androgênios gerando assim os efeitos progestogênicos e androgênicos (Kloosterboer, 2000; Kloosterboer, 2001; Kloosterboer 2004) que podem ter ações antagônicas aos efeitos estrogênicos, pois, a ação do  $17\beta$ -estradiol na TH é apenas agonista. Sobre a influência da progesterona no sistema de peptídeos, Zhang e Novak (1995), mostraram que os níveis de ANP plasmáticos foram atenuados pela combinação  $17\beta$ -estradiol com progesterona. No útero de camundongos ovariectomizados, o  $17\beta$ -estradiol estimula o CNP, enquanto a progesterona significativamente atenua este efeito do estrógeno (Acuff et al., 1997). Outros estudos relatam que a progesterona também pode agir diretamente sobre o coração, por conseguinte, pode reduzir a síntese da ANP (Knowlton & Sun, 2001). Adicionalmente, a progesterona pode diminuir o número de receptores de oxitocina, como demonstrado por Grazzini e colaboradores (1998) e essa inibição pode levar à supressão da secreção de ANP (Gutkowska et al., 1997). Porém, dados de Hong

e colaboradores (1992) retratam a ação positiva da progesterona sobre o ANP, pois valores fisiológicos de estradiol e progesterona foram capazes de manter níveis adequados de mRNA do ANP e os andrógenos aumentaram a expressão do gene do ANP *in vivo*.

Somando a essa discussão, que envolve o efeito dos metabólitos da tibolona sobre o sistema de peptídeos, pode-se especular que tibolona normalizou os níveis de ANP circulante, por estimular a síntese de RNAm do ANP e provavelmente por ter exercido estímulo à clivagem e a secreção do ANP dos estoques atriais, diminuindo os estoques de ANP. Outro mecanismo que necessitaria ser elucidado seriam as vias pelas quais os grânulos atriais são formados e quais as influências dos hormônios sexuais na formação desses grânulos. Assim, o metabólito  $\Delta^4$ -tibolona poderia ser o responsável por interferir tanto na maior clivagem e liberação do ANP, reduzindo os estoques, como também alterar os mecanismos de formação dos grânulos de ANP atriais, devido a esse metabólito se ligar a receptores diferentes dos RE.

Para esclarecer se o aumento nos níveis circulantes da ANP foi devido ao aumento na produção desse peptídeo ou a diminuição de sua degradação, o RNAm dos receptores renais de ANP nas fêmeas foram mensurados.

Os efeitos biológicos dos peptídeos natriuréticos são mediados por ligações dos peptídeos com receptores específicos de membrana localizados na superfície de células alvo (Baxter, 2004). O NPR-A tem grande afinidade pelo ANP, possui atividade guanilato ciclase e é mediador das atividades biológicas dos peptídeos natriuréticos. Já o NPR-C, receptor de clearance do ANP, está envolvido na eliminação dos peptídeos natriuréticos, que se ligam aos receptores, são internalizados e enzimaticamente degradados (Potter et al., 2006). Devido o RNAm de ambos os receptores, NPR-A e NPR-C, ser altamente expresso nos rins (Lowe et al, 1989; Schulz et al., 1989; Porter et al., 1990; Wilcox et al., 1991; Nagase et al., 1997; Potter et al., 2006) a expressão gênica desses receptores foram quantificados, pois pouco se sabe sobre a influência da TH sobre esses receptores renais.

Em relação aos NPR renais, a ovariectomia levou à redução do RNAm do NPR-A, enquanto, a expressão gênica do NPR-C não foi alterada neste estudo entre os grupos. Um resultado inesperado mostrou que tanto a TH com 17 $\beta$ -estradiol quanto com a tibolona, não foram capazes de normalizar a expressão gênica do NPR-A renal e não



interferiu no RNAm do NPR-C. Por outro lado, em camundongos fêmeas FORKO, outro modelo animal com deficiência estrogênica associada a hipertensão e a obesidade, Belo e colaboradores (2008), mostraram que a TH com estradiol aumentou os níveis de RNAm do NPR-A e reduziu os níveis de NPR-C renais. Contudo, nas fêmeas controle, o tratamento com estradiol foi capaz de aumentar apenas a expressão gênica do NPR-A, sem alterar a do NPR-C. Dados conflitantes confirmam a necessidade de uma maior investigação sobre os modelos de deficiência estrogênica utilizado em estudos experimentais e a influência da TH sobre os NPR renais.

Como mostrado acima, as TH utilizadas por 14 dias em ratas wistar após 21 dias de ovariectomia, apesar de aumentar os níveis plasmáticos de ANP e a síntese de ANP atrial, não foram capazes de normalizar o RNAm do NPR-A renal, deprimido devido ao período de privação estrogênica. Contudo, pode-se sugerir que o aumento dos níveis circulantes da ANP é devido ao aumento da síntese deste e não pela diminuição do clearance renal, uma vez que a expressão gênica do NPR-C não foi alterada com a ovariectomia e nem com as TH. Caso os resultados experimentais em animais, sejam confirmados em mulheres na fase pós-menopausa, como a redução da ação renal do ANP, associado a um menor nível circulante do hormônio em ratas ovariectomizadas e a não normalização desses receptores renais com a TH, esse poderia ser um dos mecanismos, pelos quais, em algumas mulheres em uso de TH, foram observado aumento de DCV (Hulley et al., 1998; Rossouw et al., 2002; Shumaker et al., 2003; Berg et al., 2006).

Embora as TH estudadas não tenham apresentado efeito sobre a expressão gênica do NPR-A renal, o fato delas terem normalizado os níveis circulantes de ANP, pode ser relevante. É bem descrito que vários outros tecidos expressam o NPR-A, necessário para mediar os efeitos biológicos do ANP. A presença de RNAm de NPR-C em outros tecidos também é observada, contudo, apesar de não ter sido investigada a expressão gênica dos NPR em outros tecidos, torna-se interessante a discussão da presença desses receptores no tecido adiposo envolvendo a TH.

O tecido adiposo apresenta sítios de ligação (De Leon et al., 1995) e secreta ANP (Crandall et al., 1992). Os receptores de ANP, NPR-C e o NPR-A também foram identificados em tecido adiposo de ratos e em humanos (Sarzani et al., 1995; Dessi-Fulgheri et al., 1998). Devido ao fato de em indivíduos obesos ter sido observado baixos níveis circulantes de ANP (Wang et al., 2004), a alta expressão de NPR-C no tecido

adiposo (Sarzani et al., 1996) foi relacionada com a obesidade. Adicionalmente, Belo e colaboradores (2008), foram os primeiros a estudar os efeitos do estrogênio sobre NPR em tecido adiposo. Esses pesquisadores mostraram que a TH com estradiol foi capaz de diminuir a expressão de NPR-C no tecido adiposo mesentérico, sugerindo que o aumento nos níveis circulantes do ANP, não é devido somente ao aumento da síntese, mas também, devido a diminuição do clearance de ANP no tecido adiposo sob a influência estrogênica.

Em analogia aos dados do atual estudo, devido ao ganho de peso das ratas ovariectomizadas e a normalização após as THs, pode-se especular que tanto estradiol quanto a tibolona poderiam induzir uma redução dos receptores de clearance em tecido adiposo e, conseqüentemente, estar contribuindo para um aumento dos níveis plasmáticos de ANP. Assim, o aumento dos níveis plasmáticos de ANP observado nestas fêmeas pode ser devido não só a um aumento na secreção de ANP, mas também a diminuição de sua degradação no tecido adiposo.

Além do NPR-C ser responsável pelo clearance de ANP e a relação deste com o estradiol ter sido explorada, as endopeptidases neutras também são responsáveis por inativar os peptídeos natriuréticos (Kenny et al., 1993; Potter et al., 2006), porém, não foram alvo do atual estudo. Não há dados disponíveis sobre o efeito inibitório do estradiol sobre a degradação da ANP através dos mecanismos via endopeptidase neutra. No entanto, tem sido demonstrado que estradiol diminui o RNAm da endopeptidase neutra no útero de ratos (Pinto et al., 1999). Adicionalmente, a ovariectomia reduz a atividade de endopeptidase neutra no cérebro em 30% e a diminuição dessa atividade pode ser amenizada pela reposição de estrogênio (Huang et al., 2004). Se a endopeptidase neutra vascular se comporta da mesma forma que no útero e no cérebro, os níveis plasmáticos ANP poderiam estar aumentados pelo tratamento com estradiol e, possivelmente também pela tibolona, sugerindo um efeito depressor das TH na endopeptidase neutra. Assim, especulamos que a inibição das endopeptidases neutra também poderia estar envolvida no aumento do ANP circulante, observado em ratas tratadas com estradiol e tibolona.

As interações do sistema imunológico com o endócrino são evidentes, neste último, podemos destacar os hormônios sexuais, pois os estrógenos podem influenciar sensivelmente o sistema imunológico (Lahita, 2000). Além disso, evidências imunológicas, epidemiológicas e clínicas sugerem que os hormônios sexuais femininos

desempenham um papel importante na etiologia e fisiopatologia das doenças inflamatórias crônicas (Cutolo et al., 2010). Nos últimos anos, estudos têm mostrado evidências para ambas as atividades pró e antiinflamatórias dos estrógenos, dependendo de diversos fatores, tais como, o tipo de célula-alvo, o órgão-alvo, tempo e concentração de estrogênio administrado, e na variabilidade da expressão de RE em células específicas (Xing et al., 2009). As ações antiinflamatórias do estrogênio são sustentadas, por exemplo, por estudos que mostram a regulação de genes antiinflamatórios pelo estradiol (Bruce-Keller et al., 2001; Ghisletti et al., 2005; Xing et al., 2009). Adicionalmente, os peptídeos natriuréticos e seus receptores são encontrados em muitas células do sistema imunológico, no entanto, o significado destes peptídeos no sistema imune começou a ser investigado recentemente. Há um maior conhecimento da influência do ANP sobre a resposta inata do que sobre a resposta adquirida, contudo, o ANP, também tem papel na regulação de citocinas da resposta celular e, pouco se sabe, de sua influência sobre a resposta humoral (Vollmar, 2005). Os principais componentes da imunidade inata são os fagócitos, o epitélio e células natural Killer, bem como, as citocinas e as proteínas do sistema complemento (Demsey et al., 2003). Sobre as citocinas, estudos epidemiológicos demonstraram um aumento no risco cardiovascular associado com o aumento de níveis basais de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF- $\alpha$  (Ridker et al., 2000; Gameiro & Romão, 2010). Os níveis de citocinas pró-inflamatórias funcionam como biomarcadores para DCV, que também aumentam durante o avançar da idade (Bruunsgaard, 2006) e deficiência de estrogênio (Pacifci et al., 1996; Vural et al., 2006a; Xing et al., 2009; Gameiro & Romão, 2010).

Existem estudos que exploram os efeitos antiinflamatórios do estrogênio e do ANP, contudo, não há dados da interação desses dois hormônios sobre as citocinas pró-inflamatórias em períodos de privação estrogênica. Para contribuir na elucidação dos mecanismos pelo qual o estradiol possui efeitos cardiovasculares, foi hipotetizado que o ANP poderia participar da redução de citocinas pró-inflamatórias induzidas pelos hormônios estrogênicos em ratas neste estudo. Neste sentido, foi verificado se as THs com tibolona e 17 $\beta$ -estradiol seriam capazes de reverter os níveis de citocinas inflamatórias, via normalização dos níveis plasmáticos de ANP. Os resultados desse estudo, de forma inédita, mostraram que as fêmeas ovariectomizadas apresentaram níveis séricos aumentados de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- $\alpha$ ), que podem ser relacionados com o possível prejuízo nos níveis plasmáticos de ANP. A TH com 17 $\beta$ -

estradiol foi capaz de normalizar o sistema de peptídeos natriuréticos, assim como, os elevados níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias encontrados em fêmeas ovariectomizadas. Por outro lado, o tratamento com a tibolona, apesar de normalizar os níveis plasmáticos de ANP, atenuou apenas os níveis de TNF- $\alpha$ , permanecendo elevados os níveis séricos de IL-6, equivalentes aos das fêmeas ovariectomizadas.

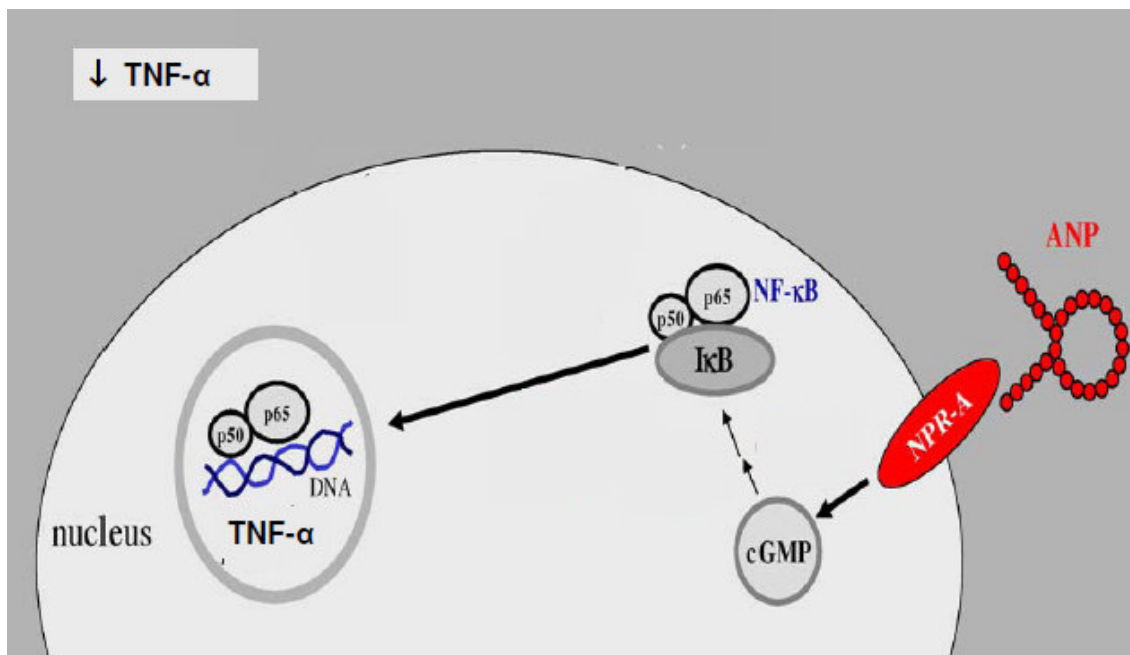
Estudos demonstram que os estrógenos são capazes de diminuir os níveis de TNF- $\alpha$ , como o realizado por Arenas e colaboradores (2005), em que os animais ovariectomizados apresentavam níveis elevados de TNF- $\alpha$  e, o tratamento com estrogênio foi capaz de diminuir esses níveis. Da mesma forma, outros estudos, porém em humanos, demonstraram que a deficiência de estrogênios pode aumentar a liberação das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , e que a TH pode inibir a expressão e liberação destas citocinas (Morishita et al., 1999; Vural et al., 2006b). Vural e colaboradores (2006b) mostraram que mulheres na pós-menopausa apresentaram níveis plasmáticos elevados de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10 e a TH por dois meses, com estrogênio conjugado e medroxiprogesterona, reduziu TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ . Entretanto, um estudo realizado em mulheres, demonstrou um efeito dose-dependente dos estrógenos sobre as citocinas. Esse estudo avaliou a TH com baixas e altas doses de estrogênio eqüino conjugado, no qual, foi observado elevação de níveis de IL-6 em pacientes que fizeram terapia com altas doses e, nenhuma alteração em mulheres que utilizaram baixas doses (Wakatsuki et al, 2003). Porém, dados observados no atual estudo são semelhantes aos recentes resultados da literatura. Foram mostrados níveis elevados de TNF- $\alpha$  no ventrículo esquerdo em ratas, após 14 semanas de ovariectomia e que o tratamento com 17 $\beta$ -estradiol, por 10 semanas, foi capaz de normalizar esses níveis (Liou et al., 2010).

Quanto à participação dos estrógenos no sistema imunológico, estudos mostram a presença de RE em células envolvidas na resposta imune (Stygar et al. 2001; Molero et al., 2002; Stygar et al., 2007). Adicionalmente, peptídeos natriuréticos, especialmente o ANP e seus receptores, são expressos e regulados em células imunes (Vollmar et al., 1990; Vollmar & Schulz, 1990; Vollmar et al., 1996; Liu & Malik, 2006), principalmente em macrófagos (Vollmar & Schulz, 1994; Vollmar & Schulz, 1995; Kiemer & Vollmar, 1998). Além disso, ambos, ANP e NPR, são regulados por estímulos inflamatórios, sugerindo que os peptídeos natriuréticos atuam como proteínas reguladoras no processo inflamatório (Vollmar & Schulz, 1994; Vollmar, 2005). Diante do exposto, parece que, tanto o estradiol quanto o ANP, participam da resposta imune em

receptores independentes, assim, através dos resultados atuais e dados da literatura, torna-se possível especular qual a possível interação entre esses dois fatores humorais.

Uma via comum para o mecanismo da resposta antiinflamatória do estradiol e do ANP é via a atenuação do fator nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B; Kalaitzidis & Gilmore, 2005; Dai et al., 2007; Kiemer et al., 2000; Ladetzki-Baehs et al., 2007). Estudos mostram que no início dos processos inflamatórios as respostas imunológicas são reguladas por um fator de transcrição induzível chave, o NF- $\kappa$ B (Liu & Malik, 2006; Vlantis & Pasparakis, 2010). A família do NF- $\kappa$ B inclui cinco membros, p65 (Rel-a), c-Rel, Rel-B, NF- $\kappa$ B1 (p50 e seu precursor p105) e NF- $\kappa$ B2 (p52 e seu precursor p100). Apesar do presente estudo não analisar a expressão protéica do NF- $\kappa$ B, foi medido os níveis séricos de TNF- $\alpha$ , que por sua vez, é regulada por mecanismos de transcrição, no qual, estudos sugerem ser via NF- $\kappa$ B (Liu et al., 2000; Hitti et al., 2006; Yang et al., 2009; Vlantis e Pasparakis, 2010; Falvo et al., 2010).

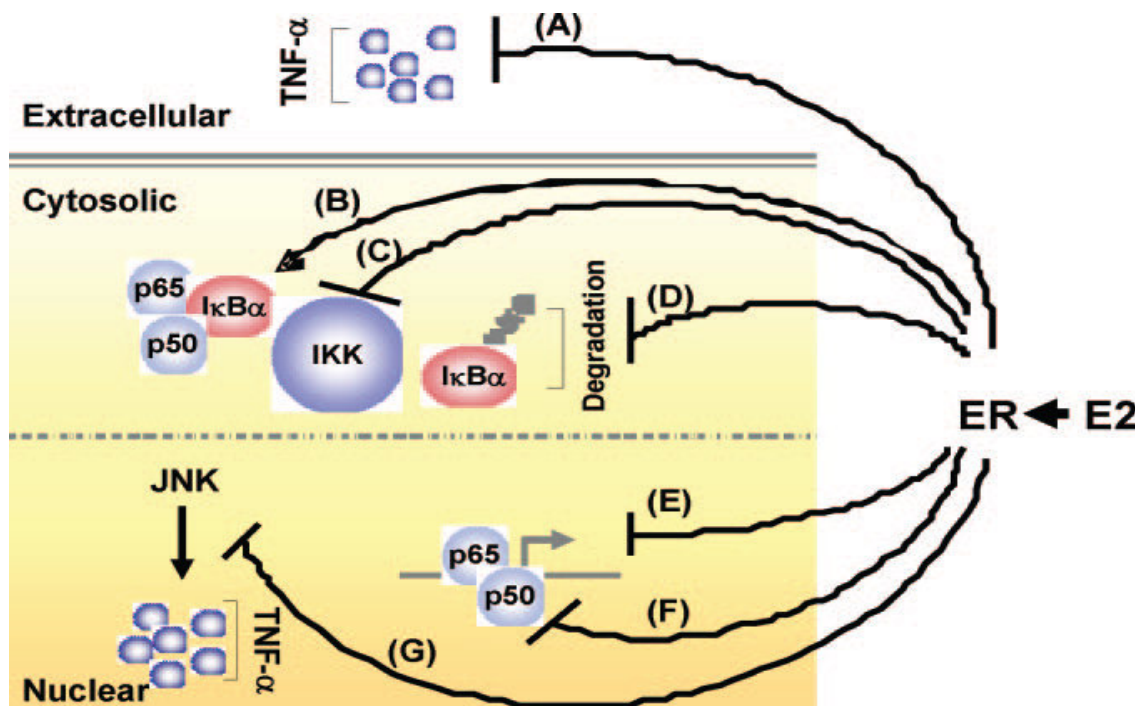
Adicionalmente, estudos mostram mecanismos, pelos quais, o ANP pode modular a síntese de TNF- $\alpha$  via NF- $\kappa$ B (Tsukagoshi et al., 2001; Kiemer & Vollmar, 2001; Kiemer et al., 2002; Vollmar, 2005; Ladetzki-Baehs et al., 2007; Vellaichamy et al., 2007). A figura 17 representa de maneira sintética esses mecanismos que foram estudados *in vivo* e *in vitro* em diferentes células, principalmente em macrófagos e células endoteliais. A ligação do ANP ao NPR-A, eleva GMPc que mantém a I $\kappa$ B desfosforilada. A I $\kappa$ B desfosforilada impede a translocação do NF- $\kappa$ B (inativa no citoplasma associada aos membros da família da I $\kappa$ B) para o núcleo e assim, reduz a síntese de TNF- $\alpha$ . A fosforilação e a degradação do I $\kappa$ B leva a translocação do NF- $\kappa$ B para o núcleo e, a ativação do NF- $\kappa$ B tem um papel indispensável na indução de rápida produção de TNF- $\alpha$  (Ghosh et al., 1998; Kiemer & Vollmar, 2001; Vollmar, 2005; Liu & Malik, 2006; Ladetzki-Baehs et al., 2007).



**Figura 17:** Mecanismo inibitório do ANP sobre o TNF- $\alpha$  via NF- $\kappa$ B.

FONTE: Adaptado de Vollmar (2005).

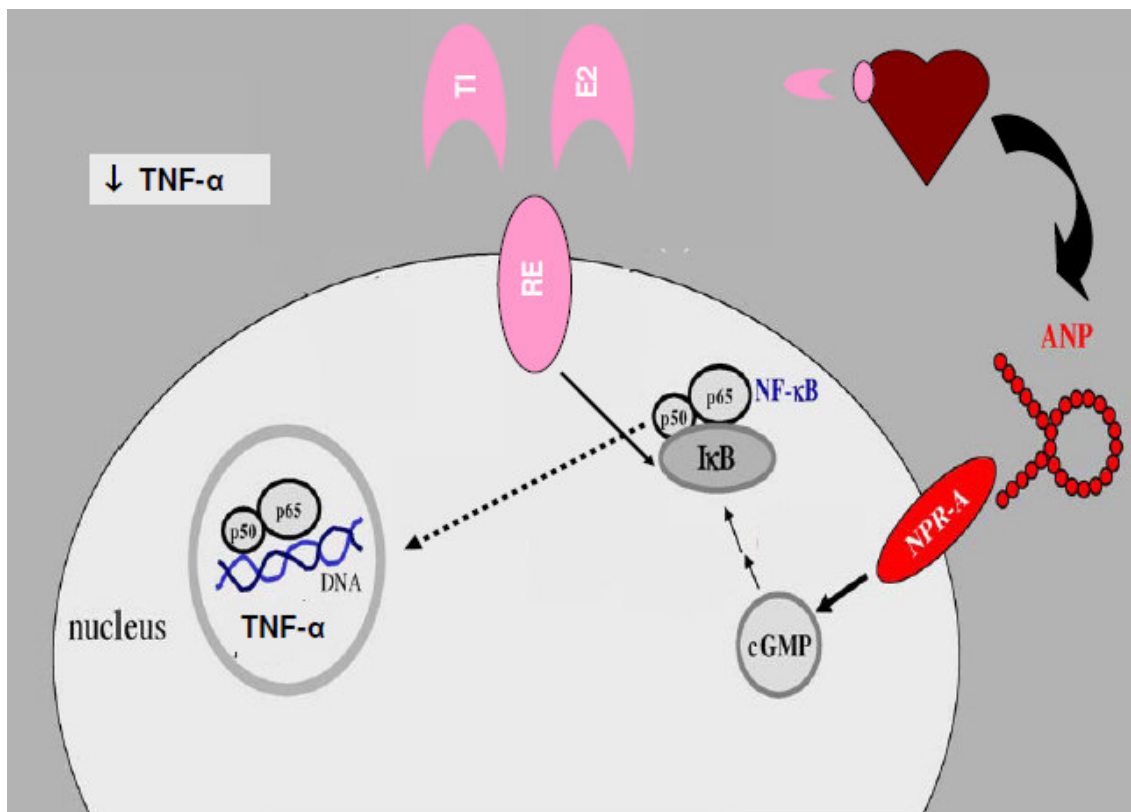
Há mais dados a respeito da modulação do estradiol sobre o TNF- $\alpha$  via NF- $\kappa$ B. A revisão de Xing e colaboradores (2009) sobre o estrogênio e mecanismos de proteção vascular mostra de forma sintética essa modulação (figura 18). O estradiol diretamente inibe a expressão do mediador pró-inflamatório TNF- $\alpha$  (A) e aumenta a expressão I $\kappa$ B $\beta$  (B). O estradiol também pode inibir a fosforilação do mediador IKK (complexo I $\kappa$ B $\beta$  quinase que contribui para a estabilização do I $\kappa$ B $\beta$  - C) e a degradação de I $\kappa$ B (D). No nível de transcrição, a ativação de RE induzida por estradiol inibe da transcrição induzida pelo NF- $\kappa$ B de quimiocinas e citocinas (E) e pode inibir a capacidade do NF- $\kappa$ B de se ligar no DNA (F). Foi mostrado também que estradiol bloqueia JNK (c-jun N-terminal quinase - G) que induz a produção de TNF- $\alpha$ .



**Figura 18:** Os mecanismos pelos qual o tratamento com estradiol (E2) atenua a via de sinalização pró-inflamatória. TNF- $\alpha$ , fator de necrose tumoral alfa; I $\kappa$ B $\beta$ , proteína I $\kappa$ capaB; IKK, complexo I $\kappa$ capaB quinase; NF- $\kappa$ B, fator nuclear  $\kappa$ capaB; JNK, c-jun N-terminal quinase .

FONTE: Xing et al., 2009.

Diante do exposto, pode-se especular uma via de ligação entre o estradiol e o ANP em relação a resposta inflamatória. Por exemplo, por meio de seus receptores específicos localizados em células inflamatórias e endoteliais, o ANP e o estradiol inibiriam em conjunto a produção de TNF- $\alpha$  via NF- $\kappa$ B. Por sua vez, o estradiol atuaria nos átrios aumentando a síntese e a liberação de ANP, e uma vez no plasma, o ANP, além dos seus conhecidos efeitos cardiovasculares, seria também responsável por normalizar os níveis de citocinas pró-inflamatórias. Um mecanismo semelhante à modulação do estradiol sobre a síntese de TNF- $\alpha$  poderia ser estendido a tibolona, pois, além de ser conhecida a afinidade dos metabólitos da tibolona sobre os REs, o tratamento das fêmeas com essa droga foi capaz de normalizar os níveis circulantes de ambos, ANP e TNF- $\alpha$  (Figura 19).



**Figura 19:** Mecanismo proposto para ação inibitória do ANP, 17 $\beta$ -estradiol (E2) e da tibolona (TI) sobre o TNF- $\alpha$  via NF- $\kappa$ B e modulação do E2 e da TI sobre a síntese e liberação de ANP pelo coração.

FONTE: Adaptado de Vollmar (2005).

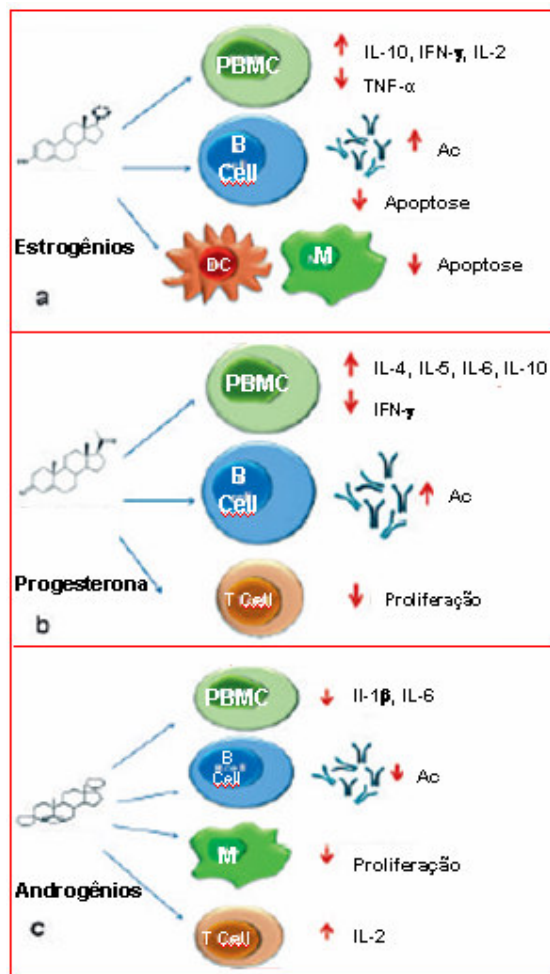
Sobre a tibolona, poucos estudos foram realizados a fim de elucidar a ação dessa droga sobre o sistema imunológico e dados do papel da tibolona sobre as citocinas pró-inflamatórias são conflitantes. No presente estudo, a tibolona foi capaz de diminuir os níveis séricos de TNF- $\alpha$ , porém, não reduziu os níveis de IL-6. Estudos *in vitro* em células Ishikawa, derivadas da linhagem de célula do adenocarcinoma humano, foram utilizadas para avaliar os efeitos da tibolona e seus metabólitos sobre o TNF- $\alpha$  e outros marcadores que parecem estar envolvidos na endometriose. Essas células expressavam tanto RE quanto receptores de progesterona (RP). Os resultados mostraram que nem a tibolona e nenhum dos metabólitos da tibolona ( $\Delta$ -4, 3 $\alpha$ -OH e 3 $\beta$ -OH tibolona) aumentaram TNF- $\alpha$  (Mirkin & Archer, 2007). Adicionalmente, estudo em humanos mostrou que TH no período de dois meses com a tibolona em mulheres pós-menopausa, apesar de reduzir a reabsorção óssea, não foi capaz de diminuir os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10 e IL-2 (Vural et al., 2006a). Dados opostos aos anteriores, também



foram encontrados. Mulheres na pós-menopausa e mulheres na pós-menopausa com osteoporose a TH com tibolona foi capaz de reduzir os níveis de IL-6 e TNF- $\alpha$  (Zhang et al., 2006).

Diferentes protocolos de pesquisa podem ser os responsáveis por esses diferentes resultados. Esses diferem na espécie estudada, no tempo de tratamento, na dose administrada de tibolona, se o estudo é *in vitro* ou *in vivo*, no método utilizado para dosagem de citocinas, entre outros fatores.

Em relação à ausência do efeito da tibolona sobre os níveis séricos de IL-6 nos resultados deste estudo, parece que a ligação do metabólito  $\Delta$ -4 tibolona via RP pode ter contribuído para neutralizar a ação dos metabólitos que atuam sobre os RE, pois a progesterona pode aumentar os níveis séricos IL-6 e em monócitos, a secreção de IL-6 foi inibida em menor proporção com uso de progesterona do que com o uso de estradiol (Jain et al., 2004; Zen et al., 2010). Na figura 20 os principais efeitos dos hormônios esteróides são sintetizados, sugerindo que a progesterona aumenta a síntese de IL-6 (Zen et al., 2010).



**Figura 20:** Principais efeitos dos hormônios esteróides nas células imunes. (a) Estrogênios aumentam a produção de interleucina (IL) 10, IL-12 e interferon gama (INF- $\gamma$ ) e, inibem a secreção de TNF- $\alpha$  pelas células mononucleares sanguíneas (PBMC); estimulam a produção e anticorpos (Ac) pelas células B; diminuem a apoptose de células dendríticas (DC) e de macrófagos (M). (b) Progesterona aumenta a produção IL-4, IL-5, IL-6, L-10 e inibe a produção de INF- $\gamma$  pelas PBMC; estimula a produção de Ac pelas células B e diminui a proliferação de células T. (c) Androgênios inibem a secreção de IL-1 e IL-6 pelas PBMC e aumentam a secreção de IL-2 pelas células T; inibem a secreção de Ac pelas células B e a proliferação de M.

FONTE: Adaptado de Zen *et al.* (2010).

Sobre a influência dos estrógenos na reatividade vascular, vários trabalhos investigaram a reatividade vascular de anéis de aorta em ratas ovariectomizadas (Chang et al., 1980; Nakajima et al., 1995; Paredes-Carbajal et al., 1995; Bolego et al., 1997; Barbacanne et al., 1999; Florian et al., 2004; Bianchi, et al., 2006; Stice et al., 2009; Fenoy et al., 2010), no entanto, no presente estudo, apesar do grupo OVX não apresentar alterações hemodinâmicas, foi de interesse verificar se havia prejuízo na reatividade vascular neste grupo, uma vez que, as citocinas pró-inflamatória estavam aumentadas e níveis circulantes de ANP diminuídos.

Os resultados deste estudo mostram, conforme descrito anteriormente, que nas fêmeas ovariectomizadas os níveis séricos de IL-6 e TNF- $\alpha$  estão aumentados, enquanto que, os níveis plasmáticos de ANP estão diminuídos comparados às fêmeas SHAM. Estas alterações não implicaram em modificação da PAM, PAS, PAD e FC, todavia, a ovariectomia aumentou a reatividade à fenilefrina na presença do endotélio em anéis de aorta isolados, ainda que, a reatividade vascular à acetilcolina e a expressão da enzima eNOS na aorta não foram alteradas nos grupos estudados. Ademais, os tratamentos com 17 $\beta$ -estradiol e tibolona foram capazes de normalizar parcialmente as alterações vasculares das ratas ovariectomizadas, assim como diminuir os níveis séricos e plasmáticos de TNF- $\alpha$  e ANP. Isso pode ser interpretado como uma possível disfunção vascular na aorta das ratas ovariectomizadas e que as TH poderiam contribuir para minimizar essa disfunção.

Trabalhos que utilizam bloqueios farmacológicos em anéis de aorta isolados de fêmeas ovariectomizadas tratadas ou não com a TH, na presença ou ausência do endotélio vascular, mostram resultados que sugerem prováveis efeitos potetores vasculares dos estrógenos (Rahimian et al., 2002; Florian et al., 2004; Bianchi et al., 2006; Stice et al., 2009). Embora bloqueios farmacológicos não foram efetuados neste estudo, os resultados apresentados corroboram com os de Bianchi e colaboradores (2006) e mais recentemente, com o estudo de Stice e colaboradores (2009). Após dois meses de ovariectomia, Bianchi e colaboradores (2006), encontraram uma maior reatividade à fenilefrina em anéis de aorta isolados em fêmeas ovariectomizadas. Quando o endotélio foi removido, a resposta vasoconstrictora foi semelhante entre os grupos, mostrando que a diferença observada foi, possivelmente, dependente do endotélio e não do músculo liso vascular. No que diz respeito ao relaxamento dependente do endotélio, este foi similar entre o grupo controle e ovariectomizado, avaliado pela curva dose resposta à acetilcolina. Dessa forma, foi proposto que o estrogênio poderia atenuar o

aumento da reatividade da aorta via redução de prostanóides vasoconstrictores ou aumento da síntese de prostaciclina e via NO, pelo aumento de sua biodisponibilidade basal. Outros estudos também sugerem que a perda de estrogênios endógenos leva à redução da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) derivado do endotélio e prejudica a função endotelial (Hernandez et al., 2000; Gimenez et al., 2006).

Este estudo não teve como objetivo identificar a contribuição relativa de cada mediador endotelial (NO, PGI<sub>2</sub>, EDHF) na reatividade vascular em anéis de aorta. Contudo, avaliou a expressão protéica da eNOS no segmento da aorta superior e seu possível papel na participação da provável disfunção endotelial nas ratas ovariectomizadas. Ademais, a expressão da eNOS também foi medida nos grupos que receberam TH para avaliar se, a expressão dessa enzima, poderia estar envolvida na atenuação do aumento da reatividade da aorta.

A modulação dos estrógenos sobre a eNOS já foi demonstrada em outros trabalhos. Estudos sugerem que os estrógenos ativam a síntese e liberação de NO por estimular a expressão gênica da eNOS (Kleinert et al., 1998), bem como através do aumento de sua atividade enzimática por via não genômica (Chen et al., 1999; Haynes et al., 2000; Simoncini et al., 2000; Simoncini et al., 2003; Simoncini & Genazzani 2003). Sobre os mecanismos moleculares, estudos indicam que no endotélio, 17 $\beta$ -estradiol ativa a eNOS por via não genômica através da fosfatidilinositol-3-quinase/serina-treonina kinase (PI3/Akt; Chen et al., 1999; Haynes et al., 2000) ou proteína quinase ativadora de mitose (MAPK; Simoncini & Genazzani 2003). Essa ativação leva à produção de NO no endotélio, que então se difunde para o músculo liso vascular (VSM) e causa o relaxamento do vaso.

Os resultados deste estudo mostram que a expressão protéica da eNOS na aorta não foi diferente entre os grupos, embora, um aumento da resposta vasoconstrictora das fêmeas ovariectomizadas e a atenuação dessa resposta com os tratamentos na reatividade vascular de anéis de aorta foi demonstrado. Possivelmente, outros mecanismos podem estar envolvidos nessa resposta vasoconstrictora.

Nossos resultados corroboram com estudos de Stice e colaboradores (2009), o qual mostrou que não houve diferença entre as ratas envelhecidas e/ou tratadas com estradiol, ovariectomizadas e/ou tratadas com estradiol sobre a expressão protéica aórtica das isoformas eNOS e iNOS. Outros trabalhos também sugerem que a TH com

estradiol não afeta a expressão da eNOS (Arnal et al., 1996; MacRitchie et al., 1997). Em contrapartida, estudos mostraram que em ratas ovariectomizadas houve uma diminuição na expressão gênica da eNOS na aorta torácica superior, enquanto que, o tratamento com estradiol normalizou esses níveis (Rahimian et al., 2002). Ainda sobre a expressão gênica, dados mostram que o  $17\beta$ -estradiol pode modular o tônus vascular via rápida liberação de NO derivado do endotélio e levar a uma *up-regulation* nos níveis de RNAm de eNOS (Siow et al., 2007). Florian e colaboradores (2004) mostraram níveis protéicos aumentados da eNOS em ratas ovariectomizadas em comparação as fêmeas tratadas com estradiol e intactas. Como justificativa, estudos apontam que a região da aorta torácica analisada pode ser em parte, responsável pelos diferentes resultados encontrados na literatura. Ao comparar a atividade da eNOS em diferentes segmentos da aorta, dados mostraram que a atividade da eNOS no segmento superior da aorta é maior em resposta ao tratamento com estradiol (Andersen & Stender, 2000; Rahimian et al., 2002).

Sobre a tibolona, poucos dados evidenciam os efeitos cardiovasculares dessa droga e muito pouco se sabe sobre sua ação no endotélio vascular. Aparentemente, não há dados na literatura que avaliam a reatividade vascular de anéis de aorta isolados na TH com a tibolona. Cicinelli e colaboradores (2002) mostraram que administração de tibolona em mulheres pós-menopausa foi associada com aumento dos níveis plasmáticos dos metabólitos do NO, sugerindo uma regulação da síntese dessa potente molécula vasodilatadora pela tibolona. Em artérias coronárias de coelhos os metabólitos da tibolona, inclusive o  $\Delta$ -4 tibolona mostraram efeito agudo semelhante ao estradiol, apresentando rápido início de relaxamento caracterizado por ações não genômicas (Lund et al., 2004). Adicionalmente, os efeitos da tibolona sobre a eNOS também foram pouco estudados e os resultados do presente estudo não corroboram com os achados de Simoncini e colaboradores (2004). Possivelmente, devido às diferenças que existem de estudos *in vivo* para *in vitro*. Simoncini e colaboradores (2004) avaliaram, *in vitro*, se a tibolona e seus metabólitos exerciam efeitos vasculares direto em células humanas endoteliais através da regulação genômica e não genômica da atividade da eNOS. Esses concluíram que tanto a tibolona, quanto seus metabólitos  $3\alpha$ -OH e  $3\beta$ -OH tibolona e, em menor intensidade os metabólitos sulfatados, induzem uma rápida síntese de NO e ativação da eNOS através dos RE por mecanismos não genômicos e genômicos. Adicionalmente, sugeriram que as células endoteliais são capazes de converter os metabólitos sulfatados inativos em formas ativas (desulfatadas). Entretanto, metabólito

$\Delta$ -4 tibolona foi completamente neutro sobre a atividade da eNOS, reforçando que os receptores de estrogênio são os principais agentes dos efeitos da tibolona sobre a síntese de NO nas células endoteliais. Além desses achados, esse estudo também sugere que a tibolona exerce seu efeito não genômico através dos RE via MAPK e não via fosfatidilinositol-3-quinase/AKT.

Embora a atividade de eNOS, sugestivamente, não seja a principal via contribuidora da possível disfunção vascular; nos grupos estudados, os níveis séricos aumentados de TNF- $\alpha$  poderiam contribuir no aumento da resposta pressora à fenilefrina nas ratas ovariectomizadas, uma vez que, níveis aumentados de TNF- $\alpha$  foram associados a disfunção endotelial (Arenas et al., 2005). Poderia se especular ainda que a TH com 17 $\beta$ -estradiol ou tibolona atenuou a resposta vasoconstrictora na aorta, possivelmente, por diminuir os níveis de TNF- $\alpha$ . Adicionalmente, é importante ressaltar que a normalização dos níveis de TNF- $\alpha$ , pode ser em parte, modulado pelo ANP e pelo estrogênio conforme discutido acima. O TNF- $\alpha$ , esta potente citocina, provavelmente, pode levar a disfunção endotelial por diferentes vias, entre as quais, por diminuir a expressão de eNOS, diminuir a disponibilidade do EDHF, e adicionalmente, aumentar a atividade o estado oxidativo das células, por meio de maior atividade da NADPH oxidase (Zhang et al, 2009).

Diante do efeito diurético e natriurético do ANP, a excreção de sódio e o volume urinário foram também avaliados neste estudo. Nos rins, o ANP aumenta a taxa de filtração glomerular, inibe a reabsorção de sódio e água e, reduz a secreção de renina. Esses efeitos parecem ser dependentes da ligação do ANP ao NPR-A, pois em camundongos Knockout para NPR-A o efeito diurético e natriurético foi abolido (Kishimoto et al., 1996).

Ao avaliar os parâmetros de excreção de água e sódio neste estudo, sugere-se que os hormônios sexuais femininos possuem efeitos sobre a diurese e natriurese, pois, a deficiência de estrógenos foi capaz de aumentar a excreção de água e de sódio urinário, conforme observado no grupo OVX comparado ao grupo SHAM, ainda que estes resultados estejam associados a níveis mais baixos de ANP plasmáticos nas fêmeas ovariectomizadas e RNAm de NPR-A renal reduzido. Adicionalmente, a TH com tibolona e 17 $\beta$ -estradiol normalizou a diurese e a natriurese a valores equivalentes as fêmeas SHAM, além de, aumentar os níveis circulantes de ANP, sem ser capaz de normalizar a expressão gênica do NPR-A renal. Embora os efeitos diurético e natriurético do ANP sejam bem conhecidos, parece não ser essa a principal via dominante, pela qual os

hormônios estrogênicos regulam a excreção de sódio e água pelos rins, uma vez que, com a redução dos efeitos do ANP, poderia ser observado menor excreção de sódio e água nas OVX.

Estudos que apóiam os resultados encontrados neste trabalho, têm sugerido que os esteróides ovarianos podem agir promovendo a retenção do íon sódio ( $\text{Na}^+$ ) e de água no corpo (Stachenfeld et al., 2001; Pechere-bertschi et al., 2002). Contudo, os efeitos dos hormônios estrogênicos sobre o balanço renal hidroeletrolítico ainda não foram completamente compreendidos. Uma grande parte dos trabalhos que contribuem para elucidar as ações dos estrógenos sobre a homeostase renal do  $\text{Na}^+$  e da água mostram a modulação do estrogênio via canais de sódio epitelial sensível a amilorida (ENaC), via vasopressina, via aldosterona e/ou via sistema renina angiotensina (SRA). Os efeitos diretos dos estrógenos sobre os rins parecem ser mediados via  $\text{RE}\alpha$  e  $\text{RE}\beta$ , pois ambos são expressos nesse órgão (Carley et al., 2003; Sharma & Thakur, 2004). A seguir, as ações estrogênicas nos mecanismos renais são discutidas resumidamente e dão suporte aos resultados encontrados neste estudo.

O ajuste final da excreção renal de  $\text{Na}^+$  é efetivado no néfron distal sensível a aldosterona que compreende o final do túbulo convoluto distal, a conexão tubular e o ducto coletor. O transporte transepitelial de  $\text{Na}^+$  nesta região do néfron é mediada por ENaC no lúmen e a Na-K-ATPase na membrana plasmática basolateral (Loffing & Korbmacher, 2009). Gambling e colaboradores (2004) mostraram que os hormônios sexuais femininos modulam a expressão do ENaC no rim de ratas fêmeas, pois a quantidade de RNAm do ENaC são menores em ratos machos quando comparados a fêmeas adultas. A ovariectomia diminuiu a expressão do RNAm das subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ENaC tornando-as equivalentes aos níveis de RNAm encontrados nos machos. Adicionalmente, a reposição com estradiol normalizou os níveis de RNAm dos  $\alpha$ ENaC sem alterar a expressão gênica dos  $\beta$  e  $\gamma$ ENaC. Assim, o estudo sugere que o estradiol modula a expressão gênica dos ENaC e pressupõe-se, conseqüentemente, uma maior quantidade de ENaC e reabsorção de  $\text{Na}^+$  no néfron distal de fêmeas.

A arginina vasopressina (AVP), também chamada de hormônio anti-diurético (ADH), é um importante hormônio envolvido no equilíbrio do balanço dos fluidos e na regulação da pressão arterial. A AVP é sintetizada no corpo celular paraventricular e núcleos supraóptico localizados na região anterior do hipotálamo. Os axônios dessas áreas se projetam para a hipófise posterior, onde AVP é armazenado e liberado em

resposta à estimulação central de osmorreceptores (Stachenfeld & Keefe, 2002). Os estrógenos parecem influenciar na liberação do AVP via mecanismos centrais, pois foram identificados RE $\alpha$  e RE $\beta$  nos neurônios produtores de AVP, como no núcleo supra-óptico (Ishunina et al., 2000). Estudos em mulheres na pós-menopausa mostram que a TH com estradiol aumentou os níveis plasmáticos de AVP além de deslocar o limiar osmótico para a liberação de AVP a uma osmolalidade plasmática menor, levando a uma redução no volume urinário e na excreção de sódio (Stachenfeld et al., 1998). Essa adaptação foi confirmada posteriormente, ratificando que os estrógenos diminuem o limiar osmótico para a liberação de AVP (Stachenfeld & Keefe, 2002; Sims et al., 2008).

Um dos principais sistemas humorais que participam da modulação da função renal é o sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA). O estrogênio pode influenciá-lo, contudo, a interação dos estrógenos com o SRAA é complexa, variando de acordo com a metodologia utilizada, o órgão analisado, as fases do ciclo hormonal, as diferentes espécies e a quantidade de sal na dieta. Além disso, não existe apenas o SRA sistêmico, mas vários SRA locais, tecido-específico, como o renal e o cardíaco (Dzau et al., 2001).

Há evidências de que os estrógenos são capazes de inibir o SRA, contudo, esses trabalhos não dão suporte aos resultados encontrados, pois a ovariectomia aumentou a excreção de Na<sup>+</sup> e água. Os estudos sugerem que os estrógenos agem sobre o SRAA em diferentes vias. Alguns estudos mostram que os estrógenos inibem a expressão da enzima conversora de angiotensina (ECA, Babiker et al., 2002; Silva-Antonialli et al., 2004) e o aumento da atividade da ECA na aorta, nos rins e no ventrículo esquerdo de ratas ovariectomizadas pode ser prevenido com a reposição de estradiol (Tanaka et al., 1997; Dean et al., 2005). Adicionalmente, Gallagher e colaboradores (1999) mostraram que a ovariectomia foi capaz de aumentar a densidade dos receptores AT1 nos rins e no núcleo paraventricular de ratas Wistar. A expressão de RNAm de AT1 parece estar aumentada em ratas ovariectomizadas (Nickenig et al., 1998) e o aumento da densidade de ligantes específicos para o AT1 nos rins (autorradiografia), na adrenal e na aorta também foi encontrado por Dean e colaboradores (2005) em ratas ovariectomizadas. Estudos também sugerem que os estrógenos podem atenuar a secreção da aldosterona estimulada pela AngII, por reduzir a sensibilidade da adrenal à AngII (Chen & Printz, 1983; Douglas, 1987) e a TH com estradiol em ratas ovariectomizadas, reduziria a expressão de AT1 na adrenal (Roesch et al., 2000). Por outro lado, expressão renal de



receptores AT2 parece ser estimulada pelo estradiol. A AngII ao se ligar aos receptores AT2, ao contrário dos efeitos do AT1, promove efeito diurético (Arias-Loza et al., 2009).

Dados da literatura que dão suporte à idéia de que os estrógenos modulam o SRA e, assim, são favoráveis a retenção de Na<sup>+</sup> e água corporal também são encontrados. O suporte para o efeito antidiurético e antinatriurético do SRA possivelmente, induzido pelos estrógenos, foi baseado na identificação recente de novos componentes do SRA. Estudos mostram a existência de um eixo contra-regulatório intrínseco no SRA, formado pela enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), pela angiotensina-(1-7) e pelo receptor Mas (Donoghue et al., 2000; Santos et al., 2008). A Ang-(1-7) é encontrada em elevada concentração em diversos compartimentos do néfron (Kimura et al., 2002) e, em concentrações fisiológicas, a Ang-(1-7), ao interagir com seu receptor Mas, exerce efeito antidiurético e antinatriurético *in vivo* e *in vitro* (Santos et al., 1996; Simões e Silva et al., 1998; Magaldi et al., 2003). Adicionalmente, Brosnihan e colaboradores (1997) mostraram que o estradiol foi capaz de promover a produção de Ang-(1-7) em fêmeas. Ji e colaboradores (2008) sugeriram que a TH com estradiol promoveu uma *upregulation* da atividade e da expressão protéica da ECA2 renal e conseqüentemente, um aumento na produção de Ang-(1-7) ao utilizar modelo experimental de doença renal hipertensiva em ratas ovariectomizadas e tratadas com estradiol. Estes últimos dados podem indicar que a deficiência estrogênica poderia levar a maior excreção de sódio e água, por inibir a via ECA2 e Ang-(1-7). Embora, um efeito diurético e natriurético da Ang-(1-7) ter sido mostrado em alguns estudos (Dellipizzi et al., 1994; Handa et al., 1996). Diante destes dados, pode ser concluído que os efeitos dos estrógenos sobre o SRA, e conseqüentemente sobre a modulação da excreção de Na<sup>+</sup> e água, não são unânimes.

A tibolona apresentou efeito semelhante ao do 17β-estradiol, ou seja, foi capaz de normalizar a excreção de sódio e água no grupo OVX. Os efeitos estrogênicos da tibolona são justificados devido à análise de sua estrutura e de seus metabólitos, como descrito anteriormente. Alguns de seus metabólitos se ligariam ativamente ao RE, com preferência pelo RE $\alpha$  (De Gooyer et al., 2003), a estimulação deste receptor no rim, resultaria em seus efeitos sobre o balanço hidroeletrólítico.

A partir destes resultados, pode-se especular que na presença de estrógenos ou drogas com ação estrogênica, a exemplo da tibolona, a estimulação das vias antidiuréticas e antinatriuréticas (ENaC, vassopressina e Ang-1-7) estariam se sobrepondo a inibição das vias renais de retenção de Na<sup>+</sup> e água (AngII e aldosterona) pelos estrógenos.

## CONCLUSÃO

O sistema de peptídeos natriuréticos foi prejudicado em ratas ovariectomizadas e esse prejuízo foi acompanhado de alterações cardiovasculares e imunológicas.

A deficiência de estrógenos reduziu os níveis de ANP plasmático, o estoque atrial e a expressão gênica do ANP no átrio. Os níveis de RNAm do NPR-A renal foram diminuídos e, o RNAm do NPR-C renal não foi alterado entre os grupos estudados.

Sobre as alterações cardiovasculares a deficiência estrogênica aumentou a reatividade no anel de aorta, sendo sugestivo, uma disfunção endotelial que não é acompanhada do prejuízo da expressão protéica da eNOS nesse vaso.

Em relação ao sistema imunológico, os níveis de citocinas pró-inflamatórias estavam aumentados nas fêmeas ovariectomizadas.

Além disso, as ratas com deficiência estrogênica ganharam peso e tiveram aumento na excreção de sódio e volume urinário.

As fêmeas ovariectomizadas tratadas com tibolona normalizaram o sistema de peptídeos natriuréticos, exceto, os estoques atriais e os níveis RNAm do NPR-A renal. No que diz respeito ao tratamento com estradiol, este foi capaz de normalizar a síntese, o estoque e a liberação do ANP, normalizando os níveis de ANP circulantes. Contudo, igualmente a tibolona, não normalizou os níveis de RNAm do NPR-A renal.

Sobre a reatividade vascular, os tratamentos normalizaram parcialmente a resposta dos anéis de aorta isolados, frente à vasoconstrição com fenilefrina, contudo, a eNOS parece não ter contribuído para a atenuar essa resposta, pois sua expressão protéica não foi alterada entre os grupos estudados no segmento da aorta.

O tratamento com estradiol diminuiu IL-6 e TNF- $\alpha$  séricas. O tratamento com a tibolona foi capaz somente de reduzir os níveis séricos de TNF- $\alpha$ .

Adicionalmente, as ratas tratadas com as THs não ganharam peso e tiveram diminuição na excreção de sódio e volume urinário.

Sumarizando, estes resultados evidenciam de modo inédito a influência da tibolona no sistema de peptídeo natriurético e sobre as citocinas inflamatórias. A tibolona foi capaz

de normalizar parcialmente o sistema de peptídeos natriurético o que, possivelmente, levou a normalização parcial da reatividade vascular e das citocinas inflamatória.

## 7 REFERÊNCIAS

Acuff CG, Huang H, Steinhilber ME (1997). Estradiol induces C-type natriuretic peptide gene expression in mouse uterus. *Am J Physiol*, 273: H2672–2677.

Albertazzi P, Di Micco R, Zanardi E (1998). Tibolone: a Review. *Maturitas*, 30: 295–305.

Allen NE, Tsilidis KK, Key TJ, Dossus L, Kaaks R, Lund E, Bakken K, Gavrilyuk O, Overvad K, Tjønneland A, Olsen A, Fournier A, Fabre A, Clavel-Chapelon F, Chabbert-Buffet N, Sacerdote C, Krogh V, Bendinelli B, Tumino R, Panico S, Bergmann M, Schuetze M, van Duijnhoven FJ, Bas Bueno-de-Mesquita H, Charlotte Onland-Moret N, van Gils CH, Amiano P, Barricarte A, Chirlaque MD, Molina-Montes ME, Redondo ML, Duell EJ, Khaw KT, Wareham N, Rinaldi S, Fedirko V, Mouw T, Michaud DS, Riboli E (2010). Menopausal Hormone Therapy and Risk of Endometrial Carcinoma Among Postmenopausal Women in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Am J Epidemiol.*, 1: 1–10.

Andersen MR, Stender S (2000). Endothelial nitric oxide synthase activity in aorta of normo cholesterolemic rabbits: regional variation and the effect of estrogen. *Cardiovasc Res.*, 47(1):192–199.

Arabi A, Garnero P, Porcher R, Pelissier C, Benhamo CL, Roux C (2003). Changes in body composition during post-menopausal hormone therapy: a 2 year prospect study. *Human Reproduction*; 18: 1747–1752.

Arai K, Tsuruta L, Watanabe S, Arai N (1997). Cytokine signal networks and a new era in biomedical research. *Mol Cells.*, 7(1): 1–12.

Arenas IA, Armstrong SJ, Xu Y, Davidge ST (2005). Chronic tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibition enhances NO modulation of vascular in estrogen-deficient rats. *Hypertension* 46:76–81

Arias-Loza PA, Muehlfelder M, Elmore SA, Maronpot R, Hu K, Blode H, Hegele-Hartung C, Karl Fritzemeier H, Ertl G, Pelzer T (2009). Differential Effects of 17 $\beta$ -Estradiol and of Synthetic Progestins on Aldosterone-Salt-Induced Kidney Disease. *Toxicol Pathol*, 37(7): 969–982.

Arnal JF, Clamens S, Pechet C (1996). Ethinylestradiol does not enhance the expression of nitric oxide synthase in bovine endothelial cells but increases the release of bioactive nitric oxide by inhibiting superoxide anion production. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:4108–13.

Asarian L, Geary N (1999). Cyclic estradiol treatment phasically potentiates endogenous cholecystokinin's satiating action in ovariectomized rats. *Peptides*, 0:445–50.

Asarian L, Geary N (2002). Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and restores physiological patterns of spontaneous feeding and sexual receptivity in ovariectomized rats. *Horm. Behav.*, 42: 461–471.

Babaei P, Mehdizadeh R, Ansar MM, Damirchi A (2010). Effects of ovariectomy and estrogen replacement therapy on visceral adipose tissue and serum adiponectin levels in rats. *Menopause Int.*, 16(3): 100–104.

Babiker FA, De Windt LJ, Van Eickels M, Grohe C, Meyer, Doevendans PA (2002). Estrogen hormone action in the heart: regulatory network and function. *Cardiovascular Research*, 53: 709–719.

Barbacanne MA, Rami J, Michel JB, Souchard JP, Philippe M, Besombes, JP, Bayard F, Arnal JF (1999). Estradiol increases rat aorta endothelium-derived relaxing factor (EDRF) activity without changes in endothelial NO synthase gene expression: possible role of decreased endothelium-derived superoxide anion production. *Cardiovascular Research*, 41: 672– 681.

Barrett-Connor E (1997). Sex differences in coronary heart disease: why a women so superior? The 1995 Ancel Keys Lecture. *Circulation*; 95: 252–264.

Baxter GF (2004). The natriuretic peptides. *Basic Res Cardiol*, 99: 71–75.

Bednarek-Tupikowska G, Filus A, Kuliczowska-Plaksej J, Tupikowski K, Bohdanowicz-Pawlak A, Milewicz A (2006). Serum leptin concentrations in pre- and postmenopausal women on sex hormone therapy. *Gynecological & Endocrinology*; 22 (4): 207–12.

Belo NO, Carnio, EC, Gutkowska J, Antunes-Rodrigues J, Reis AM (2004). Involvement of atrial natriuretic peptide in blood pressure reduction induced by estradiol in spontaneously hypertensive rats. *Regulatory Peptides*, 117: 53–60.

Belo NO, Sairam MR, dos Reis AM (2008). Impairment of the Natriuretic Peptide System in Follitropin Receptor Knockout Mice and Reversal by Estradiol: Implications for Obesity-Associated Hypertension in Menopause. *Endocrinology*, 149: 1399–1406.

Beral V, Bull D, Reeves G (2005). Endometrial cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet*, 365: 1543–1551.

Berg LTWJ, Faber A, Berg PB (2006). HRT use in 2001 and 2004 in The Netherlands - A world of difference. *Maturitas*, 54: 193–197

Bianchi PR, Gumz BP, Giuberti K, Stefanon I (2006). Myocardial infarction increases reactivity to phenylephrine in isolated aortic rings of ovariectomized rats. *Life Sciences*, 78: 875–881.

Binko J, Murphy TV, Majewski H (1998). 17Beta-oestradiol enhances nitric oxide synthase activity in endothelium-denuded rat aorta. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 25(2):120-7.

Bissoli NS, Medeiros AR, Santos MC, Busato VC, Jarske RD, Abreu GR, Moysés MR, de Andrade TU (2009). Long-term treatment with supraphysiological doses of nandrolone decanoate reduces the sensitivity of Bezold-Jarisch reflex control of heart rate and blood pressure. *Pharmacol Research*, 78: 379-84.

Bolego C, Cignarella A, Ruzza R, Zaarour C, Messi E, Zanisi M, Puglisi L (1997). Differential effects of low- and high-dose estrogen treatments on vascular responses in female rats. *Life Sciences*, 25(60) 2291–2302.

Bonavera JJ, Dube MG, Kalra PS, Kalra SP (1994). Anorectic effects of estrogen may be mediated by decreased neuropeptide Y release in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology*, 134: 2367–2370.

Botsis D, Kassanos D, Kalogirou D (1997). Vaginal ultrasound of the endometrium in postmenopausal women with symptoms of urogenital atrophy on low dose oestrogen or tibolone treatment: a comparison. *Maturitas*, 26: 57–62.

Bradford M (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal Biochem*, 72:248–54.

Brosnihan KB, Li P, Ganten D, Ferrario CM (1997). Estrogen protects transgenic hypertensive rats by shifting the vasoconstrictor-vasodilator balance of RAS. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 273: R1908–R1915, 1997.

Bruce-Keller AJ, Barger SW, Moss NI, Pham JT, Keller JN, Nath A (2001). Pro-inflammatory and pro-oxidant properties of the HIV protein Tat in a microglial cell line: attenuation by 17  $\beta$ -estradiol. *J. Neurochem*. 78: 1315–1324.

Bruunsgaard H (2006) The clinical impact of systemic low-level inflammation in elderly populations. With special reference to cardiovascular disease, dementia and mortality. *Dan Med Bull*, 53(3): 285-309.

Burnett Jr JC, Kao PC, Hu DC, Heser DW, Heublein D, Granger JP, Opgenorth TJ, Reeder GS (1986). Atrial natriuretic peptide elevation in congestive heart failure in the human. *Science*, 231: 1145–1147.

Butera PC, Bradway DM, Cataldo NJ (1993). Modulation of the satiety effect of cholecystokinin by estradiol. *Physiol Behav*, 53: 1235–1238.

Byyny RL & Speroff L (1996). A clinical guide for the care of older women: primary and preventive care, 2<sup>nd</sup> ed. Baltimore: Williams & Wilkins. *The rectangularization of life*; 1–19.

Carley ME, Rickard DJ, Gebhart JB, Webb MJ, Podratz KC, Spelsberg TC (2003). Distribution of estrogen receptors alpha and beta mRNA in mouse urogenital tissues

and their expression after oophorectomy and estrogen replacement. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct.*, 14(2): 141–145.

Castro LC, Arora C, Parvez S, Parvez H, Valenzuela G, Hobel CJ (1989). Plasma atrial natriuretic peptide levels during the rat estrous cycle, pregnancy, and puerperium. *Am J Obstet Gynecol.*, 160(1):15–9.

Chakrabarti S, Lekontseva O, Davidge ST (2008). Estrogen is a modulator of vascular inflammation. *Life*, 60(6): 376-382.

Chang WC, Nakao J, Orimo H, Murota SI (1980). Stimulation of prostaglandin cyclooxygenase and prostacyclin synthetase activities by estradiol in rat aortic smooth muscle cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 620: 472–482.

Chen FM, Printz MP (1983). Chronic estrogen treatment reduces angiotensin II receptors in the anterior pituitary. *Endocrinology*, 113:1503–1510.

Chen Z, Yuhanna IS, Galcheva-Gargova Z, Karas RH, Mendelsohn ME, Shaul PW (1999). Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J Clin Invest*, 103: 401–406.

Chomczynski P, Sacchi N (1987). Single-step method of RNA isolation by Acid Guanidinium thiocyanate– phenol– chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162:155– 9.

Cicinelli E, Ignarro LJ, Galantino P, Pinto V, Barba B, Schonauer S (2002). Effects of tibolone on plasma levels of nitric oxide in postmenopausal women. *Fertil Steril*, 78: 464–468.

Clark BA, Elahi D, Epstein FH (1990). The influence of gender, age and the menstrual cycle on plasma Atrial Natriuretic Peptide. *Clin Endocrinol Metab*, 70: 349–352

Clegg DJ, Brown LM, Zigman JM, Kemp CJ, Strader AD, Benoit SC, Woods SC, Mangiaracina M, Geary N (2007). Estradiol dependent decrease in the orexigenic potency of ghrelin in female rats. *Diabetes*, 56: 1051–1058.



Cohen S, Bigazzi PE, Yoshida T (1974). Similarities of Tcell function in cell-mediated immunity and antibody production. *Cell Immunol.*, 2: 150–159.

Cohen RA, Shepherd JT, Vanhoutte PM (1983). Inhibitory role of endothelium in the response of isolated arteries to platelets. *Science*, 221: 273-274.

Cooke PS, Naaz A (2004). Role of estrogens in adipocyte development and function. *Exp Bio Med*, 229: 1127–1135.

Couse JF & Korach KS (1999). Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocrinology Review*, 20: 358–417.

Crandall DL, Gordon G, Herzlinger HE, Saunders BD, Zolotor RC, Cervoni P, Kral JG (1992). Transforming growth factor alpha and atrial natriuretic peptide in white adipose tissue depots in rats. *Eur J Clin Invest*, 22: 676–680.

Cutolo M, Brizzolara R, Atzeni F, Capellino S, Straub RH, Puttini PC (2010). The immunomodulatory effects of estrogens: clinical relevance in immune-mediated rheumatic diseases. *Ann N Y Acad Sci.*, 1193: 36–42.

Dai R, Phillips RA, Ahmed SA (2007). Despite inhibition of nuclear localization of NF-KB p65, c-Rel, and RelB, 17- $\beta$  estradiol up-regulates NF-KB signaling in mouse splenocytes: the potential role of Bcl-31. *Journal of Immunology*, 179: 1776–1783.

Dantas AP, Scivoletto R, Nigro D, Fortes ZB, Carvalho MH (1999). Influence of female sex hormones on endothelium-derived vasoconstrictor prostanoid generation in microvessels of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 34: 914–919.

Davidson BJ, Rea CD, Valenzuela G (1988). Atrial natriuretic peptide, plasma renin activity, and aldosterone in women on estrogen therapy and with premenstrual syndrome. *Fertil Steril*, 50: 743–746.

Dean AS, Tan J, O'Brien ER, Leenen FH (2005). 17 $\beta$ -estradiol downregulates tissue angiotensin-converting enzyme and ANGII type 1 receptor in female rats. *American Journal of Physiology – Regul Integr Comp Physiol.*, 288: R759–R766.

De Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, Sonnenberg H (1981). A rapid and potent response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sciences*, 28(1): 89–94.

De Gooyer ME, Deckers GH, Schoonen WGEJ, Verheul HAM, Kloosterboer HJ (2003). Receptor profiling and endocrine interactions of tibolone. *Steroids*, 68: 21–30.

De Leon H, Bonhomme MC, Thibault G, Garcia R (1995). Localization of atrial natriuretic factor receptors in the mesenteric arterial bed. Comparison with angiotensin II and endothelin receptors. *Circ Res*, 77: 64–72.

De Visser J, Coert A, Freenstra H, van der Vies J (1984). Endocrinological studies with (7 $\alpha$ ,17 $\alpha$ )-17-OH-7-methyl-19-norpregn-5(10)-em-20-yn-3-one). *Azneimittelforschung*, 34: 1010–1017.

Dellipizzi A, Hilchey SD, McGiff JC, et al. Natriuretic action of angiotensin(1-7) (1994). *Br J Pharmacol*, 11:1-4.

Demsey PW, Vaidya SA, Cheng G (2003). The art of war: innate and adaptive immune responses. *Cell Mol Life Sci*, 60: 2604–2621.

Deng Y, Kaufman S (1993). The influence of reproductive hormones on ANF release by rat atria. *Life Sci*, 53: 689–695.

Deroo BJ & Korach KS (2006). Estrogen receptors and human disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 116 (3): 561–570.

Dessi-Fulgheri P, Sarzani R, Tamburrini P, Moraca A, Espinosa E, Cola G, Giantomassi L. (1997). Plasma atrial natriuretic peptide and natriuretic peptide receptor gene expression in adipose tissue of normotensive and hypertensive obese patients. *J Hypertens*, 15: 1695–1699.

Dessi-Fulgheri P, Sarzani R., Rappelli A (1998). The natriuretic peptide system in obesity-related hypertension: new pathophysiological aspects. *J Nephrol*, 11: 296–299.

Dinarello CA (2007). Historical insights into cytokines. *Eur J Immunol* 37: S34–45.

Donoghue M, Hsieh F, Baronas E (2000). A novel angiotensin-converting enzymelated carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res*, 87:E1-E9.

Douglas JG (1987). Estrogen effects on angiotensin receptors are modulated by pituitary in female rats. *Am J Physiol*, 252: E57–E62.

Doust JA, Pietrzak E, Dobson A, Glasziou P (2005). How well does B-type natriuretic peptide predict death and cardiac events in patients with heart failure: systematic review. *BMJ*, 330 (7492): 625–633.

Dubey RK, Oparil S, Imthurn B, Jackson EK (2002). Sex hormone and hypertension. *Cardiovasc Res*, 53: 688–708.

Dzau VJ, Bernstein K, Celermajer D, Cohen J, Dahlöf B, Deanfield J, Diez J, Drexler H, Ferrari R, van Gilst W, Hansson L, Hornig B, Husain A, Johnston C, Lazar H, Lonn E, Lüscher T, Mancini J, Mimran A, Pepine C, Rabelink T, Remme W, Ruilope L, Ruzicka M, Schunkert H, Swedberg K, Unger T, Vaughan D, Weber M (2001). The relevance of tissue angiotensin-converting enzyme: manifestations in mechanistic and endpoint data. *Am J Cardiol*, 8;88 (9A):1L-20L.

Eaker ED, Chesebro JH, Sacks FM (1993). Cardiovascular disease in women. *Circulation*, 88: 1999–2009.

Egarter C, Huber J, Leikermoser R (1996). Tibolone versus conjugated estrogens and sequential progestogen in the treatment of climacteric complaints. *Maturitas*, 23: 55–62.

Espiner EA, Richards AM, Yandle TG, Nicholls MG (1995). Natriuretic hormones. *Endocrinol Metab Clin North Am.*, 24(3): 481–509.

Falvo JV, Tsytsykova AV, Goldfeld AE (2010). Transcriptional control of the TNF gene. *Curr Dir Autoimmun*, 11: 27–60.

Farhat MY, Lavigne MC, Ramwell PW (1996). The vascular protective effects of estrogen. *FASEB J*, 10(5): 615-24.

Favaretto AL, Ballejo GO, Albuquerque-Araújo WI, Gutkowska J, Antunes-Rodrigues J, McCann SM (1997). Oxytocin releases atrial natriuretic peptide from rat atria in vitro that exerts negative inotropic and chronotropic action. *Peptides*, 18(9): 1377–1381.

Fenoy FJ, Hernandez ME, Hernandez M, Quesada T, Salom MG, Hernández I (2010). Acute effects of 2-methoxyestradiol on endothelial aortic NO release in male and ovariectomized female rats. *Nitric Oxide*, 23(1): 12–19.

Fisher M (2008). Injuries to the vascular endothelium: vascular wall and endothelial dysfunction. *Rev Neurol Dis.*, 5(1): S4–11.

Florian M, Freiman A, Magder S (2004). Treatment with 17beta-estradiol reduces superoxide production in aorta of ovariectomized rats. *Steroids*, 69: 779–787.

Furchgott RF, Zawadzki JV (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288: 373–376.

Gallagher PE, Li P, Lenhar JR, Chappell MC, Brosnihan KB (1999). Estrogen regulation of angiotensin-converting enzyme mRNA. *Hypertension*, 33 (II): 323–328.

Gambling L, Dunford S, Wilson CA, Mcardle HJ, Baines ADL (2004). Estrogen and progesterone regulate alpha, beta, and gammaENaC subunit mRNA levels in female rat kidney. *Kidney International*, 65: 1774–1781.

Gameiro C, Romao F (2010). Changes in the immune system during menopause and aging. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2: 1299–1303.

Garcia R, Thibault G, Cantin M, Genest J (1984). Effect of a purified atrial natriuretic factor on rat and rabbit vascular strips and vascular beds. *Am J Physiol.*, 247(1 Pt 2):R34–39.

Geary N, Asarian L, Korach KS, Pfaff DW, Ogawa N (2001). Deficits in E2-dependent control of feeding, weight gain, and cholecystokinin satiation in ER-alpha null mice. *Endocrinology*, 142: 4751–4757.

Genazzani AR, Petraglia F, Facchinetti F (1987). Effects of Org OD 14 on pituitary and peripheral beta-endorphin in castrated rats and postmenopausal women. *Maturitas*, Suppl 1: 35–48.

Ghisletti S, Meda C, Maggi A, Vegeto E (2005). 17beta-estradiol inhibits inflammatory gene expression by controlling NF-kappa $\beta$  intracellular localization. *Mol. Cell. Biol.*, 25: 2957–2968.

Ghosh S, May MJ, Kopp EB (1998). NF-kappa $\beta$  and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*, 16: 225–260.

Gibson UE, Heid CA, Williams PM (1996). A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res*, 6(10):995-1001.

Gimenez J, Garcia PM, Bonacasa B, Carbonell LF, Quesada T, Hernandez I (2006). Effects of oestrogen treatment and angiotensin-converting enzyme inhibition on the microvasculature of ovariectomized spontaneously hypertensive rats. *Exp. Physiol.*, 91: 261–268.

Gol M, Ozsener S, Sendag F, Uretmen S, Oztekin K, Tanyalcin T, Bilgin O, (2005) Does tibolone affect serum leptin levels and body weight in postmenopausal women? *Archive of Gynecology & Obstetrics*, 272 (2): 127–130.

Gompel A, Kandouz M, Siromachkova M (1997). The effects of tibolone on proliferation, differentiation and apoptosis in human breast cells. *Gynecology & Endocrinology*, 11 Suppl 11: 79.

Goodwin BL, Pendleton LC, Levy MM, Solomonson LP, Eichler DC (2007). Tumor necrosis factor-alpha reduces argininosuccinate synthase expression and nitric oxide production in aortic endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 293 (2): H1115-21.

Grazzini E, Guillon G, Mouillac B, Zingg HH (1998). Inhibition of oxytocin receptor function by direct binding of progesterone. *Nature*, 392(6675): 509–512.

Green S (1986). Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature*, 320: 134–139.

Grohé C, Briesemeister G, Stimpel M, Karas RH, Vetter H, Neyses L (1994). Cardiac myocytes contain functional estrogen receptors. *Circulation*, 90: 2898.

Gutkowska J, Genest J, Thibault G, Garcia R, Larochelle P, Cusson JR (1987). Circulating forms and radioimmunoassay of natriuretic factor. *Endocrinol Metab Clin N Am*; 16:183–98.

Gutkowska J, Jankowski M, Lambert C, Mukaddam-Daher S, Zingg HH, McCann SM (1997). Oxytocin releases atrial natriuretic peptide by combining with oxytocin receptors in the heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 11704–11709.

Gutkowska J, Nemer M (1998). Structure, expression, and function of atrial natriuretic factor in extraatrial tissues. *Endocr Rev.*, 10(4): 519–536.

Gutkowska J, Paquette A, Wang D, Lavoie JM, Jankowski M (2007). Effect of exercise training on cardiac oxytocin and natriuretic peptide systems in ovariectomized rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 293: R267–R275.

Hammar M, Christau S, Nathorst-Boos J (1998). A double blind randomised trial comparing the effects of tibolone and continuous combined hormone replacement therapy in postmenopausal women with menopausal symptoms. *Bristh Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 105: 904–911.

Handa RK, Ferrario CM, Strandhoy JW. Renal actions of angiotensin-(1-7): in vivo and in vitro studies (1996). *Am J Physiol*, 270:F141-7.

Hanggi W, Lippuner K, Jaeger P, Birkhauser MH, Horber FF (1998). Differential impact of conventional oral or transdermal hormone replacement therapy or tibolone on body composition in postmenopausal women. *Clinical Endocrinology*, 48: 691–699.

Hasenbrink G, Sievernich A, Wildt L, Ludwig J, Lichtenberg-Frate H (2006). Estrogenic effects of natural and synthetic compounds including tibolone assessed in *Saccharomyces cerevisiae* expressing the human estrogen  $\alpha$  and  $\beta$  receptors. *The FASEB Journal*, 20: 861–870.

Haynes MP, Sinha D, Russell KS, Collinge M, Fulton D, Morales-Ruiz M, Sessa WC, Bender JR (2000). Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells. *Circ Res.*, 87(8): 677–682.

Heine PA, Taylor JA, Iwamoto GA, Lubahn DB, Cooke PS (2000). Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 12729–12734.

Hernandez I, Delgado JL, Diaz J, Quesada T, Teruel MJ, Llanos MC, Carbonell LF (2000). 17beta-estradiol prevents oxidative stress and decreases blood pressure in ovariectomized rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 279: R1599–R1605.

Hirano T (1999). Molecular basis underlying functional pleiotropy of cytokines and growth factors. *Biochem Biophys Res Commun.*, 260(2): 303–308.

Hitti E, Iakovieve T, Brook M, Deppenmeier S, Gruber AD, Radzioch D, Clark AR, Blackshear PJ, Kotlyarov A, Gaestel M (2006). Mitogen-activated protein kinase activated protein kinase 2 regulates tumor necrosis factor mRNA stability and translation mainly by altering tristetraprolin expression, stability, and binding to adenine/uridine-rich element. *Mol Cell Biol*, 26: 2399–2407.

Hoeg JM, Willis LR, Weinberger MH (1977). Estrogen attenuation of the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol*, 233: 369–373.

Homma H, Kurachi H, Nishio Y, Takeda T, Yamamoto T, Adachi K, Morishige K, Ohmichi M, Matsuzawa Y, and Murata Y (2000). Estrogen suppresses transcription of lipoprotein lipase gene. *J Biol Chem*, 275: 11404–11411.

Hong M, Yan Q, Tao B, Boersma A, Han KK, Vantyghem MC (1992). Estradiol, progesterone and testosterone exposures affect the atrial natriuretic peptide gene expression in vivo in rats. *Biol Chem Hoppe-Seyler*, 373: 213–218.

Hrabovszky E, Kallé I, Hajszán T, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Liposits Z (1997). Expression of estrogen receptor- $\beta$  messenger ribonucleic acid in oxytocin and

vasopressin neurons of rat supraoptic and paraventricular nuclei. *Endocrinology*, 139: 2600–2604.

Hsueh AJW, Jones PBC, Adashi EY, Wang C, Zhuang LZ, Welsh Jr. TH (1983). Intraovarian mechanisms in the hormonal control of granulosa cell differentiation in rats. *J. Reprod. Fert.*, 69: 325–342.

Huang J, Guan H, Booze RM, Eckman CB, Hersh LB (2004). Estrogen regulates neprilysin activity in rat brain. *Neurosci Lett*, 367: 85–87.

Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Ringgs B, Vittinghoff E (1998). 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*, 280: 605–613.

Ishunina TA, Kruijver FP, Balesar R, Swaab DF (2000). Differential expression of estrogen receptor alpha and beta immunoreactivity in the human supraoptic nucleus in relation to sex and aging. *J Clin Endocrinol Metab.*, 85(9): 3283–3291.

Jain SK, Kannan K, Prouty L, Jain SK (2004). Progesterone, but not 17beta-estradiol, increases TNF-alpha secretion in U937 monocytes. *Cytokine*, 26(3): 102–105.

Jankowski M, Rachelska G, Donghao W, McCann SM, Gutkowska J (2001). Estrogen receptors activate atrial natriuretic peptide in the rat heart. *Proc Natl Acad Sci*, 98: 11765–11770.

Ji H, Menini S, Zheng W, Pesce C, Xie Wu X, Sandberg K (2008). Role of angiotensin-converting enzyme2 and angiotensin(1–7) in 17β-oestradiol regulation of renal pathology in renal wrap hypertension in rats. *Exp Physiol*, 93(5): 648–657.

Jiang CW, Sarrel PM, Lindsay DC, Poole-Wilson PA, Collins P (1991). Endothelium-independent relaxation of rabbit coronary artery by 17 beta-oestradiol in vitro. *Br J Pharmacol*, 104(4):1033-7.

John SW, Kregge JH, Oliver PM, Hagaman JR, Hodgins JB, Pang SC, Flynn TG, Smithies O (1995). Genetic decreases in atrial natriuretic peptide and salt sensitive hypertension. *Science*, 267(5198): 679–681.



Jones MEE, Thorburn AW, Britt KL, Hewitt NK, Wreford NG, Proietto J, Oz OK, Leury BJ, Robertson M, Yao S, Simpson ER (2000). Aromatase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity. *Proc Natl Acad Sci*, 97:12735–12740.

Kalaitzidis D, Gilmore, TD (2005). Transcription factor cross-talk: the estrogen receptor and NF-kappa $\beta$ . *Trends Endocrinol. Metab.*, 16: 46–52.

Kasugai Y, Ikegami A, Matsuo K, Ohashi M, Sukamoto T, Hosoi T, Ouchi Y & Orimo H (1998). Effects of tibolone (Org OD14) treatment for 3 months on ovariectomy-induced osteopenia in 8-month-old rats on a low-calcium diet: preventive testing for 3 months. *Bone*, 22: 119–124.

Kenny AJ, Bourne A, Ingram J (1993). Hydrolysis of human and pig brain natriuretic peptides, urodilatin, C-type natriuretic peptide and some C-receptor ligands by endopeptidase-24.11. *The Biochemical Journal*, 291(1): 83–88.

Khush KK, Gerber IL, McKeown B, Marcus G, Vessey J, Foster E, Chatterjee K, Michaels AD (2006). Obese patients have lower B-type and atrial natriuretic peptide levels compared with non obese. *Congest Heart Fail*, 12: 85–90.

Kicovic P, Cortes-Prieto J, Luisi M (1982). Placebo controlled cross over study of effects of Org OD 14 in menopausal women. *Reproduction*, 6: 81–91.

Kiemer AK, Vollmar AM (1998). Autocrine regulation of inducible nitric-oxide synthase in macrophages by atrial natriuretic peptide. *J Biol Chem*, 273: 13444–13451.

Kiemer AK, Vollmar AM (2001). The atrial natriuretic peptide regulates the production of inflammatory mediators in macrophages. *Ann Rheum Dis*, 60:iii68–iii70

Kiemer AK, Hartung T, Vollmar AM (2000). cGMP-mediated inhibition of TNF-alpha production by the atrial natriuretic peptide in murine macrophages. *J Immunol*, 165: 175–81.

Kiemer AK, Weber NC, Vollmar AM (2002). Induction of Ikappa $\beta$ : atrial natriuretic peptide as a regulator of the NF-kappa $\beta$  pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 295:1068–1076.

Kimura M, Irahara M, Yasui T, Saito S, Tezuka M, Yamano S, Kamada M, Aono T (2002). The obesity in bilateral ovariectomized rats is related to a decrease in the expression of leptin receptors in the brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 290: 1349–1353.

Kishimoto I, Dubois SK, Garbers DL (1996). The heart communicates with the kidney exclusively through the guanylyl cyclase-A receptor: acute handling of sodium and water in response to volume expansion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 6215–6219.

Kleinert H, Wallerath T, Euchenhofer C, Ihrig-Biedert I, Li H, Forstermann U (1998). Estrogens increase transcription of the human endothelial NO synthase gene: analysis of the transcription factors involved. *Hypertension*, 31: 582–588.

Kloosterboer HJ (2000). Intracrinology: the secret of the tissue-specificity of tibolone. *Journal of British Menopause Society*, 6 (Suppl): 23–27.

Kloosterboer HJ (2001). Tibolone: a steroid with a tissue-specific mode of action. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 76: 231–238.

Kloosterboer HJ (2004). Tissue-selectivity: the mechanism of action of tibolone. *Maturitas*, 48(1): S30–S40.

Kloosterboer HJ, Ederveen AGH (2003). Pros and cons of existing treatment modalities in osteoporosis: a comparison between tibolone, SERMs and estrogen + progestogen treatments. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 83: 157–165.

Knowlton AA, Sun L (2001). Heat-shock factor-1, steroid hormones, and regulation of heat-shock protein expression in the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 280: H455–464.

Korach BJ & Deroo KS (2006). Estrogen receptors and human disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 116 (3): 561–570.

Kuiper GG, Carlsson MB, Grandien K, Enmark V, Haggblom J, Nilsson S, Gustafsson JA (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Endocrinology*, 138: 863–870.

Ladetzki-Baehs K, Keller M, Kiemer AK, Koch, Zahler S, Wendel A, Vollmar AM (2007). Atrial natriuretic peptide, a regulator of nuclear factor-kappa $\beta$  activation in vivo. *Endocrinology*, 148: 332–336.

Lahita RG (2000). Gender and the immune system. *J. Gen. Specif. Med.*, 3: 19–22.

Langin D, Dicker A, Tavernier G, Hoffstedt J, Mairal A, Ryden M, Arner E (2005). Adipocyte lipases and defect of lipolysis in human obesity. *Diabetes*, 54: 3190–3197.

Lee SD, Kuo WW, Ho YJ, Lin AC, Tsai CH, Wang HF, Kuo CH, Yang AL, Huang CY, Hwang JM (2008). Cardiac Fas-dependent and mitochondria-dependent apoptosis in ovariectomized rats. *Maturitas*, 61: 268–277

Lerner DJ & Kannel WB (1986). Patterns of coronary heart disease morbidity and mortality in the sexes: a 26-year follow-up of the Framingham population. *American Heart Journal*, 111: 383–390.

Levin ER, Gardner DG, Samson WK (1998). Mechanisms of disease: natriuretic peptides. *N Engl J Med*, 339(5): 321–328.

Lindsay R, Hart D, Kraszewski A. (1980) Prospective double-blind trial of synthetic steroid (Org OD14) for preventing postmenopausal osteoporosis. *Bristh Medical Journal*, 280: 1207–1209.

Liou CM, Yang AL, Kuo CH, Tin H, Huang CY, Lee SD (2010). Effects of 17 $\beta$ -estradiol on cardiac apoptosis in ovariectomized rats. *Cell Biochem Funct.* 28: 521–528.

Liu H, Sidiropoulos P, Song G, Pagliari LJ, Birrer MJ, Stein B, Anrather J, Pope RM (2000). TNF-alpha gene expression in macrophages: regulation by NF-kappa B is independent of c-Jun or C/EBP beta. *J Immunol*, 164(8): 4277–4285.

Liu MY, Hattori Y, Fukao M, Sato A, Sakuma I, Kanno M (2001). Alterations EDHF-mediated hyperpolarization and relaxation in mesenteric artery of female rats in long-term deficiency of oestrogen and during oestrus cycle. *Br J Pharmacol*, 132: 1035–1046.

Liu SF, Malik AB (2006). NF-kappa $\beta$  activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 290: L622–L645.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4):402-8.

Loffing J, Korbmacher C (2009). Regulated sodium transport in the renal connecting tubule (CNT) via the epithelial sodium channel (ENaC). *Pflugers Arch - Eur J Physiol*, 458: 111–135.

Lowe DG, Chang MS, Hellmiss R, Chen E, Singh S, Garbers DL, Goeddel DV (1989). Human atrial natriuretic peptide receptor defines a new paradigm for second messenger signal transduction. *Embo J*, 8: 1377–1384.

Lund CO, Nilas L, Pedersen SH, Dalsgaard T, Ottesen B. (2004) Tibolone and its metabolites acutely relax rabbit coronary arteries in vitro. *Maturitas*, 49: 179–188.

MacRitchie AN, Jun SS, Chen Z, German Z, Yuhanna IS, Sherman TS, Shaul PW (1997). Estrogen upregulates endothelial nitric oxide synthase gene expression in fetal pulmonary artery endothelium. *Circ Res*, 81: 355–362.

Maffei S, Del Ry S, Prontera C, Clerico A (2001). Increase in circulating levels of cardiac natriuretic peptides after hormone replacement therapy in postmenopausal women. *Clin Sci*, 101: 447–453.

Magaldi AJ, Cesar KR, de Araujo M (2003). Angiotensin-(1-7) stimulates water transport in rat inner medullary collecting duct: evidence for involvement of vasopressin V2 receptors. *Pflugers Arch*, 447:223-30.

Magness RR & Rosenfeld CR (1989). Local and systemic estradiol-17 $\beta$ : effects on uterine and systemic vasodilatation. *American Journal of Physiology*, 256: E536–E542.

Marin J, Sánchez-Ferrer CF, Salices M (1988). Effects of ouabain on isolated cerebral and femoral arteries of the cat: a functional and biochemical study. *British Journal of Pharmacology*, 93: 43-52.

Meeuwssen IB, Samson MM, Duursma SA, Verhaar HJ (2001) The effect of tibolone on fat mass, fat-free mass, and total body water in postmenopausal women. *Endocrinology*, 142: 4813–4817.

Mendelsohn ME, Karas RH (1999). The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med*, 340(23): 1801–1811.

Mirkin S, Archer DF (2007). Effects of tibolone and its metabolites on Angiopoietin-1, Tie-2 and tumor necrosis factor-alpha mRNA in Ishikawa cells. Implication for tibolone's effects on the endometrium. *Maturitas*, 57: 338–346.

Molero L, Garcia-Duran M, Diaz-Recasens J, Rico L, Casado S, Lopez-Farre A (2002). Expression of estrogen receptor subtypes and neuronal nitric oxide synthase in neutrophils from women and men: regulation by estrogen. *Cardiovascular Research*, 56: 43–51.

Moncada S, Higgs A (1993). The L-arginine-nitric oxide pathway. *New England Journal of Medicine*, 329: 2002–2012.

Moore R (2001). Livial: a review of clinical studies. *Bristh Journal Obstetric & Gynaecology*, 106 Suppl 19: 1–21.

Morishita M, Miyagi M, Iwamoto Y. Effects of sex hormones on production of interleukin-1 by human peripheral monocytes (1999). *J Periodontol.*, 70(7): 757–60.

Moro C, Crampes F, Sengenès C, De Glisezinski I, Galitzky J, Thalamas C, Lafontan M (2004). Atrial natriuretic peptide contributes to physiological control of lipid mobilization in humans. *Faseb J*, 18: 908–910.

Morris E, Wilson P, Robinson J, Rymer J (1999). Long term effects of tibolone on the genital tract in postmenopausal women. *Bristh Journal Obstetric & Gynaecology*, 106: 954–959.

Moysés MR, Barker LA, Cabral AM (2001). Sex hormone modulation of serotonin-induced coronary vasodilation in isolated heart. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 34 (7): 949–58.

- Mueller SO & Korach KS (2001). Estrogen receptors and endocrine diseases: lessons from estrogen receptor knockout mice. *Curr. Opin. Pharmacology*, 1: 613–619.
- Munoz J, Derstine A, Gower BA (2002). Fat distribution and insulin sensitivity in postmenopausal women: influence of hormone replacement. *Obes. Res.* 10: 424–431.
- Nagase M, Katafuchi T, Hirose S, Fujita T (1997) Tissue distribution and localization of natriuretic peptide receptor subtypes in strokeprone spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*, 15: 1235–1243.
- Nakajima T, Kitazawa T, Hamada E, Hazama H, Omata M, Kurachi Y (1995). 17beta-estradiol inhibits the voltage-dependent L-type Ca<sup>2+</sup> current in aortic smooth muscle cells. *European Journal of Pharmacol*, 294: 625–635.
- Nakano Y, Oshima T, Matsuura H, Kajiyama G, Kambe M (1998). Effect of 17beta-estradiol on inhibition of platelet aggregation in vitro is mediated by an increase in NO synthesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18(6):961-7.
- Nakao K, Ogawa Y, Suga S, Imura H (1992). Molecular biology and biochemistry of the natriuretic peptide system I: natriuretic peptides. *J Hypertens*, 10: 907–912.
- Nash JD, Ozols RF, Smyth JF, Hamilton TC. (1989). Estrogen and anti-estrogen effects on the growth of human epithelial ovarian cancer in vitro. *Obstetric & Gynecology*, 73: 1009–1016.
- Nickenig G, Baumer AT, Grohe C, Kahlert S, Strehlow K, Rosenkranz S, Stablein A, Beckers F, Smits JF, Daemen MJ, Bohm M (1998). Estrogen modulates AT1 receptor gene expression in vitro and in vivo. *Circulation*, 97: 2197–2201.
- Node K, Kitakaze M, Kosaka H, Minamino T, Sato H, Kuzuya T, Hori M (1997). Roles of NO and Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in coronary vasodilation induced by 17beta-estradiol in ischemic heart failure. *FASEB J*, 11(10):793-9.

Okamura H, Kelly PA, Chabot JG, Morel G, Belles-Isles M, Heisler S (1988). Atrial natriuretic peptide receptors are present in brown adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun*, 156: 1000–1006.

Oliver PM, Fox JE, Kim R, Rockman HA, Kim HS, Reddick RL, Pandey KN, Milgram SL, Smithies O, Maeda N (1997). Hypertension, cardiac hypertrophy, and sudden death in mice lacking natriuretic peptide receptor A. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94(26): 14730–14735.

Opal SM, DePalo VA (2000). Anti-Inflammatory Cytokines. *Chest*, 117: 1162–1172.

Oppenheim JJ (2001). Cytokines: past, present, and future. *Int J Hematol.*, 74(1): 3–8.

Ozaki K, Leonard WJ (2002). Cytokine and cytokine receptor pleiotropy and redundancy. *J Biol Chem*, 277(33): 29355–29358.

Pacifici R. (1996). Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res*, 11: 1043–1051.

Paech K, Webb P, Kuiper GG, Nilsson S, Gustafsson J, Kushner PJ, Scanlan TS (1997). Differential ligand activation of estrogen receptors ER $\alpha$  and ER $\beta$  at AP1 sites. *Science*, 277: 1508–1510.

Palin SL, McTernan PG, Anderson LA, Sturdee DW, Barnett AH, Kumar S (2003). 17 $\beta$ -estradiol and anti-estrogen ICI:compound 182,780 regulate expression of lipoprotein lipase and hormone-sensitive lipase in isolated subcutaneous abdominal adipocytes. *Metabolism*, 52(4): 383–388.

Pallottini V, Bulzomi P, Galluzzo P, Martini C, Marino M (2008). Estrogen regulation of adipose tissue functions: involvement of estrogen receptor isoforms. *Infect Disord Drug Targets*, 8(1): 52–60.

Pandey KN (2005). Biology of natriuretic peptides and their receptors. *Peptides*, 26: 901–932.

Pantaleão TU, Mousovich F, Rosenthal D, Padrón AS, Carvalho DP, da Costa VM (2010). Effect of serum estradiol and leptin levels on thyroid function, food intake and body weight gain in female Wistar rats. *Steroids*, 75(10): 638–642.

Paredes-Carbajal MC, Juarez-Oropeza MA, Ortiz-Mendoza CM, Mascher D (1995). Effects of acute and chronic estrogenic treatment on vasomotor responses of aortic rings from ovariectomized rats. *Life Sciences*, 57: 473–486.

Pechere-Bertschi A, Maillard M, Stalder H, Brunner HR, Burnier M (2002). Renal segmental tubular response to salt during the normal menstrual cycle. *Kidney Int*, 61: 425–431.

Pinto FM, Armesto CP, Magraner J, Trujillo M, Martin JD, Candenias ML (1999). Tachykinin receptor and neutral endopeptidase gene expression in the rat uterus: characterization and regulation in response to ovarian steroid treatment. *Endocrinology*, 140: 2526–2532.

Porter JG, Arfsten A, Fuller F, Miller JA, Gregory LC, Lewicki JA (1990). Isolation and functional expression of the human atrial natriuretic peptide clearance receptor cDNA. *Biochem Biophys Res Commun*, 171: 796–803.

Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM (2006) Natriuretic Peptides, Their Receptors, and Cyclic Guanosine Monophosphate-Dependent Signaling Functions. *Endocrine Reviews* 27: 47–72.

Prelevic GM, Beljic T, Ginsburg J (1997). The effect of tibolone on cardiac flow in postmenopausal women with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Maturitas*, 27: 85-90.

Rahimian R, Dubé GP, Toma W, Dos Santos N, McManus BM, Van Breemen C (2002). Raloxifene enhances nitric oxide release in rat aorta via increasing endothelial nitric oxide mRNA expression. *European Journal of Pharmacology*, 434(3): 141–149.

Reed MJ, Kloosterboer HJ, (2004). Tibolone: a selective tissue estrogenic activity regulator (STEAR). *Maturitas*, 30; 48 Suppl 1:S4–S6.



Regitz-Zagrosek V, Oertelt-Prigione S, Seeland U, Hetzer R (2010). Sex and gender differences in myocardial hypertrophy and heart failure. *Circ J*, 74(7): 1265-73.

Riccioni G, D'Orazio N, Menna V, Lambo MS, Guagnano MT, Di Ilio C (2003). Role of leptin in anorexia nervosa. *La Clinica Terapeutica*, 154(6): 401–404.

Riedel M, Oeltermann A, Mügge A, Creutzig A, Rafflenbeul W, Lichtlen P (1995). Vascular responses to 17 $\beta$ -oestradiol in postmenopausal women. *European Journal of Clinical Investigations*, 25: 44–47.

Richards AM, Lainchbury JG, Troughton RW, Espiner EA, NichollsMG (2004). Clinical applications of B-type natriuretic peptides. *Trends Endocrinol Metab*, 15: 170–174.

Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N (2000). C-Reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women, *N Engl J Med*. 342(12): 836–843

Roesch DM, Tian Y, Zheng W, Shi M, Verbalis JG, Sandberg K (2000). Estradiol Attenuates Angiotensin-Induced Aldosterone Secretion in Ovariectomized Rats. *Endocrinology*, 141: 4629–4636.

**Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, Lacroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J (2002). Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*, 288: 321–333.**

Rubattu S, Volpe M (2001). The atrial natriuretic peptide: a changing view. *J. Hypertens.*, 19(11): 1923–1931.

**Ruehlmann DO, Steinert JR, Valverde MA, Jacob R, Mann GE (1998). Environmental estrogenic pollutants induce acute vascular relaxation by inhibiting L-type Ca<sup>2+</sup> channels in smooth muscle cells. *FASEB J*, 12(7): 613-9.**

Ruskoaho H. (2003). Cardiac hormones as diagnostic tools in heart failure. *Endocr Rev.*, 24(3): 341–356.

Rymer J, Chapman MG & Fogelman I (1994). Effect of tibolone on postmenopausal bone loss. *Osteoporosis Int*, 4: 314-319.

Saengsirisuwan V, Pongseeda S, Prasannarong M, Vichaiwong K, Toskulkao C (2009). Modulation of insulin resistance in ovariectomized rats by endurance exercise training and estrogen replacement. *Metabolism.*, 58(1): 38–47.

Santollo J, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA, Eckel LA (2010). Activation of ER $\alpha$  is necessary for estradiol's anorexigenic effect in female rats. *Hormones and Behavior* (in press).

Santollo J, Eckel LA (2008). Estradiol decreases the orexigenic effect of neuropeptide Y, but not agouti-related protein, in ovariectomized rats. *Physiol Behav*, 191: 173–177.

Santos RAS, Simões e Silva AC, Magaldi AJ (1996). Evidence for a physiological role of angiotensin-(1-7) in the control of hydroelectrolyte balance. *Hypertension*, 27:875-84.

Santos RAS, Ferreira AJ, Simões, Silva AC (2008). Recent advances in the angiotensin converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. *Exp Physiol*, 93:519-27.

Santos RL, Abreu GR, Bissoli NS, Moyses MR. (2004). Endothelial mediators of 17 beta-estradiol-induced coronary vasodilation in the isolated rat heart. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 37(4): 569–575.

Sarzani R, Paci VM, Zingaretti CM, Pierleoni C, Cinti S, Cola G, Rappelli A, Dessì-Fulgheri P (1995). Fasting inhibits natriuretic peptides clearance receptor expression in rat adipose tissue. *J Hypertens*, 13: 1241–1246.

Sarzani R, Dessì-Fulgheri P, Paci VM, Espinosa E, Rappelli A (1996). Expression of natriuretic peptide receptors in human adipose and other tissues. *J. Endocrinol Invest*, 19: 581–585.

Sarzani R, Dessì-Fulgheri P, Salvi F, Serenelli M, Spagnolo D, Cola G, Pupita M (1999). A novel promoter variant of the natriuretic peptide clearance receptor gene is

associated with lower atrial natriuretic peptide and higher blood pressure in obese hypertensives. *J Hypertension*; 17: 1301–1305.

Schulz S, Singh S, Bellet RA, Singh G, Tubb DJ, Chin H, Garbers DL (1989). The primary structure of a plasma membrane guanylate cyclase demonstrates diversity within this new receptor family. *Cell*, 58: 1155–1162.

Seidman CE, Duby AD, Choi E, Graham RM, Haber E, Homcy C, Smith JA, Seidman JG (1984). The structure of rat preproatrial natriuretic factor as defined by complementary DNA clone. *Science*, 225(4659): 324–326.

Sengenès C, Berlan M, De Glisezinski I, Lafontan M, Galitzky J (2000). Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human adipocytes. *FASEB J*, 14: 1345–1351.

Sharma PK, Thakur MK (2004). Estrogen receptor alpha expression in mice kidney shows sex differences during aging. *Biogerontology*, 5(6): 375–381.

Shumaker SA, Legault C, Rapp SR, et al (2003). Estrogen plus progestin and the incidence of dementia and mild cognitive impairment in postmenopausal women. The Women's Health Initiative Memory study: a randomized controlled trial. *JAMA*; 289: 2651–62.

Silbergberg SD & Magleby KL (1999). Beating the odds with big K. *Science*, 285: 1859–1860.

Silva-Antonialli MM, Tostes RC, Fernandes L, Fior-Chadi DR, Akamine EH, Carvalho MH, Fortes ZB, Nigro D (2004). A lower ratio of AT1/AT2 receptors of angiotensin II is found in female than in male spontaneously hypertensive rats. *Cardiovascular Research*, 62: 587–593.

Simões e Silva AC, Bello AP, Baracho NC (1998). Diuresis and natriuresis produced by long term administration of a selective angiotensin-(1-7) antagonist in normotensive and hypertensive rats. *Regul Pept*, 74:177-84.

Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil D, Ley K, Chin WW, Liao JK (2000). Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature*, 407: 538–541.

Simoncini T, Genazzani AR (2003). Non-genomic actions of sex steroid hormones. *Eur J Endocrinol*, 148: 281–292.

Simoncini T, Rabkin E, Liao JK (2003). Molecular basis of cell membrane estrogen receptor interaction with phosphatidylinositol 3-kinase in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23:198–203.

Simoncini T, Mannella P, Fornari L, Caruso A, Varone G, Garibaldi S, Genazzani AR (2004). Tibolone activates nitric oxide synthesis in human endothelial cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 89(9): 4594–4600.

Sims ST, Rehrer NJ, Bell ML, Cotter JD (2008). Endogenous and exogenous female sex hormones and renal electrolyte handling: effects of an acute sodium load on plasma volume at rest. *J Appl Physiol*, 105:121-127.

Siow RC, Li FY, Rowlands DJ, de Winter P, Mann GE (2007). Cardiovascular targets for estrogens and phytoestrogens: transcriptional regulation of nitric oxide synthase and antioxidant defense genes. *Free Radic. Biol. Med.* 42: 909–925.

Siseles N, Halperin M, Benecia H (1995). A comparative study of two hormone replacement regimens on safety and efficacy variables. *Maturitas*, 21: 201-210.

Spinetti A, Margutti A, Bertolini S, Bernardi F, BiFulco G, degli Uberti EC, Petraglia F, Genazzani AR (1997). Hormonal replacement therapy affects calcitonin gene-related peptide and atrial natriuretic peptide secretion in postmenopausal women. *Eur J Endocrinol*, 137: 664–669.

Stachenfeld NS, Dipietro L, Palter SF, Nadel ER (1998). Estrogen influences osmotic secretion of AVP and body water balance in postmenopausal women. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*, 274: 187–195.

Stachenfeld NS, Splenser AE, Calzone WL, Taylor MP, Keefe DL (2001). Sex differences in osmotic regulation of AVP and renal sodium handling. *J Appl Physiol*, 91: 1893–1901.

Stachenfeld NS & Keefe DL (2002). Estrogen effects on osmotic regulation of AVP and fluid balance. *American Journal of Physiology & Endocrinology Metabolism*, 283(4): E711–21.

Stampfer MJ & Colditz GA (1991). Estrogen replacement therapy and coronary heart disease: a quantitative assessment of epidemiologic evidence. *Prev Med*, 20: 47-63.

Stevenson JC (2000). Cardiovascular effects of oestrogen. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 74: 387–393.

Stice JP, Eiserich JP, Knowlton AA (2009). Role of aging versus the loss of estrogens in the reduction in vascular function in female rats. *Endocrinology*, 150(1): 212–219.

Stumpf WE, Sar M, Aumüller G (1977). The heart: a target organ for estradiol. *Science*, 196(4287): 319–321.

Stygar D, Masironi B, Eriksson H, Sahlin L (2007). Studies on estrogen receptor (ER)  $\alpha$  and  $\beta$  responses on gene regulation in peripheral blood leukocytes in vivo using selective ER agonists. *Journal of Endocrinology*, 194: 101–119.

Stygar D, Wang H, Stjernholm Vladic Y, Ekman G, Eriksson H & Sahlin L (2001). Co-localization of oestrogen receptor beta and leukocyte markers in the human cervix. *Molecular Human Reproduction*, 7: 881–886.

Sudhir K, Chou TM, Mullen WL, Hausmann D, Collins P, Yock PG, Chatterjee K (1995). Mechanisms of estrogen-induced vasodilation: in vivo studies in canine coronary conductance and resistance arteries. *J Am Coll Cardiol*, 26(3): 807-14.

Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H (1988). A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature*, 332(6159): 78–81.

Sudoh T, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H (1990). C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun.*, 168(2): 863–870.

Syed V, Ulinski G, Mok SC, Yiu GK, Ho SM (2001). Expression of gonadotropin receptor and growth responses to key reproductive hormones in normal and malignant human ovarian surface epithelial cells. *Cancer Research*, 61: 6768–6776.

Tanaka M, Nakaya S, Watanbe M, Kumai T, Tateishi T, and Kobayashi S (1997). Effects of ovariectomy and estrogen replacement on aorta angiotensin-converting enzyme activity in rats. *Jpn J Pharmacol*, 73:361–363.

Tostes RC, Nigro D, Fortes ZB, Carvalho MHC (2003). Effects of estrogen on the vascular system. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 36: 1143–1158.

Tsukagoshi H, Shimizu Y, Kawata T, Hisada T, Shimizu Y, Iwamae S, Ishizuka T, Iizuka K, Dobashi K, Mori M (2001). Atrial natriuretic peptide inhibits tumor necrosis factor-alpha production by interferon-gamma activated macrophages via suppression of p38 mitogenactivated protein kinase and nuclear factor-kappa B activation. *Regul Pept*, 99: 21–29.

Tsutamoto T, Kanamari T, Morigami N, Sugimoto Y, Yamaoka O, Kinoshita M (1993). Possibility of down-regulation of atrial natriuretic peptide receptor coupled to guanylate cyclase in peripheral vascular beds of patients with chronic severe heart failure. *Circulation*, 87: 70–75.

Valdivia I & Ortega D (2000). Mammographic density in postmenopausal women treated with tibolone, estriol or conventional hormone replacement therapy. *Clinical Drug Investigation*, 20: 101–107.

Valverde MA, Rojas P, Amigo J, Cosmelli D, Orio P, Bahamonde MI, Mann GE, Vergara C, Latorre R (1999). Acute activation of Maxi-K channels (hSlo) by estradiol binding to the beta subunit. *Science*, 17;285(5435):1929-31.

Vanhoutte PM (2000). Endothelial dysfunction and inhibition of converting enzyme. *Revista Brasileira de Hipertensão*, 7(1): 14–23.

Vanhoutte PM (2009). How We Learned to Say NO. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 29(8): 1156–60.

Vellaichamy E, Kaur K, Pandey KN (2007). Enhanced activation of pro-inflammatory cytokines in mice lacking natriuretic peptide receptor-A. *Peptides*, 28(4): 893–899.

Vila E, Salaices M. (2005). Cytokines and vascular reactivity in resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 288(3): H1016–1021.

Vlantis K, Pasparakis M (2010). Role of TNF in pathologies induced by nuclear factor kappaB deficiency. *Curr Dir Autoimmun*, 11: 80–93.

Vollmar AM, Lang RE, Hanze J, Schulz R (1990). The rat thymus--a site of atrial natriuretic peptide synthesis. *Peptides*, 11: 33–37.

Vollmar AM, Schulz R (1990). Atrial natriuretic peptide in lymphoid organs of various species. *Comp Biochem Physiol A*, 96: 459–463.

Vollmar AM, Schulz R (1994). Gene expression and secretion of atrial natriuretic peptide by murine macrophages. *J Clin Invest*, 94:539–545.

Vollmar AM, Schulz R (1995). Expression and differential regulation of natriuretic peptides in mouse macrophages. *J Clin Invest*, 95: 2442–2450.

Vollmar AM, Schmidt KN, Schulz R (1996). Natriuretic peptide receptors on rat thymocytes: inhibition of proliferation by atrial natriuretic peptide. *Endocrinology*, 137: 1706–1713.

Vollmar AM (2005). The role of atrial natriuretic peptide in the immune system. *Peptides*, 26: 1086–1094.

Vural P, Canbaz M, Akgul C (2006a). Effects of hormone replacement therapy on plasma pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines and some bone turnover markers in postmenopausal women. *Pharmacological Research*, 53: 367–371.

Vural P, Akgul C, Canbaz M (2006b). Effects of hormone replacement therapy on plasma pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines and some bone turnover markers in postmenopausal women. *Pharmacological Research*, 54: 298–302.

Wade GN, Gray JM (1979). Gonadal effects on food intake and adiposity: a metabolic hypothesis. *Physiol. Behav.*, 22: 583–593.

Wakatsuki A, Ikenoue N, Shinohara K, Watanabe K, Fukaya T (2003). Effect of lower dosage of oral conjugated equine estrogen on inflammatory markers and endothelial function in healthy postmenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 24: 571–576.

Wang TJ, Larson MG, Levy D, Benjamin EJ, Leip EP, Wilson PW, Vasan RS (2004). Impact of obesity on plasma natriuretic peptide levels. *Circulation*, 109: 594–600.

Wang M, Ebmeier CC, Olin JR, Anderson RJ (2006). Sulfation of tibolone metabolites by human postmenopausal liver and small intestinal sulfotransferases (SULTs). *Steroids*, 71: 343–351.

Weiner CP, Lizasoain I, Baylis Sa, Knowles RG, Charles IG, Moncada S (1994). Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America*, 91: 5212–5216.

White RE, Darkow DJ, Lang JLF (1995). Estrogen relaxes coronary arteries by opening BKCa channels through a cGMP-dependent mechanism. *Circulation Research*, 77: 936–942.

Wilcox JN, Augustine A, Goeddel DV, Lowe DG (1991). Differential regional expression of three natriuretic peptide receptor genes within primate tissues. *Mol Cell Biol*, 11: 3454–3462

Wild RA (1996). Estrogen: effects on the vascular tree. *Obstetrics and Gynecology*, 87: 27–35.

Xing D, Nozell S, Chen YF, Hage F, Oparil S (2009). Estrogen and Mechanisms of Vascular Protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 29: 289–295.

Yandle TG, Richards AM, Gilbert A, Fisher S, Holmes S, Espiner EA (1993). Assay of brain natriuretic peptide (BNP) in human plasma: evidence for high molecular weight



BNP as a major plasma component in heart failure. *J Clin Endocrinol Metab*, 76: 832–838.

Yang XD, Huang B, Li M, Lamb A, Kelleher NL, Chen LF (2009). Negative regulation of NF- $\kappa$ B action by Set9-mediated lysine methylation of the RelA subunit. *Embo J*, 28: 1055–1066.

Yoshitake K, Yokota K, Kasugai Y, Kagawa M, Sukamoto T, Nakamura T (1999). Effects of 16 weeks of treatment with tibolone on bone mass and bone mechanical and histomorphometric indices in mature ovariectomized rats with established osteopenia on a calcium-diet. *Bone*, 25: 311–319.

Yu, BP, Chung HY (2006). The inflammatory process in aging. *Rev Clin Gerontol* 16: 179–187.

Yu JH, Jeong YJ, Kwon KB, Kim SZ, Kim SH, Park JW, Yu HC (2008). A comparison of the lipolytic activity of different natriuretic peptides on human adipocytes. *Int J Pept Res Ther*, 14: 167–172.

Zen M, Ghirardello A, Iaccarino L, Tonon M, Campana C, Arienti S, Rampudda M, Canova M, Doria A (2010). Hormones, immune response, and pregnancy in healthy women and SLE patients. *Swiss Med Wkly*, 140 (13–14) : 187–201.

Zhang Y, Novak K (1995). Atrial natriuretic factor release during pregnancy in rats. *J Physiol*, 488: 509–514.

Zhang F, Ram JL, Standley PR, Sowers JR (1994). 17 beta-Estradiol attenuates voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> currents in A7r5 vascular smooth muscle cell line. *Am J Physiol*, 266 (4 Pt 1): C975-80.

**Zhang XZ, Song LG, Li H, Han JF, Qian GF, He M, Li Y, Gu L (2006). Effects of alendronate on bone mineral density, cytokines and indices of bone metabolism in postmenopausal osteoporotic patients. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*. 2006 Jul; 45(7): 565–568.**

Zhang H, Park Yoonjung, Wu Junxi, Chen Xiu Ping, Lee Sewon, Yang Jiyeon, Dellsperger Kevin C., Zhang C (2009), Role of TNF- $\alpha$  in vascular dysfunction. *Clinical Science*, 116: 219–230.