

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

IZABELA FACCO CALIMAN

**MECANISMOS DE PREJUÍZO DO RELAXAMENTO VIA ENDOTELIAL
E O ESTRESSE OXIDATIVO SÃO REVERTIDOS PELA
ATORVASTATINA EM RATAS OVARIECTOMIZADAS**

**VITÓRIA
2012**

IZABELA FACCO CALIMAN

**MECANISMOS DE PREJUÍZO DO RELAXAMENTO VIA ENDOTELIAO
E O ESTRESSE OXIDATIVO SÃO REVERTIDOS PELA
ATORVASTATINA EM RATAS OVARIECTOMIZADAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Nazaré Souza Bissoli

VITÓRIA
2012

Caliman, Izabela Facco 1989

Mecanismos de disfunção do relaxamento endotelial e estresse oxidativo são revertidos pela atorvastatina em ratas ovariectomizadas [Vitória] 2012. xx, 101p., 29,7 cm (UFES, M. Sc. Ciências Fisiológicas, 2012).

Orientador: Prof^a. Dr^a. Nazaré Souza Bissoli

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Raquel Santos de Medeiros Garcia

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

1. Ovariectomia 2. Atorvastatina 3. Reatividade Vascular 4. Óxido Nítrico
5. Espécies Reativas do Oxigênio 6. NF-kB

IZABELA FACCO CALIMAN

**MECANISMOS DE DISFUNÇÃO DO RELAXAMENTO ENDOTELIAL E
ESTRESSE OXIDATIVO SÃO REVERTIDOS PELA ATORVASTATINA
EM RATAS OVARIECTOMIZADAS**

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

Aprovada em 26 de novembro de 2012

Prof^a. Dr^a. Nazaré Souza Bissoli
Dept^o. Ciências Fisiológicas – UFES
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Ana Raquel Santos de Medeiros Garcia
Dept^o. Ciências Biológicas e da Saúde – IFES
Co-orientadora

Prof. Dr. Thiago de Melo Costa Pereira
Dept^o. Ciências Biológicas e da Saúde – IFES

Prof^a. Dr^a. Suely Gomes de Figueiredo
Dept^o. Ciências Fisiológicas – UFES

Prof^a. Dr^a. Ivanita Stefanon
Dept^o. Ciências Fisiológicas – UFES
Coordenadora do PPGCF – UFES

**VITÓRIA
2012**

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me permitiu chegar até aqui, dando força, sabedoria e paciência para que pudesse atingir todas as metas.

A minha família, que soube entender minha ausência em muitos momentos durante o período do mestrado e, mesmo sem entender muito bem os motivos, sempre me apoiou e incentivou.

A Prof^a. Dr^a. Nazaré Souza Bissoli, que permitiu o desenvolvimento dessa dissertação em seu laboratório. Desde a Iniciação científica, se fez uma orientadora presente e dedicada, confiando sempre em meu trabalho. Obrigada!

Aos todos os amigos do laboratório de hipertensão experimental, em especial Polyana e Karine, pelos momentos de convivência e cumplicidade. A Aline, pela amizade e parceria em todas as fases desse trabalho, pelo ensinamento das técnicas e pela confiança desde a Iniciação científica, e ao Phablo, pela sua benevolente contribuição com as análises do DHE.

Aos demais alunos que passaram pelo LHE, agradeço pela disposição em ajudar e pela contribuição para o meu aprendizado.

Aos alunos de Iniciação Científica, Antônio, Glauciene e Lara, sem os quais nenhuma etapa deste trabalho teria sido concluída. Obrigada pela paciência, amizade e parceria nos experimentos.

A Prof^a. Dr^a. Sônia Gouvêa e as alunas Renata e Cíntia, pelo agradável convívio no laboratório.

A Prof^a. Dr^a. Suely Gomes de Figueiredo e aos alunos do laboratório de química em proteínas pelo auxílio em algumas técnicas e pela disponibilidade de todos os momentos.

Aos alunos do programa, pelas conversas de descontração e pelo auxílio neste trabalho, especialmente a Taís pela ajuda com o western blot, Camille com a técnica do DHE e Cristie pela ajuda com os equipamentos do multiusuário.

Ao LHMI, pela estrutura e auxílio prestados, que permitiram a realização de parte do protocolo experimental deste estudo.

Aos professores do PPGCF, secretários e funcionários, em especial Edson e Marildo, pela atenção e apoio durante os experimentos.

Aos demais amigos que contribuíram com este trabalho, pelo incentivo e disponibilidade. Ao Abreu, agradeço pela gentil colaboração com as dosagens referentes ao perfil lipídico.

A todos aqueles que, embora não nomeados, se somaram para tornar possível este momento, meu reconhecido e carinhoso OBRIGADA!!!

"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

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1 DISFUNÇÃO VASCULAR E DEFICIÊNCIA ESTROGÊNICA.....	22
1.2 PROCESSO INFLAMATÓRIO E DISFUNÇÃO VASCULAR.....	26
1.3 DISFUNÇÃO VASCULAR E ESTATINAS.....	28
2. OBJETIVOS	30
2.1 OBJETIVO GERAL.....	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	31
3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	31
3.3 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	32
3.4 OVARECTOMIA.....	33
3.5 TRATAMENTOS.....	33
3.6 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOLÓGICOS.....	34
3.6.1 Evolução ponderal e razão de peso do útero e coração pelo comprimento da tíbia	34
3.6.2 Perfil lipídico	35
3.7 DETERMINAÇÃO DA FASE DO CICLO ESTRAL.....	35
3.8 REATIVIDADE VASCULAR DO LEITO MESENTÉRICO.....	35
3.8.1 Protocolos de estudo da reatividade vascular	36
3.8.1.1 Reatividade vascular a Acetilcolina (ACh) sem inibidores farmacológicos.....	36
3.8.1.2 Reatividade vascular a Acetilcolina (ACh) na presença de	

inibidores farmacológicos.....	37
3.8.1.3 Avaliação da participação do óxido nítrico (NO) no relaxamento dependente do endotélio.....	37
3.8.1.4 Avaliação da participação dos prostanóides derivados da Ciclooxygenase (COX) e do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) no relaxamento dependente do endotélio.....	38
3.8.1.5 Influência da produção de espécies reativas ao oxigênio (EROs) no relaxamento dependente do endotélio.....	38
3.8.2 Análise dos resultados de reatividade vascular.....	38
3.9 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS PROTEICOS POR WESTERN BLOT..	39
3.9.1 Extração das proteínas.....	39
3.9.2 Dosagem das proteínas.....	40
3.9.3 Eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE).....	40
3.9.4 Transferência das proteínas	41
3.9.5 Incubação dos anticorpos.....	41
3.10 ESTUDO DA GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM ARTÉRIAS MESENTÉRICAS – DIHIDROETIDINA.....	42
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
4. RESULTADOS.....	44
4.1 EVOLUÇÃO PONDERAL E RAZÃO DE PESO DO ÚTERO E CORAÇÃO PELO COMPRIMENTO DA TÍBIA.....	44
4.2 PERFIL LIPÍDICO.....	46
4.3 REATIVIDADE VASCULAR DO LEITO MESENTÉRICO.....	46
4.3.1 Avaliação da resposta relaxante dependente do endotélio	47
4.3.2 Avaliação da participação do óxido nítrico (NO) no relaxamento dependente do endotélio.....	48

4.3.2.1 Expressão proteica das isoformas endotelial e induzível da óxido nítrico sintase (eNOS e iNOS) nos ramos mesentéricos	52
4.3.3 Avaliação da participação do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e dos prostanóides derivados da Ciclooxygenase (COX) no relaxamento dependente do endotélio.....	54
4.3.3.1 Expressão proteica da Ciclooxygenase 2 (COX-2) nos ramos mesentéricos.....	57
4.3.4 Participação das espécies reativas ao oxigênio (EROs) na resposta de relaxamento dependente do endotélio.....	58
4.3.4.1 Expressão proteica da gp91phox nos ramos mesentéricos dos grupos experimentais.....	61
4.3.4.2 Quantificação da produção de Espécies Reativas de Oxigênio pela oxidação do dihidroetídio (DHE) nas artérias mesentéricas dos grupos experimentais.....	62
4.4 EFEITO DOS TRATAMENTOS COM 17B-ESTRADIOL E ATORVASTATINA SOBRE A EXPRESSÃO PROTEICA DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO NUCLEAR KAPPA B (NF-KB) NOS RAMOS MESENTÉRICOS DAS FÊMEAS OVARIECTOMIZADAS.....	64
5. DISCUSSÃO.....	66
6. CONCLUSÕES.....	82
7. REFERÊNCIAS.....	83

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Parâmetros ponderais de peso corporal (inicial e final) e peso de órgãos (coração e útero) em gramas (g) e razão destes com o comprimento de tíbia em centímetros (cm) nos grupos Fêmea Sham (SHAM), Fêmea Ovariectomizada (OVX), Fêmeas Ovariectomizadas tratadas com 17 β -estradiol (EST) e Atorvastatina (ATO)..... 45
- Tabela 2:** Perfil lipídico, em mg/dL, nos grupos Fêmea Sham (SHAM), Fêmea Ovariectomizada (OVX), Fêmeas Ovariectomizadas Tratadas com 17 β -estradiol (EST) e Atorvastatina (ATO)..... 46
- Tabela 3:** Valor da Resposta Máxima (R_{máx}) e do log da concentração da droga para produzir 50% da resposta máxima (pD₂) no leito mesentérico obtidos através das curvas de dose-resposta de Acetilcolina (Ach) *in bolus* nos grupos Wistar Sham (SHAM), Ovariectomizada (OVX), Ovariectomizadas Tratadas com 17 β -estradiol (EST) e Atorvastatina (ATO) na ausência de inibidores..... 48
- Tabela 4:** Valor da Resposta Máxima (R_{máx}) e do log da concentração da droga para produzir 50% da resposta máxima (pD₂) no leito mesentérico obtidos através das curvas de dose-resposta de Acetilcolina (Ach) *in bolus* nos grupos Wistar Sham (SHAM), Ovariectomizada (OVX), Ovariectomizadas Tratadas com 17 β -estradiol (EST) e Atorvastatina (ATO) na presença de Aminoguanidina (AG) e L-NAME..... 51
- Tabela 5:** Valor da Resposta Máxima (R_{máx}) e do log da concentração da droga para produzir 50% da resposta máxima (pD₂) no leito mesentérico obtidos através das curvas de dose-resposta de Acetilcolina (Ach) *in bolus* nos grupos Wistar Sham (SHAM), Ovariectomizada (OVX), Ovariectomizadas Tratadas com 17 β -estradiol (EST) e Atorvastatina (ATO) na presença de L-NAME com Indometacina (INDO) e Clotrimazol..... 57

Tabela 6: Valor da Resposta Máxima (R_{máx}) e do log da concentração da droga para produzir 50% da resposta máxima (pD₂) no leito mesentérico obtidos através das curvas de dose-resposta de Acetilcolina (ACh) *in bolus* nos grupos Wistar Sham (SHAM), Ovariectomizada (OVX), Ovariectomizadas Tratadas com 17 β -estradiol (EST) e Atorvastatina (ATO) na presença de Ácido Ascórbico e Apocinina..... 61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Efeito direto do estrogênio sobre os vasos sanguíneos.....	23
Figura 2: Estrogênio estimulando mecanismos de dilatação dependente do endotélio e da célula do músculo liso vascular.....	24
Figura 3: Pontos regulatórios relevantes na via sinalizadora do NF-kB.....	27
Figura 4: Organograma do Protocolo Experimental.....	32
Figura 5: Fotografia da técnica de ovariectomia.....	33
Figura 6: Em (A) fotografia da artéria mesentérica superior. Em (B) fotografia do leito mesentérico, após canulação da artéria mesentérica, sendo perfundido pela solução nutritora.....	36
Figura 7: Registro típico representativo da construção da curva dose-resposta a ACh.....	37
Figura 8: Valores do peso corporal inicial e peso corporal final em gramas (g) dos grupos Wistar SHAM, Ovariectomizada (OVX), Ovariectomizada tratada com com 17 β -estradiol (EST) e Ovariectomizada tratada com Atorvastatina (ATO).....	44
Figura 9: Curva dose-resposta a acetilcolina (ACh) induzindo vasorrelaxamento no leito mesentérico nos grupos Sham, OVX, EST e ATO na ausência de inibidores.....	47
Figura 10: (A) Curva dose-resposta a acetilcolina (ACh) induzindo vasorrelaxamento no leito mesentérico nos grupos Sham, OVX, EST e ATO na presença de aminoguanidina (inibidor da iNOS); (B) Diferença percentual na área abaixo da curva (% dAUC) entre os grupos antes e após a inibição com aminoguanidina.....	49

Figura 11: (A) Curva dose-resposta a acetilcolina (ACh) induzindo vasorrelaxamento no leito mesentérico nos grupos Sham, OVX, EST e ATO na presença de L-NAME (inibidor da inespecífico da NOS); (B) Diferença percentual na área abaixo da curva (% dAUC) entre os grupos antes e após a inibição com L-NAME..... 50

Figura 12: Porcentagem de relaxamento máxima do LVM à ACh na ausência e presença dos inibidores Aminoguanidina (AG) e L-NAME..... 51

Figura 13: Resultados da expressão proteica da isoforma endotelial da óxido nítrico sintase (eNOS) nos ramos mesentéricos nos grupos Wistar Sham (SHAM), Ovariectomizada (OVX), Ovariectomizadas Tratadas com 17 β -estradiol (EST) e Atorvastatina (ATO)..... 52

Figura 14: Resultados da expressão proteica da isoforma induzível da óxido nítrico sintase (iNOS) nos ramos mesentéricos nos grupos Wistar Sham (SHAM), Ovariectomizada (OVX), Ovariectomizadas Tratadas com 17 β -estradiol (EST) e Atorvastatina (ATO)..... 53

Figura 15: (A) Curva dose-resposta a acetilcolina (ACh) induzindo vasorrelaxamento no leito mesentérico nos grupos Sham, OVX, EST e ATO na presença de Clotrimazol (inibidor da inespecífico da citocromo P450); (B) Diferença percentual na área abaixo da curva (% dAUC) entre os grupos antes e após a inibição com Clotrimazol..... 54

Figura 16: (A) Curva dose-resposta a acetilcolina (ACh) induzindo vasorrelaxamento no leito mesentérico nos grupos Sham, OVX, EST e ATO na presença de L-NAME (inibidor da NOS) e Indometacina (inibidor da COX); (B) Efeito da ovariectomia e dos tratamentos sobre a porcentagem da área abaixo da curva (% AUC) na presença conjunta de L-NAME e Indometacina..... 55

Figura 17: Diferença percentual na área abaixo da curva (% dAUC) na presença de L-NAME e após a inibição com L-NAME e INDO entre os grupos Wistar Sham (SHAM), Ovariectomizada (OVX), Ovariectomizadas Tratadas com 17 β -estradiol (EST) e Atorvastatina (ATO)..... 56

Figura 18: Resultados da expressão proteica da ciclooxigenase 2 (COX-2) nos ramos mesentéricos nos grupos Wistar Sham (SHAM), Ovariectomizada (OVX), Ovariectomizadas Tratadas com 17 β -estradiol (EST) e Atorvastatina (ATO).....	58
Figura 19: Curva dose-resposta a acetilcolina (Ach) induzindo vasorrelaxamento no leito mesentérico nos grupos Sham, OVX, EST e ATO na presença de Ácido Ascórbico (antioxidante não enzimático).....	59
Figura 20: Curva dose-resposta a acetilcolina (Ach) induzindo vasorrelaxamento no leito mesentérico nos grupos Sham, OVX, EST e ATO na presença de Apocinina (inibidor da NAD(P)H oxidase).....	60
Figura 21: Resultados da expressão proteica da subunidade gp91phox da NADP(H) oxidase nos ramos mesentéricos nos grupos Wistar Sham (SHAM), Ovariectomizada (OVX), Ovariectomizadas Tratadas com 17 β -estradiol (EST) e Atorvastatina (ATO).....	62
Figura 22: (A) Imagens de microscopia apresentam a fluorescência emitida por dihidroetídeo na artéria mesentérica dos ratos do grupo Sham, Ovariectomizado (OVX), Ovariectomizadas Tratadas com 17 β -estradiol (EST) e Atorvastatina (ATO). (B) Gráfico com valores da fluorescência emitida por dihidroetídeo.....	63
Figura 23: Resultados da expressão proteica da subunidade p65 do NF-kB nos ramos mesentéricos nos grupos Wistar Sham (SHAM), Ovariectomizada (OVX), Ovariectomizadas Tratadas com 17 β -estradiol (EST) e Atorvastatina (ATO).....	65
Figura 24: Potenciais mecanismos pelos quais os fatores de risco para doenças cardiovasculares levam ao desacoplamento da eNOS e disfunção endotelial.....	75

Figura 25: Diagrama esquemático mostrando os mecanismos propostos para a disfunção de relaxamento endotelial no leito vascular mesentérico de fêmeas ovariectomizadas e a normalização dos efeitos pela atorvastatina..... 81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC ASC: Ácido Ascórbico

ACh: Acetilcolina

AG: Aminoguanidina

APO: Apocinina

BH₄: tetrahidrobiopterina

CLO: Clotrimazol

COX: Ciclooxigenase

dAUC: diferenças das áreas abaixo das curvas

DHE: dihidroetídio

DVC: Doença cardiovascular

EDHF: Fator hiperpolarizante derivado de endotélio

EETs: ácidos epoxieicosatrienóicos

EROs: Espécies reativas do oxigênio

eNOS: Oxido nítrico sintase endotelial

iNOS: Oxido nítrico sintase induzível

nNOS: Oxido nítrico sintase neuronal

IL-1 β : Interleucine 1 beta

IL-6: Interleucina-6

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

HDL: Lipoproteína de alta densidade

HMG-CoA: 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A

I κ β : Inibidor kappa β

INDO: Indometacina

LDL: Lipoproteína de baixa densidade

L-NAME: N ω -nitro-L-arginina metil ester

LVM: Leito vascular mesentérico

NAD(P)H: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma química reduzida)

NF- κ B: fator de transcrição kappa B

NO: Oxido nítrico

NOS: Oxido nítrico sintase

O $_2^{\cdot-}$: Ânion superóxido

ONOO $^-$: Peroxinitrito

pD $_2$: logaritmo negativo da EC $_{50}$

PGs: prostanóides

PGI $_2$: Prostaciclina

PPARs: receptores ativados por proliferadores de peroxissoma

RE: Receptor de estrogênio

R $_{m\acute{a}x}$: Resposta máxima

TRH: Terapia de Reposição Hormonal

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

TXA $_2$: Tromboxano A $_2$

VLDL: Lipoproteína de muito baixa densidade

RESUMO

O aumento de doenças cardiovasculares (DCV) tem sido descrito em mulheres na pós-menopausa, porém há questionamentos sobre o uso das terapias hormonais quanto a sua eficácia em relação à cardioproteção. Assim terapias não-estrogênicas, como a atorvastatina, por apresentarem efeitos pleiotrópicos ligados ao sistema cardiovascular (SCV), poderiam beneficiar mulheres nessa fase da vida, entretanto poucos estudos compararam ação da atorvastatina com estrogênio sobre o SCV. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do tratamento com atorvastatina sobre a reatividade vascular do leito vascular mesentérico (LVM) em ratas ovariectomizadas, bem como a participação dos fatores de relaxamento endotelial sobre a resposta vascular. Foram utilizadas ratas Wistar (180-200g), divididas em quatro grupos (n=6): Sham, Ovariectomizada (OVX), OVX tratadas com 17- β -estradiol (EST; 0,5 μ g/Kg/dia) e OVX tratadas com atorvastatina (ATO; 20mg/kg/dia). Os tratamentos foram realizados por 14 dias, após 21 dias decorridos do processo de ovariectomia. Ao final do tratamento, foram realizadas curvas doses-resposta à acetilcolina (ACh - 10^{-12} a 10^{-3} M) no LVM na presença e ausência de bloqueadores para avaliação da reatividade vascular. A ovariectomia (OVX) reduziu o relaxamento a ACh comparado ao grupo SHAM, contudo o tratamento dos animais ovariectomizados com EST ou ATO foi capaz de normalizar essa resposta. O bloqueio com Aminoguanidina (10^{-4} M) reduziu somente a resposta à ACh no grupo OVX, aumentando a diferença existente entre este grupo e o SHAM, indicando um processo inflamatório nas ratas OVX. Em presença de L-NAME (10^{-4} M) essas respostas foram reduzidas e equalizadas, indicando que as diferenças iniciais eram devido a via do óxido nítrico (NO). A adição de indometacina (INDO; $2,8 \times 10^{-6}$ M) em conjunto ao L-NAME não alterou a resposta já obtida somente com L-NAME, mostrando não haver participação significativa de prostanoídes nessa resposta. Ao mesmo tempo, não houve diferença entre os grupos na resposta vasodilatadora em presença de Clotrimazol (10^{-6} M), que representa a resposta mediada pelo fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). A inibição das espécies reativas ao oxigênio (EROs), avaliada por meio do bloqueio com ácido ascórbico (10^{-4} M), não alterou a resposta de relaxamento observado na curva sem bloqueio, porém, a inibição da NADPH oxidase por apocinina (10^{-5} M) evocou maior redução de resposta à ACh no grupo OVX que nos demais, mostrando aumento do estresse oxidativo nesse grupo, o que

pode se comprovado pela maior produção de EROs e aumentada expressão proteica da NADPH oxidase nesse grupo. O grupo OVX também apresentou menor expressão de eNOS e maior expressão proteica de iNOS, enquanto que os tratamentos foram capazes de normalizar esses valores. O grupo OVX apresenta maior expressão de NF- κ B, importante fator de transcrição envolvido com a resposta inflamatória, enquanto que a ATO foi capaz de reduzir essa expressão. Assim, estes dados evidenciam que a atorvastatina reverte o quadro de disfunção endotelial gerado pela deficiência de estrogênio, por mecanismos relacionados à via do NO e a redução do estresse oxidativo, bem como contribui para melhora do quadro inflamatório observado nestes animais, fornecendo evidências de que o uso de drogas sem efeito estrogênico pode colaborar na prevenção de DCV durante a fase pós-menopausa.

Palavras-Chave: Ovariectomia, atorvastatina, reatividade vascular, óxido nítrico, espécies reativas do oxigênio, NF- κ B.

ABSTRACT

The increase in cardiovascular disease (CVD) has been described in postmenopausal women, however there are questions about the use of hormonal therapies as their effectiveness in relation to cardioprotection. Thus estrogen receptor independent therapies, such as atorvastatin, by submitting pleiotropic effects related to the cardiovascular system (CVS), could benefit women in this stage of life, however there are limited data comparing atorvastatin with estrogen on the CVS. So, we performed this study to evaluate the effects of atorvastatin on mesenteric vascular bed (MVB) reactivity from ovariectomized (OVX) female rats, as well as the participation of endothelial relaxing factors on the vascular response. Experiments were performed on female Wistar rats divided into four groups (n=6): control (SHAM); ovariectomized (OVX), OVX treated with 17 β estradiol (EST, 0.5 μ g/Kg/day) and OVX treated with Atorvastatin (ATO, 20mg/Kg/day). Twenty-one days after ovariectomy, the female rats were given the respectively drugs, and those treatments lasted 14 days. At the end of treatment, the MVB was isolated and were conducted dose-response curves to acetylcholine (ACh - 10^{-12} a 10^{-3} M) in the presence and absence of blockers for assessment of vascular reactivity. The ovariectomized rats (OVX) showed significant decreases in vasodilator response to ACh under noradrenaline-induced constriction. This decreased response was restored in MVBs obtained from ATO or EST-treated ovariectomized rats. In OVX rats, the relaxation to ACh was significantly reduced by Aminoguanidine, increasing the difference between this group and the SHAM group, indicating an inflammatory process in OVX rats. In presence of L-NAME (10^{-4} μ M) these responses were reduced and equalized, indicating that the initial differences were due to nitric oxide (NO) pathway. The addition of indomethacin ($2,8 \times 10^{-6}$ M) together to the L-NAME did not alter the response obtained with L-NAME alone, showing no significant participation of prostanoids in this response. At same time, there was no difference among groups in the vasodilator response in the presence of clotrimazole (10^{-6} M), which represents the response mediated by endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF). Inhibition of reactive oxygen species (ROS), assessed by blocking with ascorbic acid (10^{-4} M) did not alter the relaxation response observed in control curve, however, inhibition of NADPH oxidase by apocynin (10^{-5} M) evoked greater reduction in response to ACh in OVX group than in the others, showing increased

oxidative stress in this group, which can be evidenced by the increased production of ROS and increased protein expression of NADPH oxidase in this group. The OVX group also showed lower eNOS expression and increased protein expression of iNOS, while the treatments were able to normalize these values. Furthermore, the OVX group has higher expression of NF- κ B, an important transcription factor involved in the inflammatory response, while the ATO were able to reduce this expression. Thus, these data indicate that atorvastatin improved the relaxation dysfunction caused by estrogen deficiency, through mechanisms related to NO pathway, and by reduction in oxidative stress, besides contributing to improvement of the inflammation seen in these animals, providing evidence that non-estrogen therapies could be used to improvement the CVS in estrogen deficient state, such as menopause.

Keywords: Ovariectomy, atorvastatin, vascular reactivity, nitric oxide, oxidative stress, NF- κ B.

1 INTRODUÇÃO

Os hormônios sexuais regulam e atuam em diversos eventos relacionados ao desenvolvimento e progressão de doenças cardiovasculares (DCV) (Orshal & Khalil., 2004; Maric-Bilkan & Manigrasso., 2012). O dimorfismo sexual pode explicar parcialmente as diferenças observadas na incidência dessas doenças entre homens e mulheres, que exibem menores fatores de risco cardiovascular, como hipertensão, dislipidemia e diabetes mellitus, que homens de mesma idade (Barton et al., 2011; Wang et al., 2012). Entretanto, este benefício feminino se suprime com o estabelecimento da menopausa, mostrando o efeito cardioprotetor dos hormônios sexuais ovarianos (Knowlton & Lee., 2012). Gompel e colaboradores (2011) sugerem que a Terapia de Reposição Hormonal (TRH) em mulheres pós-menopausa confere uma proteção eficiente contra a progressão da doença arterial por restaurar a deficiência de estrogênio, embora estudos randomizados com TRH clássicas (Women Health Initiated (WHI) e Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study (HERS)) tenham mostrado um aumento de eventos cardiovasculares nessas mulheres (Hulley et al., 1998; Rossouw et al., 2002; Berg et al., 2006), apontando a necessidade de investigar possíveis TRH efetivas e seguras para serem usadas pela mulher nessa fase.

Nossos resultados mais recentes mostram que em ratas normotensas ovariectomizadas a tibolona, o raloxifeno e tamoxifeno normalizaram a reatividade vascular coronariana, do leito mesentérico e da aorta, associado à redução de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-6) e aumento na concentração de peptídeo natriurético atrial plasmático e cardíaco (Lamas et al., 2011, Caliman et al., 2011; Medeiros et al., 2012). Essas drogas apresentam suas ações fisiológicas via, principalmente, receptores de estrogênios (Kushner et al., 2000; Arpino et al., 2008) e apesar dos resultados promissores mostrados em estudos clínicos e experimentais, estas terapias também vêm apresentando problemas, como surgimento de câncer de mama com a tibolona (Beral et al., 2003; Cummings et al., 2008) e doenças tromboembólicas com raloxifeno (Barrett-Connor et al., 2006) e tamoxifeno (Onitilo et al., 2009).

Por este motivo, terapias que atuem por mecanismos independentes dos receptores de estrogênio e que apresentem efeitos positivos sobre as DCV devem ser investigadas como possíveis alternativas de uso para as mulheres na peri ou pós-menopausa. Assim, neste trabalho, escolhemos estudar a atorvastatina, um inibidor da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, que é um agente farmacoterapêutico indicado para o tratamento de hipercolesterolemia (Nachtigal et al., 2008), e que, adicionalmente, tem mostrado ações pleiotrópicas relacionadas a melhora de alterações vasculares, estresse oxidativo e inflamação (Wassmamm et al., 2002; Ye et al., 2008; Viridis et al., 2009).

1.1 DISFUNÇÃO VASCULAR E DEFICIÊNCIA ESTROGÊNICA

A cardioproteção observada na pré-menopausa pode ser justificada pelo estrogênio apresentar efeitos hemodinâmicos, metabólicos e vasculares (Dantas et al., 1999). Os efeitos protetores do estrogênio se relacionam ao fato desse hormônio 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 sanguíneo (Magness & Rosenfeld., 1989; Riedel et al., 1995). Existem dois mecanismos principais para explicar os efeitos vasodilatadores do estrogênio: um efeito direto sobre o músculo liso vascular, atuando sobre canais de cálcio voltagem dependente do tipo L (Ruehlmann et al., 1998) ou ainda estimulando a corrente de saída de potássio (Valverde et al., 1999), e um efeito dependente do endotélio (Farhat et al., 1996; Jun et al., 1998; Mendelsohn, 2000; Golding & Kepler, 2001), como pode ser observado na figura 1.

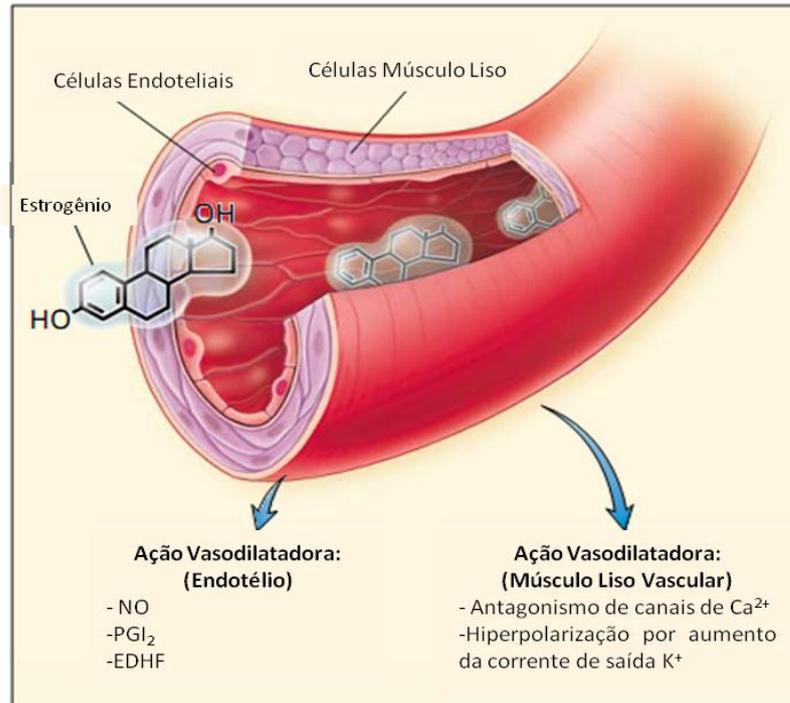


Figura 1: Efeito direto do estrogênio sobre os vasos sanguíneos. A ação vasodilatadora direta do estrogênio sobre o músculo liso vascular poderia ocorrer pelo antagonismo de canais de Ca²⁺ tipo L voltagem-dependente, inibindo assim o influxo transmembrana, levando a redução na concentração intracelular desse íon e conseqüentemente ao relaxamento, ou ainda por meio de hiperpolarização mediada por aumento da corrente de saída de K⁺. A vasodilatação dependente do endotélio ocorre por meio da liberação de fatores de relaxamento endoteliais, tais como óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI₂) e fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (Modificado de Mendelsohn & Karas, 1999).

Sobre o endotélio vascular é bem estabelecido que a disfunção endotelial esteja envolvida na fisiopatologia da DCV, incluindo as que ocorrem na fase pós-menopausa (Cohen et al., 1983). As células endoteliais vasculares participam na homeostase do sistema cardiovascular regulando o tônus vascular basal e a resposta vasomotora a diferentes estímulos, controlando a camada muscular subjacente por liberação de fatores vasorrelaxantes como óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI₂) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). Durante o processo de disfunção endotelial, a síntese e/ou a bioatividade dos vasodilatadores é reduzida, favorecendo o aumento de vasoconstritores derivados do endotélio, como angiotensina II, endotelina-1, ânion superóxido (O⁻) e o tromboxano (TXA₂), processo que pode favorecer ao aumento das DCV (Furchgott & Vanhoutte, 1989; Stankevicius et al., 2003; Leung et al., 2006; Qiao et al., 2008;

Féléto & Vanhoutte, 2009). O estrogênio, atuando por mecanismos genômicos ou não genômicos, pode contribuir para modulação vascular ao estimular mecanismos de relaxamento dependentes do endotélio, enquanto que a deficiência desse hormônio pode conduzir a disfunção endotelial (Orshal & Khalil., 2004; Wang et al., 2012; Cutini et al. 2012)

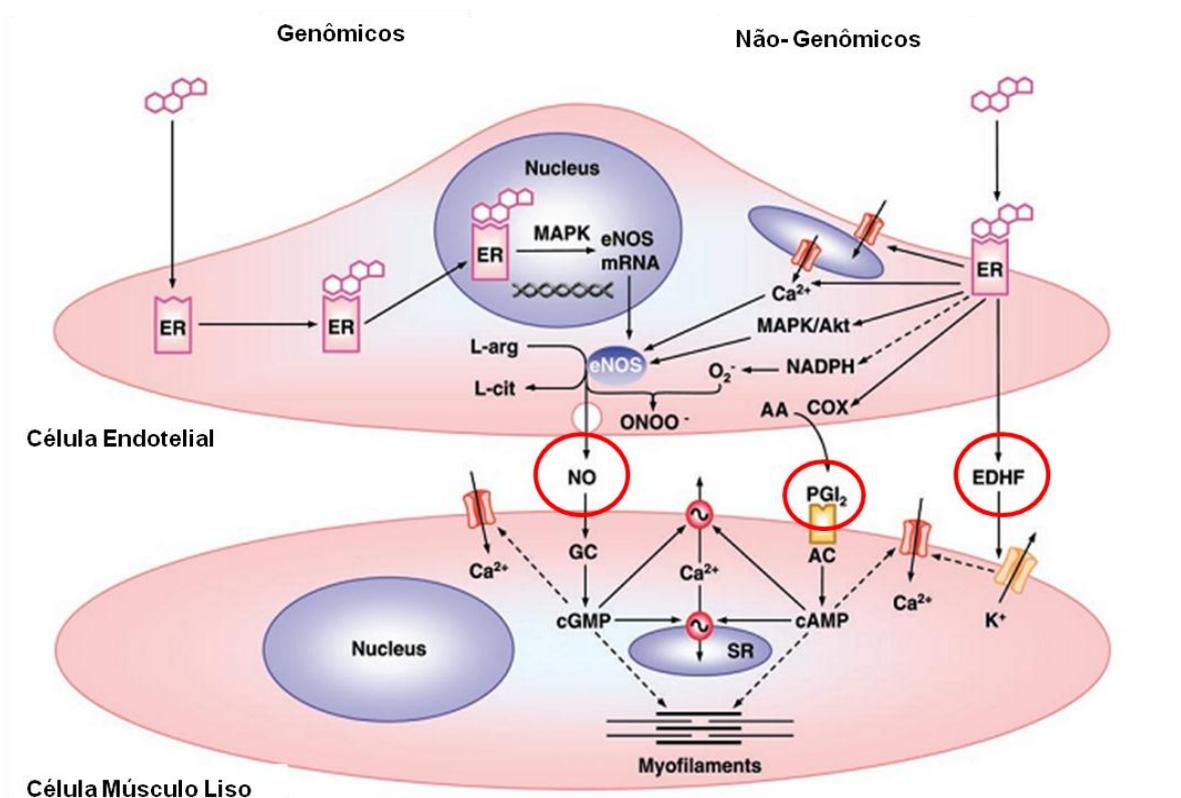


Figura 2: Estrogênio estimulando mecanismos de dilatação dependente do endotélio e da célula do músculo liso vascular. Na via genômica, estrogênio se liga ao seu receptor (ER) citosólico/nuclear, levando a ativação da MAP kinase, aumentando a produção de eNOS. Na via não-genômica, estrogênio se liga a ao seu receptor de membrana, que leva ao aumento da liberação de Ca^{+2} do retículo sarcoplasmático e estimulação da via MAPK/Akt, levando a ativação da eNOS e produção de NO. ER também inibe a produção de EROs pela NADP(H), que previne a inativação do NO e a formação de peroxinitritos ($ONOO^-$). ER ativa a COX, aumentando a produção de PGI_2 e aumenta a produção de EDHF, que ativa os canais de K^+ e causa hiperpolarização da célula muscular. L-arg, L-arginina; L-cit, L-citrulina; AA, ácido araquidônico; GC, guanilato ciclase; AC, adenilato ciclase (Modificado de Orshal e Khalil, 2004).

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). O NO, principal agente vasodilatador dos vasos de condutância, apresenta papel fundamental no controle da homeostase vascular, incluindo a habilidade de modular a ação de vasoconstritores (Arenas et al., 2005). Tal molécula é sintetizada pela óxido nítrico sintase (NOS), sendo descritas três isoformas desta enzima: eNOS (endotelial), nNOS (neuronal) e iNOS (induzida) (Wang & Marsden, 1995). As isoformas eNOS e nNOS são constitutivamente expressas, enquanto a expressão de iNOS é induzida em células vasculares endoteliais e lisas após exposição a estímulos inflamatórios (Nawate et al., 2005).

Outro importante fator de relaxamento é o EDHF, que promove hiperpolarização das células do músculo liso vascular principalmente em vasos de resistência (Woodman et al., 2000). A vasodilatação induzida por este composto ocorre com participação ativa dos canais de potássio presentes nas células do músculo liso vascular. Em geral, as respostas mediadas pelo EDHF envolvem o aumento de Ca^{+2} intracelular, que ao ser liberado, induz vasodilatação por meio da abertura dos canais de K^{+} ativados por Ca^{+2} (Félétou & Vanhoutte, 2009). Além do NO e da PGI_2 , outras substâncias hiperpolarizantes foram identificadas, como as lipogênases, os derivados do citocromo P450 (ácidos epoxieicosatrienóicos (EETs)), peptídeo natriurético tipo C e outros mediadores gasosos (CO, H_2S) (Rattmann, 2009; Félétou & Vanhoutte, 2009).

Além das ações do estrogênio sobre os fatores de relaxamento endotelial, este hormônio parece modular os níveis de espécies reativas do oxigênio (EROs) e contribuir para um menor quadro de estresse oxidativo. Este se relaciona diretamente com um prejuízo em vias de vasodilatação, com redução da biodisponibilidade do NO que reage com o ânion superóxido (O_2^{-}), um dos mais importantes radicais, formando peroxinitrito ($ONOO^{-}$) (Gryglewski et al., 1986), e também com inativação da tetrahydrobiopterina (BH_4), que é um cofator essencial para o funcionamento da NOS e consequente produção de NO (Lucchesi et al., 2005).

Estudos em mulheres têm demonstrado ocorrência de disfunção vascular na pós-menopausa, com prejuízo da vasodilatação mediada por fluxo, na via do NO e na

resposta vascular à Acetilcolina (ACh) (Taddei et al., 1996; Viridis et al., 2000; Moreau et al., 2012). Em modelos experimentais de ovariectomia, que mimetiza os efeitos da menopausa em ratas, também pode ser observado prejuízo de resposta vasodilatadora a ACh, com alterações relacionadas aos fatores de relaxamento endoteliais, como NO, EDHF e PGI₂, bem como aumento do estresse oxidativo e maior expressão da NAD(P)H oxidase, principal enzima produtora de EROs no endotélio (Liu et al., 2001; Nawate et al., 2005; Camporez et al., 2011; Knowlton e Lee, 2012).

Além da disfunção vascular relacionada à redução dos estrógenos, seja por ovariectomia ou pela idade, a deficiência de estrogênio pode levar ao aumento de marcadores inflamatórios como enzimas e citocinas, bem como ativação de fatores de transcrição gênica (Xing et al., 2009; Knowlton & Lee, 2012; Medeiros et al., 2012), que colaboram com o aumento do risco cardiovascular, tanto em mulheres quanto em modelos animais experimentais.

1.2 PROCESSO INFLAMATÓRIO E DISFUNÇÃO VASCULAR

O endotélio vascular saudável é caracterizado por um estreito balanço entre pró e antioxidantes, vasodilatadores e vasoconstritores e, moléculas pró e anti-inflamatórias (Donato et al., 2009). O endotélio disfuncional, deste modo, pode apresentar uma maior produção de moléculas “pró-aterogênicas”, levando a inflamação da parede vascular, que desempenha importante papel na patogênese e progressão de DCVs, como aterosclerose e hipertensão (Savoia & Schiffrin, 2006; Chakrabarti et al., 2008).

A deficiência estrogênica, além de conduzir a um prejuízo na dilatação vascular associado a alterações na produção de fatores de relaxamento endoteliais e aumento do estresse oxidativo (Mendelsohn & Karas, 1999; Camporez et al., 2011; Cau et al., 2012), também pode levar ao surgimento de um processo inflamatório vascular (Chakrabarti et al., 2008). Estudos apontam os mecanismos pelos quais o estrogênio pode apresentar efeitos anti-inflamatórios, como redução da apoptose,

regulação do recrutamento leucocitário e inibição da expressão de genes inflamatórios, como iNOS, COX-2 e matrix metaloprotease 9 (Ghisletti et al., 2005; Straub, 2007). Além desses, estudos indicam que o estrogênio também pode modular a atividade de fatores de transcrição, como o fator de transcrição kappa B (NF-κB), responsável pela regulação gênica de fatores que controlam adesão, proliferação, inflamação, estado redox e enzimas tecido-específicas (Stice & Knowlton, 2008; Donato et al., 2009; Wan & Lenardo, 2010).

O NF-κB é um complexo proteico dimérico, formado por homo ou heterodímeros. As subunidades que o constituem fazem parte de uma família de proteínas estruturalmente relacionadas, globalmente designadas por proteínas Rel/NF-κB (NF-κB1 (p50 e o seu precursor p105), NF-κB2 (p52 e o seu precursor p100), p65/RelA, c-Rel e RelB) (Ghosh & Hayden, 2008; Prajapati et al., 2010), conforme pode ser observado na figura 3. Em células em homeostase, o NF-κB mantém-se em sua forma inativa no citoplasma, associado com as proteínas inibitórias do sítio κB, chamadas inibidores κB (IκB), como IκBα, IκBβ, IκBε, que inibem a ligação do NF-κB ao DNA. A ativação do NF-κB é mediada principalmente pela degradação do IκB, evento cuidadosamente regulado que é iniciado por fosforilações específicas por IKK (IκB kinases) ativados. A degradação proteolítica das IκBs permite a translocação do NF-κB ao núcleo, onde regula a expressão de genes importantes a resposta inflamatória (Stice & Knowlton, 2008; Ghosh & Hayden, 2008; Lawrence, 2009).

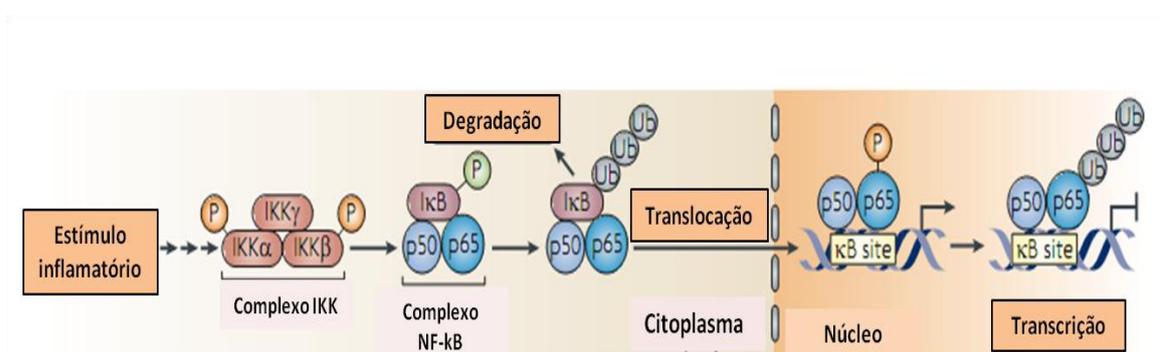


Figura 3: Pontos regulatórios relevantes na via sinalizadora do NF-κB. No simples modelo de ativação do NF-κB, o estímulo inflamatório ativa a via de transdução de sinal que induz a ativação de IKK, resultando em fosforilação da proteína IκB e sua conseqüente degradação. Liberado, o dímero NF-κB se desloca até o núcleo e liga o sítio κB ao promotor de genes-alvo, que leva a sua transcrição. O Fosfato (P) verde significa fosforilação que resulta em negativa regulação da proteína

fosforilada, enquanto que o fosfato laranja indica ativação. Ub: Ubiquitina (Modificado de Ghosh & Hayden, 2008).

O NF- κ B pode ser ativado por uma enorme quantidade de estímulos, tais como bactérias, fungos e vírus, alguns agentes quimioterapêuticos, espécies reativas de oxigênio e algumas citocinas inflamatórias, como TNF- α e IL-6 (Lean et al., 2005; Ghisletti et al., 2005; Wan & Lenardo, 2010). Deste modo, a deficiência de estrogênio, ao conduzir ao aumento de marcadores inflamatórios, como as citocinas citadas (Medeiros et al., 2012), e levar a uma disfunção endotelial poderia promover a ativação do NF- κ B e, conseqüentemente, ao aumento de eventos inflamatórios por ele regulados.

1.3 DISFUNÇÃO VASCULAR E ESTATINAS

Estatinas são amplamente descritas no tratamento de hipercolesterolemia. Estas drogas reduzem a síntese de colesterol por inibirem a enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA (HMG-CoA) redutase, bloqueando sua conversão a mevalonato (Viridis et al., 2009; Shuto et al., 2011; Russoni et al., 2011). A redução da morbidade e mortalidade em pacientes hipercolesterolêmicos utilizando estatinas se relaciona a redução dos níveis de colesterol destes indivíduos (Wassmann et al., 2001a), contudo parece que os efeitos benéficos destas drogas sobre o sistema cardiovascular não se limitam a sua ação sobre os lipídeos. Os efeitos pleiotrópicos das estatinas, independentes dos níveis de colesterol, envolvem redução da pressão sanguínea, melhora da função endotelial, estabilização das placas ateroscleróticas, atenuação do remodelamento vascular e miocárdico e redução do estresse oxidativo e inflamação (Briones et al., 2009; Sun et al., 2009; Suh et al., 2010; Shuto et al., 2011).

Nas células vasculares, os efeitos das estatinas podem ter importantes implicações no reestabelecimento da função endotelial. Estatinas podem inibir a síntese de

prostanóides derivados da COX-2 e inibir sistemas de sinalização intracelular, como os ativados pela Angiotensina II (Rho/RhoA quinases e MAPK), envolvidos na regulação de fatores fibróticos. Da mesma forma, os efeitos positivos das estatinas sobre a disfunção vascular envolvem atenuação da geração de ânions superóxido pela NAD(P)H oxidase e aumento da expressão da eNOS com produção do NO (Viridis et al., 2009; Briones et al., 2009; Suh et al., 2010). Adicionalmente, as estatinas também têm mostrado efeitos modulatórios sobre a inflamação e resposta imune, sendo capazes de reduzir citocinas inflamatórias, como TNF- α e aumentar as anti-inflamatórias, como IL-10, bem como atuar sobre o NF- κ B, inibindo sua atividade (Jasińska et al., 2007; Sun et al., 2009; Mondosi et al., 2010).

Diante do exposto, hipotetizamos que o tratamento crônico com atorvastatina pode melhorar a disfunção vascular relacionada à deficiência estrogênica, influenciando os fatores de relaxamento derivados do endotélio, o estresse oxidativo, bem como o processo inflamatório.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a resposta de relaxamento endotelial do leito mesentérico e a expressão de proteínas envolvidas na modulação da reatividade vascular em ratas ovariectomizadas e tratadas com 17β -estradiol ou atorvastatina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a reatividade vascular e a sensibilidade à acetilcolina em ratas ovariectomizadas e/ou tratadas com 17β -estradiol ou atorvastatina;
- Estudar a participação da via do óxido nítrico, do fator hiperpolarizante derivado do endotélio, dos prostanóides derivados da ciclooxigenase e das espécies reativas ao oxigênio na resposta de vasorrelaxamento a acetilcolina;
- Verificar a expressão proteica das isoformas endotelial e induzível da óxido nítrico sintase, ciclooxigenase 2 e NADP(H) oxidase nos grupos experimentais;
- Analisar o efeito do tratamento com 17β -estradiol e a atorvastatina na produção de ânions superóxido em artérias mesentéricas das fêmeas ovariectomizadas;
- Investigar a alteração na expressão do fator de transcrição nuclear Kappa B em fêmeas com deficiência estrogênica e/ou tratadas com 17β -estradiol ou atorvastatina;
- Comparar os efeitos deficiência de estrogênio e dos tratamentos sobre parâmetros ponderais e perfil lipídico.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizadas ratas Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), fêmeas com peso corporal variando entre 180-200 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 para o uso de animais de experimentação da UFES, nº 069/2011.

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 para biotérios de pesquisa. As gaiolas individuais permitiram 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 A foram realizados os protocolos referentes à reatividade vascular e coletados o soro, coração e útero. No bloco B, os animais tiveram os tecidos coletados para realização da expressão proteica por *western blot* e verificação da produção de espécies reativas do oxigênio na artéria mesentérica.

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

- Fêmea SHAM (n=06, SHAM);

- Fêmea ovariectomizada (n=06, OVX);
- Fêmea ovariectomizada tratada com 17β -estradiol 0,5 μ g/kg/dia (n=06, EST);
- Fêmea ovariectomizada tratada com atorvastatina 20mg/Kg/dia (n=06, ATO).

3.3 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Os experimentos foram realizados seguindo-se o seguinte cronograma (figura 4):

- 1º dia: Verificação do peso corporal seguido de ovariectomia, a exceção das fêmeas do grupo SHAM, que sofreram cirurgia fictícia.
- 21º dia: Verificação do peso corporal e início dos tratamentos.
- 35º dia: Verificação do peso corporal, cateterização da artéria mesentérica superior para realização da reatividade, coleta de sangue, retirada e pesagem dos úteros e coração; armazenamento da artéria e ramos mesentéricos.

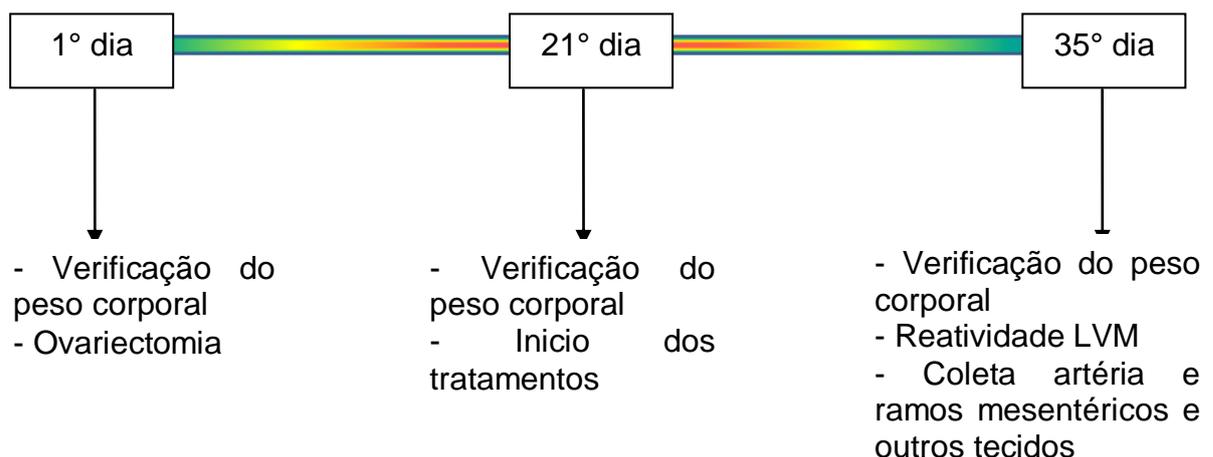


Figura 4: Organograma do Protocolo Experimental.

3.4 OVARIECTOMIA

Após anestesia intraperitoneal com mistura de ketamina ($30\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) e xilazina ($3\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), 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 (figura 5). 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.



Figura 5: Fotografia da técnica de ovariectomia.

3.5 TRATAMENTOS

Os tratamentos foram iniciados 21 dias após a ovariectomia e tiveram a duração de 14 dias. Tal protocolo foi pré-estabelecido por nosso grupo (Medeiros et al., 2012; Lamas et al., 2011), de forma que as fêmeas ovariectomizadas apresentassem alterações de reatividade vascular e fatores humorais, como citocinas pró-

inflamatórias. Neste modelo de deficiência estrogênica, os tratamentos com estradiol ou drogas que têm ação sobre receptores de estrogênio, como raloxifeno e tamoxifeno, são capazes de reverter parcialmente ou totalmente às alterações observadas.

Os grupos EST foram tratados com 17β -estradiol (Sigma, St. Louis, USA) dissolvido em óleo de amêndoas, numa dose diária de $0,5\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal por via parenteral direta (subcutânea), transfixando-se a massa muscular da coxa traseira da rata, alternando as patas.

Os grupos ATO receberam a droga por administração via oral (gavagem), na forma de suspensão aquosa, numa dose diária de $20\text{ mg}/\text{kg}$ de peso corporal (Feng et al., 2011).

Os grupos SHAM e OVX receberam por 14 dias os veículos dos tratamentos por via oral (gavagem).

3.6 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOLÓGICOS

3.6.1 Evolução ponderal e razão de peso do útero e coração pelo comprimento da tíbia

As fêmeas foram pesadas no início do protocolo experimental e separadas aleatoriamente entre os grupos SHAM, OVX, EST ou ATO. Ao final dos tratamentos com as drogas ou veículo, o peso corporal das fêmeas foi medido novamente, obtendo o peso corporal final.

No último dia do protocolo experimental o útero e coração destes animais foram isolados, lavados com solução fisiológica e o excesso de líquido foi removido com papel de filtro. A diminuição ou o aumento de massa dos órgãos foi estimado dividindo o peso do órgão (mg) pelo comprimento da tíbia (cm) (Lee et al.; 2008; Liou et al., 2010).

3.6.2 Perfil lipídico

Para determinação do perfil lipídico, os animais foram anestesiados com uma mistura de ketamina ($30\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) e xilazina ($3\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), por via parenteral, e em seguida submetidos a exposição da artéria aorta descendente. Amostras de 3,0 mL de sangue foram coletadas e em seguida centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos. O soro foi separado, estocado -20°C em alíquotas, para dosagem de triglicerídeos séricos, colesterol total e frações (HDL, VLDL e LDL). As dosagens foram realizadas em aparelho automatizado (Cobas 6000 Analyzer, Roche Diagnostics, SA), segundo as instruções de cada kit comercial (Roche Diagnostics, SA). Os resultados foram expressos em mg/dL.

3.7 DETERMINAÇÃO DA FASE DO CICLO ESTRAL

Esfregaços vaginais foram realizados em cada uma das fêmeas do grupo SHAM, pelo menos sete dias consecutivos antes do final do protocolo experimental, a fim de se confirmar que o ciclo estral do animal estava ocorrendo normalmente ((I) estro, (II) metraestro, (III) diestro e (IV) proestro). As secreções vaginais eram coletadas usando uma pipeta de plástico preenchida com salina (NaCl 0,9%), a qual era inserida no interior da vagina do animal. O esfregaço era colocado sobre uma lâmina e as células examinadas ao microscópio (Becker et al., 2005; Gomes et al., 2012). Os experimentos foram realizados nas fêmeas no momento em que seu ciclo estral estava em proestro, devido ser essa fase a de maior nível estrogênico.

3.8 REATIVIDADE VASCULAR DO LEITO MESENTÉRICO

Foi utilizado o leito vascular mesentérico (LVM) isolado, segundo a descrição de Mc Gregor (1965). Após o animal ser anestesiado para coleta de sangue, a artéria mesentérica superior foi isolada (figura 6) através de uma incisão abdominal com, aproximadamente, 6 cm transversalmente e, nesse vaso introduzida uma cânula de polietileno (PE50). Imediatamente, o leito foi perfundido com solução nutritiva (NaCl 130 mM; KCl 4,7 mM; $\text{MgSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ 1,17 mM; $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,6 mM; KH_2PO_4 1,18 mM;

NaHCO₃ 14,9 mM; EDTA 0,026 mM; Glicose 11,1 mM), mantida em banho-maria a 37°C e aerada constantemente por meio de borbulhamento da mistura carbogênica de 95% de O₂ e 5% de CO₂, sendo o pH mantido a 7,4. Por meio de uma bomba peristáltica (Ismatec AS Laboratorium Technik, Switzerland), foi mantido um fluxo pulsátil de 4,0 mL/min e uma pressão de perfusão média variando de 35 ± 5 mmHg. O leito como um todo foi cuidadosamente removido, liberado em sua borda dos intestinos, desprovido dos tecidos linfáticos aderentes e colocado num banho de órgão isolado. A pressão de perfusão foi medida através de um transdutor de pressão (Spectramed P23XL) e os dados foram registrados via software (AcqKnowledge for Windows; Biopac Inc.). Após um período de estabilização (20 a 30 minutos) foi induzido aumento da pressão de perfusão do LVM, por vasoconstrição com uso de solução nutritora adicionada de quantidade variável de noradrenalina (0,1 a 0,3 mM) que fosse suficiente para elevação de 80-110 mmHg no tônus vascular.

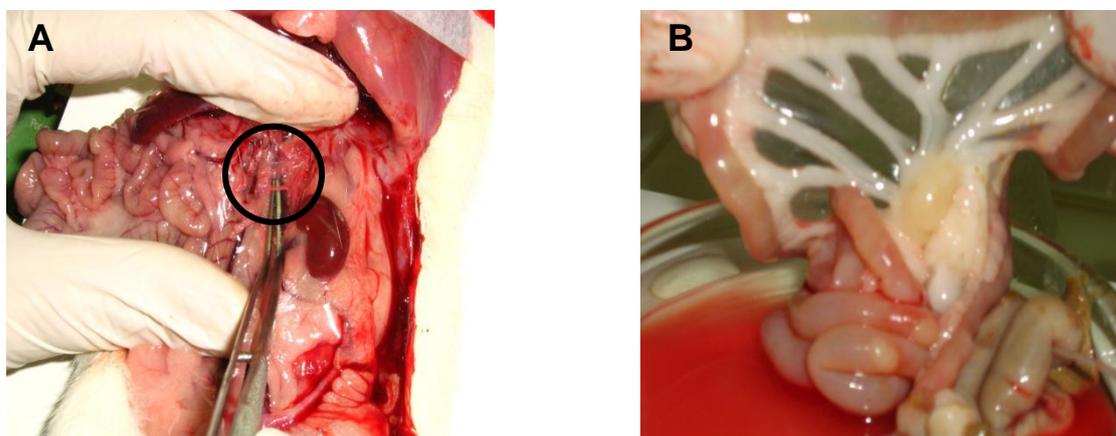


Figura 6: Em (A) fotografia da artéria mesentérica superior. Em (B) fotografia do leito mesentérico, após canulação da artéria mesentérica, sendo perfundido pela solução nutritora.

3.8.1 Protocolos de estudo da reatividade vascular

3.8.1.1 Reatividade vascular a Acetilcolina (ACh) sem inibidores farmacológicos

Após estabilização do registro e obtenção do platô de contração, foi realizada uma curva dose-resposta a ACh, um agonista vasodilatador dependente do endotélio. Foram administradas doses *in bolus* ($1,68 \times 10^{-3}$ a $1,68 \times 10^{-12}$ M) de forma crescente no LVM (figura 7). Essas curvas foram realizadas em ausência de inibidores farmacológicos (curva controle), e posteriormente em presença destes.

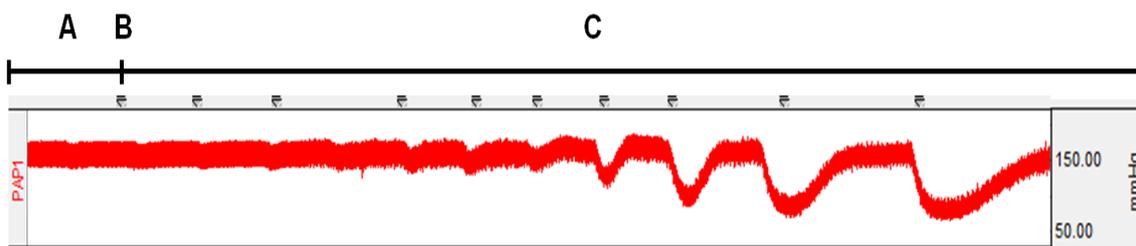


Figura 7. Registro típico representativo da construção da curva dose-resposta a ACh. (A) período de estabilização inicial (30 minutos); (B) Início da administração *in bolus* de ACh; (C) Construção da curva dose-resposta frente a doses crescentes de ACh *in bolus* no LVM. O eixo vertical indica a pressão de perfusão (mmHg).

3.8.1.2 Reatividade vascular a Acetilcolina (ACh) na presença de inibidores farmacológicos

Para se avaliar a participação do endotélio sobre a resposta vascular na presença de inibidores, estes eram adicionados à solução nutritora após a realização da curva controle. O LVM era perfundido por um período de 30 minutos; em seguida, eram repetidas doses crescentes de ACh *in bolus* para realização da curva dose-resposta.

3.8.1.3 Avaliação da participação do óxido nítrico (NO) no relaxamento dependente do endotélio

Para avaliar a participação do NO na resposta vascular no LVM, curvas doses-resposta a ACh foram construídas após a incubação com Aminoguanidina (AG, 10^{-4} M) (Nawate et al., 2005), um inibidor da iNOS e após a incubação com N^G-nitro-L-

arginine methyl ester (L-NAME, 10^{-4} M), um inibidor não seletivo da NOS (Nawate et al., 2005; Viridis et al., 2009).

3.8.1.4 Avaliação da participação dos prostanóides derivados da Ciclooxygenase (COX) e do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) no relaxamento dependente do endotélio

A participação do EDHF na modulação da função endotelial foi avaliada por meio da construção da curva dose-resposta a ACh na presença do bloqueio simultâneo com L-NAME (10^{-4} M) e Indometacina (INDO, $2,8 \times 10^{-6}$ M), um inibidor não seletivo da COX. A curva dose-resposta a ACh também foi realizada na presença de Clotrimazol (CLO, 10^{-6} M), um inibidor inespecífico da citocromo P450, cujos metabólitos apresentam um importante papel como fonte de EDHF, em especial dos ácidos epoxieicosatrienóicos (EETs) (Félétou e Vanhoutte, 2009).

3.8.1.5 Influência da produção de espécies reativas ao oxigênio (EROs) no relaxamento dependente do endotélio

Para avaliar a influência de EROs no relaxamento endotelial, doses crescentes de ACh *in bolus* foram adicionadas na presença de ácido ascórbico (AC ASC, 10^{-4} M) (Viridis et al., 2009). O papel de EROs formado pela NADPH oxidase na resposta vascular a ACh foi avaliado por meio da incubação do LVM com apocinina (APO, 10^{-5} M), um inibidor desta enzima (Viridis et al., 2009).

3.8.2 Análise dos resultados de reatividade vascular

As respostas de relaxamento evocadas pela ACh foram expressas como porcentagem de relaxamento à pré-contracção obtida pela noradrenalina. As curvas doses-resposta tiveram calculados e expressos valores de resposta máxima ($R_{\text{máx}}$) e de pD_2 ($-\text{Log EC}_{50}$), que representa o valor da concentração que produz 50% da $R_{\text{máx}}$. Para tal, foram usadas análises de regressão não-linear obtidas a partir das

curvas doses-resposta utilizando o programa GraphPad Prism Software (San Diego, CA, USA). Com a finalidade de comparar a magnitude de efeito dos inibidores sobre a resposta de relaxamento a ACh nos grupos estudados, alguns resultados foram expressos como diferenças das áreas abaixo das curvas (dAUC). A dAUC foi calculada para cada curva dose-resposta e a diferença está expressa como porcentagem da diferença da AUC (% dAUC) da curva controle correspondente.

3.9 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS PROTEICOS POR WESTERN BLOT

A técnica utilizada para detecção da expressão da eNOS, iNOS, COX-2, NADPH oxidase (gp91phox) e NF- κ B (subunidade p65) foi a de western blot, sendo utilizado o sistema descrito por Laemmli (1970).

3.9.1 Extração das proteínas

A árvore arterial mesentérica foi dissecada, separada de seus tecidos conectivos, de forma que os ramos de primeira, segunda, terceira e quarta ordem fossem representativos entre as amostras armazenadas. Estas foram mantidas a -80° C até o momento da homogeneização, que foi realizada em 200 μ L de tampão de lise (10mM Tris – HCl pH 7,4, 1mM NaVO₃, 1% SDS, 0,5mM DTT, 5 mM EDTA, 1mM PMSF), ao qual se adicionou coquetel inibidor de proteases. A homogeneização foi realizada com auxílio de sonicador ultra-sônico, sendo seguida de centrifugação a 6000 rpm, 4°C por 15 minutos. Os sobrenadantes foram recolhidos e armazenados em alíquotas a -80° C. Este extrato total foi utilizado para realização da expressão de eNOS, iNOS, COX-2 e NADPH oxidase (gp91phox).

Para a dosagem do NF- κ B (subunidade p65) foram preparados extratos citoplasmáticos e nucleares a partir das amostras armazenadas. Inicialmente as amostras foram trituradas cuidadosamente em 150 μ L de tampão A (10 mM HEPES (pH 7.9), 1.5 mM MgCl, 10 mM KCl, 1.0 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 0,1% triton-X, 10 μ g/mL coquetel inibidor de protease). Após 10 minutos de incubação no gelo, as amostras foram centrifugadas a 4°C por 10 minutos a 4500 rpm. Os sobrenadantes

foram recolhidos e representaram o extrato proteico citoplasmático, sendo armazenados a -80 °C. Os pellets foram lavados em 400 µL de tampão A sem a presença de triton-X e centrifugados novamente (4°C por 10 minutos a 4500 rpm). O sobrenadante foi descartado e os pellets resuspendidos em 60 µL do tampão B (20 mM HEPES (pH 7.9), 25% glicerol, 1.5 mM MgCl₂, 420 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, 1.0 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 10µg/mL coquetel inibidor de protease). Com auxílio de um homogenizador manual, os pellets foram macerados 20 vezes e incubados 30 minutos no gelo. A suspensão foi centrifugada por 15 minutos a 16000g a 4°C, sendo os sobrenadantes contendo os extratos nucleares armazenados a -80°C até o momento do uso (Chen et al., 2004; Davel et al., 2008).

3.9.2 Dosagem das proteínas

A determinação do conteúdo de proteína total, extratos citoplasmático e nuclear nos ramos mesentéricos foi feita utilizando-se o método de Lowry (Lowry, 1951). Preparou-se o reagente A (48:1:1 – carbonato de sódio 3% com 0,1 M de NaOH, tartarato de sódio/potássio 4% e sulfato de cobre 2%, respectivamente) e o reagente B (reagente de Folin-fenol Ciocalteu – 1:3 em água). A solução padrão foi obtida a partir de diluições de albumina bovina (BSA) em água destilada com concentração estoque final de 1mg/mL. Essa solução foi diluída para a obtenção da curva padrão, em que as diluições continham de 5 a 80 µg de proteína. Alíquotas dos sobrenadantes dos homogenatos dos tecidos (5 µL) foram utilizadas como amostras. Todos os tubos de ensaio foram completados para um volume final de 250 µL, sendo posteriormente adicionados 2,5 mL da solução A. Após 10 minutos, se adicionou 0,25 mL da solução B. A absorbância foi medida a 660 nm depois de 10 minutos. Todas as amostras foram feitas em duplicata.

3.9.3 Eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE)

De forma a se alcançar a otimização das condições do western blot, experimentos preliminares foram realizados a fim de se definir as melhores condições de separação, qualidade da banda e diluições do anticorpo. Dessa forma, diferentes

quantidades de extratos proteicos foram utilizadas dependendo da proteína a ser detectada.

Os extratos proteicos (40 µg para eNOS e iNOS; 60 µg para NF-κB (p65), gp91phox e COX-2) foram submetidas a uma eletroforese em gel (acrilamida/bisacrilamida 29:1), sendo o gel de separação a 7,5% ou 10% (para COX-2) preparado em tampão contendo 1,5 M tris-HCl pH 8,8 e 0,1% de SDS e o gel de entrada a 4% em tampão 0,5 M tris-HCl pH 6,8 e 0,1% de SDS. As amostras foram aplicadas nos géis na presença de tampão de amostra (Tris-HCl, SDS, glicerol, DTT e azul de bromofenol). Antes da sua aplicação no gel as amostras foram aquecidas a 100 °C durante 5 min. A eletroforese decorreu com o tampão de eletroforese (25 mM de tris-HCl pH 8,3, 192 mM de glicina e 0,1% de SDS), sendo esta realizada a 80 volts.

3.9.4 Transferência das proteínas

Depois de separadas, as proteínas para eNOS, iNOS e COX-2 foram transferidas para uma membrana de PVDF utilizando um aparelho de transferência (Biorad, Trans-Blot SD). A transferência foi efetuada na presença do tampão de transferência constituído por 25 mM de tris-HCl pH 8,3, 192 mM de glicina e 20% (v/v) de metanol, por 55 minutos a 10 volts. A transferência das proteínas para NFκB (p65) e gp91phox até as membranas de PVDF foi realizada em cuba molhada (Biorad), por 2:00 hs, 60 volts a 4°C, utilizando o mesmo tampão de transferência.

3.9.5 Incubação dos anticorpos

Após a transferência das bandas de proteínas, as membranas de PVDF, foram incubadas por 2:30 horas em uma solução constituída de leite em pó desnatado (5%) em tampão TBS- tween 0,1% (20 mM de tris-HCl pH 7,4 e 150 mM de NaCl), à temperatura ambiente sob agitação leve. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpos específicos para eNOS (1:2500, BD Transduction Laboratories, Lexington, UK), iNOS (1:2000, BD Transduction Laboratories, Lexington, UK), COX-2 (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) NF-κB (p65) (1:200,

Santa Cruz Biotechnology, Inc.), gp91phox (1:2000, BD Biosciences) e para β -actina (1:1500, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) por 4 horas a temperatura ambiente. Após este período, as membranas foram lavadas em tampão TBS-tween 0,1%, sob agitação leve em temperatura ambiente e incubadas com o anticorpo secundário (IgG, anti-mouse conjugado para fosfatase alcalina - 1:3000, Abcam Inc. e IgG, anti-Rabbit conjugado para fosfatase alcalina – 1:7000, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) por 1:30 hora, à temperatura ambiente, sob agitação suave, seguida de lavagem com tampão TBS-tween 0,1%, e posteriormente com tampão TBS.

A detecção da ligação proteína-anticorpo foi realizada utilizando-se o Kit comercial NBT/BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate nitroblue tetrazolium (NBT)/5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP) – Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. As membranas tiveram suas imagens digitalizadas e tratadas utilizando o programa ImageJ (*domínio público*). Em cada ensaio experimental fez-se a normalização em relação ao controle (β -actina), com vista a diminuir os possíveis erros associados às variações nas concentrações das proteínas. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias.

3.10 ESTUDO DA GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM ARTÉRIAS MESENTÉRICAS – DIHIDROETÍDEO

A geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi determinada utilizando-se um método que envolve o dihidroetídeo (DHE), um precursor não fluorescente do brometo de etídeo, e que permite analisar a produção “*in situ*” de radicais livres. Na presença de EROs o hidretídeo é oxidado dentro da célula, produzindo os compostos fluorescentes etídeo (E) e 2-hidroxi etídeo (EHO) que tem afinidade pelo DNA nuclear. A formação do etídeo se deve principalmente a oxidação da DHE pelo ânion superóxido, enquanto o EHO é formado pela oxidação da DHE por outras EROs como o peróxido de hidrogênio.

Os ratos foram anestesiados, a artéria mesentérica superior foi rapidamente dissecada e imersa em solução de Krebs (8 mM HEPES, 2mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 130mM NaCl, 5mM KCl, 2,45mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 11,1mM glicose, pH 7,4) por um período de

2:00 hs. Após, estas foram congeladas em ojetato (Tissue-Tek OCT Compound, Sakura) e mantidas a -80°C até o momento da análise. Utilizando-se um criostato (CM 1850, Leica Microsystems, Alemanha), cortes transversais das artérias ($8\ \mu\text{m}$) foram obtidos e colocados em lâminas gelatinizadas e secos em estufa a 37°C por 20 minutos. Após, as lâminas contendo os cortes foram lavadas e incubadas com Krebs por 30 minutos a 37°C . Decorrido o tempo, as lâminas tiveram o excesso de líquido removido e, em seguida, foi realizada a incubação DHE $2\ \mu\text{M}$ (30 minutos, 37°C) em câmara úmida e protegidos da luz (Camporez et al., 2011). A fluorescência emitida foi visualizada em microscópio de fluorescência invertido (DM 2500, Leica Microsystems, Alemanha) equipado com câmera fotográfica, utilizando uma objetiva de fluorescência com aumento de 400X. O etídeo unido ao núcleo das células foi visualizado com λ_{exc} : 515-560 nm e detectado com λ_{em} : 590 nm. As imagens foram quantificadas pelo programa Image Pro Plus, sendo o resultado expresso como intensidade de fluorescência (unidades arbitrárias), normalizado pela intensidade do background.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). As curvas dose-resposta foram analisadas por ANOVA duas vias seguido do teste *post-hoc* de Bonferroni, e para as demais comparações foi utilizado ANOVA de uma via seguido do teste *post-hoc* de Tukey, ambos analisados via software (Graphpad Prism, San Diego, CA, USA). Para comparação dos valores de expressão proteica foi utilizado ANOVA uma via seguido pelo teste *post-hoc* de Fisher. O nível de significância estabelecido foi $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 EVOLUÇÃO PONDERAL E RAZÃO DE PESO DO ÚTERO E CORAÇÃO PELO COMPRIMENTO DA TÍBIA

O peso corporal dos animais experimentais foi medido ao final dos 35 dias de protocolo. Na tabela 1 e figura 8 encontram-se os resultados obtidos nos grupos SHAM, ovariectomizado (OVX), ovariectomizado tratado com 17β -estradiol (EST) e ovariectomizado tratado com atorvastatina (ATO) com relação aos pesos corporais inicial e final e porcentagem de ganho de peso. No início do experimento não houve diferença significativa nos pesos corporais entre os grupos. Contudo, ao final do tratamento pode-se observar que os grupos OVX, que recebeu apenas veículo, e ATO tiveram aumento significativo de peso quando comparado ao grupo SHAM. Os animais do grupo EST não apresentaram diferença em relação ao peso corporal ao serem comparados ao grupo SHAM. Similarmente, a porcentagem de ganho de peso foi superior nos grupos OVX e ATO em relação aos demais grupos.

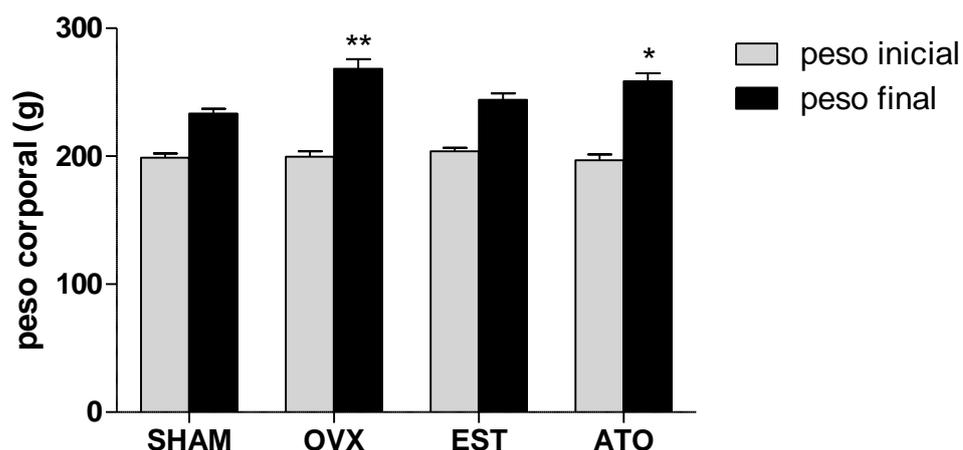


Figura 8: Valores do peso corporal inicial e peso corporal final em gramas (g) dos grupos Wistar SHAM, Ovariectomizada (OVX), Ovariectomizada tratada com 17β -estradiol (EST) e Ovariectomizada tratada com Atorvastatina (ATO). * $p < 0.05$ e ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo SHAM.

Com o objetivo de avaliar os efeitos do tratamento com atorvastatina e 17 β -estradiol sobre o útero e o coração, ao final do protocolo experimental, as vísceras foram retiradas e pesadas. Pelos resultados apresentados na tabela 1, a eficácia da ovariectomia pode ser comprovada pela redução significativa dos valores da razão do peso do útero pelo comprimento da tíbia (mg/cm) nas fêmeas OVX quando comparadas ao grupo SHAM. Os valores observados no grupo ATO se mantiveram reduzidos, visto tal droga não apresentar efeito estrogênico. O tratamento com 17 β -estradiol (EST) reverteu a hipotrofia observada nas ratas que sofreram ovariectomia, retornando a valores semelhantes ao grupo SHAM.

Em relação a razão do peso do coração pelo comprimento da tíbia (mg/cm) 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 (tabela 1).

Tabela 1: Parâmetros ponderais de peso corporal (inicial e final) e peso de órgãos (coração e útero) em gramas (g) e razão destes com o comprimento de tíbia em centímetros (cm) nos grupos Fêmea SHAM, Fêmea Ovariectomizada (OVX), Fêmeas Ovariectomizadas tratadas com 17 β -estradiol (EST) e Atorvastatina (ATO).

	Grupos (n=12)			
	SHAM	OVX	EST	ATO
Peso Inicial (g)	198,8 \pm 3,3	199,6 \pm 4,2	203,9 \pm 2,5	196,9 \pm 4,4
Peso final (g)	233,4 \pm 3,7	268,4 \pm 7,3**	244,0 \pm 5,0	258,6 \pm 6,2*
Ganho de peso (%)	14,8 \pm 1,0	28,6 \pm 1,8**	16,2 \pm 1,5	23,6 \pm 2,1*
Peso Coração (g)	0,651 \pm 0,03	0,738 \pm 0,03	0,706 \pm 0,02	0,765 \pm 0,03
Peso útero (g)	0,510 \pm 0,03	0,095 \pm 0,01**	0,444 \pm 0,02	0,100 \pm 0,01**
Razão coração/tíbia (mg/cm)	175,2 \pm 10,5	190,7 \pm 8,1	182,2 \pm 6,0	196,9 \pm 6,3
Razão útero/tíbia (mg/cm)	141,5 \pm 17,9	24,6 \pm 0,79**	114,1 \pm 4,86	26,5 \pm 1,59**

Dados expressos com média \pm EPM. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo SHAM.

4.2 PERFIL LIPÍDICO

A tabela 2 apresenta os resultados das concentrações séricas de colesterol total, HDL, LDL, VLDL e triglicerídeos obtidos em todos os grupos experimentais. O procedimento de ovariectomia, bem como os tratamentos propostos nesse estudo, não foi capaz de alterar os níveis de colesterol total, LDL, VLDL e triglicerídeos. Entretanto, os valores de HDL foram significativamente aumentados nas fêmeas ovariectomizadas (OVX) e nas que receberam atorvastatina (ATO), enquanto o tratamento com 17 β -estradiol (EST) restaurou este parâmetro aos níveis observados nos animais SHAM.

Tabela 2: Perfil lipídico, em mg/dL, nos grupos Fêmea SHAM, Fêmea Ovariectomizada (OVX), Fêmeas Ovariectomizadas Tratadas com 17 β -estradiol (EST) e Atorvastatina (ATO).

	Grupos (n=6)			
	SHAM	OVX	EST	ATO
Triglicerídeos	77,35 \pm 15,26	80,63 \pm 12,67	79,95 \pm 6,29	73,06 \pm 16,19
Colesterol Total	73,4 \pm 3,60	75,66 \pm 5,91	81,31 \pm 3,39	76,88 \pm 6,51
HDL	25,75 \pm 3,73	41,55 \pm 3,69*	36,88 \pm 4,58	41,85 \pm 3,58*
LDL	14,20 \pm 3,46	14,94 \pm 1,59	20,67 \pm 2,91	18,61 \pm 2,87
VLDL	15,43 \pm 3,05	15,28 \pm 3,07	15,96 \pm 1,25	15,66 \pm 2,97

Dados apresentados como média \pm EPM. *p<0,05 quando comparado ao grupo SHAM.

4.3 REATIVIDADE VASCULAR DO LEITO MESENTÉRICO

Para avaliar a reatividade vascular, frente ao protocolo experimental proposto no estudo, foram utilizados leitos mesentéricos isolados dos grupos SHAM, OVX, EST e ATO. Para avaliação da resposta vasodilatadora foi utilizada a acetilcolina (ACh) na presença do endotélio.

4.3.1 Avaliação da resposta relaxante dependente do endotélio

A resposta mediada pela Acetilcolina (ACh) (Figura 9 e tabela 3) produziu um relaxamento no LVM dependente da concentração da droga em todos os grupos estudados. Nas fêmeas ovariectomizadas (OVX) o relaxamento dependente do endotélio foi reduzido comparado ao grupo SHAM, enquanto que os tratamentos com 17β -estradiol (EST) ou com atorvastatina (ATO) foram capazes de restaurar essa resposta. Os valores de $E_{m\acute{a}x}$ e pD_2 são mostrados na tabela 3. Esses dados mostram a influência da deficiência de estrogênio em reduzir a resposta máxima ($E_{m\acute{a}x}$) da acetilcolina no vaso estudado, sem, entretanto, alterar a sua sensibilidade (pD_2).

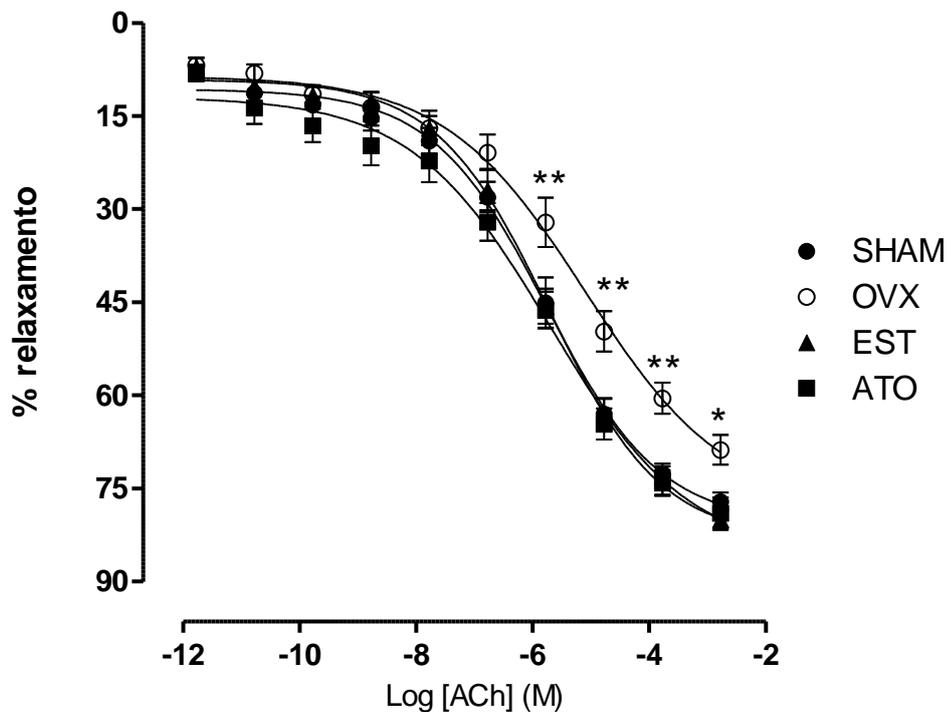


Figura 9: Curva dose-resposta a ACh induzindo vasorrelaxamento no leito mesentérico nos grupos (●) SHAM, (○) OVX, (▲) EST e (■) ATO na ausência de inibidores. Dados foram expressos como média ± EPM, n=6 por grupo. *p<0,05 e ** p<0,01 quando comparado ao grupo SHAM.

Tabela 3: Valor da Resposta Máxima (R_{máx}) e do log da concentração da droga para produzir 50% da resposta máxima (pD₂) no leito mesentérico obtidos por meio das curvas de dose-resposta de Acetilcolina (ACh) *in bolus* nos grupos Wistar SHAM, Ovariectomizada (OVX), Ovariectomizadas Tratadas com 17β-estradiol (EST) e Atorvastatina (ATO) na ausência de inibidores.

	R _{máx}	pD ₂
SHAM	79,9 ± 3,1	6,01 ± 0,3
OVX	65,7 ± 3,4* [#]	5,46 ± 0,2
EST	82,2 ± 2,8	5,59 ± 0,2
ATO	87,6 ± 0,3	5,83 ± 0,3

Dados expressos como média ± EPM. *p<0,05 quando comparado ao grupo SHAM e [#]p<0,05 quando comparado aos grupos EST e ATO.

4.3.2 Avaliação da participação do óxido nítrico (NO) no relaxamento dependente do endotélio

A modulação do óxido nítrico no relaxamento induzido pela ACh foi avaliada por meio da incubação do LVM com Aminoguanidina (AG) e L-NAME. Nos animais OVX o relaxamento foi significativamente atenuado pela AG, enquanto que a resposta observada na curva controle foi preservada no grupo SHAM, sugerindo que a deficiência nos níveis de estrogênio podem levar a um processo inflamatório mediado pela iNOS. Os tratamentos com 17β-estradiol (EST) ou atorvastatina (ATO) preveniram tais alterações endoteliais observadas no grupo OVX (figura 10A).

Visando uma melhor comparação desses resultados foi calculada a diferença percentual da área abaixo da curva (% dAUC) dos gráficos. Desta forma foi possível observar que a modulação endotelial pela iNOS na resposta vasorrelaxante a ACh é significativamente maior nos animais OVX quando comparado aos demais grupos (SHAM: $14,8 \pm 5,5$; OVX: $42,4 \pm 6,8^*$; EST: $13,8 \pm 4,7$; ATO: $24,3 \pm 2,9$; $*p < 0,05$, % dAUC) (figura 10B).

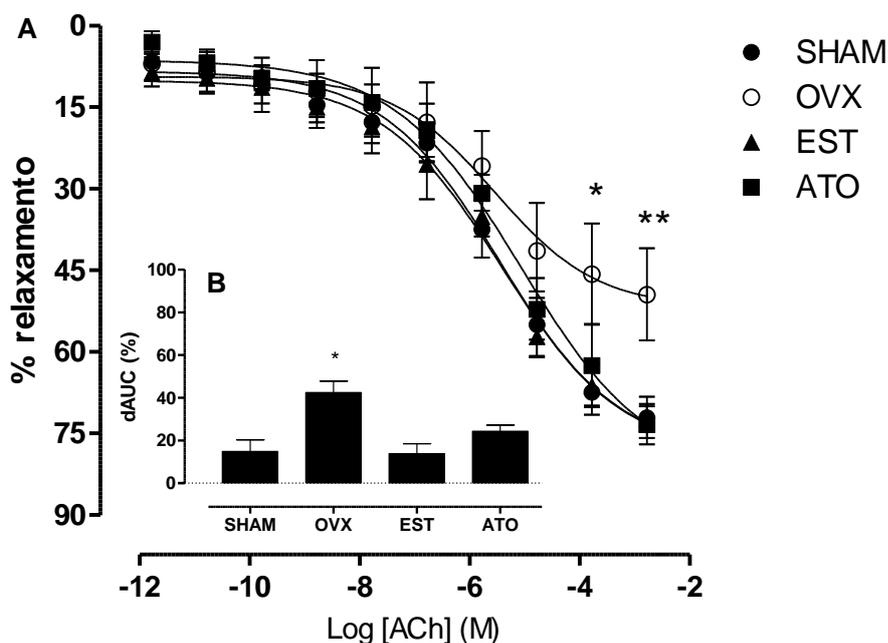


Figura 10: (A) Curva dose-resposta a ACh induzindo vasorrelaxamento no leito mesentérico nos grupos (●) SHAM, (○) OVX, (▲) EST e (■) ATO na presença de aminoguanidina (inibidor da iNOS); (B) Diferença percentual na área abaixo da curva (% dAUC) entre os grupos antes e após a inibição com aminoguanidina. Dados foram expressos como média \pm EPM, n=6 por grupo. $*p < 0,05$ e $**p < 0,01$ quando comparado ao grupo SHAM.

O bloqueio com L-NAME, entretanto, ocasionou no LVM uma expressiva redução no relaxamento à ACh, igualando a resposta entre os grupos (figura 11A), levando a indicar que a diferença observada entre o grupo ovariectomizado e os demais era provavelmente pela via do NO. Dessa forma, a participação do NO nas respostas de relaxamento foi acessada por meio da análise da diferença percentual da área abaixo da curva (% dAUC) antes e após a presença de L-NAME, no qual a queda de

resposta evocada pelo L-NAME representa a participação do NO no vasorrelaxamento. A participação deste fator endotelial na disfunção vascular observada nas OVX é restaurada pelos tratamentos com 17 β -estradiol (EST) ou atorvastatina (ATO) (SHAM: 80,9 \pm 5,8; OVX: 59,3 \pm 3,6*; EST: 74,5 \pm 2,0; ATO: 76,4 \pm 6,7; *p<0,05, % dAUC) (figura 11B).

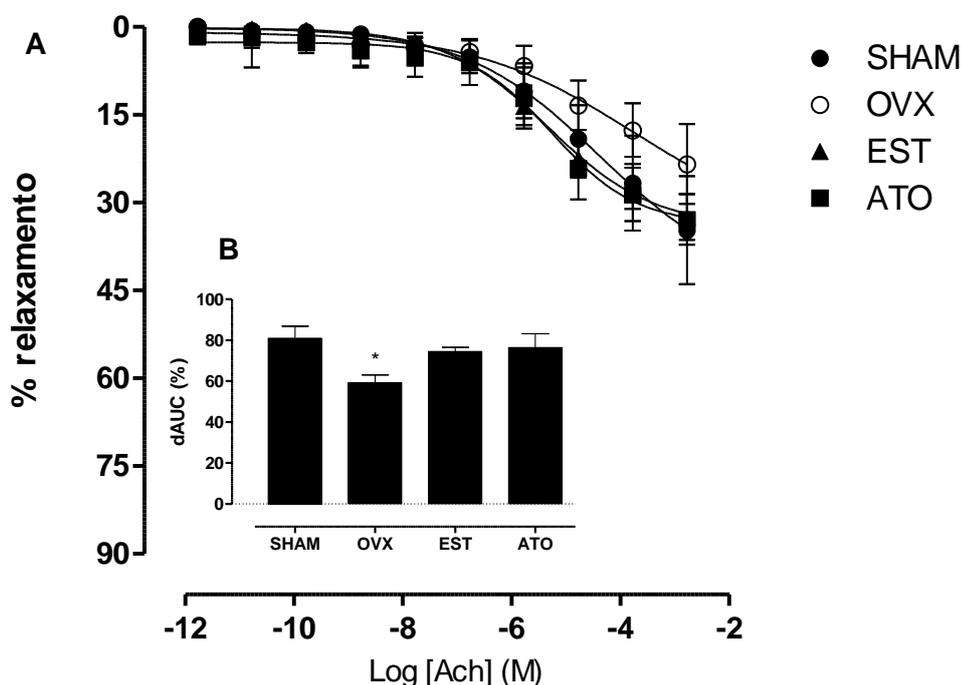


Figura 11: (A) Curva dose-resposta a ACh induzindo vasorrelaxamento no leito mesentérico nos grupos (●) SHAM, (○) OVX, (▲) EST e (■) ATO na presença de L-NAME (inibidor da inespecífico da NOS); (B) Diferença percentual na área abaixo da curva (% dAUC) entre os grupos antes e após a inibição com L-NAME. Dados foram expressos como média \pm EPM, n=6 por grupo. *p<0,05 quando comparado ao grupo SHAM.

Os valores de R_{máx} e pD₂ são mostrados na tabela 4. Adicionalmente, as respostas máximas a ACh evocadas na ausência e presença de cada um dos bloqueadores citados acima podem ser observadas na figura 12, com os valores percentuais correspondendo a redução em relação as barras sem bloqueio, em cada grupo.

Tabela 4: Valor da Resposta Máxima (R_{máx}) e do log da concentração da droga para produzir 50% da resposta máxima (pD₂) no leito mesentérico obtidos por meio das curvas de concentração-resposta de Acetilcolina (ACh) *in bolus* nos grupos Wistar SHAM, Ovariectomizada (OVX), Ovariectomizadas Tratadas com 17β-estradiol (EST) e Atorvastatina (ATO) na presença de Aminoguanidina (AG) e L-NAME.

	Aminoguanidina		L-NAME	
	R _{máx}	pD ₂	R _{máx}	pD ₂
SHAM	76,7 ± 3,8	5,52 ± 0,2	31,6 ± 6,5	5,04 ± 0,3
OVX	48,1 ± 5,3 ^{**##}	5,61 ± 0,1	23,8 ± 6,8	4,74 ± 0,3
EST	77,6 ± 3,3	5,66 ± 0,1	33,9 ± 4,6	5,31 ± 0,3
ATO	85,0 ± 3,8	5,23 ± 0,1	35,2 ± 5,8	5,23 ± 0,2

Dados expressos como média ± EPM. ** p<0,01 quando comparado ao grupo SHAM e ## p<0,01 quando comparado aos grupos EST e ATO.

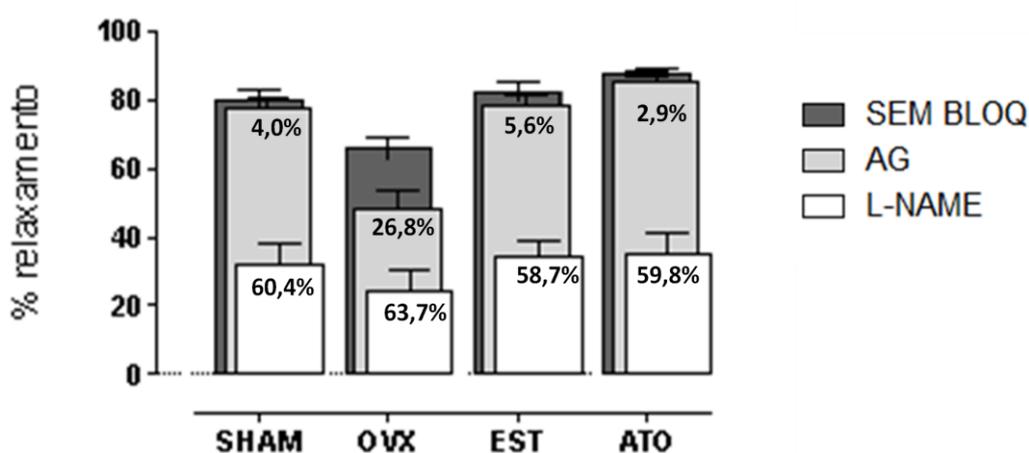


Figura 12. Porcentagem de relaxamento máxima do LVM à ACh na ausência e presença dos inibidores Aminoguanidina (AG) e L-NAME. Os valores percentuais indicam as reduções referentes as médias dos grupos. As comparações foram realizadas entre as barras sem bloqueio e AG ou L-NAME.

4.3.2.1 Expressão proteica das isoformas endotelial e induzível da óxido nítrico sintase (eNOS e iNOS) nos ramos mesentéricos

Visando explicar por qual mecanismo estaria ocorrendo a redução da modulação endotelial pelo NO nas ratas ovariectomizadas, foi comparada a expressão proteica da eNOS nos grupos estudados. Assim, em condições basais (ramos mesentéricos retirados após o sacrifício do animal) a expressão da proteína em destaque foi avaliada por meio da técnica de western blot (figura 13). A ovariectomia provocou uma redução da expressão proteica da eNOS (grupo OVX), enquanto que os tratamentos (grupo EST e ATO) foram capazes de restaurar a expressão desta proteína (SHAM: $1,07 \pm 0,10$; OVX: $0,71 \pm 0,10^{**}$; EST: $1,13 \pm 0,08$; ATO: $1,13 \pm 0,09$; $^{**}p < 0,01$).

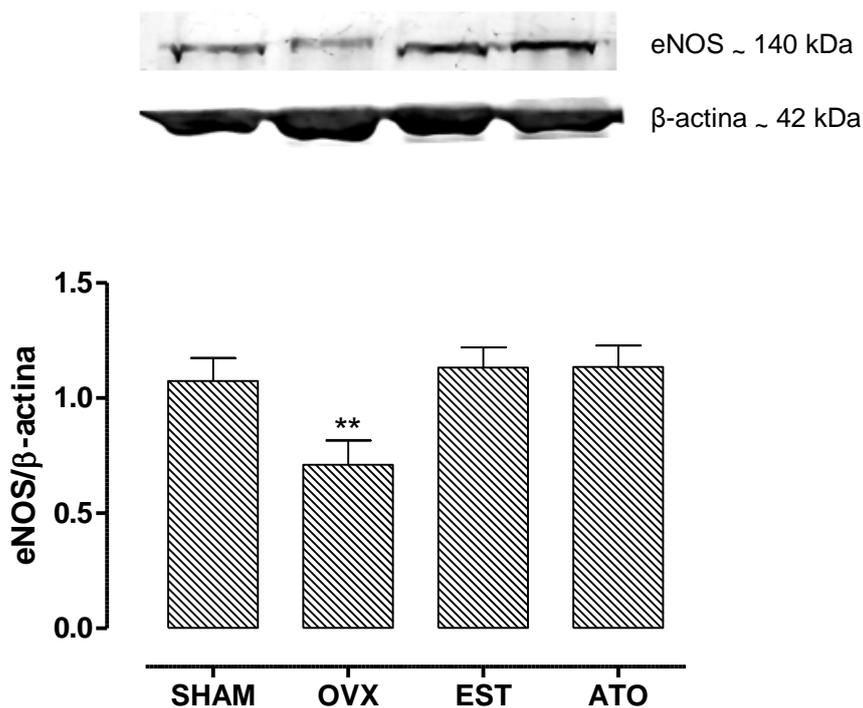


Figura 13. Resultados da expressão proteica da isoforma endotelial da óxido nítrico sintase (eNOS) nos ramos mesentéricos nos grupos Wistar SHAM, Ovariectomizada (OVX), Ovariectomizadas Tratadas com 17β -estradiol (EST) e Atorvastatina (ATO). Na parte superior da figura estão as bandas representativas da expressão da eNOS e da β -actina. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. $^{**} p < 0,01$ quando comparado ao grupo SHAM.

A influência da ovariectomia e dos tratamentos sobre a expressão da iNOS nos ramos mesentéricos também foi avaliada pela técnica de western blot. Os resultados da expressão dessa proteína são mostrados na figura 14. As fêmeas ovariectomizadas (OVX) apresentaram aumento da expressão desta proteína quando comparados aos animais SHAM, enquanto que os tratamentos com 17 β -estradiol (EST) e atorvastatina (ATO) normalizaram essa expressão (SHAM: $0,84 \pm 0,05$; OVX: $0,99 \pm 0,04^*$; EST: $0,81 \pm 0,05$; ATO: $0,84 \pm 0,03$; * $p < 0,05$).

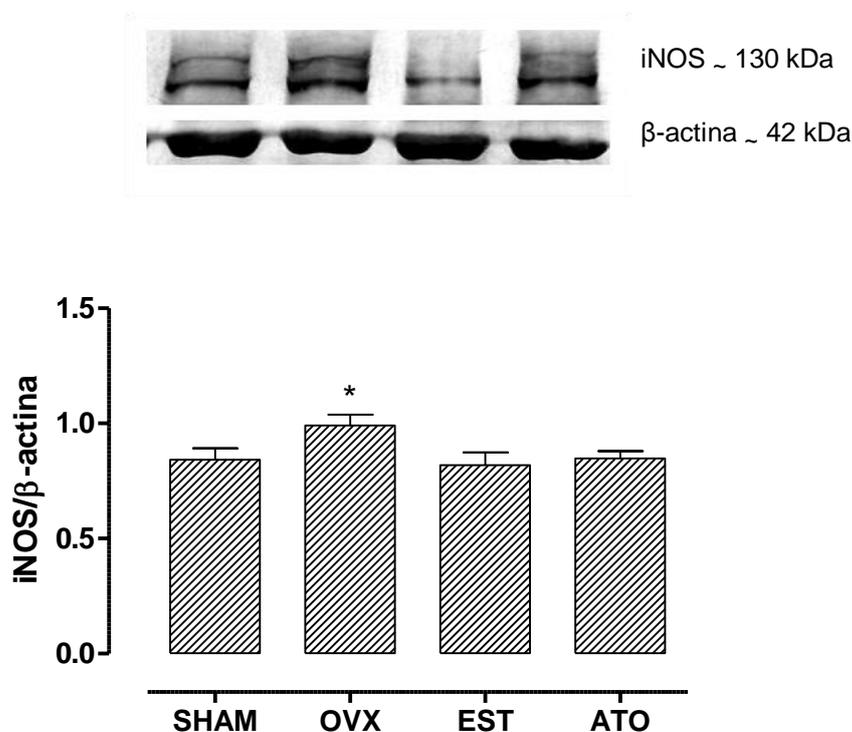


Figura 14. Resultados da expressão proteica da isoforma induzível da óxido nítrico sintase (iNOS) nos ramos mesentéricos nos grupos Wistar SHAM, Ovariectomizada (OVX), Ovariectomizadas Tratadas com 17 β -estradiol (EST) e Atorvastatina (ATO). Na parte superior da figura estão as bandas representativas da expressão da iNOS e da β -actina. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo SHAM.

4.3.3 Avaliação da participação do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e dos prostanóides derivados da Ciclooxygenase (COX) no relaxamento dependente do endotélio

A participação do EDHF nas respostas de relaxamento foi acessada por meio da utilização de Clotrimazol, um inibidor inespecífico da citocromo P450. Nessa situação, não houve diferença entre os grupos no vasorrelaxamento à ACh (figura 15A e tabela 5). Estes dados mostram que nem a ovariectomia isoladamente nem ovariectomia associada aos tratamentos com 17 β -estradiol ou atorvastatina alteraram o relaxamento mediado pelo EDHF. A análise da diferença percentual da área abaixo da curva (% dAUC) mostrou que a modulação endotelial derivada dos metabólitos da citocromo P450 foi similar em todos os grupos (SHAM: 74,5 \pm 6,1 ; OVX: 61,2 \pm 12,1; EST: 66,0 \pm 6,9; ATO: 77,6 \pm 6,4, % dAUC), levando a acreditar que o relaxamento evocado pela ACh na condição controle é prioritariamente pela via do EDHF (figura 15B).

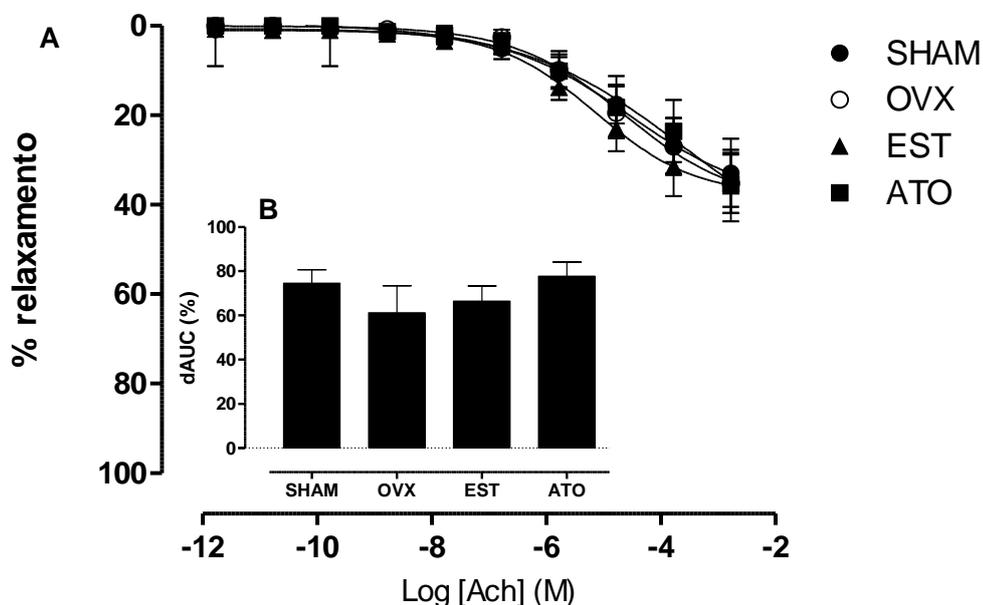


Figura 15: (A) Curva dose-resposta a ACh induzindo vasorrelaxamento no leito mesentérico nos grupos (●) SHAM, (○) OVX, (▲) EST e (■) ATO na presença de Clotrimazol (inibidor inespecífico da citocromo P450); (B) Diferença percentual na área abaixo da curva (% dAUC) entre os grupos antes e após a inibição com Clotrimazol. Dados foram expressos como média \pm EPM, n=6 por grupo.

Outra forma de avaliarmos a participação do EDHF na resposta vasorrelaxante a ACh foi por meio da inibição simultânea da produção de NO e prostanoídes (PGs) na presença conjunta de L-NAME e INDO, permanecendo uma resposta residual não-NO/não-PGs, que é atribuída ao EDHF. Também nesse protocolo as curvas doses-resposta a ACh foram significativamente atenuadas com relação a condição controle, mas o uso dos inibidores não modificaram a resposta entre os grupos (figura 16A e tabela 5). Além disso, nesse protocolo especificamente, a participação do EDHF no relaxamento endotelial foi avaliado por meio da porcentagem da área abaixo da curva (AUC), que é a área entre a curva e o eixo das abscissas, mensurando desta forma a resposta residual após o uso dos inibidores L-NAME e INDO (figura 16B). Também nesta análise, tanto a condição de ovariectomia quanto a de tratamento não alteraram os valores de área (SHAM: $34,1 \pm 12,3$; OVX: $43,5 \pm 6,0$; EST: $38,2 \pm 9,6$; ATO: $27,8 \pm 6,6$, %AUC).

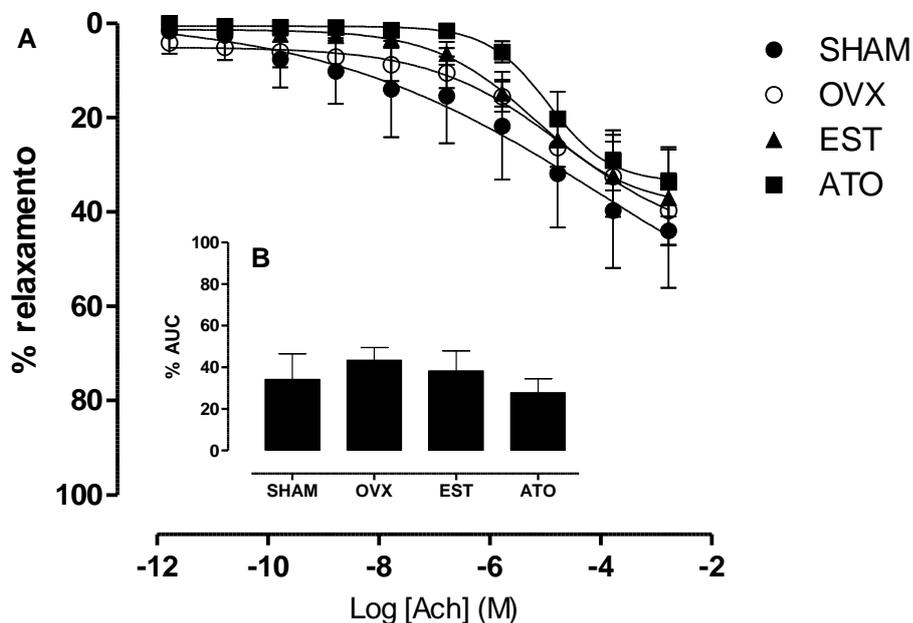


Figura 16: (A) Curva dose-resposta a ACh induzindo vasorrelaxamento no leito mesentérico nos grupos (●) SHAM, (○) OVX, (▲) EST e (■) ATO na presença de L-NAME (inibidor da NOS) e Indometacina (inibidor da COX); (B) Efeito da ovariectomia e dos tratamentos sobre a porcentagem da área abaixo da curva (% AUC) na presença conjunta de L-NAME e Indometacina. Dados foram expressos como média ± EPM, n=6 por grupo.

A inibição da via do ácido araquidônico-ciclooxigenase com INDO também foi investigada neste protocolo experimental por meio da análise da diferença percentual da área abaixo da curva (% dAUC) na presença de L-NAME e após a inibição com L-NAME e INDO, no qual o aumento de resposta evocada pela INDO representa a participação dos derivados da COX no vasorrelaxamento (SHAM: $27,1 \pm 11,0$; OVX: $35,7 \pm 6,8$; EST: $27,4 \pm 8,8$; ATO: $28,7 \pm 10,2$ % dAUC) (figura 17). Nessa análise não houve mudança, em nenhum grupo, na resposta à ACh na presença conjunta de L-NAME e INDO em comparação a resposta na presença de L-NAME sozinho (Figura 11). Esses dados mostram uma pequena participação de prostanóides nas repostas de vasorrelaxamento à ACh em todos os grupos.

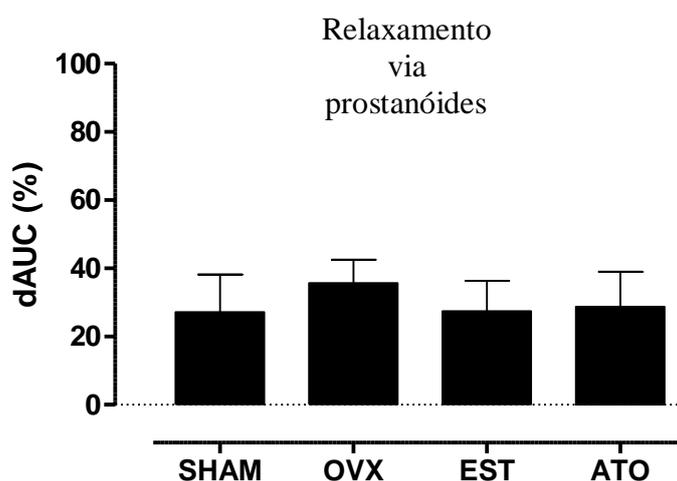


Figura 17: Diferença percentual na área abaixo da curva (% dAUC) na presença de L-NAME e após a inibição com L-NAME e INDO entre os grupos Wistar SHAM, Ovariectomizada (OVX), Ovariectomizadas Tratadas com 17 β -estradiol (EST) e Atorvastatina (ATO). Esses dados dão informação sobre a magnitude da participação da via da COX no relaxamento à ACh. Dados foram expressos como média \pm EPM, n=6 por grupo.

Tabela 5: Valor da Resposta Máxima (R_{máx}) e do log da concentração da droga para produzir 50% da resposta máxima (pD₂) no leito mesentérico obtidos por meio das curvas de dose-resposta de Acetilcolina (Ach) *in bolus* nos grupos Wistar SHAM, Ovariectomizada (OVX), Ovariectomizadas Tratadas com 17β-estradiol (EST) e Atorvastatina (ATO) na presença de L-NAME com Indometacina (INDO) e Clotrimazol.

	L-NAME + INDO		Clotrimazol	
	R _{máx}	pD ₂	R _{máx}	pD ₂
SHAM	46,9 ± 8,5	5,55 ± 0,9	37,4 ± 6,5	4,87 ± 0,4
OVX	43,4 ± 6,4	4,94 ± 0,4	41,1 ± 6,0	4,43 ± 0,3
EST	39,9 ± 6,8	4,93 ± 0,5	43,4 ± 5,6	4,43 ± 0,7
ATO	35,5 ± 6,4	4,74 ± 0,1	48,6 ± 3,8	4,05 ± 0,4

Dados expressos como média ± EPM.

4.3.3.1 Expressão proteica da Ciclooxygenase 2 (COX-2) nos ramos mesentéricos

Com objetivo de determinar se a ovariectomia e os tratamentos com 17β-estradiol e atorvastatina exercem alguma influência sobre a expressão da COX-2, foi comparada a expressão dessa enzima nos ramos mesentéricos das ratas. Na figura 18 podemos observar os resultados obtidos, por western blot, da expressão da COX-2. Nesses segmentos vasculares notou-se uma expressão reduzida dessa isoforma da ciclooxygenase em todos os grupos (SHAM: 0,33 ± 0,03; OVX: 0,34 ± 0,07; EST: 0,36 ± 0,05; ATO: 0,43 ± 0,09). A fim de verificar a autenticidade dos resultados obtidos, foi utilizado um segmento de aorta torácica do grupo ovariectomizado como controle positivo.

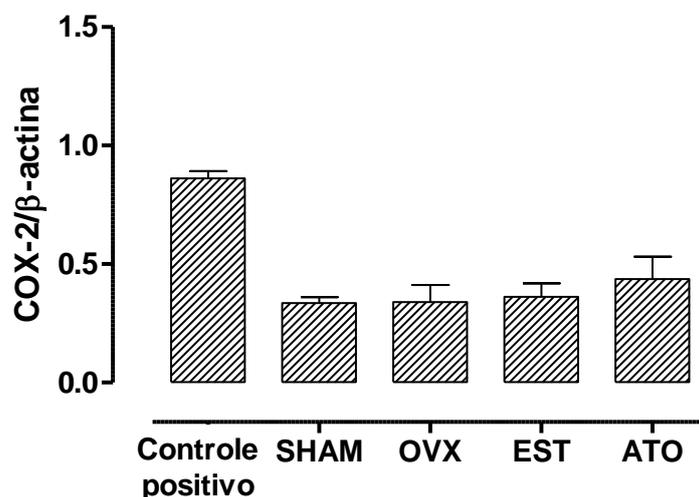
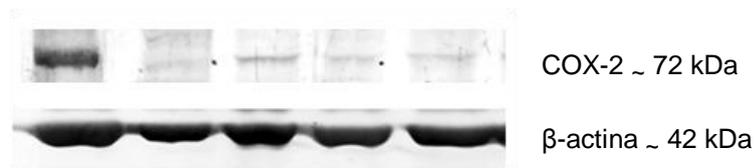


Figura 18. Resultados da expressão proteica da ciclooxigenase 2 (COX-2) nos ramos mesentéricos nos grupos Wistar SHAM, Ovariectomizada (OVX), Ovariectomizadas Tratadas com 17β-estradiol (EST) e Atorvastatina (ATO). Na parte superior da figura estão as bandas representativas da expressão da COX-2 e da β-actina. Os resultados foram expressos como média ± EPM.

4.3.4 Participação das espécies reativas ao oxigênio (EROs) na resposta de relaxamento dependente do endotélio

Neste protocolo investigamos a possível participação das EROs vasculares na resposta de relaxamento a ACh nos grupos estudados. Para tanto, utilizamos o ácido ascórbico, um antioxidante não enzimático e apocinina, um inibidor específico da NADP(H) oxidase. A incubação do LVM com ácido ascórbico não alterou as respostas de relaxamento observadas na condição controle (sem bloqueio) nos grupos estudados (figura 19). Desta forma, entendemos que a participação deste inibidor em reduzir os efeitos das EROs no relaxamento endotelial não foi efetiva, ou que a influência destas EROs neste leito vascular possa ser diminuída.

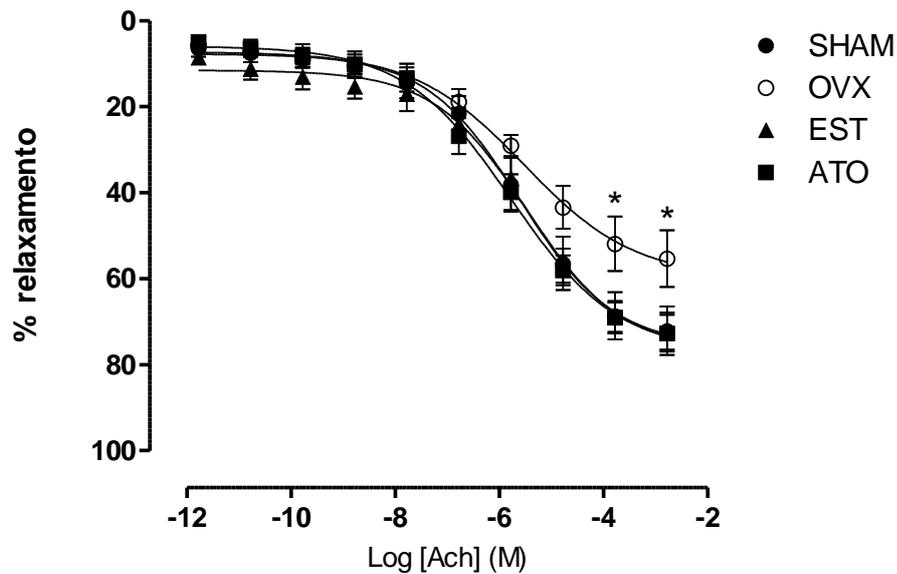


Figura 19: Curva dose-resposta a ACh induzindo vasorrelaxamento no leito mesentérico nos grupos (●) SHAM, (○) OVX, (▲) EST e (■) ATO na presença de Ácido Ascórbico (antioxidante não enzimático). Dados foram expressos como média ± EPM, n=6 por grupo. *p<0,05 quando comparado ao grupo SHAM.

Com a finalidade de investigar o possível papel das EROs provenientes da NADP(H) oxidase nas respostas vasculares de relaxamento, a apocinina foi incubada no LVM de todos os grupos. Este inibidor não alterou a resposta a ACh no grupo SHAM, quando comparada a condição controle. Entretanto, os animais submetidos a ovariectomia (OVX) apresentaram uma atenuação do relaxamento induzido pela ACh, enquanto que os tratamentos com 17β-estradiol (EST) e atorvastatina (ATO) restauraram parcialmente a condição vascular observada nos animais OVX (figura 20).

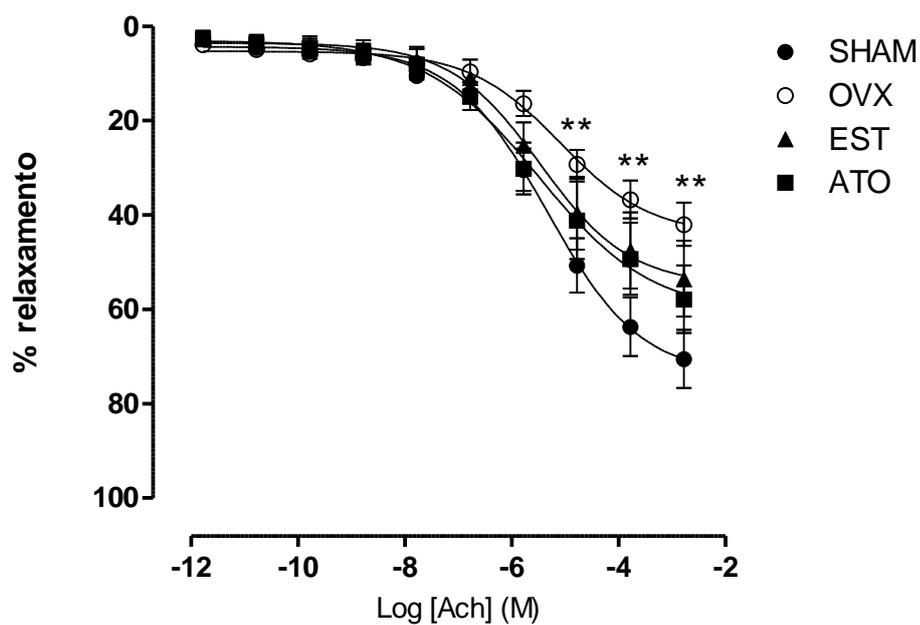


Figura 20: Curva dose-resposta a ACh induzindo vasorrelaxamento no leito mesentérico nos grupos (●) SHAM, (○) OVX, (▲) EST e (■) ATO na presença de Apocinina (inibidor da NAD(P)H oxidase). Dados foram expressos como média ± EPM, n=6 por grupo. **p<0,01 quando comparado ao grupo SHAM.

Os valores de resposta máxima e pD_2 são mostrados na tabela 6, para uma melhor visualização dos resultados. Bem como observado nos demais bloqueios, não houve diferença significativa entre os grupos experimentais na sensibilidade (pD_2) a ACh.

Tabela 6: Valor da Resposta Máxima (R_{máx}) e do log da concentração da droga para produzir 50% da resposta máxima (pD₂) no leito mesentérico obtidos por meio das curvas de dose-resposta de Acetilcolina (Ach) *in bolus* nos grupos Wistar SHAM, Ovariectomizada (OVX), Ovariectomizadas Tratadas com 17β-estradiol (EST) e Atorvastatina (ATO) na presença de Ácido Ascórbico e Apocinina.

	Ácido Ascórbico		Apocinina	
	R _{máx}	pD ₂	R _{máx}	pD ₂
SHAM	75,4 ± 4,8	4,53 ± 0,4	74,9 ± 4,4	5,61 ± 0,2
OVX	56,7 ± 4,8* [#]	5,58 ± 0,2	44,1 ± 4,7*	5,10 ± 0,1
EST	79,5 ± 4,3	5,38 ± 0,1	64,4 ± 5,2	5,34 ± 0,1
ATO	76,0 ± 4,7	5,22 ± 0,2	66,1 ± 5,4	5,83 ± 0,1

Dados expressos como média ± EPM. *p<0,05 quando comparado ao grupo SHAM e [#]p<0,05 quando comparado aos grupos EST e ATO.

4.3.4.1 Expressão proteica da gp91phox nos ramos mesentéricos dos grupos experimentais.

Considerando que no grupo ovariectomizado (OVX) houve uma diminuição da reatividade vascular e que esta foi significativamente atenuada após o bloqueio com apocinina, tivemos por objetivo investigar a expressão proteica de uma subunidade da NADP(H) oxidase nos ramos mesentéricos dos grupos estudados, a gp91phox, uma vez que esta é uma subunidade da principal isoforma da NADPH oxidase presente nos vasos sanguíneos (Görlach et. al., 2000; Ray & Shah, 2005). Os resultados da expressão desta proteína são mostrados na figura 21. As fêmeas ovariectomizadas (OVX) apresentaram maior expressão proteica da gp91phox que os animais SHAM, enquanto que os tratamentos (grupos EST e ATO) foram capazes de retornar os valores desta proteína a valores semelhantes aos do grupo controle (SHAM: 0,76 ± 0,10; OVX: 1,12 ± 0,13*; EST: 0,80 ± 0,05; ATO: 0,96 ± 0,09; *p<0,05).

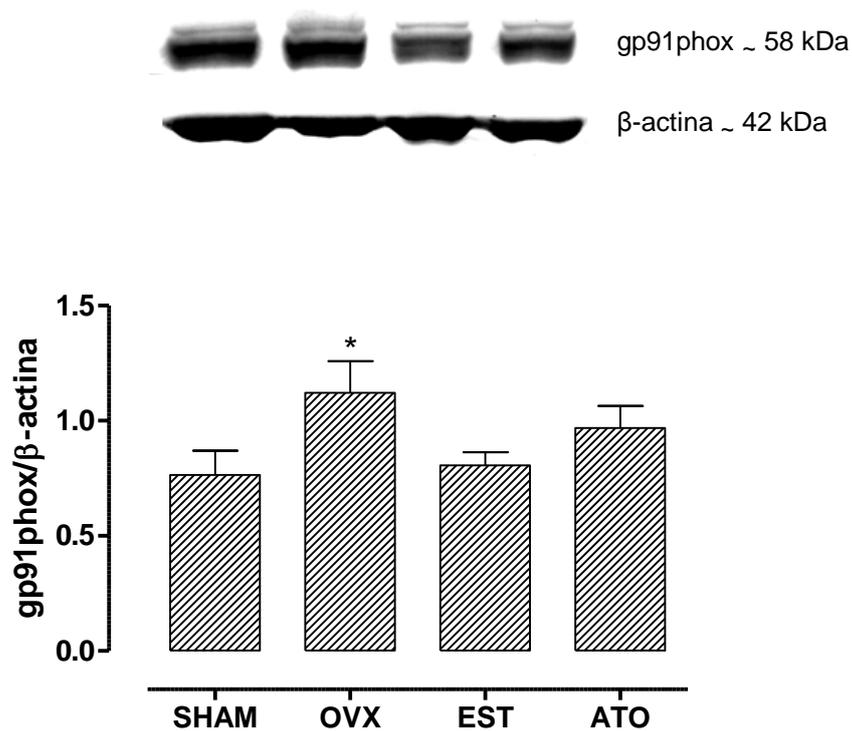
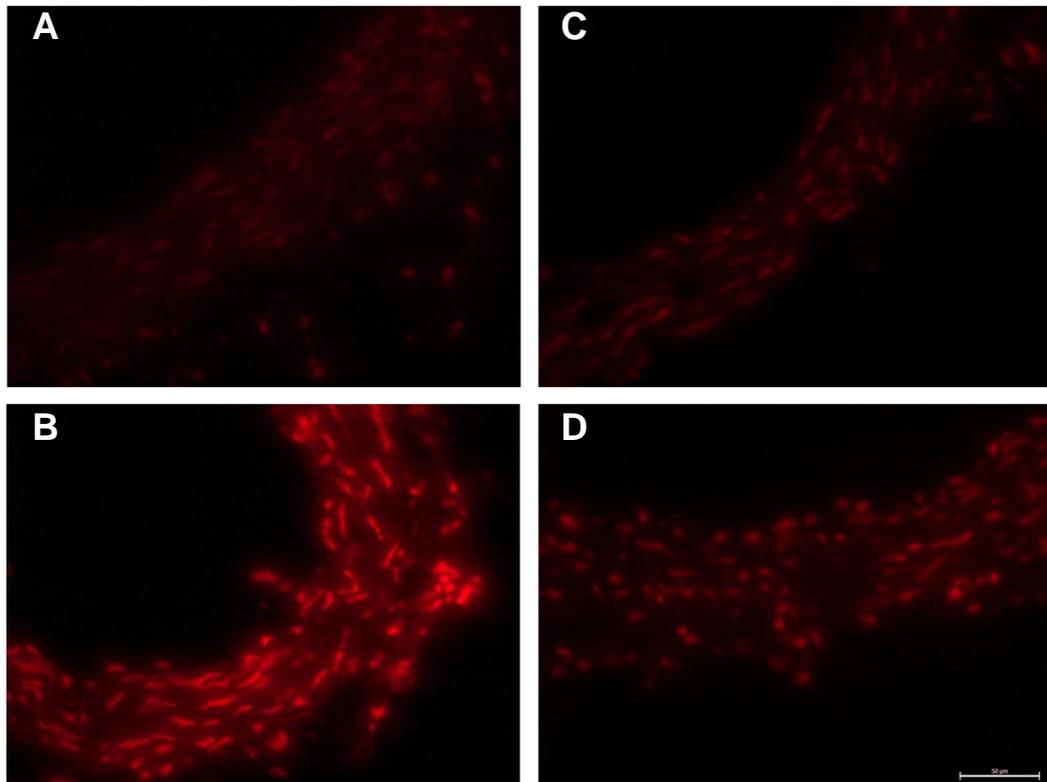


Figura 21. Resultados da expressão proteica da subunidade gp91phox da NADP(H) oxidase nos ramos mesentéricos nos grupos Wistar SHAM, Ovariectomizada (OVX), Ovariectomizadas Tratadas com 17β-estradiol (EST) e Atorvastatina (ATO). Na parte superior da figura estão as bandas representativas da expressão da gp91phox e da β-actina. Os resultados foram expressos como média ± EPM. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo SHAM.

4.3.4.2 Quantificação da produção de Espécies Reativas de Oxigênio pela oxidação do dihidroetídio (DHE) nas artérias mesentéricas dos grupos experimentais

Outra técnica utilizada para investigar a influência da ovariectomia e dos tratamentos com 17β-estradiol e atorvastatina sobre a produção de EROs foi a fluorescência produzida pela oxidação com DHE. Em condições basais, a análise da fluorescência produzida pela DHE nas artérias mesentéricas revelou um aumento da produção de EROs nos animais OVX quando comparado ao grupo SHAM. Entretanto, as ratas ovariectomizadas que receberam o tratamento (grupos EST e ATO) tiveram seus valores de fluorescência reduzidos, corrigindo a aumentada produção de EROs (SHAM: $8,59 \pm 0,65$; OVX: $11,45 \pm 0,76^*$; EST: $8,90 \pm 0,55$; ATO: $8,78 \pm 0,30$; * $p < 0,05$) (figura 22).

A



B

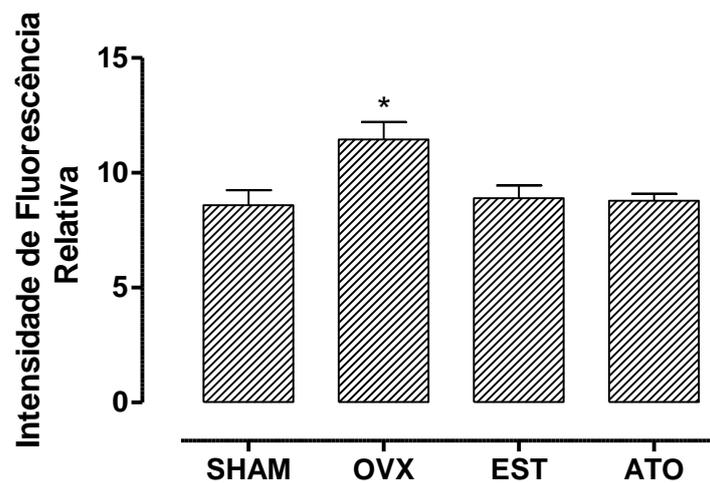


Figura 22. (A) Imagens de microscopia apresentam a fluorescência emitida por dihidroetídeo na artéria mesentérica dos ratos do grupo SHAM (A), Ovariectomizado (OVX) (B), Ovariectomizadas Tratadas com 17β -estradiol (EST) (C) e Atorvastatina (ATO) (D). (B) Gráfico com valores da fluorescência emitida por dihidroetídeo.

4.4 EFEITO DOS TRATAMENTOS COM 17 β -ESTRADIOL E ATORVASTATINA SOBRE A EXPRESSÃO PROTEICA DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO NUCLEAR KAPPA B (NF-KB) NOS RAMOS MESENTÉRICOS DAS FÊMEAS OVARIECTOMIZADAS.

A disfunção vascular observada nas ratas submetidas a ovariectomia pode estar relacionada a alterações na via do óxido nítrico, em especial a isoforma induzível da NOS, bem como alterações na expressão proteica da NAD(P)H oxidase, cuja participação na produção de EROs é bem conhecida. Deste modo, nossos dados nos levam a acreditar que o estresse oxidativo vascular e o aumento da iNOS nas fêmeas ovariectomizadas poderiam estar relacionados ao aumento do NF-kB, um fator de transcrição de moléculas pró-inflamatórias.

A ativação do fator de transcrição foi avaliada por meio da expressão da subunidade p65, a mais frequente subunidade a compor homo ou heterodímeros do complexo NF-kB (Davel et al., 2008). Os dados de expressão da proteína foram apresentados como razão entre a expressão da p65 nuclear pela citoplasmática nos ramos mesentéricos de todos os grupos estudados.

Foi observado que a condição de ovariectomia (grupo OVX) aumenta a expressão do NF-kB quando comparado aos animais SHAM, enquanto que o tratamento das fêmeas ovariectomizadas com 17 β -estradiol (grupo EST) não foi capaz de alterar os níveis de expressão desta proteína. Entretanto, o tratamento com atorvastatina (grupo ATO) promoveu uma diminuição na expressão do NF-kB quando comparado as ratas ovariectomizadas que não receberam tratamento, retornando a valores similares a dos grupo controle (SHAM: 0,81 \pm 0,04; OVX: 1,02 \pm 0,07*; EST: 1,05 \pm 0,08*; ATO: 0,88 \pm 0,05; *p<0,05) (figura 23).

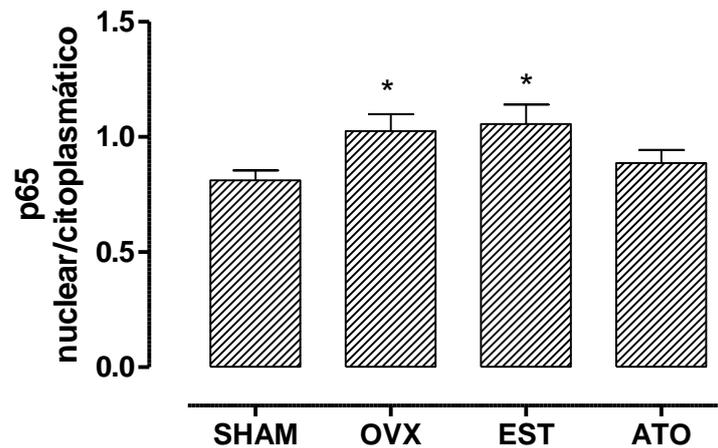
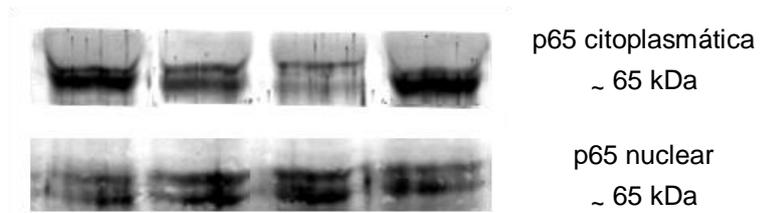


Figura 23. Resultados da expressão proteica da subunidade p65 do NF- κ B nos ramos mesentéricos nos grupos Wistar SHAM, Ovariectomizada (OVX), Ovariectomizadas Tratadas com 17 β -estradiol (EST) e Atorvastatina (ATO). Na parte superior da figura estão as bandas representativas da expressão da p65 citoplasmática e da p65 nuclear. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo SHAM.

5 DISCUSSÃO

Nossos dados evidenciam pela primeira vez a influência do tratamento com atorvastatina, um inibidor da HMG-Coa redutase, sobre a disfunção vascular observada em fêmeas ovariectomizadas e, simultaneamente, demonstram o efeito do tratamento com esta droga sobre a expressão proteica de importantes enzimas relacionadas aos mecanismos de relaxamento endotelial e estresse oxidativo.

O estado de deficiência estrogênica observado após trinta e cinco dias de ovariectomia parece apresentar um importante papel no prejuízo de relaxamento vascular do leito mesentérico, bem como na expressão de proteínas relacionadas à via do NO, estresse oxidativo e inflamação. Concomitante a estas alterações, se somam aquelas relacionadas aos parâmetros de peso corporal, de útero e perfil lipídico descritas na literatura (Lamas et al., 2011; Xu et al., 2012; Ryou et al., 2012; Medeiros et al., 2012). Oportunamente, pudemos observar a efetividade do 17 β -estradiol em reestabelecer a reatividade vascular a ACh, assim como os valores de expressão da eNOS, iNOS e NAD(P)H Oxidase a níveis observados nos animais controle, retratando o efeito do estrogênio sobre o vaso e sobre o endotélio, o que parece ser um dos mecanismos responsáveis pela função cardioprotetora e metabólica deste hormônio na fase pré-menopausa (Kim et al., 2008; Barton et al., 2011; Muehlfelder et al., 2012).

A terapia de reposição hormonal estrogênica, entretanto, apresenta dados controversos na prática clínica (Hulley et al., 1998; Manson et al., 2003; Sare et al., 2008) embora haja resultados prospectivos em modelos animais (Liu et al., 2001; Sakuma et al., 2002; Nawate et al., 2005). Assim, drogas alternativas, que não atuem via receptores de estrogênio estão sendo investigados como potenciais substitutos para a TRH. Em nosso estudo apontamos a atorvastatina, que assim como o 17 β -estradiol, foi capaz de normalizar a disfunção no relaxamento vascular do leito mesentérico e possuir papel semelhante a este hormônio sobre a expressão das proteínas avaliadas.

A deficiência de estrogênio no modelo animal de ovariectomia foi avaliada de forma indireta, por meio da razão entre o peso de útero pela tibia, que mostrou uma hipotrofia da massa uterina nas fêmeas ovariectomizadas quando comparados ao grupo SHAM e uma normalização desta razão nos animais submetidos a ovariectomia que receberam 17 β -estradiol, demonstrando um efeito proliferativo nesse órgão que é relatado na literatura (Liu & Bachmann, 1998). A utilização do peso do útero como parâmetro de eficácia da ovariectomia é bem descrita (Sato et al., 1996; Medeiros et al., 2012), bem como o uso de medidas diretas da dosagem deste hormônio, como a redução observada nos níveis séricos de estradiol após 30 dias de ovariectomia (Moysés et al., 2001) ou 21 dias (Belo et al., 2004), tempo equivalente ao praticado no presente estudo. Em contrapartida, o tratamento com atorvastatina não promoveu alterações no peso do útero quando comparado ao grupo ovariectomizado, o que possivelmente é atribuído ao fato desta droga não apresentar mecanismos de ação relacionados aos receptores estrogênicos. Nossos achados corroboram estudos anteriores com estatinas e animais OVX. Um desses estudos foi realizado por Yin e colaboradores (2012), que mostrou uma redução nos valores plasmáticos de estrogênio em fêmeas ovariectomizadas que receberam sinvastatina por 8 semanas. Outro estudo foi de Li e colaboradores (2011) que apontou pesos de útero similares entre animais OVX e que receberam tratamento com sinvastatina por 6 semanas.

Em concordância com outros estudos e com dados prévios do nosso laboratório, também mostramos que há um aumento do peso corporal das fêmeas ovariectomizadas e uma normalização deste peso ao final do protocolo experimental nas fêmeas que receberam tratamento com 17 β -estradiol (Medeiros et al., 2012; Dalpiaz et al., 2012; Zoth et al., 2012). Os valores de peso do coração e a razão deste com a tibia, entretanto, apresentaram-se similares tanto na presença ou ausência de estrogênio, corroborando dados demonstrados na literatura (Bianchi et al., 2006; Medeiros et al., 2012). O tratamento com atorvastatina, assim como observado nos parâmetros de peso de útero, não influenciaram os parâmetros ponderais descritos anteriormente.

O procedimento de ovariectomia, que conduz a um ganho de peso corporal, também se associa a um aumento do consumo energético diário e ao aumento da massa

gorda corporal (Hassan & Wahhab., 2012; Ryou et al., 2012), relacionados ao importante papel do estrogênio na regulação do metabolismo lipídico. Muitos estudos apontam a deficiência desse hormônio como causa de hiperlipidemia e hipercolesterolemia associadas à disfunção cardíaca, entretanto, esses dados não são concisos e dependem do tempo de ovariectomia e do tipo de dieta utilizada no tratamento dos animais (Starzec & Berger., 1986; Ryou et al., 2012). Em nosso estudo, não demonstramos diferenças entre os níveis de triglicerídeos, colesterol total, LDL colesterol e VLDL colesterol entre animais controle e submetidos à ovariectomia, semelhante a outros resultados (Ryou et al., 2012; Xu et al., 2012), enquanto alguns mostraram um aumento nos níveis de HDL colesterol (Saberivand et al., 2010; Zoth et al., 2012) nas fêmeas ovariectomizadas. O tratamento com atorvastatina, apesar de inibir a HMG-Coa redutase, não foi capaz de promover alteração no perfil lipídico das fêmeas SHAM ou OVX, fato também demonstrado por Nachtigal e colaboradores (2008), em fêmeas apoE Knockout. Neste último estudo, somente a utilização de altas dosagens de atorvastatina (100 mg/kg/dia) foram efetivas em reduzir os valores de triglicerídeos, colesterol total e frações. Não obstante, o uso das estatinas como drogas de efeito vasoprotetor tem sido relacionadas a mecanismos anti-inflamatórios e de atuação sobre fatores endoteliais, que são independentes de seus efeitos sobre o perfil lipídico (Wassmann et al., 2001b; Kurumazuka et al., 2006), o que também pudemos perceber sobre a reatividade vascular nas fêmeas ovariectomizadas que receberam tratamento com atorvastatina.

A deficiência de estrogênio é bem relacionada com prejuízo de reatividade vascular, tanto sobre agentes vasoconstritores como vasodilatadores (Perez-Torres et al., 2008; Pinna et al., 2008; Shuto et al., 2011; Camporez et al., 2011). Em concordância com estes estudos, observamos no presente trabalho que a função vasodilatadora da ACh, frequentemente utilizada para determinar a capacidade funcional do endotélio (Pinna et al., 2006), está prejudicada nas fêmeas ovariectomizadas. De fato, as ações favoráveis dos estrógenos sobre o sistema cardiovascular são bem conhecidas e contribuem para a manutenção de um efeito vasodilatador, antitrombótico e anti-inflamatório do endotélio (Hassan & Wahhab, 2012). Essas células desempenham um papel fundamental na circulação por meio da síntese de vasodilatadores, NO, PGI₂ e EDHF, bem como para o equilíbrio do

estado antioxidante por meio da regulação na formação de EROs (Yung et al., 2011; Camporez et al., 2011). A privação estrogênica pode contribuir para um processo de disfunção endotelial, uma vez que altera a síntese/liberação dos fatores de relaxamento (Arenas et al., 2005, Nawate et al., 2005), aumenta a produção de substâncias vasoconstritoras (como endotelina, TXA₂, prostaglandina H) (Davidge & Zhang., 1998), ativa o sistema renina-angiotensina (Yung et al., 2011) e aumenta o estado oxidativo (Wassmann et al., 2001b ; Chen et al., 2007), relacionando-se ao processo de desenvolvimento de DCV.

Tais doenças, associadas a modificações do metabolismo lipídico, são importantes causas de mortalidade em pacientes na pós menopausa (Ryou et al., 2012; Xu et al., 2012). Embora estudos tenham mostrado os efeitos vasculares benéficos da atorvastatina (Kurumazuka et al., 2006; Tycinska et al., 2011; Shuto et al., 2011), estando estes associados a redução do risco de desenvolvimento de eventos cardiovasculares, o mecanismo de ação desta droga melhorando a reatividade vascular não está completamente esclarecida. Alterações na modulação da resposta de relaxamento mediada por fatores endoteliais podem ter participação nas alterações de prejuízo vascular observada nas fêmeas ovariectomizadas e nos efeitos promovidos pela atorvastatina. De fato, estudos em diferentes modelos experimentais mostram as estatinas melhorando situações de disfunção vascular por meio de aumento de NO ou redução do estado antioxidante, como em artérias mesentéricas de resistência (Viridis et al., 2009) ou aorta (Suh et al., 2010) de machos SHR, em arteríolas coronarianas de pacientes ateroscleróticos (Tiefenbacher et al., 2004) ou mesmo em aorta de ratos machos normotensos (Perez-Guerrero et al., 2003).

Dentre os fatores vasoativos derivados do endotélio, o NO é o principal fator relaxante que modula as respostas vasculares a diferentes agonistas (Chatterjee & Catravas, 2008) e alterações na via do NO têm sido amplamente descritas em estudos experimentais com fêmeas ovariectomizadas (Nawate et al., 2005; Loyer et al., 2007; Knowlton & Lee, 2012). Em nosso trabalho, a participação da via do óxido nítrico no vasorrelaxamento, acessada por meio da % dAUC e dos resultados observados na curva dose-resposta à ACh, mostrou o grupo OVX com um maior prejuízo desta via em comparação ao SHAM, prejuízo este que é revertido pelos

tratamentos. Esses dados indicam que a regulação do relaxamento mediado pelo NO no leito vascular mesentérico pode ser regulada pelo nível de estrogênio, e que a atorvastatina também pode influenciar positivamente essa modulação.

Trabalhos que utilizam bloqueios farmacológicos em outros segmentos vasculares de fêmeas ovariectomizadas tratadas ou não com TRH sugerem prováveis efeitos do NO nas respostas endoteliais desses animais. Nesse sentido, Wong e colaboradores (2006) mostraram um aumento na contratilidade em anéis de aorta nesse modelo experimental comparado aos animais controle, cuja diferença foi aumentada após a utilização de L-NAME como instrumento farmacológico. Outro estudo realizado por LeBlanc e colaboradores (2009) apontou um prejuízo na dilatação induzida por fluxo em arteríolas coronárias de fêmeas ovariectomizadas idosas (22 meses), bem como uma redução da resposta ao relaxamento após o bloqueio com L-NAME. Nesse mesmo trabalho, o tratamento do grupo ovariectomizado com 17β -estradiol foi capaz de reverter o menor relaxamento das arteríolas coronárias. Em relação às estatinas, o papel destas na modulação da resposta vascular ao NO também já foi descrito anteriormente em machos hipertensos tratados com sinvastatina (Perez-Guerrero et al., 2003) ou atorvastatina (Viridis et al., 2009).

Estudos sugerem que o estrogênio ativa a síntese e liberação de NO por estimular a expressão gênica da eNOS (Koh, 2002), bem como por meio do aumento de sua atividade enzimática por via não genômica (Mendelsohn, 2000; Barton et al., 2011), por meio da fosfatidilinositol-3-quinase/serina-treonina kinase (PI3/Akt; Chen et al., 1999; Haynes et al., 2000). Nossos achados apontam para uma menor expressão da eNOS no grupo OVX, enquanto que os tratamentos com 17β -estradiol e atorvastatina revertem a expressão desta proteína, retornando a valores similares aos observados nos animais Sham. Em fêmeas ovariectomizadas, a menor expressão da eNOS já foi descrita em segmentos vasculares, como aorta (Pinna et al., 2008), artérias mesentéricas (Nawate et al., 2005) ou mesmo no miocárdio (Loyer et al., 2007). Da mesma forma, as estatinas também já foram apontadas como drogas que modulam os níveis das NOS, como o aumento de eNOS em machos hipertensos (Viridis et al., 2009) ou mesmo em cultura de células osteoblásticas (Yin et al., 2012). Entretanto, ainda não tinha sido demonstrado em

ratas ovariectomizadas que o tratamento com atorvastatina restaurava a expressão da eNOS a níveis similares às fêmeas sem deficiência estrogênica.

Para avaliar a influência da ovariectomia e os mecanismos de ação da atorvastatina na via do NO, investigamos o papel da iNOS sobre o relaxamento vascular do leito mesentérico. Relatos prévios mostram que a iNOS está presente em uma variedade de tecidos, principalmente em resposta a mediadores endógenos da inflamação, hipóxia e estresse oxidativo (Chatterjee & Catravas, 2008). Enquanto o NO produzido pela eNOS se relaciona a efeitos benéficos, o excessivo NO produzido pela iNOS pode ser prejudicial, uma vez que leva a disfunção endotelial e falência de múltiplos órgãos (Wu et al., 2008). Em nosso estudo, mostramos que dentre os grupos avaliados, somente o ovariectomizado apresentou uma redução da resposta relaxante em relação a curva controle após o bloqueio específico da iNOS. Este resultado pode indicar uma maior participação dessa isoforma da enzima na resposta vascular do grupo OVX e que, tanto o tratamento com atorvastatina quanto com 17 β -estradiol restauram esse possível quadro inflamatório observado nas fêmeas submetidas a ovariectomia.

Por sua vez, a ativação da transcrição gênica da iNOS pode ser induzida por uma série de fatores, incluindo endotoxinas e citocinas pró-inflamatórias, sendo que estas últimas apresentam níveis elevados no soro de fêmeas ovariectomizadas, demonstrado recentemente pelo nosso grupo e também por Koh e colaboradores (Koh et al., 2005; Medeiros et al., 2012), indicando a privação estrogênica como mediador principal desta elevação, uma vez que o tratamento destes animais com 17 β -estradiol ou outras TRH reduzem os níveis de TNF- α e IL-6 (Lamas et al., 2011; Medeiros et al., 2012). Nesse sentido, nossos achados corroboram outros estudos (Nawate et al., 2005; Knowlton & Lee, 2012), nos quais a expressão proteica da iNOS está elevada em animais submetidos a ovariectomia. Sobre a atorvastatina, poucos estudos foram realizados a fim de elucidar a ação dessa droga sobre a expressão proteica da iNOS e tampouco sua relação com a reatividade vascular. Assim, avaliamos a expressão proteica da iNOS nos ramos mesentéricos bem como nos animais que receberam os tratamentos. Os resultados obtidos pela técnica de *western blot* somam-se aos dados funcionais, mostrando um aumento da expressão proteica da iNOS nas fêmeas ovariectomizadas, enquanto que o 17 β -estradiol e a

atorvastatina foram capazes de restaurar os níveis dessas proteínas àqueles semelhantes ao grupo SHAM. Assim como o estrogênio, que reduz a expressão da iNOS em diversos modelos animais (Nawate et al., 2005; Cau et al., 2012), as estatinas também têm se mostrado capazes de reduzir a expressão da iNOS no endotélio e camada média de pequenos vasos, mas não em células musculares de aorta (Wagner et al., 2002).

Embora o NO tenha sido considerado como principal mediador do relaxamento dependente do endotélio, neste trabalho também mostramos que o EDHF pode ser um importante regulador do tônus e da reatividade vascular, especialmente em vasos de resistência (Woodman et al., 2000). Apesar do perfil distinto de atividade que é conferido a cada um dos fatores de relaxamento endoteliais, existem claras evidências demonstrando existir uma inter-relação complexa, porém bem integrada, entre esses mediadores, de tal modo a garantir a manutenção da homeostase vascular (Villar et al., 2006).

Sabe-se que uma das vias de vasodilatação relacionadas ao EDHF pode envolver o citocromo P450 e os EETs dele derivados que, geralmente, se comportam como agentes vasodilatadores difusíveis ou como segundos mensageiros intracelulares endoteliais (Félétou e Vanhoutte, 2009). Mediante essas considerações, uma das formas de se avaliar a participação do EDHF como componente da resposta relaxante nos grupos estudados foi por meio da construção de curvas doses-resposta a ACh na presença de clotrimazol, um inibidor inespecífico para o citocromo P450.

A incubação com Clotrimazol reduziu e igualou a resposta vasodilatadora em todos os grupos experimentais, ao se comparar com a resposta obtida na curva controle. Contudo, diferentemente do observado com o bloqueio com L-NAME, a magnitude da resposta acessada por meio da % dAUC foi semelhante entre os grupos, suportando a hipótese que a dependência desse fator na resposta de relaxamento não era diferente entre o grupo OVX e os demais grupos. Adicionalmente, a incubação conjunta de L-NAME com Indometacina no leito mesentérico, outra forma de se avaliar a participação do EDHF na resposta vascular nos grupos experimentais, também não mostrou diferença nas respostas de relaxamento.

O papel do EDHF atuando como importante fator de relaxamento em fêmeas ovariectomizadas, em vasos de resistência, já foi descrito anteriormente. Estudos realizados por Sakuma e colaboradores (2002) e Nawate e colaboradores (2005) em anéis de artéria mesentérica mostram uma menor resposta ao EDHF em fêmeas ovariectomizadas, também avaliada por meio do bloqueio conjunto com L-NAME e Indometacina, cuja resposta foi restaurada após o tratamento destes animais com 17β -estradiol. Outro estudo no mesmo segmento vascular, contudo, mostra o procedimento de ovariectomia influenciando a resposta vasorrelaxante atribuída ao EDHF, sem promover alterações no relaxamento mediado por NO (Liu et al., 2002). Mas, não podemos descartar totalmente a alteração na via do EDHF, visto que outras fontes de EDHF são encontradas nos vasos (Félétou e Vanhoutte, 2009; Shimokawa, 2010), além das investigadas por nosso estudo. Em relação à atorvastatina, esta parece corrigir a resposta de relaxamento nas fêmeas ovariectomizadas sem atuar sobre o componente EDHF, enquanto que apresenta importante participação na reversão do prejuízo de resposta mediada pelo NO. Adicionalmente, se ressalta que o calibre do vaso avaliado influencia na resposta mediada pelo EDHF. Hilgers e colaboradores (2006) mostraram em seu estudo uma heterogeneidade na modulação da resposta mediada pelo EDHF, na qual artérias mesentéricas de pequeno calibre apresentam respostas aumentadas aos canais de K^+_{Ca} de pequena e intermediária condutância quando comparadas as artérias mesentéricas de largo calibre. De fato, nossos dados foram obtidos se avaliando o leito mesentérico como um todo, no qual estão presentes segmentos de pequeno, médio e grande resistência, o que em parte, poderia explicar nossos achados.

Outro importante componente envolvido na disfunção endotelial, além dos mecanismos citados anteriormente, se relaciona a liberação dos prostanóides derivados da via da COX, uma vez que esses metabólitos podem modular alguns efeitos no sistema vascular como vasodilatação (como PGI_2 , PGE_2) ou vasoconstrição (PGH_2 e TXA_2) (Grizzo et al., 2008; Silveira et al., 2010). A manutenção de um balanço entre PGI_2 e TXA_2 tem importante papel na manutenção da homeostase vascular, e distúrbios desse equilíbrio podem ocorrer em determinadas doenças (Moncada & Higgs, 2006), bem como sofrer influência do estado de privação estrogênica (Dantas et al., 1999; Dantas et al., 2004). Neste estudo avaliamos a participação desta via na vasodilatação mediada pela ACh, por

meio do bloqueio com L-NAME associado a indometacina, porém nossos dados demonstraram que este fármaco não alterou o relaxamento em todos os grupos experimentais, quando comparado a curva obtida por meio do bloqueio com L-NAME. A análise da % dAUC também não indicou diferença na resposta entre as fêmeas ovariectomizadas e tratadas, sugerindo que alterações na geração e/ou equilíbrio entre os prostanóides derivados do ácido araquidônico não estão envolvidas nas respostas vasculares a ACh no leito mesentérico e que a atorvastatina parece não exercer efeito sobre essa via.

A fim de melhor elucidar os mecanismos vasculares relacionados à via da COX, realizamos a expressão proteica da COX-2, uma vez que uma maior expressão dessa enzima pode contribuir para um aumento da reatividade a vasoconstritores (Félétou e Vanhoutte, 2009; Novella et al., 2011) e, por ser uma enzima pró-inflamatória, poderia estar aumentada no modelo animal de privação estrogênica. Entretanto, nossos achados não demonstraram diferença na expressão dessa proteína entre os grupos, similar aos resultados de Yuan e colaboradores (2012), que indicaram o estradiol aumentando a produção de PGI₂ via COX-1, sem afetar a expressão de COX-2 em células endoteliais de veias umbilicais humanas. Viridis e colaboradores (2009) também demonstraram que a atorvastatina não interfere na expressão dessa enzima em animais normotensos.

Em contraposição aos nossos dados, Dantas e colaboradores (2004) mostraram que a ovariectomia conduz ao aumento de prostanóides vasoconstritores que podem participar do prejuízo de resposta vasodilatadora dependente do endotélio. No entanto, os resultados deste estudo foram realizados em fêmeas hipertensas e utilizaram diclofenaco de sódio como agente inibitório da síntese de prostanóides, o que poderia, em parte, esclarecer a divergência de resultados encontrados entre esse estudo e o os descritos por nós.

As mudanças vasculares observadas nas fêmeas ovariectomizadas que culminaram em disfunção endotelial se relacionam principalmente a via do NO, uma vez que, não observamos diferenças entre os grupos no relaxamento mediado por EDHF, e a participação de prostanóides foi pouco significativa. Contudo, os mecanismos relacionados às alterações vasculares mediadas pela privação estrogênica são complexos e envolvem múltiplas vias e fatores, como o estresse oxidativo.

O estresse oxidativo pode interferir na reatividade vascular por diferentes mecanismos. A disfunção endotelial causada pela redução da biodisponibilidade do NO e/ou elevada formação de EROs na parede vascular estão relacionadas ao desenvolvimento de complicações cardiovasculares (Yung et al., 2011; Fleenor et al., 2011), demonstrado na figura 24. Além disso, maiores concentrações de NO geradas a partir da iNOS podem reagir com EROs para produzir peroxinitrito, o que facilita a instalação de um estado pró-oxidante e aumenta o tônus vasoconstritor nas artérias (Cau et al., 2012).

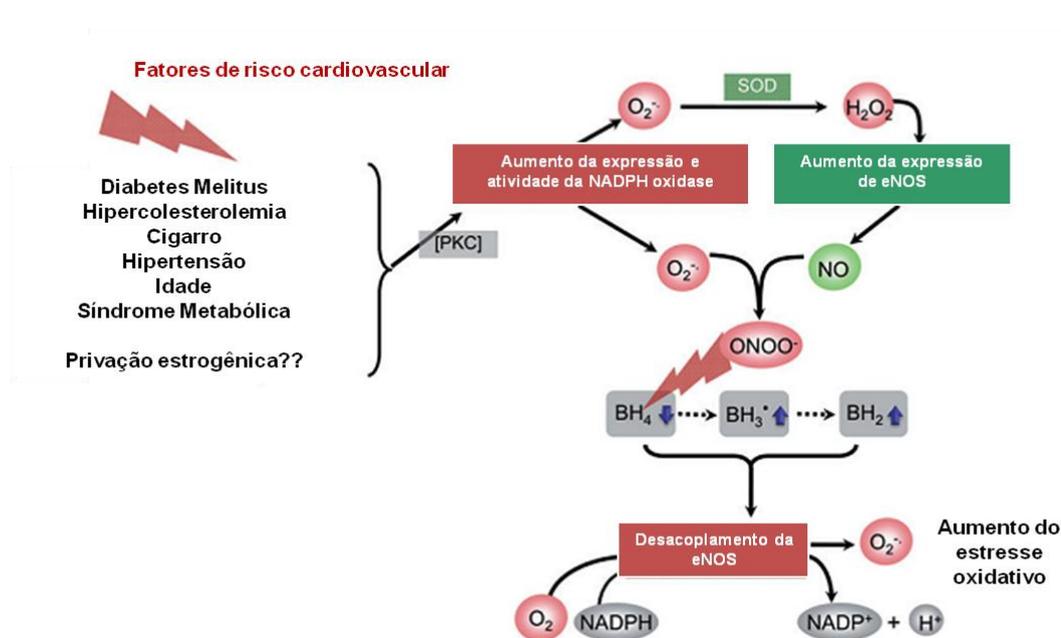


Figura 24: Potenciais mecanismos pelos quais os fatores de risco para doenças cardiovasculares levam ao desacoplamento da eNOS e disfunção endotelial. Em muitos tipos de doença vascular NAD(P)H oxidase está super regulada e gera superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que pode ser dismutado pela SOD (superóxido dismutase), resultando em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que aumenta a expressão da eNOS. A oxidação da tetrahydrobiopterina (BH_4) pelo peróxido nitrito ($ONOO^{\cdot-}$) leva ao desacoplamento da eNOS, gerando $O_2^{\cdot-}$ que contribui para o estresse oxidativo (Modificado de Förstermann & Li, 2011).

Levando-se em consideração que o estresse oxidativo tem papel importante na disfunção endotelial presente em modelos de fêmeas ovariectomizadas (Florian et al., 2004; Kang et al., 2011) e que o tratamento desses animais com antioxidantes pode restaurar a dilatação dependente do endotélio (Cau et al., 2012), assim como a reposição com estradiol (Lee et al., 2005), resolvemos avaliar a influência da

ovariectomia sobre a produção de EROs e o papel do 17β -estradiol e da atorvastatina sobre essa produção no leito vascular mesentérico.

Devido ao potencial antioxidante do ácido ascórbico, avaliamos a resposta vasodilatadora a ACh nos grupos experimentais na presença deste inibidor, entretanto, as diferenças nas respostas de relaxamento obtidas com este bloqueio não foram diferentes daquelas observadas nas curvas controle, mostrando que este anti-oxidante é pouco sensível aos níveis de EROs produzidas no leito vascular mesentérico. De fato, o ácido ascórbico atuando na inativação de ânions superóxido e outras EROs já foi proposto por outros estudos (Ajay et al., 2006a; Ajay et al., 2006b), que apontaram uma melhora na vasodilatação dependente do endotélio em anéis de aorta de machos hipertensos ou diabéticos.

Apesar dos resultados obtidos no bloqueio com ácido ascórbico, evidências apontam para uma geração de EROs aumentada em modelos de disfunção endotelial (Ray & Shah, 2005). Nesse sentido, investigamos a participação dos ânions superóxidos gerados a partir da NADP(H) oxidase, cujos complexos constituem a maior fonte de EROs na parede do vaso e podem transferir elétrons através da membrana até o oxigênio para produzir O_2^- e H_2O_2 (Muller & Morawietz, 2009; Förstermann, 2010). Dentre os inibidores da NADP(H) oxidase, Hamilton e colaboradores (2002) demonstraram que a apocinina foi o composto com maior potencial para reduzir a produção de O_2^- . Deste modo, esta droga foi utilizada para avaliar a via dos radicais livres nas fêmeas ovariectomizadas e tratadas com 17β -estradiol ou atorvastatina.

O presente estudo mostrou que a apocinina reduziu a resposta de relaxamento do leito mesentérico no grupo OVX, enquanto que os animais tratados com 17β -estradiol ou atorvastatina tiveram a resposta vasodilatadora da ACh reduzida parcialmente por este bloqueador. No entanto, no grupo SHAM a apocinina não alterou a reatividade vascular, quando comparada a curva controle. Nossos dados diferem de outros descritos na literatura, nos quais o uso do inibidor da NADP(H) oxidase promove um aumento na resposta vasodilatadora em animais com disfunção endotelial, uma vez que reduz a produção de EROs e/ou aumenta a disponibilidade de NO (Camporez et al., 2011; Yung et al., 2011; Xie et al., 2012).

Os efeitos antioxidantes do estrogênio foram descritos em doses fisiológicas ou supra fisiológicas (Lee et al., 2005), bem como sua deficiência resultando em aumento da produção de radicais livres vasculares em animais hipertensos (Wassmann et al., 2001b). O papel antioxidante das estatinas também foi reportado, como a capacidade da sinvastatina em reduzir a produção de EROs em células osteoblásticas (Yin et al., 2012) e da própria atorvastatina em reduzir a produção de EROs em células do músculo liso vascular (Wassmann et al., 2002) e os níveis de ânions superóxido da aorta de SHR (Wingler et al., 2011). A ação das estatinas sobre a NAD(P)H oxidase se dá por meio da inibição da translocação da Rac, que é um importante componente da ativação de algumas formas da NOX, até a membrana celular, resultando na inibição da NAD(P)H. Esse fenômeno pode explicar alguns dos efeitos pleiotrópicos, colesterol independentes, dessas drogas (Jasińska et al., 2007; Mennickent et al., 2008; Cau et al., 2012).

Esses achados da literatura podem indicar a diferença de resposta de relaxamento observada entre as fêmeas ovariectomizadas e os que receberam tratamento, entretanto a redução da vasodilatação no leito mesentérico após o bloqueio com apocinina ainda é contraditória. Nossos dados corroboram com Trott e colaboradores (2011), que realizaram estudo em artérias do músculo sóleo em ratos Fischer machos e observaram que, nestes animais jovens, a dilatação mediada pela ACh está prejudicada na presença de apocinina, enquanto em animais idosos, a resposta de relaxamento é aumentada em relação ao controle. Porém a inibição da produção de EROs ou captura de O_2^- podem atenuar a resposta de relaxamento em alguns leitos vasculares de resistência, em especial por reduzir H_2O_2 (Trott et al., 2011; Wingler et al., 2011; Cau et al., 2012).

O peróxido de hidrogênio pode ser gerado pela captura de O_2^- pela SOD, dismutação espontânea do O_2^- ou diretamente pela NAD(P)H oxidase e tem sido relatado em alguns estudos como vasodilatador na em células vasculares (Opitz et al., 2007; Kang et al., 2009). De fato, estudos apontam para o H_2O_2 como possível EDHF em microvassos (Miura et al., 2003; Shimokawa, 2010). Como este é um importante fator de relaxamento dos vasos mesentéricos, o bloqueio com apocinina poderia ter dupla ação na resposta à ACh, aumentando a biodisponibilidade de NO por reduzir sua degradação pelo estresse oxidativo (Youn et al., 2012), e ao mesmo

tempo abolindo o relaxamento via H_2O_2 derivado da NADPH oxidase (Xie et al., 2012). O balanço final desses efeitos na resposta no LVM, em que predominam vasos de resistência, poderia levar a diminuição do relaxamento pela retirada do H_2O_2 atuando como EDHF.

Os mecanismos de reatividade vascular relacionados a resposta de relaxamento apontam para a participação da NAD(P)H oxidase, uma vez que a expressão proteica da gp91phox nos ramos mesentéricos, bem como, a fluorescência emitida pelo dihidroetídeo na artéria mesentérica, que demonstra os níveis de EROs produzidos, se encontram elevados no grupo OVX, enquanto que os animais que receberam 17β -estradiol e atorvastatina foram capazes de reverter esse estado oxidante dos vasos.

Em acordo com os resultados acima, Yung e colaboradores (2011) e Camporez e colaboradores (2011) documentaram a maior expressão das subunidades gp91phox e p22phox do complexo NAD(P)H oxidase na aorta torácica de fêmeas ovariectomizadas, enquanto este último estudo também apontou, por meio da fluorescência emitida pelo DHE, uma maior produção de EROs na aorta dos animais OVX. Quanto a atorvastatina, o papel antioxidante desta foi descrito por Wassmann e colaboradores (2002), que relataram pela técnica de *Northern Blot* uma menor expressão no RNA da p22phox em células endoteliais após incubação por 24 horas com atorvastatina e Wassmann et al (2001b), que também demonstraram uma menor expressão da subunidade p22phox na aorta de machos SHR tratados com atorvastatina. Contudo, os resultados desse estudo apontam, pela primeira vez, que a atorvastatina é capaz de reduzir o estresse oxidativo em fêmeas ovariectomizadas por meio de mecanismos relacionados a expressão proteica da NAD(P)H oxidase e menor produção de EROs.

Somando-se a esta discussão, que envolve os efeitos da atorvastatina sobre fatores de relaxamento endoteliais em fêmeas ovariectomizadas, pode-se especular que esta droga ao normalizar a reatividade vascular em um modelo de disfunção endotelial com possível quadro inflamatório, indicado pelo aumento de citocinas e enzimas inflamatórias (Vila e Salaices, 2005; Arenas et al., 2005; Ma & Lai, 2012), poderia exercer também efeitos anti-inflamatórios sobre as células vasculares

As estatinas têm sido descritas como drogas pleiotrópicas com ações anti-inflamatórias, sendo capazes de reduzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão em células endoteliais (Wagner et al., 2002; Sun et al., 2009), promover a redução da expressão de iNOS na camada média e endotélio de microvassos (Ye et al., 2008), reduzir o estado oxidante vascular (Wassmann et al., 2002) e atuar sobre fatores de transcrição, como PPARs, envolvidos na expressão gênica de moléculas do metabolismo lipídico (Mennickent et al., 2008) e NF-κB, envolvido na transcrição de moléculas inflamatórias (Ye et al., 2008; Mandosi et al., 2010).

Estudos mostram que no início dos processos inflamatórios as respostas imunológicas são reguladas pelo NF-κB, importante fator de transcrição induzível e que também apresenta um papel central na resposta de estresse celular (Liu & Malik, 2006; Mohamed & McFadden, 2009; Vlantis & Pasparakis, 2010). Desse modo, a avaliação dos níveis proteicos desse fator de transcrição se fez condizente com os demais achados deste estudo.

Nosso estudo mostrou, de forma inédita, que os níveis proteicos do NF-κB se encontram elevados no leito vascular mesentérico de fêmeas ovariectomizadas, e que o 17β-estradiol não alterou os resultados observados no grupo OVX. Por sua vez, a atorvastatina foi capaz de reduzir esse fator nesses animais. Até nosso conhecimento, a influência da ovariectomia sobre o NF-κB só foi demonstrado por Stice e colaboradores (2011), que indicaram uma ativação desse fator nos cardiomiócitos de fêmeas ovariectomizadas. Adicionalmente, o estrogênio pode reduzir a atividade do NF-κB em algumas linhas celulares, como HeLa, HEP-G2 e MCF-7 (Kalaitzidis & Gilmore, 2005), ou aumentar a atividade em células endoteliais, cardiomiócitos e células T (Hamilton et al., 2004; Kou et al., 2011).

É importante destacar que evidências imunológicas 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 anti-inflamatórias dos estrógenos, dependendo de diversos fatores, tais como, o tipo de célula-alvo, tempo e concentração de estrogênio administrado, e na variabilidade da expressão de receptores de estrogênio em células específicas (Xing et al., 2009).

As ações anti-inflamatórias do estrogênio são sustentadas, por exemplo, por estudos que mostram a regulação de genes anti-inflamatórios pelo estradiol (Ghisletti et al., 2005; Xing et al., 2009). Porém, o estrogênio também está envolvido na inflamação. Estudos indicam 17β -estradiol aumentando a secreção de matrix metaloproteinases (Kawasaki et al., 2000) e aumentando os níveis de IL- 1β e IL-6 (Kou et al., 2011). De fato, os níveis de citocinas inflamatórias já foram descritos na literatura sofrendo aumento (Medeiros et al., 2012) ou diminuição com a ovariectomia (Dalpiaz et al., 2012).

Caso esses resultados experimentais em animais sejam confirmados em mulheres na fase pós-menopausa, apontando uma maior expressão do NF- κ B em modelo de deficiência estrogênica, sem alteração pelo tratamento com 17β -estradiol, esse poderia ser um dos mecanismos, pelos quais, em algumas mulheres em uso de TRH, foram observado aumento de DCV, apesar do restabelecimento de vários fatores endoteliais responsáveis pela homeostase vascular.

A atorvastatina, nesse sentido, poderia ser apontada para a utilização nestas mulheres, que apresentam índices elevados de doença cardiovascular associados ou não a hipercolesterolemia. A atorvastatina, além de seu mecanismo anti-inflamatório, também indicado por outros estudos em diferentes modelos animais (Jasińska et al., 2007; Ye et al., 2008; Calisto et al., 2010), mostrou ser uma droga capaz de reverter os mecanismos de disfunção de relaxamento endotelial em animais com deficiência estrogênica, bem como reduzir o estresse oxidativo nesse modelo animal, conforme podemos observar na figura 25, que resume os efeitos do tratamento com atorvastatina nas fêmeas ovariectomizadas.

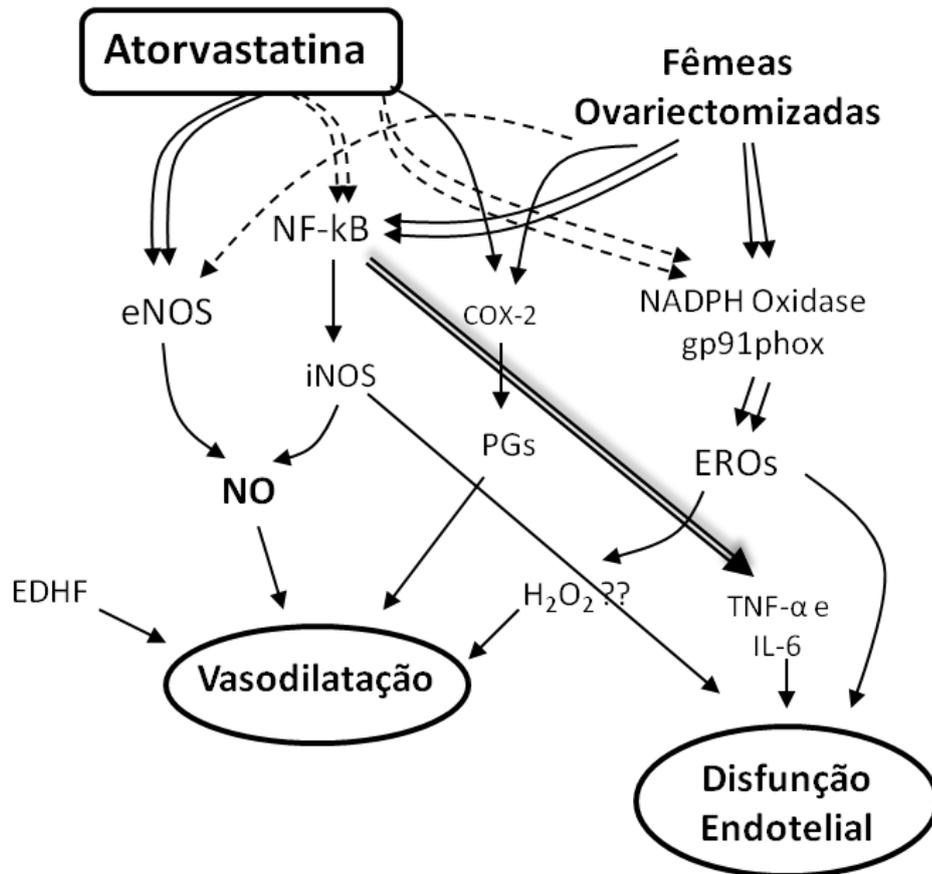


Figura 25: Diagrama esquemático mostrando os mecanismos propostos para a disfunção de relaxamento endotelial no leito vascular mesentérico de fêmeas ovariectomizadas e a normalização dos efeitos pela atorvastatina. inibição da via, estimulação da via. Setas duplas indicam maior estimulação ou inibição. O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) está apontado como possível espécie reativa de oxigênio (ERO) que contribui para a vasodilatação. O NF-kB é apontado como possível mediador da disfunção endotelial, ao estar envolvido com importantes mecanismos que levam ao prejuízo de relaxamento nas fêmeas ovariectomizadas, como as EROs, iNOS e citocinas inflamatórias (TNF-α e IL-6).

6 CONCLUSÕES

A deficiência estrogênica, obtida por meio do procedimento de ovariectomia, induz a alterações na função endotelial do leito vascular mesentérico, relacionadas, principalmente a via do NO, bem como aumento de estresse oxidativo. Nesse modelo experimental, a atorvastatina, semelhante ao estrogênio, foi capaz de reverter o prejuízo de relaxamento a acetilcolina, atuando sobre as vias do NO, aumentando a expressão de eNOS, reduzindo a de iNOS e diminuindo a geração de espécies reativas do oxigênio, em especial as relacionadas ao complexo NAD(P)H oxidase. Por outro lado, a resposta endotelial vasodilatadora regulada por outros fatores relaxantes do endotélio, como os prostanóides derivados da COX ou o EDHF, parece não apresentar alterações nas fêmeas ovariectomizadas nem sofrer influência da atorvastatina ou do 17 β -estradiol.

Somam-se a estes resultados, o aumento da expressão proteica do NF-kB nas fêmeas ovariectomizadas, o que poderia levar ao aumento de citocinas e enzimas inflamatórias nesses animais. No entanto, a TRH com o 17 β -estradiol não foi capaz de reduzir a concentração desse fator nos ramos mesentéricos, enquanto que a atorvastatina, além dos efeitos positivos sobre os fatores de relaxamento endoteliais, mostrou ser uma droga com possíveis ações anti-inflamatórias em fêmeas com deficiência estrogênica, sem promover alterações n de colesterol ou peso desses animais.

Sumariando, estes resultados evidenciam de modo ainda não descrito na literatura, os mecanismos pelos quais a atorvastatina promove o ajuste da reatividade vascular em fêmeas ovariectomizadas, ao normalizar os fatores de relaxamento derivados do endotélio, bem como seu papel antioxidante e anti-inflamatório vascular nesse modelo experimental. Destacamos deste modo, uma possível opção para a prevenção de DCV em fêmeas com deficiência estrogênica, ou seja, um tratamento alternativo às clássicas TRH, cujo alvo não seja os receptores de estrogênio.

7 REFERÊNCIAS

Ajay M, Achike FI, Mustafa AM, Mustafa MR. Direct effects of quercetin on impaired reactivity of spontaneously hypertensive rat aortae: comparative study with ascorbic acid. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2006a; 33: 345–350.

Ajay M, Mustafa MR. Effects of ascorbic acid on impaired vascular reactivity in aortas isolated from age-matched hypertensive and diabetic rats. *Vascular Pharmacology*. 2006b; 45: 127–133.

Arenas IA, Armstrong SJ, Xu Y, Davidge ST. Chronic Tumor Necrosis Factor- α Inhibition Enhances NO Modulation of Vascular Function in Estrogen-Deficient Rats. *Hypertension*. 2005; 46: 76-81.

Arpino G, Wiechmann L, Osborne CK, Schiff R. Crosstalk between the estrogen receptor and the HER tyrosine kinase receptor family: molecular mechanism and clinical implications for endocrine therapy resistance. *Endocr Rev*. 2008; 29(2): 217-33.

Barrett-Connor E, Mosca L, Collins P, Geiger MJ, Grady D, Kornitzer M, McNabb MA, Wenger NK. Effects of raloxifene on cardiovascular events and breast cancer in postmenopausal women. *N Engl J Med*. 2006; 355(2): 125-37.

Barton M, Meyer MR, Prossnitz ER. Estrogen-Independent Activation of Estrogen Receptors. *Hypertension*. 2011; 57: 1056-1057.

Becker JB, Arnold AP, Berkley KJ, Blaustein JD, Eckel LA, Hampson E, Herman JP, Marts S, Sadee W, Steiner M, Taylor J, Young E. Strategies and methods for research on sex differences in brain and behavior. *Endocrinology*. 2005; 146(4): 1650-73.

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

Beral V. Breast cancer and hormone replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet*. 2003; 362: 419-27.

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

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

Briones AM, Rodríguez-Criado N, Hernanz R, García-Redondo AB, Rodrigues-Díez RR, Alonso MJ, Egido J, Ruiz-Ortega M, Salaices M. Atorvastatin Prevents Angiotensin II–Induced Vascular Remodeling and Oxidative Stress. *Hypertension*. 2009; 54: 142-149.

Caliman IF; Lamas AZ, Medeiros ANS, Dalpiaz PLM, Rocha APB; Moyses MR; dos Reis AM; Bissoli NS. The tamoxifen, modulator of selective estrogen receptor, normalizes cytokines and atrial natriuretic peptide levels in ovariectomized rats. *In: VIII International Symposium Vasoactive Peptides*, 2011; Ouro Preto; Resumo: p. 69.

Calisto KL, Carvalho BM, Ropelle ER, Mittestainer FC, Camacho ACA, Guadagnini D, Carvalheira JBC, Saad MJA. Atorvastatin Improves Survival in Septic Rats: Effect on Tissue Inflammatory Pathway and on Insulin Signaling. *Plos one*. 2010; 5(12): e14232.

Camporez JPG, Akamine EH, Davel AP, Franci CR, Rossoni LV, Carvalho RO. Dehydroepiandrosterone protects against oxidative stress-induced endothelial dysfunction in ovariectomized rats. *J Physiol*. 2011; 10: 2585–2596.

Cau SBA, Carneiro FS, Tostes RC. Differential modulation of nitric oxide synthases in aging: therapeutic opportunities. *Frontiers in Physiology*. 2012; 3(218): 1-11

Chakrabarti S, Lekontseva O, Davidge ST. Estrogen is a Modulator of Vascular Inflammation. *IUBMB Life*. 2008; 60(6): 376–382.

Chatterjee A & Catravas JD. Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. *Vascular Pharmacology*. 2008; 49: 134-140.

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

Chen Y, Ross BM, Currie RW. Heat shock treatment protects against angiotensin II–induced hypertension and inflammation in aorta. *Cell Stress & Chaperones.* 2004; 9(1): 99–107.

Chen C, Korshunov VA, Massett MP, Yan C, Berk BC. Impaired Vasorelaxation in Inbred Mice Is Associated with Alterations in Both Nitric Oxide and Super Oxide Pathways. *Vasc Res.* 2007; 44: 504 - 12.

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

Cummings SR, Ettinger B, Delmas PD, et al. The effects of tibolone in older postmenopausal women. *N Engl J Med.* 2008; 359: 697-708.

Cutini PH, Campelo AE, Agriello E, Sandoval MJ, Rauschemberger MB, Massheimer VL. The role of sex steroids on cellular events involved in vascular disease. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology.* 2012; 132: 322–330.

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

Dalpiaz PLM, Lamas AZ, Caliman IF, Medeiros ARS, Abreu GR, Moysés MR, Andrade TU, Alves MF, Carmona AK, Bissoli NS. The chronic blockade of Angiotensin I-converting enzyme eliminates sex differences observed in serum cytokine levels of spontaneously hypertensive rats. *B. Jour. Med. Biol. Research.* 2012. In press.

Dantas APV, Scivoletto R, Fortes ZB, Nigro D, Carvalho MHC. Prostanoid Generation in Microvessels of Spontaneously Hypertensive Rats Influence of Female Sex Hormones on Endothelium-Derived Vasoconstrictor. *Hipertension.* 1999; 34: 914-919.

Dantas APV, Franco MCP, Tostes RCA, Fortes ZB, Costa SG, Nigro D, Carvalho MHC. Relative Contribution of Estrogen Withdrawal and Gonadotropins Increase Secondary to Ovariectomy on Prostaglandin Generation in Mesenteric Microvessels. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004; 43: 48–55.

Davel APC, Fukuda LE, Sa LL, Munhoz CD, Scavone C, Sanz-Rosa D, Cachofeiro V, Lahera V, Rossoni LV. Effects of isoproterenol treatment for 7 days on inflammatory mediators in the rat aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008; 295: H211–H219.

Davidge ST & Zhang Y. Estrogen Replacement Suppresses a Prostaglandin H Synthase–Dependent Vasoconstrictor in Rat Mesenteric Arteries. *Circ Res.* 1998; 83: 388-395.

Donato AJ, Pierce GL, Lesniewski LA, Seals DR. Role of NFκB in age-related vascular endothelial dysfunction in humans. *Aging.* 2009; 1(8): 678-680.

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

Féléto M & Vanhoutte PM. EDHF: an update. *Clinical Science.* 2009; 117: 139–155.

Feng B, Xu L, Wang H, Yan X, Xue J, Liu F, Hu JF. Atorvastatin exerts its anti-atherosclerotic effects by targeting the receptor for advanced glycation end products. *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1812(9): 1130-7.

Fleenor BS, SealsDR, Zigler ML, Sindler AL. Superoxide-lowering therapy with Tempol reverses arterial dysfunction with aging in mice. *Aging Cell.* 2011; 11: 269–276.

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

Förstermann U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Arch - Eur J Physiol.* 2010; 459: 923–939.

Förstermann U & Li H. Therapeutic effect of enhancing endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and preventing eNOS uncoupling. *British Journal of Pharmacology*. 2011; 164: 213–223.

Furchgott RF & Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and constricting factors. *FASEB Journal*. 1989; 3: 2007-2018.

Ghisletti S, Meda C, Maggi A, Vegeto E. 17 β -Estradiol Inhibits Inflammatory Gene Expression by Controlling NF κ B Intracellular Localization. *Molecular and cellular biology*. 2005, 25(8): 2957–2968.

Ghosh S & Hayden MS. New regulators of NF- κ B in inflammation. *Nature reviews immunology*. 2008; 8: 837-848.

Golding EM & Kepler TE. Role of estrogen in modulating EDHF-mediated dilations in female rat middle artery. *Am J Phys*. 2001; 280(6): H2417-23.

Gomes HL, Graceli JB, Gonçalves WLS, Santos RL, Abreu GR, Bissoli NS, Pires JGP, Cicilini MA, Moysés MR. Influence of gender and estrous cycle on plasma and renal catecholamine levels in rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol*. 2012; 90: 75–82.

Gompel A, Boutouyrie P, Joannides R, Christin-Maitre S, Kearny-Schwartz A, Kunz K, Laurent S, Boivin JM, Pannier B, Pornel B, Struijker-Boudier HAJ, Thuillez C, Bortel LV, Zannad F, Pithois-Merli I, Jaillon P, Simon T. Association of menopause and hormone replacement therapy with large artery remodeling. *Fertility and Sterility*. 2011; 96(6): 1445-50.

Görlach A, Brandes RP, Nguyen K, Amidi M, Dehghani F, Busse R. A gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall. *Circ Res*. 2000; 87(1): 26-32.

Grizzo LT, Cordelline S. Perinatal exposure affects nitric oxide and cyclooxygenase pathways in aorta of weaned rats. *Toxicological sciences* . 2008; (1): 207-214.

Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature*. 1986; 320(6061): 454-6.

Hamilton CA, Brosnam MJ, Al-Benna S, Berg G, Dominiczack AF. NAD(P)H oxidase inhibition improves endothelial function in rat and human blood vessels. *Hypertension*. 2002; 40: 755-762.

Hamilton KL, Gupta S, Knowlton AA. Estrogen and regulation of heat shock protein expression in female cardiomyocytes: cross-talk with NFkB signaling. *J Mol Cell Cardiol*. 2004; 36: 577–84.

Hassan HA & Wahhab MAA. Effect of soybean oil on atherogenic metabolic risks associated with estrogen deficiency in ovariectomized rats. *J Physiol Biochem*. 2012; 68: 247–253.

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

Hilgers RHP, Todd J, Webb RC. Regional heterogeneity in acetylcholine-induced relaxation in rat vascular bed: role of calcium-activated K⁺ channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006; 291: H216–H222.

Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Ringgs B, Vittinghoff E. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin replacement study (HERS) Research group. *JAMA*. 1998; 280: 605–613.

Jasińska M, Owczarek J, Michalak DO. Statins: a new insight into their mechanisms of action and consequent pleiotropic effects. *Pharmacological Reports*. 2007; 59: 483-499.

Jun SS, Chen Z, Pace MC, Shaul PW. Estrogen up regulates cyclo-oxygenase-1 gene expression in ovine fetal pulmonary artery endothelium. *J Clin Invest.* 1998; 102(1): 176-83.

Kalaitzidis D & Gilmore TD. Transcription factor cross-talk: the estrogen receptor and NF- κ B. *Trends Endocrinol Metab.* 2005; 16: 46–52.

Kang LS, Reyes RA, Muller-Delp JM. Aging impairs flow-induced dilation in coronary arterioles: role of NO and H₂O₂. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009; 297: H1087–H1095.

Kang LS, Chen B, Reyes RA, LeBlanc AJ, Teng B, Jamal S, Muller-Delp JM. Aging and estrogen alter endothelial reactivity to reactive oxygen species in coronary arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011; 300: H2105-H2115.

Kawasaki T, Ushiyama T, Inoue K, Hukuda S. Effects of estrogen on interleukin-6 production in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Clin Exp Rheumatol.* 2000; 18: 743–745.

Kim KH, Moriarty K, Bender JR. Vascular cell signaling by membrane estrogen receptors. *Steroids.* 2008; 73: 864-869.

Knowlton A.A & Lee AR. Estrogen and the cardiovascular system. *Pharmacology & Therapeutics.* 2012; 135: 54–70.

Koh KK. Effects of estrogen on the vascular wall: vasomotor function and inflammation. *Cardiovascular Research.* 2002; 55: 714–726.

Koh JM, Khang YH, Jung CH, Bae S, Kim DJ, Chung YE, Kim GS. Higher circulating hsCRP levels are associated with lower bone mineral density in healthy pre- and postmenopausal women: evidence for a link between systemic inflammation and osteoporosis. *Osteoporos Int.* 2005; 89: 735-742.

Kou XX, Wu YW, Ding Y, Hao T, Bi RY, Gan YH, Ma X. 17 β -Estradiol Aggravates Temporomandibular Joint Inflammation Through the NF- κ B Pathway in Ovariectomized Rats. *Arthritis & rheumatism.* 2011; 63: 1888–1897.

Kurumazuka D, Mori T, Matsumoto N, Shirakawa H, Kimura S, Nakaro D, Hayashi T, Kitaura Y, Matsumura Y. Gender difference of atorvastatin's vasoprotective effect in balloon-injured rat carotid arteries. *European Journal of Pharmacology*. 2006; 553: 263–268.

Kushner PJ, Agard DA, Greene GL, Scanlan TS, Shiau AK, Uht RM, Webb P. Estrogen receptor pathways to AP-1. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2000; 74(5): 311-7.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227: 680-685.

Lamas AZ; Caliman IF; Medeiros ARS; Dalpiaz PLM, Rocha APB; dos Reis AM; Bissoli NS. Evaluation of cardiovascular biomarkers in ovariectomized rats treated with estrogen or raloxifene. *In: VIII International Symposium Vasoactive Peptides*, 2011; Ouro Preto; Resumo: p. 68.

Lawrence T. The Nuclear Factor NF- κ B Pathway in Inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009; 1: a001651.

Lean JM, Jagger CJ, Kirstein B, Fuller K, Chambers TJ. Hydrogen Peroxide Is Essential for Estrogen-Deficiency Bone Loss and Osteoclast Formation. *Endocrinology*. 2005; 146(2): 728–735.

LeBlanc AJ, Reyes R, Kang LS, Dailey RA, Stallone JN, Moningka NC, Muller-Delp JM. Estrogen replacement restores flow-induced vasodilation in coronary arterioles of aged and ovariectomized rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009; 297: R1713–R1723.

Lee YM, Cheng PY, Hong SF, Chen Sy, Lam KK, Sheu JR, Yen MH. Oxidative stress induces vascular heme oxygenase-1 expression in ovariectomized rats. *Free Radical Biology & Medicine*. 2005; 39: 108– 117.

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

Leung HS, Leung FP, Yao X, Ko WH, Chen ZY, Vanhoutte PM, Huang Y. Endothelial mediators of the acetylcholine-induced relaxation of the rat femoral artery. *Vascul Pharmacol.* 2006; 44(5): 299-308.

Li X, Song QS, Wang JY, Leng HJ, Chen ZQ, Liu ZL, Dang GT, Song CL. Simvastatin induces estrogen receptor- α expression in bone, restores bone loss, and decreases ER α expression and uterine wet weight in ovariectomized rats. *J Bone Miner Metab.* 2011; 29: 396-403.

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

Liu D & Bachmann K. An Investigation of the Relationship Between Estrogen, Estrogen Metabolites and Blood Cholesterol Levels in Ovariectomized Rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics.* 1998; 286: 561–568.

Liu MY, Hattori Y, Fukao M, Sato A, Sakuma I, Kanno M. Alterations in EDHF-mediated hyperpolarization and relaxation in mesenteric arteries of female rats in long-term deficiency of oestrogen and during oestrus cycle. *British Journal of Pharmacology.* 2001; 132: 1035-1046.

Liu MY, Hattori Y, Sato A, Ichikawa R, Zhang XH, Sakuma I. Ovariectomy attenuates hyperpolarization and relaxation mediated by endothelium-derived hyperpolarizing factor in female rat mesenteric artery: a concomitant decrease in connexin-43 expression. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2002; 40(6): 938-48.

Liu SF & Malik AB. NF- κ B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006; 290: L622–L645.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951. 193:265-276.

Loyer X, Damy T, Chvojikova Z, Robidel E, Marotte F, Oliviero P, Heymes C, Samuel JL. 17 β Estradiol Regulates Constitutive Nitric Oxide Synthase Expression Differentially in the Myocardium in Response to Pressure Overload. *Endocrinology.* 2007; 148(10): 4579–4584.

Lucchesi PA, Belmadani S, Matrougui K. Hydrogen peroxide acts as both vasodilator and vasoconstrictor in the control of perfused mouse mesenteric resistance arteries. *J Hypertens*. 2005; 23(3): 571-9.

Ma Z & Lai L. The Anti-inflammatory Effect of Z-Ligustilide in Experimental Ovariectomized Osteopenic Rats. *Inflammation*. 2012 Jul 4. [Epub ahead of print]

Magness RR & Rosenfeld CR. Local and systemic estradiol-17 β : effects on uterine and systemic vasodilatation. *American Journal of Physiology*. 1989; 256: E536–E542.

Mandosi E, Fallarino M, Gatti A, Carnovale A, Rossetti M, Lococo E, Buchetti B, Filetti S, Lenti L, Morano S. Atorvastatin downregulates monocyte CD36 expression, nuclear NF κ B, and TNF- α levels in type 2 diabetes. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. 2010; 17(6): 539-454.

Manson JE, Hsia J, Johnson KC, Rossouw JE, Assaf AR, Lasser NL, Trevisan M, Black HR, Heckbert SR, Detrano R, Strickland OL, Wong ND, Crouse JR, Stein E, Cushman M. Women's Health Initiative Investigators. Estrogen plus progestin and the risk of coronary heart disease. *N Engl J Med*. 2003; 349: 523-534.

Maric-Bilkan C & Manigrasso MB. Differences in Hypertension: Contribution of the Renin–Angiotensin System. *Gen Med*. 2012; 9(4): 287-91.

Mc Gregor DD. The effect of sympathetic nerve stimulation on vasoconstrictor response in perfused mesenteric blood vessels of the rat. *Journal of Physiology*. 1965; 177: 21-30.

Medeiros AR, Lamas AZ, Caliman IF, Dalpiaz PL, Firmes LB, Abreu GR, Moysés MR, Lemos EM, Reis AM, Bissoli NS. Tibolone has anti-inflammatory effects in estrogen-deficient female rats on the natriuretic peptide system and TNF- α . *Regul Pept*. 2012; 179(1-3): 55-60.

Mendelsohn ME. Nongenomic, ER-Mediated Activation of Endothelial Nitric Oxide Synthase: How Does It Work? What Does It Mean?. *Circ Res*. 2000; 87: 956-960.

Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *The New England Journal of Medicine*. 1999; 340(23): 1801-1811.

Mennickent SC, Bravo MD, Calvo CM, Avello ML. Efectos pleiotrópicos de las estatinas. *Rev Méd Chile*. 2008; 136: 775-782.

Miura H, Bosnjak JJ, Ning G, Saito T, Miura M, Gutterman DD. Role for hydrogen peroxide in flow-induced dilation of human coronary arterioles. *Circ Res*. 2003; 92: e31–e40.

Mohamed MR & McFadden G. NFκB inhibitors: Strategies from poxviruses. *Cell Cycle*. 2009; 8(19): 3125-3132.

Moncada S & Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br. J. Pharmacol*. 2006; 147: S193-S201.

Moreau KL, Meditz A, Deane KD, Kohrt WM. Tetrahydrobiopterin improves endothelial function and decreases arterial stiffness in estrogen-deficient postmenopausal women. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012; 302(5): H1211-8.

Moysés MR, Barker LA, Cabral AM. Sex hormone modulation of serotonin-induced coronary vasodilation in isolated heart. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2001; 34 (7): 949–5.

Muehlfelder M, Loza PAA, Fritzscheier KH, Pelzer T. Both estrogen receptor subtypes, ERα and ERβ, prevent aldosterone-induced oxidative stress in VSMC via increased NADPH bioavailability. *Biochemical and Biophysical Research communications*. 2012; 423: 850–856.

Muller G & Morawietz H. Nitric Oxide, NAD(P)H Oxidase, and Atherosclerosis. *Antioxidants & redox signaling*. 2009; 11(7); 1711-1731.

Nachtigal P, Pospisilova N, Jamborova G, Pospechova K, Solichova D, Andrys C, Zdansky P, Micuda S, Semecky V. Atorvastatin has hypolipidemic and anti-inflammatory effects in apoE/LDLreceptor-double-knockout mice. *Life Sciences*. 2008; 82: 708–717

Nawate S, Fukao M, Sakuma I, Soma T, Nagai K, Takikawa O, Miwa S, Kitabatake A. Reciprocal changes in endothelium-derived hyperpolarizing factor- and nitric oxide-system in the mesenteric artery of adult female rats following ovariectomy. *British Journal of Pharmacology*. 2005; 144: 178–189.

Novella S, Dantas AP, Segarra G, Novensa L, Heras M, Hermenegildo C, Medina P. Aging enhances contraction to thromboxane A(2) in aorta from female senescence-accelerated mice. *Age (Dordr.)*. 2011; PMID: 2210-2320.

Onitilo AA, McCarty CA, Wilke RA, Glurich I, Engel JM, Flockhart DA, Nguyen A, Li L, Mi D, Skaar TC, Jin Y. Estrogen receptor genotype is associated with risk of venous thromboembolism during tamoxifen therapy. *Breast Cancer Res Treat*. 2009; 115(3): 643-50.

Opitz N, Drummond GR, Selemidis S, Meurer S, Schmidt HHHW. The 'A's and 'O's of NADPH oxidase regulation: A commentary on "Subcellular localization and function of alternatively spliced Nox1 isoforms". *Free Radical Biology & Medicine*. 2007; 42: 175–179.

Orshal JM & Khalil RA. Gender, sex hormones, and vascular tone. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004; 286: R233–R249.

Perez-Guerrero C, Sotomayor MA, Jimenez L, Herrera MD, Marhuenda E. Effects of Simvastatin on Endothelial Function After Chronic Inhibition of Nitric Oxide Synthase by L-NAME. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2003; 42: 204–210.

Perez-Torres I, Hafidi ME, Infante O, Banos G. Effects of sex hormone levels on aortic vascular reactivity and variables associated with the metabolic syndrome in sucrose-fed female rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol*. 2008; 86: 25-35.

Pinna C, Bolego C, Sanvito P, Pelosi V, Baetta R, Corsini A, Gaion RM, Cignarella A. Raloxifene Elicits Combined Rapid Vasorelaxation and Long-Term Anti-Inflammatory Actions in Rat Aorta. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006; 319(3): 1444-51.

Pinna C, Cignarella A, Sanvito P, Pelosi V, Bolego. . Prolonged Ovarian Hormone Deprivation Impairs the Protective Vascular Actions of Estrogen Receptor Agonists. *Hypertension*. 2008; 51: 1210-1217.

Prajapati B , Singhal M, Yashwant, Sharma GN, Gupta V. Role of NFkB in Various Immunological & Inflammatory Disorders. *International Journal of Toxicological and Pharmacological Research*. 2010; 2(1): 35-39.

Qiao X, McConnell KR, Khalil RA. Sex Steroids and Vascular Responses in Hypertension and Aging. *Gen Med*. 2008; 5 Suppl A:S46-64.

Rattmann YD. Mecanismos vasculares envolvidos nos efeitos vasculares da *Dicksonia sellowiana* (PRESL.) HOOK. 2009. 145f. Tese de doutorado em farmacologia. Universidade Federal do Paraná.

Ray R & Shah AM. NADPH oxidase and endothelial cell function. *Clin Sci*. 2005; 109(3): 217-26.

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

Rossoni LV, Wareing M, Wenceslau CF, Al-abri M, Cobb C, Austin C. Acute simvastatin increases endothelial nitric oxide synthase phosphorylation via AMP-activated protein kinase and reduces contractility of isolated rat mesenteric resistance arteries. *Clinical Science*. 2011; 121: 449–458.

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

Ruehlmann DO, Steinert JR, Valverde MA, Jacob R, Mann GE. Environmental estrogenic pollutants induce acute vascular relaxation by inhibiting L-type Ca²⁺ channels in smooth muscle cells. *FASEB J*. 1998; 12(7): 613-9.

Ryou SH, Kang MS, Kim KI, Kang HY, Kang JS. Effects of green tea or *Sasa quelpaertensis* bamboo leaves on plasma and liver lipids, erythrocyte Na efflux, and platelet aggregation in ovariectomized rats. *Nutrition Research and Practice (Nutr Res Pract)*. 2012; 6(2): 106-112.

Saberivand A, Karimi I, Becker LA, Moghaddam A, Azizi-Mahmoodjigh S, Yousefi M, Zavareh S. The effects of *Cannabis sativa* L. seed (hempseed) in the ovariectomized rat model of menopause. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2010; 32 (7): 467-7.

Sakuma I, Liu My, Sato A, Hayashi T, Iguchi a, Kitabatake A, Hattori Y. Endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation in mesenteric arteries of middle-aged rats: influence of oestrogen. *British Journal of Pharmacology*. 2002; 135.

Sare GM, Gray LJ, Bath PMW. Association between hormone replacement therapy and subsequent arterial and venous vascular events: a meta-analysis. *European Heart Journal*. 2008; 29: 2031–2041.

Sato M, Rippey MK, Bryant HU. Raloxifene, tamoxifen, nafoxidme, or estrogen effects on reproductive and nonreproductive tissues in ovariectomized rats. *FASEBJ*. 1996; 10: 905-912.

Savoia C & Schiffrin EL. Inflammation in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2006; 15: 152–158.

Shimokawa H. Hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Eur J Physiol*. 2010; 459: 915–922.

Shuto H, Tominaga K, Yamauchi A, Ikeda M, Kusaba K, Mitsunaga D, Hirabara Y, Egawa T, Takano Y, Kataoka Y. The statins fluvastatin and pravastatin exert anti-flushing effects by improving vasomotor dysfunction through nitric oxide-mediated mechanisms in ovariectomized animals. *European Journal of Pharmacology*. 2011; 651: 234–239.

Silveira EA, Lizardo JHF, Souza LP, Stefanon I, Vassalo DV. Acute lead-induced vasoconstriction in vascular beds of isolated perfused rat tails is endothelium-dependent. *Brazilian journal medical biological research*. 2010; 43(5): 492-499.

Stankevicius E, Kevelaitis E, Vainorius E, Simonsen U. Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors. *Medicina (Kaunas)*. 2003; 39(4): 333-341.

Starzec JJ & Berger DF. Effects of Stress and Ovariectomy on the Plasma Cholesterol, Serum Triglyceride, and Aortic Cholesterol Levels of Female Rats. *Physiology & Behavior*. 1986; 37: 99-104.

Stice JP & Knowlton AA. Estrogen, NFκB, and the Heat Shock Response *Mol Med*. 2008; 14(7-8): 517-27.

Stice JP, Chen L, Kim SC, Chen L, Tran AL, Liu TT, et al. 17β-estradiol, aging, inflammation and the stress response in the female heart. *Endocrinology*. 2011; 152: 1589–1598.

Straub RH. The Complex Role of Estrogens in Inflammation. *Endocrine Reviews*. 2007; 28(5): 521–574.

Suh JW, Choi DJ, Chang HJ, Cho YS, Youn TJ, Chae IH, Kim KI, Kim CH, Kim HS, Hee B, Park YB. HMG-CoA Reductase Inhibitor Improves Endothelial Dysfunction in Spontaneous Hypertensive Rats Via Down-regulation of Caveolin-1 and Activation of Endothelial Nitric Oxide Synthase. *J Korean Med Sci*. 2010; 25: 16-23.

Sun YM, Tian Y, Li X, Liu YY, Wang LF, Li J, Li ZQ, Pan W. Effect of atorvastatin on expression of IL-10 and TNF-alpha mRNA in myocardial ischemia–reperfusion injury in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009; 382: 336–340.

Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Mattei P, Sudano I, Bernini G, Pinto S, Salvetti A. Menopause Is Associated With Endothelial Dysfunction in Women. *Hypertension*. 1996; 28: 576-582.

Tiefenbacher CP, Friedrich S, Bleeke T, Vahl C, Chen X, Niroomand F. ACE inhibitors and statins acutely improve endothelial dysfunction of human coronary arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004; 286: H1425–H1432.

Trott DW, Seawright JW, Luttrell MJ, Woodman CR. NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species contribute to age-related impairments of endothelium-dependent dilation in rat soleus feed arteries. *J Appl Physiol.* 2011; 110: 1171–1180.

Tycinska AM, Janica J, Mroczko B, Musial WJ, Sawicki R, Sobkowicz B, Kaminski K, Lebkowska U, Szmitkowski M. Hypotensive effect of atorvastatin in hypertensive patients: the association among flow-mediated dilation, oxidative stress and endothelial dysfunction. *Arch Med Sci.* 2011; 7(6): 955-62.

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

Vila E & Salices M. Cytokines and vascular reactivity in resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005; 288: H1016–H1021.

Villar IC, Francis S, Webb A, Hobbs AJ, Ahluwalia A. Novel aspects of endothelium-dependent regulation of vascular tone. *Kidney Int.* 2006; 70; 5: 840-53.

Virdis A, Ghiadoni L, Pinto S, Lombardo M, Petraglia F, Gennazzani A, Buralli S, Taddei S, Salvetti A. Mechanisms responsible for endothelial dysfunction associated with acute estrogen deprivation in normotensive women. *Circulation.* 2000; 101(19): 2258-63.

Virdis A, Colucci R, Versari D, Ghisu N, Fornai M, Antonioli L, Duranti E, Daghini E, Giannarelli C, Blandizzi C, Taddei S, Tacca MD. Atorvastatin Prevents Endothelial Dysfunction in Mesenteric Arteries From Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension.* 2009; 53: 1008-1016.

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

Wagner AH, Schwabe O, Hecker M. Atorvastatin inhibition of cytokine-inducible nitric oxide synthase expression in native endothelial cells in situ. *British Journal of Pharmacology.* 2002; 136: 143 - 149.

Wan F & Lenardo MJ. The nuclear signaling of NF- κ B: current knowledge, new insights, and future perspectives. *Cell Research*. 2010; 20: 24-33.

Wang Y & Marsden PA. Nitric oxide synthases: gene structure and regulation. *Adv Pharmacol*. 1995; 34: 71-90.

Wang L, Szklo M, Folsom AR, Cook NR, Gapstur SM, Ouyang P. Endogenous sex hormones, blood pressure change, and risk of hypertension in postmenopausal women: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2012; 224: 228-234.

Wassmann S, Laufs U, Bäumer AT, Müller K, Ahlbory K, Linz W, Itter G, Rösen R, Böhm M, Nickenig G. HMG-CoA Reductase Inhibitors Improve Endothelial Dysfunction in Normocholesterolemic Hypertension via Reduced Production of Reactive Oxygen Species. *Hypertension*. 2001a; 37: 1450-1457.

Wassmann S, Baumer AT, Strehlow K, Eickels M, Grohe C, Ahlbory K, Rosen R, Bohm M, Nickenig G. Endothelial dysfunction and oxidative stress during estrogen deficiency in spontaneously hypertensive rats. *Circulation*. 2001b; 103: 435–441.

Wassmann S, Laufs U, Müller K, Konkol C, Ahlbory K, Bäumer AT, Linz W, Böhm M, Nickenig G. Cellular Antioxidant Effects of Atorvastatin In Vitro and In Vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002; 22: 300-305.

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

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

Wingler K, Hermans JJR, Schiffers P, Moens AL, Paul M, Schmidt HHHW. NOX1, 2, 4, 5: counting out oxidative stress. *British Journal of Pharmacology*. 2011; 164: 866–883.

Wong CM, Yao X, Au CL, Tsang SY, Fung KP, Laher I, Vanhoutte PM, Huang Y. Raloxifene prevents endothelial dysfunction in aging ovariectomized female rats. *Vascular Pharmacology*. 2006; 44: 290–298.

Woodman OL, Wongsawatkul O, Sobey CG. Contribution of nitric oxide, cyclic GMP and K⁺ channels to acetylcholine-induced dilatation of rat conduit and resistance arteries. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2000; 27(1-2): 34-40.

Wu F, Tyml K, Wilson JX. iNOS expression requires NADPH oxidase-dependent redox signaling in microvascular endothelial cells. *J Cell Physiol*. 2008; 217(1): 207–214.

Xie W, Parker JL, Heaps CL. Effect of exercise training on nitric oxide and superoxide/H₂O₂ signaling pathways in collateral-dependent porcine coronary arterioles. *J Appl Physiol*. 2012; 112(9):1546-55.

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

Xu JW, Xiang QL, Lin GP, Fu XD, Zhou KW, Jiang P, Zeng SH, Wang TH. Estrogen improved metabolic syndrome through down-regulation of VEGF and HIF-1a to inhibit hypoxia of periaortic and intra-abdominal fat in ovariectomized female rats. *Mol Biol Rep*. 2012; 39: 8177–8185.

Ye Y, Martinez JD, Perez-Polo RJ, Lin Y, Uretsky BF, Birnbaum Y. The role of eNOS, iNOS, and NF- κ B in upregulation and activation of cyclooxygenase-2 and infarct size reduction by atorvastatin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008; 295: H343–H351.

Yin H, Shi ZG, Yu YS, Hu J, Wang R, Luan ZP, Guo DH. Protection against osteoporosis by statins is linked to a reduction of oxidative stress and restoration of nitric oxide formation in aged and ovariectomized rats. *European Journal of Pharmacology*. 2012; 674: 200-206.

Youn JY, Wang T, Blair J, Laude KM, Oak JH, McCann LA, Harrison DG, Cai H. Endothelium-specific sepiapterin reductase deficiency in DOCA-salt hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012; 302(11): H2243-9.

Yuan P, Wu WH, Gao L, Zheng ZQ, Liu D, Mei HY, Zhang ZL, Jing ZC. Oestradiol ameliorates monocrotaline pulmonary hypertension via NO, PGI₂ and ET-1 pathways. *Eur Respir J*. 2012 Aug 30. [Epub ahead of print].

Yung LM, Wong WT, Tian XY, Leung FP, Yung LH, Chen ZY, Yao X, Lau CW, Huang Y. Inhibition of Renin-Angiotensin System Reverses Endothelial Dysfunction and Oxidative Stress in Estrogen Deficient Rats. *Plos one*. 2011; 6(3): 17437.

Zoth N, Weigt C, Zengin S, Selder O, Selke N, Kalicinski M, Piechotta M, Diel P. Metabolic effects of estrogen substitution in combination with targeted exercise training on the therapy of obesity in ovariectomized Wistar rats. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 2012; 130: 64–72.