

**EFEITOS DA TERAPIA HORMONAL COMBINADA DE ESTROGÊNIO
E DROSPIRENONA SOBRE A REATIVIDADE CORONARIANA EM
RATAS OVARIECTOMIZADAS ESPONTANEAMENTE
HIPERTENSAS.**

MARIANA VERONEZ BORGIO

Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas

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

Vitória, ES maio de 2015

MARIANA VERONEZ BORGIO

**EFEITOS DA TERAPIA HORMONAL COMBINADA DE ESTROGÊNIO E
DROSPIRENONA SOBRE A REATIVIDADE CORONARIANA EM RATAS
OVARIECTOMIZADAS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSAS.**

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

Orientadora

Prof.^a Dr.^a. Gláucia Rodrigues de Abreu.

VITÓRIA
2015

**EFEITOS DA TERAPIA HORMONAL COMBINADA DE ESTROGÊNIO E
DROSPIRENONA SOBRE A REATIVIDADE CORONARIANA EM RATAS
OVARIECTOMIZADAS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSAS.**

MARIANA VERONEZ BORGIO

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

Aprovada em

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a. Gláucia Rodrigues de Abreu
Orientadora

Prof.^a Dr.^a Angélica Espinosa Barbosa Miranda

Prof.^a Dr.^a. Sonia Alves Gouvêa

Prof. Dr. Helder Mauad

Prof.^a Dr.^a. Silvana do Santos Meyrelles

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, Maio de 2015.



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

Borgo, Mariana Veronez

EFEITOS DA TERAPIA HORMONAL COMBINADA DE ESTROGÊNIO E DROSPIRENONA SOBRE A REATIVIDADE CORONARIANA EM RATAS OVARIECTOMIZADAS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSAS.

Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Centro Biomédico, Universidade Federal do Espírito Santo.

Orientadora: Prof^a Dr^a Gláucia Rodrigues de Abreu

1. Hipertensão 2. Menopausa 3. Drospirenona 4. Reatividade Coronariana

*Ao meu marido,
meu parceiro e grande
incentivador desta
longa caminhada.*

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de crescimento.

A meus pais Mara e Robson e meus irmãos Pablo, Lia e Eric por estarmos juntos nessa caminhada.

Ao meu companheiro de vida Bernardo que me apoiou incondicionalmente, sem questionar minhas ausências e me estimulou a prosseguir sempre.

À Helena, minha filha, por quem busco ser exemplo.

À minha orientadora Prof^ª. Dra. Gláucia Rodrigues de Abreu por confiar em mim e oferecer o apoio necessário para o meu desenvolvimento como pesquisadora.

Aos colegas do laboratório Renato e Laíz pela ajuda diária com o tratamento dos animais.

Ao Erick meu agradecimento especial pela parceria fundamental em momento tão especial da minha vida. Ao Fabrício, pela contribuição com o melhoramento gráfico da tese e da apresentação, além dos maravilhosos momentos de reflexões filosóficas. À Simone, com quem dividi momentos que vão além da pesquisa.

Aos demais colegas: Suelen, Mariza, Paulo, Vinícius, Cíntia e Renata pelo apoio e ensinamentos.

Aos colegas do Laboratório de Coração Isolado que dividiram comigo os momentos de experimentação no Languendorff com as angústias e as alegrias desse. Ao Prof. Roger por abrir as portas do seu laboratório para o desenvolvimento dos trabalhos.

Aos colegas do Laboratório de Endocrinologia e Toxicologia Celular Priscila e Gabriela pelo apoio fundamental para o desenvolvimento das análises histológicas e de biologia molecular e ao Prof. Jones por abrir as portas do laboratório.

À Profa Sônia Golvêa por sempre me apoiar e auxiliar com carinho.

A todos os professores e funcionários do departamento que direta ou indiretamente participaram dessa conquista.

Muito obrigada!

"Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos."

Isaac Newton

RESUMO

A incidência de hipertensão arterial aumenta de forma significativa em mulheres após a menopausa, um fenômeno que parece estar associado à redução dos níveis de estrogênio. A drospirenona (DRSP) é uma progestina com propriedades anti-androgênica e anti-mineralocorticóide. No entanto, os seus efeitos sobre a vasodilatação coronária dependente do endotélio não foram avaliadas. Dessa forma, este estudo investigou os efeitos da terapia combinada com 17 β -estradiol (E2) e DRSP sobre a vasodilatação endotélio-dependente do leito coronariano de ratas espontaneamente hipertensas ovariectomizadas. Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: Sham operado (Sham), ovariectomizadas (OVX), ovariectomizadas tratadas com E2 (E2) e ovariectomizadas tratadas com E2 e DRSP (E2+DRSP), ambos tratados por 6 semanas. Os parâmetros hemodinâmicos foram avaliados diretamente por cateterização da artéria femoral. Já a vasodilatação dependente do endotélio, em resposta à bradicinina no leito arterial coronariano, foi avaliada usando corações isolados de acordo com o método de Langendorff modificado. O conteúdo proteico da enzima óxido nítrico sintase endotelial e do receptor de estrogênio alfa (ER- α) das coronárias foram avaliadas por Western blotting. Realizou-se a análise histológica das artérias coronárias e avaliou-se o estresse oxidativo *in situ* por quantificação de superóxido pelo método de dihidroetídio fluorescência. Nossos resultados demonstraram que a ovariectomia aumentou a pressão arterial sistólica, sendo prevenido pelo tratamento com DRSP. Ambos os tratamentos preveniram a disfunção endotelial causada pela ovariectomia. A resposta vasodilatadora no grupo DRSP foi significativamente superior para as três concentrações mais elevadas em comparação com o grupo OVX. A expressão de ER- α diminuiu em ratos OVX, efeito que foi restaurado pelas terapias hormonais. Os parâmetros morfométricos e o estresse oxidativo foram aumentados após a OVX e prevenidos em ambos os tratamentos E2 e DRSP. A DRSP não prejudicou as ações vasculares benéficas atribuídas ao estrogênio, como observado com outras progestinas utilizadas em grandes triagens clínicas. Assim a associação de DRSP na terapia hormonal com E2 mostra-se como uma opção terapêutica interessante, especialmente nos quadros de hipertensão pós-menopausal, pois parece atuar na prevenção de doenças coronárias.

ABSTRACT

Drospirenone (DRSP) is a progestin with antihypertensive properties. However, its effects on endothelium-dependent coronary vasodilation have not been evaluated. This study investigated the effects of combined therapy with E2 and DRSP on the endothelium-dependent vasodilation of the coronary bed of ovariectomized spontaneously hypertensive rats. Animals were randomly divided into Sham operated (Sham), ovariectomized (OVX), ovariectomized treated with E2 (E2) and ovariectomized treated with E2 and DRSP (DRSP) groups. Hemodynamic parameters were evaluated directly by cannulation of the femoral artery. Endothelium-dependent vasodilation in response to bradykinin in the coronary arterial bed was assessed using isolated hearts according to modified Langendorff method. Coronary protein expression of endothelial nitric oxide synthase and estrogen receptor alpha (ER- α) were assessed by Western blotting. Histological slices of coronary arteries were stained with hematoxylin and eosin, and morphometric parameters were analyzed. Oxidative stress was assessed *in situ* by dihydroethidium fluorescence. Ovariectomy enhanced systolic blood pressure, which was prevented only by the DRSP treatment. OVX causes endothelial dysfunction, an effect prevented by both treatments; however, the vasodilator response in the DRSP group was significantly higher at the three highest concentrations compared to the OVX group. ER- α expression decreased in OVX rats restored by the treatments. Morphometric parameters and oxidative stress were augmented by OVX and reduced by both the E2 and DRSP treatments. Hormonal therapy with E2 and DRSP may be an important therapeutic option in the prevention of coronary heart disease in the hypertensive post-menopausal women.

Keywords: Menopause; Hypertension; Hormone therapy; Drospirenone; Coronary reactivity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vias de relaxamento vascular induzidas pelo receptor de estrogênio.....	26
Figura 2. Efeitos da aldosterona na doença cardiovascular.....	31
Figura 3. Diagrama da sequência de trabalho para análise da reatividade vascular coronariana.	42
Figura 4. Diagrama da sequência de trabalho para colota dos órgãos.	43
Figura 5. Pressão de perfusão coronariana basal.....	47
Figura 6. Resposta vasodilatadora dependente do endotélio	48
Figura 7. Reatividade vascular ao E2.....	49
Figura 8. Expressão protéica da enzima óxido nítrico sintase endotelial (A) e do receptor de estrogênio alfa (B).	50
Figura 9. Cortes transversais das artérias coronárias em HE.	51
Figura 10. Avaliação morfométrica em artérias coronárias	52
Figura 11. Avaliação do estresse oxidativo vascular “in situ” pela fluorescência ao dihidroetídio (DHE).....	53
Figura 12. Diagrama dos principais efeitos da terapia hormonal com E2 e E2/DRSP	54

LISTA DE SIGLAS

Akt: Proteína Kinase B

AMPC: Monofosfato Cíclico de Adenosina

ANOVA: Análise de variância

AR: Receptor de Androgênos

BK_{Ca}⁺: Canais de potássio dependentes de cálcio

CAM: Complexo Cálcio-Calmodulina

CEE: Conjugado de Estrogênio Equino

CVD: Doença Cardiovascular

DAG: Diacilglicerol

DBD: Local do Receptor de Estrogênio de Interação com a Molécula de DNA

DRSP: Drospirenona

E1: Estrona

E2: 17 β -estradiol

EDHF: Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio

eNOS: Isoforma Endotelial da Enzima Oxido Nítrico Sintase

EPM: Erro Padrão da Média

ER: Receptor de Estrogênio

ERE: Elementos de Resposta ao Estrogênio

ERK: Via da Kinase Ativada por Estímulos Extracelulares

FC: Frequência Cardíaca

GPR30 ou GPER: Receptor de Estrogênio Acoplado à Proteína G

GR: Receptor de Glicocorticóides

HDL: Lipoproteína de Alta Densidade

HeE: Hematoxilina e Eosina

HERS: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study

i.p.: Intraperitoneal

IAM: Infarto Agudo do Miocárdio

IP3: 1,4,5- Trifosfato de Inositol

K^+ _{ATP}: Canais de Potássio Sensíveis a ATP

K^+ _v: Canais de Potássio Dependentes de Voltagem

Kg: Quilograma

LBD: Local do Receptor de Estrogênio com Função de Interação com o Ligante

LDL: Lipoproteína de Alta Densidade

MAPK: Proteína Kinase Ativada por Mitógeno

MHT: Terapia Hormonal Menopausal

MPA: Acetato de Medroxiprogesterona

MR: Receptor de Mineralocorticóides

NHS: Nurse's Health Study

O_2^- : Ânion Superóxido

OVX: Ovariectomia

PAD: Pressão Arterial Diastólica

PAM: Pressão Arterial Média

PAS: Pressão Arterial Sistólica

Pd: Pressão Diastólica Intraventricular

PIP₂: 4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol

PIP₃: 3,4,5-trisfosfato de fosfatidilinositol

PLC: Fosfolipase C

PR: Receptor de Progesterona

PU/PC: Razão entre Peso Uterino e Peso corporal

PU: Peso Uterino

ROS: Espécies Reativas de Oxigênio

SHR: Ratos com Hipertensão Espontânea

VSMC: Célula do músculo liso vascular

WHI: Women's Health Initiative

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Aspectos Epidemiológicos da Doença Cardiovascular Relacionada à Menopausa.....	17
1.2	Hipertensão Arterial na Menopausa	18
1.2.1	O Modelo de Hipertensão Experimental e Menopausa	19
1.3	A Controvérsia sobre a Terapia Hormonal Menopausal.....	20
1.4	Ações Vasculares do Estrogênio e seus Receptores.....	23
1.4.1	ER α e ER β : os Receptores Clássicos de Estrogênio	23
1.4.2	GPER: a Descoberta mais Recente	27
1.5	As Progestinas na Terapia Hormonal Menopausal	28
1.6	A Drospirenona	29
2	OBJETIVOS	33
2.1	Objetivo Geral:	33
2.2	Objetivos Específicos:	33
3	MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1	Animais de Experimentação.....	34
3.1.1	Grupos Experimentais.....	34
3.2	Procedimentos Experimentais.....	35
3.2.1	Castração dos Animais	35
3.2.2	Tratamento com Estradiol e Drospirenona.....	35

3.2.3	Medida Indireta da Pressão (Pletismografia)	36
3.2.4	Cateterização	36
3.2.5	Medida Direta da Pressão Arterial e Frequência Cardíaca	37
3.2.6	Coração Isolado	37
3.2.7	Quantificação da Massa Uterina	38
3.2.8	Dissecação das Artérias Coronárias	38
3.2.9	Análise Histológica	39
3.2.10	Quantificação do Superóxido	39
3.2.11	Western Blotting	40
3.3	Protocolos	42
3.3.1	Protocolo de Reatividade vascular	42
3.3.2	Protocolo de coleta de material para análises histológicas e moleculares ...	43
3.4	Expressão dos Resultados e Análise Estatística	43
4	RESULTADOS	45
4.1	Eficácia da cirurgia de ovariectomia e da terapia de reposição hormonal....	45
4.2	Medidas Hemodinâmicas e Concentrações Plasmáticas de Sódio e Potássio.....	45
4.3	Pressão de Perfusão Coronariana Basal e Estudo da Reatividade Vascular Dependente do Endotélio à Bradicinina e ao E2.	46
4.4	Expressão Protéica da Enzima Óxido Nítrico Sintase Endotelial (eNOS) e do Receptor de Estrogênio α	50
4.5	Avaliação Morfométrica	51

4.6	Estresse Oxidativo Vascular (Fluorescência ao Dihidroetídio).....	52
5	DISCUSSÃO	54
6	CONCLUSÃO	63
7	REFERÊNCIAS.....	64

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Epidemiológicos da Doença Cardiovascular Relacionada à Menopausa

A doença cardiovascular (CVD) apresenta-se como importante problema de saúde na maioria dos países industrializados, com uma prevalência, nos Estados Unidos, de 42,7 milhões de casos e mortalidade de 459.000 (AMERICAN HEART ASSOCIATION, 2008). No Brasil, em 2006, 69.493 pessoas morreram acometidas por infarto do miocárdio e desse total 40.8% eram mulheres (DATASUS).

Dentre as CVDs, destaca-se a hipertensão arterial por sua alta prevalência, em especial na população feminina, em que apresenta taxa superior a 25% (KEARNEY et al., 2005). Nos Estados Unidos, 75% das mulheres pós-menopausadas são hipertensas (ONG et al., 2007). Os dados são alarmantes, uma vez que, a elevação dos níveis pressóricos em mulheres está relacionada ao aumento do risco cardiovascular (VASAN et al., 2001).

A hipertensão arterial, bem como outras doenças cardiovasculares, são menos comuns em mulheres na pré-menopausa que em homens na mesma faixa etária. Os riscos de desenvolvimento de CVDs, durante a pós-menopausa se agravam com o avançar da idade, demonstrando o efeito protetor do estrogênio sobre o sistema cardiovascular (BARRET-CONNOR, 1991; BARRET-CONNOR, 2013; WENGER et al., 1993; EWER e GLÜCK, 2009; DUBEY et al., 2004; ORSHAL, 2004; FRANKLIN et al., 1997; ROSAMOND et al., 2007).

Compreender os mecanismos da hipertensão arterial na pós-menopausa e sua relação com a terapia hormonal menopausal (MHT) é fundamental, uma vez que as estimativas atuais prevêem que, até o ano de 2050, um bilhão de mulheres em todo o mundo estará na menopausa (MEYER et al., 2008), necessitando de intervenção preventiva ou terapêutica para limitar a doença arterial coronariana e seus riscos associados (GURNEY et al., 2014; CLARKSON et al., 2013).

1.2 Hipertensão Arterial na Menopausa

A hipertensão arterial é uma doença multifatorial que envolve aspectos etiológicos e mecanismos fisiopatológicos, dentre os quais estão: os neurais, cardíacos, hormonais, vasculares, moleculares e genéticos. Esta doença pode ou não estar acompanhada de lesões em seus órgãos-alvos, como vasos, coração, retina e rins (ASHRAF & VONGPATANASIN, 2006).

O entendimento do papel dos estrógenos endógenos na patogênese da hipertensão constitui grande desafio, já que os efeitos das alterações hormonais ocorridas após a menopausa se confundem pela presença de outros fatores de risco como o envelhecimento e enrijecimento vascular, obesidade, resistência à insulina e dislipidemias (MUECK e SEEGER, 2004; COYLEWRIGHT., et al 2008). Estudos transversais demonstraram que a menopausa eleva em duas vezes o risco de desenvolvimento da hipertensão arterial (STAESSEN et al., 1989; AMIGONI et al., 2000), sendo que, o aumento dos níveis pressóricos está relacionado tanto a fases iniciais como tardias do período menopausal (Izumi et al, 2007).

Os rins tem papel fundamental no controle da pressão arterial (PA), contudo a menopausa aumenta o risco de desenvolvimento de doença renal e glomeruloesclerose. O estrogênio apresenta efeitos protetores sobre os rins na hipertensão (PECHERE-BERTSCHI e BURNIER, 2004), pois, dentre seus diferentes mecanismos,este hormônio promove a inibição da proliferação de células mesangias (XIAO et al., 2001). Coggins e colaboradores observaram que mulheres, a partir dos 52 anos, apresentaram declínio da taxa de filtração glomerular quando comparadas às mulheres mais jovens ou aos homens da mesma faixa etária, pesquisas posteriores corroboraram esses dados (THARAUX et al., 1999; MCGUIRE et al., 2007). Em âmbito experimental observou-se que o desenvolvimento da glomérulo esclerose em ratas se inicia na fase que corresponde ao período da menopausa em humanas (ZHENG et al., 2003), e a ovariectomia por si só agrava a injuria renal levando ao desenvolvimento da

hipertensão, esses efeitos são atenuados com a terapia hormonal. (HERNANDEZ SCHULMAN e RAIJ, 2006; MARIC et al., 2004; MARIC et al, 2008).

Um outro mecanismo pelo qual o estrogênio é capaz de modular positivamente a PA envolve o estímulo para maior liberação de óxido nítrico (NO). O NO age, entre outros fatores na regulação da excreção e reabsorção de sódio. Contudo, na pós-menopausa este mecanismo fica prejudicado (KIM et al., 2014).

1.2.1 O Modelo de Hipertensão Experimental e Menopausa.

O modelo de hipertensão utilizado no presente trabalho foi desenvolvido em 1963 por Okamoto e Aoki, denominado *spontaneously hypertensive rats* (SHR). Esse modelo apresenta grande similaridade com a fisiopatogenia da hipertensão essencial ou primária em humanos, pois ambas apresentam origem poligênica e são influenciadas por fatores ambientais (TRIPPODO e FROHLICH, 1981).

O desenvolvimento da hipertensão arterial no SHRs inicia-se na 5ª semana de vida, apresentando níveis pressóricos considerados como hipertensão espontânea entre a 7ª e a 15ª semanas, atingindo um platô entre a 20ª e 28ª semanas, não havendo influência sexual nesse desenvolvimento (YAMORI, 1984).

A resistência periférica total eleva-se e o débito cardíaco pode estar normal ou reduzido no SHR adulto (POTTS et al., 1998). Com o desenvolvimento da hipertensão arterial, ocorre progressiva hipertrofia cardíaca (THOMAS et al., 1997), mantendo inicialmente o débito cardíaco normal, até que em estágios finais a função cardíaca é comprometida pelo desenvolvimento de insuficiência cardíaca congestiva (FROHLICH, 1977). A frequência cardíaca é mais elevada que nos ratos normotensos já na 3ª semana de vida, resultado de um aumento na frequência intrínseca do marcapasso cardíaco (DICKOUT e LEE, 1998). Os SHRs mostram aumento da resistência periférica total (JUDY et al., 1976), sendo as pequenas artérias, arteríolas e, possivelmente os esfíncteres pré-capilares os principais responsáveis pelo aumento da resistência vascular periférica

(TRIPPODO e FROHLICH, 1981), ocorrendo alterações morfológicas dos vasos (FOLKOW et al, 1975), alterações da membrana celular da musculatura lisa vascular (OVERBECK, 1972) e redução da densidade arteriolar da musculatura esquelética (HUTCHINS e DARNELL, 1974). As alterações das propriedades funcionais nos SHR's precedem o desenvolvimento da hipertensão arterial, sendo que a redução da distensibilidade e complacência vascular nos animais jovens resulta de uma hipertrofia da camada média (VAN GORP et al, 2000). Observa-se também que os SHR's apresentam hiperatividade simpática (TRIPPODO e FROHLICH, 1981, LUNDIN et al, 1984).

Não há um modelo animal completamente apropriado para se estudar a hipertensão pós-menopausa e assim elucidar seus mecanismos. Estudos tem sido realizados em carneiros, coelhos, primatas não-humanos, ratos e camundongos como modelos de várias mudanças na menopausa (THORNDIKE e TURNER, 1998) no entanto, não há nenhum modelo animal em que a hipertensão se desenvolva naturalmente na pós-menopausa, em função disso utiliza-se a ovariectomia como forma de mimetizar a menopausa em animais (Fang et al., 2001; Peng et al., 2003).

Ratas SHR's cessam os ciclos apenas entre 10 e 12 meses de idade e têm baixos níveis de estradiol comparadas às mulheres na pós-menopausa (FORTEPIANI et al., 2003), mas nessa idade se torna muito difícil trabalhar com esse modelo, dadas as demais complicações advindas do longo tempo de hipertensão. Em SHR's mais jovens (entre 4 e 8 meses de idade), as fêmeas têm pressão arterial mais baixa do que os machos (THORNDIKE e TURNER, 1998; FORTEPIANI et al., 2003; Reckelhoff et al., 1998). No entanto, com a idade de 16 a 18 meses, a pressão sanguínea aumenta cerca de 25 a 35 mm Hg não havendo mais diferenças sexuais na PA (Giummelly et al., 1999).

1.3 A Controvérsia sobre a Terapia Hormonal Menopausal

O estrogênio é largamente utilizado como contraceptivo e como MHT sendo comum sua associação às progestinas. (STEFANICK, 2005).

Os primeiros estudos observacionais, como o Nurse's Health Study (NHS) realizado durante a década de 70, sugeriam um claro benefício das MHTs, demonstrando redução entre 30 e 50% no risco de CVD com o uso da terapia hormonal com estrogênio (DUBEY et al., 2004). Uma meta-análise de estudos observacionais da época demonstrou redução de aproximadamente 33% no risco de desfechos fatais por CVD entre usuárias de terapia hormonal (STEFANICK, 2005). Outro estudo que acompanhou 337 pacientes submetidas ao procedimento de angioplastia coronariana, mostrou que a taxa de desfechos cardiovasculares foi menor entre mulheres em uso de MTH em relação as que não usavam (12% vs. 35%), além de maior sobrevida (O'KEEFE et al., 1997).

Estudos experimentais também corroboraram a ideia de que o estrogênio oferece benefícios vasculares, entre outros mecanismos, por meio da redução da resistência vascular coronariana e aumento do fluxo coronário. (ECKSTEIN et al., 1994; ROSANO et al., 1999; MOYSÉS et al., 2001; SANTOS et al., 2004). A reposição com estrogênio em modelos de pós-menopausa mostrou-se eficaz em reduzir a pressão arterial de animais normotensos e hipertensos (SILVA-ANTONIALLI et al., 2004; XU et al., 2008; HERNANDEZ et al., 2000; BORGIO et al., 2011), além de reduzir o estresse oxidativo, prevenir disfunção endotelial, melhorar a reatividade vascular dependente de endotélio e prevenir o remodelamento vascular em estágios iniciais da hipertensão (CLAUDIO et al., 2013; GARCIA et al., 2005; HERNANDEZ et al., 2000).

No entanto, outras triagens clínicas randomizadas como o Women's Health Initiative (WHI) e o Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS I e II), que analisaram a prevenção primária e secundária, respectivamente, não demonstraram tais benefícios sobre o sistema cardiovascular além de reportarem o aumento do risco de morte por doença cerebrovascular em pacientes com MHT (GRADY et al., 2002; ROSSOUW et al., 2002; WOMEN'S HEALTH INITIATIVE, 2002).

Para compreender tamanha discordância é importante lembrar que a origem e os níveis plasmáticos dos estrógenos endógenos sofrem alterações com a avançar da idade e que o principal estrógeno circulante durante a pré-menopausa é o 17 β -estradiol (E2) ovariano. Sua concentração sérica oscila drasticamente durante o

ciclo menstrual, sendo de 250 a 500 pg/mL na fase pré-ovulatória e de 40-50 pg/mL na fase pré-menstrual. Na pós-menopausa a estrona (E1) passa a ser o principal estrógeno circulante, sendo que a concentração sérica do E2 é frequentemente inferior a 20 pg/mL e sua formação se dá principalmente por meio da conversão da testosterona em tecidos periféricos (GRUBER, 2002).

Dessa forma as discrepâncias nos resultados dos estudos clínicos podem em parte ser explicadas pelo tipo de terapia escolhida. A primeira linha de terapia hormonal utilizou conjugado de estrogênio equino (CEE) que levou a denominação comercial de Premarin®. Essa droga, por sua vez apresenta uma composição de variados hormônios, quais sejam: E1, equilina, 17 α -dihidroequilina, 17 α -estradiol, equilenina, 17 α -dihidroequilenina, E2, delta-8,9-dihidroesterona, 17 β -dihidroequilina e 17 β -dihidroequilenina. Sendo assim, o CEE e o E2 apresentam distintas propriedades farmacológicas, como produtos metabólicos, afinidades e seletividade aos receptores de estrogênio (ERs) e propriedades agonistas diferentes (DUBEY et al., 2004).

Seguindo essa mesma linha de pensamento, um estudo demonstrou que o tratamento com E2 em pacientes com falência ovariana prematura reduziu significativamente a pressão arterial, enquanto não foram observados efeitos com o uso do etinilestradiol sintético (LANGRISH et al., 2009). Entretanto, estrógenos sintéticos, como o benzoato de estradiol parecem prover benefícios cardiovasculares similares aos do E2 (SMITH et al., 2004).

A falta dos benefícios vasculares da MTH nessas triagens, podem ainda ser explicadas por fatores como, dose do hormônio escolhido, via de administração, alterações dos ERs relacionadas à idade e ainda o momento em que a terapia é iniciada e a interação com outros hormônios sexuais. (KHALIL, 2013; CLARKSON et al., 2013).

Embora persista esse cenário de contradições, as MTHs são utilizadas rotineiramente na prática clínica havendo associação entre diversos estrógenos e progestinas (NORTH AMERICAN MENOPAUSE SOCIETY, 2010; SCHMIDT, 2012).

1.4 Ações Vasculares do Estrogênio e seus Receptores

Os efeitos do estrogênio sobre a função cardíaca tem sido amplamente investigados. O estrogênio provê proteção cardiovascular por diversos mecanismos, dentre os quais: alterações no metabolismo lipoproteico, inibição da agregação plaquetária, inibição da proliferação de células do músculo liso vascular (CMLV) e ação antioxidante (FALUDI e ALDRIGH, 2000). O estrogênio parece reduzir a expressão e permeabilidade de canais de Ca^{2+} no músculo liso vascular (SMILEY e KHALIL, 2009).

Atualmente estão descritos duas classes de receptores de estrogênio: a primeira é constituída pelos fatores de transcrição ativados por ligante denominados receptores de estrogênio, caracterizados como $ER\alpha$ e $ER\beta$; a segunda é caracterizada por um receptor de membrana acoplado à proteína G (GPR30 ou GPER); (TORAN-ALLERAND, 2004).

1.4.1 $ER\alpha$ e $ER\beta$: os Receptores Clássicos de Estrogênio

O $ER\alpha$ foi descrito no final da década de cinquenta e somente em 1996 foi descrito um segundo receptor, chamado então de $ER\beta$ (KUIPER et al., 1996). Ambas as formas estão presentes na vasculatura, tanto em células endoteliais como nas CMLV (MENDELSON E KARAS, 1999).

Os $ER\alpha$ e $ER\beta$ são membros da super família de receptores hormonais nucleares e são codificados por genes distintos com diferentes localizações cromossômicas (DAHLMAN-WRIGHT et al., 2006). Esses receptores funcionam como fatores de transcrição ativados por ligantes e produzem efeitos denominados efeitos genômicos, mas podem também ativar mecanismos adicionais.

Além do próprio estrogênio, outros hormônios e fatores de crescimento também podem regular esses receptores. Em células endoteliais alguns fatores de

crescimento podem ativar ER α , na ausência do ligante, o que ocorre provavelmente via ativação de proteína kinase ativada por mitógeno. (KARAS et al., 1998).

As primeiras idéias de efeitos não reprodutivos desses receptores foram sugeridas a partir do estudo em um homem com uma mutação no gene para ER α (SUBHIR et al., 1997a). Os sintomas eram similares ao de indivíduos com deficiência na aromatase, entre outros sintomas apresentavam aterosclerose coronariana, disfunção endotelial e prejuízo no teste de vasodilatação braquial (SUBHIR et al., 1997b). Esses achados embasaram a hipótese de que o estrogênio exerceria efeitos sobre a função arterial via ER.

As implicações fisiológicas e fisiopatológicas relacionadas às mudanças na relação entre a expressão de ER α e ER β ainda não foram totalmente esclarecidas. Um vasto número de sítios polimórficos de ambos os *loci* gênicos de ER α e ER β foram identificados em humanos (ROSENKRANZ et al.,1998; GENNARI et al.,2005; DAHLMAN-WRIGHT et al.,2006).

Estruturalmente os ERs nucleares são compostos por 6 domínios (A a F): o domínio A/B tem a função de ativação de transcrição independente de hormônios. O domínio C é o domínio de ligação ao DNA. O domínio E/F é o domínio receptor do ligante (LBD) onde se ligam os hormônios. Este domínio também apresenta a função de ativação de transcrição dependente de hormônios (KUIPER et al., 1996).

Dessa forma, os receptores de estrogênio, membros da superfamília dos receptores nucleares, utilizam o domínio conservado de ligação ao DNA para interagir com elementos específicos de resposta hormonal no genoma, influenciando a transcrição de genes. Tais efeitos foram referidos como genômicos e originalmente descritos para receptores nucleares.

Em contraste com as ações mediadas por mecanismos genômicos, o estrogênio também pode produzir efeitos dentro de um intervalo de tempo demasiadamente curto (segundos ou minutos) para ser mediada pelo mecanismo “clássico” que envolve ativação transcricional de genes. Esses efeitos são conhecidos como efeitos não-genômicos ou simplesmente efeitos rápidos (REVELLI et al., 1998;

HAMMES e LEVIN, 2007). Possivelmente as ações do estrogênio por via não genômica se dêem através da atuação direta sobre de receptores de esteróides presentes na membrana.

A diversidade de ações atribuídas aos ER α e β pode ser explicada por sua capacidade de adotar múltiplas conformações dependendo da natureza do ligante, ou seja, cada ligante pode induzir a uma conformação diferente do receptor e, como consequência, conjuntos distintos de co-ativadores e co-receptores podem ser recrutados para o complexo transcricional-receptor, resultando em efeitos distintos (HELDRING et al., 2007).

Em diversos tipos de células, ERs estão associados à cavéolas e grandes complexos de proteína. Nas cavéolas, há grande número de outras moléculas de sinalização que promovem maior eficiência na sinalização. Através destas associações, o estrogênio desencadeia uma série de vias de sinalização intracelular, incluindo a via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), a via do fosfatidilinositol (IP₃K/Akt), além da ativação de fluxos de canais de iônicos e estimulação dos receptores por fator de crescimento que levam a vasodilatação (MORIARTY et al., 2006), as vias pelas quais o estrogênio pode causar vasodilatação estão resumidas na figura 1.

Uma das ações rápidas de estrogênio consiste na capacidade de estimular a enzima óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS) em células endoteliais vasculares (HISAMOTO e BENDER, 2005; MORIARTY et al., 2006). Este mecanismo leva aos conhecidos efeitos rápidos do estrogênio na resposta de vasodilatação endotélio-dependente mediada pelo NO, um efeito já demonstrado *in vitro* e *in vivo* (WILLIAMS et al., 1992; STIRONE et al., 2005a; LI et al., 2007).

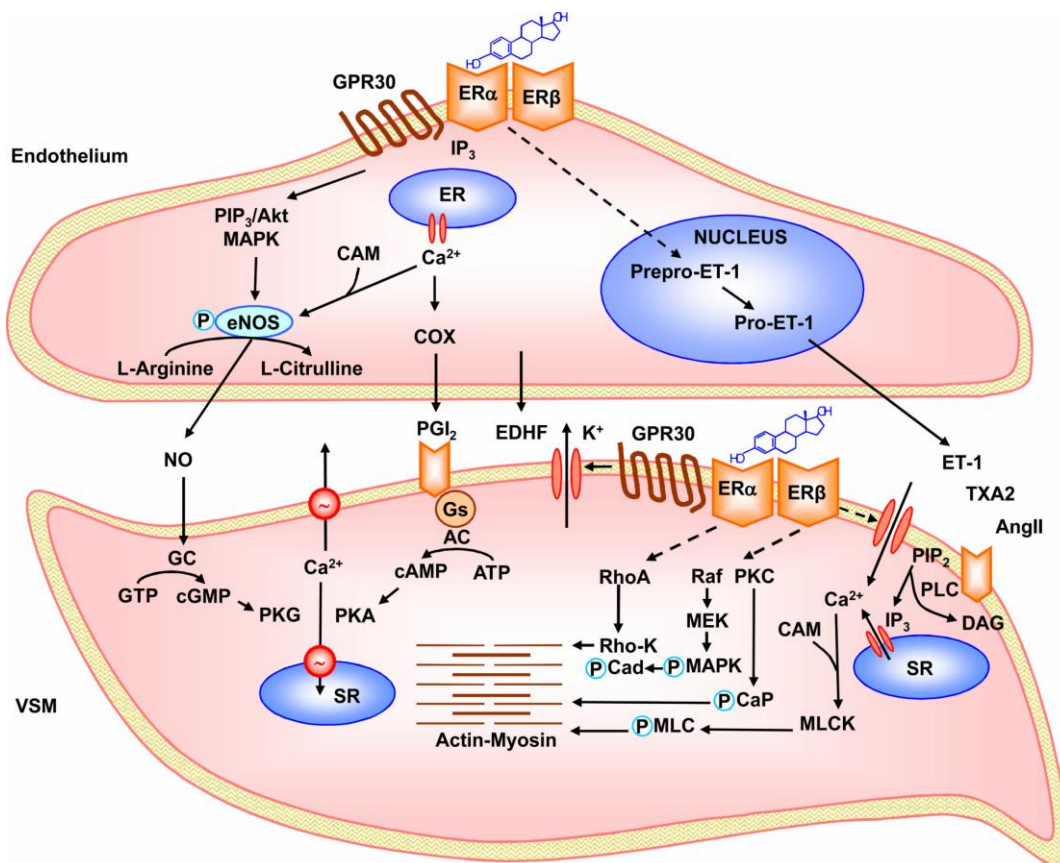


Figura 1. Vias de relaxamento vascular induzidas pelo receptor de estrogênio (ER). O 17β-estradiol (E2) liga-se aos receptores ERα, ERβ ou GPR30 e ativam a fosfolipase C (PLC), levando a geração de 1,4,5- trifosfato de inositol (IP₃) and diacilglicerol (DAG). O IP₃ causa a liberação do Ca²⁺ do retículo endoplasmico (ER). O Ca²⁺ forma o complexo cálcio-calmodulina (CAM), que inicia a ativação da eNOS. O E2 também ativa o fosfatidilinositol 3-quinase (PI₃K), que transforma o 4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol (PIP₂) em 3,4,5-trisfosfato de fosfatidilinositol (PIP₃), e ativa a Akt. A ativação da Akt ou MAPK mediadas pelos ERs fosforila e ativa a eNOS. A eNOS ativada transforma L-arginina em L-citrulina e produz NO, que se difunde das células endoteliais e ativa a guanilato ciclase (GC) no músculo liso vascular (VSM) levando ao aumento de cGMP e estimulando a proteína quinase dependente de cGMP (PKG). PKG reduz o Ca²⁺ intracelular pela estimulação de bombas extrusão de Ca²⁺ na membrana plasmática e bombas captação de Ca²⁺ retículo sarcoplasmático (SR) e reduz a sensibilidade dos miofilamentos contráteis ao [Ca²⁺]_i e assim promovendo relaxamento no VSM. O E2 também ativa a COX e produz prostaciclina (PGI₂) que ativa a via dependente de cAMP, a proteína quinase A (PKA), promovendo relaxamento por uma via similar ao cGMP/PKG. O E2 induz também a liberação de EDHF que ativa canais de K⁺, hiperpolarizando e relaxando o VSM. O E2 reduz a produção de endotelina (ET-1). No VSM, agonistas como ET-1, TXA2 e AngII ativam receptores específicos, estimulando a PLC e aumentando a produção de IP₃ e DAG. O IP₃ estimula a liberação de Ca²⁺ do SR. Esses agonistas estimulam também a entrada de Ca²⁺, que forma CAM, ativando a enzima Kinase de cadeia leve da miosina (MLCK), fosforilando da MLC e iniciando a contração do VSM. O DAG ativa a PKC, que por sua vez fosforila a calponina (CaP) e/ou ativa a cascata de proteína quinase envolvendo a Raf, MAPK kinase (MEK) and MAPK, fosforilando a caldesmonina (CaD) e aumentando a sensibilidade dos miofilamentos ao Ca²⁺. O E2 se liga aos ERs do VSM, levando a inibição desses mecanismos do contração do VSM ativados por agonistas. O E2 ativa ainda canais K⁺, levando a hiperpolarização da membrana e inibindo a entrada de Ca²⁺ através de canais de Ca²⁺. Além disso o E2 pode também inibir a PKC, MAPK ou a RhoA/Rho-quinase (Rho-K). As linhas tracejadas indicam inibição. (Khalil AR., 2013).

A aplicação aguda de estrogênio no músculo liso vascular isolado leva, na maioria dos casos, ao relaxamento de anéis vasculares e inibição da proliferação em culturas de células musculares lisas. No músculo liso arterial, esses efeitos são resultado do aumento do efluxo de cálcio, envolvendo ativação de guanilato ciclase e inibição de canais de K^+ sensíveis a ATP (K_{ATP}) e canais de potássio ativados por Ca^{2+} (K_{Ca}) (Figura 1) (KLEPPISCH e NELSON., 1995; QUAYLE et al., 1995; WHITE et al., 1995; PRAKASH et al., 1999).

Além disso, Muehlfelder e colaboradores em 2012, relataram que a ativação de ambos os receptores clássicos de estrogênio ($ER\alpha$ e $ER\beta$) são capazes de prevenir o estresse oxidativo induzido pela ativação excessiva dos receptores de mineralocorticóides (MR) pela aldosterona.

Estes estudos demonstram claramente os efeitos celulares imediatos do estrogênio tanto em células endoteliais quanto células musculares lisas, os quais alteram o meio interno da célula, resultando na capacidade de resposta alterada aos estímulos subsequentes (MILLER et al., 2002; HAAS et al., 2007) e levando a dilatação de vários leitos vasculares incluindo o leito vascular coronariano (JIANG et al., 1991; WHITE et al., 1995).

1.4.2 GPER: a Descoberta mais Recente

Os receptores GPER, por sua vez, foram inicialmente identificados com ampla distribuição no cérebro, localizados principalmente na membrana do retículo endoplasmático (OWMAN et al., 1996). O GPER medeia ações do estrogênio por meio da ativação de diversas cascatas de transdução, como a via da kinase ativada por estímulos extracelulares (ERK), o PI3K/Akt, mobilização de Ca^{2+} e aumento da produção e ativação da adenilatociclase (AMPc) (HASBI et al., 2005; REVANKAR et al., 2005; FILARDO et al 2000; THOMAS et al, 2005).

Estudos mais recentes demonstraram a presença do GPER no sistema cardiovascular e seu papel fisiológico, na regulação vascular e miocárdica, vem

ganhado cada vez mais importância (MEYER et al., 2011; AREFIN et al 2014). Assim o uso de agonistas seletivos para esse receptor pode ser uma promessa para o futuro da terapia hormonal menopausal estrogênica (MEYER, 2014).

Entretanto, enquanto esses estudos ainda estão em escala experimental o que se observa na clínica é a utilização de terapias combinadas de estrógenos associados as progestinas (NORTH AMERICAN MENOPAUSE SOCIETY, 2010; SCHMIDT, 2012).

1.5 As Progestinas na Terapia Hormonal Menopausal

Progestina é o termo utilizado para determinar compostos sintéticos com ações pró-gestacionais (STANCZYK e HENZL, 2001). As progestinas são utilizadas na MTH para prevenir a hiperplasia endometrial causada pela terapia estrogênica, sendo o acetato de medroxiprogesterona (MPA) o mais utilizado e pesquisado (ANDERSON et al, 2004).

As progestinas podem ser classificadas como estruturalmente relacionadas à progesterona e estruturalmente relacionadas à testosterona.

Relacionadas à progesterona temos duas subclassificações: 1 - os derivados da pregnenolona, como o MPA e o acetato de megestrol e 2 - os não derivados da pregnenolona como o acetato de nomegestrol, demegestona, nesterona, promegestona e a trimegestona (STANCZYK et al, 2013).

Os estruturalmente relacionados à testosterona também recebem subclassificações: 1 - etinilados como os estranos (noretindrona, acetato de noretindrona, noretinodrel, linestrenol, diacetato de etinodiol) e os 13-etilgonanos: norgestrel, levonorgestrel, desogestrel, gestodeno, norgestimato e 2 - não etinilados que são o dienogest e a drospirenona. (STANCZYK et al, 2013; EDGREN e STANCZYK, 1999; KUHL, 2005)

A progesterona age via receptor de progesterona (PR), que também é um fator de transcrição ativado por ligante, membro da família de receptores nucleares de esteróides (LU et al., 2006). As progestinas se ligam os PR com alta afinidade e mimetizam suas ações, entretanto muitas progestinas se ligam a outros membros da família de receptores esteróides como os receptores de andrógenos (AR), receptores de glicocorticóides (GR) e receptores de mineralocorticóides (MR) apresentando efeitos colaterais via esses receptores (AFRICANDER et al 2011; MOORE et al., 2012).

As ações das progestinas via receptores esteróides é complexa, uma vez que há mais de uma isoforma para cada receptor. Existem duas isoformas de PR, denominadas PR-A e PR-B (KASTNER et al, 1990), presentes no trato reprodutivo feminino, glândula mamária, cérebro, glândula hipófise e algumas células com função imune (MANGAL et al, 1997; SOYAL et al, 2005).

O conhecimento a cerca dos efeitos das progestinas sobre o sistema cardiovascular está um pouco restrito as ações da MPA o que tem gerado críticas (HERMSMEYER et al, 2008). Estudos com primatas demonstraram efeitos adversos da MPA sobre a reatividade coronariana que é oposto ao efeito protetor observado pela progesterona (MISHRA et al., 2005). A MPA impediu os efeitos benéficos do estrogênio sobre o reatividade coronariana, efeito não observado com a progesterona (MIYAGAWA et al., 1997; MINSHALL et al., 1998). A progesterona reduziu a hiperreatividade coronária em primatas ovariectomizadas (HERMSMEYER et al., 2004).

Wassmann e colaboradores (2005) demonstraram que a progesterona antagonizou os efeitos do estrogênio sobre a expressão e atividade de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD) e aumentou a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células do músculo liso vascular.

1.6 A Drospirenona

A drospirenona (DRSP) é um esteróide derivado da 17 α -espirolactona e é uma das poucas progestinas com potente ação antimineralocorticoide, ligando-se com alta afinidade ao MR, antagonizando as ações da aldosterona (FUHRMANN et al., 1996; KRATTENMACHER, 2000). A associação de DRSP e E2 é atualmente uma das opções terapêuticas para mulheres pós-menopausadas (NORTH AMERICAN MENOPAUSE SOCIETY, 2010; SCHMIDT, 2012) e parece atuar positivamente sobre a função endotelial em mulheres saudáveis na menopausa (VILLA et al., 2010).

Especula-se que efeitos vasculares da E2/DRSP, podem relacionar-se diretamente com a sua ação antialdosterona, ou ainda pode ser um efeito indireto sobre o relaxamento vascular (WHITE et al., 2006). A E2/DRSP utilizada por 6 semanas mostrou aumento significativo na perfusão miocárdica em pacientes pós-menopausadas com angina pectoris (KNUUTI et al., 2007).

Por essa propriedade antialdosterona a drospirenona pode mimetizar os efeitos endógenos da progesterona sobre o sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) (OELKERS et al., 1978). O angiotensinogênio tem sua síntese estimulada pelo estrogênio (OELKERS, 2004), levando ao aumento da produção de aldosterona e conseqüentemente promovendo a retenção de sódio e água, que pode resultar em elevação da pressão arterial. Durante a fase lútea ciclo menstrual normal a aldosterona está impedida de interagir com os receptores de mineralocorticóides renais pela progesterona secretada nessa fase, prevenindo a retenção de sódio (SCHINDLER et al., 2003).

Em mulheres tratadas com progesterona, no entanto, não houve redução de PA de normotensas, apenas uma discreta redução na PA de hipertensas (RYLANCE et al., 1985), parece que o efeito antagônico ao MR da progesterona parece ser importante apenas quando a progesterona endógena está em altas concentrações como na fase lútea do ciclo ou na gestação, uma vez que a meia vida desse hormônio é curta e seus metabólitos não tem afinidade pelos MRs (QUINKLER et al., 2002).

É importante ressaltar que esse efeito antialdosterona da drospirenona pode interferir em vários sistemas, haja vista as ações da aldosterona em outros órgãos

ou sistemas além dos rins (figura 2). Conhecidamente a aldosterona apresenta efeitos, via MR, sobre os vasos e miocárdio desencadeando uma gama de processos fisiopatológicos associados à doença cardiovascular (GENAZZANI, 2007). Esses efeitos incluem fibrose vascular e miocárdica (Brilla *et al.*, 1990), dano vascular direto (ROCHA *et al.*, 1998), disfunção endotelial (FARQUHARSON e STRUTHERS, 2002), redução da complacência arterial (DUPREZ *et al.*, 1998) ativação simpática (BARR *et al.*, 1995) e redução da sensibilidade barorreflexa (YEE e STRUTHERS, 1998).

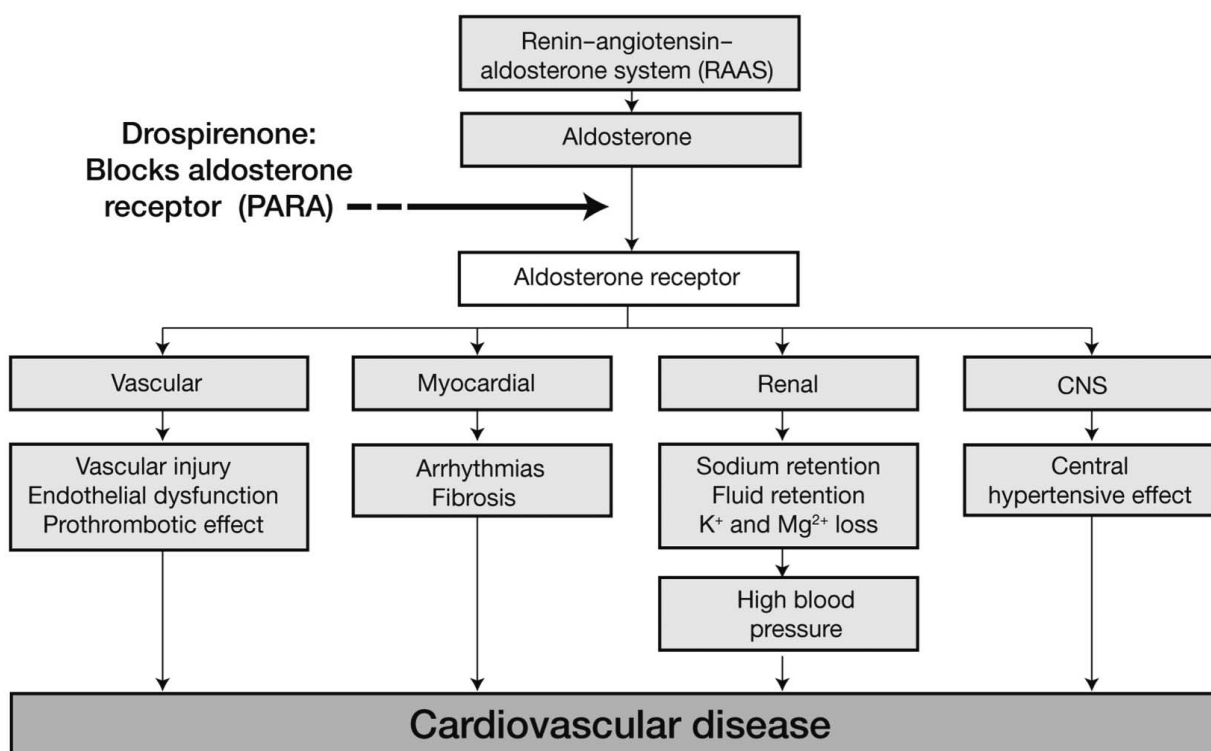


Figura 2: Efeitos da aldosterona na doença cardiovascular. PARA, progestógenos antagonistas do receptor de aldosterona. Adaptado de Genazzani AR, *et al.* Drosiprenone and its antialdosterone properties. *Climacteric* 2007.

Os benefícios vasculares dos estrógenos estão bem descritos, entretanto os efeitos da terapia combinada de E2 com drospirenona sobre a reatividade vascular coronariana dependente de endotélio não haviam sido investigados, especialmente na condição da hipertensão. Em razão das características possivelmente anti-hipertensivas da drospirenona e sabendo que outros análogos sintéticos da progesterona já demonstraram interferir negativamente nos efeitos vasculares do

estrogênio, acreditamos ser de suma importância o conhecimento dos efeitos dessa terapia sobre a vasodilatação mediada pelo endotélio no leito coronariano, além dos parâmetros hemodinâmicos e remodelamento vascular, uma vez que essa droga é atualmente uma terapia hormonal de escolha para mulheres hipertensas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

O presente estudo buscou conhecer os efeitos da associação do estrogênio com a drospirenona sobre a vasodilatação mediada pelo endotélio no leito coronário de ratas espontaneamente hipertensas ovariectomizadas.

2.2 Objetivos Específicos:

Analisar em modelo de hipertensão e menopausa os efeitos da terapia combinada de estrogênio e drospirenona sobre:

- I. os parâmetros hemodinâmicos;
- II. a reatividade vascular coronariana dependente de endotélio;
- III. o remodelamento vascular;
- IV. a expressão dos receptores de estrogênio α ;
- V. o estresse oxidativo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais de Experimentação

Foram utilizadas ratas com hipertensão espontânea (SHR), com 12 semanas e peso corporal variando entre 160 e 200g gramas, fornecidas pelo Biotério de pesquisa do Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo.

Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada (20-24°C) e iluminação artificial. O manuseio dos animais esteve de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFES), sob o protocolo 023/2012.

Os animais ficaram em gaiolas simples com livre acesso a água e a ração *ad libidum*.

3.1.1 Grupos Experimentais

As ratas foram divididas em 4 grupos (n=10):

1. Controle (Sham)
2. Ovariectomizado (OVX)
3. Tratado com estradiol (E2)
4. Tratado com estradiol e drospirenona (E2/DRSP)

3.2 Procedimentos Experimentais

3.2.1 Castração dos Animais

Após anestesia com quetamina (5 mg/ kg) e xilazina (10 mg/kg), as fêmeas foram submetidas a uma incisão de 1 a 1,5 cm, na pele, entre o último rebordo costal e a coxa, a um centímetro da linha mediana seguida de uma incisão na camada muscular, abrindo a cavidade peritoneal para posterior remoção dos ovários (ooforectomia) e ligadura da tuba uterina. Após a retirada dos ovários foi realizada sutura da musculatura e pele. O mesmo procedimento foi realizado do lado oposto. Ao final do procedimento, os animais receberam 0,1 ml do antibiótico Enrofloxacina 2,55mg, por via intramuscular. Após 7 (sete) dias de recuperação pós-operatória, os animais foram colocados em gaiolas simples e iniciado o tratamento.

3.2.2 Tratamento com Estradiol e Drospirenona

Aos grupos que receberam a terapia com estradiol, administravam-se injeções subcutâneas com volume de 0,1 mL contendo 0,05 mg/ kg por dia de 17 β -estradiol (Sigma, St Louis, MO) diluído em óleo de milho, 3 vezes por semana, como descrito previamente por Saengsirisuwan e colaboradores.

Aos grupos tratados com estradiol, administravam-se 17 β -estradiol 0,03 mg/kg por dia e drospirenona 0,06 mg/kg por dia (Angeliq[®]) por via oral (método de gavagem) diariamente durante 6 semanas, para isso a droga era dissolvida em água destilada e utilizada imediatamente. Tais concentrações foram escolhidas no sentido de mimetizar as doses utilizadas na conduta clínica como terapia hormonal menopausal. Os animais eram pesados a cada 7 dias para ajuste da dose da droga.

3.2.3 Medida Indireta da Pressão (Pletismografia)

Os níveis de pressão sistólica eram avaliados por pletismografia de cauda antes de se proceder a ovariectomia. Após calibração do aparelho e obtenção de uma adequada vasodilatação caudal, a medida indireta era aferida por meio de um transdutor foto elétrico posicionado na porção proximal da cauda, o manguito era então inflado e posteriormente aberto para ocorrer a despressurização e o registro da onda de pulso.

3.2.4 Cateterização

Após anestesia com quetamina (5 mg/ kg) e xilazina (10 mg/kg), a artéria femoral foi isolada através de uma incisão na região inguinal e nela introduzida a extremidade de menor calibre da cânula (PE10). A extremidade livre da cânula PE50 foi preenchida de solução salina (NaCl 0.9%) e ocluída com um pino inoxidável. A cânula então foi heparinizada com solução salina a 2% como medida profilática para a formação de coágulos, o que poderia amortecer o sinal para aferição da pressão arterial (PA) modificando assim o resultado final. Foi realizada exteriorização da cânula, por meio de um trocater, até à região médio cervical posterior do animal. Após ser exteriorizada, a cânula foi fixada por um fio de sutura, a fim de evitar que o animal pudesse arrancá-la ou mordê-la. Tal procedimento permitiu que esse estudo fosse realizado com o animal acordado e com o mínimo de manuseio e perturbação possível. A cânula arterial foi utilizada para verificação direta da PA. Os cateteres foram confeccionados pela conexão de duas cânulas de polietileno PE10 e PE50, medindo 3 e 15 cm de comprimento respectivamente, montadas sobre um mandril de aço inoxidável e soldadas por aquecimento.

3.2.5 Medida Direta da Pressão Arterial e Frequência Cardíaca

Após a cateterização (12 horas) com o animal acordado e com um mínimo de perturbação e manuseio do mesmo, o cateter de polietileno (cânula) foi conectado a um transdutor de pressão (Spectramed P23XL) e os dados de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), foram digitalizadas (Acqknowledge P23XL for Windows; Biopac Ind.) e armazenados em disco rígido do computador para análises futuras.

3.2.6 Coração Isolado

Os animais foram heparinizados 200 UI, por via intraperitoneal (ip) e anestesiados com pentobarbital e posteriormente sacrificados. Foi realizada uma incisão cirúrgica no tórax, expondo os órgãos, o coração foi dissecado de suas conexões e imediatamente transferido ao aparelho de perfusão através da canulação da artéria aorta, ao nível da sua curvatura. A seguir iniciou-se a perfusão retrógrada pelo método de *Langendorff* modificado, utilizando-se para a perfusão, a solução de nutrientes modificada, composta de NaCl, 120 mM; CaCl₂.H₂O, 1,25 mM; KCL, 5,4 mM; MgSO₄.7H₂O, 2,5 mM; NaH₂PO₄.H₂O, 2,0 mM; NaHCO₃, 27,0 mM; Na₂SO₄, 1,2 mM; EDTA, 0,03 mM e glicose 11,0 mM, mantida a 37°C por um banho-maria, e continuamente aerada com mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂) na câmara de saturação de O₂, mantendo o pH estável em 7.4.

O fluxo era mantido constante em 10 ml por minuto por meio de uma bomba de rolete (Hugo Sanchs, Germany). A pressão isovolumétrica do ventrículo esquerdo (PVE) foi mantida através de um balão de látex, preenchido com água, que ainda vazio era introduzido via átrio esquerdo, através da válvula mitral, no ventrículo esquerdo e conectado a um transdutor de pressão (Statham Transducer P23Db). O volume do balão era ajustado por seringa (2 ml), de forma a se controlar a pressão diastólica intraventricular (Pd) em torno de 10 mm Hg. A frequência dos batimentos

foi avaliada através da medida do pulso de PVE por meio de um cardiômetro. A pressão de perfusão coronariana (PPC) foi avaliada por meio de um transdutor de pressão (Statham Transducer P23Db), conectado imediatamente próximo à cânula de perfusão aórtica, por meio da qual foi perfundido o leito coronariano. Uma vez que o fluxo de perfusão se mantém constante, as alterações de perfusão são relacionadas às mudanças na resistência vascular.

Foram necessários 40 min de estabilização funcional para se iniciar as medidas, através das quais se pode verificar a reatividade desses vasos em resposta ao agente vasodilatador bradicinina nas concentrações de 0,1, 1, 10, 30, 100, 300 e 1000 ng/0,1 mL e E2 na concentração única de 10 µg/0,1 mL.

3.2.7 Quantificação da Massa Uterina

Após o sacrifício dos animais o útero foi dissecado, limpo e lavado em solução fisiológica. O excesso de líquido foi removido com papel de filtro e em seguida realizada a pesagem. O índice de massa do útero foi estimado e corrigido em mg de tecido úmido/100g de peso corporal.

3.2.8 Dissecção das Artérias Coronárias

As ratas foram sacrificadas por decapitação. O tórax foi aberto e o coração retirado e mantido em solução de Krebs Henseleit (em mmol/L: 115 NaCl, 25 NaHCO₃, 4,7 KCl, 1,2 MgSO₄.7H₂O, 2,5 CaCl₂, 1,2 KH₂PO₄, 5,5 glicose e 0,01 Na₂EDTA) a pH 7,4 durante o procedimento de dissecção. O ramo descendente anterior da artéria coronária esquerda e o ramo septal foram isolados com o auxílio de um microscópio de dissecção (D.F. Vasconcelos M900, São Paulo, Brasil) e congelados rapidamente em nitrogênio líquido e, posteriormente, estocados a -80 °C até a análise.

3.2.9 Análise Histológica

Após a dissecação, as artérias coronárias foram fixadas em formalina-PBS, pH 7,4, durante 24 h à temperatura ambiente. As amostras de artérias coronárias foram congeladas em OCT e foram cortadas em secções de 8 mm de espessura e montadas em lâminas de vidro revestidas de gelatina. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (HE).

O sistema de análise de imagem para histomorfometria foi composto de uma câmara digital (Axio-Came ERC 5S), acoplada a um microscópio de luz (Olympus AX70; Olympus, Center Valley, PA). As imagens de alta resolução (2048 × 1536 pixels tampão) foram capturadas com Carl Zeiss AxioVision Rel. 4.8. As fotomicrografias foram obtidas utilizando uma objetiva de 20x, e a área total vascular, a área do lúmen, a área da parede e a razão área de parede / lúmen foram calculados com a ferramenta de medida de área de AxioVision Rel. 4.8. Os resultados representam a área de parede coronária e são expressos como a média ± SEM.

3.2.10 Quantificação do Superóxido

Amostras de artérias coronárias congelados e não fixados (n = 4 por grupo) foram cortadas secções transversais de 8 mm de espessura em criostato e montados em lâminas de vidro revestidas de gelatina. As amostras foram incubadas com o corante dihidroetídio fluorescente (DHE) na concentração de 2 mmol/L em solução de Krebs modificada de um (contendo HEPES 20 mM), em uma câmara umidificada, protegida da luz, a temperatura de 37°C durante 30 minutos, para detecção de superóxidos. A intensidade de fluorescência foi detectada a 585 nm e quantificada em nas secções de tecido utilizando um microscópio confocal (Leica DM 2,500 TI, Nikon Instruments Inc., Melville, NY, EUA) por um investigador que não conhecia o protocolo experimental.

3.2.11 Western Blotting

A análise da expressão protéica foi determinada através do método de Western Blotting. Para obter a quantidade de proteínas necessárias para as dosagens, somou-se artérias coronárias de 3 animais em um “pool” que caracterizamos como (n=1), e para cada grupo utilizamos um N final conforme segue: SHAM=4; OVX=4; E2/DSRP=4 e E2=4. As amostras de coronárias foram mantidas a uma temperatura de -80° C até o momento da extração protéica, que foi realizada posteriormente, em tampão de lise contendo (em mmol/l) 150 NaCl, 50 Tris-HCl, 5 EDTA.2Na, 1 MgCl₂ ao qual se adicionou 10µg/mL coquetel inibidor de proteases (Sigma Fast; Sigma). A homogeneização foi realizada com auxílio de sonicador ultra-sônico, sendo seguida de centrifugação a 6000 rpm a 4°C por 15 minutos. Os sobrenadantes foram recolhidos, aliquotados e armazenados a -80 °C. Este extrato total foi utilizado para avaliação da expressão de eNOS e ER α .

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

Posteriormente, foi calculado o volume necessário para uma carga de 50 µg de proteína, sendo este volume de amostra misturada, em partes iguais, com tampão de homogeneização. Aliquotas do homogeneizados foram diluídas em solução de Laemmli 2X (0,5 mM de uréia, 0,17 mM de SDS, 39 µM de ditiodiol, 0,01 M de Tris

e azul de bromofenol 0,5%). As amostras depois de preparadas eram aquecidas a 95°C durante 4 minutos.

As amostras foram carregadas em géis de SDS-poliacrilamida 7,5% e 10% para eNOS, ER α (1,5 M Tris HCl pH: 8,8, acrilamida 40%, glicerol 100%, SDS 10%, APS 10% e Temed) previamente imersos em um tampão para eletroforese (25mM de Tris HCl, 190 mM de glicina e 0,1% de SDS). Antes da sua aplicação no gel as amostras foram aquecidas a 100 °C durante 5 min. A eletroforese foi conduzida com o tampão (25mM de tris-HCl pH 8,3, 192 mM de glicina e 0,1% de SDS), a 80 volts por aproximadamente 2 horas e 30 minutos (PowerPacTM HC, BioRad, Singapura). Os procedimentos relativos a eletroforese foram realizados segundo o sistema descrito por Laemmli (1970).

As proteínas eram separadas das amostras para avaliar a expressão da eNOS e ER α , foram transferidas para uma membrana de PVDF utilizando um sistema de transferência (Biorad, Trans-Blot SD), com tampão de transferência constituído de 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 análise do receptor de AT1 e AT2, Mn SOD2 e gp91phox foi realizada em cuba molhada (Biorad), por 2:00 hs, 60 volts a 4°C.

Após a transferência, as membranas de PVDF foram incubadas por 2:30 horas em uma solução constituída de leite 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, para evitar ligações inespecíficas com reativos não imunológicos. Em seguida, as membranas foram incubadas por 4 horas em temperatura ambiente, sob agitação, em TBS-T adicionado mais os seguintes anticorpos primários: eNOS (1:2500, BD Transduction Laboratories, Lexington, UK), ER α (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, California, EUA) e para β -actina (1:1500, Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Após este período, as membranas foram lavadas em tampão TBS-tween 0,1%, sob agitação leve em temperatura ambiente e incubadas com o anticorpo secundário (IgG, anti-mouse conjugado para fosfatase alcalina - 1:3000, Abcam Inc. e IgG, anti-Rabbit conjugado para fosfatase alcalina – 1:7000, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) por 1:30 hora, à temperatura ambiente, sob agitação suave,

seguida de lavagem com tampão TBS-tween 0,1%, e posteriormente com tampão TBS.

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

3.3 Protocolos

3.3.1 Protocolo de Reatividade vascular

Uma linha temporal com a seqüência de trabalho do protocolo de reatividade vascular.

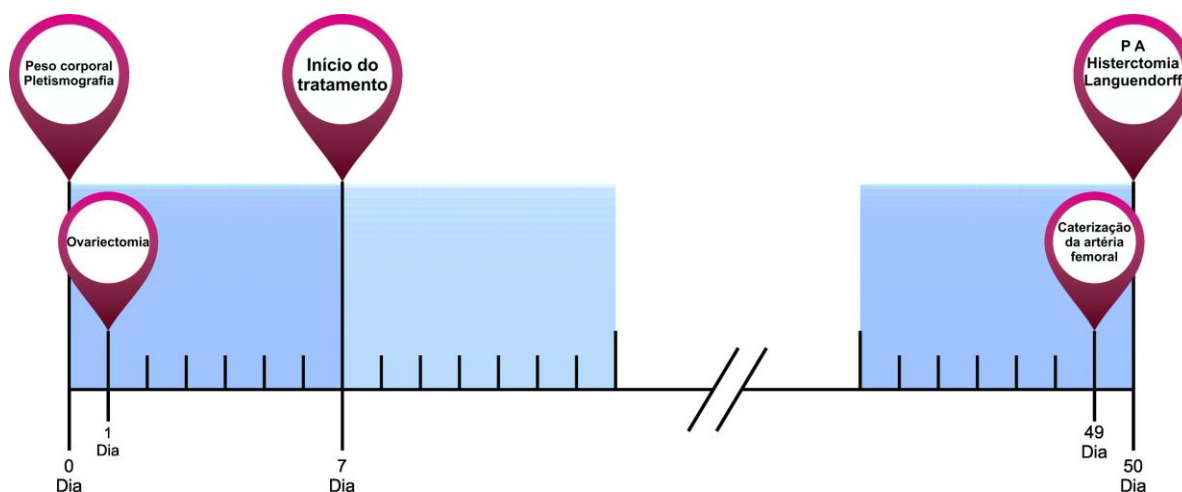


Figura 3. Diagrama da seqüência de trabalho para análise da reatividade vascular coronariana.

3.3.2 Protocolo de coleta de material para análises histológicas e moleculares

Uma linha temporal com a sequência de trabalho do protocolo de coleta dos órgãos para posteriores análises histológicas, quantificação de superóxido e análises por Western Blotting.

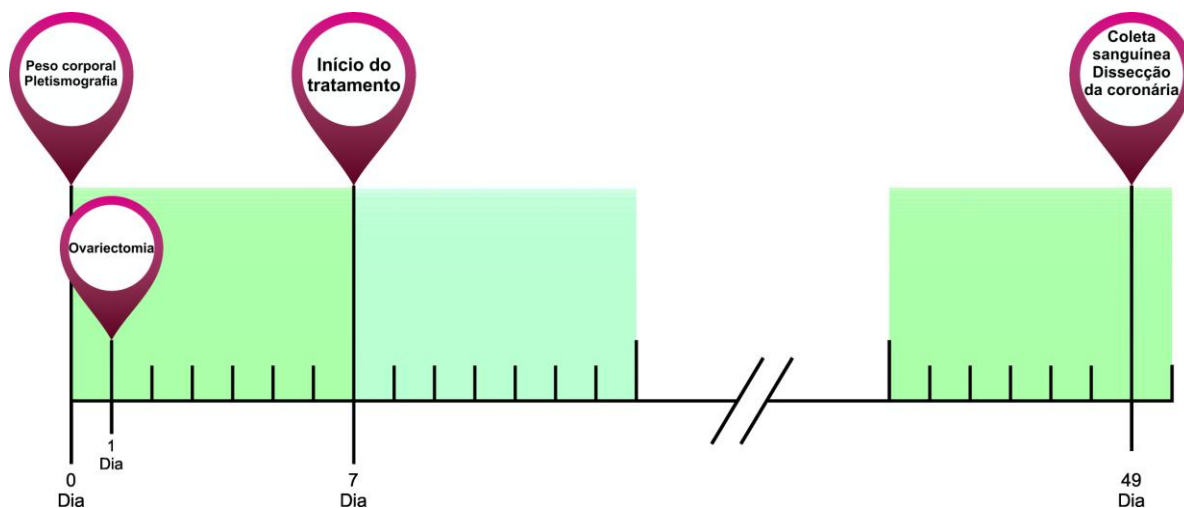


Figura 4. Diagrama da sequência de trabalho para coleta dos órgãos.

3.4 Expressão dos Resultados e Análise Estatística

Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM). Os valores de N indicam o número de animais utilizados em cada grupo experimental.

O relaxamento coronariano à bradicinina e ao E2 foi expresso em porcentagem de relaxamento. Para análise dos resultados de reatividade vascular coronariana utilizou-se análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida de teste post-hoc Tukey/Kramer.

Para análise dos resultados de pressão arterial e frequência cardíaca utilizou-se análise de variância (ANOVA) de uma via seguida de teste post-hoc Tukey/Kramer. Para aos resultados de reatividade vascular com diferentes concentrações de

bradicinina utilizou-se ANOVA de uma duas vias seguida de teste post-hoc Tukey/Kramer. Os resultados da expressão protéica da eNOS e ER α estão expressos como razão entre a densidade óptica para estas proteínas em relação a β -actina. As médias foram analisadas através da ANOVA de uma via. Quando ANOVA apresentou significância estatística realizou-se teste *pos-hoc* de Fisher utilizando-se Graph Prism Software (San Diego, CA, USA). Os resultados foram considerados estatisticamente significantes para valores de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Eficácia da cirurgia de ovariectomia e da terapia de reposição hormonal

Para a análise da eficácia da cirurgia de ovariectomia e da terapia de reposição hormonal, após o sacrifício dos animais, o útero foi removido cuidadosamente e pesado úmido. Foi observado uma redução do peso uterino (atrofia) do grupo ovariectomizado, assim como, uma redução na razão entre o peso do útero com o peso corporal quando comparado ao grupo controle ($p < 0.05$). Por outro lado, houve uma prevenção da atrofia uterina nos dois grupos que foram submetidos a terapia de reposição hormonal, os quais tiveram o peso uterino significativamente maior comparado ao grupo OVX ($p < 0.05$), indicando a eficácia da terapia de reposição hormonal (Tabela 1).

4.2 Medidas Hemodinâmicas e Concentrações Plasmáticas de Sódio e Potássio.

Antes proceder as ovariectomias e iniciar os tratamentos, os animais foram submetidos a verificação da PA por medida indireta, para verificação dos níveis pressóricos. Os animais apresentaram PAM de 145 ± 5 mmHg, só então foram randomicamente divididos entre os grupos. As medidas hemodinâmicas demonstraram um aumento na pressão arterial sistólica nos ratos hipertensos após a ovariectomia ($p < 0.05$ vs Sham), evidenciando a importância dos estrógenos sobre a regulação da pressão arterial. Além disso, ambos os tratamentos utilizados para a terapia hormonal preveniram o aumento observado nas ratas OVX ($p < 0.05$ vs OVX), mantendo a pressão arterial sistólica nos mesmo níveis dos animais utilizados como controle. Entretanto, não houve diferenças entre os grupos nos parâmetros de frequência cardíaca, pressão diastólica e pressão arterial média

(Tabela 1). Além disso, não foram detectadas diferenças entre os grupos em relação as concentrações plasmáticas de sódio e potássio (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros ponderais, hemodinâmicos e eletrolíticos plasmáticos.

	Controle	OVX	E2	E2+DRSP
PC (g)	189 ± 3	231 ± 4 [*]	176 ± 2 ^{#‡}	198 ± 3 [#]
PU (mg)	345 ± 36	159 ± 21 [*]	280 ± 11 [#]	303 ± 22 [#]
PU/PC (mg/g)	1.81 ± 0.18	0.69 ± 0.1 [*]	1.58 ± 0.07 [#]	1.53 ± 0.1 [#]
FC (bpm)	347 ± 14	344 ± 19	366 ± 5	335 ± 14
PAS (mmHg)	176 ± 5	197 ± 4 [*]	178 ± 7	173 ± 4 [#]
PAD (mmHg)	110 ± 4	116 ± 4	108 ± 5	109 ± 7
PAM (mmHg)	133 ± 4	143 ± 3	131 ± 5	130 ± 6
Na ⁺ Plasma (mEq/L)	147.7 ± 0,67	147.3 ± 0.25	146.8 ± 1.44	146 ± 0.71
K ⁺ Plasma (mEq/L)	3.63 ± 0.09	3.3 ± 0.06	4.05 ± 0.35	3.54 ± 0,14

PC: peso corporal, PU peso do útero, FC: frequência cardíaca, PAS: pressão arterial sistólica, PAD: pressão arterial diastólica, PAM: pressão arterial média. Os dados são demonstrados como média ± EPM. * p<0.05 vs controle, # p<0.05 vs OVX, † p<0.05 vs E2 e ‡ p<0.05 vs E2+DRSP.

4.3 Pressão de Perfusão Coronariana Basal e Estudo da Reatividade Vascular Dependente do Endotélio à Bradicinina e ao E2.

A pressão de perfusão coronariana basal foi significativamente menor nas ratas OVX comparadas as ratas controle (p<0.05 – figura 5). Esses resultados já haviam sido reportados em estudos prévios do nosso laboratório tanto em ratas Wistar

quanto em SHR (Moysés et al., 2001; Borgo et al., 2011). A resposta vasodilatadora dependente do endotélio à bradicinina foi reduzida significativamente nas ratas submetidas a ovariectomia comparadas as ratas controle ($p < 0.05$ – Figura 6A), sugerindo que a deficiência estrogênica possivelmente levou a ocorrência de uma disfunção endotelial, visto que a resposta a bradicinina ocorre mediante a ativação de receptores do tipo B2 presentes no endotélio vascular (MICHEL e VANHOUTTE, 2010).

No entanto, ambas as terapias hormonais foram capazes de prevenir a redução da resposta vasodilatadora mediada pelo endotélio vascular, as quais foram significativamente maiores quando comparadas as ratas ovariectomizadas ($p < 0.05$ – Figura 6B). Além disso, foi observado que a terapia combinada com E2 e DRSP se mostrou mais efetiva sobre a prevenção da redução da resposta vasodilatadora, uma vez que foi significativamente maior nas três maiores concentrações quando comparadas ao grupo OVX ($p < 0.05$ – Figura 6B).

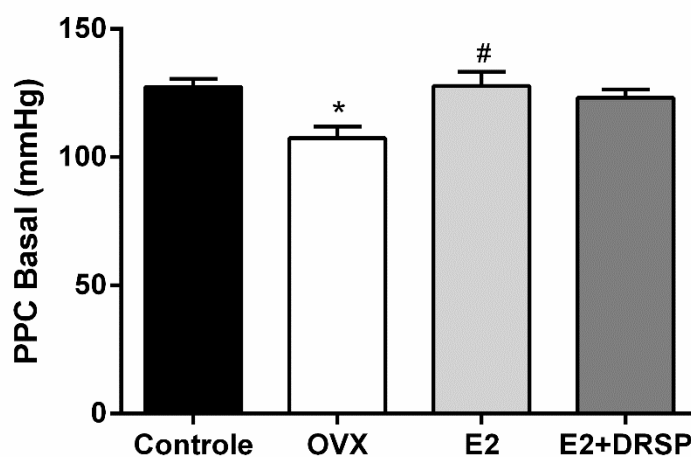


Figura 5. Pressão de perfusão coronariana basal (mmHg). Dados expressos como média \pm EPM. * $p < 0.05$ vs Controle e # $p < 0.05$ vs OVX.

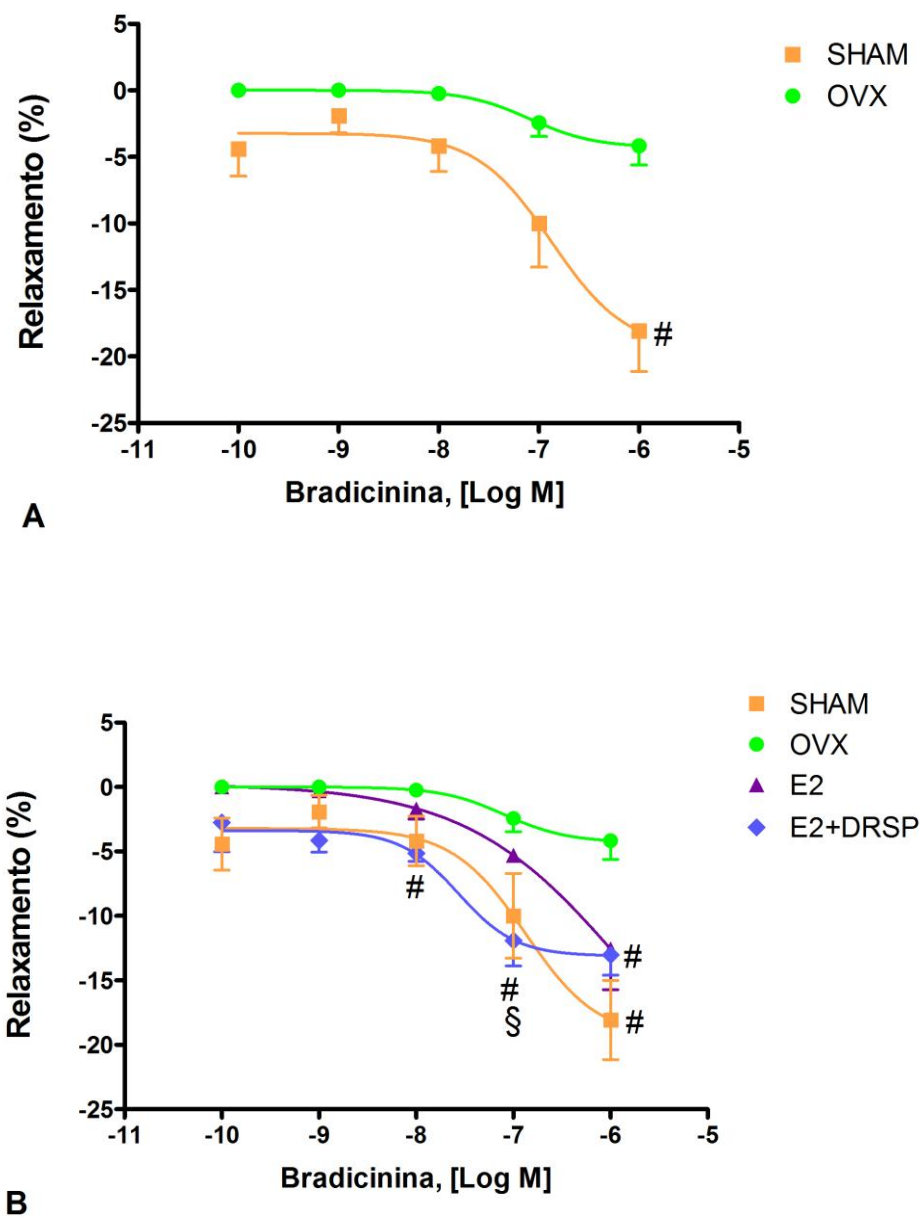


Figura 6. Resposta vasodilatadora dependente do endotélio a bradicinina, demonstrando a redução causada pela deficiência estrogênica nas ratas OVX (A), e a prevenção da disfunção endotelial nos grupos que foram submetidas a terapia de reposição hormonal (B). Dados expressos com média \pm EPM. # $p < 0.05$ vs OVX, e § $p < 0.05$ vs E2.

No estudo de reatividade vascular coronariana ao E2 (Figura 7), a deficiência estrogênica ocasionou uma redução significativa da resposta vasodilatadora comparado ao grupo controle ($p < 0.05$), as quais foram prevenidas tanto pelo tratamento com E2 quanto pela terapia combinada com E2 e DRSP ($p < 0.05$), não havendo efeito aditivo com a adição da DRSP.

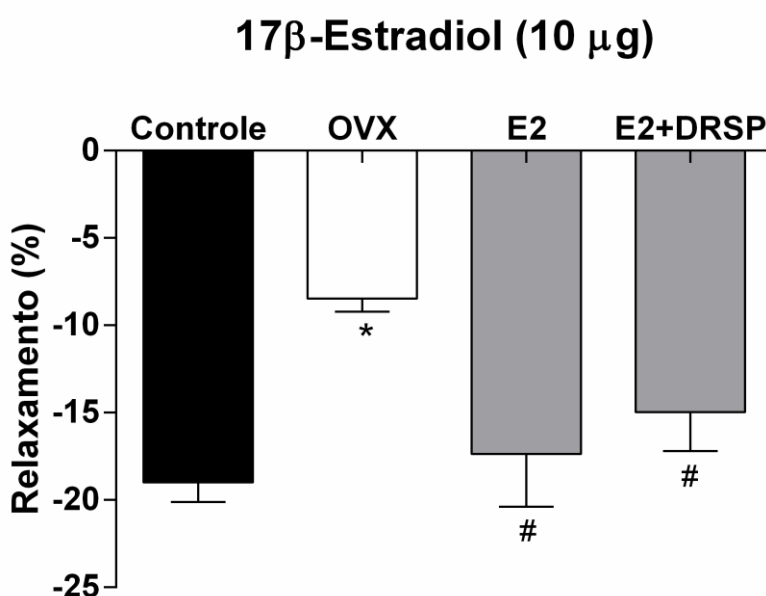


Figura 7. Reatividade vascular ao E2. A OVX reduziu significativamente a vasodilatação mediada pelo E2, a qual foi prevenida (restaurada) nos grupos que foram submetidos ao tratamento com E2 e com E2+DRSP. Dados expressos como média \pm EPM. * $p < 0.05$ vs Controle; # $p < 0.05$ vs OVX.

4.4 Expressão Protéica da Enzima Óxido Nítrico Sintase Endotelial (eNOS) e do Receptor de Estrogênio α

A expressão protéica da isoforma endotelial da enzima óxido nítrico sintase (eNOS) não foi diferente entre os grupos. Por outro lado, avaliamos os efeitos da ovariectomia e das terapias hormonais sobre a expressão do receptor de estrogênio tipo alfa ($ER\alpha$) devido aos conhecidos efeitos da ativação de $ER\text{-}\alpha$ sobre o aumento da atividade da eNOS. A ovariectomia levou a uma significativa redução na expressão desse receptor comparadas ao grupo controle ($p < 0.05$), as quais foram prevenidas pelas terapias hormonais. ($p < 0.05$ vs OVX).

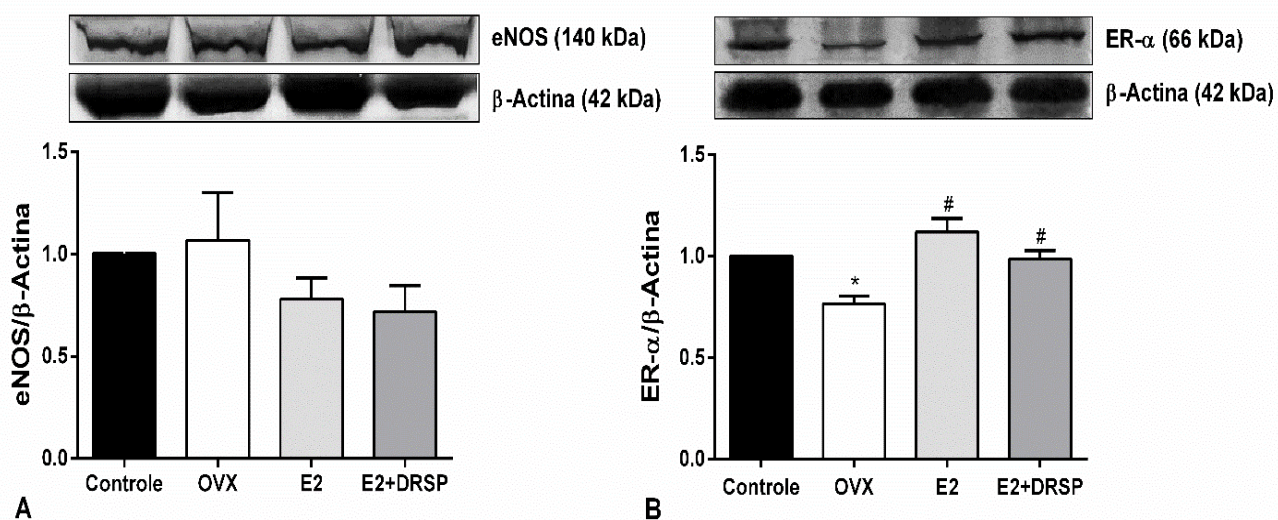


Figura 8. Expressão protéica da enzima óxido nítrico sintase endotelial (A) e do receptor de estrogênio alfa (B). Dados expressos como média \pm EPM. * $p < 0.05$ vs Controle, e # $p < 0.05$ vs OVX.

4.5 Avaliação Morfométrica

Foi realizada a análise morfométrica com o objetivo de verificar os efeitos da ovariectomia e das terapias hormonais sobre o remodelamento vascular nas artérias coronárias. A área vascular total, a área da parede e a área do lúmen aumentaram significativamente nos animais ovariectomizados comparados aos animais do grupo controle ($p < 0.05$). Porém, essas alterações foram prevenidas nos grupos tratados, as quais foram mantidas nos mesmos níveis comparados aos animais controles ($p < 0.05$ vs Sham). A razão parede/lúmen foi reduzida nos animais submetidos a ovariectomia ($p < 0.05$ vs Sham), devido ao aumento de ambos os parâmetros. Foi observado um aumento nesse parâmetro, apenas no grupo que recebeu a terapia combinada, quando comparadas aos animais do grupo OVX ($p < 0.05$).

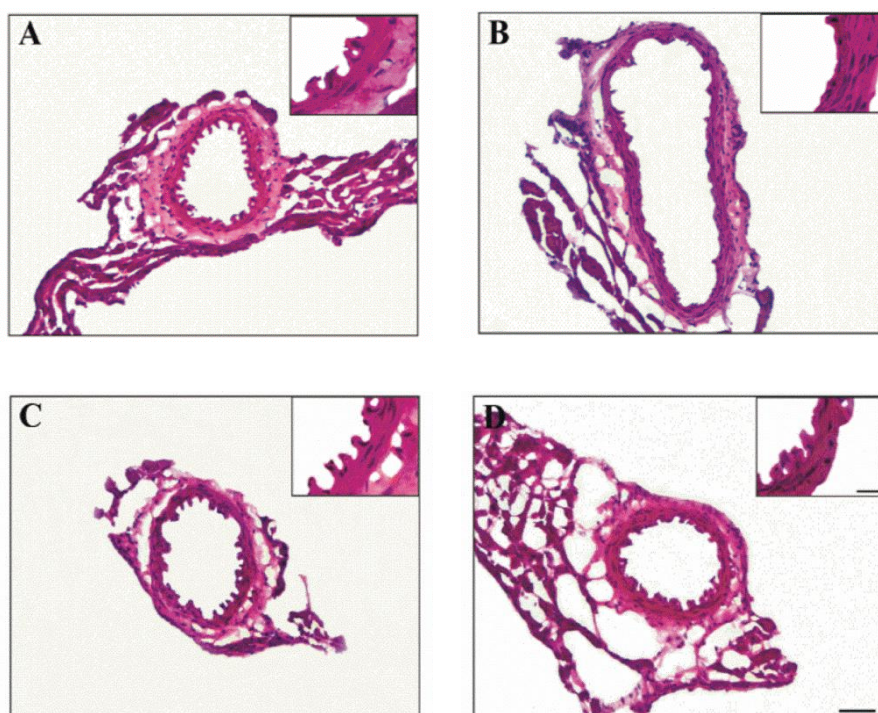


Figura 9. Imagens representativas dos cortes transversais das artérias coronárias (A) Sham, (B) OVX, (C) tratadas com E2 e (D) tratado com E2+ DRSP. Coloração H.E. (20x e 100x).

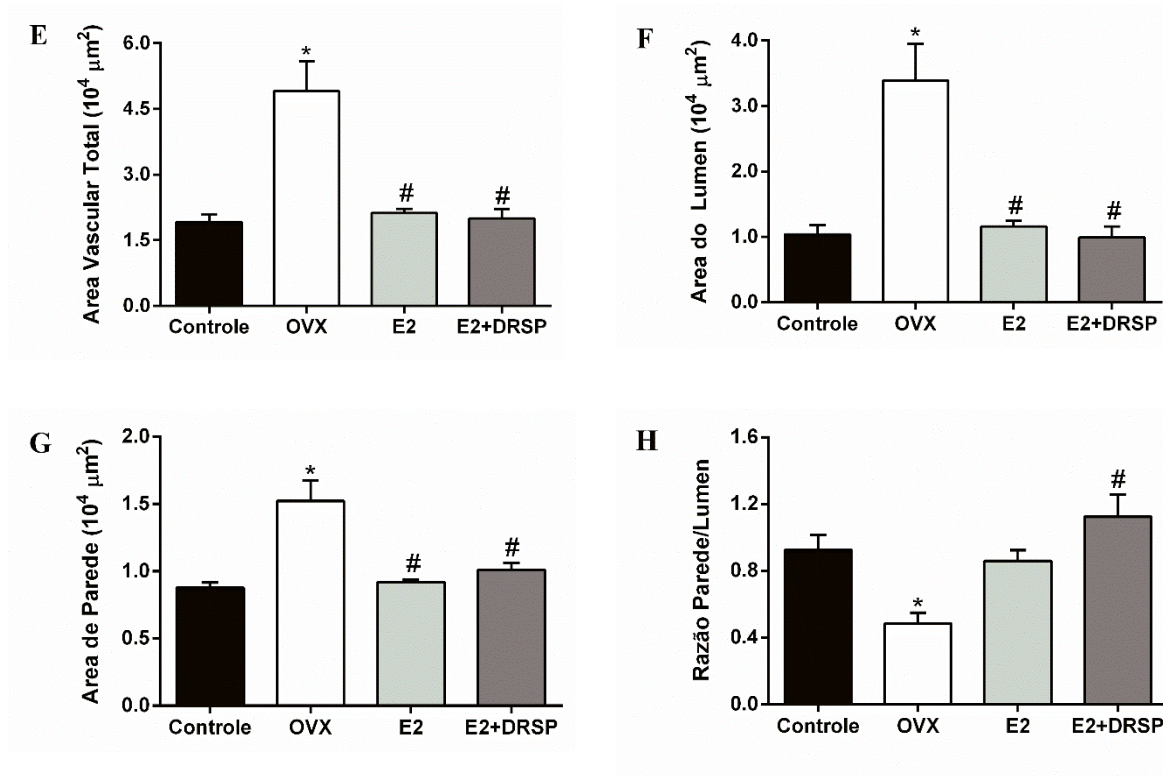


Figura 10. Avaliação morfológica em artérias coronárias de ratas ovariectomizadas e tratadas com as terapias de reposição hormonal. Dados foram expressos como média \pm EPM. * $p < 0.05$ vs Controle; # $p < 0.05$ vs OVX.

4.6 Estresse Oxidativo Vascular (Fluorescência ao Dihidroetídio)

Para a avaliação dos efeitos dos tratamentos sobre o estresse oxidativo vascular “*in situ*”, fizemos a detecção da produção de ânion superóxido pela fluorescência ao dihidroetídio (DHE). Os resultados demonstram um aumento na produção de ânion superóxido nas artérias coronárias dos animais ovariectomizados ($p < 0.05$), comparadas ao grupo controle, o que contribui para o estresse oxidativo vascular, podendo assim, reduzir a biodisponibilidade de óxido nítrico. Esse fenômeno pode contribuir diretamente a resposta prejudicada na vasodilatação dependente do endotélio mediada pela bradicinina. As terapias hormonais somente com E2 ou

combinada com drospirenona reduziram a formação vascular de ânion superóxido ($p < 0.05$) a um nível similar ao observado nos animais do grupo controle.

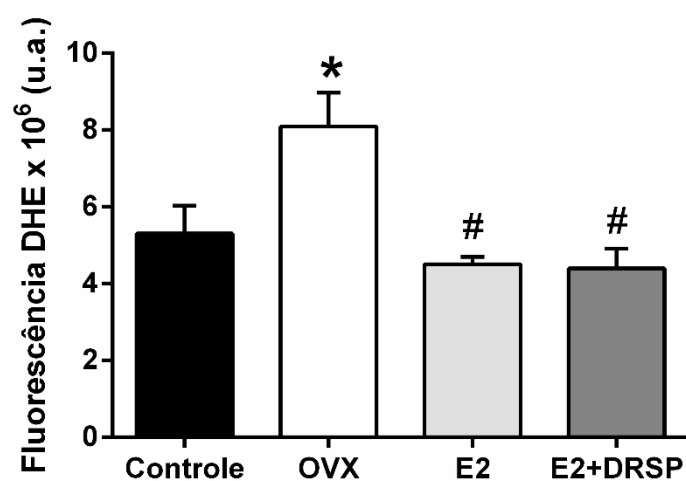
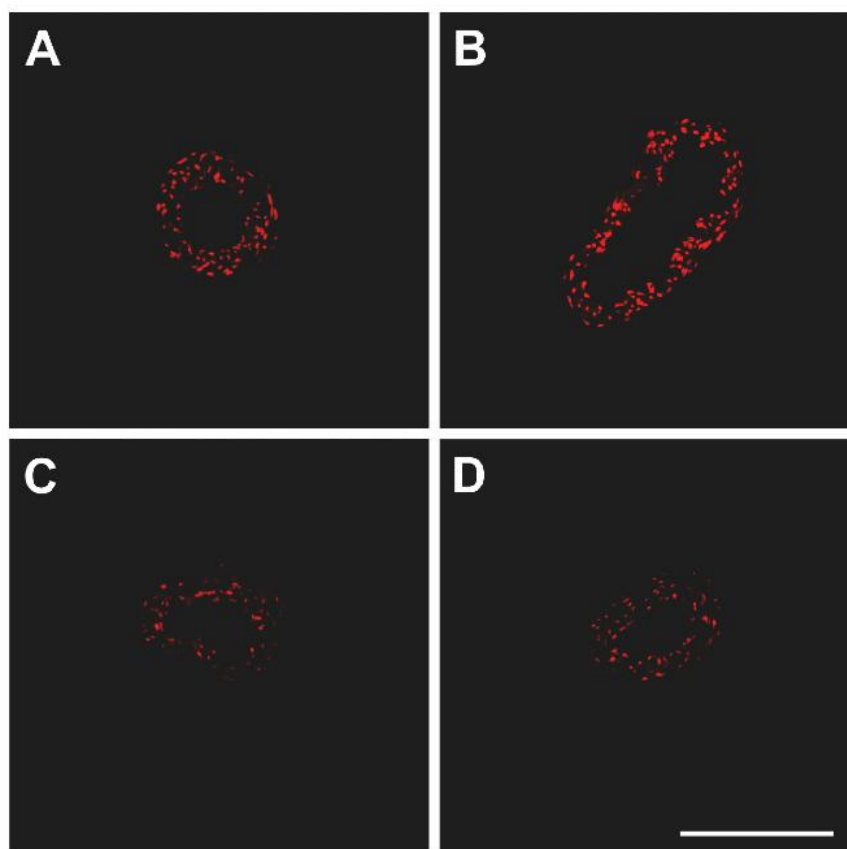


Figura 11. Avaliação do estresse oxidativo vascular “*in situ*” pela fluorescência ao dihidroetídio (DHE). Dados foram expressos como média \pm EPM. * $p < 0.05$ vs Controle; # $p < 0.05$ vs OVX.

5 DISCUSSÃO

Os principais achados desse estudo, os quais foram sumarizados na figura 12 são: 1- A terapia estrogênica, assim como, a terapia combinada com E2 e DRSP previnem a disfunção endotelial causada pela deficiência estrogênica em ratas hipertensas; 2- A terapia combinada com E2 e DRSP demonstrou uma resposta melhorada da reatividade vascular dependente do endotélio, uma vez que foi significativamente maior nas três maiores concentrações quando comparadas ao grupo OVX e; 3- A DRSP, não prejudicou as ações benéficas do estrogênio relacionadas à prevenção do remodelamento e do estresse oxidativo; 4 - Reduziu a pressão arterial sistólica no grupo E2+DRSP. Esses achados mostram uma ação diferenciada de outras progestinas sintéticas utilizadas nas triagens clínicas de grande impacto.



Figura 12: Diagrama dos principais efeitos da terapia hormonal com 17 β -estradiol e sua associação a drospirenona no modelo de hipertensão e experimental.

A cessação da função ovariana e a consequente redução dos níveis dos hormônios sexuais após a menopausa exercem um importante impacto metabólico

e implicações fisiopatológicas que influenciam negativamente o sistema cardiovascular. Com o envelhecimento há também um aumento na incidência de hipertensão que é maior em mulheres após a menopausa quando comparadas a mulheres no período pré-menopausa (STAESSEN et al., 1989). Está claramente demonstrado, em modelos animais, que a redução nas concentrações plasmáticas do E2 induzido pela OVX pode ocasionar o aumento da pressão arterial em ratas normotensas (Hernandez et al., 2000), e também agravar o quadro hipertensivo de animais hipertensos (BORGIO et al., 2011; MORAES et al., 2011), assim como foi demonstrado nesse estudo, sugerindo um importante papel desse hormônio ovariano sobre a regulação da PA. Considerando que a hipertensão é um dos fatores de risco independentes mais importantes e para o surgimento de doença arterial coronariana e para o acidente vascular encefálico, as mulheres que estão no período pós-menopausa estão, provavelmente, mais propensas ao desenvolvimento desse agravo, principalmente quando já apresentam uma doença de base como a hipertensão. Portanto, o estudo de terapias hormonais que possam contribuir para o controle da hipertensão são relevantes, especialmente quando consideraram-se as peculiaridades do período pós-menopausal.

No presente estudo, verificamos que as ratas que foram submetidas a cirurgia de OVX apresentaram elevação significativa da PAS quando comparadas aos animais do grupo controle. Já no grupo tratado com E2+DRSP esse aumento não foi observado, sugerindo um efeito preventivo da drospirenona sobre a exacerbação PAS (tabela 1).

Em outro modelo de hipertensão, Arias-Loza e colaboradores em 2006, demonstraram que em ratas OVX tratadas com aldosterona e sobrecarga salina, a terapia com E2+DRSP em diferentes concentrações, assim como a terapia estrogênica preveniu o aumento exacerbado da PA. No entanto, outra progestina sintética, o acetato de medroxiprogesterona (MPA), aboliu praticamente todos os efeitos benéficos da terapia estrogênica.

Em humanos, um estudo clínico que avaliou os efeitos anti-hipertensivos da drospirenona em mulheres com hipertensão estágio 1 e 2 no período pós-menopausa, demonstrou que a adição da DRSP em concentrações de 2 e 3 mg conjugados ao estradiol, reduziu significativamente a pressão arterial, sem

alterações na concentração sérica de potássio, e aumento na concentração sérica de aldosterona (WHITE et al., 2006). Resultados similares foram encontrados em outro estudo que avaliou os efeitos do uso prolongado da drospirenona (13 meses) em concentrações que variaram entre 0,5 e 3 mg, tendo demonstrado redução significativa na PAS em todas as concentrações avaliadas, enquanto que a PAD reduziu somente nas concentrações de 2 e 3 mg. Além disso, foram demonstrados outros benefícios adicionais com o uso combinado com a DRSP, como a proteção contra a hiperplasia endometrial, melhora do perfil lipídico e da densidade mineral óssea (Archer, 2005).

Por outro lado, quando avaliou-se a terapia conjugada utilizada como método contraceptivo em mulheres jovens e normotensas, não foram verificadas alterações agudas nos valores de PAS ambulatorial de 24 horas (Cagnacci et al., 2013) e após 6 meses de uso contínuo, bem como nenhuma alteração dos parâmetros autonômicos, como a variabilidade da frequência cardíaca (Nisenbaum et al., 2014). Portanto, a terapia combinada com E2+DRSP, parece ter uma grande importância nas mulheres pós-menopausadas em relação aos efeitos cardiovasculares, no sentido de prevenir o surgimento da hipertensão associada a queda do E2, e em mulheres jovens, que a utiliza como método contraceptivo, não estão descritos impactos sobre a PA, apesar da prevenção da retenção hidrossalina.

O mecanismo que parece governar o efeito da drospirenona sobre a pressão arterial na hipertensão é seu efeito antialdosterona, caracterizado pela sua inibição ao receptor de mineralocorticóide. Esse fato tem importância fundamental sobre a regulação da PA, porque, além de inibir a retenção de sódio pelos rins, foi recentemente descrito que esses receptores podem regular a resistência vascular diretamente em células do músculo liso vascular (VSMC) (McCurley et al., 2012). No referido estudo, verificou-se que em camundongos com deleção específica para os MR em VSMC a pressão sistólica foi significativamente menor em comparação com os animais selvagens (controle), tal redução se manteve a medida que os animais envelheceram, assim como, quando foram estimulados pela infusão de angiotensina II. Isso sugere, portanto, que os efeitos responsáveis pela redução da pressão arterial induzidos pela DRSP podem ocorrer mediante a inibição dos MR

diretamente nas VCMC, bem como, pela inibição da retenção hidrossalina pelos rins.

Em nosso estudo de reatividade do leito coronariano de ratas SHR, a presença de estrogênio foi associada a um tônus miogênico mais elevado, o que pode ser expressado pela maior perfusão coronariana basal dos grupos que receberam terapia hormonal quando comparados ao grupo OVX (figura 5). Dados anteriores do nosso grupo de pesquisa já demonstraram um comportamento similar na PPC basal tanto de fêmeas normotensas (MOYSÉS et al., 2001 e SANTOS et al., 2004), quanto de espontaneamente hipertensas (SANTOS et al., 2010; BORGO et al., 2011). Em outro estudo, no entanto foi observado que segmentos de artéria coronária de ratos Sprague-Dawley, mostraram um tônus miogênico mais elevado em artérias de machos e de fêmeas ovariectomizadas quando comparadas às fêmeas controles e fêmeas ovariectomizadas tratadas com estrogênio subcutâneo (WELLMAN et al., 1996). Talvez a diferença observada entre nosso estudo, onde a presença de estrogênio foi associada a uma pressão de perfusão basal mais elevada nos grupos E2 e E2+DRSP, e os demais estudos, deva-se ao tipo de preparação experimental utilizada. Muitos estudos nos quais a ação do estrogênio foi associada a uma menor pressão de perfusão ou ainda a um efeito inibidor sobre o tônus do músculo liso vascular foram realizados em pequenas secções vasculares (Jiang et al., 1991), em anéis pré-contraídos (White et al., 1995 e White, 2002) ou *in vivo* (Penny et al., 1981). Nosso estudo, por sua vez, foi realizado com o coração isolado e com o leito vascular íntegro, sob condições muito próximas à fisiológica, isto é, com fluxo constante e sem contração prévia. A preparação foi montada e era esperado que estabilização fosse atingida para em seguida registrar os valores basais PPC e proceder à administração dos agentes vasodilatadores.

Além disso, em nossa análise histológica das artérias coronárias observamos que, apesar do aumento da parede vascular, o lúmen nos animais ovariectomizados sofreu um aumento (figura 10G e 10F). Segundo Folkow, o aumento na resistência vascular observado na hipertensão pode ser explicado pelas alterações na arquitetura da parede vascular não havendo necessidade de postular sobre mudanças no acoplamento excitação-contração (Folkow et al., 1956; 1958; 1978). Ele demonstrou que o aumento observado na resistência vascular mínima

(resistência ao fluxo sanguíneo após a vasodilatação máxima) ocorre pelo aumento da camada média que invade o lúmen reduzindo assim seu diâmetro e aumentando então a taxa parede/lúmen. Sendo assim, o aumento observado no lúmen do grupo OVX fez com que a razão parede/lúmen, nesse caso, ficasse reduzida. Isso pode também explicar, em parte, a redução na PPC basal desse grupo. No entanto, o mecanismo que norteia esse fenômeno observado em preparação de coração isolado, assim como, o estabelecimento desse efeito como benéfico ou maléfico em relação a proteção cardiovascular observado em animais com ovários intactos ainda não estão bem esclarecidos.

Por outro lado, embora seja observado uma redução na PPC basal de ratas OVX, a resposta vasodilatadora dependente do endotélio a bradicinina foi extremamente reduzida nesses animais, indicando claramente um prejuízo da função endotelial com a deficiência estrogênica em animais SHR (Figura 6A). Essa questão fica mais evidente quando se observa as imagens morfométricas, onde pode ser notado claramente a falta ou a menor camada endotelial vascular coronariana do grupo OVX (imagem aproximada no canto superior direito da figura 9B). Em estudo prévio do nosso laboratório, resultados similares foram encontrados em ratas normotensas após 8 semanas de OVX (CLAUDIO et al., 2013), indicando que a ausência do hormônio ovariano, independentemente dos valores pressóricos, é o principal fator que contribui para o desenvolvimento da disfunção endotelial. Cabe ressaltar que os animais SHR já exibem disfunção endotelial, a qual está estabelecida com aproximadamente 12 semanas de idade (RIZZONI et al., 1994). Portanto, nesse modelo de hipertensão, a deficiência de estrogênio parece potencializar a progressão do dano endotelial, levando a um prejuízo funcional.

Observamos, também, que a redução dos níveis de E2 aumentou o estresse oxidativo vascular, como demonstrado pela avaliação da produção vascular coronariana de ânion superóxido pela fluorescência ao DHE. Esse aumento na produção de superóxido pode representar um fator de extrema importância na progressão da disfunção endotelial nos animais SHR.

O estresse oxidativo, por sua vez, é definido como um desequilíbrio entre os sistemas pró e antioxidantes, de maneira que o primeiro predomine, gerando toxicidade celular pela formação excessiva de EROs (HALLIWELL, 2006). Estudos

prévios têm demonstrado que, de fato, a ovariectomia pode levar ao aumento no estresse oxidativo vascular (HERNANDEZ et al, 2000). Uma vez que o estradiol é reconhecidamente um hormônio antioxidante, a redução de suas concentrações circulantes poderia ser responsável pelo aumento da atividade de vias geradoras de ânion superóxido (O_2^-), como a via do complexo multi enzimático do sistema da NADPH oxidase (FLORIAN et al., 2004), que aparece como uma das principais vias geradoras de EROS no sistema vascular, assim como, reduzir a expressão proteica de enzimas antioxidantes (STREHLOW et al., 2003). Dessa maneira, o aumento O_2^- observado nos OVX pode levar a redução da biodisponibilidade de óxido nítrico, uma vez que essa molécula reage com ânion superóxido a uma velocidade muito alta formando peroxinitrito, o qual é o principal responsável pelo desacoplamento da eNOS devido a oxidação do co-fator dessa enzima, a tetrahydrobiopterina (BH_4) (LAURSEN et al., 2001). Além disso, o peroxinitrito pode reduzir o relaxamento vascular mediado pelo fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), por inibir canais para potássio ativados por cálcio (BKca) (Liu et al., 2002).

Por outro lado, a piora da função endotelial foi prevenida tanto pela terapia isolada com E2, quanto pelo tratamento combinado com E2 e DRSP. Ao contrário de outras progestinas sintéticas utilizadas em terapias hormonais pós-menopausa, como a MPA, que podem prejudicar ou antagonizar as ações benéficas do estradiol sobre a função vascular (WASSMANN et al., 2005; ARIAS-LOZA et al., 2006; SIMONCINI et al., 2007).

O grupo E2+DRSP demonstrou uma resposta vasodilatadora mais pronunciada quando comparado ao grupo OVX, uma vez que o relaxamento foi significativamente maior nas três maiores concentrações de bradicinina avaliadas, sugerindo que essa progestina, além de não prejudicar os efeitos do estradiol, tenha potencializado sua proteção vascular. Estudos realizados em humanos demonstram que a terapia combinada com DRSP, de fato, pode melhorar a função vascular dependente do endotélio em mulheres jovens (MEENDERING et al., 2010; THOMPSON et al., 2011), assim como a reatividade vascular dependente e independente do endotélio em mulheres saudáveis no período pós-menopausa (VILLA et al., 2010).

Nesse sentido, como o relaxamento vascular avaliado no presente estudo é dependente do endotélio, avaliamos a expressão protéica da enzima eNOS para verificar se os efeitos das terapias estão associadas ao aumento dessa enzima. No entanto, não foram detectadas diferenças entre os grupos, sugerindo que, nesse modelo, a expressão vascular da enzima eNOS não seja influenciada pelo estradiol, e nem a terapia combinada com a DRSP. Esses achados parecem ser contraditórios a estudos prévios nos quais ficou demonstrado o aumento da liberação de NO induzida pelo estrogênio (JIANG et al., 1991; LANTIN-HERMOSO et al., 1997; CAULIN-GLASER et al., 1997) ou aumento da expressão da eNOS por um mecanismo dependente de ER α após tratamento com E2 em artérias cerebrais e em cultura de células endoteliais humanas (MCNEILL et al., 2002; SIMONCINI et al., 2007). Entretanto, nosso modelo é de tratamento a longo prazo, simulando a terapia em humanos, enquanto os resultados mencionados advêm de exposições agudas ou estudos *in vitro*, o que pode explicar os achados contrastantes.

Além disso, nem todos os estudos têm relatado aumento na expressão dessa enzima com o tratamento com E2 após a OVX. Outros trabalhos já demonstraram que o estrogênio não aumentou a expressão da eNOS em ratos ou culturas de células endoteliais (ARNAL et al., 1996; ETHAGE et al., 1997; BARBACANNE et al., 1999; WASSMANN et al., 2001), somando-se a esses, estão dados do nosso grupo de pesquisa, que também demonstrou não haver influência direta do E2 sobre a expressão da eNOS em artérias coronárias de animais ovariectomizados (CLAUDIO et al., 2013). Ademais, outro estudo demonstrou, inclusive, uma redução da expressão dessa enzima na artéria aorta (FLORIAN et al., 2004). Portanto, a expressão vascular da eNOS em função da ovariectomia e do tratamento com E2 podem depender de vários fatores, como o tipo de vaso ou leito vascular avaliado, tipo de estrógeno utilizado para a terapia hormonal e também do tempo de exposição ao E2 exógeno, necessitando assim, de estudos adicionais.

Por outro lado, a expressão do ER α diminuiu com a OVX, sendo preservada em ambos os grupos tratados. Esse resultado pode explicar, em parte, a melhora da reatividade vascular com os tratamentos devido a conhecida ativação da eNOS, mediada pela ligação do E2 a esse receptor, aumentando assim a liberação de NO, como já relatado previamente (CHEN et al., 1999). Isso sugere que, apesar de

não haver maior expressão de eNOS, a biodisponibilidade do NO pode estar aumentada com a terapia hormonal. Outro fator importante é a redução do estresse oxidativo vascular com os tratamentos, uma vez que o aumento das espécies reativas de oxigênio podem reduzir a biodisponibilidade de NO, como mencionado acima.

Observamos ainda que a resposta de relaxamento do leito coronariano ao 17β -estradiol administrado agudamente foi significativamente prejudicada no grupo OVX, sendo preservada nos grupos tratados. A ação do 17β -estradiol em promover vasodilatação de segmentos arteriais, está amplamente descrita na literatura, seja por administração crônica, aguda ou mesmo a infusão do hormônio em preparações de anéis isolados e em leitos vasculares (MAGNESS e RONSENFELD, 1989; WELLMAN et al., 1996; DARKOW et al., 1997, SANTOS et al., 2004, GUO et al., 2005 e GUO et al., 2006; SANTOS et al., 2010).

A vasodilatação observada no presente estudo ocorreu de maneira imediata após a administração do hormônio, o que sugere uma ativação do tipo não-genômica. Como houve redução na vasodilatação induzida pelo 17β -estradiol no grupo OVX em relação ao controle, a ação aguda do estrogênio parece depender de seus níveis endógenos, que estariam regulando a expressão dos $RE\alpha$ (NIRMALA e THAMPAN, 1995). Dessa forma o aumento da expressão dos $ER\alpha$ nos grupos que receberam tanto E2 quanto E2+DRSP pode explicar a preservação da resposta vasodilatadora ao E2 nesses grupos. Portanto a drospirenona se mostra, mais uma vez, como uma terapia que mantém as ações benéficas do estrogênio sobre a circulação coronariana.

Assim como os resultados da expressão das proteínas, a histomorfometria e a redução do estresse oxidativo parecem estar mais diretamente relacionados aos efeitos mediados pelo estradiol do que pela própria drospirenona na terapia combinada, uma vez que não foram identificadas diferenças entre os grupos E2 e E2+DRSP, demonstrando assim, um efeito neutro da DRSP sobre remodelamento vascular. Entretanto, esses resultados por si são considerados de enorme importância, uma vez que outras progestinas sintéticas reduzem a expressão endotelial gênica e protéica da eNOS associado a redução na produção de NO (Zerr-Fouineau et al., 2007 e 2009), fenômeno que possivelmente culmina com a

piora da função vascular. Corroborando com essa teoria, Arias-Loza e colaboradores, em 2006, demonstraram que anéis de aorta expostos a MPA apresentaram aumento na contração vascular à fenilefrina, assim como, a redução do relaxamento vascular tanto dependente quanto independente do endotélio.

Além disso, outros mecanismos podem estar envolvidos com a melhora da vasodilatação dependente do endotélio observada no grupo de animais tratados com a terapia combinada. A DRSP pode estar agindo de forma semelhante a progesterona, ou seja, assim como o E2, a progesterona pode diretamente aumentar rapidamente a atividade da enzima eNOS mediante a ativação do receptor de progesterona, com consequente sinalização das vias da MAPK e PI3K, como relatado previamente em cultura de células endoteliais por Simoncini e colaboradores (2007).

Sugerimos ainda que a inibição dos MR pela DRSP poderia ter aumentado as concentrações plasmáticas de aldosterona, como já relatado em estudos anteriores (OELKERS et al., 1991; WHITE et al., 2006). A aldosterona possui efeitos vasculares diretos (FELDMAN e GROS., 2011), como redução da vasoconstrição induzida pela fenilefrina, efeito esse que se mostrou mediado pelo receptor de estrogênio acoplado a proteína G (GPER) (GROS et al., 2013).

Assim, considerando o efeito anti-mineralocorticóide da drospirenona, a arquitetura vascular e a avaliação do estresse oxidativo, acreditamos que esses possam ser os prováveis mecanismos relacionados à melhora da vasodilatação mediada pelo endotélio vascular ocorrido pelo tratamento com a terapia combinada com E2 e DRSP. Ademais, o estabelecimento da relação de causa e efeito desses fatores em animais hipertensos e ovariectomizados, especificamente sobre a reatividade coronariana, continuam por serem determinados, necessitando de estudos futuros.

6 CONCLUSÃO

A terapia combinada com E2+DRSP, além de apresentar efeitos benéficos sobre a redução da PA, melhorou a reatividade vascular dependente do endotélio no leito vascular coronariano, além disso, não afetou as ações do E2 sobre o remodelamento e estresse oxidativo coronariano em ratas SHR ovariectomizadas. Esses resultados são de uma grande importância, considerando que a DRSP conhecidamente, atua de uma maneira similar a progesterona no combate aos sintomas da pós-menopausa e protegendo contra a hiperplasia endometrial. Interessantemente, em nosso estudo, a DRSP não prejudicou as ações vasculares benéficas atribuídas ao estrogênio, como observado com outras progestinas utilizadas em grandes triagens clínicas. Assim, a associação de DRSP na terapia hormonal com E2 mostra-se como uma opção terapêutica importante, especialmente nos quadros de hipertensão pós-menopausal, em que parece atuar na prevenção de doenças coronárias.

7 REFERÊNCIAS

Africander D, Verhoog N, Hapgood JP. Molecular mechanisms of steroid receptor-mediated actions by synthetic progestins used in HRT and contraception. *Steroids* 2011; 76:636–652.

Amigoni S, Morelli P, Parazzini F, Chatenoud L. Determinants of elevated blood pressure in women around menopause: results from a cross-sectional study in Italy. *Maturitas*. 2000; 34: 25-32.

Anderson GL, Limacher M, Assaf AR, Bassford T, Beresford SA, Black H, Bonds D, Brunner R, Brzyski R, Caan B, Chlebowski R, Curb D, Gass M, Hays J, Heiss G, Hendrix S, Howard BV, Hsia J, Hubbell A, Jackson R, Johnson KC, Judd H, Kotchen JM, Kuller L, LaCroix AZ, et al. Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2004; 291:1701–1712

Archer DF, Thorneycroft IH, Foegh M, Hanes V, Glant MD, Bitterman R, Kempson RL. Long-term safety of drospirenone-estradiol for hormone therapy: A randomized, double-blind, multicenter trial. *Menopause* 2005; 12: 716 –727.

Arefin S, Simoncini T, Wieland R, Hammarqvist F, Spina S, Goglia L, Kublickiene K. Vasodilatory effects of the selective GPER agonist G-1 is maximal in arteries of postmenopausal women. *Maturitas* 2014; 78, 123–130.

Arias-Loza PA, Hu K, Schafer A, Bauersachs J, Quaschnig T, Galle J, et al. Medroxyprogesterone acetate but not drospirenone ablates the protective function of 17 β -estradiol in aldosterone salt-treated rats. *Hypertension* 2006; 48: 994-1001.

Arnal JF, Clamens S, Pechet C, Negre-Salvayre A, Allera C, Girolami JP, Salvayre R, Bayard F. 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 U S A*. 1996; 93: 4108 – 4113.

Asharaf MS & Vongpatanasin W. Estrogen and hypertension. *Current Hypertension Reports* 2006; 8(5): 368 - 376.

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

Barr CS, Lang CC, Hanson J, Arnott M, Kennedy N, Struthers AD. Effects of adding spironolactone to an angiotensin-converting enzyme inhibitor in chronic congestive heart failure secondary to coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1995; 76:1259–65.

Barrett-Connor, E. Menopause, atherosclerosis, and coronary artery disease. *Curr Opin Pharmacol* 2013; 13, 186–191.

Borgo MV, Lopes AB, Gouvêa AS, Romero WG, Moysés MR, Bissoli NS, Abreu GR. Effect of tamoxifen on the coronary vascular reactivity of spontaneously hypertensive female rats. *Braz J Med Biol Res* 2011; 44(8): 786–792.

Brilla CG, Pick R, Tan LB, Janicki JS, Weber KT. Remodeling of the rat right and left ventricles in experimental hypertension. *Circ Res* 1990; 67:1335–64.

Cagnacci A, Ferrari S, Napolitano A, Piacenti I, Arangino S, Volpe A. Combined oral contraceptive containing drospirenone does not modify 24-h ambulatory blood pressure but increases heart rate in healthy young women: prospective study. *Contraception* 2013; 88: 413–417.

Caulin-Glaser T, García-Cardena G, Sarrel P, Sessa WC, Bender JR. 17 β -Estradiol regulation of human endothelial cell basal nitric oxide release, independent of cytosolic Ca²⁺ mobilization. *Circ Res.* 1997; 81: 885 - 892.

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

Cheng SB, Dong J, Pang Y, LaRocca J, Hixon M, et al. Anatomical location and redistribution of G protein-coupled estrogen receptor-1 during the estrus cycle in mouse kidney and specific binding to estrogens but not aldosterone. *Mol Cell Endocrinol* 2014; 382: 950–959. doi:10.1016/j.mce.2013.11.005.

Clarkson, T. B., Melendez, G. C., Appt, S. E. Timing hypothesis for postmenopausal hormone therapy: its origin, current status and future. *Menopause* 2013; 20, 342–353.

Claudio ERG, Endlich PW, Santos RL, Moysés MR, Bissoli NS, Gouvêa SA, Silva JF, Lemos VS, Abreu GR. Effects of chronic swimming training and oestrogen therapy on coronary vascular reactivity and expression of antioxidant enzymes in ovariectomized rats. *PLoS ONE* 2013; 8(6):e64806.

Coggins CH, Breyer Lewis J, Caggiula AW, Castaldo LS, Klahr S, Wang SR. Differences between women and men with chronic renal disease. *Nephrol Dial Transplant*. 1998; 13:1430 -1437.

Coylewright M, Reckelhoff JF, Ouyang P. Menopause and hypertension: an age-old debate. *Hypertension*. 2008; 51: 952 - 959.

Dahlman-Wright K, Cavailles V, Fuqua SA, Jordan VC, Katzenellenbogen JA, Korach KS, Maggi A, Muramatsu M, Parker MG, Gustafsson JA. International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen Receptors. *Pharmacological Reviews* 2006; 58: 773-781.

Darkow DJ, Lu L & White RE. Estrogen relaxation of coronary artery smooth muscle is mediated by nitric oxide and cGMP. *Am J Physiol* 1997; 272: H2765 - H2773.

Datasus: banco de dados. <http://www.datasus.gov.br>.

Dickout JG, Lee RM. Blood pressure and heart rate development in young spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* 1998; 274: H794 - H800.

Dubey RK, Imthurn B, Zacharia LC, Jackson EK. Hormone replacement therapy and cardiovascular disease: what went wrong and where do we go from here? *Hypertension* 2004; 44:789–795.

Duprez DA, De Buyzere ML, Rietzschel ER, et al. Inverse relationship between aldosterone and large artery compliance in chronically treated heart failure patients. *Eur Heart J* 1998; 19:1371–6.

Eckstein N, Nadler E, Barnea O, Shavit G, Ayalon D. Acute effects of 17 beta-estradiol on the rat heart. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 171:844–848.

Edgren RA, Stanczyk FZ. Nomenclature of the gonane progestins. *Contraception* 1999; 60:313.

Elhage R, Bayard F, Richard V, Holvoet P, Duverger N, Fiévet C, Arnal JF. Prevention of fatty streak formation of 17 β -estradiol is not mediated by the production of nitric oxide in apolipoprotein E– deficient mice. *Circulation*. 1997; 96: 3048 - 3052.

Faludi AA, Bertolami MC, Aldrighi JM. Menopausa. *Atheros* 2000; 11(3): 86 – 93.

Fang Z, Carlson S, Chen Y, Oparil S, Wyss J. Estrogen depletion induces NaCl-sensitive hypertension in female spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; 281: R1934-R1939.

Farquharson CA, Struthers AD. Aldosterone induces acute endothelial dysfunction in vivo in humans: evidence for an aldosterone-induced vasculopathy. *Clin Sci (Lond)* 2002; 103:425–31.

Feldman RD, Gros R. Unraveling the mechanisms underlying the rapid vascular effects of steroids: sorting out the receptors and the pathways. *Br J Pharmacol* 2011; 163: 1163–1169.

Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton AR Jr. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol Endocrinol* 2000; 14: 1649–1660.

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

Folkow B The Fourth Volhard Lecture. Cardiovascular structural adaptation: Its role in the initiation and maintenance of primary hypertension. *Clin Sd Mol Med* 1978; 55 (suppl): 3s-22s

Folkow B, Grimby G, Thulesius O. Adaptive structural changes of the vascular walls in hypertension and their relation to the control of the peripheral resistance. *Acta Pkysiol Scand* 1958; 44: 255-272.

Folkow B, Hallback M, Lundgren Y, Silvertson R, Weiss L. Importance of adaptive changes in vascular design for establishment of primary hypertension studied in man and in spontaneously hypertensive rats. *Circ Res* 1975; 32/33: 2-16.

Folkow B. Structural, myogenic, humoral and nervous factors controlling peripheral resistance. *Hypotensive Drugs* 1956; pp 163-174.

Fortepiani LA, Zhang H, Racusen LC, Roberts II LJ, Reckelhoff JF. Characterization of an animal model of postmenopausal hypertension in SHR. *Hypertension* 2003; 41:640 - 645.

Frohlich ED. The adrenergic nervous system and hypertension: State of the art. *Mayo Clin Proc* 1977; 52: 361-8.

Fuhrmann U, Krattenmacher R, Slater EP, Fritzemeier KH. The novel progestin drospirenone and its natural counterpart progesterone: biochemical profile and antiandrogenic potential. *Contraception* 1996; 54:243–251.

Garcia PM, Gimenez J, Bonacasa B, Carbonell LF, Miguel SG, Quesada T, Hernandez I. 17 β -Estradiol exerts a beneficial effect on coronary vascular remodeling in the early stages of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Menopause* 2005; 12(4):453-459.

Genazzani AR, Mannella P, Simoncini T. Drospirenone and its antialdosterone properties. *Climacteric*. 2007; 10 Suppl 1:11-8.

Gennari L, Merlotti D, De Paola V, Calabro A, Becherini L, Martini G, Nuti R. Estrogen receptor gene polymorphisms and the genetics of osteoporosis: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2005; 161: 307–320.

Giummelly P, Lartaud-Idjouadiene I, Marque V, Niederhoffer N, Chillon J-M, Capdevila-Atkinson C, Atkinson J. Effects of aging and antihypertensive treatment on aortic internal diameter in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1999; 34: 207 - 211.

Grady D, Herrington D, Bittner V, Blumenthal R, Davidson M, Hlatky M, et al. Cardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II). *JAMA* 2002; 288:49–57.

Gros R, Ding Q, Liu B, Chorazyczewski J, Feldman RD. Aldosterone mediates its rapid effects in vascular endothelial cells through GPER activation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2013; 304: C532–C540.

Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC. Production and actions of estrogens. *N Engl J Med* 2002; 346:340–352.

Guo X, Lu X, Ren H, Levin ER & Kassab GS. Estrogen modulates the mechanical homeostasis of mouse arterial vessels through nitric oxide. *American Journal of Physiology* 2006; 263: H1788 - H11797.

Guo X, Razandi M, Pedram A, Kassab G & Levin ER. Estrogen induces vascular wall dilation: mediation through kinase signaling to nitric oxide and estrogen receptors α and β . *Journal of Biological Chemistry* 2005; 280: 19704 -19710.

Gurney, E. P., Nachtigall, M. J., Nachtigall, L. E., Naftolin, F. The Women's Health Initiative trial and related studies: 10 years later: a clinician's view. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2014; 142, 4–11.

Halliwell B. Reactive species and antioxidants: Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 2006;141:312-322.

Hammes SR, Levin ER. Extranuclear steroid receptors: nature and actions. *Endocr Rev* 2007; 28: 726-741.

Hasbi A, O'dowd BF, George SR. A G protein-coupled receptor for estrogen: the end of the search? *Mol Interv* 2005; 5:158–161.

Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Strom A, Treuter E, Warner M. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev* 2007; 87:905–931.

Hermesmeyer RK, Mishra RG, Pavcnik D, Uchida B, Axthelm MK, Stanczyk FZ, Burry KA, Illingworth DR, Kaski JC, Nordt FJ. Prevention of coronary hyperreactivity in pre-atherogenic menopausal rhesus monkeys by transdermal progesterone. *Arteriosclerosis Thromb Vasc Biol* 2004; 24:955–961.

Hermesmeyer RK, Thompson TL, Pohost GM, Kaski JC. Cardiovascular effects of medroxyprogesterone acetate and progesterone: a case of mistaken identity? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2008; 5:387–395.

Hernandez I, Delgado JL, Diaz J. 17β -Estradiol prevents oxidative stress and decreases blood pressure in ovariectomized rats. *Am J Physiol* 2000; 279: 1599–1605.

Hernandez Schulman I, Raji L. Salt sensitivity and hypertension after menopause: role of nitric oxide and angiotensin II. *Am J Nephrol*. 2006; 26:170 -180.

Heylen E, Huang A, Sun D, Kaley G. Nitric oxide-mediated dilation of arterioles to intraluminal administration of aldosterone. *J Cardiovasc Pharmacol* 2009; 54(6): 535–542.

Hisamoto K, Bender JR. Vascular cell signaling by membrane estrogen receptors. *Steroids* 2005; 70: 382-387.

Hutchins PM, Darnell AE. Observation of a decreased number of small arterioles in spontaneously hypertensive rats. *Circ Res* 1974; 34/35: 161- 5.

Izumi Y, Matsumoto K, Ozawa Y, Kasamaki Y, Shinndo A, Ohta M, Jumabay M, Nakayama T, Yokoyama E, Shimabukuro H, Kawamura H, Cheng Z, Ma Y, Mahmut M. Effect of age at menopause on blood pressure in postmenopausal women. *Am J Hypertens*. 2007; 20: 1045-1050.

Jiang C, Sarrel PM, Lindsay DC, Poole-Wilson PA, Collins P. Endothelium-independent relation of rabbit coronary artery by 17- β oestradiol *in vitro*. *British Journal of Pharmacology* 1991; 104: 1033-1037

Jiang CW, Sarrel PM, Lindsay DC, Poole-Wilson PA, Collins P. Endothelium-independent relaxation of rabbit coronary artery by 17 beta-oestradiol *in vitro*. *Br J Pharmacol*. 1991; 104: 1033 - 1037.

Judy WV, Watanabe AM, Henry DP, Besch HR Jr, Murphy WR, Hockel GJ. Sympathetic nerve activity: Role in regulation of blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. *Circ Res* 1976; 38: 21- 9.

Karas RH, Gauer EA, Biebe, H, Baur WE, Mendelsohn ME. Growth factor activation of the estrogen receptor in vascular cells occurs via a mitogenactivated protein kinase-independent pathway. *J Clin Invest*. 1998; 101: 851–2861.

Kastner P, Bocquel MT, Turcotte B, Garnier JM, Horwitz KB, Chambon P, Gronemeyer H. Transient expression of human and chicken progesterone receptors does not support alternative translational initiation from a single mRNA as the mechanism generating two receptor isoforms. *J Biol Chem* 1990; 265:12163–12167.

Khalil R.A. Estrogen, Vascular Estrogen Receptor and Hormone Therapy in Postmenopausal Vascular Disease. *Biochem Pharmacol* 2013; 15: 86(12)

Kim JM, Kim TH, Lee HH, M.D, Lee SH, Wang T. Postmenopausal Hypertension and Sodium Sensitivity. *Journal of Menopausal Medicine* 2014; 20(1):1- 6.

Kleppisch T, Nelson MA. ATP-sensitive K⁺ currents in cerebral arterial smooth muscle: pharmacological and hormonal modulation. *Am J Physiol* 1995; 269: H1634-H1640.

Knuuti J, Kalliokoski R, Janatuinen T, Hannukainen J, Kalliokoski KK, Koskenvuo J, et al. Effect of estradiol-drospirenone hormone treatment on myocardial perfusion reserve in postmenopausal women with angina pectoris. *Am J Cardiol* 2007; 99: 1648–52.

Krattenmacher R. Drospirenone: pharmacology and pharmacokinetics of a unique progesterone. *Contraception* 2000; 62:29–38.

Kuhl H. Pharmacology of estrogens and progestogens: influence of different routes of administration. *Climacteric* 2005. 8(Suppl 1):3–63

Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 5925-5930.

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

Langrish JP, Mills NL, Bath LE, Warner PE, Webb DJ, Kelnar CJ, Critchley HOD, Newby DE, Wallace WHB. Cardiovascular effects of physiological and standard sex steroid replacement regimens in premature ovarian failure. *Hypertension*. 2009; 53:805- 811.

Lantin-Hermoso RL, Rosenfeld CR, Yuhanna IS, German Z, Chen Z, Shaul PW. Estrogen acutely stimulates nitric oxide synthase activity in fetal pulmonary artery endothelium. *Am J Physiol*. 1997; 273: L119 - L126.

Laursen JB, Somers M, Kurz S, McCann L, Warnholtz A, Freeman BA, Tarpey M, Fukai T, Harrison DG. Endothelial regulation of vasomotion in ApoE-deficient mice: Implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation* 2001; 103: 1282-1288.

Li L, Hisamoto K, Kim Kh, Haynes Mp, Bauer Pm, Sanjay A, Collinge M, Baron R, Sessa Wc, And Bender Jr. Variant estrogen receptor-c-Src molecular interdependence and c-Src structural requirements for endothelial NO synthase activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 16468-16473.

Liu Y, Terata K, Chai Q, Li H, Kleinman LH, Gutterman DD. Peroxynitrite inhibits Ca²⁺-activated K⁺ channel activity in smooth muscle of human coronary arterioles. *Circ Res* 2002; 91: 1070–1076.

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

Lu NZ, Wardell SE, Burnstein KL, Defranco D, Fuller PJ, Giguere V, Hochberg RB, McKay L, Renoir JM, Weigel NL, Wilson EM, McDonnell DP, Cidlowski JA. International Union of Pharmacology. LXV. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: glucocorticoid, mineralocorticoid, progesterone, and androgen receptors. *Pharmacol Rev* 2006; 58:782–797.

Lundin S, Ricksten SE, Thorén P. Renal sympathetic activity in spontaneously hypertensive rats and normotensive controls, as studied by three different methods. *Acta Physiol Scand* 1984; 120: 265 - 72.

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

Mangal RK, Wiehle RD, Poindexter AN 3rd, Weigel NL. Differential expression of uterine progesterone receptor forms A and B during the menstrual cycle. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1997; 63:195-202.

Maric C, Sandberg K, Hinojosa-Laborde C. Glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis are attenuated with 17beta-estradiol in the aging Dahl salt sensitive rat. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15:1546 –1556.

Maric C, Xu Q, Sandberg K, Hinojosa-Laborde C. Age-related renal disease in female Dahl salt-sensitive rats is attenuated with 17 betaestradiol supplementation by modulating nitric oxide synthase expression. *Gen Med.* 2008;5:147–159.

McCurley A, Pires PW, Bender SB, Aronovitz M, Zhao MJ, Metzger D, et al. Direct regulation of blood pressure by smooth muscle cell mineralocorticoid receptors. *Nat Med* 2012; 18(9): 1429-1433.

McGuire BB, Watson RW, Pérez-Barriocanal F, Fitzpatrick JM, Docherty NG. Gender differences in the reninangiotensin and nitric oxide systems: relevance in the normal and diseased kidney. *Kidney Blood Press Res* 2007; 30: 67- 80.

McNeill AM, Zhang C, Stanczyk FZ, Duckles SP, Krause DN. Estrogen increases endothelial nitric oxide synthase via estrogen receptors in rat cerebral blood vessels, effect preserved after concurrent treatment with medroxyprogesterone acetate or progesterone. *Stroke* 2002; 33: 1685-1691.

Meendering JR, Torgrimson BN, Miller NP, Kaplan PF, Minson CT. A combined oral contraceptive containing 30 mcg ethinyl estradiol and 3.0 mg drospirenone does not impair endothelium-dependent vasodilation. *Contraception* 2010; 82: 366-372.

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

Meyer MR, Fredette NC, Howard TA, Hu C, Ramesh C, Daniel C, Amann K, Arterburn JB, Barton M, Prossnitz ER. G Protein-coupled Estrogen Receptor Protects from Atherosclerosis. *Scientific Reports* 2014; 4:7564.

Meyer MR, Haas E, Barton M. Need for research on estrogen receptor function: importance for postmenopausal hormone therapy and atherosclerosis. *Gen Med* 2008; 5(suppl A):S19–S33.

Meyer MR, Prossnitz ER, Barton M. The G protein-coupled estrogen receptor GPER/GPR30 as a regulator of cardiovascular function. *Vascul Pharmacol* 2011; 55: 17–25.

Michel T, Vanhoutte PM. Cellular signaling and NO production. *Pflugers Arch* 2010; 459(6):807-16.

Miller VM, Li L, Sieck GC. Endothelium-dependent effects of estrogen on vasomotor tone: consequences of non-genomic actions. *Vasc Pharmacol* 2002; 38: 109-113.

Minshall RD, Stanczyk FZ, Miyagawa K, Uchida B, Axthelm M, Novy M, Hermsmeyer K. Ovarian steroid protection against coronary artery hyperreactivity in rhesus monkeys. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:649–659.

Mishra RG, Hermsmeyer RK, Miyagawa K, Sarrel P, Uchida B, Stanczyk FZ, Burry KA, Illingworth DR, Nordt FJ. Medroxyprogesterone acetate and dihydrotestosterone induce coronary hyperreactivity in intact male rhesus monkeys. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:3706–3714.

Miyagawa K, Vidgoff J, Hermsmeyer K. Ca²⁺ release mechanism of primate drug-induced coronary vasospasm. *Am J Physiol* 1997; 272:H2645–H2654.

Moore NL, Hickey TE, Butler LM, Tilley WD. Multiple nuclear receptor signaling pathways mediate the actions of synthetic progestins in target cells. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 357:60–70.

Moraes AN, Gouvêa SA, Gonçalves WLS, et al. Raloxifene reduces blood pressure in hypertensive animals after ovarian hormone deprivation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2011;109(5):334-338.

Moriarty K, Kim KH, Bender JR. Minireview: Estrogen receptor-mediated rapid signaling. *Endocrinology* 2006; 147: 5557–5563.

Moysés MR, Barker LA, Cabral AM. Sex hormone modulation of serotonin induced coronary vasodilation in isolated heart. *Braz J Med Biol Res* 2001; 34: 949-958.

Mueck AO, Seeger H. Effect of hormone therapy on blood pressure in normotensive and hypertensive postmenopausal women. *Maturitas*. 2004; 49:189 - 203.

Muehlfelder M, Arias-Loza PA, Fritzeimer KH, Pelzer T. Both estrogen receptor subtypes, ER α and ER β , prevent aldosterone-induced oxidative stress in VSMC via increased NADPH bioavailability. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 423:850–856.

Nirmala PB, Thampan RV. Ubiquitination of the rat uterine estrogen receptor: dependence on estradiol. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 213: 24 - 31.

Nisenbaum MG, Melo NR, Giribela CRG, Morais TL, Guerra GM, Angelis K, et al. Effects of a contraceptive containing drospirenone and ethinyl estradiol on blood pressure and autonomic tone: A prospective controlled clinical trial. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2014; 175: 62-66.

North American Menopause Society. Estrogen and progestogen use in postmenopausal women: 2010 position statement of The North American Menopause Society. *Menopause* 2010; 17(2):242-55.

Oelkers W, Berger V, Bolik A, Bähr V, Hazard B, Beier S, et al. Dihydrospirorenone, a new progestogen with antimineralocorticoid activity: Effects on ovulation, electrolyte excretion, and the renin-aldosterone system in normal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 73(4): 837-842.

Oelkers W, Schöneshöfer M, Schultze G, et al. Prolonged infusions of Ile5-angiotensin-II in sodium replete and deplete man: effects of aldosterone, ACTH, cortisol, blood pressure and electrolyte balance. *J Clin Endocrinol Metab* 1978; 46:402-13.

Oelkers W. Drospirenone, a progestogen with antimineralocorticoid properties: a short review. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 2171:255-1.

Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jap Circ J* 1963; 27: 282-93.

O'Keefe JH Jr, Kim SC, Hall RR, Cochran VC, Lawhorn SL, McCallister BD. Estrogen replacement therapy after coronary angioplasty in women. *J Am Coll Cardiol* 1997; 29:1–5.

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

Overbeck HW. Vascular responses to cations, osmolality, and angiotensin in renal hypertensive dogs. *Am J Physiol* 1972; 223: 1358-64.

Owman C, Blay P, Nilsson C, Lolait SJ. Cloning of human cDNA encoding a novel heptahelix receptor expressed in Burkitt's lymphoma and widely distributed in brain and peripheral tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 228: 285–292.

Pechere-Bertschi A, Burnier M. Female sex hormones, salt, and blood pressure regulation. *Am J Hypertens*. 2004;17: 994 -1001.

Peng N, Clark J, Wei C, Wyss J. Estrogen depletion increases blood pressure and hypothalamic norepinephrine in middle-aged spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2003; 41:1164 -1167.

Penney LL, Frederick RJ & Parker GW. 17 β -Estradiol stimulation of uterine blood flow in oophorectomized rabbits with complete inhibition of uterine ribonucleic acid synthesis. *Endocrinology* 1981; 109: 1672-1981.

Potts JT, McKeown KP, Shoukas AA. Reduction in arterial compliance alters carotid baroreflex control of cardiac output in a model of hypertension. *Am J Physiol* 1998; 43: H1121- H1131.

Prakash YS, Togaibayeva AA, Kannan MS, Miller VM, Fitzpatrick LA, Sieck GC. Estrogen increases $[Ca^{2+}]$ efflux from female porcine coronary arterial smooth muscle. *Am J Physiol* 1999; 45: H926-H934.

Quayle JM, Bonev AD, Brayden JE, Nelson MT. Pharmacology of ATPsensitive K^+ currents in smooth muscle cells from rabbit mesenteric artery. *Am J Physiol* 1995; 269: C1112-C1118.

Quinkler M, Meyer B, Bumke-Vogt C, Grossmann C, Gruber U, Oelkers W, Diederich S, Bahr V. Agonistic and antagonistic properties of progesterone metabolites at the human mineralocorticoid receptor. *European Journal of Endocrinology* 2002; 146: 789-799.

Reckelhoff JF, Zhang H, Granger JP. Testosterone exacerbates hypertension and reduces pressure-natriuresis in male spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1998; 31:435 - 439.

Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* 2005; 307: 1625–1630.

Revelli A, Massobrio M, Tesarik J. Nongenomic actions of steroid hormones in reproductive tissues. *Endocr Rev* 1998; 19: 3-17.

Rizzoni D, Castellano M, Porteri E, Bettoni G, Muiesan ML, Agabiti-Rosei E. Vascular structural and functional alterations before and after the development of hypertension in SHR. *Am J Hypertens* 1994; 7:193–200.

Rocha R, Chander PN, Khanna K, Zuckerman A, Stier CT Jr. Mineralocorticoid blockade reduces vascular injury in stroke-prone hypertensive rats. *Hypertension* 1998; 31: 451–8.

Rosano GM, Leonardo F, Pagnotta P, Pelliccia F, Panina G, Cerquetani E, della Monica PL, Bonfigli B, Volpe M, Chierchia SL. Acute anti ischemic effect of testosterone in men with coronary artery disease. *Circulation*. 1999; 99:1666–1670.

Rosenkranz K, Hinney A, Ziegler A, Hermann H, Fichter M, Mayer H, Siegfried W, Young JK, Remschmidt H, Hebebrand J. Systematic mutation screening of the estrogen receptor-gene in probands of different weight extremes: identification of several genetic variants. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 4524-4527.

Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, 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* 2002; 288:321–333.

Rylance PB, Brincat M, Lafferty K, De Trafford JC, Brincat S, Parsons V, Studd JW. Natural progesterone and antihypertensive action. *British Medical Journal* 1985; 290:13–14.

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

Santos RL, Abreu GR, Bissoli NS, Moysés MR. Endothelial mediators of 17 β -estradiol-induced coronary vasodilation in the isolated rat heart. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37: 569-575.

Santos RL, Marin EB, Gonçalves WL, Bissoli NS, Abreu GR, Moysés MR. Sex differences in the coronary vasodilation induced by 17 β -oestradiol in the isolated

perfused heart from spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiol* 2010; 200(3): 203 -10.

Schindler AE, Campagnoli C, Druckmann R, Huber J, Pasqualini JR, Schweppe KW, Thijssen JH. Classification and pharmacology of progestins. *Maturitas* 2003; 46(Suppl 1):S7 - 16.

Schmidt P. The 2012 Hormone Therapy Position Statement of The North American Menopause Society. *Menopause* 2012 ; 19(3): 257–271.

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

Simoncini T, Fu X-D, Caruso A, Garibaldi S, Baldacci C, Giretti MS, et al. Drospirenone increases endothelial nitric oxide synthesis via a combined action on progesterone and mineralocorticoid receptors. *Hum Reprod* 2007; 22(8): 2325–2334.

Smiley DA, Khalil RA. Estrogenic compounds, estrogen receptors and vascular cell signaling in the aging blood vessels. *Curr Med Chem* 2009; 16:1863–1887.

Smith NL, Heckbert SR, Lemaitre RN, Reiner AP, Lumley T, Weiss NS, et al. Esterified estrogens and conjugated equine estrogens and the risk of venous thrombosis. *JAMA* 2004; 292:1581–1587.

Soyal SM, Mukherjee A, Lee KY, Li J, Li H, DeMayo FJ, Lydon JP. Cre-mediated recombination in cell lineages that express the progesterone receptor. *Genesis* 2005; 41:58–66.

Staessen J, Bulpitt CJ, Fagard R, Lijnen P, Amery A. The influence of menopause on blood pressure. *J Hum Hypertens* 1989; 3: 427–33.

Staessen J, Bulpitt CJ, Fagard R, Lijnen P, Amery A. The influence of menopause on blood pressure. *J Hum Hypertens*. 1989; 3: 427- 433.

Stanczyk FZ, Hapgood JP, Winer S, Mishell DR Jr. Progestogens Used in Postmenopausal Hormone Therapy: Differences in Their Pharmacological Properties, Intracellular Actions, and Clinical Effects. *Endocrine Reviews* 2013. 34(2): 171–208.

Stanczyk FZ, Henzl MR. Use of the name “Progestin.” *Contraception* 2001; 64:1–2

Stefanick ML. Estrogens and progestins: background and history, trends in use, and guidelines and regimens approved by the US Food and Drug Administration. *Am J Med* 2005; 118(Suppl 12B): 64–73.

Stirone C, Boroujerdi A, Duckles SP, Krause DN. Estrogen receptor activation of phosphoinositide-3 kinase, akt, and nitric oxide signaling in cerebral blood vessels: rapid and long-term effects. *Mol. Pharmacol* 2005; a 67: 105–113.

Strehlow K, Rotter S, Wassmann S, Adam O, Grohé C, Laufs K, et al. Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. *Circ Res* 2003; 93: 70–177.

Sudhir K, Chou TM, Chatterjee K, Smith EP, Williams TC, Kane JP, Malloy MJ, Korach KS, Rubanyi GM. Premature coronary artery disease associated with a disruptive mutation in the estrogen receptor gene in a man. *Circulation* 1997 a; 96: 3774-3777.

Sudhir K, Chou TM, Messina LM, Hutchison SJ, Korach KS, Chatterjee K, Rubanyi GM. Endothelial dysfunction in a man with disruptive mutation in oestrogen-receptor gene. *Lancet* 1997 b; 349:1146-1147.

Tharaux PL, Chatziantoniou C, Casellas D, Fouassier L, Ardaillou R, Dussaule JC. Vascular endothelin-1 gene expression and synthesis and effect on renal type I collagen synthesis and nephroangiosclerosis during nitric oxide synthase inhibition in rats. *Circulation* 1999; 99: 2185-91.

Thomas CJ, Rankin AJ, Head GA, Woods RL. ANP enhances bradycardic reflexes in normotensive but not spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1997; 5: 1126-32.

Thomas P, Pang Y, Filardo EJ, Dong J. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology*. 2005; 146: 624–632.

Thompson AK, Przemska A, Vasilopoulou D, Newens KJ, Williams CM. Combined oral contraceptive pills containing desogestrel or drospirenone enhance large vessel and microvasculature vasodilation in healthy premenopausal women. *Microcirculation* 2011; 18(5): 339–346.

Thorndike EA, Turner AS. In search of an animal model for postmenopausal diseases. *Frontiers in Bioscience*. 1998; 3: c17- c26.

Toran-Allerand CD. Minireview: A plethora of estrogen receptors in the brain: where will it end? *Endocrinology* 2004; 145: 1069-1074.

Trippodo NC, Frohlich ED. Similarities of Genetic (Spontaneous) Hypertension. *Circ Res* 1981; 48: 309 -19.

van Gorp AW, Schenau DS, Hoeks AP, Boudier HA, De Mey JG, Reneman RS. In spontaneously hypertensive rats alterations changes in aortic wall properties precede development of hypertension. *Am J Physiol* 2000; 278: H1241- H1247.

Villa P, Suriano R, Ricciardi L, Tagliaferri V, Cicco S, Franciscis P, Colacurci N, Lanzone A. Low-dose estrogen and drospirenone combination: effects on glycoinsulinemic metabolism and other cardiovascular risk factors in healthy postmenopausal women. *Fertility and Sterility* 2010; 95(1):158-63.

Villa P, Suriano R, Ricciardi L, Tagliaferri V, Cicco S, Franciscis P, et al. Low-dose estrogen and drospirenone combination: Effects on glycoinsulinemic metabolism and other cardiovascular risk factors in healthy postmenopausal women. *Fertil Steril* 2011; 95(1): 158-163.

Wassmann K, Wassmann S, Nickenig G. Progesterone antagonizes the vasoprotective effect of estrogen on antioxidant enzyme expression and function. *Circulation Research* 2005; 11;97(10):1046-54.

Wassmann S, Bäumer AT, Strehlow K, van Eickels M, Grohé C, Ahlbory K, Rösen R, Böhm M, Nickenig G. Endothelial Dysfunction and Oxidative Stress During Estrogen Deficiency in Spontaneously Hypertensive Rats. *Circulation* 2001; 23; 103(3): 435 - 41.

Wellman GC, Bonev AD, Nelson MT & Brayden JE. Gender differences in coronary artery diameter involve estrogen, nitric oxide, and Ca²⁺-dependent K⁺ channels. *Circulation Research* 1996; 79: 1024 -1030.

White RE, Darkow DJ, Lang JL. Estrogen relaxes coronary arteries by opening BKca channels through a cGMPdependent mechanism. *Circulation Research* 1995; 77: 936–42.

White RE. Estrogen and vascular function. *Vascular Pharmacology* 2002; 38:73-80.

White WB, Hanes V, Chauhan V, Pitt B. Effects of a new hormone therapy, drospirenone and 17 β -estradiol in postmenopausal women with hypertension. *Hypertension* 2006; 48: 246-253.

Williams JK, Adams MR, Herrington DM, Clarkson TB. Short-term administration of estrogen and vascular responses of atherosclerotic coronary arteries. *J Am Coll Cardiol* 1992; 20: 452- 457.

Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risk and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women. *JAMA*. 2002; 288: 321 - 368.

Xiao S, Gillespie DG, Baylis C, Jackson EK, Dubey RK. Effects of estradiol and its metabolites on glomerular endothelial nitric oxide synthesis and mesangial cell growth. *Hypertension* 2001; 37: 645 - 650.

Xu X, Xiao J-C, Luo L-F, Wang S, Zhang J-P, Huang J-J, Liu M-L, Liu C-G, Xu K-Q, Li Y-J, Song H-P. Effects of ovariectomy and 17 β -estradiol treatment on the renin-angiotensin system, blood pressure, and endothelial ultrastructure. *Int J Cardiol*. 2008; 130:196–204.

Yamori Y. Development of the spontaneously hypertensive rat (SHR) and of various spontaneous rat models, and their implications. In: De Jong W (ed.). *Experimental and Genetic Models of Hypertension. Handbook of Hypertension*. Elsevier 1984; 224-39.

Yee KM, Struthers AD. Aldosterone blunts the baroreflex response in man. *Clin Sci (Lond)* 1998; 95:687–92.

Zerr-Fouineau M, Chataigneau M, Blot C, Schini-Kerth VB. Progestins overcome inhibition of platelet aggregation by endothelial cells by down-regulating endothelial NO synthase via glucocorticoid receptors. *FASEB J* 2007; 21: 265-273.

Zerr-Fouineau M, Jourdain M, Boesch C, Hecker M, Bronner C, Schini-Kerth VB. Certain progestins prevent the enhancing effect of 17 β -Estradiol on NO-mediated inhibition of platelet aggregation by endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29: 586-593.

Zheng F, Plati AR, Potier M, Schulman Y, Berho M, Banerjee A, Leclercq B, Zisman A, Striker LJ, Striker GE. Resistance to glomerulosclerosis in B6 mice disappears after menopause. *Am J Pathol*. 2003;162:1339 -1348.