

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

ALINE ZANDONADI LAMAS

**EFEITOS DOS MODULADORES SELETIVOS DE RECEPTORES DE
ESTROGENIO NA REATIVIDADE VASCULAR DE ANÉIS DE AORTA E EM
BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS CARDÍACOS DE FÊMEAS
OVARIECTOMIZADAS**

VITORIA-ES, DEZEMBRO DE 2014

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

ALINE ZANDONADI LAMAS

**EFEITOS DOS MODULADORES SELETIVOS DE RECEPTORES DE
ESTROGENIO NA REATIVIDADE VASCULAR DE ANÉIS DE AORTA E EM
BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS CARDÍACOS DE FÊMEAS
OVARIECTOMIZADAS**

VITORIA-ES, DEZEMBRO DE 2014

ALINE ZANDONADI LAMAS

**EFEITOS DOS MODULADORES SELETIVOS DE RECEPTORES DE
ESTROGENIO NA REATIVIDADE VASCULAR DE ANÉIS DE AORTA E EM
BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS CARDÍACOS DE FÊMEAS
OVARIECTOMIZADAS**

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

Prof^a. Dr^a. Nazaré Souza Bissoli

Orientadora

VITORIA-ES, DEZEMBRO DE 2014

Lamas, Aline Zandonadi, 2014

EFEITOS DOS MODULADORES SELETIVOS DE RECEPTORES DE ESTROGENIO NA REATIVIDADE VASCULAR DE ANÉIS DE AORTA E EM BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS CARDÍACOS DE FÊMEAS OVARIECTOMIZADAS. Aline Zandonadi Lamas – Vitória, dezembro de 2014, 123p.

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

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

1.Moduladores Seletivos de Receptores de Estrogênio 2.Peptídeo natriurético atrial 3. Ovariectomia 4.Reatividade de anéis de aorta 5. Inflamação 6. 17β – estradiol

**EFEITOS DOS MODULADORES SELETIVOS DE RECEPTORES DE
ESTROGENIO NA REATIVIDADE VASCULAR DE ANÉIS DE AORTA E EM
BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS CARDÍACOS DE FÊMEAS
OVARIECTOMIZADAS**

ALINE ZANDONADI LAMAS

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

Aprovada em ___/___/___

Profª Drª Nazaré Souza Bissoli (Orientadora) - UFES

Prof Dr. Alexandre Martins Costa Santos – UFES

Profª Drª Gláucia Rodrigues de Abreu - UFES

Prof. Dr. Henrique de Azevedo Futuro Neto - MULTIVIX

Prof. Dr. Valério Garrone Barauna - UFES

Profª Drª Ivanita Stefanon
Coordenadora do PPGCF-UFES
Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória-ES, Dezembro de 2014

" A persistência é o menor caminho do êxito"

(Charles Chaplin)

Dedico este trabalho em especial
ao meu esposo, meus pais e aos meus irmãos.
Amo muito vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado força, perseverança e paciência para caminhar e enfrentar essa longa jornada.

Agradeço aos meus pais, meus maiores mestres, que sempre me acompanham em toda a minha caminhada, sempre me incentivando, me dando apoio em todos os momentos e muito carinho! Agradeço também aos meus irmãos pelo imenso carinho e companheirismo! Tenho muito orgulho de todos vocês!

A meu esposo, amor da minha vida, que sempre esteve comigo em todos os momentos, escutando minhas angustias, festejando as alegrias, procurando ser sempre paciente e tendo sempre palavras de incentivo! Muito obrigada por tudo!

A minha orientadora Prof Nazaré, sempre presente e dedicada ao laboratório, que desde a época de iniciação científica me abriu as portas da pesquisa e me proporcionou um rico conhecimento acadêmico que irei levar comigo. Muito obrigada pela compreensão e todo o conhecimento que de maneira muito generosa dividiu comigo e com todos do laboratório.

Agradeço em especial minhas grandes amigas que além de grandes parceiras no trabalho são amigas que levarei para sempre Izabela e Pollyana Dalpiaz. Izabela muito obrigada pela sua parceria em tudo! Você foi uma colaboradora fundamental na execução dos trabalhos! Obrigada por cada longa jornada que pacientemente conseguimos enfrentar e afirmo com sucesso!! Pollyana, uma grande amiga que esbanja generosidade e comprometimento. Obrigada por sempre me auxiliar nas etapas que precisei. Guardo a amizade de vocês para vida toda!!

Aos "meus" queridos alunos e ex alunos de Iniciação Científica, Antônio, Glauciene e Lara. Me sinto muito orgulhosa de ver como foram amadurecendo nessa caminhada, sempre prestativos, disciplinados e sempre prontos a qualquer momento! A parceria de vocês foi fundamental!

Agradeço Ana Raquel pela grande ajuda na execução da técnica de ANP, realizado na UFMG sob supervisão da prof Dra Adelina Martha Reis.

Aos demais alunos do Laboratório de Hipertensão Experimental Karine, Phablo, Elaine, Marcos, Pollyana, Girândia, Andrews, Ewelyne agradeço pela contribuição na execução deste trabalho e pelo convívio no laboratório.

A Profa. Dra. Sônia Gouvêa muito obrigada pela ajuda em todos os momentos que solicitei, sempre presente e disposta a colaborar com extrema competência e generosidade.

Aos alunos do programa, pelas conversas de descontração e pelo auxílio neste trabalho, especialmente a Thaís pela ajuda com o Western Blot e a Cintia pela ajuda com a Reatividade da Aorta.

Ao Laboratório de Histologia Molecular e Imunohistoquímica (LHMI) e ao Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins (LUCCAR) pela estrutura e auxílio prestados, que permitiram a realização de parte do protocolo experimental deste estudo.

Ao prof. Hélder Maud pelo uso do equipamento para reatividade dos anéis de aorta.

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

Aos demais amigos que contribuíram com este trabalho, pelo incentivo e disponibilidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Obrigada a todos que de forma direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho!

RESUMO

Os Moduladores seletivos dos receptores de estrogênio (SERMs), raloxifeno e tamoxifeno, podem ser utilizados na prática clínica em mulheres no tratamento da osteoporose e câncer de mama, respectivamente. Porém, os efeitos dos SERMs sobre o sistema de peptídeo natriurético atrial (ANP) e proteínas envolvidas no processo inflamatório, assim como seus efeitos na reatividade vascular de anéis de aorta, são pouco estudados.

Neste estudo foram investigados a influência do 17β -estradiol, raloxifeno e tamoxifeno no sistema de peptídeos natriuréticos, em biomarcadores do remodelamento cardíaco - fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e subunidade p65 do fator nuclear kappa B (NF- κ B). Estudos sobre a influência dos SERMs na modulação endotelial de tônus vascular em anéis de aorta também foram realizados. As fêmeas foram divididas em cinco grupos: SHAM, OVX (ovariectomizada), OVX tratada com 17β -estradiol (EST), OVX tratada com raloxifeno (RAL) e OVX tratada com tamoxifeno (TAM). O tratamento teve duração de 14 dias, sendo iniciado 21 dias após o procedimento de ovariectomia.

A ovariectomia promoveu aumento na resposta à fenilefrina e uma atenuação no relaxamento induzido pela acetilcolina nos anéis de aorta. Na presença de aminoguanidina (50 μ M) não houve alteração na $R_{m\acute{a}x}$. Na presença de L-NAME (100 μ M) houve um aumento na $R_{m\acute{a}x}$ em todos os grupos, indicando a importância da via do óxido nítrico em todos os grupos. Na presença da apocinina (0.3 μ M) houve uma diminuição na $R_{m\acute{a}x}$ em todos os grupos, sendo significativa no grupo OVX quando comparado a situação controle. Os níveis plasmáticos, conteúdo e a expressão de RNAm do ANP no tecido atrial

esquerdo, foram reduzidos no grupo OVX. O tratamento com 17β -estradiol e SERMs normalizou o ANP plasmático assim como, o RNAm do ANP no átrio esquerdo. Esses parâmetros não estavam alterados no átrio direito. A expressão das proteínas, como TNF- α e subunidade p65 NF- κ B apresentaram-se aumentadas em animais OVX, porém foram normalizadas pelos tratamentos, exceto para o grupo RAL, em relação à expressão de TNF- α , no qual os níveis permaneceram elevados.

O tratamento com SERMs promoveu inúmeros benefícios, demonstrando efeitos anti-inflamatórios similares ao normalizarem os níveis plasmáticos de ANP, e de importantes biomarcadores envolvidos na remodelação cardíaca, assim como, normalizou a resposta vasoconstrictora e vasodilatadora dos anéis de aorta. Portanto, estes tratamentos podem ser importantes colaboradores na prevenção de doenças cardiovasculares que acometem, principalmente, mulheres na fase pós-menopausal, enquanto as utilizam para outras doenças, como osteoporose e câncer.

Palavras-chaves: 17β -estradiol; raloxifeno; tamoxifeno; ovariectomia; reatividade; inflamação; ANP; estresse oxidativo.

ABSTRACT

The selective estrogen receptors modulators (SERMs), raloxifene and tamoxifen, can be used in clinical practice for osteoporosis and breast cancer, respectively. However, the effects of SERMs on the system of atrial natriuretic peptide (ANP) and proteins involved in the inflammatory process and its effects on vascular reactivity of aortic rings, have not been determined in the literature.

In this study we investigated the influence of raloxifene and tamoxifen in the system of natriuretic peptides in cardiac remodeling biomarkers - tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and p65 subunit of nuclear factor kappa B (NF- κ B). Studies of the influence of SERMs on endothelial modulation of vascular tone in aortic rings were also conducted. The female rats were divided into five groups: SHAM, OVX (ovariectomized), OVX treated with 17 β -estradiol (EST) OVX treated with raloxifene (RAL) and OVX treated with tamoxifen (TAM). The treatments started 21 days after ovariectomy and lasted 14 days

Ovariectomy promoted an increase in responsiveness to phenylephrine and an attenuation of the acetylcholine-induced relaxation in aortic rings. In the presence of aminoguanidine (50 mM) did not change in Emax. In the presence of L-NAME (100 mM) there was an increase in Emax in all groups, indicating the importance of the nitric oxide in all groups. In the presence of apocynin (0.3 mM) there was a decrease in Rmax in all groups, it was significant in the OVX group compared to the control situation. Plasma levels, and mRNA expression of ANP in left atrial tissue were reduced in the OVX group. Treatment with 17 β -estradiol and SERMs normalized as plasma ANP, ANP mRNA in left atrium. These parameters were not altered in the right atrium. Protein expression of

TNF- α and NF- κ B p65 subunit presented increased in OVX but were normalized by the treatments, except for the raloxifene group in relation to TNF- α expression

The treatment with SERMs promoted numerous benefits, demonstrating anti-inflammatory effects similar to normalize the plasma levels of ANP and important biomarkers involved in cardiac remodeling. As well as normalized the vasoconstrictor and vasodilator response of aortic rings. Therefore, these treatments may be important contributors in preventing cardiovascular diseases that affect primarily women in the post menopausal phase.

Keywords: 17 β -estradiol; raloxifene; tamoxifen; ovariectomy; reactivity; inflammation; ANP; oxidative stress.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh: Acetilcolina
AG: Aminoguanidina
APO: Apocinina
dAUC: diferença da área abaixo da curva
DHE: dihidroetídio
DVC: Doença cardiovascular
EDHF: Fator hiperpolarizante derivado de endotélio
EROS: Espécies reativas do oxigênio
eNOS: Óxido nítrico sintase endotelial
iNOS: Óxido nítrico sintase induzível
ICAM-1 (Molécula de adesão intercelular-1)
IL-6: Interleucina-6
H₂O₂: Peróxido de hidrogênio
Iκβ: Inibidor kappa β
L-NAME: N ω -nitro-L-arginina metil ester
NF-κB: fator de transcrição kappa B
NO: Óxido nítrico
NOS: Oxido nítrico sintase
O₂⁻: Ânion superóxido
ONOO⁻: Peroxinitrito
pD₂: logaritmo negativo da EC50
R_{máx}: Resposta máxima
TRH: Terapia de Reposição Hormonal
TNF-α: Fator de necrose tumoral alfa
VCAM-1 (Molécula de adesão da célula vascular-1)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: 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. Ub: Ubiquitina (Modificado de Ghosh & Hayden, 2008).

Figura 2: Os mecanismos pelos qual o tratamento com estradiol (E2) atenua a via de sinalização pró-inflamatória. TNF-α, fator de necrose tumoral alfa; IκBβ, proteína IκBβ; IKK, complexo IκBβ quinase; NF-κB, fator nuclear κB; JNK, c-jun N-terminal quinase. (FONTE: Xing et al., 2009).

Figura 3: Esquema das reações e respectivas enzimas envolvidas na formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. NOS: NO sintase; SOD: superóxido dismutase; GPx: glutathione peroxidase; Prx: peroxirredoxinas; GR: glutathione reductase; GSH: glutathione reduzida; GSSG: glutathione oxidada (dímero). FONTE: (modificado, BARBOSA et al., 2006)

Figura 4: 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).

Figura 5: Influência da deficiência estrogênica nos níveis de citocinas inflamatórias circulantes e sobre fatores envolvidos na reatividade vascular. (EDHF: Fator hiperpolarizante derivado do endotélio)

Figura 6: Estrutura molecular dos peptídeos natriuréticos. FONTE: Adaptado de Potter *et al.* (2006).

Figura 7: Receptores de membrana dos peptídeos natriuréticos do tipo A (NPR-A) e tipo C (NPR-C). Fonte: Adaptado de Potter *et al.* (2006).

Figura 8: Organograma do protocolo experimental.

Figura 9: Procedimento da ovariectomia bilateral.

Figura 10: Representação do ciclo estral detectada por meio do esfregaço vaginal em microscópio ótico (aumento 40x) A- Metaestro ou Diestro I- caracterizada por um pouco das 3 células. (Células Nucleadas, Epiteliais e Leucócitos). B- Diestro II- caracterizada por infiltrado leucocitário. C- Proestro – caracterizada por presença predominante de células nucleadas. D- Estro – caracterizada por presença predominante de células epiteliais. (Fonte: Dalpiaz, 2012).

Figura 11: Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular “*in vitro*”. (modificado Dias, 2007).

Figura 12: Registro com curvas representando o teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e avaliação da integridade funcional do endotélio. Avaliação da viabilidade do músculo liso vascular com KCl: A) Período de estabilização inicial (45 min permanecendo na tensão de 0.9 a 1,3 g); B) Adição de KCl (75 mM) ao banho; C) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; D) Período de estabilização (30 min); E) Adição de KCl (75 mM) ao banho; F) Platô da contração induzida pelo KCl (75 mM); G) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; H) Período de estabilização (30 min). Avaliação da integridade funcional do endotélio: I) Pré-contração com fenilefrina (Fe) 10-6M; J) Platô da contração induzida pela Fe; L) Adição de acetilcolina (ACh) 10-5M. O tempo foi registrado em minutos, eixo horizontal (intervalo de 80 min) e a força em gramas (g), eixo vertical. (modificado de Dias, 2007).

Figura 13: Análise histológica do coração dos grupos SHAM, Ovariectomizada (OVX), Estrogênio (EST), Raloxifeno (RAL) e Tamoxifeno (TAM). Amostras coradas com o método Hematoxilina/Eosina (HE). 400x. Abaixo gráfico de barras do número do núcleo de miócitos/campo e área dos miócitos. Análises morfométricas foram realizadas utilizando Moticam Plus 2000 software. Os valores foram expressos como média \pm E.P.M.

Figura 14: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar nos grupos SHAM, Ovariectomizada (OVX), 17- β estradiol (EST), Raloxifeno (RAL) e Tamoxifeno (TAM). Dados foram expressos como média \pm EPM, n=6 por grupo. ** p<0,01 quando comparado ao grupo SHAM.

Figura 15: Curvas concentração-resposta à acetilcolina para avaliação do relaxamento dependente do endotélio em anéis isolados de aorta de ratos Wistar nos grupos SHAM, Ovariectomizada (OVX), 17- β estradiol (EST), Raloxifeno (RAL) e Tamoxifeno (TAM). Dados expressos como média \pm EPM. ** p<0,01 quando comparado ao grupo SHAM.

Figura 16: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar nos grupos SHAM, Ovariectomizada (OVX), 17- β estradiol (EST), Raloxifeno (RAL) e Tamoxifeno (TAM) na presença de Aminoguanidina e diferença percentual da área abaixo da curva dos grupos estudados. Dados expressos como média \pm EPM. ** p<0,01 quando comparado ao grupo SHAM.

Figura 17: Diferença percentual na área abaixo da curva entre os grupos antes e após a inibição com Aminoguanidina. Dados foram expressos como média \pm EPM.

Figura 18: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar nos grupos Sham, Ovariectomizada (OVX), 17- β estradiol (EST), Raloxifeno (RAL) e Tamoxifeno (TAM) na presença de L-NAME. Dados expressos como média \pm EPM. ** p<0,01 quando comparado ao grupo SHAM.

Figura 19: Diferença percentual na área abaixo da curva entre os grupos antes e após a inibição com L-NAME. Dados foram expressos como média \pm EPM. ** p<0,01 quando comparado ao grupo SHAM $\dagger\dagger$ p<0,05 quando comparado ao grupo SHAM, OVX, EST e RAL.

Figura 20: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar nos grupos SHAM, Ovariectomizada (OVX), 17- β estradiol (EST), Raloxifeno (RAL) e Tamoxifeno (TAM) na presença de Apocinina. Dados expressos como média \pm EPM. ** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo OVX sem presença da Apocinina.

Figura 21: Diferença percentual na área abaixo da curva entre os grupos antes e após a inibição com Apocinina. Dados foram expressos como média \pm EPM.

Figura 22: Resultados da expressão proteica da isoforma endotelial da óxido nítrico sintase (eNOS) em seguimentos de aorta torácica dos grupos SHAM, Ovariectomizada (OVX), Ovariectomizadas Tratadas com 17 β -estradiol (EST), Raloxifeno (RAL) e Tamoxifeno (TAM). 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.

Figura 23. Resultados da expressão proteica da isoforma induzível da óxido nítrico sintase (iNOS) em seguimentos de aorta torácica dos grupos SHAM, Ovariectomizada (OVX), Ovariectomizadas Tratadas com 17 β -estradiol (EST), Raloxifeno (RAL) e Tamoxifeno (TAM). 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.

Figura 24: Resultados da expressão proteica do TNF- α e da subunidade p65 do NF κ B do ventrículo esquerdo nos grupos Wistar SHAM, Ovariectomizada (OVX), Ovariectomizadas Tratadas com 17 β -estradiol (EST), Raloxifeno (RAL) e Tamoxifeno (TAM). Na parte superior dos gráficos em barra estão as bandas representativas da expressão do TNF- α e da p65 nuclear e da p65 citoplasmática. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo SHAM.

Figura 25: Imagens de micrografia representam a fluorescência emitida por dihidroetídio em segmentos de aorta torácica dos grupos SHAM, Ovariectomizada (OVX), Ovariectomizadas Tratadas com 17 β -estradiol (EST), Raloxifeno (RAL) e Tamoxifeno (TAM). Ao lado, gráfico com valores médios da

fluorescência emitida por dihidroetídio. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo SHAM.

Figura 26: Valores dos níveis plasmáticos de ANP (pg/ml) nos grupos SHAM (n=5), ovariectomizadas (OVX, n=8), ovariectomizadas tratadas com 17 β -estradiol (EST, n=7), com raloxifeno (RAL, n=5) e tamoxifeno (TAM, n=5). * $p < 0.05$ comparado ao grupo SHAM.

Figura 27: Conteúdo de ANP do átrio direito (AD – A) e átrio esquerdo (AE – B) em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de prot) dos grupos SHAM, ovariectomizadas (OVX), ovariectomizadas tratadas com 17 β -estradiol (EST), com raloxifeno (RAL) e tamoxifeno (TAM). * $p < 0.05$ comparado ao grupo SHAM. ** $p < 0.01$ comparado ao grupo EST.

Figura 28: Níveis do RNAm para o ANP no AE em unidades arbitrárias (UA) por meio da técnica de PCR real time dos grupos SHAM, ovariectomizadas (OVX), ovariectomizadas tratadas com 17 β -estradiol (EST), com raloxifeno (RAL) e tamoxifeno (TAM). ** $p < 0.01$ comparado ao grupo SHAM.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros ponderais de peso corporal (inicial e final) e peso de órgãos (útero e coração) em gramas (g) nos grupos Fêmea SHAM, Fêmea Ovariectomizada (OVX), Fêmeas Ovariectomizadas tratadas com 17 β -estradiol (EST), Raloxifeno (RAL) e Tamoxifeno (TAM).

Tabela 2. Dados histológicos do coração (número de núcleos/campo e área dos miócitos) realizada por meio da técnica de coloração hematoxilina-eosina, nos grupos Fêmea SHAM, Fêmea Ovariectomizada (OVX), Fêmeas Ovariectomizadas tratadas com 17 β -estradiol (EST), Raloxifeno (RAL) e Tamoxifeno (TAM).

Tabela 3: Valores de resposta contrátil ao Cloreto de Potássio (KCl) em anéis isolados de aorta, com endotélio de fêmeas SHAM, ovariectomizadas e ovariectomizadas tratadas com 17 β -estradiol (EST), raloxifeno (RLX) e tamoxifeno (TAM).

Tabela 4: Valores de resposta máxima (R_{máx}) e sensibilidade (pD₂) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aortas nos grupos SHAM, Ovariectomizada (OVX), 17- β estradiol (EST), Raloxifeno (RAL) e Tamoxifeno (TAM)

Tabela 5: Valores de resposta máxima (R_{máx}) e sensibilidade (pD₂) das curvas concentração- resposta à acetilcolina em anéis isolados de aortas nos grupos SHAM, Ovariectomizada (OVX), 17- β estradiol (EST), Raloxifeno (RAL) e Tamoxifeno (TAM).

Tabela 6: Valores da Resposta máxima (R_{máx}) e a sensibilidade (pD₂) das curvas concentração- resposta à fenilefrina em anéis isolados de aortas nos grupos SHAM, Ovariectomizada (OVX), 17- β estradiol (EST), Raloxifeno (RAL) e Tamoxifeno (TAM) na presença e na ausência da aminoguanidina (Amino).

Tabela 7: Valores da Resposta máxima (R_{máx}) e a sensibilidade (pD₂) das curvas concentração- resposta à fenilefrina em anéis isolados de aortas nos

grupos SHAM, Ovariectomizada (OVX), 17- β estradiol (EST), Raloxifeno (RAL) e Tamoxifeno (TAM) na presença e na ausência de L-NAME.

Tabela 8: Valores da Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e a sensibilidade (pD_2) das curvas concentração- resposta à fenilefrina em anéis isolados de aortas nos grupos SHAM, Ovariectomizada (OVX), 17- β estradiol (EST), Raloxifeno (RAL) e Tamoxifeno (TAM) na presença e na ausência da Apocinina.

Tabela 9: Dosagens do conteúdo de peptídeo natriurético atrial (ANP) no átrio direito (AD) e esquerdo (AE) em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína total (Prot) e dos níveis do RNAm para o ANP no AD e AE em unidades arbitrárias (UA) através da técnica de PCR *real time* dos grupos SHAM, ovariectomizadas (OVX), ovariectomizadas tratadas com 17 β -estradiol (EST), com raloxifeno (RAL) e tamoxifeno (TAM).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	26
1.1. DEFICIÊNCIA ESTROGÊNICA E INFLAMAÇÃO	27
1.2. DEFICIÊNCIA ESTROGÊNICA E ESPÉCIEIS REATIVAS DE OXIGÊNIO	29
1.3. INFLUÊNCIA DA DEFICIÊNCIA ESTROGÊNICA NA REATIVIDADE VASCULAR.....	32
1.4. TERAPIA DE REPOSIÇÃO HORMONAL COM MODULADORES SELETIVOS DOS RECEPTORES DE ESTROGÊNIO (SERMs).....	34
1.5. INFLUÊNCIA DA DEFICIÊNCIA ESTROGÊNICA NO SISTEMA DE PEPTÍDEO NATRIURÉTICO ATRIAL	36
2. JUSTIFICATIVA	41
3. OBJETIVO	42
3.1. OBJETIVO GERAL	42
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
4. METODOLOGIA	43
4.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS	43
4.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS:	43
4.3 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	44
4.4. OVARECTOMIA.....	44
4.5 TRATAMENTOS	45
4.6 EVOLUÇÃO PONDERAL E PESO DO ÚTERO E CORAÇÃO	46
4.7 DETERMINAÇÃO DA FASE DO CICLO ESTRAL	46
4.8 REATIVIDADE VASCULAR EM ANEIS DE AORTA ISOLADOS.....	47
4.8.1 EFEITO DO TRATAMENTO COM ESTROGÊNIO E SERMS NA RESPOSTA DE RELAXAMENTO DEPENDENTE DO ENDOTÉLIO	51
4.8.2. INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM ESTROGÊNIO E SERMS NA VIA DO ÓXIDO NÍTRICO.....	51
4.8.3. INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM ESTROGÊNIO E SERMS NA ISOFORMA INDUZÍVEL DE ÓXIDO NÍTRICO (INOS).....	51

4.8.4. ENVOLVIMENTO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS) COM ESTROGÊNIO E SERMS SOBRE A RESPOSTA CONTRÁTIL À FENILEFRINA EM AORTA TORÁCICA	51
4.9. DOSAGEM DE ANP	52
4.9.1 Iodação de ANP	52
4.9.2 Radioimunoensaio para ANP	52
4.9.3. <i>Análise de RNA</i>	53
4.9.4. Extração de RNAm	53
4.9.5. Síntese do DNA complementar (cDNA) - transcrição reversa.....	55
4.9.6. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real time - PCR)	55
4.10. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS PROTEICOS POR WESTERN BLOT	57
4.10.1. Extração das proteínas	57
4.10.2. Dosagem de proteínas	58
4.10.3. Eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE)	59
4.10.4 Transferência das proteínas	59
4.10.5 Incubação dos anticorpos	60
4.11. ESTUDO DA GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM ANÉIS DE AORTA – DIHIDROETÍDEO	61
4.12. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO CORAÇÃO.....	62
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	63
6. RESULTADOS	64
6.1. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS PONDERAIS.....	64
6.2. EFEITO DO TRATAMENTO COM ESTROGÊNIO E SERMs SOBRE PARÂMETROS HISTOLÓGICOS DE FÊMEAS OVARIECTOMIZADAS.....	65
6.3. AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE VASCULAR DA AORTA.....	67
6.3.1. EFEITO DO TRATAMENTO COM ESTROGÊNIO E SERMs SOBRE A REATIVIDADE À FENILEFRINA NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA DE FÊMEAS OVARIECTOMIZADAS	68
6.3.2. EFEITO DO TRATAMENTO COM ESTROGÊNIO E SERMs SOBRE O RELAXAMENTO NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA DE FÊMEAS OVARIECTOMIZADAS	70

6.3.3. EFEITO DOS FATORES ENDOTELIAIS ENVOLVIDOS NO TRATAMENTO COM ESTROGÊNIO E SERMs SOBRE O RELAXAMENTO NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA DE FÊMEAS OVARIECTOMIZADAS	72
6.3.3.1 <i>Participação da isoforma induzível da óxido nítrico sintase no tratamento com estrogênio e SERMs sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica</i>	73
6.3.3.2. <i>Expressão Protéica da isoforma induzível (iNOS) da óxido nítrico sintase em aorta de fêmeas ovariectomizadas</i>	74
6.3.3.3. <i>Participação da via do óxido nítrico no tratamento com estrogênio e SERMs sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica</i>	77
6.3.3.4. <i>Expressão Protéica da isoforma endotelial (eNOS) da óxido nítrico sintase em aorta de fêmeas ovariectomizadas</i>	80
6.3.3.5. <i>Influência da administração de apocinina, um inibidor da NADPH oxidase no tratamento com estrogênio e SERMs sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica</i>	81
6.4. EXPRESSÃO PROTÉICA DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO NUCLEAR KAPPA B (NF-KB) SUBUNIDADE 65 E DO FATOR DE NECROSE TUMORAL (TNF- α) NO VENTRÍCULO ESQUERDO DE FÊMEAS OVARIECTOMIZADAS.....	85
6.5. ESTUDO DA GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM ANÉIS DE AORTA– DIHIDROETÍDEO (DHE)	86
6.6. TRATAMENTO COM 17 β -ESTRADIOL, RALOXIFENO E TAMOXIFENO SOBRE O SISTEMA DE PEPTÍDEOS NATRIURÉTICOS.....	88
7. DISCUSSÃO	91
7.1. PARÂMETROS PONDERAIS E DADOS HISTOLÓGICOS	92
7.2. EFEITO DOS SERMs NA REATIVIDADE VASCULAR À FENILEFRINA E ACETILCOLINA EM ANÉIS DE AORTA DE FÊMEAS COM DEFICIÊNCIA ESTROGÊNICA.....	95
7.3. INFLUÊNCIA DO ESTROGÊNIO E DOS SERMs SOBRE OS RADICAIS LIVRE “in situ”	100
7.4. INFLUÊNCIA DAS TERAPIAS HORMONAIIS SOBRE OS NÍVEIS DO PEPTÍDEO NATRIURÉTICO E MARCADORES DA INFLAMAÇÃO	102

8. CONCLUSÃO.....	108
9. REFERÊNCIAS	109

1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define o climatério como sendo o período de vida da mulher compreendido entre o final da fase reprodutora até a senilidade, iniciando-se entre os 35 e 40 anos e estendendo-se até os 65 anos. Neste período ocorre a menopausa, definida como a perda permanente da menstruação reconhecida como 12 meses consecutivos de amenorréia (WOODS et al., 2007) ou ocorre a menopausa por remoção cirúrgica dos ovários. É importante ressaltar dados do último censo do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), no qual a população feminina totaliza aproximadamente 94 milhões de mulheres, sendo que neste universo, cerca de 63 milhões está entre 35 e 65 anos, significando que 67% das mulheres no Brasil estão na faixa etária do período do climatério (IBGE, 2010). Estudos descrevem que após a menopausa ocorre um aumento exponencial de risco cardiovascular (GOLDEN et al., 2002), logo o estudo de intervenções nesta fase é de extrema importância, pois pode-se considerar um problema de saúde público.

Mulheres na pós-menopausa, em comparação com mulheres na pré-menopausa, apresentam duas vezes mais risco de insuficiência coronariana (STAMPFER et al., 1991), sendo a doença cardiovascular a principal causa de morte em mulheres na pós-menopausa (BARRETT-CONNOR et al., 2006). Além disso, na deficiência dos níveis estrogênicos há um incremento da disfunção endotelial e diminuição da vasodilatação endotélio-dependente (DUBEY et al., 2005).

Na fase da pré-menopausa a cardioproteção pode ser justificada, pois na presença de estrogênio endógeno esses benefícios 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 (RIEDEL et al., 1995; MAGNESS, R., 1989).

Vários mecanismos têm sido propostos para tentar elucidar os efeitos diretos e indiretos do estrógeno no sistema cardiovascular, como por exemplo, redução da pressão arterial e atividade oxidante (TOSTES et al., 2003). Há estudos que

demonstram que a administração de estradiol diminuiu a pressão arterial de mulheres normotensas após dois meses de tratamento (CAGNACCI et al., 1999) e diminuiu a resistência vascular periférica e conseqüentemente a pressão arterial de mulheres na pós-menopausa (WEST et al., 2001). Além dos mecanismos propostos, o estrogênio também pode influenciar nos processos inflamatórios e no estresse oxidativo, e como um dos objetivos do nosso estudo foi a influência dos tratamentos nesses sistemas, iremos detalhar com maior ênfase estes pontos.

1.1. DEFICIÊNCIA ESTROGÊNICA X INFLAMAÇÃO

Há uma forte ligação entre os sistemas imune e endócrino que pode ser explicitada nas seguintes observações: as células de ambos os sistemas possuem receptores para citocinas, neurotransmissores e neuropeptídeos; os produtos imuno-neuroendócrinos são achados em ambos os tecidos, linfóide e endócrino; mediadores endócrinos podem modular o sistema imune e mediadores imunes podem afetar estruturas do sistema endócrino (BESEDOVSKY; REY, 2013).

O estrógeno diminui a expressão de moléculas de adesão de células vasculares VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) e de adesão intercelulares ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1), o que diminui o acúmulo de leucócitos no endotélio. Estudos *in vitro* demonstram que o estrógeno afeta a liberação de citocinas pró-inflamatórias por essas células, provavelmente por um *cross-talk* dos receptores de estrogênio como o fator de transcrição nuclear NF- κ B, que resulta na redução da atividade desse fator.

O NF- κ B 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- κ B (NF- κ B1 (p50 e o seu precursor p105), NF- κ B2 (p52 e o seu precursor p100), p65/RelA, c-Rel e RelB) (GHOSH; HAYDEN, 2008a). Em células em homeostase, o NF- κ B mantém-se em sua forma inativa no citoplasma, associado com as proteínas inibitórias do sítio κ B, chamadas inibidores κ B (I κ B), como I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , que inibem a ligação do NF- κ B ao DNA (Figura 1). A ativação do NF- κ B é mediada principalmente pela

degradação do I κ B, evento cuidadosamente regulado que é iniciado por fosforilações específicas por IKK (I κ B kinases) ativados. A degradação proteolítica das I κ Bs permite a translocação do NF- κ B ao núcleo, onde regula a expressão de genes importantes a resposta inflamatória (GHOSH; HAYDEN, 2008a; STICE; KNOWLTON, 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 (GHISLETTI et al., 2005; LEAN et al., 2005; WAN; LENARDO, 2010).

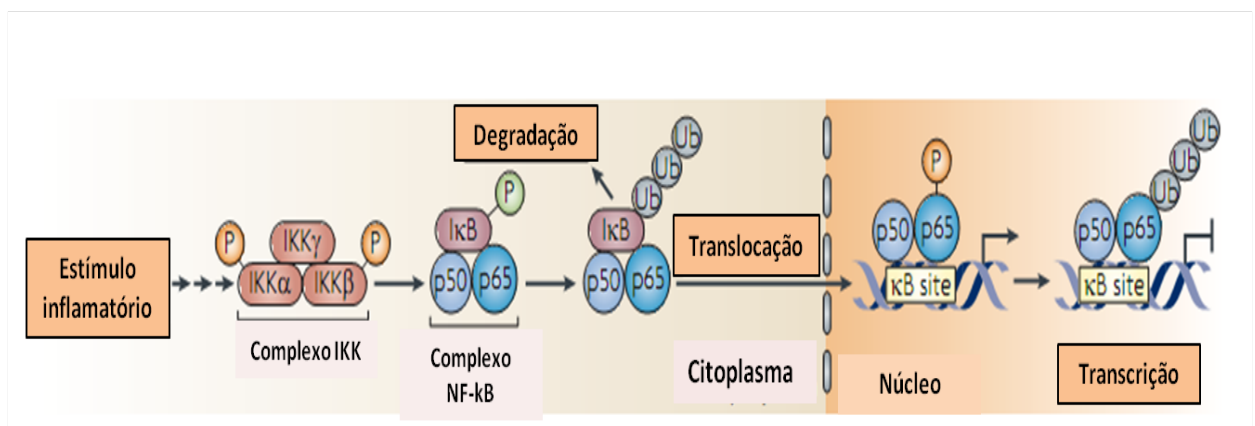


Figura 1: Pontos regulatórios relevantes na via sinalizadora do NF- κ B. No simples modelo de ativação do NF- κ B, o estímulo inflamatório ativa a via de transdução de sinal que induz a ativação de IKK, resultando em fosforilação da proteína I κ B e sua consequente degradação. Liberado, o dímero NF- κ B se desloca até o núcleo e liga o sítio κ B ao promotor de genes-alvo, que leva a sua transcrição. Ub: Ubiquitina (Modificado de Ghosh & Hayden, 2008).

É proposto diversas vias nas quais o estrogênio pode exercer efeito anti-inflamatório (Figura 2), inibindo diretamente a expressão do mediador pró-inflamatório TNF- α ; aumentando a expressão I κ B- α ; inibindo a fosforilação do mediador IKK e consequentemente, a degradação de I κ B α ; inibindo a transcrição, a ativação do NF- κ B de por citocinas; pode também inibir a capacidade do NF- κ B de se ligar no DNA e/ou o estrogênio bloqueiar a JNK (c-jun N-terminal quinase-G) que induz a produção de TNF- α

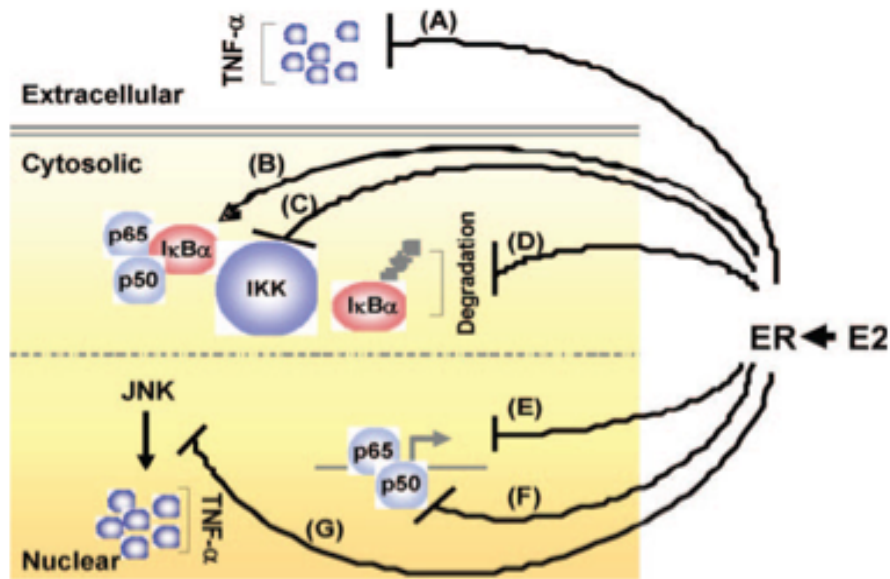


Figura 2: Os mecanismos pelos qual o tratamento com estrogênio (E2) atenua a via de sinalização pró-inflamatória. TNF- α , fator de necrose tumoral alfa; I κ B β , proteína I κ apaB; IKK, complexo I κ apaB quinase; NF- κ B, fator nuclear κ apaB; JNK, c-jun N-terminal quinase. FONTE: (XING et al., 2009a)

1.2. DEFICIÊNCIA ESTROGÊNICA E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

As espécies reativas de oxigênio (EROS) podem ser consideradas um dos principais fatores que aumentam o risco para doenças cardiovasculares (DCV) após a menopausa. Em um estudo foi relacionado um aumento da produção das EROS com a deficiência estrogênica em mulheres, e os autores concluíram que essa fase, ou seja, a fase da pós-menopausa é um fator de risco para ocorrência do aumento do estresse oxidativo e conseqüentemente, para o desenvolvimento de DCV (SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ et al., 2012).

Vale ressaltar que em quadros de hipertensão ou mesmo em casos de deficiência estrogênica, podem haver redução da biodisponibilidade do NO, cujo consumo é aumentado devido às espécies reativas de oxigênio (EROS) ou por prejuízo na síntese de NO (MONCADA, 1993). O NO sofre reações

oxidativas e redutoras para produzir vários derivados, que compõe o ciclo para geração de EROs conforme pode ser observado abaixo (Figura 3).

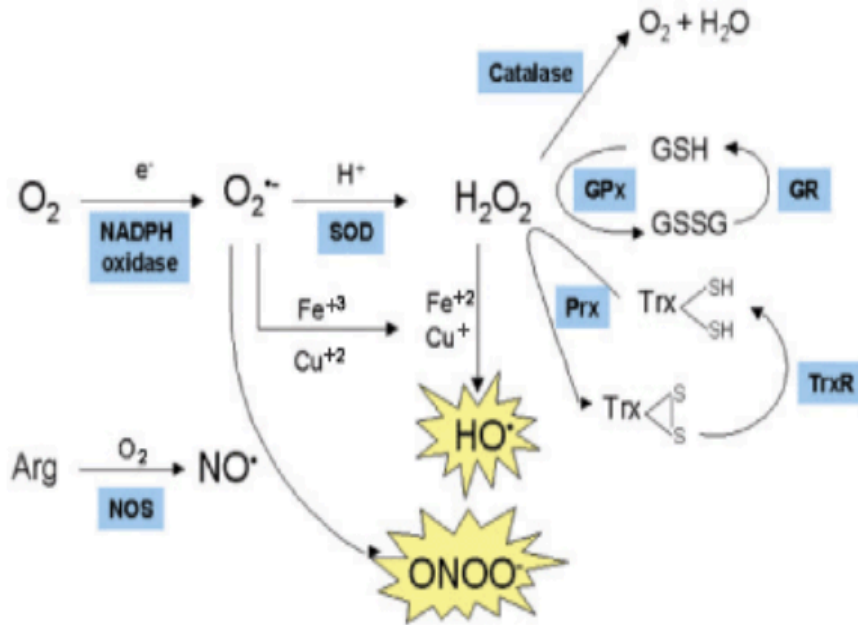


Figura 3: Esquema das reações e respectivas enzimas envolvidas na formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. NOS: NO sintase; SOD: superóxido dismutase; TrxR: tiorredoxina redutase; Trx: tiorredoxina; GPx: glutathiona peroxidase; GR: glutathiona redutase; GSH: glutathiona reduzida; GSSG: glutathiona oxidada (dímero). FONTE: (BARBOSA et al., 2006)

A meia-vida do NO é decisivamente determinada pelo EROS, como o ânion superóxido (GRYGLEWSKIL et al., 1986). O ânion superóxido reage com o NO formando o peroxinitrito e isso representa uma importante via de produção de EROS (Figura 3). O peroxinitrito em altas concentrações no meio é citotóxico, causando danos oxidativos as células (BECKMAN, 1996). Outras EROS, como o produto da dismutação do ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso liberado pelos neutrófilos, tem alta capacidade oxidante, o que contribuirá ainda mais para o estresse oxidativo nos tecidos (MÜNDEL et al., 2005).

Assim, as células têm uma série de mecanismos de defesa para se proteger da toxicidade das EROS, sendo o estrogênio capaz de aumentar essas defesas intra e extracelularmente, contribuindo para manter o equilíbrio no balanço redox. Há enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD) que representa uma importante defesa, pois remove o ânion superóxido ao convertê-lo a peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas como a Catalase, que rapidamente o converte à água (ONAL et al., 2007; STREHLOW et al., 2003).

O estrogênio exerce papel antioxidante por meio da modulação da atividade NADPH oxidase e aumento da expressão de enzimas antioxidantes como a superóxido desmutase e catalase (DANTAS et al., 2002). A NADPH oxidase é uma enzima responsável pela maior fonte de ânion superóxido em cardiomiócitos e nas células vasculares (GRIENGLING; SORESCU; USHIO-FUKAI, 2000; PARAVICINI; TOUYZ, 2006), essa reação não só provoca a diminuição da biodisponibilidade do NO, mas também contribui para atenuar a vasodilatação dependente do endotélio (ZIELONKA et al., 2010).

1.3. INFLUÊNCIA DA DEFICIÊNCIA ESTROGÊNICA NA REATIVIDADE VASCULAR

O aumento na produção de NO é, provavelmente, o principal fator responsável pelos benefícios cardiovasculares do estrogênio, uma vez que esses hormônios são conhecidos por aumentar a expressão da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e também por ativar agudamente a sinalização da via da fosfatidil inositol 3-quinase (PI3K), levando a fosforilação e ativação dessa enzima (MURPHY, 2011). O estrogênio pode ainda aumentar a biodisponibilidade de NO sem aumentar a expressão e/ou atividade da eNOS, mediante suas propriedades antioxidantes.

Os efeitos não-genômicos, nos vasos, ocorrem em resposta a ligação dos estrógenos aos receptores, independentemente de transcrição gênica e síntese protéica (FARHAT; ABI-YOUNES; RAMWELL, 1996), promovendo vasodilatação. O 17 β -estradiol, por seus efeitos não-genômicos, vem sendo apontado como um fator importante no controle do tônus vascular por ação no endotélio e no músculo liso vascular (SMILEY; KHALIL, 2009). Nas células

endoteliais, contribui para produção de óxido nítrico (NO), ativando a enzima NO sintase endotelial (eNOS). O NO é um poderoso vasodilatador produzido a partir da transformação da L-arginina em L-citrulina pela NO sintase (NOS) (Figura 4).

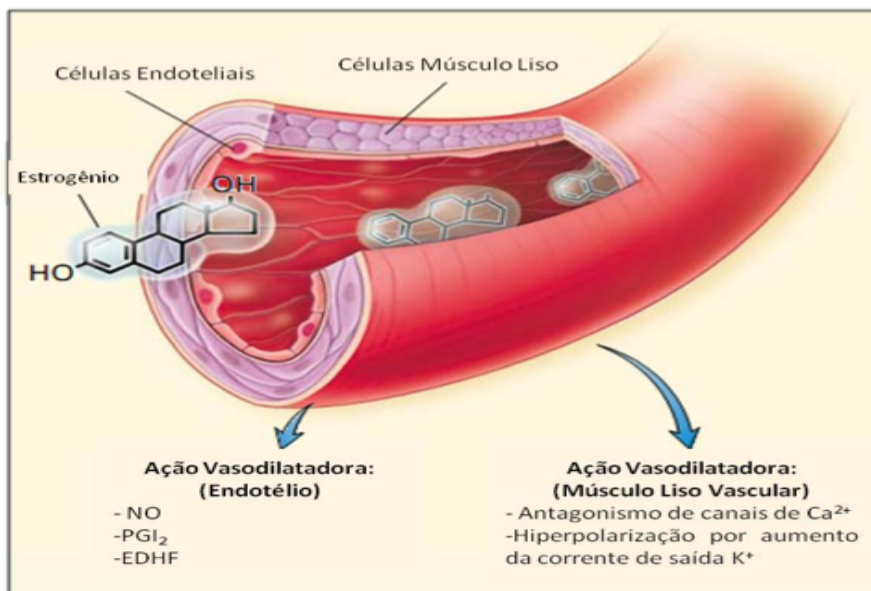


Figura 4: Efeito direto do estrogênio sobre os vasos sanguíneos. A ação vasodilatadora direta do estrogênio sobre o músculo liso vascular poderia ocorrer pelo antagonismo de canais de Ca²⁺ tipo L voltagem-dependente, inibindo assim o influxo transmembrana, levando a redução na concentração intracelular desse íon e consequentemente 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 (MENDELSON; KARAS, 1999).

É bem conhecido que a disfunção do endotélio vascular participa da gênese de doenças cardiovasculares, incluindo as que ocorrem na fase pós-menopausa. O endotélio vascular é particularmente afetado pela ação de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α (figura 5). É bem conhecido que a deficiência estrogênica pode levar ao aumento de citocinas circulantes (DE MEDEIROS et al., 2012; LAMAS, 2009) e prejuízos na reatividade vascular (CALIMAN et al., 2013; LAMAS, 2009; OLIVEIRA et al., 2014). Em um estudo *in vivo* que

simulava o modelo de menopausa, os níveis aumentados de TNF- α eram associados a disfunção endotelial (ARENAS et al., 2005).

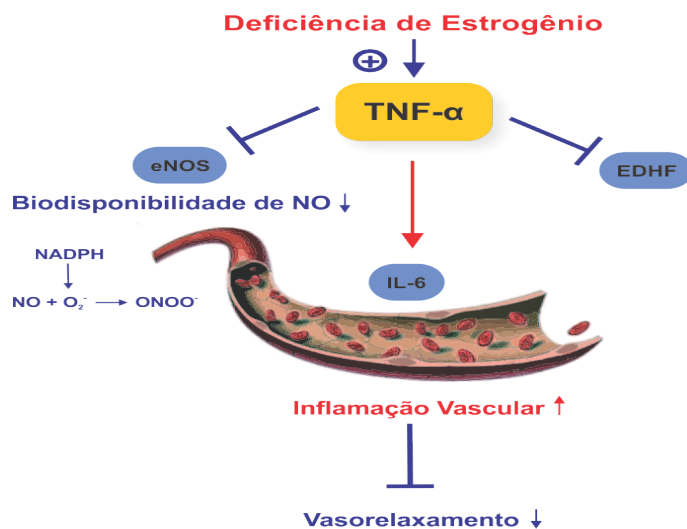


Figura 5: Influência da deficiência estrogênica nos níveis de citocinas inflamatórias circulantes e sobre fatores envolvidos na reatividade vascular. (EDHF: Fator hiperpolarizante derivado do endotélio)

1.4. TERAPIA DE REPOSIÇÃO HORMONAL COM MODULADORES SELETIVOS DOS RECEPTORES DE ESTROGÊNIO (SERMs)

Estudos apontam 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 (GOMPÉL et al., 2011). Porém, estudos randomizados com TRH clássicas *Women Health Initiated* (WHI) e *Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study* (HERS) demonstraram um aumento de eventos cardiovasculares nessas mulheres (HULLEY et al., 1998; ROSSOUW et al., 2002), apontando assim a necessidade de investigar possíveis TRH efetivas e seguras para serem usadas pela mulher nessa fase. Contudo, estes estudos tiveram limitações metodológicas que implicaram diretamente na interpretação de seus resultados, criando assim vieses nos dados. Assim, o estudo de possíveis terapias de reposição seguras e eficazes são de grande relevância.

O estudo do possível uso de terapias com moduladores seletivos dos receptores de estrogênio (SERMs) têm mostrado efeitos benéficos no tratamento dos sintomas da menopausa em situações clínicas (WONG et al., 2006). Os SERMs são uma classe de compostos sintéticos que atuam como antagonistas ou agonistas dos receptores de estrogênio, de acordo com os tecidos alvo (OSBORNE, 1998; SATO; RIPPY; BRYANT, 1996). O tamoxifeno é o anti-estrógeno mais utilizado para o tratamento de câncer de mama (GJERDE et al., 2010; OSBORNE, 1998). O raloxifeno é utilizado para o tratamento e prevenção da osteoporose pós-menopausa (SATO; RIPPY; BRYANT, 1996). Em adição a estas indicações específicas, estas drogas podem ser utilizados para reduzir os problemas cardiovasculares que surgem em mulheres na fase pós-menopausa. Alguns estudos clínicos e experimentais têm mostrado que o raloxifeno e tamoxifeno fornecem efeitos protetores sobre a função cardiovascular, aumentando a síntese e bioatividade de fatores endoteliais (BORGIO et al., 2011; COLACURCI et al., 2003; TAKAHASHI et al., 2007), reduzindo o estresse oxidativo ou marcadores inflamatórios (CHRISTODOULAKOS; LAMBRINOUDAKI; BOTSIS, 2006; LEUNG et al., 2007; PINNA et al., 2006). Os SERMs apresentam um bom perfil de segurança e exibem baixa incidência de efeitos colaterais. No entanto, estes medicamentos, bem como a terapia com estrogênio aumenta o risco de tromboembolismo venoso na fase pós-menopausa. Considerando que o tratamento com estrogênio, raloxifeno ou tamoxifeno parecem induzir mudanças no padrão de coagulação para pró-trombose, os pacientes devem ser exaustivamente informados sobre os riscos associados a essas terapias (ETTINGER et al., 1999; GIZZO et al., 2013; GURNEY et al., 2014; HERNANDEZ et al., 2009; MANSON et al., 2003; SHAH et al., 2012; WASSERTHEIL-SMOLLER et al., 2003). Portanto, embora estudos em longo prazo *in vitro* (HISAMOTO et al., 2001) e *in vivo* (PINNA et al., 2006) tenham demonstrado a melhora da disfunção cardiovascular conferida pelos SERMs, vale ressaltar que diversas variáveis, tais como sexo, função endotelial e espécie parecem afetar os resultados do tratamento. Essa informação, justifica maiores estudos sobre essas drogas para que tanto os mecanismos dos efeitos benéficos e não-benéficos sejam evidenciados, garantindo assim um tratamento seguro e eficaz.

1.5. INFLUÊNCIA DA DEFICIÊNCIA ESTROGÊNICA NO SISTEMA DE PEPTÍDEO NATRIURÉTICO ATRIAL

Tem sido demonstrado que o estrogênio tem influência profunda, sobretudo nos mecanismos envolvidos na resposta cardiovascular em modelos de deficiência estrogênica. Entretanto, poucos estudos investigaram os efeitos da terapia de reposição hormonal (TRH) com estrógeno no sistema ANP (MAFFEI et al., 2001; SPINETTI et al., 1997). DE MEDEIROS e colaboradores (2012) demonstraram que o tratamento com tibolona, uma substância sintética esteroidal, normalizou os níveis de ANP em ratas com deficiência estrogênica. SPINETTI e colaboradores (1997) realizou um estudo em mulheres na fase da pós menopausa e evidenciou que a terapia com estrogênio aumenta a secreção de ANP, permitindo assim uma modulação positiva na função cardiovascular.

Em relação aos efeitos crônicos do raloxifeno e tamoxifeno no sistema peptídeo natriurético em modelos animais de deficiência de estrogênio não há dados disponíveis na literatura. Por ser o sistema de peptídeo importante no controle cardiovascular e ter se tornado objeto de estudo do nosso trabalho, detalharemos o papel fisiológico deste sistema.

Em 1981, foi identificado por De Bold e colaboradores (1981) o primeiro peptídeo natriurético. Foi observado um potente efeito hipotensor e diurético em um experimento realizado pela infusão intravenosa de extrato atrial em ratos. Posteriormente, a substância responsável por esses efeitos, presente no interior dos miócitos atriais foi purificada (FLYNN; DE BOLD; DE BOLD, 1983) e apontado como o primeiro peptídeo da família dos hormônios natriuréticos cardíacos (SEIDMAN et al., 1984). Em seguida, a partir de extrato de encéfalo de porco, foram isolados dois outros peptídeos contendo estruturas semelhantes ao ANP, identificados como peptídeo natriurético cerebral (BNP) e peptídeo natriurético do tipo C ou CNP (SUDOH et al., 1988, 1990).

Desde a descoberta, vários estudos demonstram que os peptídeos natriuréticos cardíacos (ANP e BNP) e seus precursores moleculares podem

ser utilizados como marcadores úteis de doença cardíaca (BURNETT et al., 1986; JA et al., 2005; TG et al., 1993), devido sua ação como reguladores da pressão sanguínea e na homeostase de fluidos corporais, por meio de seus efeitos diurético, natriurético e vasodilatador (ESPINER et al., 1995; RUBATTU; VOLPE, 2001). O ANP aumenta o ritmo de filtração glomerular, inibe o transporte de sódio pelo segmento medular do ducto coletor (COGAN, 1986) aumenta a diurese e natriurese (ESPINER et al., 1995), estudos também relatam efeito antiinflamatório do ANP (KIEMER; VOLLMAR, 2001; LADETZKI-BAEHS et al., 2007; VOLLMAR, 2005)

Em relação a sua estrutura os três subtipos apresentam em comum a formação de um anel composto por 17 aminoácidos ligados por pontes de dissulfeto entre dois resíduos de cisteína, nas posições 7 e 23, sendo essa formação essencial para o reconhecimento do peptídeo pelo receptor de membrana. Os ANP, BNP e CNP são estruturalmente semelhantes (Figura 6), mas geneticamente distintos e são sintetizados em locais diferentes (POTTER et al., 2006). O ANP e o BNP são de origem cardíaca e o CNP de origem endotelial. O gene precursor do ANP codifica 151 aminoácidos (pré-pro-hormônio) que proteoliticamente é processado à forma de pro-hormônio contendo 126 aminoácidos (proANP1-126) estocados no interior dos miócitos atriais.

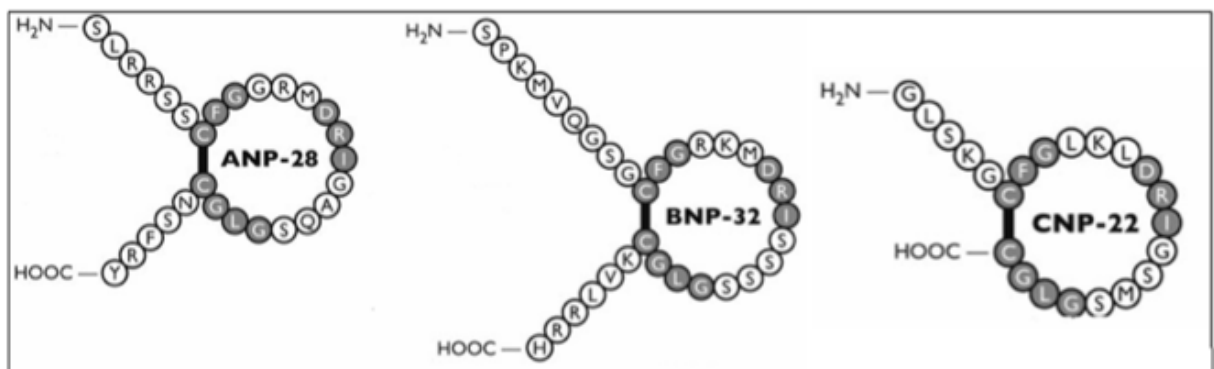


Figura 6: Estrutura molecular dos peptídeos natriuréticos. FONTE: Adaptado de Potter *et al.* (2006).

A liberação do ANP pode ocorrer por estímulos mecânicos ou humorais, no qual, o principal estímulo para a sua liberação é a distensão da parede atrial

resultante do aumento do retorno venoso. Uma vez secretado, o ANP perfunde para o seio coronário onde tem sua distribuição facilitada para vários órgãos alvos (POTTER; ABBEY-HOSCH; DICKEY, 2006). Vale ressaltar que o ANP tem um importante papel na regulação do sistema cardiovascular (LEVIN et al., 1998) sendo o único peptídeo estudado neste presente trabalho.

Para o ANP exercer seus efeitos biológicos torna-se necessária a ligação em receptores denominados receptores de peptídeos natriuréticos (NPR) ou chamados de receptores de guanilato ciclase específicos de membrana, localizados na superfície das células alvo (BAXTER, 2004). São conhecidos três tipos de receptores com afinidade aos peptídeos natriuréticos: NPR tipo A (NPR-A), tipo B (NPR-B) e tipo C (NPR-C), este último, também chamado de receptor de *clearance*. Os NPR-A e NPR-B possuem atividade guanilato ciclase e são mediadores das atividades biológicas dos peptídeos natriuréticos. O NPR-C não possui atividade guanilato ciclase e sua função é a remoção dos peptídeos natriuréticos da circulação (PANDEY, 2005; POTTER et al., 2006). O ANP se liga ao NPR-A e ao NPR-C. Em humanos e em ratos o RNAm do NPR-A é altamente expresso nos rins, adrenal, íleo terminal, tecido adiposo, na aorta e pulmão (POTTER; ABBEY-HOSCH; DICKEY, 2006) e em células do sistema imunológico (VOLLMAR, 2005).

O NPR-A é composto por domínios extracelular, intracelular e transmembrana. A parte extracelular liga-se ao ANP e a parte intracelular promove a síntese de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) mediada pela guanilato ciclase a partir da guanosina trifosfato (GTP). O GMPc, chamado de segundo mensageiro, é o responsável pela maioria das ações biológicas do ANP (figura 7).

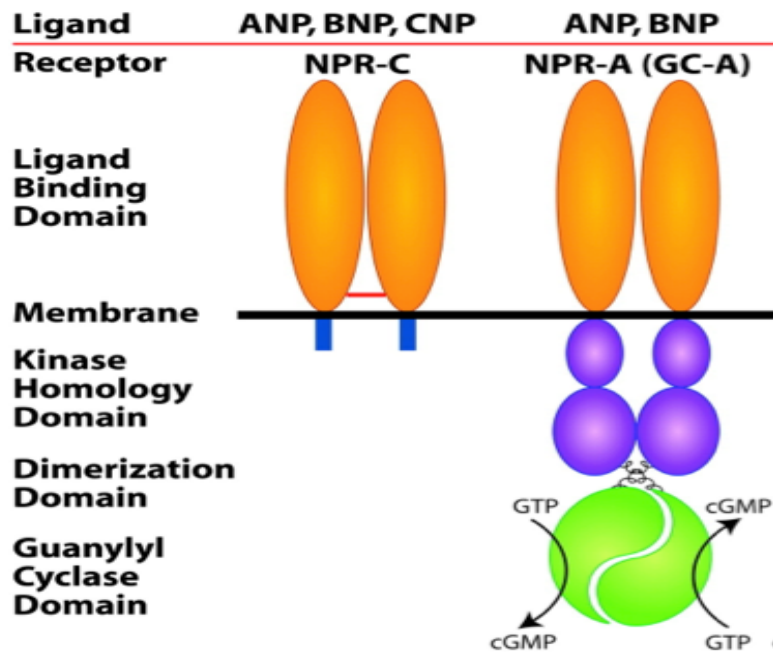


Figura 7: Receptores de membrana dos peptídeos natriuréticos do tipo A (NPR-A) e tipo C (NPR-C). Fonte: Adaptado de Potter et al (2006)

Além disso, os efeitos do ANP sobre a pressão arterial se devem a combinação dos efeitos sobre o volume intravascular, natriurese, diurese e relaxamento vascular. Camundongos transgênicos com maior expressão do gene ANP têm menor pressão sanguínea, enquanto animais com o gene para ANP inativado são propensos a desenvolver hipertensão (MELO et al., 1998).

Uma possível via pela qual a produção dos peptídeos natriuréticos pode ser influenciada pelo estrógeno está relacionada ao efeito direto dos hormônios ovarianos sobre a expressão gênica e liberação cardíaca dos peptídeos natriuréticos. HONG e colaboradores (1992) demonstraram que a ovariectomia diminuiu o ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) de ANP transcrito no átrio, e após um tratamento por 7 dias em ratas Wistar recebendo estradiol e progesterona, ocorreu um aumento da expressão gênica atrial de ANP.

2. JUSTIFICATIVA

A revisão literária desenvolvida, mostra que a deficiência estrogênica pode acarretar sérios problemas à saúde da mulher na fase da pós-menopausa, pois como já é sabido, nesta fase da vida há aumento na incidência de doenças cardiovasculares, risco de osteoporose, distúrbios cognitivos, sintomas vasomotores entre outros, quando comparado à fase da pré-menopausa.

O raloxifeno e tamoxifeno, moduladores seletivos de receptores de estrogênio, já são possíveis drogas que mulheres na fase da pós-menopausa, poderiam estar utilizando, principalmente, com a finalidade de tratamento para osteoporose e câncer de mama, respectivamente. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar, os efeitos da terapia com SERMs como um adjuvante benéfico sobre o sistema cardiovascular, uma vez que estudos de terapia com estrogênio são contraditórios, pois podem apresentar aumento de eventos cardiovasculares em mulheres que receberam essa terapia. Para isto, ratas ovariectomizadas foram tratadas por 14 dias com estrogênio, raloxifeno e tamoxifeno e a aorta foi utilizada para investigar os possíveis danos vasculares, assim como demais experimentos foram realizados para observar a influência da deficiência estrogênica.

3. OBJETIVO

3.1. OBJETIVO GERAL:

Determinar possíveis alterações no sistema de peptídeos natriuréticos e associar com marcadores de remodelamento cardíaco, assim como avaliar a reatividade vascular de anéis de aorta em ratas ovariectomizadas e tratadas com 17 β -estradiol, raloxifeno ou tamoxifeno.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Comparar os efeitos da deficiência de estrogênio e dos tratamentos sobre os parâmetros abaixo relacionados:

1. Analisar parâmetros morfológicos no ventrículo esquerdo.
2. Analisar a reatividade vascular de anéis de aorta;
3. Verificar a expressão protéica de eNOS e iNOS nos segmentos da aorta torácica;
4. Realizar a dosagem plasmática, conteúdo e expressão do peptídeo natriurético atrial (ANP) nos átrios;
5. Verificar a expressão da subunidade p65 do fator de transcrição NFkB e o fator de necrose tumoral alpha (TNF- α) no ventrículo esquerdo;
6. Analisar a formação de espécies reativas vascular de oxigênio "in situ"

4. METODOLOGIA

4.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizadas ratas Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), com peso corporal variando entre (150-200 g). Esses animais foram fornecidos pelo Biotério de Pesquisa da UFES. 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*. Os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa n° 012/2008.

4.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS:

Dois blocos de tratamentos foram utilizados para avaliar os parâmetros estudados devido ao grande número de protocolos experimentais realizados. O número de animais por experimento variou 5-8 (n=5-8 dependendo do protocolo). Tanto no bloco A quanto no bloco B as fêmeas foram separadas em cinco grupos e receberam os mesmos tratamentos. Nos grupos que fizeram parte do bloco A foram realizados os protocolos referentes à reatividade vascular dos anéis de aorta e coletados o plasma, coração (histologia) e útero. No bloco B, os animais tiveram os tecidos coletados (coração e vasos) para realização da expressão protéica por western blot e para verificação da produção de espécies reativas do oxigênio em anéis de aorta.

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

- Wistar Sham
- Wistar ovariectomizada
- Wistar ovariectomizada tratada com estrogênio (0,5µg/Kg/dia)
- Wistar ovariectomizada tratada com raloxifeno (2mg/Kg/dia)
- Wistar ovariectomizada tratada com tamoxifeno (1mg/Kg/dia)

4.3 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Os experimentos foram realizados seguindo-se o cronograma abaixo:

- 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; procedimento para a reatividade nos anéis de aorta, retirada de sangue, retirada e pesagem do útero e coração e armazenamento da aorta em meios apropriados.

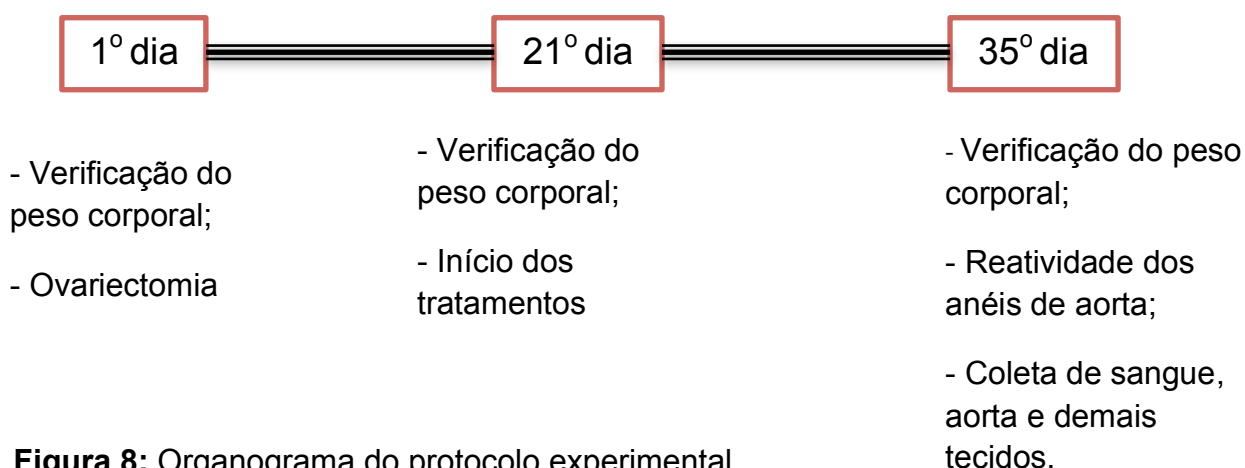


Figura 8: Organograma do protocolo experimental

4.4. OVARIECTOMIA

Após anestesia intraperitoneal com mistura de ketamina (30mg.kg^{-1}) e xilazina (3mg.kg^{-1}), as fêmeas foram submetidas a uma incisão de 1 a 1,5 cm na pele, entre a última costela e a coxa, a 1 cm da linha mediana, seguida de uma incisão na camada muscular, abrindo a cavidade peritoneal para posterior remoção dos ovários e ligadura da trompa uterina. Após a retirada dos ovários, foi realizada sutura da musculatura e pele. O mesmo processo foi realizado no lado oposto. 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.

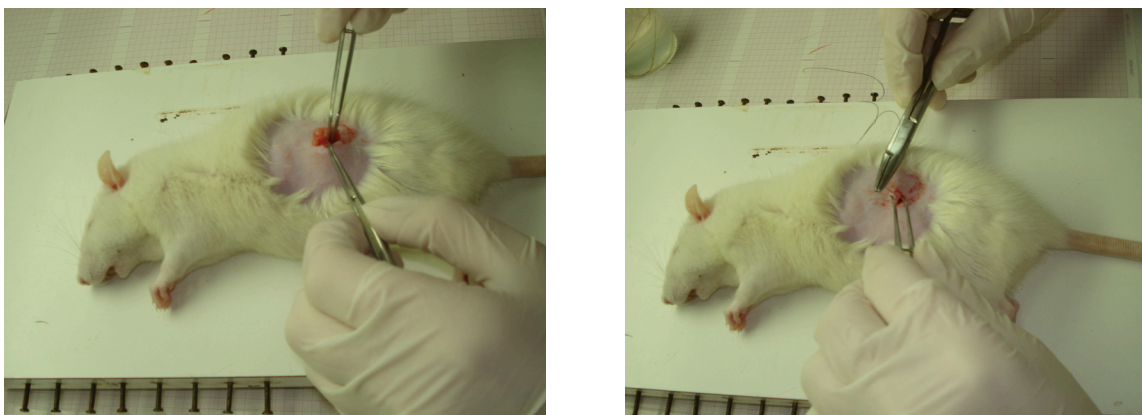


Figura 9: Procedimento da ovariectomia bilateral.

4.5 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 (CALIMAN et al., 2013; DE MEDEIROS et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2014).

O raloxifeno (Eli Lilly, Indianapolis, IN, USA) e o tamoxifeno (Sandoz, Cambé, PR, Brazil) foram administrados por via oral (gavagem), na forma de suspensão aquosa, numa dose diária de 2,0mg/kg de peso corporal e 1,0mg/kg de peso corporal, respectivamente.

O grupo estrogênio foi tratado com 17 β -estradiol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) dissolvido em óleo de amêndoas, numa dose diária de 0,5 μ g/kg de peso corporal por via parenteral direta (subcutânea), transfixando-se a massa muscular da coxa traseira da rata, alternando as patas. Os grupos SHAM e ovariectomizada receberam o veiculo (água) sob forma de gavagem e óleo de amendoim (subcutânea), simulando as mesmas condições nas quais os animais tratados foram submetidos.

4.6 EVOLUÇÃO PONDERAL E PESO DO ÚTERO E CORAÇÃO

As fêmeas foram pesadas no início do protocolo experimental e separadas aleatoriamente entre os grupos SHAM, OVX, EST, RAL ou TAM. 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.

4.7 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 (Figura 10). 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). 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.

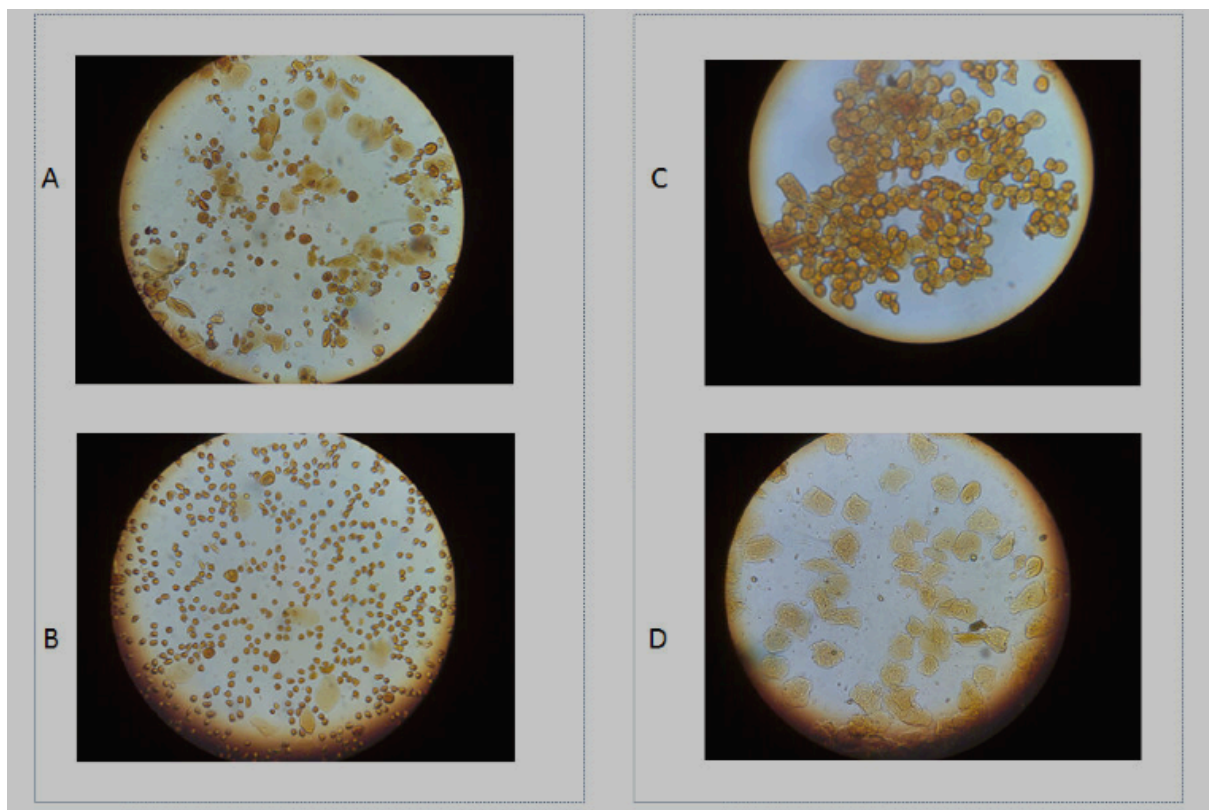


Figura 10: Representação do ciclo estral detectada por meio do esfregaço vaginal em microscópio ótico (aumento 40x) A- Metaestro ou Diestro I- caracterizada por um pouco das 3 células. (Células Nucleadas, Epiteliais e Leucócitos). B- Diestro II- caracterizada por infiltrado leucocitário. C- Proestro – caracterizada por presença predominante de células nucleadas. D- Estro – caracterizada por presença predominante de células epiteliais. Fonte: DALPIAZ (2011)

4.8 REATIVIDADE VASCULAR EM ANEIS DE AORTA ISOLADOS

No último dia do protocolo experimental o ramo descendente da aorta torácica foi cuidadosamente removido e rapidamente imerso em uma placa de petri contendo solução nutritora de Krebs-Henseleit composta por (em mM): NaCl 127; KCl 4,7; CaCl₂.2H₂O 2,5; MgSO₄.7H₂O 1,2; KH₂PO₄ 1,17; NaHCO₃ 24; Glicose 11; EDTA 0,01, aerada com mistura carbogênica contendo 5% de CO₂ e 95% de O₂. Esta solução foi mantida com pH 7,4. Em seguida, foi removido o tecido conjuntivo e adiposo adjacente à artéria e então, o vaso foi cortado em anéis de 4 a 5 mm de comprimento. Para a obtenção do registro de tensão isométrica, cada anel vascular foi colocado em um banho, contendo 5mL de solução de Krebs-Henseleit, aerado continuamente com mistura carbogênica, mantido à temperatura de 37° C e pH de 7,4, de acordo com o método descrito por MARÍN (1993). Os anéis isolados foram montados em uma preparação com suportes de acrílico fixados em cubas de vidro (Figura 11). Essa montagem foi realizada de forma que as duas hastes metálicas ficaram paralelas na luz do vaso, sendo assim, qualquer alteração do diâmetro do vaso foi captada pelo transdutor de força que estava acoplado a um sistema de aquisição de dados. Uma tensão de repouso de 1,0g foi dada aos anéis, reajustada, quando necessária, durante período de 45 minutos de estabilização.

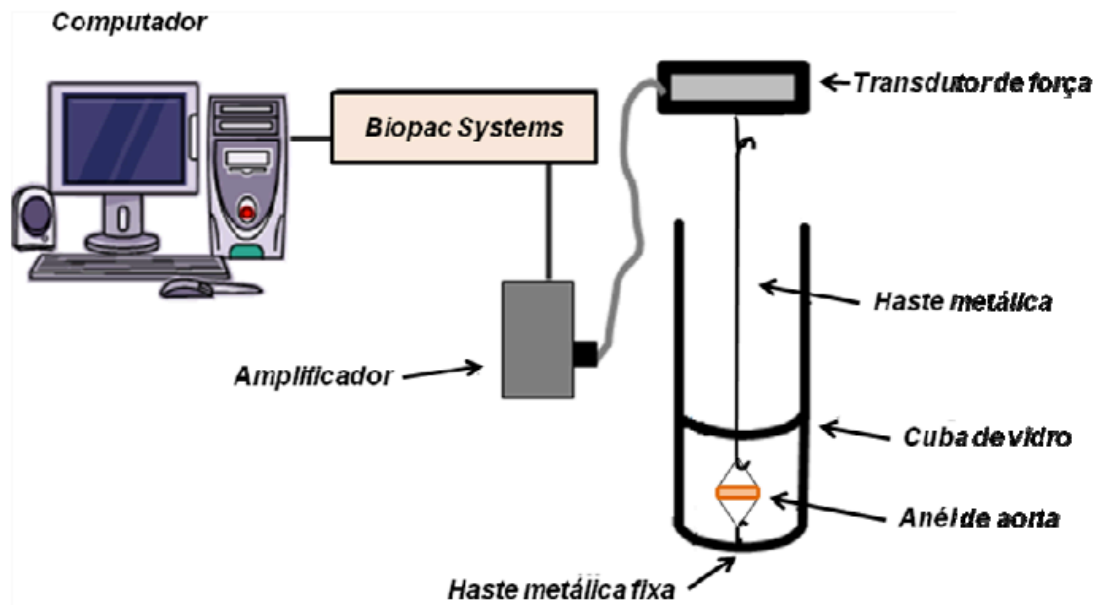


Figura 11: Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular “*in vitro*”. (modificado Dias, 2007).

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

Em seguida, foi avaliada a integridade funcional do endotélio. Os anéis foram pré contraídos com fenilefrina (0,1 μ M nos segmentos da artéria aorta) até atingir 50- 75% da contração máxima ao segundo KCl. Ao final da contração, ao atingir o platô, foi administrada uma dose única de acetilcolina (ACh) 10 μ M. A integridade funcional do endotélio foi considerada apenas nos anéis onde a acetilcolina foi capaz de induzir mais de 80% de inibição da contração à

fenilefrina. Esse procedimento foi realizado em todos os grupos estudados (SHAM, OVX, EST, RAL e TAM), antes de iniciar as curvas dose-resposta (Figura 12).

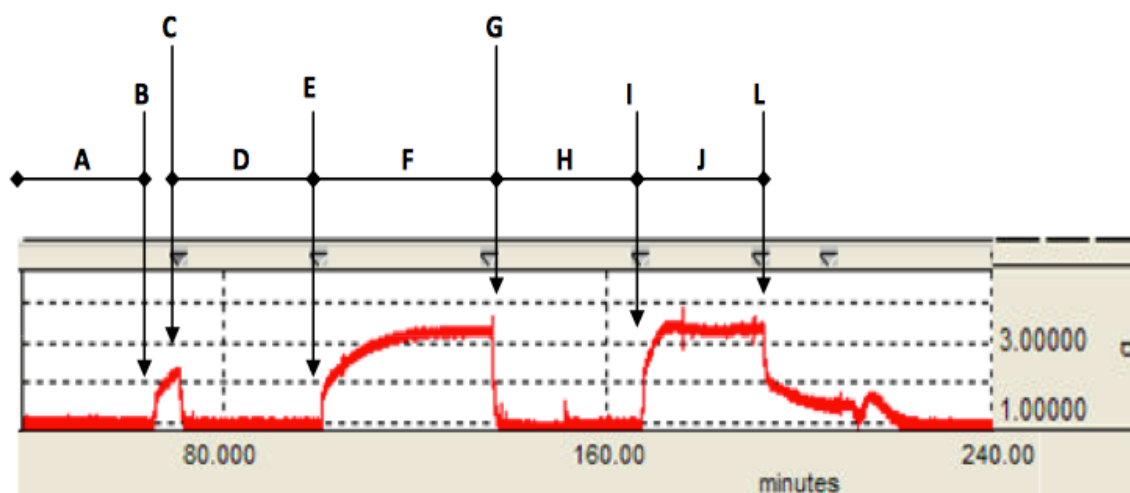


Figura 12: Registro com curvas representando o teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e avaliação da integridade funcional do endotélio. Avaliação da viabilidade do músculo liso vascular com KCl: A) Período de estabilização inicial (45 min permanecendo na tensão de 0.9 a 1,3 g); B) Adição de KCl (75 mM) ao banho; C) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; D) Período de estabilização (30 min); E) Adição de KCl (75 mM) ao banho; F) Platô da contração induzida pelo KCl (75 mM); G) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; H) Período de estabilização (30 min). Avaliação da integridade funcional do endotélio: I) Pré-contração com fenilefrina (Fe) 10-6M; J) Platô da contração induzida pela Fe; L) Adição de acetilcolina (ACh) 10-5M. O tempo foi registrado em minutos, eixo horizontal (intervalo de 80 min) e a força em gramas (g), eixo vertical. (modificado de Dias, 2007).

A resposta contrátil (tensão isométrica, em g) foi medida usando um transdutor de força (FT03 modelo, Grass Instrumento Co.) acoplado a um sistema de aquisição de dados (MP100, BiopacSystems, Inc., CA) e foi expressa em

porcentagens das respostas máximas. A sensibilidade da aorta foi avaliada pela determinação do valor pD_2 ($-\log EC_{50}$), que corresponde ao logaritmo negativo da concentração molar do agonista (EC_{50}) que determina um efeito igual a 50% da resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) em experimentos individuais.

4.8.1 Efeito do tratamento com Estrogênio e SERMs na resposta de relaxamento dependente do endotélio

A função endotelial foi avaliada por meio do relaxamento induzido pelo agonista muscarínico acetilcolina (ACh). Para tal, os anéis de aorta com endotélio foram pré-contraídos com fenilefrina $10^{-6}M$. Uma vez obtido o platô, foram realizadas as curvas concentração-resposta, cumulativas à acetilcolina (10^{-11} a $3 \cdot 10^{-4}$ M).

4.8.2. Influência do tratamento com Estrogênio e SERMs na via do óxido nítrico

Com a finalidade de compreender a participação do óxido nítrico (NO) na resposta contrátil à fenilefrina, os anéis de aorta foram incubados com um inibidor não-seletivo da enzima óxido nítrico sintase (NOS), o NG-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, $100 \mu M$).

4.8.3. Influência do tratamento com Estrogênio e SERMs na isoforma induzível de óxido nítrico (iNOS)

Com a finalidade de compreender a participação da iNOS na resposta contrátil à fenilefrina, os anéis de aorta foram incubados com um inibidor não seletivo dessa enzima, a Aminoguanidina ($50 \mu M$).

4.8.4. Envolvimento das espécies reativas de oxigênio (EROS) com Estrogênio e SERMs sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica

Para verificar o envolvimento das EROS sobre a resposta contrátil à fenilefrina foi utilizado a apocinina (Apo, $100 \mu M$), um inibidor seletivo da enzima NADPH oxidase, ou seja, inibe uma das principais enzimas formadoras de radicais livres;

4.9. DOSAGEM DE ANP

As dosagens de ANP foram feitas por radioimunoensaio de duplo-anticorpo (RIE) no laboratório da profa. Adelina Martha dos Reis no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. O plasma foi submetido à extração usando-se colunas Sep-Pak C 18 (WatersAssociates, Milford, MA). As colunas de Sep-Pak foram ativadas com 8ml de acetonitrila e lavadas com 8ml de acetato de amônia a 0,2%, pH 4. A seguir, o plasma foi aplicado à coluna. Após lavagem com 5ml de acetato de amônia, o ANP adsorvido foi eluído com 3ml de acetonitrila 60% em acetato de amônia 0,2% e evaporado em Speed-Vac. Após a evaporação, as amostras foram reconstituídas com tampão (fosfato de sódio 0,1 M, NaCl 0,14M, albumina bovina 0,1%, azida sódica 0,01%, triton X-100 0,1% em pH 7,4) e então, dosadas por RIE. O tecido cardíaco, átrios direito e esquerdo, foram homogeneizados em solução de ácido acético 0,1 N, contendo inibidores de proteases (EDTA 10⁻⁵M, Pepstatina 0,5x10⁻⁵Me PMSF 10⁻⁵M). Após centrifugação, alíquotas do sobrenadante foram diluídas em tampão fosfato para determinação do ANP por RIE.

4.9.1 Iodação de ANP

A iodação de ANP de rato (Ser101-Tyr126) (Peninsula Laboratories Inc, Belmont, CA,USA) foi feita pelo método de Lactoperoxidase com 125I-sódico como descrito por GUTKOWSKA et al (1987). A purificação da fração monoiodinada foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

4.9.2 Radioimunoensaio para ANP

ANP imunorreativo foi determinado por radioimunoensaio de acordo com técnica descrita por GUTKOWSKA et al (1987). O ANP extraído por Sep-Pak foi reconstituído em 0,5 ml de tampão (fosfato de sódio 0,1 M, NaCl 0,14M, albumina bovina 0,1%, azida sódica 0,01 %, triton X-100 0,1% - pH 7.4). As amostras de 100µl foram incubadas "overnight" com 100µl de anticorpo anti-ANP a 4°C.

Adicionou-se 100µl (8.000cpm) de 125I-ANP e incubou-se por mais 24 horas. A separação do imunocomplexo foi feita por precipitação com segundo anticorpo

(soro de cabra anti gama-globulina de coelho). Após duas horas à temperatura ambiente adicionou-se 0,5ml de polietilenoglicol 6,25% em água. Os tubos foram centrifugados por 20 minutos, 4°C, a 1.500xg. Após aspiração do sobrenadante, a radioatividade do precipitado foi determinada por contador gama (LKB).

4.9.3. Análise de RNA

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

4.9.4. Extração de RNAm

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

A fase aquosa foi transferida cuidadosamente (para não contaminar RNA total com DNA genômico) para novos tubos plásticos estéreis e identificados. Álcool Isopropílico (0,5ml) foi adicionado ao RNA total para promover a sua precipitação e após 10 minutos de repouso, seguiu-se nova centrifugação

(15.300xg, 4°C, 15 minutos). O precipitado de RNA foi então lavado com 1ml de etanol a 75% seguido de centrifugação curta (9600xg, 4°C, 5 minutos).

O precipitado de RNA foi ressuscitado em 50µl de água tratada com dietilpircarbonato (DEPC) e aquecida a 58°C por 10 minutos para desnaturação.

Para a quantificação, alíquotas de 6µl da solução de RNA foram diluídas em 0,3ml de água tratada (DPEC) e a solução resultante foi submetida à leitura em espectrofotômetro nas faixas de 260 e 280nm. A pureza do RNA foi considerada satisfatória quando a razão das absorbâncias a 260 e 280nm era superior a 1,7. Considerando que uma unidade de absorbância a 260nm corresponde a 40µg de RNA por ml de solução, a concentração de RNA na solução original foi calculada pela fórmula: $[RNA] = A_{260} \times D \times 40\mu\text{g/ml}$, onde A = absorbância e D = diluição da alíquota usada para a quantificação, no caso 100, visto que, 10µl de solução de RNA serão diluídos em 1 ml de água.

Após a extração, 1µg de RNA dos tecidos foram submetidos à transcrição reversa para posterior realização da PCR como será descrito posteriormente.

4.9.5. Síntese do DNA complementar (cDNA) - transcrição reversa

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

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

4.9.6. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real time - PCR)

Após a síntese do cDNA, foi realizada reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação do c-DNA para ANP com pares de "primers" baseados em seqüências previamente publicadas. Para amplificar ANP os seguintes

"primers" foram utilizados: CAG CAT GGG CTC CTT CTC CA e TCCGCT CTG GGC TCC AAT CCT.

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

A técnica que usa o composto *SYBR GREEN* tem como base uma molécula fluorogênica altamente específica ao DNA dupla fita. Essa molécula em solução exibe pouca fluorescência, mas durante a PCR várias moléculas fluorogênicas se ligam ao DNA, em locais formados por depressões da estrutura tridimensional da molécula de DNA (*minor groove*), aumentando consideravelmente a fluorescência emitida tornando possível a detecção dos fragmentos de DNA amplificados por aparelhos adequados. A análise da expressão diferencial através da PCR em tempo real é feita base a danos valores de CT (*threshold cycle*), definido como o ponto em que o sinal de fluorescência emitido tem o primeiro registro estatisticamente superior à fluorescência basal, o que sempre ocorre durante a fase exponencial de amplificação (GIBSON et al.,1996). Com isso são calculados os valores de quantificação absoluta ou relativa, dependendo do objetivo do estudo e dos dados gerados (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Para a reação de PCR em tempo real foi utilizado um protocolo básico em todas as reações, mantendo as concentrações usuais de reagente num volume final de 25µl.

Resumidamente a reação consistiu-se de: 2µl de cDNA e 23µl de uma solução *mix* composta por 3µl do *primer* senso (1 ou 5 pmol/µl), 3µl do *primer* antissenso (1 ou 5pmol/µl; Invitrogen, Brasil) e por 17µl de *SYBR® Green Master Mix* (AppliedBiosystems, Warrington WA, UK). Cada amostra foi feita em duplicata, inclusive os controles negativos que tiveram o cDNA, substituído pelo mesmo volume de água na reação.

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

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

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

4.10. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS PROTEICOS POR WESTERN BLOT

A técnica utilizada para detecção da expressão das proteínas eNOS, iNOS em aorta e das proteínas NF-κB (subunidade p65) e TNF-α no ventrículo esquerdo foi a de western blot, sendo utilizado o sistema descrito por LAEMMLI (1970).

4.10.1. Extração das proteínas

A aorta torácica foi cuidadosamente dissecada e mantidas a -80° C até o momento da homogeneização, que foi realizada em 200µL 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. Para dosagem do TNF-α foi realizado o mesmo procedimento acima descrito, porém utilizou-se o ventrículo esquerdo, sendo realizado com 1500µL 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 12000 rpm, 4°C por 20 minutos. Os sobrenadantes foram recolhidos e armazenados em alíquotas a -80 °C.

Já para a dosagem do NF-κB (subunidade p65) foram preparados extratos citoplasmáticos e nucleares a partir da outra porção do ventrículo esquerdo que foi cuidadosamente retirado e mantido a -80° C até o momento da homogeneização. Inicialmente as amostras foram trituradas cuidadosamente em 1500µL 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, 10µg/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 protéico citoplasmático, sendo armazenados a -80 °C. Os pellets foram lavados em 1000µL 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 ressuspensos em 200µL 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).

4.10.2. Dosagem de proteínas

A determinação do conteúdo de proteína total, extratos citoplasmático e nuclear foram feitas utilizando-se o método de Lowry (LOWRY et al., 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 100 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 μ L, 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.

4.10.3. 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 μ g para eNOS e iNOS; 60 μ g para NF- κ B (p65), 100 μ g TNF- α) foram submetidas a uma eletroforese em gel (acrilamida/bisacrilamida 29:1), sendo o gel de separação a 7,5% (eNOS; iNOS; NF- κ B) ou 12,5% (TNF- α) 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.

4.10.4 Transferência das proteínas

Depois de separadas, as proteínas para eNOS e iNOS 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 NF κ B (p65) e TNF- α para as membranas de PVDF foram realizadas em cuba molhada (Biorad), por 2:00 hs, 60 volts a 4°C, utilizando o mesmo tampão de transferência.

4.10.5 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), NF- κ B (p65) e TNF- α (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), β -actina (1:1500, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) e GAPDH (1:5000, 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 as membranas contendo anti-eNOS, anti-iNOS e anti-TNF- α foram incubadas com o anticorpo secundário (IgG, anti-mouse conjugado para fosfatase alcalina - 1:3000, Abcam Inc.) e as membranas contendo anti-p65 NF- κ B foram incubadas com o anticorpo secundário (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, sendo a β -actina para eNOS e iNOS, e GAPDH para TNF- α , com vista a diminuir os possíveis erros associados às variações nas concentrações das proteínas. Para análise do NF κ B foi realizado a razão nuclear/citoplasmática. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias (UA).

4.11. ESTUDO DA GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM ANÉIS DE AORTA – 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.

Após os animais serem eutanasiados, a aorta 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 em geladeira. Após este período, estas foram preparadas e congeladas em ocetato (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 μm) 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 μM (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.

4.12. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO CORAÇÃO

Os corações foram retirados afim de se estudar possíveis alterações cardíacas promovidos pela deficiência estrogênica. Após esse procedimento, o ventrículo esquerdo (VE) de cada animal, foi acondicionado em solução formol neutra a 10% tamponada, por um período de 24 horas. Após a clivagem do coração, os fragmentos foram incluídos em parafina. Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo rotativo (Leica® RM 2125RT; Nussloch, Germany), com cinco micrômetros de espessura. Os cortes histológicos foram estendidos em lâminas de vidro e corados pelo método de Hematoxilina-Eosina (HE) para a avaliação morfométrica dos miócitos cardíaco e possível hipertrofia celular.

A avaliação histológica foi realizada por patologista, sem conhecimento prévio da divisão dos grupos, em microscópio ótico binocular (Leica DM/LS, Leica – Germany) acoplado ao sistema de aquisição e análise histológica (MOTICOM 2000; MOTIC INSTRUMENTS INC., Canadá). A análise morfométrica foi realizada pela contagem do número do núcleo de miócitos por campo e pela medida da área do núcleo do miócito, sob um aumento de 400X (ANDRADE et al., 2007; MONTEIRO et al., 2008)

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM).

Os resultados de reatividade vascular das curvas concentração-resposta à fenilefrina foram normalizados em função da resposta máxima de contração ao KCl (75 mM) e estão expressos em %. As respostas de relaxamento dependente do endotélio, evocadas pela acetilcolina, foram expressas em porcentagem de relaxamento em relação à pré-contração obtida pela fenilefrina.

Para a determinação dos valores de resposta máxima ($R_{\text{máx}}$) e pD_2 ($-\log EC_{50}$, que corresponde ao valor da concentração de fenilefrina que produz 50% da resposta máxima), em resposta aos diferentes agonistas utilizados, foi realizada uma análise de regressão não-linear, obtida por meio da análise das curvas concentração-resposta utilizando-se Graph Prism Software (San Diego, CA, USA).

Com a finalidade de comparar a magnitude de efeito dos fármacos sobre a resposta contrátil à fenilefrina dos grupos estudados, alguns resultados foram expressos como diferenças das áreas abaixo das curvas (dAUC) de concentração-resposta à fenilefrina. A dAUC foi calculada para cada curva concentração-resposta e a diferença está expressa como porcentagem da diferença da AUC (dAUC%) da curva controle correspondente. A análise estatística dos resultados foi realizada análise de variância (ANOVA), uma e/ou duas vias para medidas repetidas ou completamente randomizada. Quando o ANOVA apresentava diferença era realizada o *post-hoc* de Tukey, utilizando-se Graph Prism Software (San Diego, CA, USA).

Na análise dos dados do sistema de peptídeos foi efetuada análise de variância de uma via (ANOVA). Quando o ANOVA apresentava diferença era realizada o *post-hoc* de Newman-Keuls. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

6. RESULTADOS

6.1. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS PONDERAIS

Ao longo de 35 dias do experimento o peso corporal dos animais experimentais foi medido. Na tabela 1 encontram-se os resultados obtidos nos grupos SHAM, ovariectomizado (OVX), ovariectomizado tratado com 17β -estradiol (EST), raloxifeno (RAL) e Tamoxifeno (TAM) com relação aos pesos corporais inicial e final, assim como o peso do útero e do coração.

No início do experimento não houve diferença significativa nos pesos corporais entre os grupos. Porém, ao final do tratamento foi observado que o grupo OVX, que recebeu apenas veículo, ocorreu aumento significativo de peso quando comparado ao grupo SHAM. Em contrapartida, no grupo TAM houve pequeno ganho de peso, ficando com peso corporal abaixo do SHAM. Os animais do grupo EST e RAL não apresentaram diferença em relação ao peso corporal ao serem comparados ao grupo SHAM.

Para avaliar os efeitos do tratamento com raloxifeno, tamoxifeno e 17β -estradiol sobre o útero e o coração, ao final do protocolo experimental, as vísceras foram retiradas e pesadas. Observa-se tabela 1, uma redução significativa dos valores da razão do peso do útero, comprovando a eficácia da ovariectomia nas fêmeas OVX quando comparadas ao grupo SHAM. Os valores observados no grupo RAL e TAM, apresentaram aumento parcial no peso do útero. O tratamento com EST reverteu a hipotrofia observada nas ratas que sofreram ovariectomia, retornando a valores semelhantes ao grupo SHAM.

Tabela 1. Parâmetros ponderais de peso corporal (inicial e final) e peso de órgãos (útero e coração) em gramas (g) nos grupos Fêmea SHAM, Fêmea Ovariectomizada (OVX), Fêmeas Ovariectomizadas tratadas com 17 β -estradiol (EST), Raloxifeno (RAL) e Tamoxifeno (TAM).

Dados Ponderais	Peso corporal	Peso corporal	Peso	Peso do
GRUPOS	Inicial (g)	Final (g)	Uterino (g)	Coração (g)
SHAM (n=07)	201 \pm 2	251.2 \pm 3	0.48 \pm 0.03	0.66 \pm 0.7
OVX (n=07)	203 \pm 4	295.9 \pm 3**	0.07 \pm 0.03**	0.67 \pm 1.3
EST (n=07)	202 \pm 3	257.9 \pm 3	0.42 \pm 0.05	0.69 \pm 1.2
RAL (n=07)	203 \pm 5	252.7 \pm 2	0.29 \pm 0.02 [‡]	0.66 \pm 0.9
TAM (n=07)	202 \pm 6	220.6 \pm 7 [†]	0.28 \pm 0.04 [‡]	0.68 \pm 1.0

Os resultados estão expressos em média \pm EPM. Significância estatística está indicada por **p<0.01 vs. SHAM; [†]p<0.05 vs. SHAM, OVX, EST e RAL; [‡]p<0.05 vs. SHAM e EST .

6.2. EFEITO DO TRATAMENTO COM ESTROGÊNIO E SERMs SOBRE PARÂMETROS HISTOLÓGICOS DE FÊMEAS OVARIECTOMIZADAS

A figura 13 demonstra a análise histológica do coração dos grupos SHAM, Fêmea Ovariectomizada (OVX), Fêmeas Ovariectomizadas tratadas com 17 β -estradiol (EST), Raloxifeno (RAL) e Tamoxifeno (TAM). Observa-se que os tratamentos com EST, RAL e TAM não apresentaram diferença em relação ao grupo SHAM em nos parâmetros analisados, assim como, a ovariectomia (grupo OVX) não promoveu qualquer alteração no tecido analisado, sendo semelhante aos demais grupos, ou seja, em todos os grupos analisados, o

número de núcleos/campo, assim como a área dos miócitos foram semelhantes (tabela 2 e figura 12)

Tabela 2. Dados histológicos do coração (número de núcleos/campo e área dos miócitos) realizada por meio da técnica de coloração hematoxilina-eosina, nos grupos Fêmea SHAM, Fêmea Ovariectomizada (OVX), Fêmeas Ovariectomizadas tratadas com 17 β -estradiol (EST), Raloxifeno (RAL) e Tamoxifeno (TAM).

Dados Histológicos	Número de	Área do núcleo miócitos
GRUPOS	núcleos/campo	(μm^2)
SHAM(n=07)	7.233 \pm 1.23	10931.43 \pm 3456
OVX (n=07)	7.166 \pm 1.09	10991.21 \pm 3467.78
EST (n=07)	7.200 \pm 1.53	10362.30 \pm 2657.32
RAL (n=07)	7.266 \pm 1.34	10542.44 \pm 3789.65
TAM (n=07)	7.300 \pm 1.32	10315.43 \pm 3987.67

Os resultados estão expressos em média \pm EPM.

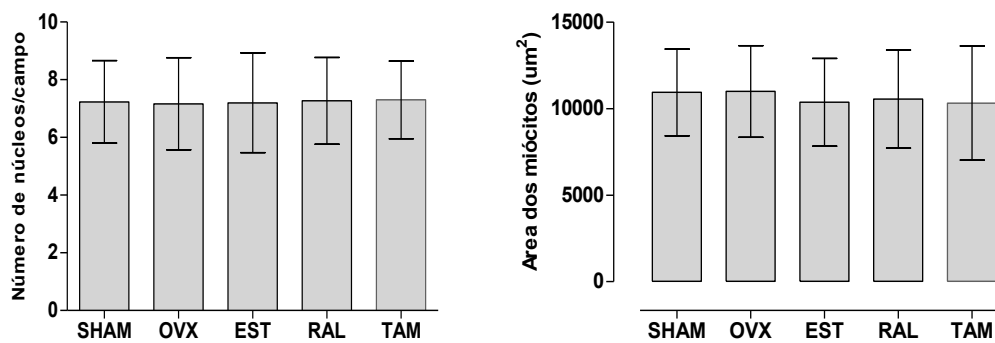
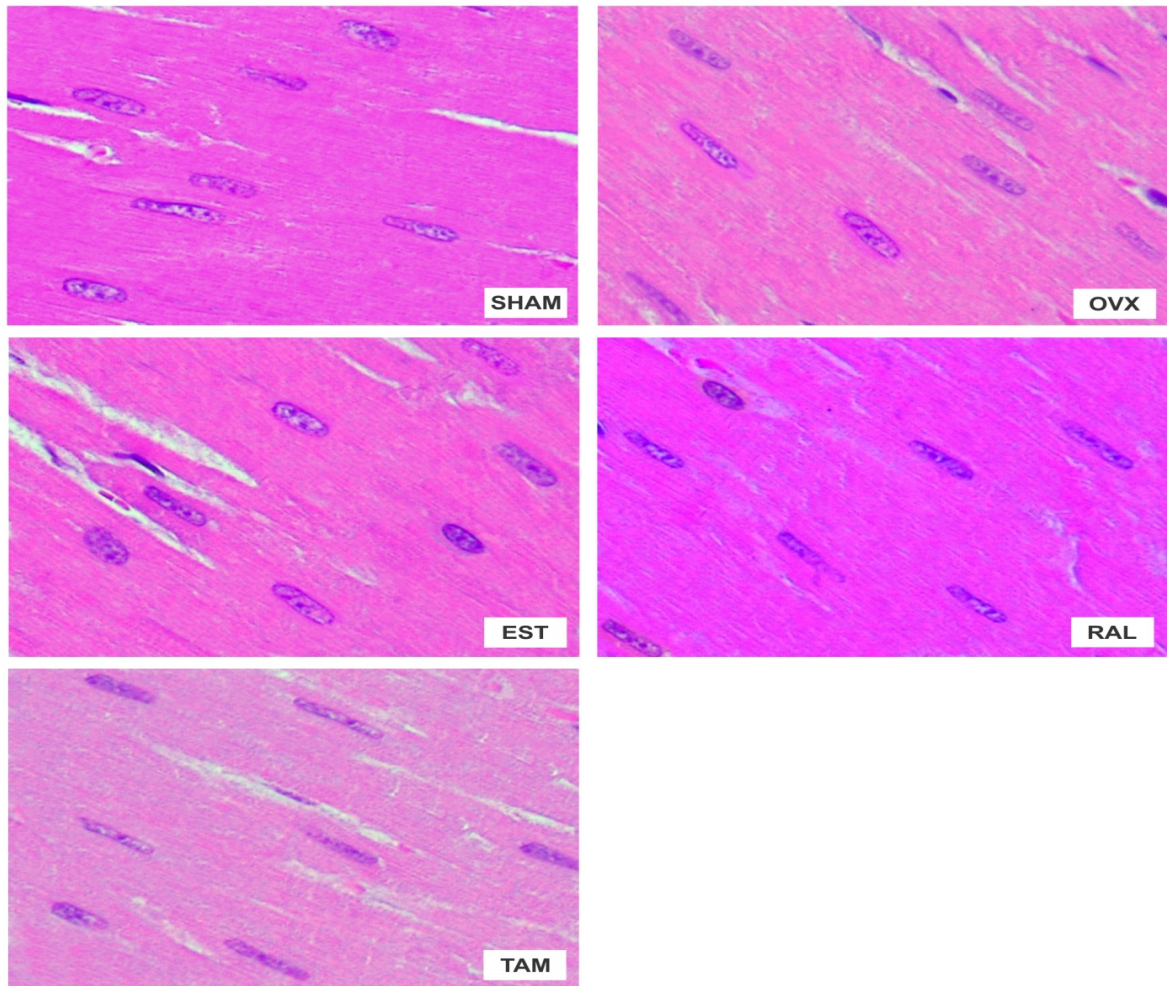


Figura 13: Análise histológica do coração dos grupos SHAM, Ovariectomizada (OVX), 17 β -estradiol (EST), Raloxifeno (RAL) e Tamoxifeno (TAM). Amostras coradas com o método Hematoxilina/Eosina (HE). 400x. Abaixo gráfico de barras quantificando o número do núcleo de miócitos/campo e área do núcleo dos miócitos. Análises morfométricas foram realizadas utilizando Moticam Plus 2000 software. Os valores foram expressos como média \pm E.P.M.

6.3. AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE VASCULAR DA AORTA

Após o período de estabilização dos anéis, a exposição dos segmentos arteriais ao KCl (75mM) promoveu resposta contrátil com magnitude semelhante em todos os grupos experimentais com endotélio íntegro (Tabela 3).

Tabela 3: Valores de resposta contrátil ao Cloreto de Potássio (KCl) em anéis isolados de aorta, com endotélio de fêmeas SHAM, ovariectomizadas e ovariectomizadas tratadas com 17 β -estradiol (EST), raloxifeno (RLX) e tamoxifeno (TAM).

	Contração (g) KCl (75mM)
SHAM	2.29 \pm 0.06
OVX	2.67 \pm 0.09
EST	2.67 \pm 0.12
RAL	2.30 \pm 0.09
TAM	2.10 \pm 0.09

Dados foram expressos como média \pm EPM.

6.3.1. EFEITO DO TRATAMENTO COM ESTROGÊNIO E SERMs SOBRE A REATIVIDADE À FENILEFRINA NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA DE FÊMEAS OVARIECTOMIZADAS

A fenilefrina (agonista α 1 adrenérgico) promoveu resposta vasoconstritora concentração-dependente nos anéis de aorta de animais dos grupos SHAM, Fêmea Ovariectomizada (OVX), Fêmeas Ovariectomizadas tratadas com 17 β -estradiol (EST), Raloxifeno (RAL) e Tamoxifeno (TAM) (Figura 14). No entanto, a resposta máxima foi maior nos segmentos arteriais dos animais do grupo ovariectomizado quando comparado ao grupo SHAM (tabela 4). Os tratamentos com 17 β -estradiol e SERMs foram capazes de normalizarem essa alteração na reatividade (tabela 4). Não houve diferença entre os grupos

estudados na sensibilidade (pD₂) (tabela 4). A resposta à fenilefrina foi expressa em porcentagem da contração máxima.

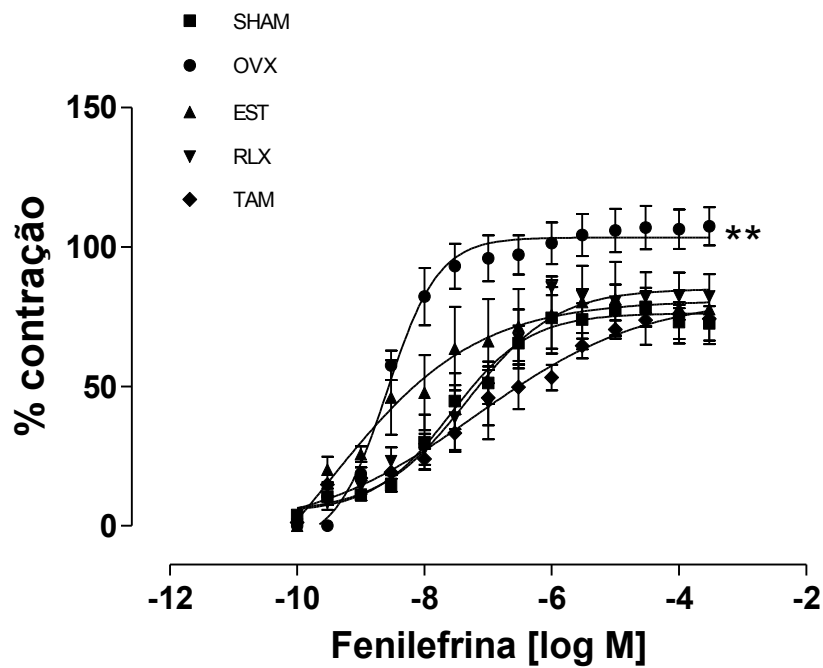
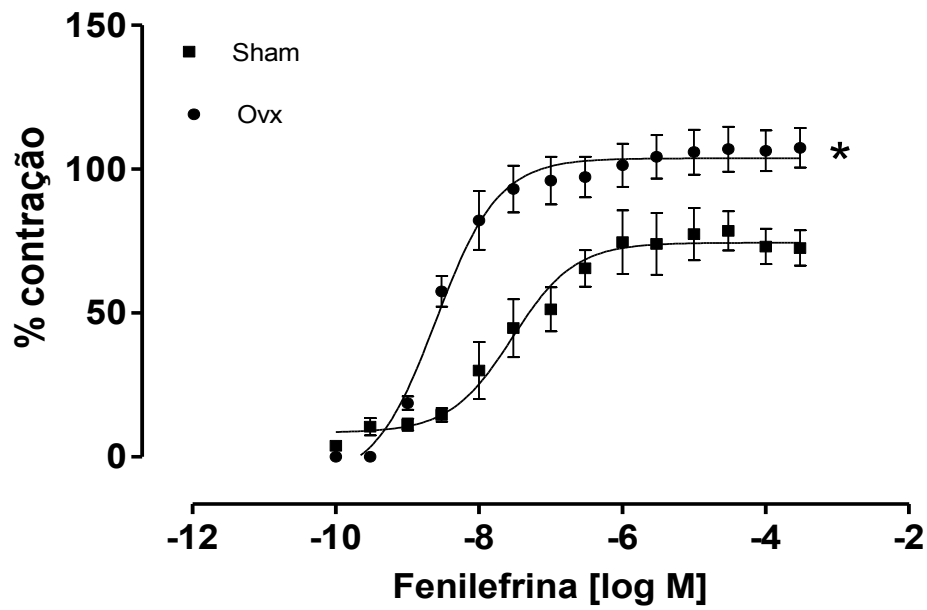


Figura 14: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar nos grupos SHAM, Ovariectomizada (OVX), 17- β estradiol

(EST), Raloxifeno (RAL) e Tamoxifeno (TAM). Dados foram expressos como média \pm EPM, n=6 por grupo. ** p<0,01 quando comparado ao grupo SHAM.

Tabela 4: Valores de resposta máxima (R_{máx}) e sensibilidade (pD₂) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aortas nos grupos SHAM, Ovariectomizada (OVX), 17- β estradiol (EST), Raloxifeno (RAL) e Tamoxifeno (TAM)

	R _{máx} (%)	pD ₂
SHAM (n=07)	74.5 \pm 2.8	7.5 \pm 0.18
OVX (n=07)	103.8 \pm 2.3*	8.6 \pm 0.10
EST (n=06)	80.9 \pm 7.9	9.5 \pm 2.50
RAL (n=06)	85.1 \pm 3.6	7.3 \pm 0.17
TAM (n=06)	82.3 \pm 7.3	7.2 \pm 0.33

Dados expressos como média \pm EPM. *p<0.01 quando comparado ao grupo SHAM.

6.3.2. EFEITO DO TRATAMENTO COM ESTROGÊNIO E SERMs SOBRE O RELAXAMENTO NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA DE FÊMEAS OVARIECTOMIZADAS

O relaxamento mediado pelo endotélio foi avaliado por meio da curva concentração-resposta à ACh. Todos os grupos estudados apresentaram relaxamento na curva de acetilcolina (Figura 15), com semelhante pD₂/sensibilidade (Tabela 5). No entanto, o grupo ovariectomizado apresentou resposta máxima reduzida à acetilcolina em relação ao grupo SHAM, o tratamento com 17 β -estradiol e SERMs foram capazes de normalizarem essa alteração na reatividade (Tabela 5).

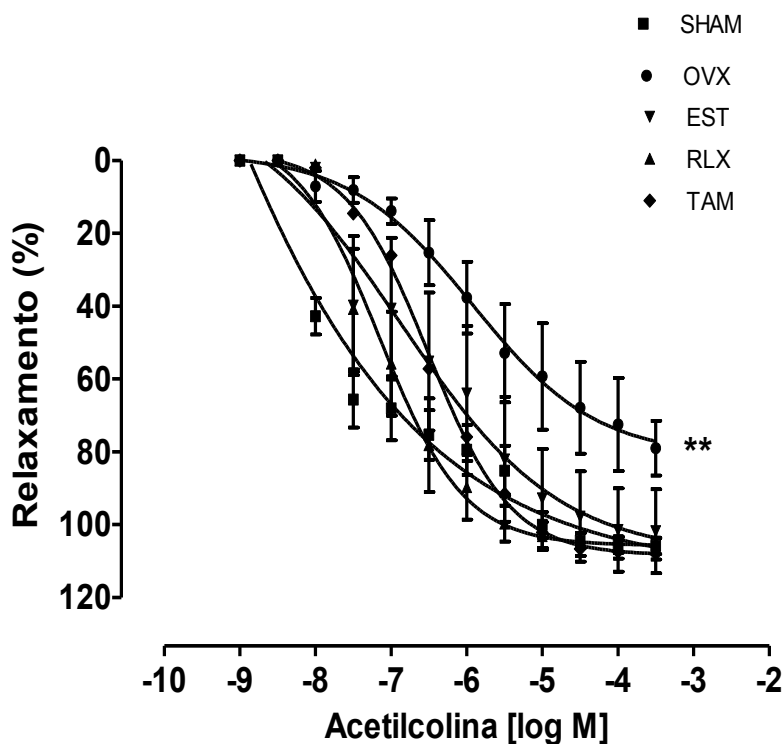
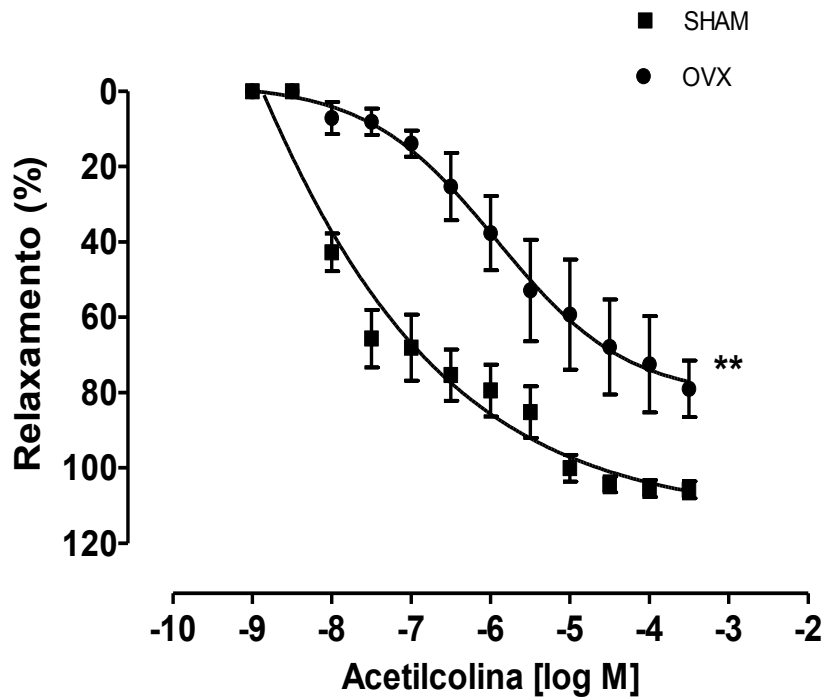


Figura 15: Curvas concentração-resposta à acetilcolina para avaliação do relaxamento dependente do endotélio em anéis isolados de aorta de ratos Wistar nos grupos SHAM, Ovariectomizada (OVX), 17- β estradiol (EST), Raloxifeno (RAL) e Tamoxifeno (TAM). Dados expressos como média \pm EPM.

** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo SHAM.

Tabela 5: Valores de resposta máxima ($R_{\text{máx}}$) e sensibilidade (pD_2) das curvas concentração-resposta à acetilcolina em anéis isolados de aortas nos grupos SHAM, Ovariectomizada (OVX), 17- β estradiol (EST), Raloxifeno (RAL) e Tamoxifeno (TAM)

	$R_{\text{máx}}$ (%)	pD_2
SHAM (n=07)	117.5 \pm 17.1	7.22 \pm 0.35
OVX (n=07)	78.2 \pm 25.4*	6.41 \pm 0.96
EST (n=06)	112.1 \pm 34.1	6.37 \pm 0.82
RAL (n=06)	107.4 \pm 8.1	7.10 \pm 0.22
TAM (n=06)	108.0 \pm 5.4	6.40 \pm 0.14

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

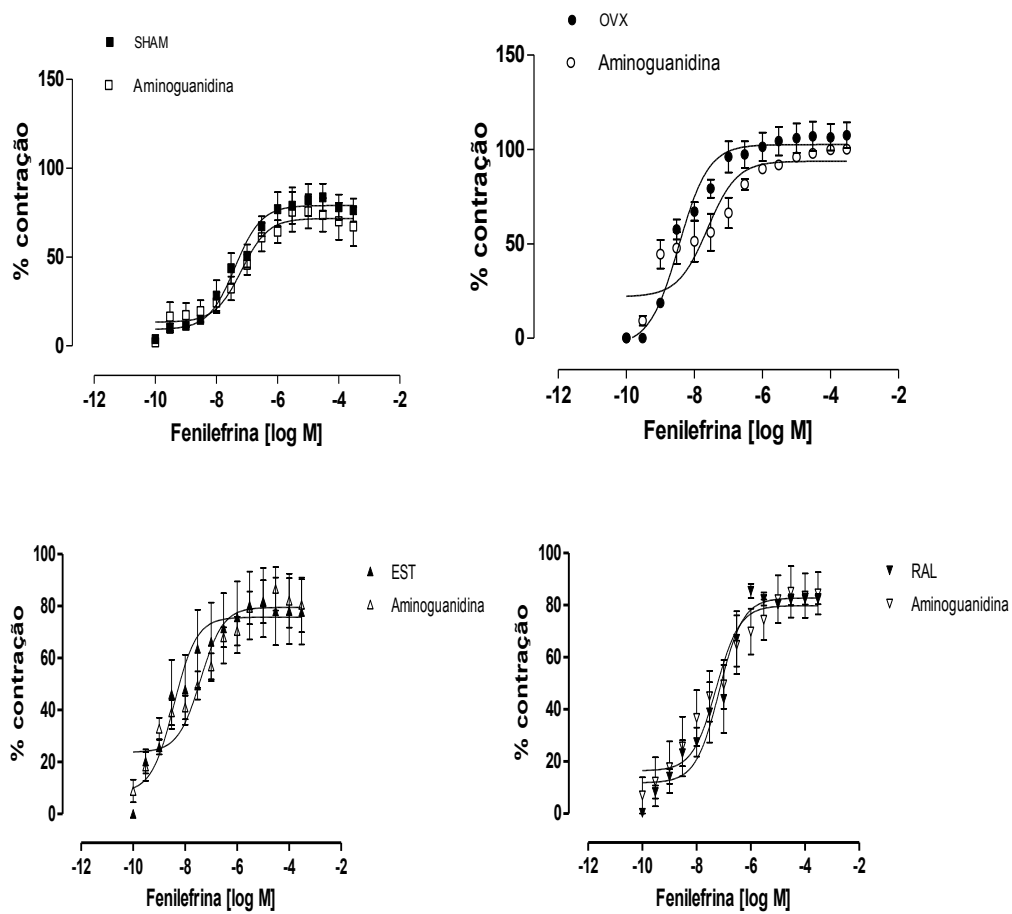
6.3.3. EFEITO DOS FATORES ENDOTELIAIS ENVOLVIDOS NO TRATAMENTO COM ESTROGÊNIO E SERMs SOBRE O RELAXAMENTO NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA DE FÊMEAS OVARIECTOMIZADAS

Os resultados apresentados anteriormente mostraram que o tratamento com 17 β -estradiol e SERMs foram capazes de diminuir a resposta máxima ($R_{\text{máx}}$) à fenilefrina quando comparada ao grupo ovariectomizado, normalizando sua resposta de forma semelhante ao grupo SHAM.

Com a finalidade de avaliar a participação dos fatores endoteliais nessa resposta, foram realizados os protocolos a seguir com seus respectivos resultados:

6.3.3.1 Participação da isoforma induzível da óxido nítrico sintase no tratamento com estrogênio e SERMs sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica.

A Aminoguanidina (50 μ M) não alterou a resposta contrátil à fenilefrina no grupo OVX quando comparado ao grupo SHAM. Este mesmo comportamento ocorreu entre todos os grupos, ou seja, a aminoguanidina não promoveu alteração na reatividade vascular de anéis de aorta em resposta à fenilefrina. (Figura 16, tabela 6).



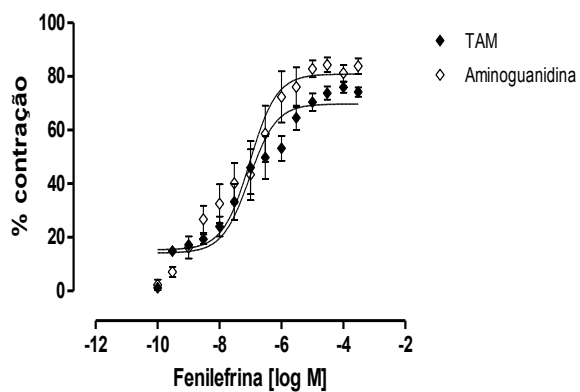


Figura 16: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar nos grupos SHAM, Ovariectomizada (OVX), 17- β estradiol (EST), Raloxifeno (RAL) e Tamoxifeno (TAM) na presença de Aminoguanidina.

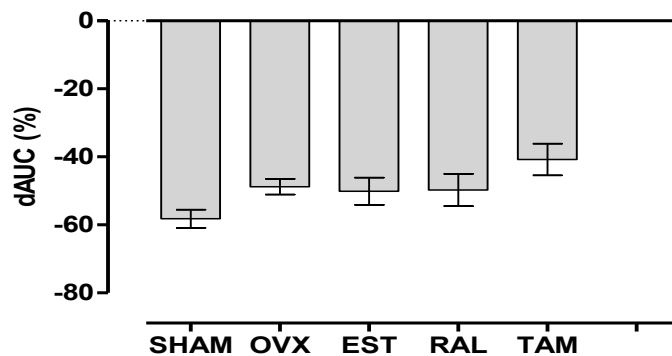


Figura 17: Diferença percentual na área abaixo da curva entre os grupos antes e após a inibição com Aminoguanidina. Dados foram expressos como média \pm EPM.

Tabela 6: Valores da Resposta máxima (R_{máx}) e a sensibilidade (pD₂) das curvas concentração- resposta à fenilefrina em anéis isolados de aortas nos grupos SHAM, Ovariectomizada (OVX), 17-β estradiol (EST), Raloxifeno (RAL) e Tamoxifeno (TAM) na presença e na ausência da aminoguanidina (Amino)

	R _{máx} (%)	R _{máx} (%)	pD ₂	pD ₂
		Amino	Amino	
SHAM (n=07)	74.5±2.8	72.5±4.2	7.74±0.32	7.45±0.18
OVX (n=07)	103.8±2.3	99.9±3.9	6.9±0.37	8.59±0.10
EST (n=06)	80.9±7.9	89.8±2.7	12.1±0.98	9.5±2.5
RAL (n=06)	85.1±3.6	89.0±9.4	7.58±0.56	7.3±0.17
TAM (n=06)	82.3±7.3	89.5±5.7	7.47±0.35	7.2±0.33

Valores expressos em média ± EPM

6.3.3.2. Expressão Protéica da isoforma induzível (iNOS) da óxido nítrico sintase em aorta de fêmeas ovariectomizadas

A expressão da iNOS em condições basais (segmentos arteriais retirados logo após o animal ser sacrificado) foi detectada, por meio da técnica de Western Blot em segmentos de aorta torácica dos grupos estudados. Os resultados da expressão dessa proteína no segmento torácico da aorta nos grupos estudados são mostrados na figura 18. Os animais ovariectomizados não apresentaram diferença nos níveis de expressão protéica de iNOS ao serem comparados ao grupo SHAM, assim como os animais que receberam o tratamento com as terapias hormonais também não apresentaram diferença (SHAM 0.66±0.08; OVX 0.58±0.08; EST 0.77±0.15; RAL 0.56±0.10; TAM 0.66±0.08).

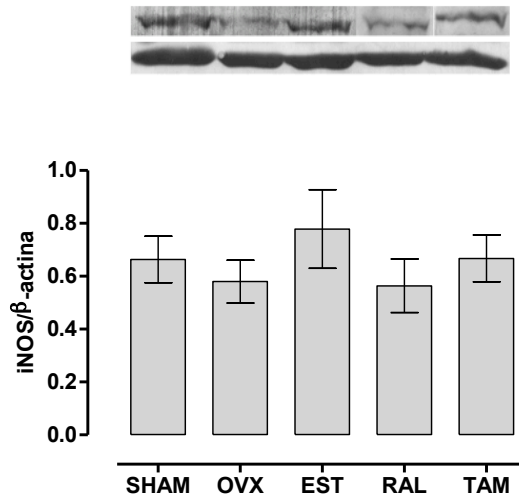


Figura 18. Resultados da expressão proteica da isoforma induzível da óxido nítrico sintase (iNOS) em seguimentos de aorta torácica dos grupos SHAM, Ovariectomizada (OVX), Ovariectomizadas Tratadas com 17β-estradiol (EST), Raloxifeno (RAL) e Tamoxifeno (TAM). Na parte superior da figura estão as bandas representativas da expressão da iNOS e da β-actina. Os resultados foram expressos como média ± EPM.

6.3.3.3. Participação da via do óxido nítrico no tratamento com estrogênio e SERMs sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica.

Após o bloqueio da via do NO com L-NAME (100μM) ocorreu aumento acentuado na resposta vasoconstritora à fenilefrina nos anéis isolados de aorta em todos os grupos, refletindo no aumento da R_{máx}. Todavia, no grupo TAM, esse aumento foi em maior magnitude (Tabela 7; Figura 19). Não houve diferença na sensibilidade pD₂ (tabela 7).

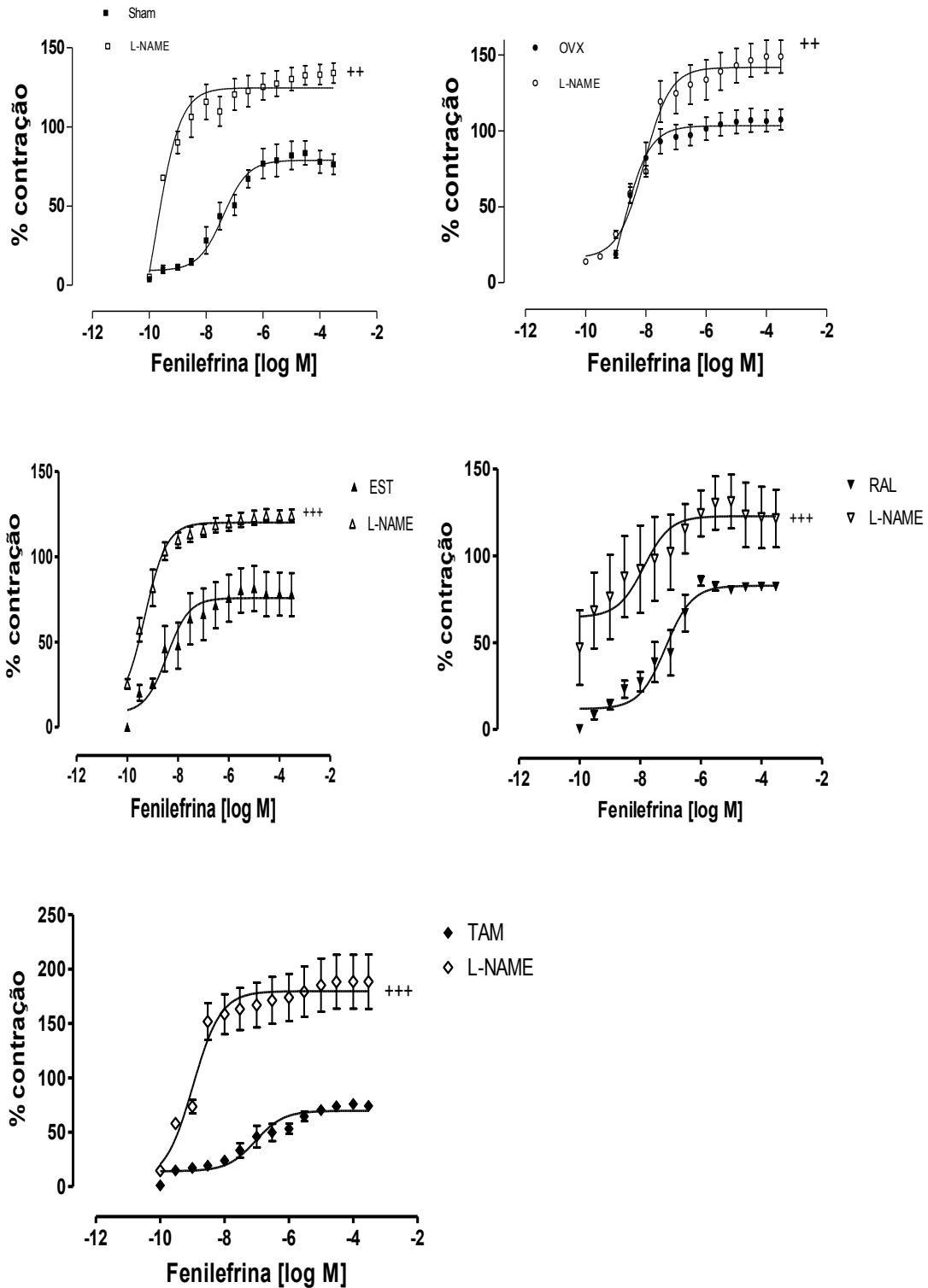


Figura 19: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar nos grupos SHAM, Ovariectomizada (OVX), 17- β estradiol (EST), Raloxifeno (RAL) e Tamoxifeno (TAM) na presença de L-NAME. Dados expressos como média \pm EPM. ++ p <0,01 quando comparado ao respectivo grupo na ausência do bloqueador.

Visando uma melhor comparação desses resultados, foi calculada a diferença da área abaixo da curva (% dAUC) (Figura 20). Foi evidenciado então que o aumento da reatividade à fenilefrina provocado pelo L-NAME, ocorreu em menor magnitude no grupo OVX. Este resultado sugere uma redução da biodisponibilidade de óxido nítrico nos anéis isolados de aorta dos animais com deficiência estrogênica. Os tratamentos com estrogênio e os SERMs foram capazes de normalizarem esse parâmetro, sendo que no grupo TAM houve maior magnitude na resposta, indicando uma maior biodisponibilidade de óxido nítrico nos anéis isolados de aorta dos animais tratados com tamoxifeno. (%dAUC - SHAM: 90.2 ± 17.6 ; OVX: $26.3 \pm 6.2^{**}$; EST: 96.8 ± 11.8 ; RAL: 124.2 ± 35.9 ; TAM: $277.6 \pm 39.2^{\dagger\dagger}$).

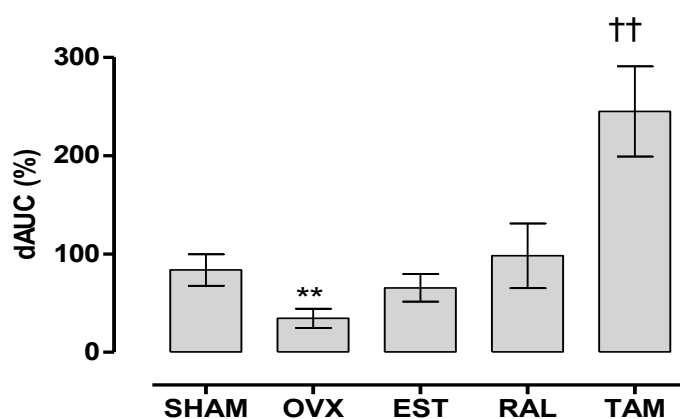


Figura 20: Diferença percentual na área abaixo da curva entre os grupos antes e após a inibição com L-NAME. Dados foram expressos como média ± EPM. ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo SHAM †† $p < 0,05$ quando comparado ao grupo SHAM, OVX, EST e RAL

Tabela 7: Valores da Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e a sensibilidade (pD_2) das curvas concentração- resposta à fenilefrina em anéis isolados de aortas nos grupos SHAM, Ovariectomizada (OVX), 17- β estradiol (EST), Raloxifeno (RAL) e Tamoxifeno (TAM) na presença e na ausência de L-NAME

	R _{máx} (%)	R _{máx} (%)	pD ₂	pD ₂
		L-NAME	L-NAME	
SHAM (n=07)	74.5±2.8	128.4±3.4 ⁺⁺	7.72±1.28	7.45±0.18
OVX (n=07)	103.8±2.3	135.7±9.7 ⁺⁺	10.52±3.45	8.59±0.10
EST (n=06)	80.9±7.9	122.8±7.4 ⁺⁺⁺	11.80±6.44	9.5±2.5
RAL (n=06)	85.1±3.6	122.7±7.2 ⁺⁺⁺	11.14±7.24	7.3±0.17
TAM (n=06)	82.3±7.3	181.7±7.4 ^{+++†}	9.21±0.59	7.2±0.33

Dados foram expressos como média ± EPM. ⁺⁺p<0,01 e ⁺⁺⁺p<0,001 quando comparado ao respectivo grupo na ausência do inibidor. [†]p<0.05 vs. SHAM, OVX, EST e RAL.

6.3.3.4. Expressão Protéica da isoforma endotelial (eNOS) da óxido nítrico sintase em aorta de fêmeas ovariectomizadas

Visando explicar por qual mecanismo estaria ocorrendo o aumento da modulação endotelial pelo NO, a expressão protéica da eNOS foi avaliada. Assim, em condições basais (segmentos arteriais retirados logo após o animal ser sacrificado) a expressão da eNOS foi detectada, por meio da técnica de Western Blot em segmentos de aorta torácica dos grupos estudados. Os resultados da expressão dessa proteína no segmento torácico da aorta nos grupos estudados são mostrados na figura 22. Os animais ovariectomizados e os que receberam o tratamento com as terapias hormonais não apresentaram diferença nos níveis de expressão protéica de eNOS ao serem comparados ao grupo SHAM (SHAM 0.62±0.13; OVX 0.65±0.05; EST 0.73±0.07; RAL 0.67±0.07; TAM 0.67±0.06).

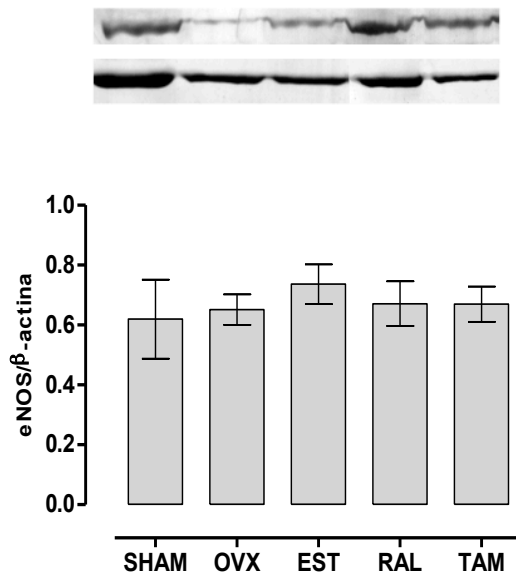


Figura 22: Resultados da expressão proteica da isoforma endotelial da óxido nítrico sintase (eNOS) em segmentos de aorta torácica dos grupos SHAM, Ovariectomizada (OVX), Ovariectomizadas Tratadas com 17β-estradiol (EST), Raloxifeno (RAL) e Tamoxifeno (TAM). Na parte superior da figura estão as bandas representativas da expressão da eNOS e da β-actina. Os resultados foram expressos como média ± EPM.

6.3.3.5. Influência da administração de apocinina, um inibidor da NADPH oxidase no tratamento com estrogênio e SERMs sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica.

É reconhecido que a biodisponibilidade de óxido nítrico pode ser reduzida por espécies reativas de oxigênio (EROS), tendo como consequência o aumento da contração vascular. Diante disso, investigamos a influência das espécies reativas de oxigênio na resposta contrátil à fenilefrina em animais com deficiência estrogênica.

A NADPH oxidase é a principal fonte de espécies reativas de oxigênio do organismo. Para analisar a influência da NADPH oxidase na resposta contrátil à fenilefrina em animais com deficiência estrogênica, foi utilizada a apocinina (0,3 μM), um inibidor não-seletivo da NADPH oxidase. A apocinina não alterou a pD₂ das curvas de % da contração à fenilefrina dos grupos, mas reduziu a

resposta máxima em todos os grupos experimentais (Tabela 8, Figura 23). Para melhor visualização, calculamos a diferença da área abaixo das curvas dos gráficos (%dAUC) (figura 24), porém não houve diferença entre os grupos estudados.

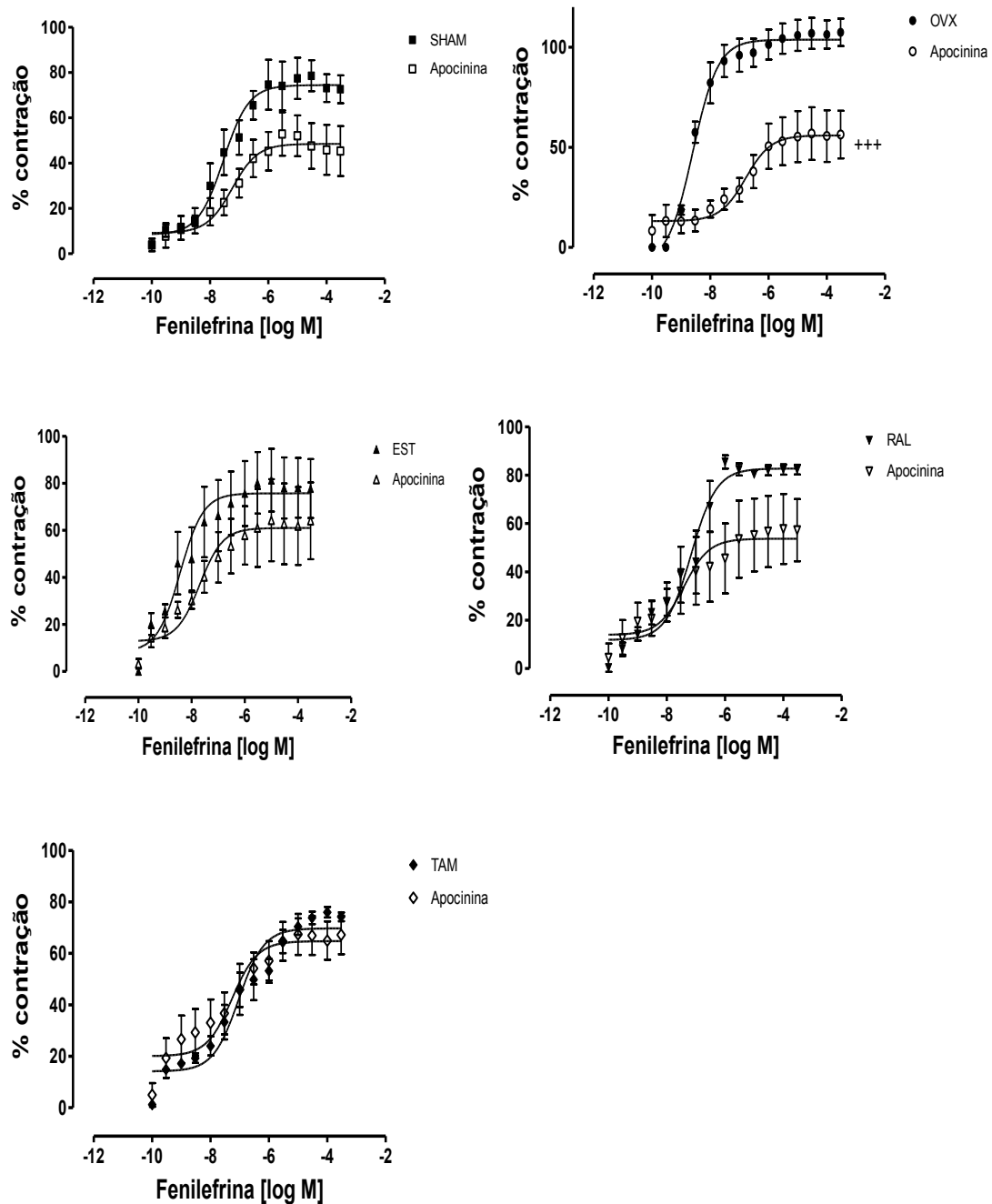


Figura 23: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar nos grupos SHAM, Ovariectomizada (OVX), 17- β estradiol (EST), Raloxifeno (RAL) e Tamoxifeno (TAM) na presença de Apocinina.

Dados expressos como média \pm EPM. $^{**}p < 0,001$ quando comparado ao grupo OVX sem presença da inibidor.

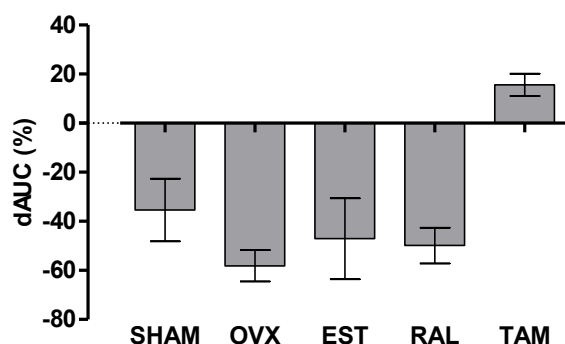


Figura 24: Diferença percentual na área abaixo da curva entre os grupos antes e após a inibição com Apocinina. Dados foram expressos como média \pm EPM.

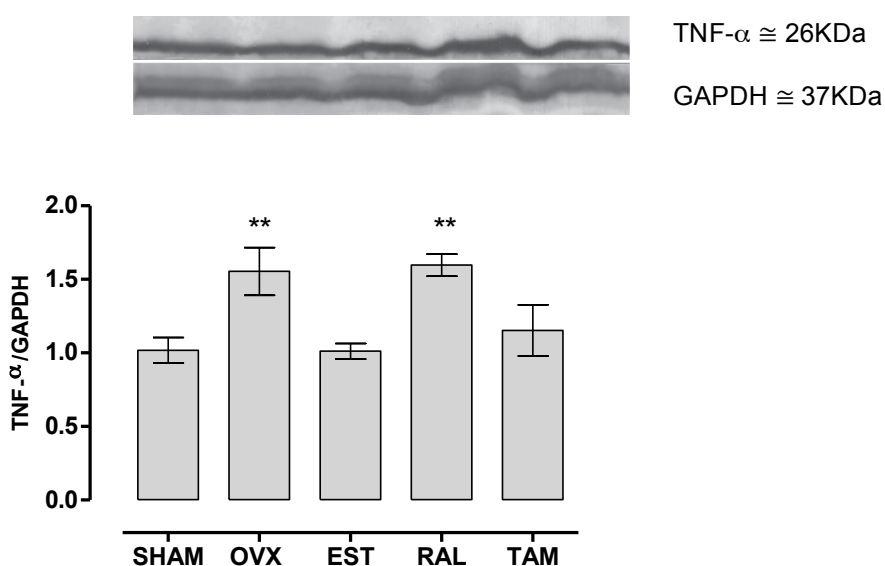
Tabela 8: Valores da Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e a sensibilidade (pD_2) das curvas concentração- resposta à fenilefrina em anéis isolados de aortas nos grupos SHAM, Ovariectomizada (OVX), 17- β estradiol (EST), Raloxifeno (RAL) e Tamoxifeno (TAM) na presença e na ausência da Apocinina.

	$R_{m\acute{a}x}$ (%)	$R_{m\acute{a}x}$ (%)	pD_2	pD_2
		Apocinina	Apocinina	
SHAM (n=07)	74.5 \pm 2.8	49.2 \pm 3.9	7.32 \pm 0.34	7.45 \pm 0.18
OVX (n=07)	103.8 \pm 2.3	57.4 \pm 5.5 ⁺⁺⁺	6.83 \pm 0.37	8.59 \pm 0.10
EST (n=06)	80.9 \pm 7.9	65.5 \pm 8.8	8.2 \pm 1.22	9.5 \pm 2.5
RAL (n=06)	85.1 \pm 3.6	57.9 \pm 14.7	8.89 \pm 6.7	7.3 \pm 0.17
TAM (n=06)	82.3 \pm 7.3	73.4 \pm 13.2	8.52 \pm 2.18	7.2 \pm 0.33

Dados foram expressos como média \pm EPM. $^{+++}p < 0,001$ quando comparado ao respectivo grupo na ausência do inibidor.

6.4. EXPRESSÃO PROTÉICA DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO NUCLEAR KAPPA B (NF-KB) SUBUNIDADE 65 E DO FATOR DE NECROSE TUMORAL (TNF- α) NO VENTRÍCULO ESQUERDO DE FÊMEAS OVARIETOMIZADAS

Foi observado que no modelo de deficiência estrogênica (grupo OVX) ocorreu um aumento na expressão da proteína NF-kB, assim como da proteína TNF- α quando comparado aos animais SHAM. O tratamento com 17 β -estradiol (EST) e tamoxifeno (TAM) promoveu uma diminuição na expressão do NF-kB e do TNF- α quando comparado as ratas ovariectomizadas que não receberam tratamento, retornando a valores similares a do grupo SHAM. Entretanto, o tratamento com raloxifeno (RAL) somente foi capaz de normalizar a expressão do NF-kB (SHAM: 0.98 ± 0.09 ; OVX: $1.56 \pm 0.16^{**}$; EST: 1.01 ± 0.06 ; RAL: $1.60 \pm 0.07^{**}$; TAM: 1.16 ± 0.18), os níveis do TNF-alfa não foram normalizados. (SHAM: 1.02 ± 0.09 ; OVX: $1.56 \pm 0.16^*$; EST: 1.01 ± 0.06 ; RAL: $1.60 \pm 0.07^*$; TAM: 1.16 ± 0.18 * $p < 0,05$) (figura 25).



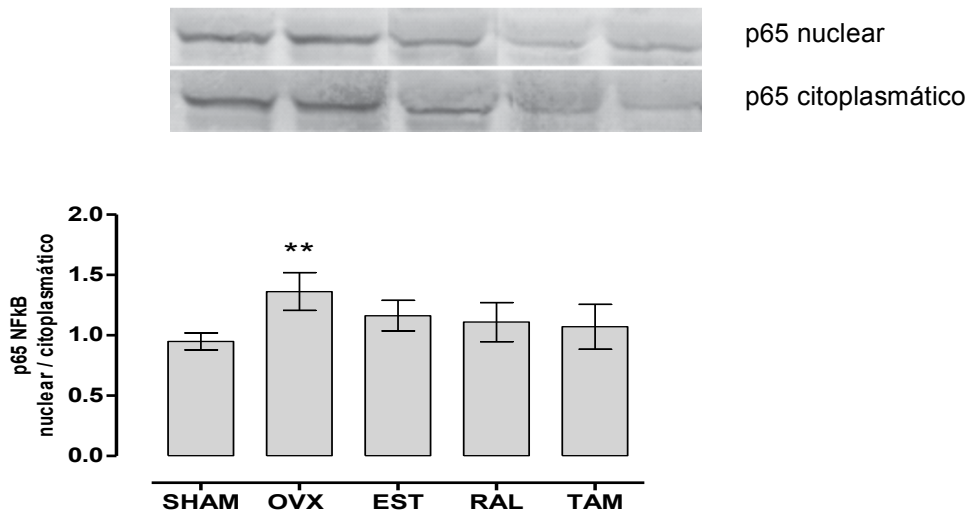


Figura 25: Resultados da expressão proteica do TNF- α e da subunidade p65 do NFkB do ventrículo esquerdo nos grupos SHAM, Ovariectomizada (OVX), Ovariectomizadas Tratadas com 17 β -estradiol (EST), Raloxifeno (RAL) e Tamoxifeno (TAM). Na parte superior dos gráficos em barra estão as bandas representativas da expressão do TNF- α e da p65 nuclear e da p65 citoplasmática. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo SHAM.

6.5. ESTUDO DA GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM ANÉIS DE AORTA– DIHIDROETÍDEO (DHE)

A técnica utilizada para investigar a influência da ovariectomia e dos tratamentos com 17 β -estradiol, raloxifeno e tamoxifeno sobre a produção de EROS foi a fluorescência produzida pela oxidação com DHE. Em condições basais, a análise da fluorescência produzida pela DHE em anéis de aorta revelou um aumento da produção de EROS nos animais OVX quando comparado ao grupo SHAM. Entretanto, as ratas ovariectomizadas que receberam o tratamento com e raloxifeno tiveram seus valores de fluorescência reduzidos, corrigindo a produção aumentada de EROS, porém o grupo tamoxifeno não foi capaz de normalizar essa produção (SHAM: 5.20 ± 0.58 ; OVX: $10.1 \pm 1.72^*$; EST: 4.63 ± 1.1 ; RAL: 5.43 ± 0.55 ; TAM: $9.83 \pm 0.75^\#$; * $p < 0,05$ vs SHAM; $^\#p < 0,05$

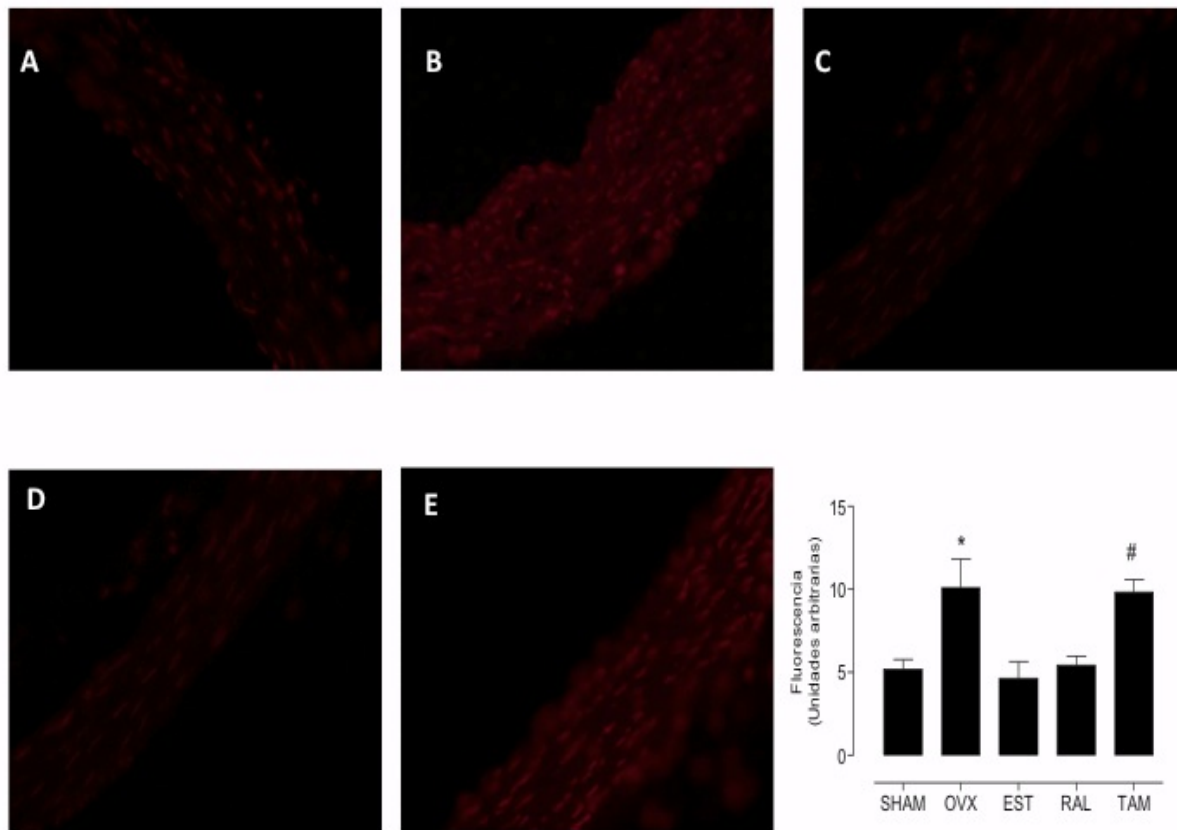


Figura 26: Imagens de micrografia representam a fluorescência emitida por dihidroetídio em segmentos de aorta torácica dos grupos SHAM (A), Ovariectomizada (OVX) (B), Ovariectomizadas Tratadas com 17β -estradiol (EST) (C), Raloxifeno (RAL) (D) e Tamoxifeno (TAM) (E). Ao lado, gráfico com valores médios da fluorescência emitida por dihidroetídio. * $p<0,05$ vs SHAM; # $p<0,05$ vs SHAM, EST, RAL.

6.6. TRATAMENTO COM 17β -ESTRADIOL, RALOXIFENO E TAMOXIFENO SOBRE O SISTEMA DE PEPTÍDEOS NATRIURÉTICOS

Ao final de 35 dias, os animais foram eutanasiados e o plasma coletado para dosagem dos níveis de ANP. Os resultados, apresentados na figura 27, mostram uma redução acentuada nos níveis plasmáticos de ANP no grupo OVX, contudo, após o tratamento hormonal com 17β -estradiol (EST), raloxifeno

(RAL) e tamoxifeno (TAM), os níveis plasmáticos de ANP são normalizados ao nível das fêmeas SHAM (SHAM: $263.3 \pm 53,3$; OVX: $92,5 \pm 19,5^*$; EST: $247.3 \pm 29,9$; RAL: 281.8 ± 65.6 ; TAM: 368.5 ± 73.7 – pg/ml; $*p < 0,05$)

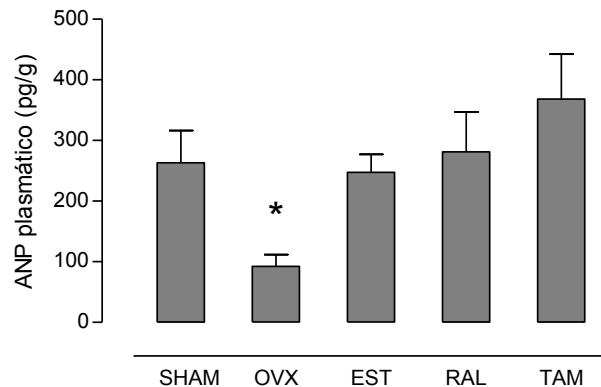


Figura 27: Valores dos níveis plasmáticos de ANP (pg/ml) nos grupos SHAM (n=5), ovariectomizadas (OVX, n=8), ovariectomizadas tratadas com 17β -estradiol (EST, n=7), com raloxifeno (RAL, n=5) e tamoxifeno (TAM, n=5). $*p < 0.05$ comparado ao grupo SHAM.

Na tabela 9 são apresentados os resultados das dosagens do conteúdo de ANP no átrio direito (AD) e esquerdo (AE) em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína total (Prot), assim como, os níveis do RNAm para o ANP no AD e AE em unidades arbitrárias (UA).

Tabela 9: Dosagens do conteúdo de peptídeo natriurético atrial (ANP) no átrio direito (AD) e esquerdo (AE) em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína total (Prot) e dos níveis do RNAm para o ANP no AD e AE em unidades arbitrárias (UA) através da técnica de PCR *real time* dos grupos SHAM, ovariectomizadas (OVX), ovariectomizadas tratadas com 17β -estradiol (EST), com raloxifeno (RAL) e tamoxifeno (TAM).

GRUPOS	ANP AD ($\mu\text{g}/\text{mg}$ Prot)	ANP AE ($\mu\text{g}/\text{mg}$ Prot)	RNAm ANP AD/S26 (UA)	RNAm ANP AE/S26 (UA)
SHAM (n=8)	5.29 \pm 0.55	5.68 \pm 0.35	255.7 \pm 15.3	91.3 \pm 4.4
OVX (n=6)	4.74 \pm 0.72	3.48 \pm 0.40 ^{*&&}	287.4 \pm 50.9	40.0 \pm 10.1 ^{**}
EST (n=6)	4.50 \pm 0.34	6.48 \pm 0.97	284.3 \pm 28.3	122.3 \pm 12.0
RAL (n=6)	5.44 \pm 0.78	5.47 \pm 0.64	353.3 \pm 80.8	153.9 \pm 23.2
TAM (n=6)	4.31 \pm 0.79	5.59 \pm 0.37	430.8 \pm 61.9	108.2 \pm 9.76

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

O conteúdo de ANP no átrio esquerdo (figura 28b) foi maior nas ratas SHAM em relação ao grupo OVX, assim, pode-se inferir que a ovariectomia interferiu nos estoques de ANP do átrio esquerdo, resultados esses, que vão de acordo com a diminuição dos níveis de ANP plasmático nesse grupo. Ao comparar o grupo OVX e SHAM com os grupos tratados, observa-se que os grupos EST, RAL e TAM foram capazes de retornar o conteúdo de ANP do átrio esquerdo ao nível das ratas controles (SHAM). Já em relação ao átrio direito, não houve diferença no conteúdo de ANP entre os grupos (figura 28a).

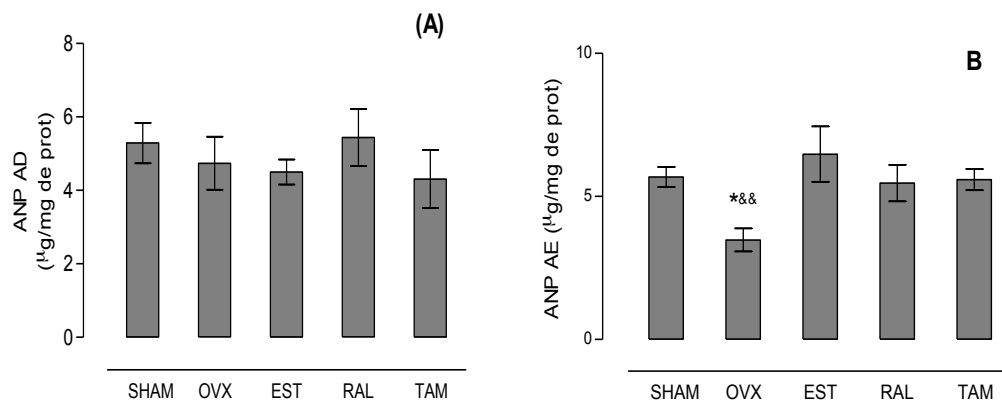


Figura 28: Conteúdo de ANP do átrio direito (AD – A) e átrio esquerdo (AE – B) em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de prot) dos grupos SHAM, ovariectomizadas (OVX), ovariectomizadas tratadas com 17β -estradiol (EST), com raloxifeno (RAL) e tamoxifeno (TAM). * $p < 0.05$ comparado ao grupo SHAM. && $p < 0.01$ comparado ao grupo EST.

As diferenças nos níveis de conteúdo de ANP foram confirmadas pela determinação do RNAm para ANP no átrio direito e átrio esquerdo (tabela 9). Assim como nos níveis de conteúdo de ANP do átrio direito não apresentaram diferença entre os grupos, os níveis de RNAm para o ANP no átrio direito também não foram diferentes. Já em relação aos níveis de RNAm para o ANP no átrio esquerdo, a ovariectomia (OVX) reduziu e os tratamentos com 17β -estradiol (EST), raloxifeno (RAL) e tamoxifeno (TAM) normalizaram esses níveis de RNAm para o ANP no átrio esquerdo quando comparados ao grupo SHAM (figura 28a).

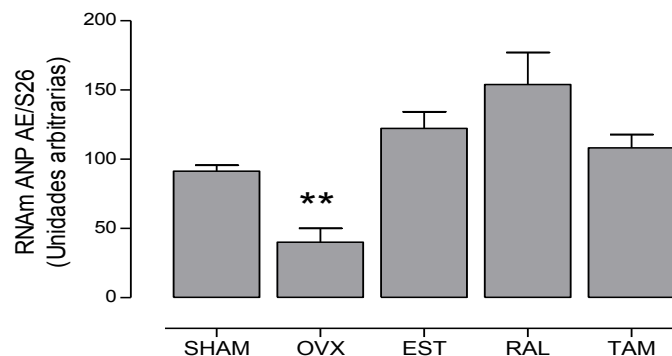


Figura 29: Níveis do RNAm para o ANP no AE em unidades arbitrárias (UA) por meio da técnica de PCR real time dos grupos SHAM, ovariectomizadas (OVX), ovariectomizadas tratadas com 17β -estradiol (EST), com raloxifeno (RAL) e tamoxifeno (TAM). ** $p < 0.01$ comparado ao grupo SHAM.

7. DISCUSSÃO

A deficiência estrogênica apresentou importante papel na regulação da reatividade vascular, assim como no estresse oxidativo e na inflamação, conforme dados demonstrados em nosso estudo. Mediante as informações mencionadas anteriormente, a importância deste trabalho reside no fato de avaliar e evidenciar o efeito do tratamento do raloxifeno e tamoxifeno em modelo de deficiência estrogênica sobre o sistema cardiovascular.

Assim, os principais achados deste estudo em relação ao tratamento com 17-beta-estradiol, raloxifeno e tamoxifeno em ratas ovariectomizadas foram: Em relação ao estudo no tecido cardíaco: (I) Normalizaram os níveis de ANP plasmático, assim como sua expressão; (II) Os biomarcadores inflamatórios foram normalizados, com exceção do grupo RAL no qual não foi possível a normalização do TNF- α . Em relação ao estudo da reatividade vascular de anéis de aorta: (III) Reduziram a resposta vasoconstrictora à fenilefrina e preveniram a disfunção endotelial; (IV) Reduziram a produção "in situ" de EROS, exceto no grupo TAM. Assim, os dados desse estudo evidenciam pela primeira vez, a influência do tratamento com raloxifeno e tamoxifeno sobre o ANP em fêmeas ovariectomizadas, e, simultaneamente, demonstram o efeito do tratamento com estas drogas sobre a expressão protéica de importantes biomarcadores de remodelamento cardíaco como o ANP, TNF- α e NF κ B e na reatividade vascular de anéis de aorta.

A efetividade do 17 β -estradiol em restaurar os parâmetros vasculares e cardíacos avaliados, demonstram sua função cardioprotetora deste hormônio na fase pré-menopausa, já demonstrada (BARTON et al., 2011; KIM et al., 2008; MUEHLFELDER et al., 2012). Em linhas gerais, o tratamento com raloxifeno e tamoxifeno também foram capazes de normalizar importantes alterações encontradas no grupo com deficiência estrogênica, de forma semelhante ao estrogênio.

O sistema de peptídeos natriuréticos apresenta importantes funções cardiovasculares e imunológicas, assim, alterações no sistema de peptídeos natriuréticos, poderiam ser um dos responsáveis por essas alterações mencionadas nas fêmeas com deficiência de estrogênio. Em nosso estudo, foi

demonstrado que a diminuição dos níveis de ANP de fêmeas com deficiência de estrogênio foi acompanhada por aumento da expressão da subunidade p65 de NF- κ B e da proteína TNF- α no tecido cardíaco (ventrículo esquerdo) e que os tratamentos com 17 β -estradiol e SERMs foram capazes de normalizar os níveis de ANP, assim como as proteínas envolvidas na inflamação. Os tratamentos também foram capazes de normalizarem possíveis prejuízos na reatividade vascular de anéis de aorta, ao normalizarem a resposta à fenilefrina e à acetilcolina. Em relação ao TNF- α , o tratamento com raloxifeno não foi capaz de normalizar sua expressão, porém normalizou outros importantes parâmetros. Apesar dos biomarcadores pesquisados estarem alterados no grupo OVX, não foi encontrado modificações no coração em relação ao tamanho dos miócitos cardíacos ou a área, que poderia refletir em uma possível hipertrofia cardíaca.

7.1. PARÂMETROS PONDERAIS E DADOS HISTOLÓGICOS

O peso do útero foi avaliado a fim de comprovar a eficácia da técnica de ovariectomia, ou seja, avaliar de forma indireta a deficiência de estrogênio. A utilização do peso do útero como parâmetro de eficácia da ovariectomia é bem descrita (CALIMAN et al., 2013; DE MEDEIROS et al., 2012; SATO et al., 1996) 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. Foi observado em nosso estudo um menor peso do útero nas fêmeas ovariectomizadas quando comparado ao grupo SHAM. O tratamento com 17 β -estradiol nas ratas ovariectomizadas normaliza o peso do útero, tornando-se semelhante ao grupo SHAM. Este resultado apresentado demonstra um efeito proliferativo do estrogênio no útero, dado que já é relatado na literatura (NASH et al., 1989). Os tratamentos com SERMs reverteram parcialmente esta alteração. Em estudos anteriores foi observado aumento de peso uterino em OVX tratadas com tamoxifeno (BORGIO et al., 2011; MARK et al., 2007). Por outro lado, outros estudos não demonstraram qualquer efeito sobre o peso uterino com o tratamento com raloxifeno (MARK et al., 2007; SLIWIŃSKI et al., 2009). No entanto, (SATO et al., 1996a; SATO et al., 1996b) demonstraram que o raloxifeno aumentou o

peso do útero e BLACK et al (1994) revelou que o peso úmido uterino de ratas que receberam 0,1-10 mg/kg de raloxifeno era ligeiramente mais elevada do que a das ratas ovariectomizadas. Estes resultados de aumento parcial no peso uterino são semelhantes ao nosso estudo. O aumento parcial no peso do útero do grupo tamoxifeno pode estar relacionado a dose administrada e ao tempo de tratamento utilizados no presente estudo, uma vez que o tamoxifeno exerce papel de agonista no útero (DUTERTRE; SMITH, 2000). Estudo em humanos foi constatado que mulheres que utilizam o tamoxifeno por um longo período, aumentam o risco de desenvolverem câncer de endométrio (COSMAN; LINDSAY, 1999).

Em relação ao peso corporal há um aumento do peso das fêmeas ovariectomizadas corroborando com dados da literatura (KLOOSTERBOER; EDERVEEN, 2002; YOSHITAKE et al., 1999). Após o início do tratamento com SERMs e 17 β -estradiol, os animais ovariectomizados tratados com estas drogas, apresentaram peso corporal final semelhante ao grupo SHAM, com exceção do grupo tratado com tamoxifeno que obteve um menor ganho de peso. Esse dado está de acordo com a literatura, como o estudo de (HOZUMI; HAKAMATA; NAGAI, 2005), em que foi demonstrado que o tratamento com tamoxifeno em ratas ovariectomizadas, reduz a ingestão de comida e o ganho de tecido adiposo nesses animais, além de promover diminuição nos níveis de leptina. A leptina, um hormônio produzido pelos adipócitos, tem sido relatado na literatura como um importante fator hormonal ao nível hipotalâmico e seus níveis têm sido correlacionados positivamente com o peso corporal, com o índice de massa corporal e com a circunferência abdominal (RICCIONI et al., 2003).

Em relação aos dados histológicos realizados no coração por meio da técnica de coloração Hematoxilina/Eosina, não houve diferença entre os grupos estudados. Apesar dos dados da literatura demonstraram que os hormônios sexuais exercem um importante papel na manutenção do peso normal do coração (BUPHA et al., 2006; REN et al., 2003) o número de núcleos de miócitos/campo e área de miócitos dos miócitos assim como, o peso do coração (g) não apresentaram diferença entre os grupos. Estudo de PAIGEL e colaboradores (2011) em ratas com 60 dias de ovariectomia, também

demonstrou que o peso do coração não se altera ao comparar os grupos SHAM, OVX e EST. Vale ressaltar que, outro importante fator que sabidamente contribui para alteração do peso cardíaco é o aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial (BISSOLI et al., 2009). Estudos do nosso grupo de pesquisa, utilizando o mesmo tempo de ovariectomia, demonstrou que as fêmeas não tiveram aumento desses parâmetros (de MEDEIROS, 2010), que se aumentados poderiam levar a hipertrofia cardíaca (BISSOLI et al., 2009).

7.2. EFEITO DOS SERMs NA REATIVIDADE VASCULAR À FENILEFRINA E ACETILCOLINA EM ANÉIS DE AORTA DE FÊMEAS COM DEFICIÊNCIA ESTROGÊNICA

Comparando a função vascular dos grupos estudados no presente estudo, observou-se que a reatividade vascular à fenilefrina foi diferente entre os animais com deficiência estrogênica comparados aos animais que receberam os tratamentos. O grupo OVX apresentou aumento da responsividade à fenilefrina em comparação com o grupo SHAM. Os tratamentos com raloxifeno e tamoxifeno, demonstraram resultados da reatividade à fenilefrina semelhante ao SHAM. Há vários trabalhos que evidenciam a influência do estrogênio sobre a reatividade vascular de anéis de aorta em ratas ovariectomizadas (BOLEGO et al., 1980; NAKAJIMA et al., 1995; PAREDES-CARBAJAL et al., 1995; BIANCHI et al., 2006; FLORIAN et al., 2004; STICE et al., 2009; FENOY et al., 2010). No estudo de BIANCHI e colaboradores (2006), foi encontrada uma maior reatividade à fenilefrina em anéis de aorta isolados em fêmeas ovariectomizadas, assim como no estudo de KAUSER et al (1996) que demonstrou que além das ratas ovariectomizadas, o tratamento com tamoxifeno também reduzia a vasoconstrição induzida pela fenilefrina em anéis de aorta.

Porém, essas mudanças na responsividade à fenilefrina não foram acompanhadas de alterações da resposta contrátil ao cloreto de potássio, sugerindo que nesses modelos estudados, não há alteração do aparato contrátil do músculo liso vascular. Como o endotélio é um importante regulador do tônus vascular, um desequilíbrio na liberação e/ou síntese dos fatores

derivados do endotélio pode ser o responsável pelas alterações da reatividade vascular encontrada no presente estudo.

Esse aumento da reatividade nos anéis de aorta torácica de ratas ovariectomizadas foi acompanhado por diminuição do relaxamento dependente do endotélio. Uma das possíveis causas, poderia ser a menor biodisponibilidade de NO após a ovariectomia. Tal fato pode ser avaliado realizando a curva-concentração resposta à fenilefrina, utilizando um inibidor da NOS (L-NAME). Na presença deste inibidor houve aumento na R_{max} em todos os grupos, igualando a resposta, levando a indicar que a diferença observada entre o grupo ovariectomizado e os demais era provavelmente pela via do NO, exceto no grupo TAM, no qual houve um aumento acentuado quando comparado aos demais grupos. Estes resultados podem indicar que a liberação/biodisponibilidade de NO pela fenilefrina é prejudicada na OVX, demonstrando assim, que a regulação da reatividade mediada pelo NO nos anéis de aorta pode ser influenciada pelo nível de estrogênio presente. Esse resultado foi similar a um estudo em anéis de aorta de ratas SHAM e ratas que receberam raloxifeno e estrogênio, de forma crônica, que demonstrou maior resposta à fenilefrina após L-NAME (RAHIMIAN et al., 2002). Assim, observa-se que a perda de estrogênio endógeno leva à redução da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) derivado do endotélio e prejudica a função endothelial (GIMÉNEZ et al., 2006; HERNÁNDEZ et al., 2000).

Em relação a maior resposta obtida na presença de L-NAME com terapia com tamoxifeno, estudos demonstraram que o tamoxifeno relaxa os vasos sanguíneos de mamíferos *in vitro* como se segue. O tamoxifeno reduz o tônus da artéria coronária de coelhos por meio da libertação endotelial do óxido nítrico, mediada pelo receptor de estrogênio (FIGTREE et al., 2000), esse mecanismo está associada à elevadas concentrações de cálcio [Ca⁺²] em células endoteliais e fosforilação da óxido nítrico endotelial sintase (eNOS). Estudo em mulheres relacionando a terapia com tamoxifeno, indica melhora na função endotelial com aumento na dilatação mediada pelo fluxo (STAMATELOPOULOS et al., 2004). A utilidade clínica do tamoxifeno na melhoria da função endotelial já foi estabelecida em estudos anteriores realizados em humanos (CLARKE et al., 2001; STAMATELOPOULOS et al.,

2004). Nossos dados corroboram com os estudos anteriores, pois ao observar a %dAUC, após o bloqueio com L-NAME, nota-se uma maior magnitude de resposta ao NO no grupo TAM quando comparado aos demais grupos.

A menor biodisponibilidade de NO pode ocorrer por redução na expressão vascular da principal enzima responsável pela sua liberação, a eNOS. O regulador fisiológico mais importante da expressão da eNOS *in vivo* é o shear stress (HARRISON et al., 2006; LI et al., 2002). De acordo com estudos presentes na literatura, o 17 β -estradiol ativa a eNOS por via não genômica por meio da fosfatidilinositol-3-quinase/serina-treonina kinase (PI3/Akt) (HAYNES et al., 2000) ou proteína quinase ativadora de mitose (MAPK) (SIMONCINI & Genazzani, 2003), essa ativação leva à produção de NO no endotélio, que então se difunde para o músculo liso vascular e causa o relaxamento do vaso. Todavia, no nosso estudo não foi observada alteração da expressão protéica da eNOS em aorta de ratas ovariectomizadas, assim como os tratamentos não interferiram na expressão desta proteína, logo não houve diferença entre os grupos. Nossos resultados corroboram com o estudo STICE e colaboradores (2009) que demonstrou que não houve diferença entre as ratas tratadas com estradiol, ovariectomizadas e/ou tratadas com estradiol sobre a expressão protéica das isoformas eNOS e iNOS da aorta. Outros trabalhos também sugerem que a terapia com estradiol não afeta a expressão da eNOS (ARNAL & CLAMENS, 1996; MACRITCHIE et al., 1997). Em contrapartida, demais estudos, em animais ovariectomizados, apresentam uma menor expressão da eNOS, isso foi encontrado em diversos segmentos vasculares, como aorta (Pinna et al, 2008), artérias mesentéricas (CALIMAN et al., 2013; NAWATE et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2014) ou mesmo no miocárdio (LOYER et al., 2007). Os dados de eNOS, principalmente, na aorta, são conflitantes na literatura, pois poderá depender da região da aorta a ser analisada. Há estudos que demonstraram que em ratas ovariectomizadas houve uma diminuição na expressão gênica da eNOS na aorta torácica superior, enquanto que, o tratamento com estradiol normalizou esses níveis (RAHIMIAN et al., 2002). FLORIAN e colaboradores (2004) mostraram níveis protéicos aumentados da eNOS, na aorta torácica, em ratas ovariectomizadas em comparação as fêmeas tratadas com estradiol e controles. Ao comparar a atividade da eNOS

em diferentes segmentos da aorta, dados mostraram que a atividade da eNOS no segmento superior da aorta é maior em resposta ao tratamento com estradiol (ANDERSEN et al., 2000; RAHIMIAN et al., 2002).

Seguindo o propósito de elucidar os mecanismos de ação dos SERMs na via do óxido nítrico, o próximo passo do presente estudo foi avaliar a isoforma induzível de óxido nítrico (iNOS). A iNOS está presente em uma variedade de tecidos, principalmente em resposta a mediadores endógenos da inflamação, hipóxia e estresse oxidativo (Chatterjee et al., 2008). Além disso, o aumento da atividade e da expressão da iNOS está bem descrita em doenças inflamatórias (BRIONES AM, ALONSO MJ, MARÍN J, BALFAGON G, 2000; SUN J, LAWRENCE J, DRUHAN J, 2010). Assim, para avaliar a iNOS, foi realizada uma curva concentração resposta à fenilefrina na presença de Aminoguanidina. No grupo SHAM, a Aminoguanidina não alterou a resposta contrátil à fenilefrina, o mesmo ocorreu com os demais grupos. Os resultados obtidos pela técnica de western blot somam-se aos dados funcionais, mostrando que a expressão proteica da iNOS nos animais ovariectomizados, assim como a resposta mediada pela aminoguanidina não foram alteradas quando comparada a condição controle (ausência de inibidores) e nem entre os grupos nas mesmas condições (presença de aminoguanidina). O mesmo ocorreu com o grupo tratado com o 17β -estradiol, raloxifeno e tamoxifeno.

Sabe-se que o estrogênio, reduz a expressão da iNOS em diversos modelos animais (CAU et al., 2012; NAWATE et al., 2005). Aparentemente, há poucos dados na literatura que avaliam a reatividade vascular de anéis de aorta isolados na terapia hormonal com o raloxifeno e tamoxifeno. Porém, o achado do grupo SHAM sugere que o NO oriundo da iNOS não participa na modulação da resposta contrátil à fenilefrina, o mesmo comportamento se observa nos animais com deficiência estrogênica. Os tratamentos não alteraram essa resposta, ou seja, não houve modificação na curva concentração resposta quando comparada a situação controle.

Está bem estabelecido que a NADPH oxidase é a principal fonte vascular de ânion superóxido O_2^- (GRIENDLING; SORESCU; USHIO-FUKAI, 2000; HARRINSON DG, 2009). HAMILTON e colaboradores (2002) estudaram

inibidores da NADPH oxidase, e demonstraram que a apocinina foi o composto com maior potencial para reduzir a produção de O_2^- . Estudos demonstram que o aumento de EROS está presente em modelos de deficiência estrogênica (CALIMAN et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2014). Em um estudo realizado em camundongos fêmeas, a ovariectomia resultou em aumento da produção O_2^- estimulada pela NADPH em aorta e, a reposição hormonal com 17β -estradiol promoveu uma diminuição na produção de O_2^- (WASSMANN et al., 2005)

Em nosso estudo, ocorreu redução da resposta à fenilefrina em todos os grupos na presença de apocinina, porém ao comparar a resposta obtida na curva controle (ausência de inibidor) com as curvas obtidas na presença do inibidor, respectivo de cada grupo, os animais ovariectomizados apresentaram uma redução a resposta à fenilefrina, significativamente mais acentuada, podendo indicar que neste grupo há maior produção de EROS. Este efeito pode estar relacionado à ação da apocinina sobre a NADPH oxidase, impedindo a formação de O_2^- por esta via, e, assim, aumentando a biodisponibilidade do NO (FLEENOR et al., 2011; YUNG et al., 2011). Esses achados da literatura podem indicar a diferença da resposta de vasoconstrição à fenilefrina, observada entre os animais ovariectomizados e os que receberam tratamento, uma vez que o grupo OVX parece apresentar maior estresse oxidativo.

7.3. INFLUÊNCIA DO ESTROGÊNIO E DOS SERMs SOBRE OS RADICAIS LIVRE “in situ”

Estudos *in vitro* têm demonstrado que as EROS reduzem a disponibilidade do substrato eNOS e/ou níveis de cofactores em células endoteliais (CALIMAN et al., 2013; DAVEL et al., 2011; WONG et al., 2008). Um aumento de superóxido (O_2^-), um importante EROS, ocorre concomitantemente com diminuição da biodisponibilidade do NO. O superóxido reage rapidamente com o NO, formando peroxinitrito e diminuindo a biodisponibilidade (RUBANYI; VANHOUTTE, 1986). Levando em consideração esta informação, foi realizada a análise “in situ” em anéis de aorta para avaliar a produção de EROS. Esta análise revelou que a produção de EROS nas fêmeas OVX estava extremamente aumentado em comparação com os valores do SHAM,

corroborando assim com dados já relatados na literatura, no qual a deficiência estrogênica aumenta EROS (CALIMAN et al., 2013; MILLER et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2014). Nossos dados mostraram que o tratamento com estrogênio e raloxifeno reduziram a formação de EROS em anéis de aorta nas OVX.

Em relação ao estrogênio, foi observado uma diminuição de espécies reativas de oxigênio promovidas por esse tratamento. Alguns autores atribuem os efeitos antioxidantes do estrogênio à sua estrutura fenólica, que poderia seqüestrar EROS independentemente da interação com receptores de estrogênio. Entretanto, esse efeito seqüestrante de EROS só pode ser observado em concentração mil vezes maior do que as fisiológicas, de forma que é provável que essa atividade seqüestrante não seja o principal mecanismo antioxidante dos estrógenos (KELLER, 1999). Sugere-se que o estrógeno pode modular a atividade e/ou expressão de enzimas anti e pró-oxidantes. De fato, alguns trabalhos têm observado que o estrógeno em concentrações fisiológicas pode reduzir a expressão da enzima NADPH oxidase, principal geradora de EROS em vasos sangüíneos (DANTAS et al., 2002) em ratas espontaneamente hipertensos ovariectomizados. CALIMAN e colaboradores (2013) demonstraram uma diminuição desta enzima NADPH oxidase, em ratas normotensas ovariectomizadas tratadas com estrogênio.

Estudos realizados em animais demonstram propriedades antioxidantes do raloxifeno, por meio de tratamento crônico, com redução do stress oxidativo em cultura de células de animais SHR (WASSMANN et al., 2002) e em ratos ovariectomizados (AYDIN et al., 2011). Estudo em mulheres na pós-menopausa, demonstrou que o tratamento com raloxifeno reduz o índice de estresse oxidativo e os níveis plasmáticos de moléculas de adesão (COLACURCI et al., 2003). Assim, nossos dados demonstram pela primeira vez o efeito dos SERMs estudados sobre a produção de EROS na aorta de ratas.

Por outro lado, o tratamento com tamoxifeno não foi capaz de normalizar a geração de EROS "in situ". Nosso estudo está de acordo com o de VITSEVA e colaboradores (2005) que demonstrou um aumento significativo na liberação de

superóxido com os metabólitos tamoxifeno em atividade plaquetária ou geração de plaquetas alteradas; esta alteração foi normalizada quando um mimético da superóxido dismutase foi adicionado. Em contrapartida, outro estudo realizado por LEE e colaboradores (2014) demonstrou que, em pacientes com câncer de mama, o tratamento com tamoxifeno reduz a geração de EROS. O nosso grupo também demonstrou, em experimentos anteriores, que o uso de tamoxifeno em mulheres após a quimioterapia, no tratamento de câncer de mama, reduziu significativamente os níveis de marcadores de risco de doenças cardiovasculares, tais como a proteína C-reativa, a apolipoproteína A-1 e apolipoproteína B-100 (ROMERO et al., 2012). Apesar de ter sido incapaz de atenuar a produção de EROS “in situ” o tratamento com tamoxifeno foi capaz de normalizar a disfunção vascular e demais biomarcadores cardíacos (discutidos abaixo) que encontravam-se alterados em ratas ovariectomizadas. Estas evidências experimentais demonstram os diferentes resultados da terapia com tamoxifeno sobre o sistema cardiovascular, os quais podem ser, ao menos em parte, pela ação de seus diferentes metabólitos, uma vez que quando o tamoxifeno é biotransformado, forma-se três principais metabólitos ativos (4-hidroxi-tamoxifeno, n-desmetil-tamoxifeno e endoxifeno) (MONTENEGRO, 2009).

7.4. INFLUÊNCIA DAS TERAPIAS HORMONAIIS SOBRE OS NÍVEIS DO PEPTÍDEO NATRIURÉTICO E MARCADORES DA INFLAMAÇÃO

Na literatura é bem conhecido que as hormônios natriuréticos têm diversas ações fisiológicas importantes, oferecendo alguns efeitos benéficos em distúrbios cardiovasculares (CLERICO et al., 1999; KUROSKI DE BOLD, 1999; PINNA et al., 2008). Analisamos o conteúdo e expressão de RNAm do ANP nos átrios, estes parâmetros foram reduzidos em ratos OVX, assim como houve também uma redução no ANP plasmático, porém estes parâmetros foram normalizados pelos tratamentos. Assim, nosso estudo sugere que o raloxifeno e tamoxifeno, similarmente ao estrogênio, pode aumentar os níveis de ANP, aumentando o RNAm e, conseqüentemente, aumentar o conteúdo deste peptídeo no tecido cardíaco.

Vale ressaltar que doenças cardiovasculares apresentam elevadas correlações com marcadores da inflamação sistêmica, tais como a proteína C- reactiva, a IL-6 e TNF- α e disfunção endotelial é um fator comum, que desempenha um papel importante no desenvolvimento de várias doenças cardiovasculares (BELO et al., 2004; LEVINE et al., 1990; PAIGEL et al., 2011).

O NF- κ B pode ativar citocinas inflamatórias que podem estimular a produção de espécies reativas de oxigênio e demais citocinas (HIROTA et al., 1995; LEAN et al., 2005; TESTA et al., 1996), promovendo assim um quadro inflamatório mais acentuado. No presente estudo, observou-se aumentos de NF- κ B p65 subunidade e expressão da proteína TNF- α no tecido ventricular de ratas OVX, o que poderia estar relacionado com a diminuição nos níveis de ANP plasmático e tecidual.

Podemos destacar que os hormônios sexuais podem influenciar sensivelmente o sistema imunológico (LAHITA, 2000). Além disso, evidências imunológicas, epidemiológicas e clínicas sugerem que os hormônios sexuais femininos desempenham um papel importante na etiologia e fisiopatologia das doenças inflamatórias crônicas (CUTOLO et al., 2010). Nos últimos anos, estudos têm mostrado evidências para ambas as atividades pró e antiinflamatórias dos estrógenos, dependendo de diversos fatores, tais como, o tipo de célula-alvo, o órgão-alvo, tempo e concentração de estrogênio administrado, e na variabilidade da expressão de receptor estrogênico em células específicas (XING et al., 2009). As ações antiinflamatórias do estrogênio são sustentadas, por exemplo, por estudos que mostram a regulação de genes antiinflamatórios pelo estradiol (BRUCE-KELLER et al., 2001; GHISLETTI et al., 2005; XING et al., 2009). Adicionalmente, os peptídeos natriuréticos e seus receptores são encontrados em muitas células do sistema imunológico, no entanto, o significado destes peptídeos no sistema imune começou a ser investigado recentemente. Estudos demonstram que os estrógenos são capazes de diminuir os níveis de TNF- α , como o realizado por ARENAS e colaboradores (2005) em que os animais ovariectomizados apresentavam níveis elevados de TNF- α e, o tratamento com estrogênio foi capaz de diminuir esses níveis. Uma via comum da resposta antiinflamatória do estrogênio e do ANP é a via de

atenuação do fator nuclear kappa B (KIEMER et al., 2000; LADETZKI-BAEHS et al., 2007).

Adicionalmente, demais estudos mostram mecanismos pelos quais, o ANP pode modular a síntese de TNF- α via NF- κ B (KIEMER e VOLLMAR, 2001; KIEMER et al., 2002; LADETZKI-BAEHS et al., 2007; VOLLMAR, 2005). A ligação entre o NF- κ B e as citocinas, por exemplo, pode ocorrer por ativação de NF- κ B após estimulação com lipopolissacarídeo resultando na liberação de TNF- α na circulação (GHISLETTI et al., 2005). É interessante notar que os níveis de TNF- α elevados são correlacionados diretamente com a ocorrência de deficiências funcionais do coração (WAN e LENARDO, 2010). Em nosso estudo, apesar dos níveis desta citocina encontrar-se elevada nos animais OVX, assim como nos animais que receberam o tratamento com raloxifeno, não foi observado quaisquer alteração histológica no tecido cardíaco.

Em relação a expressão do NF- κ B, nossos resultados sobre a influência da ovariectomia na expressão de NF- κ B em cardiomiócitos foram consistentes com a literatura (STICE et al., 2011) o que indica a ativação deste fator nestas condições. O NF- κ B forma homodímeros e heterodímeros. O dímero de NF- κ B é encontrado no citoplasma de células numa forma inativa, em associação com os membros de uma família de proteínas inibitórias referidos como I κ B. O NF- κ B e sua proteína inibitória I κ B constituem uma via fundamental que medeia a inflamação (BAEUERLE & BALTIMORE, 1996; GHOSH & HAYDEN, 2008b; LI et al., 2002; STICE & KNOWLTON, 2008). Após estimulação, a I κ B é fosforilada e degradadas, permitindo que o NF- κ B se transloque para o núcleo (GHOSH & HAYDEN, 2008b; GHOSH et al., 1998; LAWRENCE, 2009) e modulam a expressão de genes alvo. O raloxifeno pode agir durante essas diferentes fases, reduzindo a "ativação" deste importante fator NF- κ B. Apesar de que o tratamento com raloxifeno não foi capaz de normalizar a expressão de TNF- α nos corações de ratas ovariectomizadas, pode-se especular que o raloxifeno pode estar agindo durante outra fase da ativação do NF- κ B e/ou degradação de TNF α ou o tempo de tratamento talvez não tenha sido suficiente para normalizar esta citocina, em contrapartida, o raloxifeno foi capaz de normalizar os demais fatores estudados. Além do efeito direto no NF κ -B p65 subunidade proposto anteriormente , os tratamentos com 17 β -estradiol,

raloxifeno e o tamoxifeno, ao aumentar o ANP cardíaco poderiam, indiretamente normalizarem o NFκ-B p65 subunidade.

Apesar das diferenças estruturais entre essas formulações (DUTERTRE; SMITH, 2000) e suas indicações clínicas, a normalização desses parâmetros demonstrou um possível efeito anti-inflamatório em modelos de deficiência de estrogênio. A nossa proposta foi baseada nos dados que o ANP possui potencial imunomodulador pela sua propriedade de alterar a função dos macrófagos e ser um regulador da transcrição de genes pró-inflamatórios (KIEMER et al., 2000; KIEMER; VOLLMAR, 2001; VOLLMAR, 2005).

Estes resultados vêm reforçar a importância do estudo de marcadores de remodelação cardíaca, uma vez que há uma estreita ligação entre o aumento de mediadores inflamatórios e a regulação do NF-κB e TNF-α, em fêmeas com deficiência de estrogênio, assim como ressaltar a importância de estudos que avaliem a deficiência no sistema de ANP, principalmente, em modelos de deficiência estrogênica. Os tratamentos propostos neste estudo, apresentaram efeitos anti-inflamatórios que poderiam contribuir para prevenir uma possível disfunção cardíaca, particularmente, na fase da pós-menopausa.

A influência dos hormônios estrogênicos e do ANP sobre o sistema cardiovascular tem sido extensamente estudada. Contudo, pouco se sabe sobre a influência dos estrógenos sobre a síntese e liberação do ANP. Estudos mostraram que os níveis de ANP em mulheres jovens é em média o dobro dos homens e que essa diferença desaparece após a menopausa (CLARK et al., 1990). Em animais o estradiol foi capaz de aumentar a secreção basal de ANP em átrios perfundidos e isolados (DENG Y, 1993). Porém, poucos estudos investigaram os efeitos da terapia hormonal nos níveis circulantes da ANP em mulheres pós-menopausa e resultados conflitantes têm sido obtidos. De acordo com nossos resultados apresentados de ANP, estes corroboram com dados da literatura (BELO et al., 2004; DENG Y, 1993; GUTKOWSKA et al., 2007; ZHANG Y, 1995), a terapia com estrogênio normaliza os níveis de ANP plasmático.

No átrio esquerdo, o conteúdo e o RNAm de ANP atrial apresentaram-se reduzidos. O tratamento com 17-β estradiol e SERMs normalizaram esse

parâmetros. Tanto no grupo OVX quanto nos grupos EST, RAL e TAM, as variações do ANP plasmático foram correlacionadas com as mudanças na concentração do ANP no átrio esquerdo e não no átrio direito, diferentemente, do estudo de JANKOWSKI e colaboradores (2001) que encontrou diferença do conteúdo de ANP apenas no átrio direito. Esses resultados diferentes podem ser atribuídos a diversos fatores, os mais relevantes são referentes à linhagem do animal estudado, ao tempo de ovariectomia, a redução do peso do átrio entre outros. Estudos mostraram que, em resposta à expansão de volume, o átrio direito de ratos é a principal fonte liberadora de ANP (FAVARETTO et al., 1997; GUTKOWSKA et al., 1997). Porém, neste estudo, os níveis e a expressão de RNAm de ANP em ambos os átrios das fêmeas não foram avaliados em resposta à expansão do volume e sim à deficiência estrogênica.

A terapia hormonal com SERMs nas fêmeas ovariectomizadas, assim como o estrogênio normalizou os níveis plasmáticos de ANP mediado pela normalização da expressão gênica do RNAm do ANP atrial esquerdo, contudo, nas fêmeas ovariectomizadas o conteúdo de ANP do átrio esquerdo não foi normalizado. O raloxifeno e o tamoxifeno, assim como o estrogênio e a ovariectomia, não influenciaram na síntese e na liberação de ANP no átrio direito.

Diante do exposto, pode-se especular uma via de ligação entre o estrogênio e o ANP em relação a resposta inflamatória. O estrogênio, atuaria nos átrios aumentando a síntese e a liberação de ANP, e uma vez no plasma, o ANP, além dos seus conhecidos efeitos cardiovasculares, seria também responsável por normalizar os níveis de importantes biomarcadores. De forma similar ao estrogênio, os SERMs, por terem afinidade por receptores de estrogênio, também demonstram serem capazes de normalizarem importantes alterações cardiovasculares e imunológicas.

8. CONCLUSÃO

Nossos resultados indicam que a disfunção endotelial em anéis de aorta em resposta a fenilefrina e a acetilcolina, encontrada em ratos ovariectomizados, é normalizada pelo tratamento com raloxifeno e tamoxifeno a um grau semelhante aos animais do grupo SHAM, similarmente ocorre com o grupo tratado com 17- β estradiol. Podemos especular que caso, o raloxifeno ou tamoxifeno seja usados numa fase precoce de deficiência estrogênica, essas drogas exerçam um efeito protetor sobre a função endotelial, assim como exerçam importante controle sobre os biomarcadores cardíacos, pois conforme demonstrado esses biomarcadores estudados (NF- κ B, TNF - α e ANP) encontram-se alterados em ratas com deficiência estrogênica e os tratamentos com 17- β estradiol e os SERMs foram capazes de normalizar para níveis semelhantes aos do grupo SHAM, com exceção do grupo RAL, no qual este tratamento não normalizou o TNF- α . Portanto, o nosso estudo demonstrou pela primeira vez a influência dos SERMs sobre o sistema de peptídeos, com efeitos anti-inflamatórios que poderiam contribuir para prevenção de uma possível disfunção cardíaca, que mulheres na fase da pós-menopausa estão mais sujeitas a serem acometidas. Entretanto, recomenda-se que o uso contínuo destas terapias só deve ser utilizado após uma avaliação cuidadosa da relação risco-benefício em mulheres pós-menopáusicas, principalmente, em mulheres com histórico familiar de doenças cerebrovasculares.

9. REFERÊNCIAS:

ANDERSEN MR, S. S. Endothelial nitric oxide synthase activity in aorta of normo cholesterolemic rabbits: regional variation and the effect of estrogen. **Cardiovascular Research**, v. 47, n. 1, p. 192–199, 2000.

ANDRADE, T. U. et al. Effect of enalapril treatment on the sensitivity of cardiopulmonary reflexes in rats with myocardial infarction. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, v. 34, n. 7, p. 606–11, jul. 2007.

ARENAS, I. A et al. Chronic tumor necrosis factor-alpha inhibition enhances NO modulation of vascular function in estrogen-deficient rats. **Hypertension**, v. 46, n. 1, p. 76–81, jul. 2005.

ARNAL JF, CLAMENS S, P. C. Ethinylestradiol does not enhance the expression of nitric oxide synthase in bovine endothelial cells but increases the release of bioactive nitric oxide by inhibiting superoxide anion production. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 93, p. 4108–13, 1996.

AYDIN, H. et al. Effect of oxidative stress on aorta and tibia osteoprotegerin gene expression in ovariectomized rats. **Minerva endocrinologica**, v. 36, n. 2, p. 107–15, jun. 2011.

BAEUEERLE, P. A.; BALTIMORE, D. NF-kappa B: ten years after. **Cell**, v. 87, n. 1, p. 13–20, 4 out. 1996.

BARRETT-CONNOR, E. et al. Effects of raloxifene on cardiovascular events and breast cancer in postmenopausal women. **The New England journal of medicine**, v. 355, n. 2, p. 125–37, 13 jul. 2006.

BARTON, M.; MEYER, M. R.; PROSSNITZ, E. R. Estrogen-independent activation of estrogen receptors. **Hypertension**, v. 57, n. 6, p. 1056–7, jun. 2011.

BAXTER, G. F. The natriuretic peptides. **Basic research in cardiology**, v. 99, n. 2, p. 71–5, mar. 2004.

BECKER, J. B. et al. Strategies and methods for research on sex differences in brain and behavior. **Endocrinology**, v. 146, n. 4, p. 1650–73, abr. 2005.

BECKMAN, J. S. Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. **Chemical research in toxicology**, v. 9, n. 5, p. 836–44, 1996.

BELO, N. O. et al. Involvement of atrial natriuretic peptide in blood pressure reduction induced by estradiol in spontaneously hypertensive rats. **Regulatory Peptides**, v. 117, n. 1, p. 53–60, jan. 2004.

BESEDOVSKY, H. O.; REY, A. D. E. L. Immune-Neuro-Endocrine Interactions : Facts and Hypotheses. v. 17, n. 1, p. 35037, 2013.

BIANCHI PR, GUMZ BP, GIUBERTI K, S. I. Myocardial infarction increases reactivity to phenylephrine in isolated aortic rings of ovariectomized rats. **Life Sciences**, v. 78, p. 875–881, 2006.

BISSOLI, N. S. et al. Long-term treatment with supraphysiological doses of nandrolone decanoate reduces the sensitivity of Bezold-Jarisch reflex control of heart rate and blood pressure. **Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society**, v. 59, n. 6, p. 379–84, jun. 2009.

BLACK, L. J.; AL., E. Raloxifene (LY139481 HCl) prevents bone loss and reduces serum cholesterol without causing uterine hypertrophy in ovariectomized rats. **The Journal of clinical investigation**, v. 93, n. 1, p. 63–9, jan. 1994.

BOLEGO C, CIGNARELLA A, RUZZA R, ZAAROUR C, MESSI E, ZANISI M, P. L. (1. Differential effects of low- and high-dose estrogen treatments on vascular responses in female rats. **Life sciences**, v. 25, n. 60, p. 2291–2302, 1997.

BORGO, M. V. et al. Effect of tamoxifen on the coronary vascular reactivity of spontaneously hypertensive female rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 8, p. 786–792, ago. 2011.

BRIONES AM, ALONSO MJ, MARÍN J, BALFAGON G, S. M. I. Influence of hypertension on nitric oxide synthase expression and vascular effects of lipopolysaccharide in the mesenteric arteries. **British Journal of Pharmacology**, v. 131, n. 2, p. 185–194, 2000.

BRUCE-KELLER AJ, BARGER SW, MOSS NI, PHAM JT, KELLER JN, N. A. (2001. Pro- inflammatory and pro-oxidant properties of the HIV protein Tat in a microglial cell line: attenuation by 17 β -estradiol. **J Neurochem**, v. 78, p. 1315–1324, 2001.

BUPHA-INTR, T.; WATTANAPERMPPOOL, J. Regulatory role of ovarian sex hormones in calcium uptake activity of cardiac sarcoplasmic reticulum. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 291, n. 3, p. H1101–8, set. 2006.

BURNETT, J. C. et al. Atrial natriuretic peptide elevation in congestive heart failure in the human. **Science (New York, N.Y.)**, v. 231, n. 4742, p. 1145–7, 7 mar. 1986.

CAGNACCI, A. et al. Physiological doses of estradiol decrease nocturnal blood pressure in normotensive postmenopausal women. p. 1355–1360, 1999.

CALIMAN, I. F. et al. Endothelial relaxation mechanisms and oxidative stress are restored by atorvastatin therapy in ovariectomized rats. **PloS one**, v. 8, n. 11, p. e80892, jan. 2013.

CAMPOREZ, J. P. G. et al. Dehydroepiandrosterone protects against oxidative stress-induced endothelial dysfunction in ovariectomized rats. **The Journal of physiology**, v. 589, n. Pt 10, p. 2585–96, 15 maio 2011.

CAU SBA, CARNEIRO FS, T. R. Differential modulation of nitric oxide synthases in aging: therapeutic opportunities. **Frontiers in Physiology**, v. 3, n. 218, p. 1–11, 2012.

CHANG WC, NAKAO J, ORIMO H, M. S. Stimulation of prostaglandin cyclooxygenase and prostacyclin synthetase activities by estradiol in rat aortic smooth muscle cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 620, p. 472–482, 1980.

CHEN, Y.; ROSS, B. M.; CURRIE, R. W. Heat shock treatment protects against angiotensin II-induced hypertension and inflammation in aorta. **Cell stress & chaperones**, v. 9, n. 1, p. 99–107, mar. 2004.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical biochemistry**, v. 162, n. 1, p. 156–9, abr. 1987.

CHRISTODOULAKOS, G. E.; LAMBRINOUDAKI, I. V; BOTSIS, D. C. The cardiovascular effects of selective estrogen receptor modulators. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1092, p. 374–84, dez. 2006.

CLARK BA, ELAHI D, E. F. The influence of gender, age and the menstrual cycle on plasma Atrial Natriuretic Peptide. **Clin Endocrinol Metab**, v. 70, p. 349–352, 1990.

CLARKE, S. C. et al. Tamoxifen Effects on Endothelial Function and Cardiovascular Risk Factors in Men With Advanced Atherosclerosis. **Circulation**, v. 103, n. 11, p. 1497–1502, 20 mar. 2001.

CLERICO, A; IERVASI, G.; MARIANI, G. Pathophysiologic relevance of measuring the plasma levels of cardiac natriuretic peptide hormones in humans. **Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme**, v. 31, n. 9, p. 487–98, set. 1999.

COGAN, M. G. Atrial natriuretic factor can increase renal solute excretion primarily by raising glomerular filtration. **The American journal of physiology**, v. 250, n. 4 Pt 2, p. F710–4, abr. 1986.

COLACURCI, N. et al. Endothelial function and menopause: effects of raloxifene administration. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 88, n. 5, p. 2135–40, maio 2003.

COSMAN, F.; LINDSAY, R. Selective estrogen receptor modulators: clinical spectrum. **Endocrine reviews**, v. 20, n. 3, p. 418–34, jun. 1999.

CUTOLO M, BRIZZOLARA R, ATZENI F, CAPELLINO S, STRAUB RH, P. P. The immunomodulatory effects of estrogens: clinical relevance in immune-mediated rheumatic diseases. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 1193, p. 36–42, 2010.

DALPIAZ, P. L. M. **A Influência dos Hormônios Sexuais no Balanço entre as Citocinas Pró-Inflamatórias e Anti- Inflamatórias em Machos e Fêmeas**

SHR, Após o Tratamento com Enalapril. [s.l.] Universidade Federal do Espírito Santo, 2011.

DANTAS, A. P. V. et al. In Vivo Evidence for Antioxidant Potential of Estrogen in Microvessels of Female Spontaneously Hypertensive Rats. **Hypertension**, v. 39, n. 2, p. 405–411, 1 fev. 2002.

DAVEL, A. P. et al. Endothelial dysfunction in cardiovascular and endocrine-metabolic diseases: an update. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 9, p. 920–932, set. 2011.

DAVEL, A. P. C. et al. Effects of isoproterenol treatment for 7 days on inflammatory mediators in the rat aorta. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 295, n. 1, p. H211–9, jul. 2008.

DE BOLD, A. J. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 12, n. 2, p. 403–9; discussion 403–8, 408–9, fev. 1981.

DE MEDEIROS, A. R. S. et al. Tibolone has anti-inflammatory effects in estrogen-deficient female rats on the natriuretic peptide system and TNF-alpha. **Regulatory peptides**, v. 179, n. 1-3, p. 55–60, 10 nov. 2012.

DENG Y, K. S. The influence of reproductive hormones on ANF release by rat atria. **Life sciences**, v. 53, p. 689–695, 1993.

DUBEY, R. K. et al. Vascular consequences of menopause and hormone therapy: importance of timing of treatment and type of estrogen. **Cardiovascular research**, v. 66, n. 2, p. 295–306, 1 maio 2005.

DUTERTRE, M.; SMITH, C. L. Molecular Mechanisms of Selective Estrogen Receptor Modulator (SERM) Action. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 295, n. 2, p. 431–7, nov. 2000.

ESPINER, E. A. et al. Natriuretic hormones. **Endocrinology and metabolism clinics of North America**, v. 24, n. 3, p. 481–509, set. 1995.

ETTINGER, B. et al. Reduction of vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis treated with raloxifene: results from a 3-year

randomized clinical trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation (MORE) Investigators. **JAMA**, v. 282, n. 7, p. 637–45, 18 ago. 1999.

FARHAT, M. Y.; ABI-YOUNES, S.; RAMWELL, P. W. Non-genomic effects of estrogen and the vessel wall. **Biochemical pharmacology**, v. 51, n. 5, p. 571–6, 8 mar. 1996.

FAVARETTO AL, BALLEJO GO, ALBUQUERQUE-ARAÚJO WI, GUTKOWSKA J, ANTUNES-RODRIGUES J, M. S. Oxytocin releases atrial natriuretic peptide from rat atria in vitro that exerts negative inotropic and chronotropic action. **Peptides**, v. 18, n. 9, p. 1377–1381, 1997.

FENOY FJ, HERNANDEZ ME, HERNANDEZ M, QUESADA T, SALOM MG, H. I. (. Acute effects of 2-methoxyestradiol on endothelial aortic No release in male and ovariectomized female rats. **Nitric Oxide**, v. 23, n. 1, p. 12–19, 2010.

FIGTREE, G. A.; WEBB, C. M.; COLLINS, P. Tamoxifen Acutely Relaxes Coronary Arteries by an Dependent Mechanism. **THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS**, v. 295, n. 2, p. 519–523, 2000.

FLEENOR BS, SEALS DR, ZIGLER ML, S. A. Superoxide-lowering therapy with Tempol reverses arterial dysfunction with aging in mice. **Aging Cell**, v. 11, p. 269–276, 2011.

FLORIAN, M.; FREIMAN, A.; MAGDER, S. Treatment with 17-beta-estradiol reduces superoxide production in aorta of ovariectomized rats. **Steroids**, v. 69, n. 13-14, p. 779–87, dez. 2004.

FLYNN, T. G.; DE BOLD, M. L.; DE BOLD, A. J. The amino acid sequence of an atrial peptide with potent diuretic and natriuretic properties. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 117, n. 3, p. 859–65, 28 dez. 1983.

GARCIA, A. R. S. DE M. **Ação moduladora da tibolona no sistema de peptídeos natriuréticos: implicações cardiovasculares e imunológicas.** [s.l: s.n.].

GHISLETTI S, MEDA C, MAGGI A, V. E. 17beta-estradiol inhibits inflammatory gene expression by controlling NF-kappa β intracellular localization. **Mol Cell**, v. 25, p. 2957–2968, 2005.

GHISLETTI, S. et al. 17beta-estradiol inhibits inflammatory gene expression by controlling NF-kappaB intracellular localization. **Molecular and cellular biology**, v. 25, n. 8, p. 2957–68, abr. 2005.

GHOSH, S.; HAYDEN, M. S. New regulators of NF-kappaB in inflammation. **Nature reviews. Immunology**, v. 8, n. 11, p. 837–48, nov. 2008a.

GHOSH, S.; HAYDEN, M. S. New regulators of NF-kappaB in inflammation. **Nature reviews. Immunology**, v. 8, n. 11, p. 837–48, nov. 2008b.

GHOSH, S.; MAY, M. J.; KOPP, E. B. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. **Annual review of immunology**, v. 16, p. 225–60, jan. 1998.

GIBSON, U. E.; HEID, C. A; WILLIAMS, P. M. A novel method for real time quantitative RT-PCR. **Genome research**, v. 6, n. 10, p. 995–1001, 1 out. 1996.

GIMÉNEZ, J. et al. 17Beta-oestradiol enhances the acute hypotensive effect of captopril in female ovariectomized spontaneously hypertensive rats. **Experimental physiology**, v. 91, n. 4, p. 715–22, jul. 2006.

GIZZO, S. et al. Update on raloxifene: mechanism of action, clinical efficacy, adverse effects, and contraindications. **Obstetrical & gynecological survey**, v. 68, n. 6, p. 467–81, jun. 2013.

GJERDE, J. et al. Associations between tamoxifen, estrogens, and FSH serum levels during steady state tamoxifen treatment of postmenopausal women with breast cancer. **BMC cancer**, v. 10, p. 313, jan. 2010.

GOLDEN, S. H. et al. Endogenous postmenopausal hormones and carotid atherosclerosis: a case-control study of the atherosclerosis risk in communities cohort. **American journal of epidemiology**, v. 155, n. 5, p. 437–45, 1 mar. 2002.

GOMPEL, A. et al. Association of menopause and hormone replacement therapy with large artery remodeling. **Fertility and sterility**, v. 96, n. 6, p. 1445–50, dez. 2011.

GRIENGLING, K. K.; SORESCU, D.; USHIO-FUKAI, M. NAD(P)H Oxidase : Role in Cardiovascular Biology and Disease. **Circulation Research**, v. 86, n. 5, p. 494–501, 17 mar. 2000.

GRYGLEWSKIL, R. J. et al. Bioassay of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor (EDRF) from porcine aortic endothelial cells. p. 685–694, 1986.

GURNEY, E. P. et al. The Women's Health Initiative trial and related studies: 10 years later: a clinician's view. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 142, p. 4–11, jul. 2014.

GUTKOWSKA, J. et al. Circulating forms and radioimmunoassay of atrial natriuretic factor. **Endocrinology and metabolism clinics of North America**, v. 16, n. 1, p. 183–98, mar. 1987.

GUTKOWSKA, J. et al. Oxytocin releases atrial natriuretic peptide by combining with oxytocin receptors in the heart. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 21, p. 11704–9, 14 out. 1997.

GUTKOWSKA, J. et al. Effect of exercise training on cardiac oxytocin and natriuretic peptide systems in ovariectomized rats. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 293, n. 1, p. R267–75, jul. 2007.

HAMILTON CA, BROSNAM MJ, AL-BENNA S, BERG G, D. A. NAD(P)H oxidase inhibition improves endothelial function in rat and human blood vessels. **Hypertension**, v. 40, p. 755–762, 2002.

HARRINSON DG, G. M. Oxidative stress and hypertension. **The Medical Clinics and North America**, v. 93, p. 621–635, 2009.

HARRISON DG, WIDDER J, GRUMBACH I, CHEN W, WEBER M, S. C. Endothelial mechanotransduction, nitric oxide and vascular inflammation. **J Intern Med**, v. 259, p. 351–363, 2006.

HAYNES MP, SINHA D, RUSSELL KS, COLLINGE M, FULTON D, MORALES-RUIZ M, SESSA WC, B. J. Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells. **Circulation research**, v. 87, n. 8, p. 677–682, 2000.

HERNÁNDEZ, I. et al. 17beta-estradiol prevents oxidative stress and decreases blood pressure in ovariectomized rats. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 279, n. 5, p. R1599–605, nov. 2000.

HERNANDEZ, R. K. et al. Tamoxifen treatment and risk of deep venous thrombosis and pulmonary embolism: a Danish population-based cohort study. **Cancer**, v. 115, n. 19, p. 4442–9, 1 out. 2009.

HIROTA, H. et al. Continuous activation of gp130, a signal-transducing receptor component for interleukin 6-related cytokines, causes myocardial hypertrophy in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 11, p. 4862–6, 23 maio 1995.

HISAMOTO, K. et al. Induction of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by the raloxifene analog LY117018 is differentially mediated by Akt and extracellular signal-regulated protein kinase in vascular endothelial cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 50, p. 47642–9, 14 dez. 2001.

HONG, M. et al. Estradiol, progesterone and testosterone exposures affect the atrial natriuretic peptide gene expression in vivo in rats. **Biological chemistry Hoppe-Seyler**, v. 373, n. 4, p. 213–8, abr. 1992.

HOZUMI, Y.; HAKAMATA, Y.; NAGAI, H. Plasma leptin concentration in tamoxifen-treated ovariectomized rats . **Gynecol Obstet Invest.**, v. 59, n. 2, p. 15542935, 2005.

HULLEY, S. et al. Randomized Trial of Estrogen Plus Progestin for Secondary Prevention of Coronary Heart Disease in Postmenopausal Women. **JAMA**, v. 280, n. 7, 1998.

IBGE. **IBGE. Indicadores Sociais Mínimos.**
http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/indicadores_minimos/sinteseindicsociais2010/SIS_2010.pdf.

JA, D. et al. How well does B-type natriuretic peptide predict death and cardiac events in patients with heart failure : systematic review . v. 330, n. 7492, 2005.

JANKOWSKI, M. et al. Estrogen receptors activate atrial natriuretic peptide in the rat heart. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 20, p. 11765–70, 25 set. 2001.

JD, C. A. & C. Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. **Vascular pharmacology**, v. 49, p. 134–140, 2008.

KELLER, D. R. K. . G. D. G. . I. B. . R. M. . J. E. K. . Phytoestrogens inhibit growth and MAP kinase activity in human aortic smooth muscle cells. **Hypertension**, v. 33, p. 177–182, 1999.

KIEMER, A K. et al. Atrial natriuretic peptide reduces expression of TNF-alpha mRNA during reperfusion of the rat liver upon decreased activation of NF-kappaB and AP-1. **Journal of hepatology**, v. 33, n. 2, p. 236–46, ago. 2000.

KIEMER, A. K. et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 by natriuretic peptides. **Endocrinology**, v. 143, n. 3, p. 846–52, mar. 2002.

KIEMER, A. K.; VOLLMAR, A. M. The atrial natriuretic peptide regulates the production of inflammatory mediators in macrophages. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 60 Suppl 3, p. iii68–70, nov. 2001.

KIM, K. H.; MORIARTY, K.; BENDER, J. R. Vascular cell signaling by membrane estrogen receptors. **Steroids**, v. 73, n. 9-10, p. 864–9, out. 2008.

KLOOSTERBOER, H. J.; EDERVEEN, A. G. H. Pros and cons of existing treatment modalities in osteoporosis: a comparison between tibolone, SERMs

and estrogen (+/-progestogen) treatments. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 83, n. 1-5, p. 157–65, dez. 2002.

KUROSKI DE BOLD, M. L. Estrogen, natriuretic peptides and the renin-angiotensin system. **Cardiovascular research**, v. 41, n. 3, p. 524–31, mar. 1999.

LADETZKI-BAEHS, K. et al. Atrial natriuretic peptide, a regulator of nuclear factor-kappaB activation in vivo. **Endocrinology**, v. 148, n. 1, p. 332–6, jan. 2007.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–5, 15 ago. 1970.

LAMAS, A. **EFEITO DO TRATAMENTO COM MODULADORES SELETIVOS DE RECEPTORES DE ESTROGÊNIO (SERMs) SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR E SOBRE OS NÍVEIS SÉRICOS DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS EM RATAS OVARECTOMIZADAS**. [s.l.] Universidade Federal do Espírito Santo, 2009.

LAWRENCE, T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 1, n. 6, p. a001651, dez. 2009.

LEAN, J. M. et al. Hydrogen peroxide is essential for estrogen-deficiency bone loss and osteoclast formation. **Endocrinology**, v. 146, n. 2, p. 728–35, fev. 2005.

LEE, Y.-H.; KANG, B. S.; BAE, Y.-S. Premature senescence in human breast cancer and colon cancer cells by tamoxifen-mediated reactive oxygen species generation. **Life sciences**, v. 97, n. 2, p. 116–22, 3 mar. 2014.

LEUNG, F. P. et al. Raloxifene , tamoxifen and vascular tone. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, v. 34, n. 8, p. 809–13, ago. 2007.

LEVIN, E. R.; GARDNER, D. G.; SAMSON, W. K. Natriuretic peptides. **The New England journal of medicine**, v. 339, n. 5, p. 321–8, 30 jul. 1998.

LEVINE, B. et al. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. **The New England journal of medicine**, v. 323, n. 4, p. 236–41, 26 jul. 1990.

LI H, WALLERATH T, F. U. Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase. **Nitric Oxide**, v. 7, p. 132–147, 2002.

LI, X.; STARK, G. R. NFkappaB-dependent signaling pathways. **Experimental hematology**, v. 30, n. 4, p. 285–96, abr. 2002.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–8, dez. 2001.

LÍVEA FUJITA BARBOSA, M. H. G. DE M. E O. A. DANOS OXIDATIVOS E NEURODEGENERAÇÃO: O QUÊ APRENDEMOS COM ANIMAIS TRANSGÊNICOS E NOCAUTES? **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1352–1360, 2006.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–75, nov. 1951.

LOYER X, DAMY T, CHVOJKOVA Z, ROBIDEL E, MAROTTE F, OLIVIERO P, HEYMES C, S. J. 17β Estradiol Regulates Constitutive Nitric Oxide Synthase Expression Differentially in the Myocardium in Response to Pressure Overload. **Endocrinology**, v. 148, n. 10, p. 4579–4584, 2007.

MACRITCHIE AN, JUN SS, CHEN Z, GERMAN Z, YUHANNA IS, SHERMAN TS, S. P. Estrogen upregulates endothelial nitric oxide synthase gene expression in fetal pulmonary artery endothelium. **Circulation research**, v. 81, p. 355–362, 1997.

MAFFEI, S. et al. Increase in circulating levels of cardiac natriuretic peptides after hormone replacement therapy in postmenopausal women . v. 101, n. 5, p. 2001, 2001.

MAGNESS, RR; ROSENFELD, C. Local and systemic estradiol-17 beta: effects on uterine and systemic vasodilation . v. 256, p. 2650565, 1989.

MANSON, J. E. et al. Estrogen plus progestin and the risk of coronary heart disease. **The New England journal of medicine**, v. 349, n. 6, p. 523–34, 7 ago. 2003.

MARÍN, J. Mechanisms involved in the increased vascular resistance in hypertension. **Journal of autonomic pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 127–76, abr. 1993.

MARK, C. J. et al. Effects of estrogens and selective estrogen receptor modulators on vascular reactivity in the perfused mesenteric vascular bed. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 293, n. 5, p. R1969–75, nov. 2007.

MELO, L. G. et al. Salt-sensitive hypertension in ANP knockout mice: potential role of abnormal plasma renin activity. **The American journal of physiology**, v. 274, n. 1 Pt 2, p. R255–61, jan. 1998.

MENDELSON, M. E.; KARAS, R. H. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. **The New England journal of medicine**, v. 340, n. 23, p. 1801–11, 10 jun. 1999.

MILLER, A. A et al. Effect of gender on NADPH-oxidase activity, expression, and function in the cerebral circulation: role of estrogen. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 38, n. 7, p. 2142–9, jul. 2007.

MONCADA, S. [Significance of endogenous nitric oxide production for the effect of nitrates and in septic shock]. **Schweizerische Rundschau für Medizin Praxis = Revue suisse de médecine Praxis**, v. 82, n. 42, p. 1154–60, 19 out. 1993.

MONTEIRO, R. et al. Chronic green tea consumption decreases body mass, induces aromatase expression, and changes proliferation and apoptosis in adult male rat adipose tissue. **The Journal of nutrition**, v. 138, n. 11, p. 2156–63, nov. 2008.

MONTENEGRO, M. F. **Efeitos do tamoxifeno e seus metabólitos na reatividade vascular.** [s.l: s.n.].

MOYSÉS, M. R.; BARKER, L. A; CABRAL, A M. Sex hormone modulation of serotonin-induced coronary vasodilation in isolated heart. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]**, v. 34, n. 7, p. 949–58, jul. 2001.

MUEHLFELDER, M. et al. Both estrogen receptor subtypes, ER α and ER β , prevent aldosterone-induced oxidative stress in VSMC via increased NADPH bioavailability. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 423, n. 4, p. 850–6, 13 jul. 2012.

MÜNDEL, T. et al. Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMP-dependent protein kinase. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 25, n. 8, p. 1551–7, ago. 2005.

MURPHY, E. Estrogen signaling and cardiovascular disease. **Circulation research**, v. 109, n. 6, p. 687–96, 2 set. 2011.

NAKAJIMA, T. et al. 17beta-Estradiol inhibits the voltage-dependent L-type Ca²⁺ + currents in aortic smooth muscle cells . v. 294, p. 8750727, 1995.

NASH, J. D. et al. Estrogen and anti-estrogen effects on the growth of human epithelial ovarian cancer in vitro. **Obstetrics and gynecology**, v. 73, n. 6, p. 1009–16, jun. 1989.

NAWATE, S. et al. 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**, v. 144, n. 2, p. 178–89, jan. 2005.

OLIVEIRA, P. W. C. et al. Metformin ameliorates ovariectomy-induced vascular dysfunction in non-diabetic Wistar rats. **Clinical science (London, England: 1979)**, 13 fev. 2014.

ONAL, B. et al. Novel alterations in superoxide dismutase and catalase activities in the female rabbit bladder subjected to hormonal manipulations . v. 39, n. 4, p. 17333513, 2007.

OSBORNE, C. K. Tamoxifen in the treatment of breast cancer. **The New England journal of medicine**, v. 339, n. 22, p. 1609–18, 26 nov. 1998.

PAIGEL, A. S. et al. Myocardial contractility is preserved early but reduced late after ovariectomy in young female rats. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 9, n. 1, p. 54, jan. 2011.

PANDEY, K. N. Biology of natriuretic peptides and their receptors. **Peptides**, v. 26, n. 6, p. 901–32, jun. 2005.

PARAVICINI, T. M.; TOUYZ, R. M. Redox signaling in hypertension. **Cardiovascular research**, v. 71, n. 2, p. 247–58, 15 jul. 2006.

PAREDES-CARBAJAL MC, JUAREZ-OROPEZA MA, ORTIZ-MENDOZA CM, M. D. Effects of acute and chronic estrogenic treatment on vasomotor responses of aortic rings from ovariectomized rats. **Life Sciences**, v. 57, p. 473–486, 1995.

PINNA, C. et al. Raloxifene Elicits Combined Rapid Vasorelaxation and Long-Term Anti-Inflammatory Actions in Rat Aorta. **THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS**, v. 319, n. 3, p. 1444–1451, 2006.

PINNA, C. et al. Prolonged ovarian hormone deprivation impairs the protective vascular actions of estrogen receptor alpha agonists. **Hypertension**, v. 51, n. 4, p. 1210–7, abr. 2008.

POTTER, L. R.; ABBEY-HOSCH, S.; DICKEY, D. M. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. **Endocrine reviews**, v. 27, n. 1, p. 47–72, fev. 2006.

RAHIMIAN, R. et al. Raloxifene enhances nitric oxide release in rat aorta via increasing endothelial nitric oxide mRNA expression. **European journal of pharmacology**, v. 434, n. 3, p. 141–9, 11 jan. 2002.

REN, J. et al. Impact of estrogen replacement on ventricular myocyte contractile function and protein kinase B/Akt activation. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 284, n. 5, p. H1800–7, maio 2003.

RG, L. Gender and the immune system. **j Gend Specif Med**, v. 3, n. 7, p. 11252923, 2000.

RICCIONI G1, D'ORAZIO N, MENNA V, LAMBO MS, GUAGNANO MT, D. I. C. Role of leptin in anorexia nervosa. **Clin Ter.**, v. 154, n. 6, p. 14994520, 2003.

RIEDEL, M. et al. Vascular responses to 17 beta-oestradiol in postmenopausal women . v. 25, n. 1, p. 7705386, 1995.

ROMERO, W. G. et al. Tamoxifen alters the plasma concentration of molecules associated with cardiovascular risk in women with breast cancer undergoing chemotherapy. **The oncologist**, v. 17, n. 4, p. 499–507, jan. 2012.

ROSSOUW, J. E. et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. **JAMA: the journal of the American Medical Association**, v. 288, n. 3, p. 321–33, 17 jul. 2002.

RUBANYI, G. M.; VANHOUTTE, P. M. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. **The American journal of physiology**, v. 250, n. 5 Pt 2, p. H822–7, maio 1986.

RUBATTU, S.; VOLPE, M. The atrial natriuretic peptide : a changing view . v. 19, n. 11, p. 11677356, 2001.

SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, M. A. et al. Menopause as risk factor for oxidative stress. **Menopause (New York, N.Y.)**, v. 19, n. 3, p. 361–7, mar. 2012.

SATO, M. et al. Advantages of raloxifene over alendronate or estrogen on nonreproductive and reproductive tissues in the long-term dosing of ovariectomized rats. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 279, n. 1, p. 298–305, out. 1996.

SATO, M.; RIPPY, M. K.; BRYANT, H. U. Raloxifene, tamoxifen, nafoxidine, or estrogen effects on reproductive and nonreproductive tissues in ovariectomized

rats. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 10, n. 8, p. 905–12, jun. 1996.

SEIDMAN, C. E. et al. The structure of rat preproatrial natriuretic factor as defined by a complementary DNA clone. **Science (New York, N.Y.)**, v. 225, n. 4659, p. 324–6, 20 jul. 1984.

SHAH, V. P. et al. Tamoxifen promotes superoxide production in platelets by activation of PI3-kinase and NADPH oxidase pathways. **Thrombosis research**, v. 129, n. 1, p. 36–42, jan. 2012.

SIMONCINI T, G. A. Non-genomic actions of sex steroid hormones. **Eur J Endocrinol**, v. 148, p. 281–292, 2003.

SLIWIŃSKI, L. et al. A comparative study of the effects of genistein, estradiol and raloxifene on the murine skeletal system. **Acta biochimica Polonica**, v. 56, n. 2, p. 261–70, jan. 2009.

SMILEY, D. A.; KHALIL, R. A. Estrogenic compounds, estrogen receptors and vascular cell signaling in the aging blood vessels. **Current medicinal chemistry**, v. 16, n. 15, p. 1863–87, jan. 2009.

SPINETTI, A et al. Hormonal replacement therapy affects calcitonin gene-related peptide and atrial natriuretic peptide secretion in postmenopausal women. **European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies**, v. 137, n. 6, p. 664–9, dez. 1997.

STAMATELOPOULOS, K. S. et al. Tamoxifen improves endothelial function and reduces carotid intima-media thickness in postmenopausal women. **American heart journal**, v. 147, n. 6, p. 1093–9, jun. 2004.

STAMPFER, M. J. et al. Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease. Ten-year follow-up from the nurses' health study. **The New England journal of medicine**, v. 325, n. 11, p. 756–62, 12 set. 1991.

STICE, J. P. et al. 17β -Estradiol, aging, inflammation, and the stress response in the female heart. **Endocrinology**, v. 152, n. 4, p. 1589–98, abr. 2011.

STICE, J. P.; KNOWLTON, A. A. Estrogen, NFkappaB, and the heat shock response. **Molecular medicine (Cambridge, Mass.)**, v. 14, n. 7-8, p. 517–27, 2008.

STICE JP, EISERICH JP, K. A. Role of aging versus the loss of estrogens in the reduction in vascular function in female rats. **Endocrinology**, v. 150, p. 212–219, 2009.

STREHLOW, K. et al. Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. **Circulation research**, v. 93, n. 2, p. 170–7, 25 jul. 2003.

SUDOH, T. et al. A new natriuretic peptide in porcine brain . v. 332, n. 6159, p. 2964562, 1988.

SUDOH, T. et al. C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 168, n. 2, p. 863–70, 30 abr. 1990.

SUN J, LAWRENCE J, DRUHAN J, Z. L. Reactive oxygen and nitrogen species regulate inducible nitric oxide synthase function shifting the balance of nitric oxide and superoxide production. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 494, p. 130–137, 2010.

TAKAHASHI, K. et al. Raloxifene improves the ovariectomy-induced impairment in endothelium-dependent vasodilation. **Menopause (New York, N.Y.)**, v. 14, n. 4, p. 656–61, 2007.

TESTA, M. et al. Circulating levels of cytokines and their endogenous modulators in patients with mild to severe congestive heart failure due to coronary artery disease or hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 28, n. 4, p. 964–71, out. 1996.

TG, Y. et al. Assay of brain natriuretic peptide (BNP) in human plasma : evidence for high molecular weight BNP as a major plasma component in heart failure . v. 76, n. 4, p. 8473392, 1993.

TOSTES, R. C.; NIGRO, D.; FORTES, Z. B. Effects of estrogen on the vascular system. v. 36, p. 1143–1158, 2003.

VITSEVA, O. et al. The Effects of Tamoxifen and Its Metabolites on Platelet Function and Release of Reactive Oxygen Intermediates. **THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS**, v. 312, n. 3, p. 1144–1150, 2005.

VOLLMAR, A. M. The role of atrial natriuretic peptide in the immune system. **Peptides**, v. 26, n. 6, p. 1086–94, jun. 2005.

WAN, F.; LENARDO, M. J. The nuclear signaling of NF-kappaB: current knowledge, new insights, and future perspectives. **Cell research**, v. 20, n. 1, p. 24–33, jan. 2010.

WASSERTHEIL-SMOLLER, S. et al. Effect of estrogen plus progestin on stroke in postmenopausal women: the Women's Health Initiative: a randomized trial. **JAMA**, v. 289, n. 20, p. 2673–84, 28 maio 2003.

WASSMANN K, WASSMANN S, N. G. Progesterone antagonizes the vasoprotective effect of estrogen on antioxidant enzyme expression and function. **Circulation research**, v. 97, p. 1046–1054, 2005.

WASSMANN, S. et al. Raloxifene improves endothelial dysfunction in hypertension by reduced oxidative stress and enhanced nitric oxide production. **Circulation**, v. 105, n. 17, p. 2083–91, 30 abr. 2002.

WEST, S. G. et al. Transdermal estrogen reduces vascular resistance and serum cholesterol in postmenopausal women. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 184, n. 5, p. 926–33, abr. 2001.

WONG, C. M. et al. Raloxifene prevents endothelial dysfunction in aging ovariectomized female rats. **Vascular pharmacology**, v. 44, n. 5, p. 290–8, maio 2006.

WONG, C. M. et al. Raloxifene protects endothelial cell function against oxidative stress. **British journal of pharmacology**, v. 155, n. 3, p. 326–34, out. 2008.

WOODS, N. F. et al. Symptoms during the menopausal transition and early postmenopause and their relation to endocrine levels over time: observations

from the Seattle Midlife Women's Health Study. **Journal of women's health** (2002), v. 16, n. 5, p. 667–77, jun. 2007.

XING, D. et al. Estrogen and mechanisms of vascular protection. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 29, n. 3, p. 289–95, mar. 2009a.

XING, D. et al. Estrogen and Mechanisms of Vascular Protection. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 29, n. 3, p. 289–95, mar. 2009b.

YOSHITAKE, K. et al. Effects of 16 weeks of treatment with tibolone on bone mass and bone mechanical and histomorphometric indices in mature ovariectomized rats with established osteopenia on a low-calcium diet. **Bone**, v. 25, n. 3, p. 311–9, set. 1999.

YUNG LM, WONG WT, TIAN XY, LEUNG FP, YUNG LH, CHEN ZY, YAO X, LAU CW, H. Y. Inhibition of Renin-Angiotensin System Reverses Endothelial Dysfunction and Oxidative Stress in Estrogen Deficient Rats. **Plos one**, v. 6, n. 3, p. 17437, 2011.

ZHANG Y, N. K. Atrial natriuretic factor release during pregnancy in rats. **J Physiol**, v. 488, p. 509–514, 1995.

ZIELONKA, J. et al. Peroxynitrite is the major species formed from different flux ratios of co-generated nitric oxide and superoxide: direct reaction with boronate-based fluorescent probe. **The Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 19, p. 14210–6, 7 maio 2010.

