

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO E DA TERAPIA  
ESTROGÊNICA SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR DE  
AORTA DE RATAS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSAS  
OVARIECTOMIZADAS: Papel do Sistema Renina-Angiotensina**

**Patrick Wander Endlich**

**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, SETEMBRO DE 2013.**

PATRICK WANDER ENDLICH

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO E DA TERAPIA  
ESTROGÊNICA SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR DE  
AORTA DE RATAS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSAS  
OVARIECTOMIZADAS: Papel do Sistema Renina-Angiotensina**

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gláucia Rodrigues de Abreu

**VITÓRIA-ES**

**2013**

Endlich, Patrick Wander

Efeitos do exercício físico e da terapia estrogênica sobre a reatividade vascular de aorta de ratas espontaneamente hipertensas ovariectomizadas: Papel do Sistema Renina-Angiotensina. Vitória – 2013.  
117 f.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gláucia Rodrigues Abreu

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

1. Hipertensão. 2. Exercício Físico. 3. Terapia Estrogênica

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO E DATERAPIA ESTROGÊNICA  
SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR DE AORTA DE RATAS  
ESPONTANEAMENTE HIPERTENSAS OVARIECTOMIZADAS:  
Papel do Sistema Renina-Angiotensina**

PATRICK WANDER ENDLICH

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

Aprovada em 27 de setembro de 2013.

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Gláucia Rodrigues de Abreu  
Departamento de Ciências Fisiológicas – UFES  
Orientadora

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Nazaré Souza Bissoli  
Departamento de Ciências Fisiológicas – UFES  
Co-orientadora

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Virgínia Soares Lemos  
Departamento de Fisiologia e Biofísica – ICB - UFMG

---

Prof<sup>º</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria José Campagnole dos Santos  
Departamento de Fisiologia e Biofísica – ICB - UFMG

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Ágata Lages Gava  
Departamento de Ciências Fisiológicas – UFES

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**

**Vitória, Setembro de 2013.**

**DEDICO ESTE TRABALHO**

*À minha família, em especial a minha mãe, e a todos que me apoiaram e a contribuíram de alguma forma para a realização desse sonho.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à Deus pelo dom da vida;

À minha família: meu pai, minha irmã e minha mãe, pelo amor incondicional e por ser meu porto seguro, onde eu obtenho todo carinho e atenção possível para vencer qualquer desafio;

À minha orientadora, Gláucia, ao qual hoje tenho orgulho de chamá-la de minha Mestre, pela oportunidade concedida e pela credibilidade inquestionável depositada. Além, de me ensinar muito mais que produzir ciência;

Aos meus grandes e eternos amigos, Rodrigo Galon, Washington Gonçalves, Elisângela Marchesi e Duba Andrade que compartilham comigo das minhas vitórias e me apoiam nas minhas aventuras até as minhas loucuras, mas jamais me abandonam na amargura;

Aos anjos que apareceram na minha vida, quando tudo parecia estar perdido, Profa. Maria José Campagnole, Profa. Adelina Martha dos Reis, Profa. Ivanita Stefanon, Erick Roberto, Rogério Faustino, Leandro Ceotto, Mariza Velten e Augusto Peluso. Compartilho desta vitória de igual forma com cada um de vocês;

À Professora Nazaré Bissoli por sempre me motivar e por despretensiosamente me fazer querer ser “grande”, mas mais do que isso, pela amizade formada ao longo destes anos;

Aos meus incontáveis amigos de laboratório da UFES, UFMG e *Erasmus Medical Center*, pelo companheirismo ao longo destes anos, especialmente, Mariana Borgo, Walckiria Romero, Andressa Bolsoni, Cinthia Helena, Bruno Sevá, Simone Alves, Helena Lima, Edineuza Aparecida, Marta Ramirez, Renata Tiradentes, Paulo, Fabrício, Vinícius, Lázaro Ferreira e Luiz Henrique;

Ao Professor Alexander H Jan Danser, Prof. Anton e especialmente ao Joep Van Esch, pela infinita atenção e pela transmissão do saber;

À Professora Sônia Gouvêa, por me deixar conhecer um “coração” que nenhum livro de Fisiologia me faria entender;

Aos técnicos, especialmente, Enildo, Marilene e Frank (Erasmus), pelo trabalho prestado com tanta competência e compromisso;

Ao Zé pela motivação para que eu enfrentasse esta jornada, ao Marcelo pelo estímulo a perseverar durante os momentos críticos e ao Rafael por ter me ensinado nestes últimos momentos mais que um doutorado poderia fazer;

Ao Marcelo Tcheco que em uma simples atitude me fez enxergar que a bondade está acima de qualquer conhecimento científico;

Ao Fernando, Lau, Luís e a Mel pela atenção e carinho despretensiosos para comigo, nos momentos onde eu parecia poder contar somente comigo mesmo;

Me faltam palavras para agradecer, mas à vocês: meu eterno, obrigado!

*"Nós não fomos capazes de responder a todos os nossos problemas, na verdade, não respondemos completamente a nenhum deles. As respostas que obtivemos serviram apenas para levantar um novo conjunto de questões. De alguma forma, nos sentimos tão confusos quanto antes, mas pensamos que estamos confusos em nível muito mais elevado e sobre coisas mais importantes." (Outdoor da International Business Machines - IBM - nos seus centros de pesquisa).*

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	13
<b>ABSTRACT</b> .....	14
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>1.1 Modelos experimentais de menopausa, hipertensão e hipertensão na menopausa</b> .....	20
<b>1.2 A repercussão do 17-<math>\beta</math>-estradiol sobre o SRA</b> .....	21
1.2.1 Estrogênio.....	21
1.2.2 O Sistema Renina Angiotensina (SRA).....	22
1.2.2 Efeitos vasculares do 17- $\beta$ -estradiol sobre o SRA.....	25
<b>1.3 Papel do 17-<math>\beta</math>-estradiol sobre o Óxido Nítrico (NO)</b> .....	29
1.3.1 Papel do 17- $\beta$ -estradiol sobre o aumento da biodisponibilidade de NO: efeito sobre o sistema anti-oxidante.....	31
<b>1.4 Papel do Exercício Físico sobre o SRA: foco em modelos experimentais de hipertensão e/ou ovariectomizados</b> .....	32
<b>1.5 Papel do Exercício Físico sobre o Óxido Nítrico (NO) e sua biodisponibilidade pelo sistema anti-oxidante</b> .....	36
<b>2 OBJETIVOS</b>	
2.1 – Objetivo Geral.....	39

2.2 – Objetivos Específicos.....	39
----------------------------------	----

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

3.1 – Animais Experimentais.....	41
3.2 – Ovariectomia.....	41
3.3 – Terapia Estrogênica com 17- $\beta$ -Estradiol (TE2).....	42
3.4 – Treinamento Físico.....	42
3.5 – Medida Indireta da Pressão Arterial Sistólica (PAS) por Pletismografia de cauda.....	43
3.6 – Dosagem Plasmática de 17- $\beta$ -estradiol.....	44
3.7 – Reatividade Vasculiar em Anéis de aorta.....	44
3.7.1 Protocolo Experimental.....	45
3.7.1.1 Reatividade vascular em anéis de aorta: Curva Concentração-Resposta de angiotensina II.....	46
3.7.1.2 Reatividade vascular em anéis de aorta: Curva Concentração-Resposta de angiotensina (1-7).....	46
3.8 – Estudo da Expressão Protéica.....	47
3.8.1 <i>Western Blot</i> para detecção da expressão dos receptores AT1, AT2 e Mas, das enzimas mnSOD 2, eNOS e da proteína Akt 1/2/3, assim como, na sua forma fosforilada pAkt 1/2/3 ser 473.....	47
3.8.2 Extração e quantificação de proteínas e preparo das amostras.....	47
3.8.3 Eletroforese e transferência das amostras.....	48
3.8.4 Incubação com Anticorpos.....	49
3.8.5 Detecção das Proteínas.....	49
3.9 – Radioimunoensaio.....	49
3.9.1 Extração de angiotensinas do plasma em colunas Bond Elut - C18.....	49
3.9.2 Radioimunoensaio.....	50
3.9.2.1 Radioimunoensaio para Angiotensina II.....	50
3.10–Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO's).....	52
3.11 – Imunohistoquímica.....	52

3.12 – Tratamento Estatístico.....	53
------------------------------------	----

## **4 RESULTADOS**

4.1 – Eficiência da Ovariectomia.....	55
4.2 – Peso Corporal.....	55
4.3 – Pressão Arterial Sistólica.....	57
4.4 – Níveis Plasmáticos de Angiotensina II.....	58
4.5 – Reatividade em Anéis de Aorta.....	59
4.5.1 – Curva concentração-resposta de Angiotensina II.....	59
4.5.2 – Curva concentração-resposta de Angiotensina-(1-7).....	65
4.6 – Expressão das Proteínas.....	74
4.6.1 – Receptor AT1.....	74
4.6.2 – Receptor AT2.....	75
4.6.3 – Receptor Mas.....	76
4.6.4 – eNOS.....	77
4.6.5 – MSOD2.....	78
4.6.6 – Akt 1/2/3 e pAkt 1/2/3 ser 473.....	79
4.7 – Produção das Espécies Reativas de Oxigênio.....	81
4.4 – Imunohistoquímica.....	81

<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>85</b>
-------------------------	-----------

<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>103</b>
-------------------------	------------

<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>105</b>
---------------------------	------------

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AKT** – Proteína quinase B

**Ang II** – Angiotensina II

**Ang-(1-7)** – Angiotensina-(1-7)

**ANOVA** – Análise de variância

**ANP** – Peptídeo Atrial Natriurético

**ApoE KO** – Deleção gênica para o receptor de apolipoproteína E

**AT1** – Receptor da angiotensina II do tipo 1

**AT2** – Receptor da angiotensina II do tipo 2

**BH<sub>4</sub>** – Tetrahidrobiopterina

**BK<sub>Ca</sub>** – Canal de potássio ativado por cálcio de alta condutância

**CAT** – Catalase

**CMLV** – Células do músculo liso vascular

**DNA** – Ácido desoxirribonucleico

**E2** - 17β-Estradiol

**ECA** – Enzima conversora de angiotensina

**EDHF** – Fator hiperpolarizante derivado do endotélio

**EGF** – Fator de crescimento epidermal

**eNOS** – Isoforma endotelial da enzima óxido nítrico sintase

**EROS** – Espécies reativas de Oxigênio

**ERα** – Receptor de estrogênio alfa

**ERβ** - Receptor de estrogênio beta

**g** – Grama

**GPx** – Glutathione Peroxidase

**H<sub>2</sub>O** – Água

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – Peróxido de hidrogênio

**HERS** - Heart and Estrogens/Progestin Replacement Study

**ICAM** – Molécula de adesão intercelular

**JNK** – Jun N-terminal Kinase

**mg/g** – Miligrama por grama

**mmHg** – Milímetros de mercúrio

**NFκB** – Fator de transcrição nuclear kappa B

**ng** – Nanograma

**NO** – Óxido nítrico

**O<sub>2</sub>** – Oxigênio molecular

**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>** - Ânion superóxido

**OE2** – Grupo ovariectomizado tratado com terapia estrogênica

**OE2+N** – Grupo ovariectomizado tratado com terapia estrogênica+treinamento crônico com natação

**OH<sup>•</sup>** - Radical hidroxil

**ONOO<sup>-</sup>** - Peroxinitrito

**ON** – Grupo treinado cronicamente pela natação

**OVX** – Grupo Ovariectomizado

**PA** – Pressão Arterial

**PAS** - Pressão Arterial Sistólica

**PC** – Peso corporal

**pg/mL** - picogramas por mililitros

**pH** – Potencial hidrogeniônico

**PI3K** – Fosfatidilinositol 3-fosfato quinase

**PU** – Peso uterino

**RL** – Radical livre

**RNA<sub>m</sub>** – Ácido ribonucleico mensageiro

**SERMs** – Moduladores seletivos de receptor de estrogênio

**SHAM** - Grupo submetido submetido à falsa cirurgia

**SHR** – Ratos espontaneamente hipertensos

**SOD-1** – Isoforma citosólica da enzima superóxido dismutase, também presente no espaço intermembranas mitocondrial.

**SOD-2** - Isoforma mitocondrial da enzima superóxido dismutase

**SOD-3** - Isoforma extracelular da enzima superóxido dismutase

**TGF- $\beta$**  – Fator de transformação do crescimento beta

**TNF- $\alpha$**  – Fator de necrose tumoral alfa

**WHI** – Women health initiative

## RESUMO

As doenças cardiovasculares representam as principais causas de morbidade e mortalidade no mundo, inclusive em mulheres no período pós-menopausa. Com a diminuição na produção dos estrógenos, observa-se o aparecimento e a elevação de vários fatores que podem aumentar o risco de desenvolvimento dessas doenças. Dentre esses fatores, o aumento da atividade ou *up regulation* do Sistema Renina-Angiotensina (SRA) tem se destacado como um importante mediador na fisiopatologia de várias doenças, tal qual, a hipertensão. Apesar de vários estudos experimentais relatarem efeitos benéficos da reposição hormonal com estrogênio, especificamente 17 $\beta$ -estradiol (E2), sobre a redução do risco cardiovascular, os resultados de estudos clínicos são inconclusivos. Desta forma, modificações no estilo de vida se fazem necessárias, como a incorporação da prática regular de exercícios físicos. Muitos estudos têm demonstrado que o exercício físico pode influenciar positivamente sobre os principais fatores de risco cardiovascular, inclusive em mulheres na pós-menopausa. O objetivo do presente estudo foi analisar os efeitos do treinamento físico crônico de natação e da terapia estrogênica sobre a reatividade vascular de aorta de ratas espontaneamente hipertensas (SHR) ovariectomizadas com foco na modulação efetuada pelo SRA. Os experimentos foram conduzidos com ratas SHR Sham e ovariectomizadas, as quais foram divididas aleatoriamente em cinco grupos: SHAM (S), ovariectomizadas (OVX), ovariectomizadas+TE2 (OE2), ovariectomizadas+natação (ON) e ovariectomizadas TE2+N (OE2+N). A reposição com E2 foi realizada por meio de injeções s.c. contendo 5  $\mu$ g de 17 $\beta$ -estradiol três vezes por semana. O protocolo de treinamento de natação foi realizado por sessenta minutos diários, de forma contínua, cinco vezes por semana. Tanto a terapia quanto o treinamento tiveram duração de oito semanas. Quarenta e oito horas após a última sessão de treinamento e/ou tratamento, as ratas tiveram a Pressão Arterial Sistólica (PAS) aferida e após sacrificadas, o sangue foi coletado para dosagem de angiotensina II (Ang II). Para o estudo funcional de reatividade de aorta, avaliou-se a resposta vasoconstritora à angiotensina II e vasodilatadora à Ang-(1-7), ainda efetuando bloqueios farmacológicos para elucidar o mecanismo de ação. A avaliação da expressão das proteínas do SRA em aorta foi realizada por Western Blotting. Os resultados encontrados demonstram que, o grupo ON e OE2+N apresentaram aumento nos níveis plasmáticos de Ang II, que não foi acompanhado por aumento na PAS. A ovariectomia causou um aumento da resposta vasoconstritora a Ang II e diminuição da vasodilatação de Ang-(1-7), que foi prevenida pelo exercício físico ou pela sua associação com a TE2. Além disso, o abrandamento da resposta vasoconstritora a Ang II, assim como o aumento da vasodilatação a Ang-(1-7) parece ter ocorrido por um mecanismo envolvendo o receptor AT2 e Mas, que tiveram sua expressão aumentada no grupo ON e OE2+N. No grupo ON a eficiência funcional destes receptores foi auxiliada pelo aumento na capacidade anti-oxidante, efetuada pela superóxido dismutase. Pôde-se concluir que tanto o treinamento físico quanto a reposição com E2 exercem efeitos cardioprotetores, e a prática regular do exercício físico pode ser uma excelente alternativa à terapia estrogênica em mulheres na pós-menopausa, haja vista que a associação da TE2 ao exercício não promoveu efeitos somatórios.

## ABSTRACT

Cardiovascular diseases are the major source of morbidity and mortality in most industrialized countries including in postmenopausal women, period characterized by a decrease in the estrogens production. Renin Angiotensin System (RAS) has been highlighted as a major mediator in the pathophysiology of many diseases, such as hypertension. Experimental and clinical studies showed *upregulation* of RAS after menopause. Although many experimental works report beneficial effects of hormonal replacement with estrogens, mainly 17 $\beta$ -Estradiol (E2), in the reduction of the risk to develop cardiovascular diseases, the results of clinical trials are so far to be conclusive. In this context, lifestyle modifications are necessary as the incorporation of regular physical training. Many studies have appointed that physical training can influence positively on the main cardiovascular risk factors. The aim of this study was to analyze the effects of chronic swimming training and estrogen therapy on vascular reactivity of aorta rings in ovariectomized spontaneously hypertensive rats (SHR) ovariectomized rats and the expression of RAS components in aorta. The animals were divided into five groups as following: Sham (S), Ovariectomized (OVX), ovariectomized treated with E2 (OTE2), ovariectomized+swimming (ON) and ovariectomized treated with E2 plus swimming (OE2+N). E2 replacement was performed by s.c. injection containing 5  $\mu$ g of 17 $\beta$ -Estradiol, three times a week. Swimming training was conducted by sixty minutes daily in a continuous way and five times per week. Both, training and E2 therapy started seven days after ovariectomy and lasted eight weeks. Forty eight hours after the last treatment and/or training session, the animals had the systolic blood pressure measured, then were sacrificed and blood was collected to measure Angiotensin II plasma levels by radioimmunoassay (RIA) and to carry out two different protocols of analysis. For the functional study with aortic rings we evaluated the response to Ang II and Angiotensin-(1-7) and the analysis of RAS proteins expression were made by Western Blotting method, which was performed in aorta artery. The results demonstrated that both exercise and E2 increased Ang II plasma levels. However, the systolic blood pressure was attenuated by treatments. The OVX group showed increase in the constrictor response to Ang II and decrease dilatator response to Ang-(1-7), that was reverted by swimming training or E2 therapy associated to swimming. Moreover, ON and OE2+N groups showed increase in the AT2 and Mas receptor expression. On the other hand, the ON showed increase in the superoxide dismutase (SOD) anti-oxidant enzyme and only the groups treated with E2 showed increase on eNOS expression. Therefore, according to the results of the present study, we conclude that both, swimming training and E2 treatment may play a role in the cardioprotection and the chronic practice of physical exercise can be a feasible alternative in relation to estrogen therapy in post-menopausal women. However, the association between physical exercise and E2 therapy not promotes additional adaptations in the parameters analyzed.

## 1 INTRODUÇÃO

O 17- $\beta$ -estradiol (E2) é um hormônio sintetizado principalmente pelos ovários e está ligado à capacidade de ovulação das mulheres, fenômeno responsável pela reprodução. No entanto, os níveis deste hormônio diminuem significativamente em decorrência da falência ovariana, caracterizando o período denominado menopausa. Para que a menopausa pudesse ser definida de acordo com aspectos biológicos do organismo da mulher e não pela sua idade cronológica, um Workshop realizado nos Estados Unidos da América (EUA) denominado *Stages of Reproductive Aging Workshop (STRAW)* criou uma escala na vida reprodutiva feminina que varia entre -5 e +2, (Butler e Santoro; 2011). Assim, o período pré-menopausa e menopausa, estão respectivamente, na escala -1 e 0, assim como o período pós-menopausa está dividido em +1 e +2, sendo todos estes períodos caracterizados conforme a seguir: (1) Pré-menopausa: na fase de transição tardia da menopausa dois ciclos menstruais não ocorrem e há períodos de mais de 60 dias de amenorréia; (2) Menopausa: amenorréia por mais de 12 meses; (3) Pós-menopausa: este período é dividido em dois, sendo: primeiros cinco anos após a menopausa; e os anos seguintes (Butler e Santoro; 2011). Nos primeiros cinco anos, ocorre a amenorréia, entre outras alterações biológicas marcantes, tais quais, declínio da síntese e secreção dos hormônios ovarianos e diminuição da massa óssea. Nos anos seguintes, conhecido como fase tardia da menopausa, o hormônio folículo estimulante (FSH) permanece elevado, declinando ao longo dos anos (Butler e Santoro; 2011).

Estudos com objetivo de avaliar as alterações hormonais após a menopausa divergem quanto aos seus resultados. Estudo prévio que acompanhou as mulheres nos dez anos seguintes ao fim do período menstrual, não encontrou nenhuma alteração nas concentrações de estrona, sulfato de estrona, dihidroepiandrosterona e FSH em relação à fase que marca o início da menopausa (Jiroutek *et al.*, 1998). No entanto, ocorreu um significativo declínio nas concentrações de estradiol, dihidrotosterona, sulfato de dihidroepiandrosterona e hormônio luteinizante (LH) (Jiroutek *et al.*, 1998).

Entretanto, o *Melbourne Women's Midlife Health Project*, foi o primeiro grande estudo longitudinal que avaliou as alterações hormonais na fase de transição para a menopausa (Burger *et al.*, 2007). E também encontrou diminuição nos níveis de estradiol, assim como em inibina A e B e nenhuma variação significativa de testosterona sérica total e DHEA; além disso, os resultados mostraram um considerável aumento nos níveis de FSH e diminuição nos níveis de testosterona ligada à globulina e androgênio livre (Burger *et al.*, 2007). De igual forma, outro grande estudo longitudinal, mostrou aumento nas concentrações de FSH e hormônio luteinizante após a transição para a menopausa, que foram declinando com o passar dos anos (Rannevik *et al.*, 2008). Os resultados ainda mostraram significativa diminuição nos níveis de E2, androstenediona, globulina ligada aos hormônios sexuais e testosterona (Rannevik *et al.*, 2008). Contudo, estes estudos apresentaram em comum em seus resultados, diminuição significativa de E2 no período de transição entre a perimenopausa e a pós-menopausa.

A diminuição dos estrógenos, particularmente do E2, característica determinante da menopausa é acompanhado de alterações biológicas no organismo feminino, dentre as quais podemos destacar: sintomas vasomotores (fogachos), atrofia urogenital, declínio cognitivo, diminuição da capacidade aeróbia, força muscular e densidade mineral óssea, aumento do peso corporal e o risco de desenvolvimento de doenças crônicas degenerativas, como o diabetes do tipo II, a osteoporose e a doença de Alzheimer (Spritzer e Wender, 2007), além do aumento dos biomarcadores para DAC como a proteína C-reativa, espécies reativas de oxigênio e de citocinas inflamatórias (Reckelhoff, 2006).

Assim, para tratar estes sintomas da menopausa, inúmeras alternativas de tratamento foram surgindo, no qual atualmente destacamos a Terapia de Reposição Hormonal com E2. Historicamente, esta terapia tem seu primeiro relato em 1930, quando o médico pesquisador Doutor Serge Voronoff tentou o transplante de ovários de primatas para mulheres, mas tendo fracassado com esta alternativa, já que as mulheres morriam em decorrência deste procedimento, o pesquisador concluiu que os hormônios ovarianos deveriam

ser sintetizados (Lellouch e Segal, 2001). Anos mais tarde, outro médico, o Doutor Robert Wilson lançou o *best-seller* “Feminine Forever”, no qual a terapia com hormônio sexual feminino sintético era denominada pílula da juventude, criando a promessa para todas as mulheres independente da idade de uma vida sexual segura e satisfatória para toda a vida (Houck, 2003). Entretanto, somente em 1942 foi aprovada pela Food and Drugs Administration (FDA) a primeira preparação para tratamento dos sintomas pós-menopausa.

Apesar do período da menopausa coincidir com um momento em que as mulheres se encontram em idade mais avançada, o qual já se constitui como um fator de risco para doenças cardiovasculares, existem inúmeras evidências na literatura a partir das diferenças entre os gêneros e entre os períodos pré e pós-menopausa estejam relacionados principalmente aos hormônios sexuais, particularmente a privação de estrógenos como um fator de risco cardiovascular. Por exemplo, no período pré-menopausa mulheres apresentam menor incidência de hipertensão quando comparado a homens (Buri *et al.*, 2005). Entretanto, após a menopausa, aumenta a incidência de hipertensão em mulheres, para níveis maiores que os encontrados para homens (Buri *et al.*, 2005). Desta forma, as doenças cardiovasculares tornam-se a principal causa de morte em mulheres na pós-menopausa (Mosca *et al.*, 2006). Ainda podemos notar esta repercussão do E2 sobre o sistema cardiovascular analisando o ciclo menstrual, uma vez que na fase lútea do ciclo menstrual (quando os níveis de estradiol estão altos), ocorre diminuição na pressão arterial comparada a fase folicular (quando os níveis de estradiol estão baixos) (Dunne *et al.*, 1991). Ainda, ocorre diminuição significativa da pressão arterial durante a gestação (Siamopoulos *et al.*, 1996), quando os níveis de estradiol aumentam em torno de 50 a 80 vezes (Kletzky *et al.*, 1980). Por estes motivos, o estradiol passou a ser admitido como um hormônio cardioprotetor, respaldando a importância da terapia de reposição hormonal com E2. De fato, inúmeros estudos clínicos e experimentais conseguiram evidenciar efeitos benéficos deste tratamento. Em 1970 o Nurses Health Study mostrou redução na incidência de doenças cardiovasculares em torno de 35 a 50% em mulheres submetidas à terapia de reposição com E2 (Manson e Martin, 2001). Estudos

experimentais, também encontraram vasodilatação mediada pelo E2 em animais hipertensos (Dantas *et al.*, 2002). Contudo, dois importantes estudos clínicos longitudinais encontraram resultados adversos. O Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study (HERS I e II) demonstrou aumento na incidência de doença cardiovasculares e até mesmo de morte por estas doenças, em mulheres pós-menopausadas com cardiopatia que fizeram a terapia de reposição com estrogênio equino combinado e acetato de medroxiprogesterona (Huley *et al.*, 1998). Outro estudo clínico, Women's Health Initiative (WHI) mostrou que o início da terapia de reposição dez a vinte anos após a menopausa, não resultou em efeito cardioprotetor (Anderson *et al.*, 2004; Rousseau *et al.*, 2002). Contudo, estes estudos tiveram limitações metodológicas que implicam diretamente na interpretação de seus resultados, tais quais: \*inclusão de mulheres utilizando outros fármacos além dos prescritos para a terapia, tais como, beta-bloqueadores e aspirina; \*formulação do estrógeno utilizado (Borelli 2005); \*utilização da terapia em mulheres com doenças cardiovasculares pré-existentes; \*início da terapia 10 anos após início da menopausa (Windler *et al.*, 2007). Atualmente, os pesquisadores vêm sugerindo que os efeitos benéficos da terapia de reposição são maiores quando esta é iniciada nas fases da peri-menopausa, quando comparado a pós-menopausa, sendo denominado de "*timing hypothesis*". De fato, os novos resultados do WHI dão suporte ao *timing hypothesis*, uma vez que as mulheres entre 50 e 59 tiveram maiores benefícios com a terapia quando comparada àquelas que iniciaram dez anos após início da menopausa, já que as alterações morfo-funcionais no sistema cardiovascular durante este período em que o organismo não foi exposto ao E2 não podem mais ser revertidas pela terapia (Rossouw *et al.*, 2007).

Por fim, podemos admitir a partir dos estudos supracitados que o E2 apresenta efeito sobre o sistema cardiovascular e isso pode ocorrer por inúmeros mecanismos, dentre os quais iremos abordar a modulação deste hormônio sobre o Sistema Renina-Angiotensina (SRA). Este sistema é considerado um dos mais importantes para o controle da pressão arterial e volume sanguíneo e parece estar ativado ou submetido a *upregulation* no período pós-menopausa (Schunkert *et al.*, 1997), por sua vez, podendo participar da instalação dos

níveis pressóricos elevados decorrentes da hipertensão no período pós-menopausa. Assim, em seções subsequentes será abordado a relação entre menopausa, SRA e Hipertensão.

#### 1.1 Modelos experimentais de menopausa, hipertensão e hipertensão na menopausa

(a) *Modelo de menopausa*: Pesquisas experimentais buscando elucidar aspectos biológicos da menopausa, somente podem ser realizadas com animais que experimentam a escamação do endométrio, tal qual em mulheres. Assim, primatas seriam o modelo experimental mais adequado para estes estudos (Wu *et al.*, 2005). Contudo, o alto custo, controle de variáveis complexas no estilo de vida e tempo requerido são fatores limitantes em estudos com estes animais (Wu *et al.*, 2005). Por isso, outros modelos experimentais podem ser requeridos, como aves e roedores, sendo estes últimos ratas e camundongos fêmeas (Wu *et al.*, 2005). A maturidade sexual da rata ocorre em torno da sexta semana de vida (Andreollo *et al.*, 2012) e cessam a ovulação em torno de 12 meses de idade, mas continuam a secretar hormônios esteróides pelas gônadas (Nelson, 2008), diferindo do processo de menopausa que ocorre em humanos. Assim, a ovariectomia (OVX) nestes animais tornou-se uma importante ferramenta para mimetizar o processo de menopausa que ocorre em humanos, pois este procedimento acarreta uma diminuição na concentração plasmática de 17- $\beta$ -estradiol pós-cirurgia.

(b) Rato Espontaneamente Hipertenso: dentre os inúmeros modelos experimentais de hipertensão, um dos mais bem estudados é o rato espontaneamente hipertenso (SHR; do inglês *Spontaneously Hypertensive Rat*). Este animal caracteriza-se por apresentar uma fisiopatogenia da hipertensão similar à dos humanos, isto é, a causa da hipertensão é poligênica e caracterizada funcionalmente por aumento na resistência vascular periférica e diminuição no débito cardíaco (Fazan Jr, *et al.*; 2001). O SHR começa a desenvolver a hipertensão na quinta semana de vida, já sendo considerado hipertenso entre a sétima e

décima semana e alcançando um platô pressórico entre a vigésima e vigésima oitava semana. Cabe ressaltar, que não há influência sexual nesse desenvolvimento (Yamori, 1984). Assim, a cirurgia de ovariectomia em fêmeas SHR torna-se um importante procedimento para estudar os efeitos da hipertensão no período pós-menopausa, uma vez que não existe nenhum animal normotenso que desenvolve hipertensão com a idade.

Em ratas SHR a atividade da renina plasmática parece aumentar com o decorrer da idade. E, o tratamento destes animais com losartan, normaliza a pressão arterial (Reckelhoff e Fortepiani; 2004). Assim, a partir destes dados podemos admitir que o SRA aumenta sua atividade no decorrer do tempo e ainda apresenta um importante papel na progressão da doença neste modelo experimental de hipertensão.

De acordo com o exposto anteriormente, podemos afirmar que a ovariectomia em animais SHR torna-se um importante modelo para estudar a repercussão do SRA na hipertensão pós-menopausa.

## 1.2 A repercussão do 17- $\beta$ -estradiol sobre o SRA

### 1.2.1 Estrogênio

Em humanos o hipotálamo secreta o hormônio estimulante de gonadotropina que estimula a hipófise anterior a secretar LH e FSH (Ackerman e Carr; 2002). Em mulheres, o LH estimula as células da Teca nos ovários a sintetizar androstediona, este que então nas células da granulosa é convertido em estrona pela P450 aromatase (Ackerman e Carr; 2002). Por conseguinte, a estrona é convertida em E2, pela enzima 17- $\beta$  dexohidrogenase do tipo I, sendo a expressão desta enzima aumentada por estímulo do FSH (Ackerman e Carr; 2002). Em mulheres no período fértil quase todo o E2 é sintetizado pelos folículos ovarianos (Ackerman GE, Carr BR; 2002). As ações genômicas deste hormônio são mediadas por dois receptores: receptor de estrogênio  $\alpha$  (ER  $\alpha$ , do inglês Estrogen Receptor  $\alpha$ ) e receptor de estrogênio  $\beta$  (ER  $\beta$ , do inglês

Estrogen Receptor  $\beta$ ). A principal função do estrogênio é o crescimento dos tecidos, dos órgãos sexuais femininos e de outros tecidos relacionados com a reprodução (Ackerman e Carr; 2002). No entanto, o E2 apresenta outra importante função de proteção cardiovascular, conforme abordado anteriormente.

### 1.2.2 O Sistema Renina Angiotensina (SRA)

O SRA é considerado o maior regulador da função renal e cardiovascular, por meio de ações diretas sobre o equilíbrio hidroeletrólítico e tônus vascular (Ferreira, Santos; 2005). A via clássica de ativação deste sistema está bem elucidada, na qual a diminuição da concentração de cloreto de sódio sensibiliza as células justaglomerulares dos rins a secretarem a enzima renina, responsável pela clivagem do angiotensinogênio em angiotensina I (Ang I) (Carey e Siragy; 2003). Por conseguinte, a Ang I é catalisada pela enzima conversora de angiotensina (ECA) em angiotensina II (Ang II), este peptídeo pode se ligar aos seus receptores de angiotensina II do tipo 1 (AT1) exercendo importantes efeitos, tais quais, contração do músculo liso vascular, taquicardia, estimulação da secreção de aldosterona e aumento na reabsorção renal de sódio (Carey e Siragy; 2003). Os efeitos pressóricos da Ang II via AT1 pode ocorrer pela ativação de 5 vias diferentes: ativação da fosfolipase  $A_2$ , fosfolipase C, fosfolipase D e canais de  $Ca^{2+}$  do tipo L e inibição da adenilato ciclase (Dinh et al., 2001). O efeito pressórico final pode ser potencializado pela degradação da bradicinina (um agente vasodilatador e natriurético) em seu metabólito inativo, a bradicina (1-7) (Carey e Siragy; 2003).

Nos últimos anos, com a evolução das técnicas de biologia molecular foi possível uma identificação mais complexa do funcionamento do SRA (Ferreira AJ, Santos RAS; 2005). Pôde-se reconhecer a presença de vias alternativas, as quais estão intimamente relacionadas ao processo de vasodilatação, por meio da ligação de Ang II com os receptores de angiotensina II do tipo 2 (AT<sub>2</sub>),

tanto quanto pela metabolização da Ang II em angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)], reação catalisada pela ECA2, no qual este heptapeptídeo desencadeia suas funções por meio do receptor Mas (Ferreira e Santos; 2005).

A Ang-(1-7) pode ser formada a partir da Ang I por meio da neutral-endopeptidase (NEP) ou pela proil-endopeptidase (PEP), ou seja, por vias independentes da ECA (Carey, Siragy; 2003). Contudo, no início do ano 2000, dois grupos de pesquisadores distintos descobriram uma enzima homóloga à ECA, denominada ECA2 (Donoghue *et al*, 2000; Tipnis *et al*, 2000) . Em princípio, acreditava-se que esta enzima tinha uma ação primária na geração da Ang-(1-9) (Donoghue *et al*, 2000). Por conseguinte, demonstrou-se que a eficiência catalítica desta enzima é 400 vezes maior para Ang II, quando comparada a Ang I (Vickers *et al*, 2002). Desta forma, a ECA2 catalisa preferencialmente a Ang II em Ang-(1-7). Este hormônio exerce seus efeitos por meio da ligação com o receptor Mas acoplado à proteína-G, embora existam evidências de que as respostas fisiológicas deste hormônio ocorram por meio da ligação com os receptores de angiotensina II, AT<sub>1</sub> ou AT<sub>2</sub>, uma vez que o bloqueio destes receptores não resulta em respostas fisiológicas mediadas pela Ang-(1-7) (Carey, Siragy; 2003) ou pela interação do receptor Mas com o receptor de bradicinina (BK) (Ferreira, Santos; 2005). Estudo evidenciou que a vasodilatação mediada pela Ang-(1-7) pode ocorrer por meio da ligação com um subtipo de receptor Mas, haja vista, que em anéis de aorta o bloqueio do Mas com A779, promoveu resposta vasodilatadora similar a situação controle (Silva *et al.*, 2007). Além disso, Castro *et al.* (2005) mostraram uma evidência para interação de Ang-(1-7) com os receptores AT1 e AT2. Corações de camundongos foram perfundidos com solução Krebs-Ringer contendo Ang-(1-7), assim como bloqueadores dos receptores de angiotensina II, AT1 e AT2. Os resultados mostraram que na presença de losartan+Ang-(1-7) houve redução significativa na pressão de perfusão coronariana, efeito este revertido pela presença do A779. No entanto, resposta interessante foi encontrada quando na solução contendo Ang-(1-7) foi adicionado bloqueador de AT2, PD123319, resultando em aumento da pressão de perfusão coronariana e não sofrendo alterações com adição de A779 e/ou losartan. A partir destes resultados, os autores concluíram que o bloqueio de

AT1 produz vasodilatação mediada pela interação entre Mas e Ang-(1-7), processo modulado pelo bloqueio de AT2, mostrando assim que as ações de Ang-(1-7) via receptor Mas pode ocorrer por interação com AT1 e AT2 (Castro *et al.*, 2005). No mesmo sentido, em camundongos o agonista do receptor Mas AVE 0991 induziu um efeito antidiurético que foi completamente bloqueado pelo A779 e antagonistas de AT2, assim como estes efeitos foram parcialmente bloqueados pelos antagonistas de AT1 (Pinheiro *et al.*, 2004). Cabe ressaltar, que o efeito anti-hipertensivo do bloqueador de AT1 (losartan) se deve em parte ao aumento nos níveis circulantes de Ang-(1-7) (Iyer *et al.*, 1998; Collister *et al.*, 2003). Por fim, a inativação da Ang-(1-7) ocorre pela sua metabolização em Ang-(1-5), um subproduto metabólico inativo, catalisado pela ECA (Santos e Ferreira; 2007).

A Ang-(1-7) apresenta uma expressão tecidual significativa no coração, rins e vasos sanguíneos (endotélio), tanto em humanos, quanto em animais experimentais (Carey e Siragy; 2003). No coração, este hormônio exerce um efeito cardioprotetor, tais quais, diminuição do remodelamento cardíaco por meio da diminuição de fibrose e hipertrofia, assim como efeito anti-arritmogênico, considerados independentes de alterações pressóricas (Carey e Siragy; 2003). Nos rins, a Ang-(1-7) apresenta efeitos complexos como inibição da fosforilação da *mitogen-activated protein* (MAP) kinase pela Ang II e natriurese (efeito evidenciado *in vitro*) (Santos e Ferreira; 2007). Nos vasos sanguíneos sua ação vasodilatadora ocorre por um mecanismo endotélio-dependente, via fosforilação da eNOS, aumento na síntese de óxido nítrico (NO), aumento nos níveis de prostanóides vasodilatadores, fator hiperpolarizante derivado do endotélio (FHDE) e diminuição da resposta vasoconstritora de Ang II (Carey e Siragy; 2003). Ainda, foi demonstrado que a Ang-(1-7) potencializa o efeito vasodilatador da bradicinina em vários leitões e espécies (Santos, Ferreira; 2007). Desta forma, o eixo vasodilatador ECA2/Ang-(1-7)/Receptor Mas tem sido apresentado como um mecanismo contra-regulatório do eixo vasoconstritor ECA/Ang II/AT<sub>1</sub> (Ferreira e Santos; 2005).

A ligação da Ang II pode ocorrer com os receptores AT<sub>1</sub> ou AT<sub>2</sub>, visto que apresentam 34% de aminoácidos homólogos (Carey e Siragy; 2003). Os receptores AT<sub>2</sub> são expressos em tecido mesenquimal fetal de homens e roedores, mas após nascimento seus níveis diminuem significativamente, sendo encontrado em baixas concentrações nos rins, coração e músculo liso vascular de adultos, razão pela qual se torna difícil a avaliação molecular e funcional destes receptores (Carey e Siragy; 2003). O mecanismo de ativação destes receptores ainda não está completamente esclarecido, embora existam evidências de ocorrer por um mecanismo via proteína G dependente e independente, resultando em respostas nas quais podemos destacar: abertura de canais de K<sup>+</sup> retificador tardio, ativação da fosfolipase A<sub>2</sub>, geração de prostaglandina e estimulação de ceramida, respostas estas que podem ser sustentadas por um longo tempo, já que estes receptores não são passivos do fenômeno de taquifilaxia (Carey e Siragy; 2003). Particularmente, nos vasos sanguíneos os receptores AT<sub>2</sub> promovem vasodilatação por um mecanismo envolvendo bradicinina, NO e GMP<sub>c</sub> (Carey e Siragy; 2003).

Em revisão de Carey e Siragy (2003) foi reportado que os receptores AT<sub>2</sub> causam vasodilatação em situações de administração de drogas antagonistas de AT<sub>1</sub>, em decorrência de maior secreção de renina pelas células justaglomerulares, levando ao aumento da formação de Ang II, que nestas condições, ligam-se aos receptores AT<sub>2</sub> resultando em vasodilatação (Butler, Santoro; 2011). Em contrapartida outro estudo demonstrou em animais normotensos a vasodilatação da Ang II mediada pelos receptores AT<sub>2</sub> tanto na ausência de antagonistas de AT<sub>1</sub> (por meio do CGP-42112A, agonista de AT<sub>2</sub>), quanto na presença destes fármacos (Carey *et al.*, 2001). Resultados similares foram encontrados no leito mesentérico de ratos (Moura *et al.*, 2004), e em artéria coronária de humanos (Batenburg *et al.*, 2004). No entanto, em microartérias coronárias de porcos apesar da expressão dos receptores AT<sub>2</sub> ter sido duas vezes maior que a de AT<sub>1</sub>, a resposta vasomotora da Ang II se mostrou bifásica, apresentando vasoconstrição sob baixas doses e vasodilatação em altas doses (Zhang *et al.*, 2004).

### 1.2.3 Efeitos vasculares do 17- $\beta$ -estradiol sobre o SRA

Está bem estabelecido na literatura que o E2 apresenta um papel cardioprotetor, devendo-se em grande parte à sua modulação sobre o SRA (Dantas *et al.*, 2002). Por sua vez, este sistema tem sua expressão aumentada e está mais ativado na condição de hipertensão, doença que como reportado anteriormente, aumenta a incidência durante a fase da menopausa. Sendo assim, este tópico irá abordar a modulação do E2 sobre o SRA, destacando esses efeitos na hipertensão pós-menopausa.

Analisando a base da via vasoconstritora do SRA, a literatura reporta que o E2 diminui a liberação de renina (Schunkert *et al.*, 1997) e diminui a atividade da ECA plasmática e vascular (Schunkert *et al.*, 1997; Gallagher *et al.*, 1999; Proudler *et al.*, 1995). Por outro lado, aumenta a secreção de angiotensinogênio (Cranes, Harris; 1978), mas causando diminuição nos níveis plasmáticos de Ang II (Schunkert *et al.*, 1997). Além disso, o E2 causa diminuição na expressão do receptor AT1 no músculo liso vascular de ratos (Nickenig *et al.*, 1998; Yung *et al.*, 2011) e diminuição na resposta pressórica de Ang II, haja vista, que camundongos infundidos cronicamente com Ang II tiveram aumento na resposta vasoconstritora deste peptídeo em decorrência da ovariectomia (Xu *et al.*, 2005).

Particularmente na condição de hipertensão, estudo conduzido com ratas hipertensas que apresentam *up regulation* do SRA, mostrou que a Terapia Estrogênica (TE2) diminuiu a concentração plasmática de renina, a atividade da ECA sérica e a concentração plasmática de Ang II (Chapell *et al.*, 2003). Por sua vez, a ovariectomia em ratas hipertensas promoveu aumento na expressão do RNAm do receptor AT1 em aorta, assim como nos rins (Yanes *et al.*, 2010),

efeito revertido pela TE2 (Wassmann *et al.*, 2001). Além disso, o tratamento de ratas stroke-prone SHR com genisteína, um fitoestrógeno, promoveu diminuição na expressão do receptor AT1 em células endoteliais de aorta (Xu *et al.*, 2004). Desta forma, ratas hipertensas submetidas à ovariectomia, apresentam aumento da atividade do eixo vasoconstritor ECA/Ang II/AT1, fato que pode estar associado ao aumento nos níveis pressóricos destes animais. Por outro lado, a TE2 reverte estes efeitos.

Yung e seus colaboradores (2011) buscaram elucidar o mecanismo pelo qual a ovariectomia acarreta disfunção endotelial em ratas normotensas. Assim, os dados mostraram que o grupo ovariectomizado apresentou um prejuízo na vasodilatação mediada pela Acetilcolina (Ach), agente vasodilatador dependente do endotélio, em anéis de aorta torácica. Por conseguinte, a incubação destes vasos, tanto com apocinina (inibidor da NAD(P)H oxidase), quanto losartan (bloqueador de AT1), restaurou este prejuízo, não havendo efeitos adicionais quando associado ambos. Outro bloqueio foi realizado, associando tiron+DETCA (ácido dietilditiocarbamato), respectivamente, um *scavenger* intracelular do ânion superóxido e inibidor da superóxido dismutase (SOD), e foi reestabelecido o relaxamento dependente do endotélio mediado pela Ach. Além disso, o tratamento crônico com enalapril (inibidor da ECA) ou valsartan (bloqueador de AT1) também reverteu este prejuízo. Estes dados funcionais foram acompanhados dos seguintes achados moleculares com o tratamento crônico com valsartan: aumento da eNOS fosforilada no fragmento de serina1177, diminuição na expressão ECA, do receptor AT1, das subunidades gp91phox e p22phox da NAD(P)H oxidase; além de diminuição na geração de espécies reativas de oxigênio e de nitrotirosina (um marcador do estresse oxidativo) (Yung *et al.*, 2011). Estes dados levaram os autores a seguinte conclusão a cerca da repercussão da ovariectomia sobre o SRA em aorta: ocorre o aumento na expressão da ECA, de Ang II, do receptor AT1, na produção das espécies reativas de oxigênio devido ao aumento na expressão e atividade da NAD(P)H oxidase. Ainda, este aumento nas espécies reativas de oxigênio, entre eles o ânion superóxido, promove aumento na formação de

peróxido de nitrito a partir do NO, diminuindo a biodisponibilidade deste importante agente vasodilatador (Yung *et al.*, 2011). Em um estudo prévio conduzido com ratas SHR, mecanismo similar foi evidenciado em ratas SHR, no qual a resposta constritora da Ang II foi aumentada nas ratas ovariectomizadas acompanhado de aumento na expressão do RNAm de AT1, aumento na produção das espécies reativas de oxigênio e diminuição na biodisponibilidade de NO (Wassman *et al.*, 2001). Ademais, o tratamento de ratas SHR pós-menopausada com Vitamina C e E promoveu redução da pressão arterial, suportando efetivo papel do estresse oxidativo em mediar a hipertensão neste período (Fortepiani *et al.*, 2003). Estes estudos nos permitem afirmar, que independente da linhagem, a diminuição dos níveis de estradiol, acarreta na aorta, aumento na expressão e atividade do eixo vasoconstritor do SRA, que irá acarretar aumento nas espécies reativas e oxigênio, diminuindo a biodisponibilidade de NO e aumentando a eficiência constritora de Ang II. Particularmente, fêmeas SHR têm estes efeitos revertidos quando submetidos a TE2.

Outra modulação que pode ocorrer em decorrência do estradiol é sobre o receptor AT2. Por exemplo, estudo reportou que a TE2 em ratas ovariectomizadas aumenta a expressão dos receptores AT2 no rim de ratas ovariectomizadas (Baiardi *et al.*, 2005). Além disso, este estudo evidenciou a presença do receptor AT2 na artéria arqueada somente das fêmeas, mas não de machos (Baiardi *et al.*, 2005). Como abordado anteriormente, a ligação de Ang II com o receptor AT2 promove vasodilatação (Carey, Siragy; 2003), embora esta ação seja contestada por outros pesquisadores que acreditam que AT2 somente contrabalança os efeitos pressóricos deste peptídeo via AT1 (Van Esch *et al.*, 2006). Assim, estudos demonstraram que em ratas a infusão crônica de baixas doses de Ang II promoveu aumento na expressão do receptor AT2 no rim e diminuição da pressão arterial, sendo este efeito perdido quando administrado bloqueador do receptor AT2, PD123319 (Sampson *et al.*, 2008). Por fim, outro estudo mostrou em ratas prenhas (período no qual os níveis de estrogênio aumentam significativamente para que haja a manutenção

da gestação) aumento na expressão de AT2, acompanhado de maior ativação da eNOS e vasodilatação, quando comparada às ratas virgens (Stenett *et al.*, 2009).

Em outro estudo conduzido com ratas prenhas foi encontrado no plasma, aumento na concentração da renina, angiotensinogênio e ECA, fato que não foi acompanhado por aumento plasmático de Ang I, Ang II e Ang-(1-7), apesar do aumento da Ang I e Ang-(1-7) nos rins (Neves *et al.*, 2003). Além disso, as ratas prenhas apresentaram maior vasodilatação à Ang-(1-7) em microartérias de resistência mesentéricas quando comparado às ratas virgens, resultado suprimido pela adição do [D-Ala<sup>7</sup>]-Ang-(1-7), bloqueador do receptor Mas (Neves *et al.*, 2003). Por outro lado, em ratas ovariectomizadas submetidas a TE2 com baixas concentrações de E2, a resposta vasodilatadora a Ang-(1-7) não foi alterada em anéis de aorta. Entretanto, as ratas que receberam alta concentração de estrogênio apresentaram atenuação significativa da resposta vasodilatadora a Ang-(1-7) e da resposta vasoconstritora a Ang II (Grobe e Katovich, 2006). Além disso, Sampson *et al.* (2008) mostraram que ratas apresentam maior expressão no rim da ECA2 quando comparada aos machos de sua espécie e ainda, os hormônios ovarianos, como o E2, parece não modular a expressão de Ang-(1-7) e do receptor Mas no endométrio, haja vista abundância deste peptídeo e receptor em ratas ovariectomizadas comparadas às ratas tratadas com E2 (Vaz-Silva *et al.*, 2012).

### 1.3 Papel do 17-β-estradiol sobre o Óxido Nítrico (NO)

O E2 apresenta importante papel na modulação do crescimento celular vascular, levando a migração e proliferação de células endoteliais e a inibição da migração e proliferação do músculo liso vascular (Geraldes *et al.*, 2002).

Assim, de uma forma indireta, podendo alterar o tônus vascular por intermédio destas ações estruturais sobre o vaso sanguíneo. Ademais, o estrogênio pode alterar o tônus vascular por de meio de suas ações de modulação sobre a síntese/liberação/bioatividade dos Fatores de Relaxamento Derivados do Endotélio (FRDE), como o NO.

Oxido Nítrico (NO, do inglês *Nitric Oxide*)

O NO é um gás endógeno com capacidade de difundir-se facilmente pelas membranas biológicas. O NO liberado pelas células endoteliais trabalha sinergicamente com a prostaciclina para inibir a agregação plaquetária, a fixação de neutrófilos e a expressão de moléculas de adesão (Radomski *et al.*, 1987). O NO em altas concentrações inibe a proliferação do músculo liso vascular (Garg, Assid; 1989). A sua via de biossíntese depende do substrato, L-arginina, que é clivado em NO e L-citrulina, por uma classe de enzimas conhecida como NO sintases, sendo elas: eNOS (endotelial NO sintase), nNOS (neural NO sintase) e a iNOS ou Mt NOS (induzível NO sintase).

A liberação basal do NO no vaso sanguíneo promovido pela eNOS é o fator determinante pelo controle do tônus vascular e da pressão arterial. Além disso, o NO pode ser liberado em resposta ao *shear stress* (estresse de cisalhamento) ou por agentes vasodilatadores causando relaxamento muscular (Munzel *et al.*, 2005).

A ativação completa da eNOS envolve duas fases uma de (a) dissociação e outra de (b) translocação da membrana plasmática, sendo que o estrogênio estimula ambas as fases, respectivamente, (a) via interação com o seu receptor- $\alpha$  e aumentando os níveis intracelulares de inositol 1,4,5-trifosfato

(IP<sub>3</sub>) e (b) via interação com os receptores de estrogênio- $\alpha$  ativando proteína quinase ativada mitogênica (MAPK) e proteína quinase B/Akt, resultando em aumento na liberação de NO pelo endotélio (Orshal e Khalil; 2004). Além disso, como a eNOS é uma isoforma dependente de Cálcio (Ca<sup>2+</sup>) para sua ativação, o estrogênio parece aumentar os níveis intracelulares deste íon, além de promover a interação das proteínas de *shock* 90 com a eNOS, assim recrutando menores quantidades de Ca<sup>2+</sup> para ativação dessa isoforma de NOS (Orshal e Khalil; 2004). Estas são consideradas ações não-genômicas do estrogênio. Além disso, este hormônio tem ações genômicas no endotélio vascular, promovendo aumento da expressão da eNOS (Orshal e Khalil; 2004) e diminuição da proteína de membrana calveolina (Chambliss e Shaul; 2002), que tem o papel de se ligar a eNOS, mantendo-a na sua forma inativa.

Resultados de estudos clínicos e experimentais em situação de pós-menopausa são consistentes com a noção que os estrógenos aumentam a biodisponibilidade de NO, já que a vasodilatação dependente do endotélio, as concentrações plasmáticas de nitrato/nitrito os quais são marcadores da produção de NO, e as respostas vasoconstritoras ao bloqueio agudo da eNOS estão todos aumentados na vasculatura periférica após exposição aos estrógenos (Best *et al.*, 1998; Kawano *et al.*, 1997; Lieberman *et al.*, 1994).

Por fim, podemos destacar que a diminuição da biodisponibilidade de NO pode estar associada à falta de substratos ou co-fatores para eNOS, alterações na sinalização celular de tal forma que a eNOS não esteja devidamente ativada, diminuição da expressão da eNOS e acelerada degradação do NO pelas espécies reativas de oxigênio (Cai e Harrison; 2000). Cabe ressaltar, que este último fator está diretamente associado a maior atividade d SRA, e particularmente, os receptores deste sistema que promovem vasodilatação, AT2 e Mas, tem seus efeitos vasodilatadores intermediados pelo NO, assim o aumento na sua biodisponibilidade determina a eficiência vasodilatadora destes receptores.

### 1.3.1 Papel do 17- $\beta$ -estradiol sobre o aumento da biodisponibilidade de NO: efeito sobre o sistema anti-oxidante

A biodisponibilidade do NO é determinada pelas espécies reativas de oxigênio, principalmente o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), que reage com NO formando peróxido de nitrito ( $ONOO^-$ ) e conseqüentemente diminuindo a biodisponibilidade deste importante fator vasodilatador (Strehlow *et al.* 2003). Assim, a diminuição na formação do ânion superóxido pode ocorrer pelo sistema enzimático, no qual destacamos o papel da superóxido dismutase (SOD). Em mamíferos, três isoformas da SOD foram identificadas: a citoplasmática, que também é encontrada no espaço intermembranas mitocondrial, CuZn-SOD (SOD-1), a mitocondrial Mn-SOD (SOD-2) e a extracelular CuZn-SOD (SOD-3 ou ecSOD). Essas três isoformas catalizam a mesma reação, a dismutação do  $O_2^{\cdot-}$  em  $H_2O_2$ , que posteriormente é convertido em  $H_2O$  e  $O_2$  pelas enzimas, catalase e glutathiona peroxidase (Schneider e Oliveira; 2004).

Neste sentido, os estrógenos podem ainda aumentar indiretamente a biodisponibilidade de NO mediante suas propriedades antioxidantes. Nessa linha, estudos demonstraram que o E2 pode regular a expressão gênica de enzimas antioxidantes. O estudo de Kang *et al.* (2011), mostrou em arteríolas coronarianas que o tratamento com E2 aumentou a expressão da SOD-1, porém, não exerceu qualquer efeito sobre a expressão da catalase. Strehlow *et al.* (2003) demonstraram *in vivo* e *in vitro* que o E2 pode aumentar a expressão proteica e do RNAm das isoformas da enzima superóxido dismutase mitocondrial e extracelular (SOD-2 e 3 respectivamente), além da atividade dessa enzima. Particularmente, estudo conduzido com rata SHR mostrou que a ovariectomia foi seguida de aumento na produção de ânion superóxido nos microvasos do leito mesentérico e a tratamento com a SOD restaurou o

prejuízo na vasodilatação dependente do endotélio diminuída pela ovariectomia (Dantas *et al.*, 2002).

#### 1.4 Papel do Exercício Físico sobre o SRA: foco em modelos experimentais de hipertensão e/ou ovariectomizados

De acordo com o exposto até este tópico, o aumento da incidência de doenças cardiovasculares e por sua vez, o aumento no índice de mortalidade, aumenta nas mulheres no período pós-menopausa. Uma associação entre os níveis diminuídos de E2 na fase pós-menopausa tem sido associado ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, tal qual, a hipertensão, uma vez que este hormônio tem reconhecido papel no controle da pressão arterial. Paralelamente, o organismo feminino passa por uma série de alterações fisiológicas, que podem ser parcialmente ou completamente revertidas pela terapia de reposição hormonal com E2, ao mesmo tempo que, modula a pressão arterial, diminuindo os níveis pressóricos, efeito extremamente importante para mulheres hipertensas. Contudo, a partir de resultados clínicos, especula-se que esta medida de intervenção, possa repercutir negativamente sobre o organismo feminino (Sare *et al*, 2008). Assim, outras medidas devem ser estudadas para que possam se consolidar como uma terapia efetiva para manutenção da integridade física das mulheres nesta fase da vida. Neste sentido, o exercício físico vem se destacando como uma medida não-farmacológica, de baixo ônus e com desconhecidos efeitos adversos relevantes quando bem prescrito, para as mulheres na menopausa. E, especificamente, a cerca destes efeitos sobre o controle da pressão arterial em mulheres hipertensas é que o exercício físico vem ganhando espaço como uma das terapias mais efetivas.

O treinamento aeróbio é recomendado como potente adjuvante no tratamento da hipertensão, pois atenua (mas não normaliza) a pressão arterial em repouso

tanto de animais (Brum *et al.*, 2000; Melo RM *et al.*, 2003; Felix JV e Michelini LC, 2007; Amaral *et al.*, 2000), quanto humanos (Laterza *et al.*, 2007; Cardoso 2010). Ainda, estudo clínico mostrou que a prática regular de exercício físico, acarreta controle no ganho de peso corporal, diminuindo assim o risco de desenvolvimento de hipertensão (Hu *et al.*, 2004).

Estudos experimentais são divergentes no que se refere ao exercício como modulador do controle da pressão arterial em repouso em fêmeas SHR, haja vista, que alguns estudos mostraram diminuição da pressão arterial (Ikeda T *et al.*, 1994; Flues *et al.*, 2010), enquanto outros não foram capazes de mostrar este efeito advindo do treinamento (Amaral *et al.*, 2008; Coimbra *et al.*, 2008). De fato, o exercício consegue modular o SRA, mesmo que não aja repercussão sobre a pressão arterial. A partir deste ponto iremos abordar o papel do exercício físico na modulação do SRA de ratas, no entanto devido à escassez de trabalhos estudando esse assunto, também iremos reportar os efeitos do treinamento em machos.

Durante a prática de exercícios físicos o fluxo sanguíneo passa por um importante redirecionamento do estômago, intestino delgado, intestino grosso, pâncreas e principalmente dos vasos esplânicos e rins, com objetivo de aumentar o fluxo para os músculos esqueléticos metabolicamente ativos (Musch *et al.*, 1987). Neste processo, a Ang II apresenta um importante papel vasoconstritor nestes tecidos metabolicamente menos ativos (Stebbins e Simons, 1995) e mais recentemente foi evidenciado que este efeito também se estende à veia porta (Chies *et al.*, 2010).

O exercício físico crônico também apresenta efeitos sobre o SRA. Filho e colaboradores (2008), encontraram diminuição plasmática de Ang II, tanto em ratos normotensos, quanto hipertensos. Por conseguinte, outro estudo demonstrou em ratos Wistar que o treinamento crônico ou uma única sessão de corrida, promove atenuação da resposta vasoconstritora de Ang II em aorta de ratos em um processo endotélio-independente (Izawa *et al.*, 1995).

A atenuação da resposta vasoconstritora da Ang II mediada pelo exercício físico ocorre por modulação na expressão dos receptores deste hormônio. Sabe-se que a ligação da Ang II com o receptor AT<sub>1</sub> pode ativar a gp91<sup>phox</sup> (ou Nox2), enzima responsável pelo aumento nas espécies reativas de oxigênio, por sua vez resulta em diminuindo da biodisponibilidade de NO (Rush e Aultman, 2008). Em pacientes com doença arterial coronariana o exercício físico promoveu em artéria mamária diminuição na expressão da proteína, assim como do RNA<sub>m</sub> de AT<sub>1</sub> e aumento na expressão do RNA<sub>m</sub> de AT<sub>2</sub>, diminuição da expressão do RNA<sub>m</sub> das glicoproteínas associada ao NAD(P)H oxidase, gp91<sup>phox</sup> (ou Nox 2), Nox 4 (outra enzima homóloga a gp91<sup>phox</sup>, presente em células endoteliais e de músculo liso vascular) e p22<sup>phox</sup> (Adams *et al.*, 2005). Por sua vez, estas alterações moleculares foram acompanhadas de menor produção de espécies reativas de oxigênio, resultando em atenuação da resposta vasoconstritora máxima a Ang II (Adams *et al.*, 2005).

Em machos SHR, o exercício físico de natação afeta diferentemente a atividade das principais enzimas envolvendo o SRA em função da idade. Enquanto em adultos ocorre uma diminuição da atividade ECA e renina plasmática, já em animais jovens observou-se aumento da atividade da renina plasmática (Zamo *et al.*, 2011). Além disso, este trabalho mostrou que o treinamento crônico de diminuiu os níveis plasmáticos de Ang II, repercutindo com diminuição na pressão arterial sistêmica (Zamo *et al.*, 2011). Outro estudo mostrou diminuição da expressão do receptor AT<sub>1</sub>, mas não do receptor AT<sub>2</sub> no rim de ratos SHR treinados cronicamente com natação (Ciampone *et al.*, 2011). No entanto, fêmeas treinadas com protocolo de natação apresentaram aumento na expressão cardíaca de AT<sub>2</sub>, tanto de normotensas (Fernandes *et al.*, 2011), quanto de hipertensas (Shah *et al.*, 2012). Trabalho utilizando animal normotenso mostrou que o exercício físico utilizando protocolo de corrida, promoveu diminuição na expressão do receptor AT<sub>1</sub> e ECA no coração, fatores associados, respectivamente, à menor fibrose cardíaca (Xu *et al.*, 2008).

Em relação aos efeitos do exercício físico sobre o eixo vasodilatador ECA2/Ang-(1-7)/Mas, muito pouco é conhecido, principalmente, quando focamos em fêmeas hipertensas. Assim, Gomes e colaboradores (2008) encontraram aumento na concentração de Ang-(1-7) e do RNAm para o receptor Mas no ventrículo esquerdo de ratos SHR em decorrência do treinamento crônico de natação. Por sua vez, Fernandes *et al.* (2011), buscando elucidar o envolvimento do SRA na hipertrofia cardíaca excêntrica, conduziram um treinamento crônico de natação com ratas normotensas e encontraram alterações nos componentes do eixo clássico do SRA, com significativo aumento na atividade da renina plasmática, da ECA sérica e ventricular. Ademais, houve aumento significativo na atividade da ECA2 do ventrículo esquerdo, seguido de aumento na expressão de Ang-(1-7) (Fernandes *et al.*; 2011). Além disso, em fêmeas hipertensas do modelo 2 rins 1 clipe (2K1C) o treinamento crônico de natação associado a infusão crônica de Ang-(1-7), aumentou a expressão cardíaca do receptor Mas e resultou em diminuição da pressão arterial, além de ter atenuado a hipertrofia cardíaca (Shah *et al.*, 2012). Por fim, outro estudo mostrou que ratos SHR treinados durante 8 semanas com protocolo de natação apresentaram melhoria na vasodilatação dependente do endotélio promovida pela Ang-(1-7) e aumentou a expressão do receptor Mas na artéria aorta (Silva *et al.*, 2011).

### 1.5 Papel do Exercício Físico sobre o Óxido Nítrico (NO) e sua biodisponibilidade pelo sistema anti-oxidante

O exercício físico também é capaz de promover alterações na expressão da eNOS, aumentando a síntese de NO, por sua vez, diminuindo o tônus vascular, efeito extremamente benéfico no controle da hipertensão.

Machos SHR treinados em corrida por 10 semanas apresentaram aumento na resposta vasodilatadora à Ach (fator vasodilatador dependente do NO) em anéis de aorta torácica, efeito que foi abolido após o bloqueio das isoformas da NOS com N<sup>w</sup>-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), assim os autores concluíram que a melhora na reatividade foi decorrente do aumento na síntese de NO (Chen *et al.*, 1996). De igual forma, Graham e Brush (2004) mostraram melhora da vasodilatação à Ach e ainda reportaram que este efeito pode ter sido em decorrência de sua maior biodisponibilidade, visto que houve diminuição na expressão da subunidade da NAD(P)H oxidase, gp91phox sem alteração na expressão das enzimas anti-oxidantes, SOD 1 e 2, assim como da catalase. Ainda, estudo conduzido com machos SHR mostrou que o exercício físico promoveu aumento da biodisponibilidade NO em decorrência da diminuição nas espécies reativas de oxigênio (Bertagnolli *et al.*, 2008). Por fim, uma única sessão de exercício de alta intensidade melhorou a resposta vasodilatadora ao fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1; do inglês *Insulin Growth Factor*) em anéis de aorta (Yang *et al.*, 2011). Por conseguinte, ocorreu aumento na expressão da eNOS neste vaso sanguíneo e o bloqueio das isoformas da NOS por meio da incubação com L-NAME e adição da SOD nos banhos mostrou que a melhora na vasodilatação foi mediada pelo aumento na síntese e biodisponibilidade de NO (Yang *et al.*, 2011).

Especificamente, em fêmeas normotensas, a ovariectomia resultou em prejuízo na vasodilatação dependente do endotélio, efeito que foi revertido pelo terapia estrogênica e pelo exercício de resistência crônico (Figard *et al.*, 2006). Os autores concluíram que um dos mediadores nessa melhora foi o aumento na síntese de NO, ciclooxygenase, Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio (EDHF) e ATPase Cálcio dependente do retículo sarcoplasmático (Figard *et al.*, 2006). Em ratas OVX, o treinamento físico foi capaz de reverter a rigidez arterial, reduzir os níveis vasculares de endotelina-1 e prevenir a diminuição de NO (Park *et al.*, 2008). Por fim, dados de nosso grupo mostraram que em ratas ovariectomizadas o treinamento crônico de natação melhora a vasodilatação à bradicinina em leito coronariano de ratos e ainda aumenta a expressão da

eNOS e catalase (Claudio *et al.*, 2013). De igual forma, esta medida terapêutica (exercício) quando associada à TE2, promove aumento na expressão da SOD-1 (Claudio *et al.*, 2013). Por fim, estudos conduzidos com outros animais experimentais, como porcas, mostrou que o treinamento físico aumenta a expressão da eNOS em artéria braquial e femoral de porcas (Laughlin *et al.*, 2003).

De acordo com o exposto até o presente momento, tanto a hipertensão arterial, quanto a ovariectomia, aumentam a atividade e causam um *up regulation* no SRA. Assim, o presente estudo testou a hipótese, se o exercício físico praticado de maneira crônica, pode prevenir as alterações no eixo vasoconstritor e melhorar a vasodilatação pelo eixo vasodilatador do SRA, refletindo em melhoria na reatividade de artéria aorta de ratas hipertensas ovariectomizadas, da mesma maneira que é observado nos estudos com reposição de E2. Como em estudos com outros modelos relatam que o exercício físico pode atuar melhorando o sistema antioxidante, acreditamos que esse seja um dos possíveis mecanismos envolvidos com essa melhoria da reatividade vascular.

Ademais, analisar as respostas adaptativas ao exercício físico pode contribuir para que esse se justifique como uma importante alternativa terapêutica contra as alterações cardiovasculares que são geradas com a diminuição na produção desses hormônios. Levando em consideração que a expectativa de vida hoje é maior, e que as mulheres passam cerca de um terço de suas vidas nesse período, estudos nessa direção visam colaborar para que essa população envelheça com qualidade de vida.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

O estudo teve como objetivo analisar os efeitos do treinamento crônico de natação e sua associação com a terapia de reposição hormonal com

estrogênio sobre o Sistema Renina-Angiotensina em artéria aorta de ratas hipertensas ovariectomizadas.

## **2.2 Objetivos Especificos**

- (a)** Analisar a pressão arterial de ratas hipertensas ovariectomizadas submetidas ao treinamento crônico de natação e sua associação com a terapia de reposição hormonal com estrogênio;
- (b)** Analisar os níveis plasmáticos de angiotensina-II de ratas hipertensas ovariectomizadas submetidas ao treinamento crônico de natação e sua associação com a terapia de reposição hormonal com estrogênio;
- (c)** Identificar possíveis alterações na reatividade à angiotensina-II em segmentos de aorta de ratas hipertensas ovariectomizadas submetidas ao treinamento crônico de natação e sua associação com a terapia de reposição hormonal com estrogênio;
- (d)** Estudar os mecanismos envolvendo o receptor AT2 com os possíveis efeitos do treinamento físico e/ou terapia de reposição hormonal com estrogênio nas possíveis alterações na reatividade à angiotensina-II em segmentos de aorta de ratas hipertensas ovariectomizadas;
- (e)** Analisar a reatividade à angiotensina-(1-7) em segmentos de aorta de ratas hipertensas ovariectomizadas submetidas ao treinamento crônico de natação e sua associação com a terapia de reposição hormonal com estrogênio;
- (f)** Esclarecer o papel dos receptores AT2 e Mas nas via vasodilatadoras envolvendo à angiotensina-(1-7) em segmentos de aorta de ratas hipertensas ovariectomizadas submetidas ao treinamento crônico de natação e sua associação com a terapia de reposição hormonal com estrogênio;

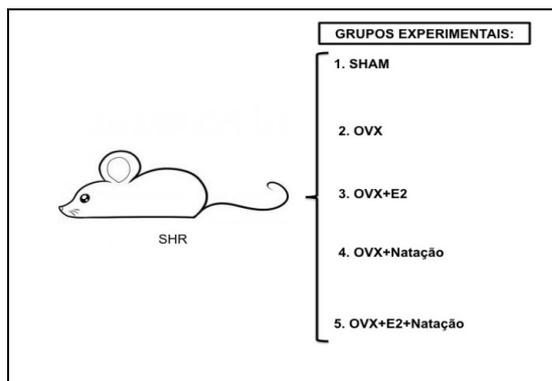
- (g) Analisar a expressão dos receptores do SRA, AT1, AT2 e Mas em segmentos de aorta de ratas hipertensas ovariectomizadas submetidas ao treinamento crônico de natação e sua associação com a terapia de reposição hormonal com estrogênio;
- (h) Analisar a expressão de uma enzima do sistema anti-oxidante, Mn SOD 2, em segmentos de aorta de ratas hipertensas ovariectomizadas submetidas ao treinamento crônico de natação e sua associação com a terapia de reposição hormonal com estrogênio;
- (i) Analisar a produção de espécies reativas de oxigênio na aorta de ratas hipertensas ovariectomizadas submetidas ao treinamento crônico de natação e sua associação com a terapia de reposição hormonal com estrogênio;
- (j) Analisar a expressão de angiotensina-(1-7) na aorta de ratas hipertensas ovariectomizadas submetidas ao treinamento crônico de natação e sua associação com a terapia de reposição hormonal com estrogênio.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais Experimentais**

Para a realização deste trabalho foram utilizadas ratas SHR (do inglês, *Spontaneously Hypertensive Rat*) com dois meses de idade pesando entre 110 e 150g. Os animais foram fornecidos pelo biotério central da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e foram mantidos em gaiolas coletivas com livre acesso à ração (Purina

Labina®, SP, Brasil) e água, sob condições de controle de temperatura (22-24°C) e ciclos claro-escuro de 12 horas. Os procedimentos executados nesta pesquisa foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFES sobre o número de protocolo 001/2010 e em conformidade com o “Guia para o cuidado e uso de animais de laboratório” (*Guide for the care and use of laboratory animals*) publicado pela NIH (National Institutes of Health, revisado em 1996). No momento da cirurgia para a ovariectomia, os animais foram divididos randomicamente nos seguintes grupos: SHAM (S), Ovariectomia (OVX), OVX+ TE2 (OE2), OVX+Natação (ON), e OVX+TE2+Natação (OE2+N) (Figura 1).



**Figura 2.** Esquema da divisão dos grupos experimentais.

### 3.2 Ovariectomia

Após a seleção dos animais para os grupos ovariectomizados, as ratas que foram submetidas à cirurgia de ovariectomia, no qual foram previamente anestesiadas com ketamina (70mg/kg) e xilazina (10mg/kg) e em seguida submetidas à remoção dos ovários, conforme procedimento descrito a seguir: foi feita 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. A cavidade peritoneal foi aberta para remoção dos ovários e ligadura da tuba uterina. Após a retirada dos ovários foi realizada a sutura da musculatura e pele (ZARROW, 1964). O mesmo procedimento foi realizado do lado oposto. O grupo SHAM foi submetido a uma falsa cirurgia, sendo feita uma incisão na pele e nos músculos, os quais foram suturados logo em seguida sem que houvesse a secção entre a tuba uterina e o ovário. Por fim, os animais receberam uma injeção de antibiótico (2,5% de enrofloxacina 0,1mL *i.m.*). Todas as ratas foram submetidas à cirurgia na mesma época e iniciaram o treinamento físico ou TE2 sete dias após o procedimento cirúrgico.

### 3.3 Terapia Estrogênica (TE2) com 17- $\beta$ -Estradiol

A TE2 foi realizada por meio de injeção subcutânea (0,1 mL) contendo 5 $\mu$ g de 3-Benzoato 17- $\beta$ -estradiol (Sigma-aldrich, St Louis, MO) diluído em óleo de milho, três vezes por semana, conforme descrito previamente (Claudio et al. 2013; Saengsirisuwan et al. 2009). A eficiência da ovariectomia e da TE2 foi avaliada pelo peso úmido do útero e sua razão pelo peso corporal, assim como, pelos níveis plasmáticos de 17- $\beta$ -estradiol.

### 3.4 Treinamento Físico

Utilizou-se um aparato para natação de ratos confeccionado em vidro, com as dimensões de: 1,8m de comprimento, 0,6m de largura e 0,7m de altura; dividido em seis raias individuais de 0,3m cada, profundidade de 0,45m. Este aparato conta com um sistema de filtragem e aquecimento, que permite manter a água limpa e com temperatura variando entre 30°C e 32°C (Figura 2). Os animais treinaram cinco dias consecutivos por semana, por um período de 8 semanas. O treinamento foi iniciado com uma fase de adaptação no qual os animais nadaram durante 10 minutos no primeiro dia de treinamento e nos dias seguintes o tempo de treinamento aumentou progressivamente até que os animais pudessem nadar continuamente por 1 hora ao final do quinto dia. A duração e frequência de treinamento foram mantidas até a última sessão de treinamento (Claudio ERG, *et al.* 2013).



**Figura 3.** Aparato de natação utilizado no treinamento dos animais.

Após a última sessão de treinamento, os animais ficaram sem treinamento físico por 48 horas e encerrado este período, foi realizado o procedimento para a medida da pressão arterial.

### **3.5 Medida Indireta da Pressão Arterial Sistólica (PAS) por Pletismografia de cauda**

O registro da pressão arterial dos animais foi feito por meio de um pletismógrafo de cauda (IITC Life Science– 23924 Victory Blvd, Woodland Hills, CA), sistema de mensuração de pressão arterial não invasivo, o qual detecta os pulsos do fluxo arterial através da cauda. A medida indireta da PAS foi realizada de acordo com Buñag (1973) nos grupos controle e tratados, no tempo zero e após 8 semanas de tratamento.

Para mensuração da PAS, as ratas foram acondicionadas em um tubo cilíndrico de acrílico, aquecidos e ventilados de maneira adequada para a realização das medidas. Além disso, a cauda dos animais foi encaixada a um manguito de borracha adaptado à região proximal da cauda e ligado a um esfigmomanômetro para insuflar e desinsuflar automaticamente em intervalos fixos de aproximadamente 50 segundos. Próximo ao manguito acoplou-se um transdutor de pulso (sensor) para captar os sinais a serem enviados e registrados no computador. O registro do experimento só teve início após um período de adaptação dos animais e da estabilização dos sinais de pulso. No registro da pressão sanguínea por pletismografia de cauda ocorre a perda e o retorno dos sinais de pulso e frequência cardíaca durante o processo de insuflação e de desinsuflação do manguito. Diante disso a PAS foi considerada como sendo o primeiro sinal de pulso no retorno do referido sinal. A PAS foi considerada como a média de no mínimo três medidas.

Após a realização deste procedimento, os animais foram sacrificados por decapitação para a coleta dos tecidos que foram utilizados posteriormente nos experimentos de bioquímica. O plasma foi coletado em tubos contendo um coquetel de inibidores sendo: 10 µl Para-Hidroximercurio-benzoato (pOHHgHz) 1mM, 50 µl orto fenantrolina 30mM, 10 µl fenilmetilsulfonil fluorídrico (PMSF) 1mM, 50 µl ácido etilenodinitrilotetra-acético (EDTA) 7,5%, 20 µl pepstatina A

1mM. A aorta torácica foi retirada para realização dos experimentos de reatividade vascular.

### **3.6 Dosagem dos Níveis Plasmáticos de 17- $\beta$ -Estradiol**

Durante a coleta do sangue uma pequena quantidade foi estocada sem inibidores (soro). No entanto, não foi possível coletar o soro desta maneira de todos os animais em decorrência do considerável volume plasmático requerido para a técnica de Radioimunoensaio (RIE), já que a mesma apresenta variações inter-ensaios (devido a radioatividade emitida pelo hormônio marcado com isótopo radioativo) e caso houvesse a necessidade de repetição do procedimento, deve-se utilizar um volume plasmático considerável de cada animal.

A concentração de E2 plasmático foi determinada por enzimaensaio (ELISA), utilizando-se um kit comercial DRG (New Jersey, EUA). O teste se baseia no princípio de ligação competitiva entre o E2 da amostra e o estradiol conjugado com peroxidase (fornecido pelo kit), por uma quantidade constante de anticorpo anti-estradiol de coelho. Os complexos formados são capturados por anticorpos de cabra anti-IgG de coelho impregnado nas cavidades da placa de ensaio. Após o tempo de reação e lavagem, o substrato (14mL tetrametilbenzidina) é adicionado e incubado resultando no desenvolvimento de coloração azul que é inversamente proporcional à concentração plasmática de estradiol.

### **3.7 Reatividade Vascular em Anéis de Aorta**

Após o sacrifício das ratas, a aorta torácica foi removida e imersa em solução de Krebs fria (NaCl 118 mM; KCl 4,7 mM; MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM; CaCl<sub>2</sub> 1,6 mM; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,2 mM; NaHCO<sub>3</sub> 25 mM; glicose 12 mM; pH 7,4 e a 4° C). O tecido conectivo foi então cuidadosamente dissecado, um pequeno anel foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido para posterior análise de *Western Blotting*. A extremidade inferior foi descartada. Por conseguinte, dois fios de aço inoxidável, em forma de triângulos, foram passados através do lúmen dos anéis de forma que ficassem paralelos a luz do vaso. Um fio foi fixado à parede do banho e o outro conectado verticalmente a um transdutor de tensão isométrica. Assim, qualquer alteração do diâmetro do vaso era captada pelo transdutor de força (TSD 125) conectado a um sistema de aquisição de dados (MP 100 Biopac Systems, Inc; Santa Bárbara, CA- EUA) e este a um

computador. Cada banho continha 5ml de solução de Krebs-Henseleit (NaCl 118 mM; KCl 4,7 mM; MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM; CaCl<sub>2</sub> 1,6 mM; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,2 mM; NaHCO<sub>3</sub> 25 mM; glicose 12 mM; pH 7,4 a 37°C) aquecida a 36 ± 0,5 °C, continuamente gaseificada com mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>), mantendo o pH estável em 7,4.

Os anéis foram estabilizados por 30 minutos em uma tensão basal de 1g. Em seguida, foi administrado Cloreto de Potássio (KCl) 75 mM no banho para verificar a atividade contrátil do músculo liso vascular induzida por despolarização. Após atingirem uma variação de um grama de força a partir do valor basal, os anéis foram lavados três vezes com solução de Krebs-Henseleit até retornarem a tensão de repouso. Assim, os anéis que não obtiveram tal contração foram descartados dos procedimentos experimentais. Após 30 minutos de estabilização, uma nova dose de KCl (75 mM) foi adicionada ao banho para a aquisição de uma contração máxima do músculo liso vascular, aferida no período de 30 minutos, tempo necessário para atingir um platô no registro da contração. Por conseguinte, os anéis foram novamente lavados para atingir o valor basal e, depois de 30 minutos foram submetidos à avaliação da integridade funcional do endotélio. A função endotelial foi avaliada através do relaxamento induzido pelo agonista do receptor muscarínico, acetilcolina (ACh). Para tal, os anéis de aorta foram pré-contraídos com fenilefrina 10<sup>-6</sup> M. Uma vez atingido o platô, uma dose única de acetilcolina (10<sup>-5</sup> M) foi aplicada. Foram considerados com endotélio íntegro, os anéis que relaxaram acima de 70%, e os que relaxaram abaixo desse percentual foram descartados.

### **3.7.1 Protocolo Experimental**

Após três ciclos de lavagem e estabilização dos anéis no valor basal, os protocolos experimentais foram iniciados. Ademais, os fármacos foram incubados durante 30 minutos e após este período foi realizada a curva concentração-resposta. É importante ressaltar, que os anéis utilizados para a curva concentração-resposta à Ang II, não foram utilizados para a curva concentração-resposta à Ang-(1-7), ou seja, os anéis montados foram limitados a experimentos somente com um dos dois peptídeos. O receptor AT<sub>1</sub> tem uma sensibilidade muito alta a Ang II, e quando em contato com altas concentrações deste peptídeo, sofre internalização e degradação, fenômeno conhecido como taquifilaxia (Carey e Siragy; 2003). Portanto, este procedimento foi adotado, haja vista, que os receptores do SRA apresentam interação no desencadeamento de suas respostas.

### 3.7.1.1 Reatividade vascular em anéis de aorta: Curva Concentração-Resposta de angiotensina II

Foi construída uma curva concentração-resposta à angiotensina II ( $10^{-11}$  a  $10^{-6}$ M) e a avaliação da função contrátil a este agente vasoconstritor em quatro diferentes situações:

- (a) **Controle**, ou seja, a reatividade foi testada somente com a incubação de Ang II;
- (b) Inibição da enzima óxido nítrico sintase (NOS) por meio da incubação com um inibidor não-seletivo, o **N<sup>w</sup>-nitro-L-arginina metil éster** (L-NAME,  $10^{-4}$ M), permitindo analisar o papel do NO durante o processo de vasoconstricção da Ang II;
- (c) Avaliação do papel dos receptores AT2, mediante a incubação com o **PD 123319** ( $10^{-6}$ M), antagonista do receptor AT2;
- (d) Incubação com **Losartan** ( $10^{-6}$ M), antagonista do receptor AT1. Este bloqueio foi realizado para nos certificarmos que as respostas constritoras da Ang II foram mediadas via AT1.

### 3.7.1.2 Reatividade vascular de anéis de aorta: Curva Concentração-Resposta à Angiotensina (1-7)

Foi realizada uma curva concentração-resposta à Ang-(1-7) ( $10^{-11}$ M e  $10^{-6}$ M) nas seguintes condições:

- (a) **Controle**, ou seja, a reatividade foi testada somente com a incubação de Ang-(1-7);
- (b) Incubação com **L-NAME** ( $10^{-4}$ M), para analisar o NO como mediador da resposta vasodilatadora da Ang-(1-7);
- (c) Incubação com **A779** (10  $\mu$ M), para analisar a especificidade da resposta vasodilatadora de Ang-(1-7) sobre o receptor Mas;
- (d) Incubação com **PD 123319** ( $10^{-6}$ M), permitindo avaliar uma possível interação (*cross-talk*) entre os receptores Mas e o receptor AT2 na resposta vasodilatadora à

Ang-(1-7).

Ao final dos experimentos com Ang-(1-7), o relaxamento independente do endotélio foi testado com uma dose de Nitroprussiato de Sódio (10-4M).

### **3.8 Estudo da Expressão Protéica**

#### **3.8.1 *Western Blot* para detecção da expressão dos receptores AT1, AT2 e Mas, das enzimas mnSOD 2, eNOS e da proteína Akt 1/2/3, assim como, na sua forma fosforilada pAkt 1/2/3 ser 473**

A técnica de *Western Blotting* foi utilizada para determinar a influência do treinamento físico de natação e/ou TE2 por 8 semanas sobre a expressão dos receptores AT1, AT2 e Mas, assim como nas enzimas, superóxido dismutase 2 (Mn SOD2), Akt 1/2/3 e sua forma fosforilada na serina 473 e da isoforma endotelial da óxido nítrico sintase (eNOS) em segmentos de aorta torácica de ratas espontaneamente hipertensas ovariectomizadas. A expressão de todas as proteínas foram realizadas em condições basais, ou seja, os segmentos da aorta torácica foram coletados aproximadamente 60 horas após o último dia de tratamento e conservados até o dia do experimento à - 80°C.

#### **3.8.2 Extração e quantificação de proteínas e preparo das amostras**

A homogeneização dos segmentos arteriais congelados foram realizados em tubos plásticos contendo esferas de cerâmica (Precellys lysing kit – CK28, Montigny - França) e tampão de lise (1% de Nonidet P40, 0,5% de Deoxicolato de Sódio, 0,1% de SDS, pH igual a 7,2 ). Por conseguinte, foi adicionada uma pílula contendo inibidores de proteases e EDTA (Complete Mini, Roche Diagnostics – Alemanha) para cada 10 mL de tampão de lise, Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub> 1M e NaF 5M na proporção 1mL/100mg. Os tubos foram centrifugados por 40 segundos a uma velocidade de 6500 rpm, passados em ultrassom e em seguida centrifugados (Eppendorf-Neitheier- Hinz GmbH 22331, Alemanha) durante 20 minutos, 14000 rpm a 4°C. O *pellet* formado foi descartado e a concentração protéica do sobrenadante foi então quantificado pelo método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando-se espectrofotômetro com absorvância de 595 nm. Comparou-se a concentração proteica das amostras com curva de solução de albumina (BSA), em concentrações conhecidas, coradas com *Comassie Blue*. A leitura da curva e de todas as amostras foi feita em triplicata.

Preparou-se alíquotas contendo o volume necessário para uma carga de 30 µg de proteína para o receptor AT1, Akt 1/2/3 e pAkt ser 473, 40 µg para o receptor AT2, Mn SOD 2 e eNOS e 50 µg para o receptor Mas, além do tampão de amostra (Lammeli 5X) (4 mL de Tris-HCl 1,5M pH 6.8, 10 mL de glicerol, 5 mL de β-mercaptoetanol, 2 g de SDS, 1mL de 1% azul de bromofenol). Cabe ressaltar, que o experimento para o receptor Mas, foi feito utilizando 50 µg de testículo de rato como controle positivo. Todas as alíquotas foram padronizadas para um volume final de 15 µL completando o volume de cada uma com água Milli-Q, quando necessário. As amostras depois de preparadas foram aquecidas a 95°C durante 5 minutos em termomixer (Eppendorf-Neitheier- Hinz GmbH 22331, Alemanha).

### 3.8.3 Eletroforese e transferência das amostras

As amostras foram carregadas em géis de SDS-poliacrilamida 4% (0,5 M Tris HCl pH:6,8, acrilamida 40%, SDS 10%, APS 10% e Temed) e 10% (1,5 M Tris HCl pH: 8.8, acrilamida 40%, 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) e submetidas a uma corrente constante de 100V por aproximadamente 2 horas para separar as proteínas pelo peso molecular (PowerPac™ HC, BioRad, CA, Estados Unidos da América, EUA). Após o término da eletroforese, foi feita a transferência elétrica das proteínas para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) por meio de nova eletroforese. Para isso, o gel, a membrana e o papel Whatman foram montados em um sistema de sanduíche banhados por uma solução tampão de transferência que foi mantida em aproximadamente 4°C durante todo processo de transferência (Tris 25mM, glicina 190mM, e Metanol 20%), (Trans-Blot SD Cell Bio-Rad, EUA) com corrente constante de 100 V por 2 horas.

[AP1] Comentário: O sistema de transferência é molhado!

### 3.8.4 Incubação com Anticorpos

Ao final da transferência, as membranas foram incubadas por 2 horas, à temperatura ambiente, com solução de bloqueio (leite desnatado 5% em TBS-T (Tris HCl 10 mM, NaCl 100mM e Tween 20 à 0,1%, pH 7,6), para evitar ligações inespecíficas com reativos não imunológicos. Em seguida, as membranas foram incubadas durante toda a noite à 4°C, sob agitação, em TBS-T adicionado mais os seguintes anticorpos primários: AT1 (Millipore, Billerica, MA, EUA - Diluição 1:1000), AT2 (Millipore, Billerica, MA, EUA – Diluição 1:500), Mas (Alomone, Jerusalem, Israel – Diluição

1:300), Akt-t (ABCAM, Cambridge, MA, EUA - Diluição 1:1000), p-Akt Ser473 (ABCAM, Cambridge, MA, EUA – Diluição 1:500), Mn SOD 2 (Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA – Diluição 1:1000) e eNOS (BD, New Jersey, EUA – Diluição: 1:1000) e  $\beta$ -actina (1:5000, Sigma Chemical, CO, St Louis, EUA). Depois disso, as membranas foram lavadas três vezes, sob agitação, com solução TBS-T para remoção do excesso de anticorpo primário e possível ligação inespecífica. A solução de TBS-T foi trocada a cada 10 minutos. Posteriormente as membranas foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente com anticorpo secundário fluorescente 9li-cor, Estados Unidos), imunoglobulina IgG anti-camundongo ou coelho, de acordo com as especificações do animal onde foi produzido o anticorpo primário.

### **3.8.5 Detecção das Proteínas**

A detecção das proteínas foi realizada por meio de um sistema de *scanner* de fluorescência (Odyssey – Li-cor, Estados Unidos) de acordo com o comprimento de onda do anticorpo secundário, por meio do *software* Odyssey. A intensidade de fluorescência foi quantificada por densitometria (*software* Odyssey) e normalizada pelo controle endógeno  $\beta$ -actina ou proteína total no caso da proteína fosforilada.

## **3.9 Radioimunoensaio (RIE)**

### **3.9.1 Extração de angiotensinas do plasma em colunas Bond Elut - C18**

Para obter as angiotensinas do plasma e tecido utilizou-se a extração em colunas Bond Elut. As colunas foram pré-ativadas com 10 ml de ACN 99,9%/HFBA 0,1% e 10 ml de HFBA 0,1%. Com uma seringa aplicou-se pressão na coluna para que o líquido passasse por ela. Após pré-ativação, as colunas foram ativadas usando-se: 10 ml de ACN 99,9%/HFBA 0,1%, 10 ml de HFBA 0,1%, 3 ml de BSA 0,1%/HFBA 0,1%, 10 ml de ACN 10%/HFBA 0,1%, 3 ml de HFBA 0,1%. Após ativação da coluna as amostras foram aplicadas, seguindo-se de lavagem sequencial com 20 ml de HFBA 0,1% e 3 ml de ACN 20%/HFBA 0,1%. Os peptídeos foram eluídos com 3 ml de ACN 99,9%/HFBA 0,1% em tubos de polietileno lavados com BSA 0,1%. As amostras de plasma antes de serem aplicadas na coluna, foram centrifugadas por 20 min/2.500 rpm/4° C. As amostras foram secas em centrífuga evaporadora por 10-12 horas e após, foram congeladas até o radioimunoensaio (RIE).

### **3.9.2 Radioimunoensaio**

Foram coletadas amostras de sangue e tecido para realização de radioimunoensaio (RIE) para dosagens de angiotensina II – Ang II. Os ensaios foram realizados de acordo com os protocolos adotados pelo Laboratório de Hipertensão do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas – UFMG (Botelho e cols, 1994).

### **3.9.2.1 Radioimunoensaio para Angiotensina II**

Para obtenção dos valores de Ang II por radioimunoensaio foram utilizadas as seguintes soluções:

I - Tampão do ensaio: Tris-HCl 0,1 M, EDTA 15 mM e lysozima 0,1%. Os reagentes foram dissolvidos em 400 ml de água deionizada. O pH foi acertado para 7,4 com HCl 3 N e o volume completado para 500 ml em balão volumétrico com água deionizada.

II - Tampão II: NaCl 0,9%, BSA 0,1%, Ácido acético 0,03% . Os reagentes foram dissolvidos em 400 ml de água deionizada e o volume acertado em balão volumétrico. Essa solução foi usada para reconstituição das amostras e diluição da curva padrão.

III - Anticorpo policlonal (1:250.000): Preparado a partir de uma solução estoque com título 1:50.000 em tampão do ensaio. Este anticorpo foi novamente diluído em tampão do ensaio para obter uma solução final na diluição de 1:250.000. Este anticorpo apresenta menos que 0,001% de reatividade cruzada com Ang I e Ang-(1-7), 0,002% de reatividade cruzada com Ang-(1-9) e 100% de reatividade cruzada com Ang-(2-8), Ang-(3-8) e Ang-(4-8).

IV - <sup>125</sup>I Ang II: marcada, purificada e diluída em tampão do ensaio para uma concentração final de 6000 cpm para cada 0,1 ml.

V - Curva padrão: As concentrações dos padrões utilizados foram de 80, 40, 20, 10, 5 e 2,5 pg/0,2 ml diluídos em tampão II, utilizando-se balão volumétrico preparadas a partir de uma solução estoque de 2 mg/ml.

VI - Suspensão de Carvão: A separação do peptídeo ligado ao anticorpo do peptídeo livre foi feita pela adição de solução de carvão ativado-dextran ao final da incubação 18-22 horas. O carvão ativado e o dextran foram dissolvidos em tampão Tris, pH 7,4.

A suspensão foi mantida sob agitação constante, em banho de gelo, por 1 hora antes do uso.

#### VII – Técnica

Cada ensaio seguiu o seguinte protocolo

**Tabela 1** - Soluções e volumes utilizados para RIE de Ang II.

Soluções (µl)	Total	Branco	Po	Padrão	Amostra
Tampão do ensaio	1.100	100	-	-	-
Tampão II	200	200	200	-	100
Pontos da curva	-	-	-	200	-
Amostra	-	-	-	-	100
<sup>125</sup> I Ang II	100	100	100	100	100
Anticorpo	-	-	100	100	100
Volume final	1400	400	400	400	400

PO – Valor de referência; <sup>125</sup>I Ang II – Ang II radiodada.

Após a adição das respectivas soluções nos tubos eles foram agitados em vórtex e incubados por 18-22 horas. Após a incubação foi adicionado 1 ml de suspensão de carvão em todos os tubos, exceto no tubo total, centrifugados a 4°C em 2.500 rpm por 20 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e contado no contador gama.

### 3.10 Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO's)

Para os procedimentos de imunohistoquímica e imunofluorescência, apenas dois animais de cada grupo tiveram sua artéria aorta torácica coletadas e congeladas a -80°C para análise descritiva dos achados, já que o remanescente das artérias de cada grupo foram utilizados na técnica de *western blotting*. Esta limitação no número de experimentos foi feita em decorrência da limitação no número de animais disponíveis para realização de experimentos conforme previamente aprovado pelo comitê de ética.

No momento da análise, as aortas foram emblocadas em Tissue Teck e foram feitos cortes de 8µm de espessura com auxílio de um micrótomo-criostato. Os cortes foram gentilmente posicionados sobre lâminas de vidro superfrost Plus®. Em seguida, as lâminas foram colocadas em estufa por 2 horas a 37°C e os cortes incubados com solução de dihidroetidina (2 µM) diluído em Krebs-HEPES pH 7,4 a 37°C por 30 minutos na ausência de luz. Ao final do período de incubação, as lâminas foram lavadas com solução salina tamponada (PBS) e mantidas à temperatura de 4°C. As imagens foram adquiridas em microscópio de fluorescência (Nikon Ti-S, EUA) equipado com filtro de comprimento de onda de 585nm (G-2E/C; Nikon, EUA) e câmera digital (Ds-Ri1; Nikon, EUA), e os dados analisados utilizando o *software* NIS Elements (Nikon).

### 3.11 Imunohistoquímica

O procedimento de imunohistoquímica foi feito para analisarmos a expressão da Ang-(1-7) na parede da artéria aorta. No entanto, o resultado deste experimento será descrito somente qualitativamente. Contudo, nos permite sugerir o que poderia acontecer *in vivo* com estes grupos de animais estudados, baseado nas curvas de concentração-resposta com Ang-(1-7) em anéis de aorta torácica.

Cortes de 8 µm foram feitos e então secos em temperatura ambiente por 1 hora. Em seguida os mesmos foram imersos em acetona fria (-20°C) em um agitador por 5 minutos. As lâminas foram deixadas expostas ao ar para a secagem por 30 minutos e depois incubada por 30 minutos com uma solução de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%). Após a lavagem em tampão TBS (PBS + Tween 20 a 10%) durante 15 minutos trocando a solução a cada 5 minutos, as lâminas foram escoadas e incubadas com uma solução de bloqueio BSA 5% (PBS + albumina bovina 5%) por 60 minutos. Escoada esta solução, foi então aplicado o anticorpo primário para a Angiotensina (1-7) em uma concentração de 1:500, diluída em BSA 1% (PBS + albumina bovina 1%). Os cortes foram então incubados durante a noite em uma câmara fechada e umedecida. No dia posterior, as lâminas foram lavadas em TBS durante 30 minutos, sendo a solução trocada a cada 5 minutos, logo após foram expostas por 70 minutos ao anticorpo secundário biotilado (Envision Plus – DAKO). Novamente lavadas em TBS, os cortes foram incubados por 70 minutos com solução de streptavidina (Envision Plus – DAKO). Depois de lavadas mais uma vez em TBS, as lâminas foram expostas ao DAB (Liquid DAB, Dako, EUA) por aproximadamente 5 minutos para revelar a marcação. Por conseguinte, lavadas em água destilada duas vezes, foram

então procedidas às etapas para a montagem permanente com as lâminas sendo: coloração com hematoxilina (10 segundos) e após lavar as lâminas em água amoniacal por 5 segundos e em seguida lavar em água corrente por 5 minutos. Por fim, as lâminas foram secas e fixadas permanentemente com Entellan. Após a secagem, as imagens foram adquiridas em um microscópio (Olimpus bx43) acoplado a uma câmera (Olimpus Q Color 5) e a um computador através do software Image Pro Plus (versão 7.0).

### **3.12 Tratamento Estatístico**

Os resultados foram expressos como Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (EPM). Os valores de  $n$  significam o número de animais utilizados em cada grupo experimental.

Os resultados de reatividade vascular das curvas concentração-resposta de contração foram expressos como delta da tensão isométrica em gramas (tensão desenvolvida à concentração aplicada menos a tensão basal). As respostas de relaxamento, evocadas pela Ang-(1-7) e nitroprussiato de sódio, respectivamente, foram expressas em porcentagem de relaxamento em relação à pré-contração obtida pela fenilefrina.

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

Com a finalidade de comparar a magnitude de efeito dos fármacos sobre a resposta contrátil à Ang II e de relaxamento a Ang-(1-7) dos grupos estudados, alguns resultados foram expressos como diferenças das áreas abaixo das curvas (dAUC) de concentração-resposta. A dAUC foi calculada para cada curva concentração-resposta e a diferença está expressa como porcentagem da diferença da AUC (dAUC%) da curva controle correspondente.

Os resultados da expressão protéica são apresentados como relação entre a densidade óptica para a proteína de interesse em relação a  $\beta$ -actina. Já os resultados

da expressão protéica da Akt 1/2/3 estão expressos como a razão entre p-Akt/Akt 1/2/3.

A análise estatística dos resultados foi realizada por análise de variância (ANOVA), de uma via completamente randomizada (fator: tratamento) e duas vias para medidas repetidas (início e fim do tratamento) ou completamente randomizada (fator 1: tratamento e fator 2: concentração da dose). Quando ANOVA apresentou significância estatística foi realizado o *post-hoc* de Tukey (em decorrência do  $n$  diferente nos diferentes grupos) e Fisher para os dados referentes ao estradiol plasmático, utilizando-se GraphPad Prism Software (San Diego, CA, EUA). Os resultados foram considerados estatisticamente significantes para valores de  $p < 0,05$ .

## **4. RESULTADOS**

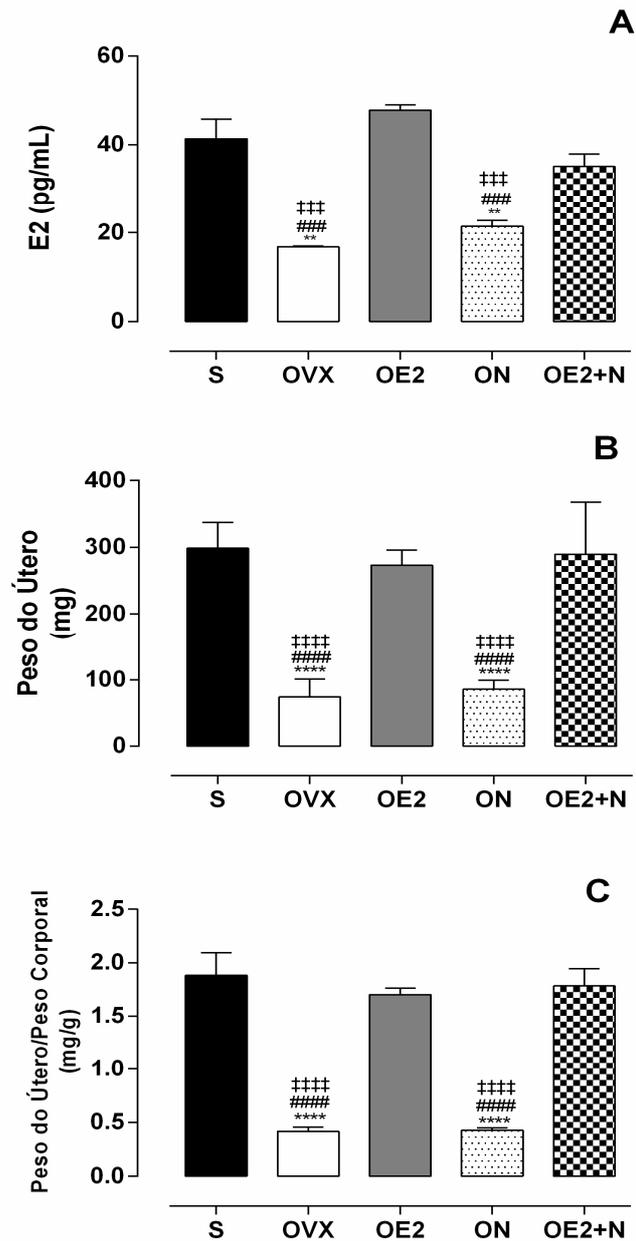
### **4.1 Eficiência da Ovariectomia**

Para avaliar a eficiência da ovariectomia foi analisada a concentração plasmática de 17- $\beta$ -estradiol, o peso do útero e a razão entre o peso do útero e peso corporal. Assim, conforme esperado, os animais pertencentes ao grupo OVX e ON apresentaram níveis plasmáticos de E2 significativamente menor que o grupo S. De igual forma, a

diminuição nos níveis do E2 foi prevenida nos grupos de animais ovariectomizados que receberam a TE2 (OE2 e OE2+N) (S:  $41,37 \pm 7,69$ ; OVX:  $16,81 \pm 0,27$ ; OE2:  $47,8 \pm 2,1$ ; ON:  $21,4 \pm 2,79$ ; OE2+N:  $35,07 \pm 4,91$  pg/mL); Figura 4A). Em consonância com estes dados de níveis hormonais, houve uma diminuição significativa no peso do útero, assim como no peso do útero corrigido pelo peso corporal no grupo OVX e ON, e ainda este efeito foi prevenido por meio da TE2 ou pela integridade dos ovários, respectivamente, nos grupos OE2, OE2+N e S (Peso do útero, S:  $298,8 \pm 36,68$ ; OVX:  $74,11 \pm 10,07$ ; OE2:  $273,1 \pm 7,66$ ; ON:  $85,86 \pm 5,08$ ; OE2+N:  $289,8 \pm 25,92$  mg; Peso do útero/Peso Corporal, S:  $1,88 \pm 0,21$ ; OVX:  $0,41 \pm 0,04$ ; OE2:  $1,7 \pm 0,05$ ; ON:  $0,42 \pm 0,02$ ; OE2+N:  $1,78 \pm 0,16$  mg/g; respectivamente, Figura 4 B e C).

#### **4.2 Peso Corporal**

Os grupos não apresentaram diferença estatisticamente significativa do peso corporal antes do início do tratamento (Tabela 2). No entanto, ao final do tratamento o grupo OVX apresentou maior peso corporal quando comparado aos grupos S, OE2 e OE2+N, ou seja, este dado nos permite afirmar que o E2 foi um fator importante para diminuir o ganho de peso na condição de ovariectomia independente do exercício físico crônico, já que os animais do grupo ON também apresentou maior peso corporal comparado a estes mesmos grupos (Tabela 2). Contudo, todos os grupos apresentaram ganho de peso significativo após o



**Figura 4.** Avaliação de parâmetros relacionados a eficiência da cirurgia de ovariectomia: **A.** Níveis plasmáticos de 17- $\beta$ -estradiol (pg/mL; n=3-4), **B.** Peso do útero (mg; n=7), **C.** Peso do útero/peso corporal (mg/g; n=7) dos grupos: SHAM (S), Ovariectomizado (OVX), OVX+E2 (OE2), Ovariectomizado+Natação (ON), Ovariectomizado+E2+Natação (OE2+N). Valores expressos em Média  $\pm$  Erro Padrão da média (EPM). Utilizou-se ANOVA uma via e teste *post hoc* de Fisher (A) e Tukey (B e C). Diferenças significativas quando  $p < 0,05$ , \*\* e  $p < 0,0001$  \*\*\*\* vs. SHAM e  $p < 0,01$ , ## e  $p < 0,001$  ##### vs. OE2 e  $p < 0,001$  ### vs. OE2+N.

período de 8 semanas de tratamento em relação ao peso inicial ( $p < 0,0001$ ; S:  $\Delta = 32,8$  g; OVX:  $\Delta = 67,3$  g; OE2:  $\Delta = 35,7$  g; ON:  $\Delta = 40$  g; OE2+N:  $\Delta = 39,7$  g).

**Tabela 2.** Média dos valores do peso corporal (g) no início e ao término do período de tratamento de 8 semanas com 17- $\beta$ -estradiol e/ou natação em ratas SHR ovariectomizadas.

	S (n=7)	OVX (n=7)	OE2 (n=7)	ON (n=7)	OE2+N (n=7)
Peso Corporal Inicial (g)	142,2 $\pm$ 3,83	135,1 $\pm$ 7,1	129,3 $\pm$ 4,5	123,6 $\pm$ 3,4	123,1 $\pm$ 2,1
Peso Corporal Final(g)	175 $\pm$ 4,7	202,4 $\pm$ 3,9 <sup>**#####,++</sup>	165 $\pm$ 2,5	203,6 $\pm$ 3,8 <sup>***###,+++</sup>	162,8 $\pm$ 4
		++		‡	

S, SHAM; OVX, ovariectomia; OE2, ovariectomia+TE2; ON, ovariectomia+natação; OE2+N, ovariectomia+ TE2. Valores expressos em média e EPM; ANOVA two-way (fator 1: tratamento; fator 2: tempo) e *post-hoc* de Tukey adotando um índice de significância mínimo de 5%.

\*\* p<0,01, \*\*\*\*p<0,0001 vs. SHAM (peso final)

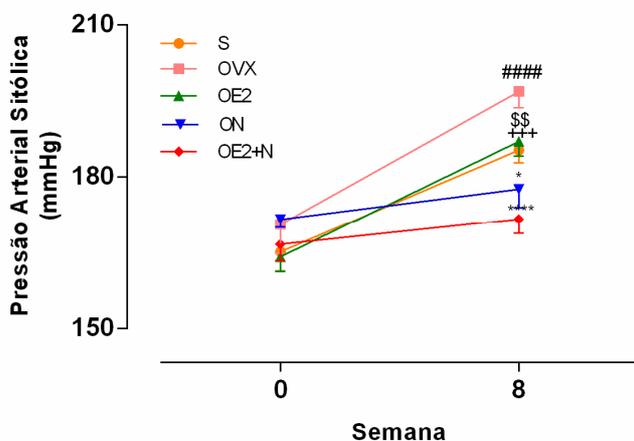
### p<0,001, #####p<0,0001 vs. OE2 (peso final)

+++‡ p<0,0001 vs.OE2+N (peso final)

### 4.3 Pressão Arterial Sistólica

As ratas tiveram a PAS avaliada na semana 0 e 8, respectivamente: a semana antes do início do tratamento; 48 horas após a última sessão de treinamento e/ou ao final da TE2 do período de tratamento. Como pode ser observado na Figura 5, não houve diferença entre os grupos na semana 0 (S: 165 $\pm$ 3,79; OVX: 170 $\pm$ 5,7; OE2: 164 $\pm$ 2,88; ON: 171 $\pm$ 1,63; OE2+N:166 $\pm$ 3,25 mmHg). Por outro lado, na semana 8, as ratas dos grupos treinados apresentaram menores valores de PAS quando comparadas ao grupo OVX (S: 185 $\pm$ 2,52; OVX: 196 $\pm$ 3,17; OE2: 187 $\pm$  2,94; ON: 177 $\pm$ 3,72; OE2+N: 171 $\pm$ 2,84 mmHg). Cabe ressaltar, que somente os grupos treinados não sofreram variação significativa na PAS no decorrer das 8 semanas (efeito do tempo) de tratamento, ou seja, o exercício físico crônico de natação foi eficiente para intervir no progresso da hipertensão (S: 0=165 $\pm$ 3,79 vs 8=185 $\pm$ 2,52 mmHg,  $\Delta$ =20 mmHg, p<0,01; OVX: 0= 170 $\pm$ 5,7 vs 8=196 $\pm$ 3,17 mmHg,  $\Delta$ =26 mmHg, p<0,0001; OE2: 0=164 $\pm$ 2,88 vs

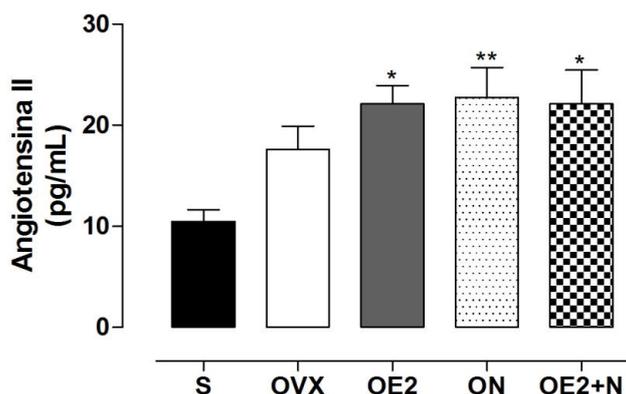
8=187± 2,94 mmHg,  $\Delta$ =22,8 mmHg,  $p<0,001$ ; ON: 0=171±1,63 vs 8=177±3,72 mmHg,  $\Delta$ =6 mmHg; OE2+N: 0=166±3,25 vs 8=187± 2,94 mmHg,  $\Delta$ =5mmHg).



**Figura 5.** Análise dos valores de pressão arterial sistólica (PAS, mmHg) medidos por meio de pletismografia de cauda antes (semana 0) e após 8 semanas de tratamento em ratas SHR dos seguintes grupos: SHAM (S, n=7), Ovariectomizado (OVX, n=7), OVX+E2 (OE2, n=7), Ovariectomizado+Natação (ON, n=7), Ovariectomizado+E2+ Natação (OE2+N, n=7). Valores expressos em Média±Erro Padrão da Média (EPM). Utilizou-se ANOVA duas vias (fator 1: tratamento e fator 2: tempo) e *post hoc* de Tukey. Diferenças significativas quando  $p<0,05$ , \*\* e  $p<0,0001$  \*\*\*\*vs. OVX;  $p<0,0001$  ####,  $p<0,01$  \$\$\$,  $p<0,001$  +++vs. semana 0 do grupo referido.

#### 4.4 Níveis Plasmáticos de Angiotensina II

Os resultados referentes aos níveis plasmáticos de Ang II podem ser evidenciados na Figura. Assim, podemos perceber que a ovariectomia não afetou os níveis plasmáticos deste hormônio, uma vez que não encontramos diferença entre o grupo S e OVX. Contudo, ambos os tratamentos, assim como a associação dos mesmos (TE2 e exercício físico), promoveram aumento significativo nos níveis plasmáticos de Ang II em relação ao grupo S (Figura 6. Níveis plasmáticos de Ang II; S:10,48±1,18; OVX: 17,62±2,27; OE2: 22,13±1,80; ON: 22,74±2,95; OE2+N: 22,11±3,33 pg/mL).



**Figura 6.** Análise dos níveis plasmáticos de angiotensina II após 8 semanas de natacao e/ou TE2 em ratas SHR dos seguintes grupos: SHAM (S; n=7), Ovariectomizado (OVX; n=6), OVX+E2 (OE2; n=5), Ovariectomizado+Natação (ON; n=7), Ovariectomizado+E2+Natação (OE2+N; n=6). Valores expressos em Média±Erro Padrão da Média (EPM). Utilizou-se ANOVA uma via e *post hoc* de Tukey. Diferenças significativas quando \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  vs. SHAM.

#### 4.5 Reatividade Vascular em Anéis de Aorta

##### 4.5.1 Curva Concentração-Resposta: Angiotensina II

Inicialmente, procedeu-se a curva de concentração-resposta a Ang II. A incubação dos banhos com este peptídeo promoveu resposta vasoconstritora concentração-dependente nos anéis de aorta de todos os grupos (Figura 7D). No entanto, a constrição mediada por Ang II na concentração de  $2 \times 10^{-6} \text{M}$  foi significativamente maior do grupo OVX quando comparado ao grupo SHAM e OE2 (Figura 7A), este resultado demonstra o papel do E2 na diminuição da resposta vasoconstritora. Ademais, os grupos treinados (ON e OE) apresentaram menor resposta vasoconstritora a Ang II quando comparado tanto aos grupos S e OE2, quanto OVX (Figura 7B e C, respectivamente. Ang II  $2 \times 10^{-6} \text{M}$ ; S:  $1,98 \pm 0,27$ ; OVX:  $2,64 \pm 0,08$ ; OE2:  $1,57 \pm 0,31$ ; ON:  $0,59 \pm 0,13$ ; OE2+N:  $0,44 \pm 0,09$  g). Similarmente, a  $R_{\text{máx}}$  dos grupos ON e OE2+N foi significativamente menor que os grupos S, OVX e OE2 (Tabela 3). Cabe ressaltar, que entre os grupos treinados não houve diferença estatisticamente significativa (Figura D), evidenciando que o treinamento físico de natação foi efetivo para promover diminuição na resposta constritora deste peptídeo independente dos níveis de E2.

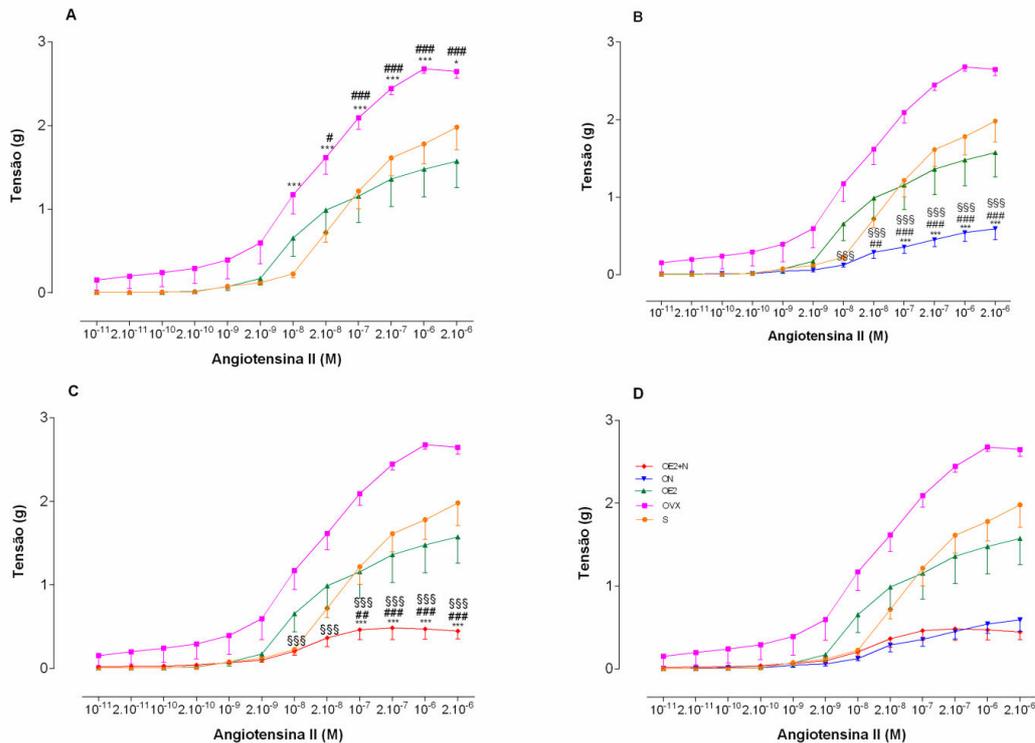
**Tabela 3.** Valores referentes à resposta máxima (R<sub>máx.</sub>, g) e sensibilidade (pD<sub>2</sub>) das curvas concentração-resposta à Angiotensina II em anéis isolados de aortas de ratas SHR dos grupos experimentais.

Grupos (n=5-6)	R <sub>máx</sub> (g)	pD <sub>2</sub>
SHAM	2,09±0,26	-7,28±0,14
OVX	2,76±0,09	-7,76±0,16
OE2	1,75±0,31 <sup>§</sup>	-7,48±0,4
ON	0,66±0,16 <sup>**.§§§.#</sup>	-7,23±0,21
OE2+N	0,53±0,11 <sup>***.§§§.##</sup>	-7,02±0,78

S, SHAM; OVX, ovariectomia; OE2, ovariectomia+TE2; ON, ovariectomia+natação; OE2+N, ovariectomia+ TE2+natação. Valores expressos em média±EPM; ANOVA uma-via e *post-hoc* de Tukey adotando um índice de significância mínimo de 5%.

\*\* p<0,01, \*\*\*p<0,001 vs. SHAM; §p<0,05, §§§p<0,001 vs. OVX.

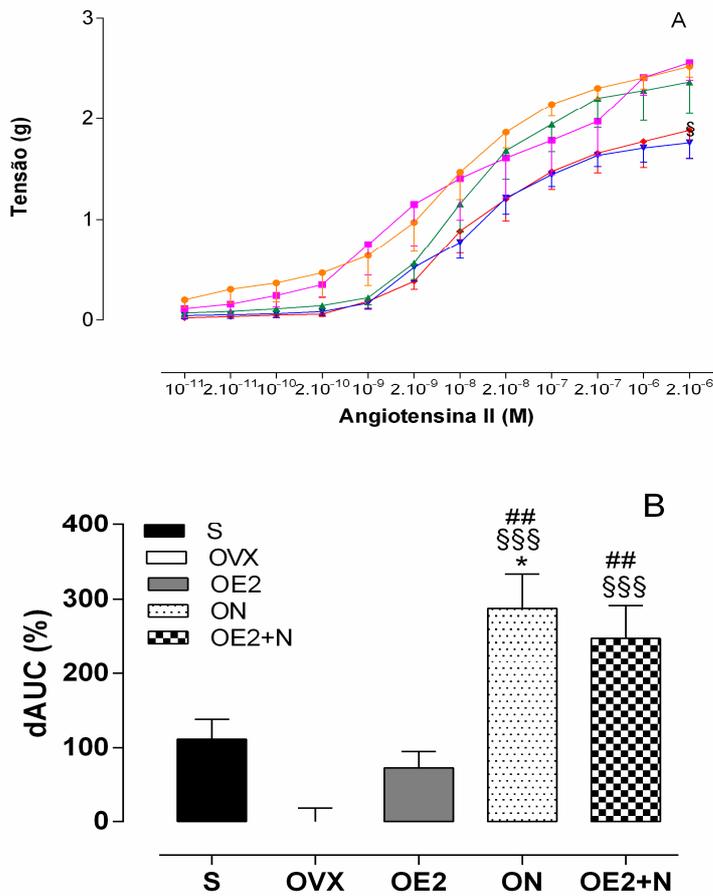
# p<0,05, ##p<0,001 vs.OE2.



**Figura 7.** Análise da reatividade vascular em anéis de aorta torácica a angiotensina II (A-D) após 8 semanas de tratamento em ratos SHR dos seguintes grupos (n=5-6): SHAM (S), Ovariectomizado (OVX), OVX+E2 (OE2), Ovariectomizado+Natação (ON), Ovariectomizado+E2+Natação (OE2+N). Valores expressos em Média±Erro Padrão da Média (EPM). Utilizou-se ANOVA duas vias (fator 1: tratamento e fator 2: concentração da dose de angiotensina II) e *post hoc* de Tukey. Diferenças significativas quando  $p < 0,05$ , \*\* e  $p < 0,001$  \*\*\* vs. SHAM;  $p < 0,05$  §,  $p < 0,001$  §§§ vs. OVX;  $p < 0,05$  #,  $p < 0,001$  ### vs. OE2.

Após o bloqueio da via do NO com L-NAME ( $10^{-6}$ M) ocorreu aumento da resposta vasoconstritora à Ang II nos anéis isolados de aorta de todos os grupos experimentais (Figura 8). Contudo, somente na dose  $2 \times 10^{-6}$ M houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo OVX e ON (Figura A; S:  $2,52 \pm 0,1$ ; OVX:  $2,55 \pm 0,1$ ; OE2:  $2,36 \pm 0,3$ ; ON:  $1,75 \pm 0,15$ ; OE2+N:  $1,88 \pm 0,2$  g). De forma similar, não foram encontradas diferença significativa na  $R_{m\acute{a}x}$ . e  $pD_2$  (Tabela 4). Entretanto, quando avaliamos a diferença da área sobre a curva de Ang II entre a situação controle e a situação no qual os banhos foram incubados com L-NAME (dAUC; %), foi encontrado um aumento significativo no dAUC do grupo ON quando comparado aos grupos S, OVX e OE2. De igual forma, o grupo OE2+N apresentou um aumento significativo quando comparado ao grupo OVX e OE2 (Figura 8B; Diferença da área sobre a curva de Ang II e Ang II em banhos incubados com L-NAME. S:  $111,69 \pm 26,54$ ; OVX:  $0,32 \pm 17,99$ ; OE2:  $73,14 \pm 22,25$ ; ON:  $287,95 \pm 45,54$ ; OE2+N:  $247,84 \pm 43,96$  %). Este

resultado nos permite admitir que o NO foi um importante fator para contrabalancear os efeitos constritores da Ang II nos grupos de animais treinados.



**Figura 8. A.** Análise da reatividade em anéis de aorta torácica a angiotensina II em banhos incubados com L-NAME ( $10^{-6}$ M) após 8 semanas de tratamento em ratas SHR dos seguintes grupos(n=5-6): SHAM (S), Ovariectomizado (OVX), OVX+E2 (OE2), Ovariectomizado+Natação (ON), Ovariectomizado+E2+Natação (OE2+N). **B.** Diferença entre a área sobre a curva (dAUC,%) de Ang II entre a situação controle e a situação com incubação de L-NAME ( $10^{-6}$ M). Valores expressos em Média±Erro Padrão da Média (EPM). **A.** Utilizou-se ANOVA duas vias (fator 1: tratamento e fator 2: concentração da dose de angiotensina II) e *post hoc* de Tukey. Diferenças significativas quando  $p < 0,05$ , § vs.OVX. **B.** Utilizou-se ANOVA uma via e *post hoc* de Tukey. Diferenças significativas quando  $p < 0,05$  \* vs. S;  $p < 0,001$  \$\$\$ vs. OVX;  $p < 0,01$  ## vs. OE2.

**Tabela 4.** Valores referentes à resposta máxima (R<sub>máx.</sub>, g) e sensibilidade (pD<sub>2</sub>) das curvas concentração-resposta à Angiotensina II em anéis isolados de aortas incubados com L-NAME (10<sup>-6</sup>M) de ratas SHR dos grupos experimentais.

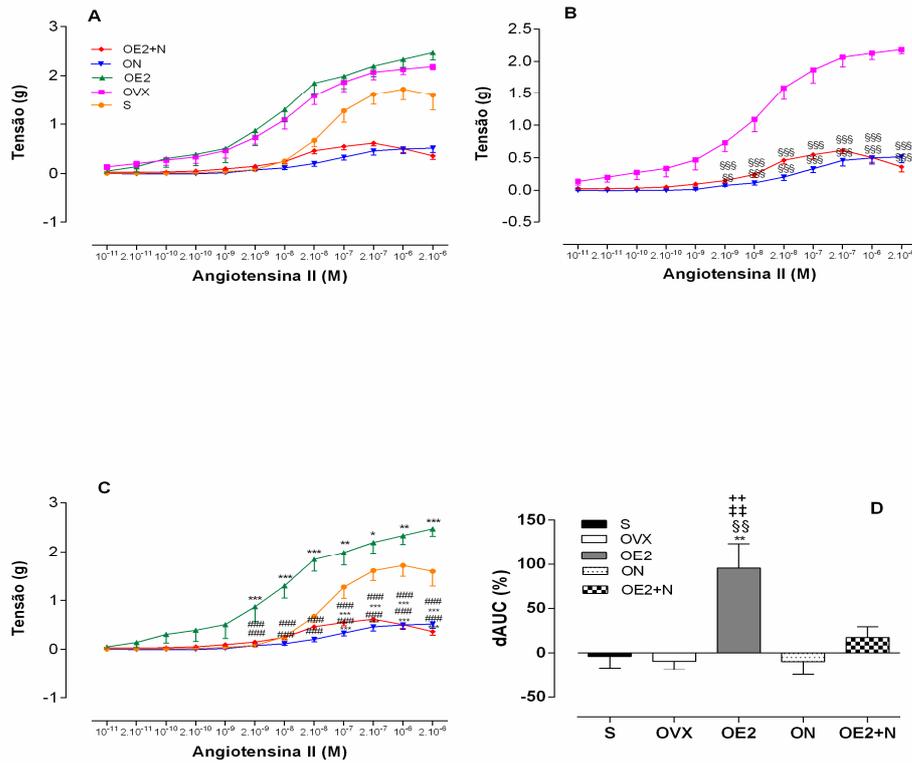
Grupos (n=5-6)	R <sub>máx</sub> (g)	pD <sub>2</sub>
SHAM	2,53±0,14	-8,43±0,53
OVX	2,70±0,29	-8,02±0,55
OE2	2,33±0,29	-7,88±0,14
ON	1,74±0,14	-7,89±0,11
OE2+N	1,81±0,25	-7,95±0,22

S, SHAM; OVX, ovariectomia; OE2, ovariectomia+TE2; ON, ovariectomia+natação; OE2+N, ovariectomia+ TE2+natação. Valores expressos em Média±EPM; ANOVA uma-*via* e *post-hoc* de Tukey adotando um índice de significância mínimo de 5%. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa.

É reportado na literatura que a resposta vasoconstritora de Ang II via receptores AT1 pode ser contrabalanceada pelo efeito vasodilatador que ocorre quando este peptídeo se liga aos receptores AT2 (Siragy; Carey, 1997; Tsutsumi *et al.*, 1999; Batenburg *et al.*, 2005). Visando avaliar a ação destes receptores, foi efetuada uma curva de Ang II em banhos incubados com PD 123319 (10<sup>-6</sup>M), um bloqueador seletivo dos receptores AT2. Assim como pode ser observado na Figura 9, os animais dos grupos treinados (ON e OE2+N) apresentaram menor resposta vasoconstritora, quando comparado aos animais dos grupos S, OVX e OE2 (Figura 9B e C) (Concentração da dose de Ang II 2x10<sup>-6</sup>M. S: 1,59±0,3; OVX:2,18±0,06; OE2:2,47±0,15; ON:0,51±0,09; OE2+N:0,36±0,07 g). Vale salientar, que o grupo OE2 apresentou um notável aumento na resposta vasoconstritora a Ang II quando os receptores AT2 foram bloqueados, com níveis de constrição similares ao grupo OVX (Figura 9A), assim como, estatisticamente maior que o grupo S (Figura 9C). Em relação a R<sub>máx</sub>, o grupo OE2 apresentou um aumento significativo em relação ao grupo S. Em contrapartida, os grupos ON e OE2 apresentaram uma resposta máxima (g) significativamente menor quando comparados aos demais grupos (S, OVX e OE2, Tabela 5). Por fim, o deslocamento da área sobre a curva entre a situação controle e quando os banhos foram incubados com PD123319 (10<sup>-6</sup>M), evidenciou que este deslocamento foi significativamente maior no grupo OE2 quando comparado aos demais grupos (Figura 9D. Diferença da área sobre a curva de Ang II e Ang II em banhos incubados com

PD123319. S:  $-3,83 \pm 13,06$ ; OVX:  $-9,42 \pm 9,51$ ; OE2:  $95,7 \pm 27,8$ ; ON:  $-9,64 \pm 15,03$ ; OE2+N:  $17,4 \pm 12,13$  %).

Por fim, foi feita uma Curva Concentração-Resposta de Ang II em banhos incubados com losartan ( $10^{-6}$ M), um bloqueador seletivo dos receptores AT1. Assim, sob esta condição, a resposta constritora da Ang II foi completamente abolida (dados não apresentados).



**Figura 9. A-C.** Análise da reatividade vascular em anéis de aorta torácica a angiotensina II em banhos incubados com PD 123319 ( $10^{-6}$ M) após 8 semanas de tratamento em ratos SHR dos seguintes grupos (n=5-6): SHAM (S), Ovariectomizado (OVX), OVX+E2 (OE2), Ovariectomizado+Natação (ON), Ovariectomizado+E2+ Natação (OE2+N). **D.** Diferença entre a área sob a curva (dAUC, %) de Ang II entre a situação controle e a situação com incubação de PD123319 ( $10^{-6}$ M). Valores expressos em Média±Erro Padrão da Média (EPM). **A-C.** Utilizou-se ANOVA duas vias (fator 1: tratamento e fator 2: concentração da dose de angiotensina II) e *post hoc* de Tukey. **D.** Utilizou-se ANOVA uma via e *post hoc* de Tukey. Diferenças significativas quando  $p < 0,05$  \*,  $p < 0,01$  \*\*,  $p < 0,001$  \*\*\* vs. SHAM;  $p < 0,01$  §§,  $p < 0,001$  §§§ vs. OVX;  $p < 0,01$  ### vs. ON;  $p < 0,01$  ++ vs. OE2+N.

**Tabela 5.** Valores referentes à resposta máxima (R<sub>máx.</sub>, g) e sensibilidade (pD<sub>2</sub>) das curvas concentração-resposta à Angiotensina II em anéis isolados de aortas incubados com PD123319 (10<sup>-6</sup>M) de ratas SHR dos grupos experimentais.

Grupos (n=5-6)	R <sub>máx</sub> (g)	pD <sub>2</sub>
SHAM	1,71±0,22	-7,34±0,10
OVX	2,26±0,08	-7,93±0,14
OE2	2,56±0,16**	-8,29±0,49
ON	0,52±0,10***§§§###	-7,40±0,18
OE2+N	0,53±0,06***§§§###	-7,97±0,14

S, SHAM; OVX, ovariectomia; OE2, ovariectomia+TE2; ON, ovariectomia+natação; OE2+N, ovariectomia+ TE2+natação. Valores expressos em Média±EPM; ANOVA uma-via e *post-hoc* de Tukey adotando um índice de significância mínimo de 5%.

\*\* p<0,01, \*\*\*p<0,001 vs. SHAM.

§§§p<0,001 vs. OVX.

###p<0,001 vs.OE2.

#### 4.5.2 Curva Concentração-Resposta: Angiotensina-(1-7)

Para melhor compreensão das respostas da curva concentração-resposta de Ang-(1-7), desmembramos os resultados em diferentes gráficos conforme pode ser visualizado na Figura (A-D). Assim, a Figura 10B apresenta as diferenças entre os grupos experimentais e o grupo S. Este apresentou um relaxamento via Ang-(1-7) significativamente maior que o grupo OVX na maior dose. Além disso, os resultados mostraram que o grupo ON apresentou um relaxamento significativamente maior que o grupo S nas doses de Ang-(1-7) 2x10<sup>-8</sup>M e 10<sup>-7</sup>M, diferenças estas que não foram encontradas quando comparado com o outro grupo treinado, o OE2+N e o grupo que recebeu TE2, o OE2 (este grupo não está representado na figura 10B). Importante ressaltar, que a TE2 não promoveu resultados similares ao grupo S, já que o referido grupo apresentou um relaxamento mediado pela Ang-(1-7) significativamente menor quando comparado a ambos os grupos treinado, ON e OE2+N, nas doses de Ang-(1-7) entre 10<sup>-9</sup>M e 2x10<sup>-7</sup>M (Figura 10C). Por fim, conforme pode ser observado na Figura 10D, o grupo OVX apresentou um relaxamento via Ang-(1-7) significativamente menor comparado ao grupo ON e OE2+N (A 1-7 2x10<sup>-6</sup>M- S: 47,64±4,49, OVX:25,82±2,43; OE2:38,9±3,31; ON: 55±9,04; OE2+N: 45,82±5,07%). Estes resultados demonstraram que o treinamento crônico de natação ou este associado

com a TE2 com E2 aumentou significativamente o relaxamento mediado pela Ang-(1-7) em ratas hipertensas submetidas à situação de baixos níveis de 17- $\beta$ -estradiol. Ainda, quando comparada a resposta máxima à Ang-(1-7), o grupo ON apresentou resultado significativamente maior comparado ao grupo OVX (Tabela 6).

**Tabela 6.** Valores referentes à resposta máxima (R<sub>máx.</sub>, g) e sensibilidade (pD<sub>2</sub>) das curvas concentração-resposta à Angiotensina-(1-7) em anéis isolados de aortas incubados de ratas SHR dos grupos experimentais.

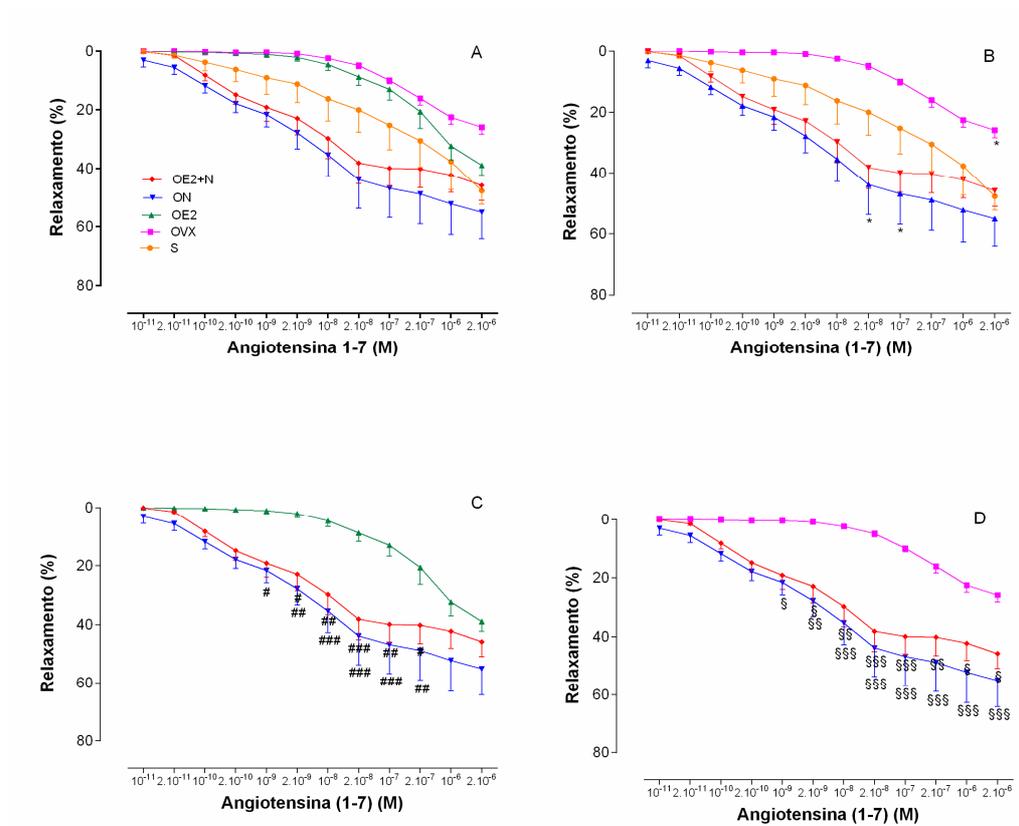
Grupos (n=5-6)	R <sub>máx</sub> (g)	pD <sub>2</sub>
SHAM	55,67±7,5	-7,44±1,18
OVX	33,67±5,78	-6,49±0,28
OE2	53,38±12,17	-6,38±0,39
ON	71,09±1,47§	-7,59±1,15
OE2+N	49,13±5,07	-8,89±0,48

S, SHAM; OVX, ovariectomia; OE2, ovariectomia+TE2; ON, ovariectomia+natação; OE2+N, ovariectomia+ TE2+natação. Valores expressos em Média±EPM; ANOVA uma-via e *post-hoc* de Tukey adotando um índice de significância mínimo de 5%.

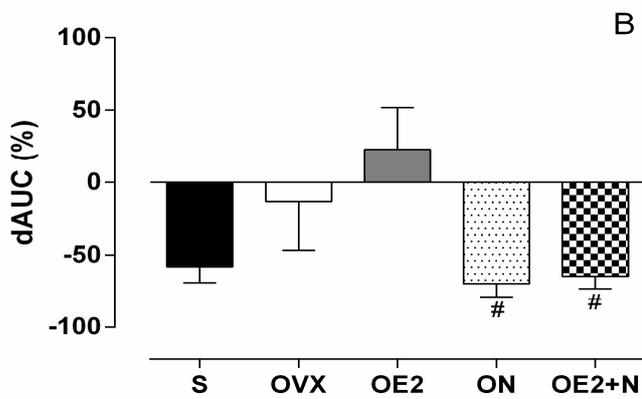
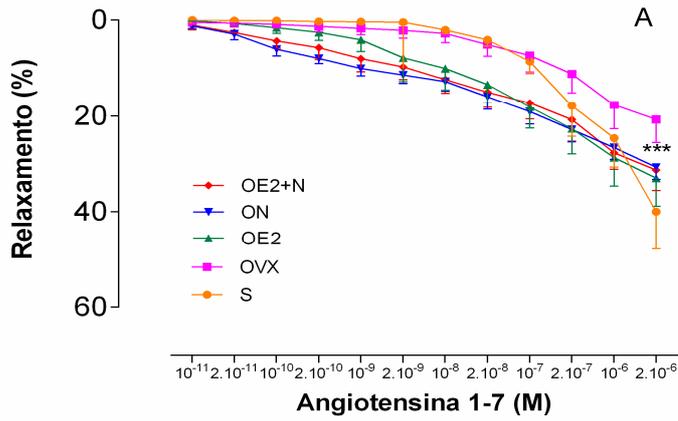
§ p<0,05 vs. OVX.

A Ang-(1-7) é um peptídeo que exerce seus efeitos biológicos via ligação com o receptor Mas (Santos *et al.*, 2013). Contudo, estudo evidenciou uma possível interação deste receptor com o AT2 (*cross-talk*), no desencadeamento dos efeitos funcionais (de Castro *et al.*, 2005). Neste sentido, buscando avaliar esta interação, realizamos o bloqueio destes receptores com o PD123319 (10<sup>-6</sup>M) e foi construída uma curva concentração-resposta com Ang-(1-7). Os resultados encontrados corroboram com estas informações, haja vista, que não houve diferença estatisticamente significativa no relaxamento entre os grupos OVX, OE2, ON e OE2+N. Entretanto, na dose máxima o grupo OVX apresentou relaxamento significativamente menor que o grupo S, conforme podemos observar na Figura 11 (2x2x10<sup>-6</sup>M- S: 39,9±7,7, OVX:20,7±4,8; OE2:32,9±5,8; ON: 27,1±2,4; OE2+N: 31,2±4,2%). Por outro lado, não encontramos na resposta máxima (g) e no pD<sub>2</sub> quando comparado os diferentes grupos (Tabela 7). Contudo, a diferença da área sobre a curva de Ang-(1-7) na situação controle e na situação entre no qual os banhos foram incubados com PD 123319, mostrou que o deslocamento do grupo OE2 foi significativamente maior que o grupo ON e OE2+N. Cabe ressaltar, que houve um aumento da área sobre a curva do grupo OE2 (Figura

11 B. dAUC, S:-57,92±10,80; OVX:-13,20±33,42; OE2: 22,78±29,24; ON:-69,62±8,96; OE2+N:-64,60±8,28 %).



**Figura 10.** Análise da reatividade vascular em anéis de aorta torácica a angiotensina-(1-7) (A-D) após 8 semanas de tratamento em ratas SHR dos seguintes grupos(n=5-6): SHAM (S), Ovariectomizado (OVX), OVX+E2 (OE2), Ovariectomizado+Natação (ON), Ovariectomizado+E2+ Natação (OE2+N). Valores expressos em Média±Erro Padrão da Média (EPM). Utilizou-se ANOVA duas vias (fator 1: tratamento e fator 2: concentração da dose de angiotensina 1-7) e *post hoc* de Tukey. Diferenças significativas quando  $p < 0,05$ , \* vs. SHAM;  $p < 0,05$  §,  $p < 0,01$  §§,  $p < 0,001$  §§§ vs. OVX;  $p < 0,05$  #,  $p < 0,01$  ###,  $p < 0,001$  #### vs. OE2.



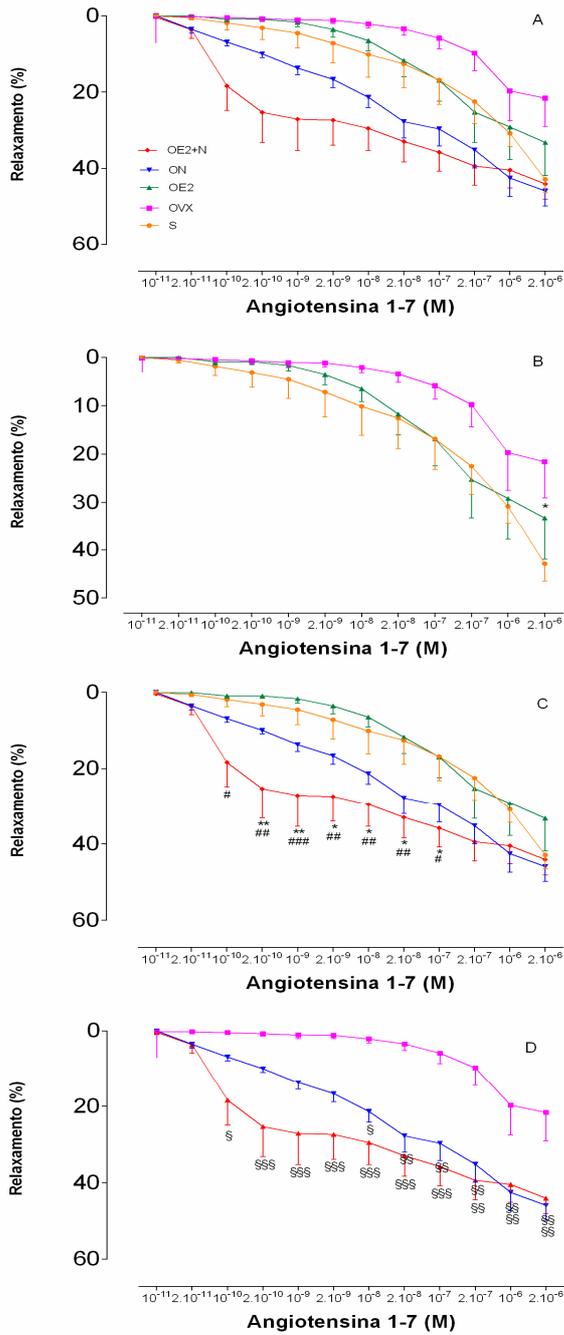
**Figura 11. A.** Curva Concentração-Resposta de angiotensina 1-7 em anéis de aorta torácica incubados com PD123319 ( $10^{-6}$ M) de ratas SHR após 8 semanas de tratamento dos seguintes grupos(n=5-6): SHAM (S), Ovariectomizado (OVX), OVX+E2 (OE2), Ovariectomizado+Natação (ON), Ovariectomizado+E2+ Natação (OE2+N). **B.** Diferença entre a área sob a curva (dAUC,%) de ANG II entre a situação controle e a situação com incubação de PD123319 ( $10^{-6}$ M). D. Utilizou-se ANOVA uma via e *post hoc* de Tukey. Valores expressos em Média±Erro Padrão da Média (EPM). Utilizou-se ANOVA duas vias (fator 1: tratamento e fator 2: concentração da dose de angiotensina 1-7) e *post hoc* de Tukey. Diferenças significativas quando  $p < 0,001$  \*\*\* vs. SHAM;  $p < 0,05$  #vs. OE2.

**Tabela 7.** Valores referentes à resposta máxima (R<sub>máx.</sub>, g) e sensibilidade (pD<sub>2</sub>) das curvas concentração-resposta à Angiotensina-(1-7) em anéis isolados de aortas incubados com PD 123319 (10<sup>-6</sup>M) de ratas SHR dos grupos experimentais.

Grupos (n=5-6)	R <sub>máx</sub> (g)	pD <sub>2</sub>
SHAM	83,24±38,07	-5,45±0,49
OVX	30,55±4,60	-6,38±0,15
OE2	47,06±4,92	-6,9±0,67
ON	70,93±17,04	-17,71±9,56
OE2+N	35,16±5,22	-3,31±4,50

S, SHAM; OVX, ovariectomia; OE2, ovariectomia+TE2; ON, ovariectomia+natação; OE2+N, ovariectomia+ TE2+natação. Valores expressos em média e EPM; ANOVA uma-via e *post-hoc* de Tukey adotando um índice de significância mínimo de 5%. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa.

Como abordado anteriormente, está bem estabelecido na literatura que a Ang-(1-7) exerce seus efeitos via receptor Mas. Entretanto, a incubação dos banhos com o bloqueador seletivo do receptor Mas, A779 (10 $\mu$ M) promoveu resposta vasodilatadora concentração-dependente à Ang-(1-7) nos anéis de aorta em todos os grupos (Figura 12A). O grupo OVX apresentou relaxamento significativamente menor que o grupo S. No entanto, o grupo OE2 não apresentou alteração significativa da resposta vasodilatadora quando comparado ao grupo OVX (Figura 12B). Por outro lado, o treinamento crônico de natação conseguiu melhorar a resposta vasodilatadora das ratas OVX, já que o grupo ON e OE2+N apresentou relaxamento significativamente maior que o grupo OVX. Contudo, quando os grupos de animais treinados (ON e OE2+N) foram comparados com o SHAM e OE2, somente o grupo OE2+N apresentou relaxamento significativamente maior nas doses entre 10<sup>-10</sup> e 10<sup>-7</sup>M comparado aos referidos grupos (Figura 12D) [Ang-(1-7) 2x10<sup>-6</sup>M- S: 42,85±3,59; OVX:21,58±7,44; OE2:33,21±8,64; ON:45,91±3,91; OE2+N:44±3,99%].



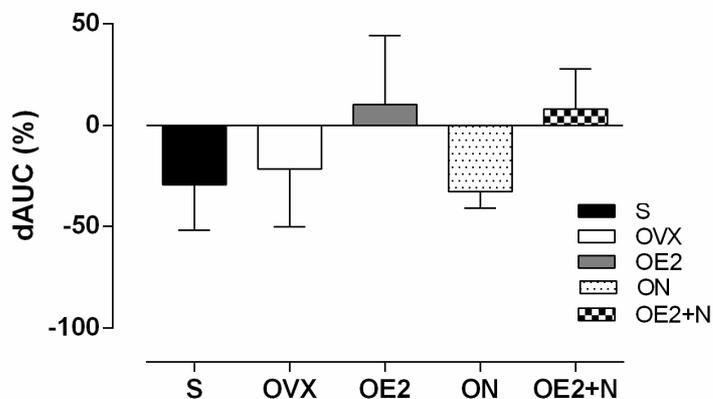
**Figura 12.** Curva Concentração-Resposta de angiotensina-(1-7) em anéis de aorta torácica incubados com A779 (10 $\mu$ M) de ratas SHR apos 8 semanas de tratamento dos seguintes grupos(n=5-6): SHAM (S), Ovariectomizado (OVX), OVX+E2 (OE2), Ovariectomizado+Natação (ON), Ovariectomizado+E2+ Natação (OE2+N). Valores expressos em Média $\pm$ Erro Padrão da Média (EPM). Utilizou-se ANOVA duas vias (fator 1: tratamento e fator 2: concentração da dose de angiotensina 1-7) e *post hoc* de Tukey. Diferenças significativas quando p<0,05, \* vs. S; p<0,05 §, p<0,01 §§, p<0,001 §§§ vs. OVX; p<0,05 #, p<0,01 ##, p<0,001 ### vs. OE2.

**Tabela 8.** Valores referentes à resposta máxima (R<sub>máx.</sub>, g) e sensibilidade (pD<sub>2</sub>) das curvas concentração-resposta à Angiotensina-(1-7) em anéis isolados de aortas incubados com A779 (10µM) de ratas SHR dos grupos experimentais.

Grupos (n=5-6)	R <sub>máx</sub> (g)	pD <sub>2</sub>
SHAM	118,1±45,89	-6,05±1,17
OVX	26,09±10,2	-1,78±4,62
OE2	56,06±6,84	-3,21±3,16
ON	81,04±9,12	-7,37±0,38
OE2+N	55,38±9,87	-10,12±2,06

S, SHAM; OVX, ovariectomia; OE2, ovariectomia+TE2; ON, ovariectomia+natação; OE2+N, ovariectomia+ TE2+natação. Valores expressos em Média±EPM; ANOVA uma-*via* e *post-hoc* de Tukey adotando um índice de significância mínimo de 5%. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa.

A diferença da área sobre a curva de Ang-(1-7) (%) entre a situação controle e a situação na qual os anéis estavam incubados com o bloqueador do receptor Mas, A779, não apresentou diferença entre os grupos, conforme pode ser observado na Figura 13 (dAUC. S: -28,97±22,80; OVX: -21,31±28,68; OE2: 10,35±34; ON: -32,45±8,4; OE2+N: 8,09±19,73 %).



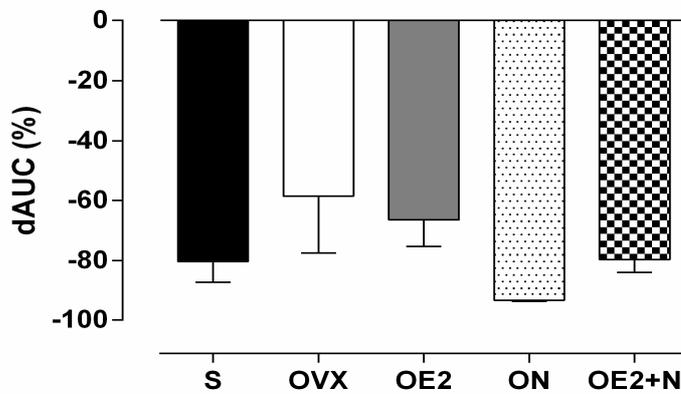
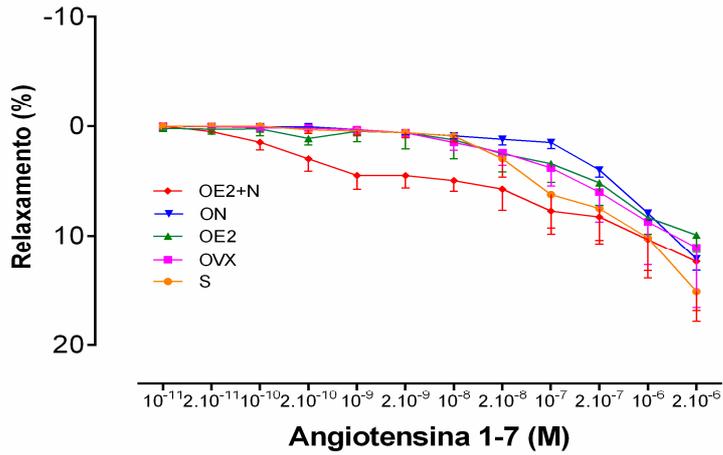
**Figura 13.** Diferença entre a área sobre a curva (dAUC,%) de Angiotensina-(1-7) entre a situação controle e a situação com incubação de A779 (10 µM) de ratas SHR após 8 semanas de tratamento dos seguintes grupos(n=5-6): SHAM (S), Ovariectomizado (OVX), OVX+E2 (OE2), Ovariectomizado+Natação (ON), Ovariectomizado+E2+ Natação (OE2+N). Valores expressos em Média±Erro padrão da Média (EPM). D. Utilizou-se ANOVA uma *via* e *post hoc* de Tukey. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa.

Por fim, quando os banhos foram incubados com L-NAME promovendo a inibição da síntese de NO pelas isoformas da NOS no vaso, todos os grupos apresentaram diminuição do relaxamento, de forma que nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos em nenhuma das doses, mostrando que o NO foi o principal mediador da vasodilatação promovida pela Ang-(1-7) (Figura 14A) [Ang-(1-7)  $2 \times 10^{-6}$ M- S:  $15,1 \pm 2,72$ ; OVX:  $11,05 \pm 5,54$ ; OE2:  $9,91 \pm 1,56$ ; ON:  $12,11 \pm 1,05$ ; OE2+N:  $12,3 \pm 4,5\%$ ). Ademais, não foi encontrada diferença significativa na  $R_{\text{máx}}$  (g), assim como no  $pD_2$  (Tabela 9) e dAUC (Figura 14B; %) (dAUC; S:  $-80,25 \pm 6,82$ ; OVX:  $-58,52 \pm 18,93$ ; OE2:  $-66,46 \pm 8,80$ ; ON:  $-93,42 \pm 0,36$ ; OE2+N:  $-79,61 \pm 4,20$ ).

**Tabela 9.** Valores referentes à resposta máxima ( $R_{\text{máx}}$ , g) e sensibilidade ( $pD_2$ ) das curvas concentração-resposta à Angiotensina-(1-7) em anéis isolados de aortas incubados com L-NAME ( $10^{-6}$ M) de ratas SHR dos grupos experimentais.

Grupos(n=5-6)	$R_{\text{máx}}$ (g)	$pD_2$
SHAM	$22,02 \pm 2,98$	$-4,16 \pm 1,67$
OVX	$8,76 \pm 4,17$	$-6,29 \pm 0,82$
OE2	$17,55 \pm 8,87$	$-3,67 \pm 9,72$
ON	$20,13 \pm 7,02$	$-4,55 \pm 0,92$
OE2+N	$36,33 \pm 14,81$	$-1,93 \pm 8,54$

S, SHAM; OVX, ovariectomia; OE2, ovariectomia+TE2; ON, ovariectomia+natação; OE2+N, ovariectomia+ TE2+natação. Valores expressos em Média $\pm$ EPM; ANOVA uma-via e *post-hoc* de Tukey adotando um índice de significância mínimo de 5%. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa.



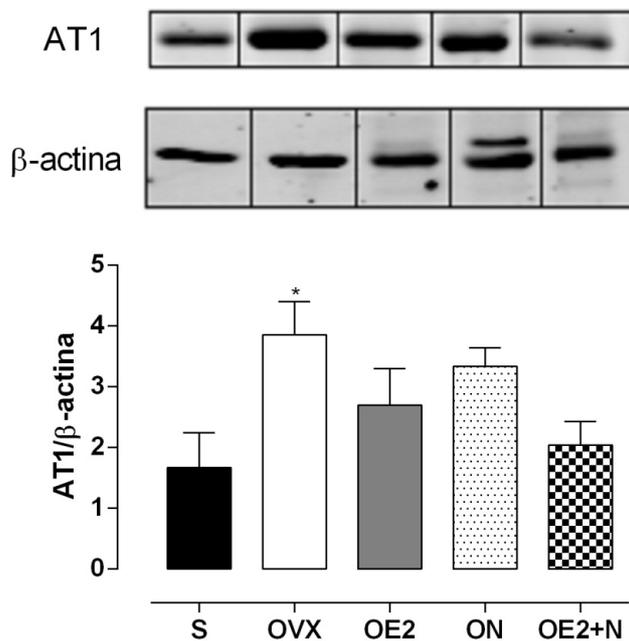
**Figura 14.A.** Curva Concentração-Resposta de angiotensina-(1-7) em anéis de aorta torácica incubados com L-NAME ( $10^{-6}$ M) de ratas SHR após 8 semanas de tratamento dos seguintes grupos(n=5-6): SHAM (S), Ovariectomizado (OVX), OVX+E2 (OE2), Ovariectomizado+Natação (ON), Ovariectomizado+E2+ Natação (OE2+N). **B.** Diferença entre a área sob a curva (dAUC,%) de Angiotensina-(1-7) entre a situação controle e a situação com incubação de A779. Valores expressos em Média±Erro Padrão da Média (EPM).**A.** Utilizou-se ANOVA duas vias (fator 1: tratamento e fator 2: concentração da dose de angiotensina 1-7). **B.** Utilizou-se ANOVA duas vias. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa.

Ao final dos experimentos com Ang-(1-7), os vasos foram incubados com Nitroprussiato de Sódio ( $10^{-4}$ M) e não houve diferença no relaxamento independente do endotélio (dados não apresentados).

## 4.6 Detecção de Proteínas

### 4.6.1 Receptor AT1

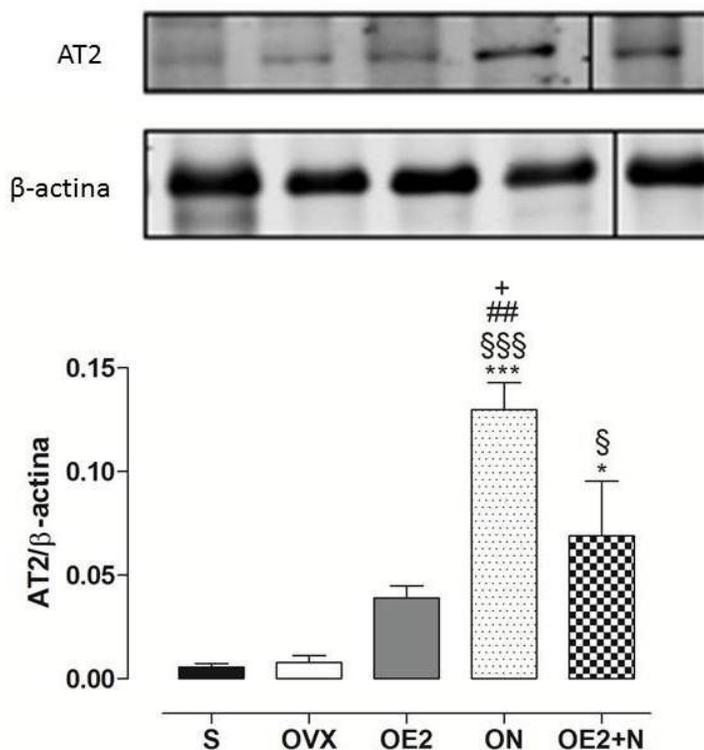
Foi realizada a mensuração da expressão do receptor AT1 em segmentos de aorta torácica. Assim, após 8 semanas de treinamento por meio de natação e/ ou TE2 com E2 em ratas SHR ovariectomizadas, podemos notar que somente o grupo OVX apresentou um aumento significativo na expressão do receptor AT1 comparado ao grupo SHAM (S:  $1,67 \pm 0,57$ ; OVX:  $3,85 \pm 0,54$ ; OE2:  $2,7 \pm 0,59$ ; ON:  $3,34 \pm 0,3$ ; OE2+N:  $2,04 \pm 0,38$ ).



**Figura 15.** Expressão protéica do receptor AT1/β-actina, por meio da técnica de *Western Blotting*, em segmentos de artéria aorta torácica após 8 semanas de tratamento em ratas SHR dos seguintes grupos: SHAM (S, n=4), Ovariectomizado (OVX, n=4), OVX+E2 (OE2, n=4), Ovariectomizado+Natação (ON, n=4), Ovariectomizado+E2+Natação (OE2+N, n=4). Valores expressos em Média±Erro Padrão da Média (EPM). Utilizou-se ANOVA uma via com *post hoc* de Tukey. Diferenças significativas quando  $p < 0,05$  \* vs SHAM.

#### 4.6.2 Receptor AT2

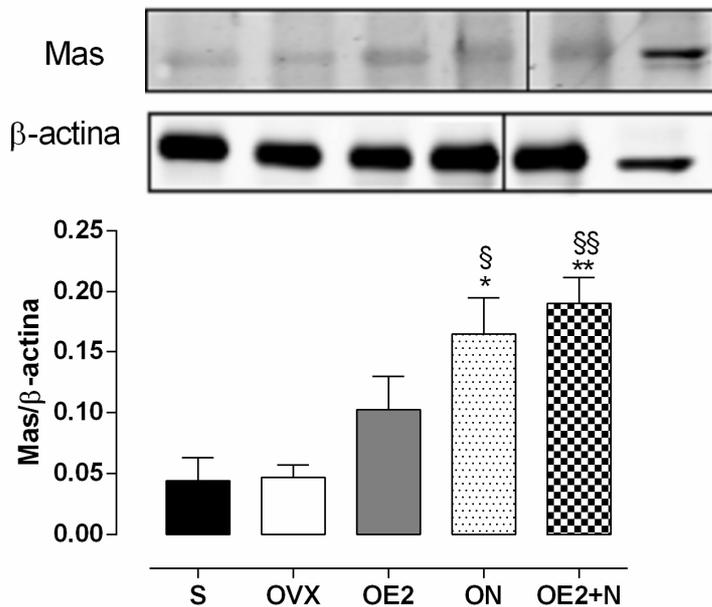
A mensuração do receptor AT2 foi realizada para analisar a expressão de um dos componentes vasodilatadores do SRA. Assim, conforme pode ser observado na Figura , o grupo ON apresentou um notório aumento na expressão dos receptores AT2 em decorrência do treinamento físico quando comparado aos grupos S, OVX, OE2 e OE2+N. Ademais, o grupo OE2+N apresentou aumento significativo na expressão do receptor AT2 quando comparado aos grupos S e OVX (S:  $0,005\pm 0,001$ ; OVX:  $0,008\pm 0,003$ ; OE2:  $0,03\pm 0,005$ ; ON:  $0,12\pm 0,01$ ; OE2+N:  $0,06\pm 0,02$ ).



**Figura 16.** Expressão protéica do receptor AT2/β-actina, por meio da técnica de *Western Blotting*, em segmentos de artéria aorta torácica após 8 semanas de tratamento em ratas SHR dos seguintes grupos: SHAM (S, n=4), Ovariectomizado (OVX, n=4), OVX+E2 (OE2, n=4), Ovariectomizado+Natação (ON, n=4), Ovariectomizado+E2+ Natação (OE2+N, n=4). Valores expressos em Média±Erro Padrão da Média (EPM). Utilizou-se ANOVA uma via com *post hoc* de Tukey. Diferenças significativas quando  $p<0,05$  \*,  $p<0,001$ \*\*\* vs. S,  $p<0,05$ §,  $p<0,001$ §§§ vs. OVX;  $p<0,01$  ##vs. OE2;  $p<0,05$ + vs. OE2+N.

#### 4.6.3 Receptor Mas

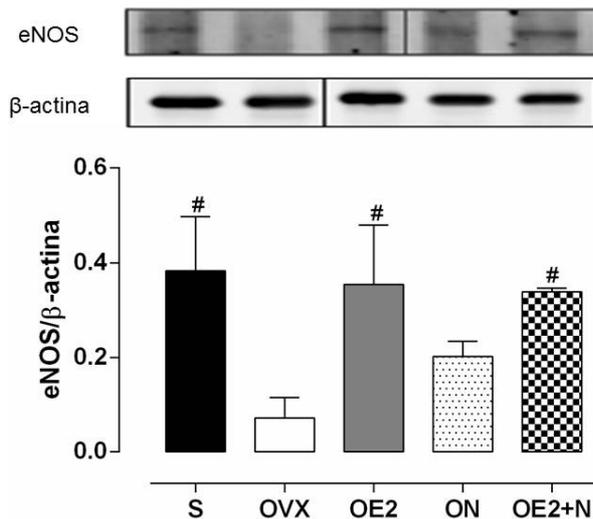
O receptor Mas é outro importante receptor do SRA, que dentre seus inúmeros efeitos, destacamos o papel de promover vasodilatação via ligação com a Angiotensina (1-7). Assim, realizamos experimentos visando quantificar a expressão deste receptor. Os resultados evidenciaram um significativo aumento na expressão do receptor Mas nos grupos ON e OE2+N quando comparados ao grupo S e OVX, conforme pode ser evidenciado na Figura (S:0,04±0,01; OVX:0,04±0,01; OE2:0,10±0,02; ON:0,16±0,03; OE2+N:0,19±0,02). Cabe ressaltar, que a primeira banda refere-se ao controle positivo, neste caso proteína extraída de testículo de rato. Este procedimento foi realizado para nos certificarmos que o *blotting* avaliado tratava-se realmente do receptor Mas.



**Figura 17.** Expressão protéica do receptor Mas/ $\beta$ -actina, por meio da técnica de *Western Blotting*, em segmentos de artéria aorta torácica após 8 semanas de tratamento em ratos SHR dos seguintes grupos: SHAM (S, n=4), Ovariectomizado (OVX, n=4), OVX+E2 (OE2, n=4), Ovariectomizado+Natação (ON, n=4), Ovariectomizado+E2+ Natação (OE2+N, n=4). Valores expressos em Média±Erro Padrão da Média (EPM). Utilizou-se ANOVA uma via com *post hoc* de Tukey. Diferenças significativas quando  $p < 0,05$  \*,  $p < 0,01$  \*\* vs S;  $p < 0,05$  §,  $p < 0,01$  §§ vs. OVX.

#### 4.6.4 eNOS

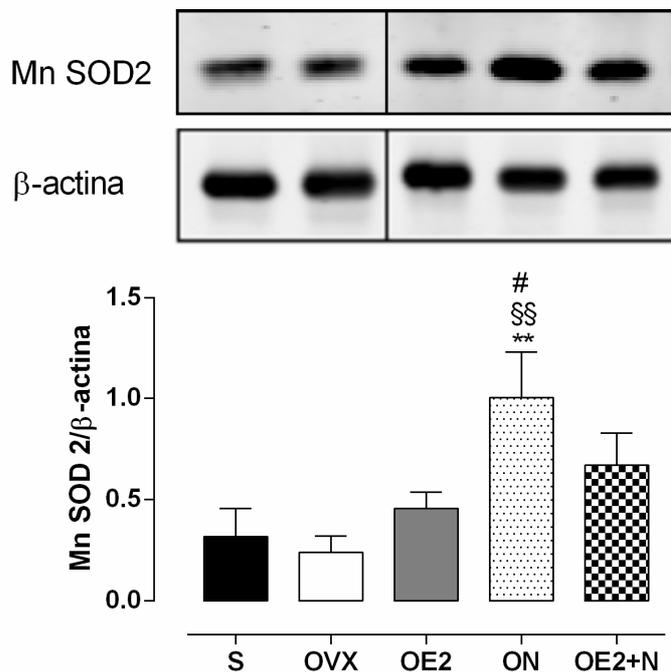
A expressão da eNOS apresentou diminuição significativa no grupo OVX quando comparado ao S. No entanto, este efeito foi prevenido realizando a TE2, já que o grupo OE2 apresentou aumento significativo da enzima quando comparado ao OVX. No tocante do treinamento físico, este promoveu aumento na expressão da eNOS somente quando associado a TE2, já que o grupo OE2+N apresentou aumento significativo quando comparado ao grupo OVX, efeito este não encontrado no grupo ON. Estes resultados nos permitem afirmar que o E2 foi um importante fator para promover o aumento na expressão da enzima (S:0,38±0,08; OVX:0,07±0,03; OE2:0,35±0,09; ON:0,20±0,02; OE2+N:0,33±0,005).



**Figura 18.** Expressão protéica da eNOS/β-actina, por meio da técnica de *Western Blotting*, em segmentos de artéria aorta torácica após 8 semanas de tratamento em ratas SHR dos seguintes grupos: SHAM (S, n=4), Ovariectomizado (OVX, n=4), OVX+E2 (OE2, n=4), Ovariectomizado+Natação (ON, n=4), Ovariectomizado+E2+ Natação (OE2+N, n=4). Valores expressos em Média±Erro Padrão da Média (EPM). Utilizou-se ANOVA uma via com *post hoc* de Tukey. Diferenças significativas quando  $p < 0,05$  # vs. OVX.

#### 4.6.5 Mn SOD2

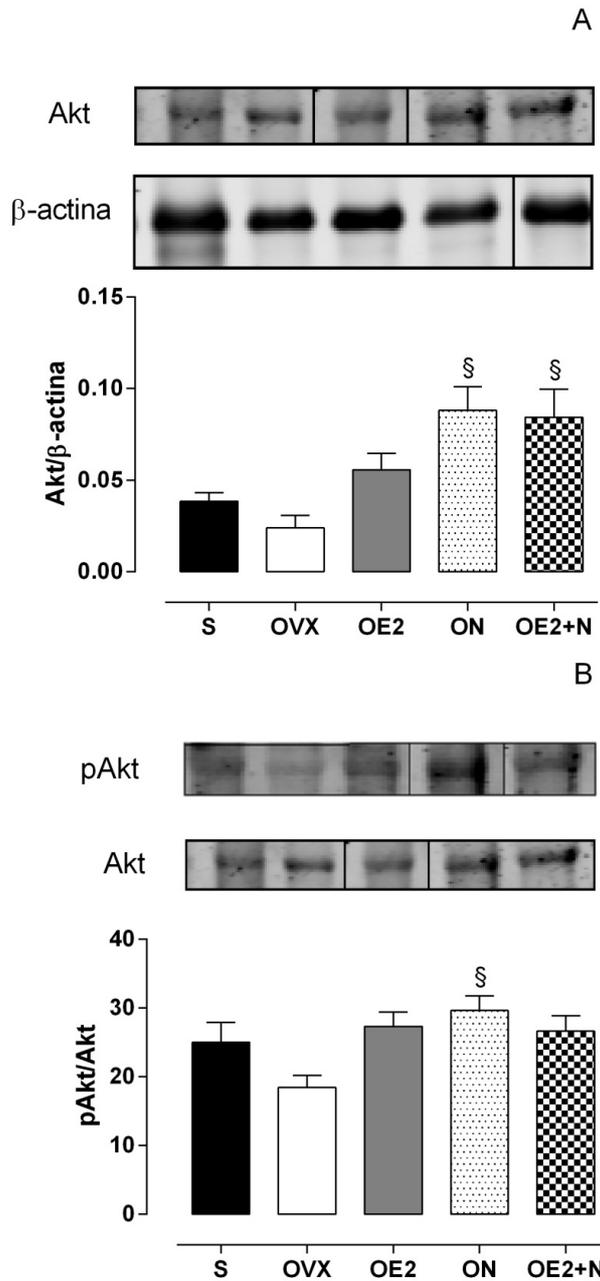
Sabe-se que a superóxido dismutase (Mn SOD) catalisa a dismutação do ânion superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, impedindo este radical livre de reagir com o NO, assim aumentando sua biodisponibilidade. Por este motivo, analisamos a expressão da Mn SOD2. Os resultados evidenciaram aumento estatisticamente significativo do grupo ON quando comparado ao grupo de animais sedentários, S, OVX e OE2 (S:0,31±0,13; OVX:0,24±0,08; OE2:0,45±0,08; ON:1±0,22; OE2+N:0,66±0,15).



**Figura 19.** Expressão protéica da Mn SOD2/β-actina, por meio da técnica de *Western Blotting*, em segmentos de artéria aorta torácica após 8 semanas de tratamento em ratas SHR dos seguintes grupos: SHAM (S, n=4), Ovariectomizado (OVX, n=4), OVX+E2 (OE2, n=4), Ovariectomizado+Natação (ON, n=4), Ovariectomizado+E2+ Natação (OE2+N, n=4). Valores expressos em Média±Erro Padrão da Média (EPM). Utilizou-se ANOVA uma via com *post hoc* de Tukey. Diferenças significativas quando  $p < 0,01$  \*\* vs. S;  $p < 0,01$  §§ vs. OVX; # $p < 0,05$  vs. OE2.

#### 4.6.6 Akt 1/2/3 e pAkt 1/2/3 ser473

Outra expressão proteica que foi avaliada foi a da proteína Akt 1/2/3 e a razão entre Akt fosforilada e Akt 1/2/3. Este experimento foi realizado para que pudéssemos avaliar a via pela qual ocorreu a ativação da eNOS. Neste sentido, na figura A podemos perceber que houve aumento significativo na Akt 1/2/3 nos grupos ON e OE2+N quando comparado ao grupo OVX (Figura 20A. Akt 1/2/3: S:0,03±0,004; OVX:0,02±0,006; OE2:0,05±0,008; ON:0,08±0,01; OE2+N:0,08±0,01). Para nos certificarmos que este aumento da expressão foi seguido de maior ativação da enzima, avaliamos a expressão da Akt fosforilada no fragmento de serina 473 corrigido pela Akt total e os resultados encontrados apontaram aumento significativo somente no grupo ON quando comparado ao grupo OVX (Figura 20B. pAkt/Akt; S: 25±2,89; OVX: 18,46±1,77; OE2: 27,34±2,12; ON:29,66±2,11; OE2+N: 26,66±2,22).



**Figura 20.** A. Expressão protéica da Akt/ $\beta$ -actina e B. pAkt/Akt, por meio da técnica de *Western Blotting*, em segmentos de artéria aorta torácica após 8 semanas de tratamento em ratas SHR dos seguintes grupos: SHAM (S, n=4), Ovariectomizado (OVX, n=4), OVX+E2 (OE2, n=4), Ovariectomizado+Natação (ON, n=4), Ovariectomizado+E2+ Natação (OE2+N, n=4). Valores expressos em Média $\pm$ Erro Padrão da Média (EPM). Utilizou-se ANOVA uma via com *post hoc* de Tukey. Diferenças significativas quando p<0,01 \* vs. S; p<0,05 § vs. OVX.

#### **4.7 Produção das Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)**

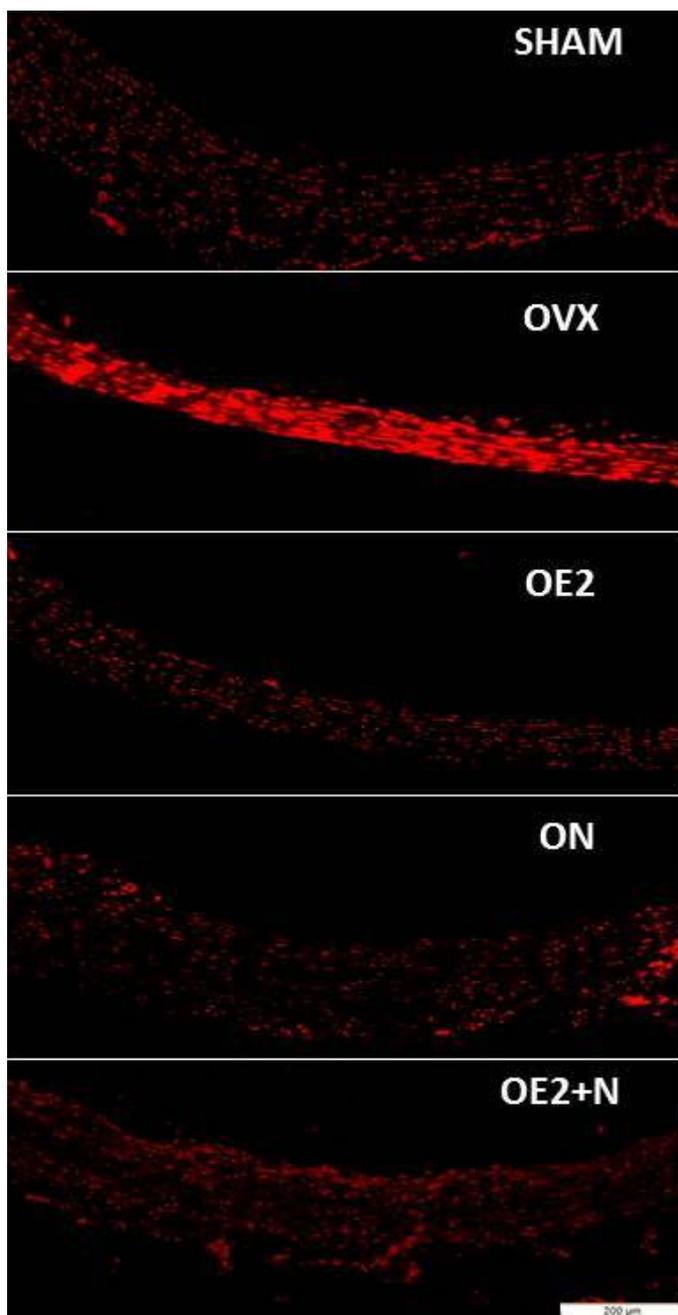
Concentrações de espécies reativas de oxigênio na parede da aorta foi analisada pela alteração na fluorescência emitida, resultante da oxidação do dihidroetídeo (DHE), que ao ser oxidado pelas espécies reativas de oxigênio gera etídeo, produzindo fluorescência vermelha ao se ligar ao DNA da célula.

A fluorescência emitida pelo DHE revelou uma elevada produção de espécies reativas de oxigênio na parede da aorta do animal OVX e este aumento foi atenuado tanto pela TE2, quanto pelo exercício físico, nas ratas SHR ovariectomizadas. Contudo, não notamos efeitos adicionais na produção das espécies reativas de oxigênio em função da associação destes dois tratamentos (Figura 21).

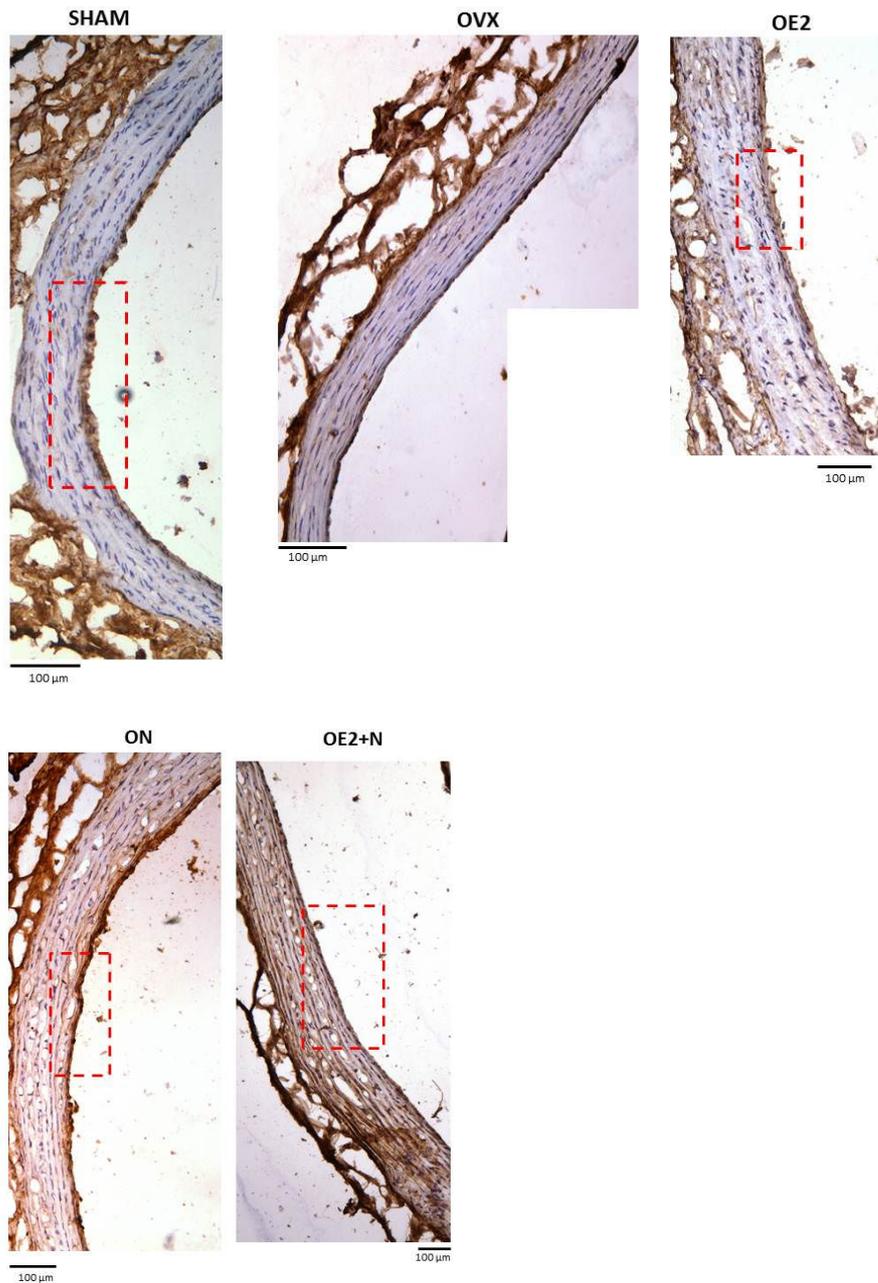
#### **4.8 Imunohistoquímica**

Para observar a expressão *in situ* de Ang-(1-7), procedeu-se a imunohistoquímica do referido peptídeo em segmento de aorta superior de um animal pertencente a cada um dos grupos estudados. Nas figuras são 22 e 23 observados cortes representativos destas imunohistoquímicas.

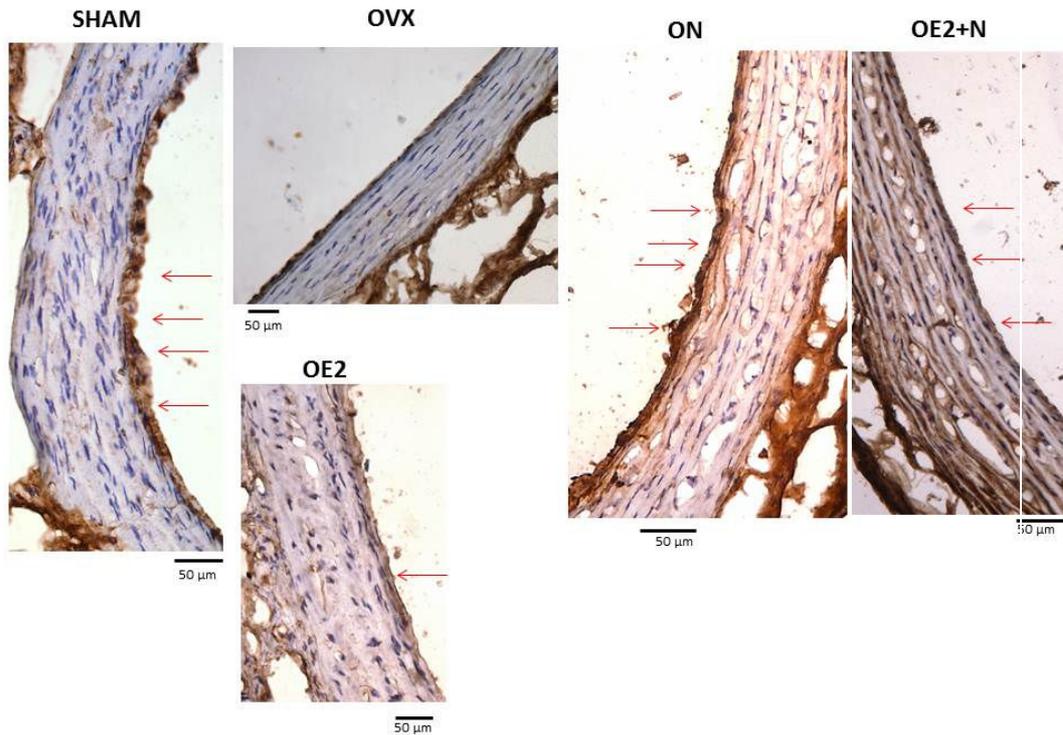
Nota-se na figura uma redução da coloração amarronzada no endotélio do segmento de aorta do animal OVX quando comparado aos demais animais, o que caracteriza uma redução de Ang-(1-7). Neste sentido, podemos perceber que o treinamento crônico de natação proporcionou um aumento de Ang-(1-7) no animal ON retornando à parâmetros de um animal controle (SHAM). Por outro lado, a TE2 não apresentou influência sobre a presença de Ang-(1-7) no endotélio vascular da aorta dos animais estudados, visto que não notamos diferença entre os animais OE2+N e ON bem como nos grupos OVX vs. OE2.



**Figura 21. Efeitos da TE2 e/ou treinamento crônico de natação sobre a produção das espécies reativas de oxigênio.** A produção de espécies reativas de oxigênio como revelada pela intensidade da fluorescência emitida pelo DHE, na parede da aorta de um animal SHAM, OVX, OE2, ON e OE2+N.



**Figura 22.** Imunohistoquímica para a detecção de Ang-(1-7) em aorta de ratas SHR submetidas à cirurgia fictícia (Sham), ovariectomizada (OVX), ovariectomizada+ TE2 (OE2), ovariectomizada+Natação (ON) e ovariectomizada+ TE2+ Natação (OE2+N). As figuras apresentadas são demonstrativas de dois resultados representativos. Os controles negativos foram incubados sem o anticorpo primário para a Ang-(1-7) e com IgG e não mostraram coloração ao DAB (dados não mostrados). A coloração amarronzada representa a expressão de Ang-(1-7) corada por DAB. Os cortes foram contra-corados com hematoxilina para a coloração nucléica. As áreas delimitadas representam a expressão de Ang-(1-7) no endotélio vascular. Painel superior com cortes de 100μm.



**Figura 23.** Imunohistoquímica para a detecção de Ang-(1-7) em aorta de ratas SHR submetidas à cirurgia fictícia (Sham), ovariectomizada (OVX), ovariectomizada+ TE2 (OE2), ovariectomizada+Natação (ON) e ovariectomizada+ TE2+ Natação (OE2+N). As figuras apresentadas são demonstrativas de dois resultados representativos. Os controles negativos foram incubados sem o anticorpo primário para a Ang-(1-7) e com IgG e não mostraram coloração ao DAB (dados não mostrados). A coloração amarronzada representa a expressão de Ang-(1-7) corada por DAB. Os cortes foram contra-corados com hematoxilina para a coloração nucléica. As áreas delimitadas representam a expressão de Ang-(1-7) no endotélio vascular. Painel superior com cortes de 50μm.

## 5 DISCUSSÃO

Durante a menopausa aumenta a incidência de doenças cardiovasculares, entre elas a hipertensão arterial, desencadeadas principalmente devido à diminuição dos níveis de 17- $\beta$ -estradiol (Wenger *et al.*, 1993). Paralelamente, a TE2 é uma alternativa terapêutica adotada neste estágio da vida da mulher. No entanto, embora resultados de estudos experimentais tenham demonstrado efeitos benéficos sobre o sistema cardiovascular desta terapia (Hernández *et al.*, 2000; Kang *et al.*, 2011; LeBlanc *et al.*, 2009), pesquisas clínicas não apresentaram efeitos que denotem proteção contra infarto agudo do miocárdio e outras doenças cardiovasculares (Hsia *et al.*, 2006), além de terem evidenciado aumentar no risco de desenvolvimento de câncer (Colditz GA, 1998). Portanto, os reais efeitos da TE2 sobre a saúde física permanecem inconclusivos. Por outro lado, o exercício físico promove uma série de adaptações fisiológicas, como diminuição da pressão arterial em repouso, conseqüentemente contribuindo para efetivo controle da perfusão sanguínea, que por sua vez auxilia no controle de doenças, como a hipertensão. O SRA é crítico na regulação da pressão arterial e patogênese da hipertensão, podendo ser uma alternativa no controle primário desta doença, por meio de abordagens farmacológicas e não farmacológicas que possam interferir neste sistema (Wu *et al.*, 1993; Oddie *et al.*, 1992). Assim, o exercício físico é uma das intervenções não-farmacológicas mais importantes prescritas para indivíduos hipertensos e entender a sua repercussão sobre o SRA torna-se de suma importância. Neste sentido, o objetivo do presente trabalho, foi analisar em ratas hipertensas ovariectomizadas, os efeitos crônicos do exercício físico e da TE2 sobre a reatividade de anéis de aorta aos dois principais fatores humorais do eixo vasoconstritor e vasodilatador do SRA, respectivamente, Ang II e Ang-(1-7). Ainda, buscamos elucidar as vias pela quais ocorrem estas possíveis modificações por meio de bloqueio farmacológico e análise bioquímica na expressão de proteínas e peptídeos envolvidos com este sistema.

No presente estudo demonstramos que o treinamento crônico de natação e/ou TE2 com E2 promovem diminuição da resposta vasoconstritora a Ang II e aumento na vasodilatação mediada pela Ang-(1-7) em anéis de aorta de ratas SHR ovariectomizadas. Estas modificações foram acompanhadas por mudanças na expressão dos receptores do SRA, AT2 e Mas, mas o bloqueio farmacológico, assim como a expressão de enzimas envolvida indiretamente ou diretamente no aumento da

capacidade vasodilatadora, Mn SOD2 e eNOS, nos permitem sugerir que a via pela qual ocorre estas alterações na reatividade podem ser diferentes quando comparado estes dois diferentes tratamentos.

*Efeitos da Terapia de Reposição Hormonal com E2 e/ou Treinamento Físico Crônico de Natação sobre o Peso Corporal de Ratas SHR ovariectomizadas.*

Estudos reportam que durante a transição para a menopausa, as fêmeas são acometidas por mudanças desfavoráveis na composição corporal, no qual podemos destacar o aumento do tecido adiposo e conseqüentemente, complicações na saúde física (Haarbo *et al.*, 1991). Particularmente, animais SHR apresentam diminuição da lipólise mediada pelas catecolaminas em adipócito isolado (Collison *et al.*, 2000), fator que em fêmeas, associado com as alterações hormonais da menopausa, influenciam diretamente no peso corporal.

Nossos resultados apontaram um ganho de peso do grupo OVX quando comparado ao SHAM e OE2, que pode ter sido causado pelo aumento no tecido adiposo, já que o E2 tem um reconhecido papel na modulação deste tecido (Kissebah *et al.*, 1989). Após a menopausa, os níveis de E2 insuficientes resultam em aumento no direcionamento da gordura corporal, principalmente na cavidade abdominal (Harboo *et al.*, 1991). Assim, a ovariectomia diminui a lipólise (Darimont *et al.*, 2000) e o tratamento com E2 reverte este efeito, além de diminuir a síntese de ácidos graxos (Hansen, Fahmy, Nielsen, 1980) e a deposição da gordura na região central (Harboo *et al.*, 1991). De igual forma, este efeito parece explicar o menor ganho de peso do grupo OE2+N, já que somente o treinamento físico não foi efetivo para impedir ganho de peso das ratas do grupo ON. Similar aos dados apresentados, trabalhos recentes de nosso grupo mostraram que somente o treinamento de natação de ratas OVX não foi capaz de prevenir o ganho de peso (Endlich *et al.*, 2013; Claudio *et al.*, 2013). Contudo, o treinamento físico pode ter sido eficiente para modificar a composição corporal, uma vez que, o peso corporal das ratas OVX treinadas foi significativamente maior quando comparado ao das ratas OVX treinadas e submetidas à TE2, mas o acúmulo de gordura na região visceral foi significativamente menor no grupo OVX treinado, de forma que os autores sugeriram aumento de massa magra (Claudio *et al.*, 2013).

Resultados similares foram encontrados por outros pesquisadores (Shinoda *et al.*, 2002; Zoth *et al.*, 2010).

*Efeitos da Terapia de Reposição Hormonal com E2 e/ou Treinamento Físico Crônico de Natação sobre a Pressão Arterial de Ratas SHR Ovariectomizadas.*

O treinamento aeróbio é recomendado como potente adjuvante no tratamento da hipertensão, pois atenua (mas não normaliza) a pressão arterial em repouso tanto em animais (Brum *et al.*, 2000; Melo RM, Martinho, Jr, Michelini LC, 2003; Felix JV, Michelini LC, 2007; Amaral SL, Zorn TM, Micheline LC, 2000), quanto humanos (Laterza *et al.*, 2007; Cardoso 2010). Neste sentido, os resultados do presente trabalho, mostraram ao final do tratamento menor valor de PAS em repouso dos grupos ON e OE2+N quando comparado aos grupos S, OVX e OE2. Além disso, somente os grupos treinados não apresentaram aumento significativo da PAS em repouso quando comparado aos seus valores iniciais, ou seja, estes grupos não apresentaram variação significativa da PAS quando comparado o momento pré-tratamento e o final do tratamento.

Em SHR, a castração de machos diminuiu a pressão arterial; já fêmeas ovariectomizadas quando tratadas com testosterona apresentaram aumento da pressão arterial para valores similares aos de machos intactos de mesma idade (Reckelhoff *et al.*, 1998), nos permitindo afirmar que nesta linhagem de ratos a testosterona apresenta importante papel no progresso da hipertensão. Por outro lado, o hormônio sexual feminino, 17- $\beta$ -estradiol, que tem seus níveis diminuídos significativamente após a ovariectomia, parece não ser o único fator responsável pelo progresso da hipertensão de ratas SHR. Wassman e colaboradores (2000) avaliaram a pressão arterial de fêmeas SHR submetidas à ovariectomia ou a Terapia de Reposição Hormonal com E2 e não encontraram diferença entre estes grupos, assim como os resultados do presente estudo. Adicionalmente, outros estudos não encontraram diferença na pressão arterial quando comparadas ratas SHR SHAM e ovariectomizadas (Dalpiaz *et al.*, 2013; Reckelhoff *et al.*, 2000). Embora o E2 tenha um reconhecido papel cardioprotetor, no período pós-menopausa de ratas SHR a dificuldade em controlar a pressão arterial se deve aos inúmeros fatores relacionados com o processo hipertensivo, tais quais: envolvimento da endotelina (Yanes *et al.*,

2005) e SRA (Yanes *et al.*, 2010) na manutenção da hipertensão; aumento dos hormônios androgênicos (Chen *et al.*, 1992), visto que estes animais apresentam níveis 4 vezes maior destes hormônios quando comparada às ratas jovens (Fortepiani *et al.*, 2003).

Com relação ao papel do exercício físico na modulação da pressão arterial em fêmeas hipertensas, estudos prévios não demonstraram diminuição da pressão arterial em ratas SHR treinadas (Amaral *et al.*, 2008; Coimbra *et al.*, 2008). Os autores atribuíram estes resultados à hipertrofia (relação parede-lúmen) do vaso sanguíneo de órgãos não exercitados como o rim, uma vez que o exercício físico foi eficiente somente em interferir na hipertrofia do vaso sanguíneo dos músculos exercitados, efeito que isolado não foi capaz diminuir a resistência vascular periférica total e consequentemente a pressão arterial. Cabe ressaltar, que estes estudos utilizaram treinamento físico crônico de corrida. Em contrapartida, o presente estudo utilizou protocolo de natação. De igual forma, Ikeda T *et al.* (1994), também encontraram atenuação significativa da pressão arterial de fêmeas treinadas cronicamente por meio de natação. Ademais, estudo utilizando ratas normotensas mostrou que após a ovariectomia o treinamento crônico de natação associado ou não a TE2, promoveu diminuição da pressão arterial (Flues *et al.*, 2010). Estes resultados nos permitem sugerir que a diminuição da pressão arterial em SHR pode ser exercício-dependente. O mecanismo pelo qual isso ocorre pode estar ligado ao peptídeo natriurético atrial (ANP). Em estudo prévio realizado por nosso grupo, machos SHR que realizaram treinamento físico por 8 semanas, apresentaram aumento nos níveis plasmáticos de ANP, somente pela natação, mas não pela corrida (Endlich *et al.*, 2011). O ANP apresenta reconhecido papel hipotensor, por meio de inúmeros fatores, dentre eles destaca-se a inibição de importantes componentes ligados ao eixo vasoconstritor do SRA (Potter *et al.*, 2006), uma vez que a inibição dos mesmos tem sido reconhecida como uma das principais adaptações responsáveis pela diminuição da pressão arterial decorrente do exercício físico (Felix *et al.*, 2007).

*Efeitos da Terapia de Reposição Hormonal com E2 e/ou Treinamento Físico Crônico de Natação sobre os Níveis Plasmáticos de Angiotensina II de Ratas SHR Ovariectomizadas.*

O SRA tem fundamental papel na regulação do sistema cardiovascular, sendo modulado por inúmeros hormônios, dentre eles o estrogênio. Por exemplo, um estudo realizado com ratas normotensas mostrou que a ovariectomia diminuiu a concentração plasmática de Ang II e aumentou a atividade da renina plasmática, e a TE2 aumentou os níveis de Ang II e diminuiu a atividade da renina plasmática (Xu *et al.*, 2008). Por outro lado, outro trabalho conduzido com ratas hipertensas mostrou que a TE2 diminuiu a concentração plasmática de renina, a atividade da sérica da ECA e a concentração plasmática de Ang II (Chapell *et al.*, 2003). No entanto, inúmeros estudos reportam que a TE2 diminuiu a atividade da ECA plasmática e tecidual (Brosnihan *et al.*, 1997; Chapell *et al.*, 2003; Dean *et al.*, 2005; Gallagher *et al.*, 1999). Assim, a partir destas informações, a modulação do estrogênio sobre os níveis plasmáticos de Ang II podem depender da condição cardiovascular ao qual a linhagem do animal estudado está submetido. No entanto, os estudos à cerca da repercussão de Ang II plasmática em função do estradiol são inconclusivos.

Em fêmeas, o treinamento de corrida com alta intensidade resultou em aumento na atividade da renina plasmática em condições de repouso (Oliveira *et al.*, 2009). No entanto, não encontramos estudos mostrando os efeitos do exercício físico sobre os níveis plasmáticos de Ang II. Entretanto, considerando esta escassez de informações, iremos discutir estes efeitos com o que já está elucidado em machos. Em animais hipertensos o exercício físico de natação afeta diferentemente a atividade das principais enzimas envolvendo o SRA em função da idade (Zamo *et al.*, 2011). Enquanto em adultos ocorre uma diminuição da atividade da ECA e renina plasmática, em animais jovens observou-se aumento da atividade da renina plasmática, mas em ambos os grupos de animais (jovens e adultos) houve diminuição da Ang II plasmática, no qual os autores associaram à diminuição da pressão arterial (Zamo *et al.*, 2011).

Os resultados de nosso trabalho mostraram que ambos os tratamentos aplicados, terapia de reposição hormonal e exercício físico, promoveram aumento nos níveis plasmáticos de Ang II. No entanto, apenas no grupo OE2 houve um aumento significativo da pressão durante o período de tratamento, enquanto nos grupos ON e OE2+N o aumento nos níveis plasmáticos de Ang II, não foi acompanhado de aumento na PAS. Assim, este aumento de Ang II plasmática e as respostas pressóricas encontradas podemos especular o envolvimento com o eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas e

maior repercussão sobre o receptor AT2. Esta associação entre níveis aumentados de Ang II e diminuição da pressão arterial via AT2 já foi analisada por outro estudo, no qual a infusão crônica de Ang II diminuiu a pressão em fêmeas Sprague-Dawley, efeito que foi abolido pelo bloqueio do receptor AT2 com PD123319 (Sampson *et al.*, 2008). Ademais, houve aumento na expressão de RNA<sub>m</sub> da ECA 2 no rim. Contudo, mais estudos *in vivo* realizando o tratamento necessário com os bloqueadores destas vias, se fazem necessário para evidenciar esta nossa especulação.

### *Efeitos da Terapia de Reposição Hormonal com E2 e/ou Treinamento Físico Crônico de Natação sobre a Reatividade Vascular de Aorta à Angiotensina II de Ratas SHR ovariectomizadas*

Homens apresentam maior risco de doenças cardiovasculares quando comparados a mulheres de idade similar. Ainda, homens apresentam maior pressão arterial que mulheres (Burt *et al.*, 1995; Wiinberg *et al.*, 1995). No entanto, essas diferenças sexuais mudam em decorrência da menopausa, quando o risco de doenças cardiovasculares e a prevalência de hipertensão aumenta em mulheres (Kannel WB, 2002). Por sua vez, inúmeros tratamentos/terapias são aplicados nesta fase e entender a sua repercussão no processo, torna-se importante para avaliar e comparar a sua eficiência. Neste sentido, fêmeas SHR são reconhecidas como importante modelo para estudo de hipertensão pós-menopausa (Fortepiani *et al.*, 2003). Sendo assim, utilizamos ratas SHR ovariectomizadas para estudar os efeitos do treinamento físico de natação e/ou terapia de reposição hormonal com E2 na reatividade vascular de anéis de aorta a Ang II.

Em fêmeas SHR a atividade da renina plasmática está aumentada na pós-menopausa quando comparada a ratas não menopausadas jovens (Fortepiani *et al.*, 2003). Ademais, o tratamento com losartan, um bloqueador do receptor AT1, diminuiu a pressão arterial (mas não normaliza), destes animais (Yanes *et al.*, 2010). Neste sentido, podemos admitir que ratas SHR com deficiência de estrogênio apresentam maior ativação do eixo clássico do SRA, Ang II/ECA/AT1, sendo este um dos principais responsáveis pelo aumento pressórico. Assim, Wassmann e colaboradores (2001) avaliaram o efeito do estrogênio sobre a reatividade de anéis de aorta a Ang II

em SHR ovariectomizadas tratadas com E2. Os resultados mostraram que após ovariectomia a resposta constritora a Ang II foi maior quando comparado ao grupo SHAM e ovariectomizado tratado com E2. Nossos resultados corroboram com o do referido trabalho. O mecanismo pelo qual ocorreu este aumento na resposta tensora do grupo OVX quando comparado ao S pode ter sido decorrente do aumento na expressão de AT1 - receptor responsável por mediar os efeitos vasoconstritores de Ang II (Carey e Siragy, 2003)- uma vez que a deficiência de estrogênio promove *upregulation* deste receptor (Wassmann *et al.*, 2001; Dean *et al.*, 2005; Nickenig *et al.*, 1998). Especulamos que a via pela qual AT1 promoveu aumento na tensão no grupo OVX ocorreu pela produção das espécies reativas de oxigênio, uma vez que a Ang II quando se liga a este receptor, ativa a NAD(P)H oxidase aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio e diminuindo a biodisponibilidade de NO (Yung *et al.*, 2011), sendo que este mecanismo foi descrito anteriormente em animais SHR (Wassmann *et al.*, 2001) e embora não tenhamos analisado a expressão ou atividade das subunidades da NAD(P)H, encontramos no animal OVX notório aumento na produção das espécies reativas de oxigênio, conforme evidenciado pela fluorescência emitida pelo DHE. No entanto, a menor resposta tensora do grupo OE2 comparado ao grupo OVX de nosso trabalho pode ter ocorrido por outra via alternativa, no qual sugerimos ocorrer pela maior ativação do receptor AT2, uma vez que o seu bloqueio resultou em aumento da resposta tensora, alcançando níveis similares ao grupo OVX, bem como o dAUC quando o receptor AT2 foi bloqueado, com PD123319, foi significativamente maior no grupo OE2, mostrando efetiva participação destes receptores na atenuação da resposta vasoconstritora a Ang II via AT1. Van Esch e colaboradores (2006) mostraram em camundongos, que a ativação do receptor AT2 ocorre mediante ativação de AT1, concluindo que o receptor AT2 somente contrabalança os efeitos pressóricos de AT1, não promovendo vasodilatação quando ativado sozinho, esses resultados explicam o aumento dos efeitos pressóricos da Ang II quando efetuamos o bloqueio do receptor AT2. Embora, estudo tenha demonstrado aumento da expressão do receptor AT2 promovido pelo estrogênio (Baiardi *et al.* 2004), no presente trabalho não encontramos diferença na expressão deste receptor entre o grupo OVX e OE2. Ademais, Yung *et al.* (2001) não evidenciaram aumento na expressão desses receptores em ratas normotensas ovariectomizadas.

Ao analisamos a produção das espécies reativas de oxigênio em um animal OE2 e notamos claramente diminuição da fluorescência ao DHE quando comparado ao animal OVX, desta forma podemos inferir que este possa ser o fator responsável por

esta diferença. As espécies reativas de oxigênio podem ser geradas pela NAD(P)H oxidase (Strehlow *et al.* 2003), enzima que apresenta expressão e atividade diminuída em ratas ovariectomizadas tratadas com E2, tanto em SHR (Sullivan *et al.*, 2009), quanto em ratas normotensas (Yung *et al.*, 2001), comparadas a ratas OVX de mesma linhagem. O ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), uma espécie reativa de oxigênio, reage com NO formando peróxido de nitrito ( $ONOO^-$ ) e conseqüentemente diminuindo a biodisponibilidade deste importante fator vasodilatador (Strehlow *et al.* 2003). Avaliamos ainda, se a diminuição na produção dos radicais livres estaria ligado ao aumento na expressão da enzima do sistema anti-oxidante Mn SOD 2, mas não houve diferença na expressão desta enzima quando comparado aos grupos OVX e OE2. Outro estudo mostrou que as enzimas do sistema anti-oxidante, glutathiona-peroxidase, SOD e catalase não tiveram sua expressão alterada pelos níveis de E2 (Wagner *et al.*, 2001). Embora nestes grupos de animais (S, OVX e OE2) não tenha sido encontrada diferença na expressão do receptor AT2, o grupo OE2 pode ter apresentado menor geração de ânion superóxido, aumentando a biodisponibilidade de NO, que destaca-se como principal mediador da vasodilatação induzida por este receptor (Tsutsumi *et al.*, 1999; Batenburg *et al.*, 2005). Em consonância, destaca-se o fato da curva concentração-resposta de Ang II mediante o bloqueio do NO, ter apresentado aumento na resposta tensora no grupo OE2, de forma que não houve diferença entre o grupo OVX e OE2; assim como, neste mesmo grupo houve aumento significativo na dAUC com L-NAME em relação a situação controle, logo mostrando que o NO contribuiu significativamente como mediador contrarregulatório dos efeitos pressores de Ang II. Por fim, destacamos o fato do grupo OE2 ter apresentado considerável aumento na expressão da eNOS, enzima responsável pela síntese de NO e embora o mecanismo vasodilatador de AT2 carece de maiores esclarecimentos, existem inúmeros relatos associando o NO como o fator responsável pela vasodilatação mediada por este receptor (Siragy HM, Carey RM, 1996; Siragy HM, Carey RM, 1997; Hannan *et al.*, 2003). O mecanismo pelo qual a exposição ao E2 aumenta a expressão da eNOS tem sido bastante estudado em cultura de células endoteliais e parece ser tempo-dependente. Em humanos, a expressão da eNOS e produção de NO esteve aumentada no endotélio aórtico após 8 horas ou mais de exposição ao estrogênio (Schivone *et al.*, 1988). Estas mesmas respostas foram encontradas em células endoteliais de ovinos (Yamamoto *et al.*, 1992). Desta forma, o estrogênio exerce efeitos diretos no vaso sanguíneo, tais quais, aumento na síntese de NO e modulação na expressão da eNOS (Jiang *et al.*, 1991; Latin-Hermoso *et al.*, 1997; Caulin-Glaser *et al.*, 1997).

Além disso, avaliamos o efeito do exercício físico por meio do treinamento crônico de natação associado ou não, a TE2 na resposta tensora a Ang II. Nossos resultados evidenciaram que o exercício físico, independente da TE2, apresentou potente efeito na diminuição da resposta vasoconstritora de Ang II comparado aos demais grupos de animais sedentários (SHAM, OVX e OE2). De forma similar, Izawa *et al.* (1995) encontrou atenuação da resposta vasoconstritora a Ang II em anéis de aorta de animais normotensos em decorrência do exercício crônico de corrida. Em trabalho recente publicado pelo nosso grupo, Endlich *et al.* (2013), mostraram diminuição da reatividade a Ang II no leito coronariano de ratas normotensas ovariectomizadas.

Assim, em nosso estudo buscando evidenciar o mecanismo pelo qual o treinamento crônico de natação promoveu esta diminuição na resposta tensora a Ang II, foi realizado o bloqueio da NOS com L-NAME e foi construída uma curva concentração-resposta a Ang II. O dAUC dos grupos ON e OE2+N foi significativamente maior mediante o bloqueio da NOS com L-NAME quando comparado aos demais grupos, evidenciando significativa contribuição do NO no abrandamento da resposta tensora a Ang II nestes grupo de animais treinados. Contudo, o mecanismo pela qual ocorreu o efeito vasodilatador do NO para contrabalancear a resposta vasoconstritora de Ang II ocorreu pode ter acontecido por vias diferentes. Estudo realizado com humanos, evidenciou que o exercício físico diminui a vasoconstrição mediada pela Ang II em artéria mamária, além de promover diminuição das espécies reativas de oxigênio, expressão do RNA<sub>m</sub> do receptor AT1 e das subunidades gp91<sup>phox</sup> e p22 da NAD(P)H oxidase, assim como aumento na expressão do RNA<sub>m</sub> do receptor AT2 (Adams *et al.*, 2005; Batenburg *et al.*, 2005).

Ao analisarmos a fluorescência ao DHE do animal SHAM, OE2 e OE2+N, podemos notar que são bem similares. Em contraposição, o animal OVX apresentou maior fluorescência comparado aos demais grupos, fato que denota maior produção de espécies reativas de oxigênio. De igual forma ao grupo OE2, no grupo OE2+N o estrogênio pode ter modulado a atividade e expressão da NAD(P)H oxidase, diminuindo a formação das espécies reativas de oxigênio e assim, aumentando a biodisponibilidade de NO, importante mediador da vasodilatação do receptor AT2, que teve expressão aumentada no grupo OE2+N. No entanto, o bloqueio do receptor AT2

não modificou a resposta tensora de Ang II neste grupo. Uma possível explicação seria o aumento do eixo vasodilatador ECA2/Ang(1-7)/Mas. Quando analisamos a expressão de Ang-(1-7) na aorta do animal OE2+N, esta se mostrou similar ao animal SHAM e maior quando comparado ao animal OVX. Este resultado nos permite sugerir que no animal OE2+N ocorreu aumento na atividade e/ou expressão local da ECA2, enzima que catalisa preferencialmente a Ang II em Ang-(1-7) (Vickers *et al.*, 2002). Assim, este possível aumento na formação de Ang (1-7) local e/ou a partir de aumento do substrato preferencial para a ECA2, Ang II, pode ter promovido os efeitos contrarregulatórios na tensão. Fernandes e colaboradores (2011) encontraram mecanismo similar no coração de ratas normotensas treinadas por meio da natação. Os resultados apontaram aumento na expressão da ECA 2, com aumento na razão Ang-(1-7)/Ang II dos grupos treinados em comparação ao grupo SHAM, sugerindo que o treinamento aeróbio promoveu aumento da formação de Ang(1-7) a partir da Ang II mediado pela ECA 2 (Fernandes T *et al.*, 2011). Similarmente, outro estudo mostrou que o treinamento crônico de natação promoveu no ventrículo esquerdo de ratos SHR aumento de Ang-(1-7) e do receptor Mas (Filho *et al.*, 2008). De forma semelhante, em nosso trabalho, também encontramos no grupo OE2+N aumento significativo do receptor Mas em segmentos de aorta torácica, sugerindo que a Ang-(1-7) local (evidenciada pelo aumento no animal OE2+N) pode ter exercido efeitos vasodilatadores contrareguladores. Desta forma, concluímos a partir de nossos dados que em fêmeas SHR ovariectomizadas e tratadas com E2 associado ao treinamento crônico de natação, a atenuação da resposta tensora a Ang II pode ocorrer pelo aumento da expressão do receptor AT2. No entanto, mediante bloqueio destes receptores, outro mecanismo pode atenuar a resposta tensora de Ang II, como sugerimos pela via envolvendo o eixo Ang-(1-7)/ECA2/Mas. Cabe ressaltar, ainda que tanto AT2, quanto Mas, apresentam o NO como mediador de sua vasodilatação, conforme será abordado nesta seção e no grupo OE2+N houve aumento significativo na expressão da eNOS, enzima responsável pela síntese de NO, sendo este efeito possivelmente modulado pelo estrogênio, todavia que o grupo ON não apresentou aumento na expressão desta enzima.

O grupo ON também apresentou diminuição da resposta tensora a Ang II quando comparado aos demais grupos de animais sedentários, S, OVX e OE2. O mecanismo pelo qual isso ocorreu pode ter se dado de forma parecida com o grupo OE2+N, já que este também apresentou aumento na expressão dos receptores AT2 e Mas, além de aumento na síntese de Ang-(1-7) no endotélio aórtico e diminuição na geração das

espécies reativas de oxigênio do animal ON avaliado. O mecanismo pelo qual o receptor Mas promove vasodilatação via Ang-(1-7) está ligado ao NO, no qual este receptor promove a estimulação da eNOS no fragmento de serina1177 e pela desfosforilação na treonina 495 (Sampaio et al. 2007). Estes efeitos parecem ser mediados em parte pela via da fosfatidilinositol 3-kinase/Akt (PI3K-Akt) (Sampaio et al. 2007). Assim, reforçando uma das hipóteses supracitadas, em nosso estudo encontramos no grupo ON aumento na expressão da Akt 1/2/3, bem como os resultados apontaram aumento da ativação desta enzima, evidenciado por meio do aumento da Akt 1/2/3 fosforilada no fragmento de serina 473. E, apesar, de não termos avaliado a peNOS ser1177, mostramos no grupo ON o NO como um importante mediador na atenuação da resposta vasoconstritora de Ang II, confirmado pelo aumento da dAUC de NO. Sustentando esta hipótese, estudo mostrou em ratos SHR que uma única sessão de exercício aumenta a fosforilação da eNOS, fato associado a diminuição da pressão em função do exercício (Lee *et al.*, 2009). Entretanto, outros estudos apresentaram aumento na expressão vascular de eNOS em decorrência do exercício físico crônico e conseqüentemente levando a uma melhora na vasodilatação dependente do endotélio (Kuru *et al.*, 2009; McAllister RM, Price EM, 2010).

Adicionalmente, no presente estudo, o aumento na biodisponibilidade de NO no grupo ON pode ter sido decorrente do aumento da capacidade anti-oxidante, haja visto que neste grupo houve aumento na expressão da Mn SOD 2 e diminuição das espécies reativas de oxigênio quando comparado ao animal OVX. Por exemplo, Rajagopalan e colaboradores (1996) mostraram que doses farmacológicas de Ang II aumentou a tensão e os níveis de ânion superóxido via NAD(P)H oxidase em segmentos aórticos de ratos, enquanto a infusão de norepinefrina resultou em aumento similar a Ang II, sem modificação nos níveis de ânion superóxido. No entanto, o aumento de enzimas anti-oxidantes como a superóxido dismutase extracelular e mitocondrial (ecMg SOD e Mn SOD), diminui a formação de ânion superóxido, aumentando a biodisponibilidade de NO (Strehlow *et al.*, 2003). Em trabalho recente de nosso grupo, Claudio *et al.* (2013), mostraram aumento na expressão de enzimas anti-oxidantes, tais quais, a isoforma citoplasmática da SOD1 e catalase em artérias coronárias de ratas normotensas treinadas por meio de natação e/ou terapia de reposição hormonal com E2 com protocolo idêntico ao do presente trabalho. Contudo, neste trabalho não foi encontrado diferença na expressão da Mn SOD2 (Claudio *et al.* 2013).

Estes resultados nos permitem admitir que no grupo ON o efeito contrarregulatório de Ang II ocorreu devido aumento na expressão da Mn SOD2 e receptor AT2. Contudo, no grupo ON (assim como no grupo OE2+N) quando este receptor esteve bloqueado pelo PD123319, não houve modificação na resposta tensora de Ang II, no qual especulamos o eixo Ang(1-7)/ECA2/Mas exercendo este efeito contrarregulatório sob estas condições. Suportando esta hipótese, estudo mostrou que a Ang-(1-7) pode antagonizar o efeito pressor da Ang II (Mahon et al. 1994) e ainda este peptídeo reduziu o aumento  $[Ca^{2+}]_i$  promovido pela Ang II e Ang IV em células mesangiais (Chansel et al. 2001). Por fim, outros estudos mostraram que a Ang-(1-7) é um modulador intracelular da Ang II, antagonizando a ativação da proteína kinase C e ERK 1/2 em células de músculo liso vascular (Zhu et al. 2002) e atenuando a geração das espécies reativas de oxigênio induzidas pela Ang II (Sampaio et al. 2007a).

*Efeitos da Terapia de Reposição Hormonal com E2 e/ou Treinamento Físico Crônico de Natação sobre a Reatividade Vascular de Aorta à Angiotensina 1-7 de Ratas SHR Ovariectomizadas*

Por conseguinte, buscamos estudar os efeitos do exercício físico por meio de protocolo de natação e/ou Terapia de Reposição Hormonal com E2 sobre a reatividade vascular de aorta à Ang-(1-7) em fêmeas SHR ovariectomizadas.

O resultado de estudo conduzido com ratas prenhas (período no qual os níveis de estrogênio aumentam significativamente para que haja a manutenção da gestação) mostrou aumento na vasodilatação à Ang-(1-7) em artérias mesentéricas de resistência quando comparado às ratas virgens (Neves et al., 2003). Por outro lado, em ratas ovariectomizadas submetidas à TE2 com baixas concentração de estrogênio, não foi encontrada alteração na resposta vasodilatadora a Ang-(1-7) em anéis de aorta (Grobe e Katovich, 2006). Nossos resultados mostraram que as ratas OVX apresentaram prejuízo na vasodilatação mediada pela Ang-(1-7) quando comparado aos grupos S. Ademais, a Terapia de Reposição Hormonal com E2 não foi capaz de modificar esta resposta no grupo OE2. Por conseguinte, a partir destes dados, podemos sugerir que a reposição exógena de E2 não exerce o mesmo efeito que o E2

endógeno ou a concentração e o tipo de estrogênio utilizado na terapia pode repercutir fisiologicamente diferente. Neste sentido, nossos resultados mostraram que o grupo OE2+N não apresentou diferença na resposta vasodilatadora a Ang-(1-7) quando comparado ao grupo ON, ou seja, mostrando que a TE2 não exerceu efeito adicional nesta resposta. No entanto, ambos os grupos treinados, ON e OE2+N, melhoraram esta resposta comparados ao grupo OVX, sendo este efeito acompanhado pelo aumento na expressão do receptor Mas em ambos os grupos. Similarmente, em machos SHR o treinamento crônico de natação foi capaz de aumentar a resposta vasodilatadora a Ang-(1-7) em anéis de aorta (Silva *et al.*, 2011), assim como aumentou a expressão do RNA<sub>m</sub> e da proteína do receptor Mas no ventrículo esquerdo (Gomes Filho *et al.*, 2008). Além disso, notamos aumento de Ang-(1-7) no endotélio do segmento aórtico do animal ON e OE2+N, sugerindo que este efeito pode ter sido mais ativo *in vivo*. Fernandes *et al.* (2011) encontraram em fêmeas submetidas ao modelo de hipertensão 2 rins 1 clipe (2K1C) aumento da expressão cardíaca de Ang-(1-7) e ECA2 em decorrência do treinamento crônico de natação.

Sabe-se que a Ang-(1-7) possui pouca afinidade com o receptor AT2 (Rowe *et al.* 1995). Entretanto, estudos evidenciaram a existência de oligomerização ou interação funcional entre os receptores de Ang-(1-7) e Ang II (Castro *et al.*, 2005; Roks *et al.*, 1999). Neste sentido, Walters e seus colaboradores (2005) mostraram em ratos SHR, que o tratamento com candesartan, bloqueador de AT1, associado à Ang-(1-7) promove atenuação da pressão arterial, efeito este que se manteve inalterado mediante a associação com A779 e extinto com PD123319, sugerindo um possível efeito vasodepressor da Ang-(1-7) via receptor AT2. Além disso, outro estudo demonstrou maior seletividade dos receptores AT2 para Ang-(1-7) comparado a Ang II na membrana basolateral do túbulo proximal (De Souza *et al.*, 2004). Ademais, a via pela qual parece ocorrer este efeito vasodepressor de Ang-(1-7) via AT2, postula-se ser mediada pelos receptores de bradicinina e NO, mecanismo já evidenciado em artérias coronárias de porco (Li *et al.*, 1997; Gorelik *et al.*, 1998; Brosnihan *et al.*, 1996; Paula *et al.*, 1995). Por fim, foi reportado em cultura de célula endotelial bovina vasodilatação via Ang-(1-7), por um mecanismo dependente da via bradicinina/NO, que foi atenuado quase completamente utilizando antagonista de AT2 (Heitsch *et al.*, 2001). Estes dados explicam os resultados encontrados em nosso estudo, uma vez que a incubação dos anéis de aorta associada ao bloqueador do receptor AT2, PD123319, atenuou notoriamente o efeito vasodilatador promovido pela Ang-(1-7) dos

grupos ON e OE2+N comparados ao OVX, nos levando a acreditar que este efeito vasodilatador de Ang-(1-7) ocorreu via AT2.

Estudo prévio não demonstrou efeito depressor do CGP42112, agonista de AT2, em animais tratados com doses altas de candesartan (Barber *et al.*, 1999). No entanto, outro trabalho mostrou vasodilatação de Ang-(1-7) via AT2 em ratos SHR tratados com candesartan (Walters *et al.*, 2005). Estes pesquisadores sugeriram maior seletividade do receptor AT2 pela Ang-(1-7) neste modelo animal de hipertensão (Walters *et al.*, 2005). Contudo, os trabalhos referidos foram realizados com machos e utilizamos em nosso estudo fêmeas, postulando uma possível resposta adicional ao exercício físico da TE2 no grupo OE2+N. Nossos resultados mostraram aumento na expressão do receptor AT2 nos grupos ON e OE2+N, assim de acordo com o que foi abordado anteriormente, este pode ter sido um dos fatores que restabeleceu a resposta vasodilatadora de Ang-(1-7) nestes grupos. Todavia, não foi evidenciado em nosso trabalho, nenhum efeito adicional do E2 ao treinamento físico, visto que não houve diferença na resposta vasodilatadora da dose máxima entre os grupos S, ON e OE2+N. Por outro lado, o estrogênio endógeno, mas não o exógeno, parece exercer efeitos nesta adaptação, uma vez que o grupo S apresentou maior resposta dilatadora comparada a OVX.

Outro resultado que nos chamou atenção foi a curva concentração-resposta de Ang-(1-7) mediante bloqueio do receptor Mas, com A779. Nossos resultados evidenciaram vasodilatação dose-dependente em todos os grupos e não foi encontrada diferença na dAUC quando comparada às curvas de Ang-(1-7). Ainda, foi encontrada maior vasodilatação no grupo S comparado ao OVX, mas não havendo diferença entre o OVX e OE2. Por fim, as ratas ovariectomizadas treinadas apresentaram melhoria do efeito vasodilatador via Ang-(1-7), uma vez que o grupo ON e OE2+N apresentou aumento significativo na vasodilatação comparado ao OVX.

Santos e colaboradores (2003) identificaram o receptor Mas como o sítio ligante para a Ang-(1-7) e ainda mostraram efeito vasodilatador via Ang-(1-7) em anéis de aorta. Desta forma, estudo que utilizou os antagonistas do receptor Mas, D-Pro<sup>7</sup>- Ang-(1-7) e A779, evidenciou resposta similar na inibição da dilatação induzida pela Ang-(1-7), sugerindo que o efeito inibitório destes antagonistas ocorre no mesmo sítio de ligação

(Santos *et al.*, 2003). No entanto, o bloqueio do receptor Mas com A779 ou D-Pro<sup>7</sup>-Ang-(1-7), assim como em camundongos knockout para Mas, este efeito vasodilatador de Ang-(1-7) foi completamente abolido em anéis de aorta de camundongos (Lemos *et al.*, 2005). Por fim, outro estudo demonstrou pouca alteração da resposta vasodilatadora de Ang-(1-7) em anéis de aorta quando realizado o bloqueio do Receptor Mas. Por exemplo, Silva e colaboradores (2007) demonstraram que a vasodilatação induzida pela Ang-(1-7) foi completamente abolida pelo antagonista do receptor Mas, D-Pro<sup>7</sup>-Ang-(1-7), mas não pelo A779, em anéis de aorta de ratas Sprague-Dawley. Cabe ressaltar, que a incubação com A779 (10µM) foi realizada vinte minutos antes da pré-constricção com fenilefrina (concentração cem vezes maior que a necessária para promover o bloqueio completo do receptor Mas em anéis de aorta de camundongos) (Silva *et al.*, 2007), sendo a mesma concentração usada em nosso estudo. Por outro lado, estes autores especularam existir um subtipo de receptor para Ang-(1-7) (Silva *et al.*, 2007) ou esta resposta pode depender do leito vascular e espécie estudada (Santos *et al.*, 2003). Entretanto, não foi encontrado estudo envolvendo fêmeas SHR e reatividade vascular de aorta a Ang-(1-7) mediante bloqueio do receptor Mas nos bancos de dados consultados, para que pudéssemos comparar os resultados do presente estudo com achados prévios. Contudo, Silva e seus colaboradores (2011) ao avaliar a reatividade vascular de aorta de ratos SHR treinados por meio de natação durante 8 semanas, evidenciaram abolição da resposta vasodilatadora de Ang-(1-7) quando os anéis foram encubados com A779 (0,1µM) ou D-Pro<sup>7</sup>-Ang-(1-7). Desta forma, baseados nestes estudos supracitados e em nossos achados, podemos sugerir que fêmeas, mas não machos, independente da linhagem, podem apresentar um subtipo de receptor para Ang-(1-7) capaz de provocar vasodilatação.

Estudo prévio realizado com artéria isolada mesentérica mostrou que o estrogênio aumenta a resposta vasodilatadora a Ang-(1-7) tanto em ratas intactas, quanto ovariectomizadas tratadas com E2 (Neves *et al.*, 2004). Nossos resultados, também evidenciaram vasodilatação significativamente maior a Ang-(1-7) no grupo S quando comparado ao grupo OVX mediante bloqueio do receptor Mas. Contudo, a TE2 não reestabeleceu esta resposta. Os motivos desta diferença entre os nossos resultados e o de Neves *et al.*(2004), pode ser devido a linhagem de ratas utilizadas (SHR vs. Sprague Dawley) e concentração de E2 utilizado na terapia, já que no nosso estudo os níveis de E2 não foram diferentes entre os grupos que receberam a terapia e o S, enquanto no outro estudo em questão os níveis deste hormônio foram até vinte e três

vezes maior que o grupo de animais intactos. Ademais, o exercício físico, independente da TE2, apresentou maior resposta vasodilatadora de Ang-(1-7) na presença de A779, sendo que os grupos ON e OE2+N apresentaram vasodilatação significativamente maior que o grupo OVX. Estes resultados funcionais corroboram com nossos achados dos estudos bioquímicos, uma vez que estes grupos apresentaram aumento da expressão do receptor Mas quando comparado aos demais grupos. Entretanto, o antagonista deste receptor estava incubado nos banhos, A779, podendo esta ligação ter ocorrido em um subtipo do receptor Mas, conforme sugerido anteriormente. Esta nossa hipótese de que este possível subtipo de receptor está presente somente em fêmeas é sustentado, pelas observações em machos SHR, o treinamento crônico de natação aumenta a resposta vasodilatadora a Ang-(1-7) e o bloqueio do receptor Mas com A779 ou D-Pro<sup>7</sup>- Ang-(1-7) abole completamente a resposta vasodilatadora de Ang-(1-7) (Silva *et al.*, 2011). Desta forma, outros experimentos devem ser realizados para que possamos explorar mais estas informações.

Estudos prévios demonstraram que o receptor AT2 é contrarregulatório das ações vasoconstritoras de Ang II via AT1, assim dentre uma dessas ações destaca-se a vasodilatação. Embora a via ainda não esteja completamente esclarecida, especula-se ocorrer por um mecanismo endotélio-dependente, envolvendo receptores de Bradicinina do tipo 2 (BK2), NO e guanosina cíclica 3',5'-monofosfato (Siragy HM, Carey RM, 1996; Siragy HM, Carey RM, 1997; Hannan *et al.*, 2003). Similarmente, a via pela qual a Ang-(1-7) promove seu efeito vasodilatador por meio do receptor Mas ainda não está inteiramente elucidada, mas há forte indício que ocorra intermediado pelo NO, no qual este receptor promove a estimulação da eNOS no fragmento de serina1177 e sua inibição pela desfosforilação na treonina 495 (Sampaio *et al.* 2007). Estes efeitos parecem ser mediados pela via da PI3K-Akt (Sampaio *et al.* 2007). Além disso, Ang-(1-7) potencializa a resposta vasodilatadora de Bradicinina (Fernandes *et al.*, 2001). Por sua vez, avaliamos a resposta vasodilatadora de Ang-(1-7) mediante o bloqueio das isoformas da NOS, com L-NAME e houve quase completa inibição da resposta vasodilatadora de Ang-(1-7) em todos os grupos, de forma que não foi encontrada diferença na curva concentração-resposta de Ang-(1-7) entre os grupos quando realizado este bloqueio. Desta forma, podemos sugerir que a resposta vasodilatadora de Ang-(1-7) ocorreu via Mas ou AT2, sendo o NO o principal mediador desta resposta. Além disso, especulamos que no grupo ON a resposta vasodilatadora de NO ocorreu via da PI3K-Akt, haja visto que este grupo apresentou aumento

significativo da Akt fosforilada no fragmento de serina 473. Esta ativação da eNOS, pela PI3K-Akt via Mas, foi reportada como sendo um possível mecanismo pelo qual o receptor Mas promove vasodilatação, conforme estudo prévio já havia relatado (Sampaio et al. 2007).

O vaso sanguíneo é o local mais importante para a formação e as ações da Ang-(1-7) (Santos *et al.*, 2000). Assim, como pôde ser observado na marcação imunohistoquímica houve um aumento na expressão de Ang-(1-7) no endotélio da aorta em todos os animais, com exceção do animal OVX e OE2. Assim, podemos dizer que o produto final da reação catalisada pela ECA2, esteve aumentada nos animais S, ON e OE2+N. Além disso, os grupos ON e OE2+N apresentaram aumento na expressão de Mas. Assim, podemos sugerir que o eixo vasodilatador ECA2/Ang-(1-7)/Mas esteve mais ativo nos grupos de animais treinados *in vivo*. No entanto, não avaliamos quantitativamente a expressão de Ang-(1-7) na parede da aorta dos grupos e desta forma não podemos fazer nenhuma inferência para os grupos. Outros estudos utilizando o protocolo de natação para treinamento físico de encontraram alterações no eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas, tais quais, aumento na expressão e atividade de ECA2, com significativo aumento de Ang-(1-7) no ventrículo esquerdo de ratas normotensas (Fernandes *et al.*, 2011); aumento de Ang-(1-7) e expressão do RNAm do receptor Mas no ventrículo esquerdo tanto de machos SHR (Gomes Filho *et al.*, 2008), quanto em fêmeas hipertensas 2K1C (Shah *et al.*, 2012); aumento na expressão do receptor Mas em aorta de ratos SHR (Silva *et al.*, 2011).

Outro ponto importante a ser ressaltado, refere-se ao estresse oxidativo, no qual foi avaliado qualitativamente pela marcação fluorescente ao DHE. Notoriamente, podemos perceber que o animal OVX apresentou aumento na produção das espécies reativas de oxigênio comparado aos demais animais, ou seja, podemos sugerir que tanto o estradiol, assim como o treinamento físico foi efetivo em diminuir o estresse oxidativo. Yung *et al.* (2011) reportaram que o aumento nas espécies reativas de oxigênio causados pelo aumento na expressão das subunidades gp91<sup>phox</sup> e p22<sup>phox</sup> da NAD(P)H oxidase e do receptor AT1 em ratas ovariectomizadas é um dos principais fatores responsáveis pela disfunção endotelial, repercutindo em prejuízo na reatividade vascular. Por conseguinte, a estimulação de AT1 pela Ang II estimula a NAD(P)H oxidase, resultando em aumento na geração do ânion superóxido (Yung *et al.*, 2011). Por outro lado, avaliamos a expressão da enzima Mn SOD2 na parede da

aorta e encontramos aumento significativo somente no grupo ON, por sua vez mostrando que o exercício físico, mas não quando associado a TE2, promove melhoria em uma importante enzima do sistema anti-oxidante. Graham DA e Rush JWE (2004) não encontraram alteração na expressão de enzimas anti-oxidantes, tais quais, SOD 1, SOD 2 e catalase em ratos SHR treinados cronicamente por meio de protocolo de corrida. No entanto, outro estudo reportou em ratos SHR treinados aumento da atividade da SOD e catalase, contribuindo para diminuição na produção das espécies reativas de oxigênio (Gu *et al.*, 2013). Estudos conduzidos com fêmea mostraram aumento da isoforma EC Cu/Zn-SOD1, não havendo diferença na expressão da Mn SOD 2 em decorrência do treinamento físico, mas não havendo efeito somatório quando este tratamento foi associado a TE2 (Claudio *et al.*, 2013).

Interessante notar, que ambos os receptores envolvidos com os mecanismos vasodilatadores do SRA, ocorrem via NO e a diminuição das espécies reativas de oxigênio como o ânion superóxido, devido o aumento de enzimas envolvidas no sistema anti-oxidante, podem aumentar a biodisponibilidade deste agente vasodilatador. Particularmente, em nosso estudo, o aumento da Mn SOD2, pode ter aumentado a eficiência contraregulatória do receptor Mas e AT2, através de aumento na biodisponibilidade de NO. Outro estudo mostrou em SHR treinados diminuição da expressão da subunidade gp91<sup>phox</sup>, aumentando a síntese de NO derivado do endotélio, resultando em melhoria da vasodilatação dependente do endotélio (Graham e Rush, 2004). Ainda, outro trabalho conduzido com machos SHR, mostrou que o treinamento físico de esteira promoveu atenuação da atividade simpática sobre o coração e hipertrofia cardíaca, como resultado da diminuição do estresse oxidativo e consequente aumento na biodisponibilidade de NO (Bertagnolli *et al.*, 2008).

## 6 CONCLUSÃO

Os dados estatísticos apontam números alarmantes na incidência de doenças cardiovasculares ao qual as mulheres são acometidas na pós-menopausa. Por sua vez, pesquisas clínicas e experimentais buscando elucidar a razão destes números mostram uma íntima associação entre os baixos níveis de E2 e estas doenças, dentre as quais destaca-se a hipertensão arterial.

A hipertensão arterial apresenta um aumento na atividade e expressão dos componentes do SRA. No entanto, tanto a terapia estrogênica, quanto o exercício físico crônico causam importantes alterações neste sistema, colaborando para diminuir a progressão desta doença.

Utilizamos em nosso estudo, ratas SHR ovariectomizadas, para estudar os efeitos da terapia estrogênica, assim como do treinamento físico crônico aeróbio, na reatividade de artéria aorta, focando na modulação do Sistema Renina-Angiotensina. Os resultados apontaram que o treinamento crônico de natação, assim como a sua associação à terapia estrogênica, levaram a atenuação da pressão arterial em condições de repouso. Estas modificações foram acompanhadas de aumento nos níveis plasmáticos de Ang II. Por sua vez, o exercício físico, repercutiu positivamente sobre a reatividade vascular de aorta, atenuando o efeito pressórico da angiotensina II e melhorando a resposta vasodilatadora mediada pela Ang-(1-7). Paralelamente, estas modificações funcionais foram seguidas de importantes alterações moleculares no SRA e até mesmo no sistema anti-oxidante. Contudo, destacamos o fato da interação entre os dois tratamentos empregados em nosso estudo não terem promovido efeitos somatórios nestas respostas, ou seja, nossos achados mostraram que o exercício físico, assim como a sua associação com a TE2 apresentaram respostas similares sobre o SRA e sua repercussão na reatividade vascular de aorta. Assim, colocando o exercício físico em posição de destaque como uma nova medida terapêutica para controle das doenças cardiovasculares pós-menopausa, tal qual a hipertensão arterial.

Cabe ressaltar, que a terapia de reposição hormonal é uma medida de custo elevado para a sociedade e de acordo com o resultado de alguns estudos, os seus efeitos

benéficos para a saúde física feminina ainda são controversos. Desta forma, outros estudos desta natureza, devem ser realizados para avaliar a eficiência do exercício como medida adjuvante no tratamento de doenças como a hipertensão, visto que este, é uma intervenção de baixo custo; não-farmacológica e com inúmeros efeitos positivos para a manutenção da integridade física de mulheres.

## REFERÊNCIAS

Ackerman GE, Carr BR . Estrogens. Reviews in endocrine e metabolic disorders. n.3, p.225 – 230, 2002.

Adams V, Linke A, Kränkel N, Erbs S, Gielen S, Möbius-Winkler S, Gummert J F, Mohr F W, Schuler G and Hambrecht R. Impact of Regular Physical Activity on the NAD(P)H Oxidase and Angiotensin Receptor System in Patients With Coronary Artery Disease. *Circulation*. 2005; 111:555-562.

Amaral SL, Sanchez LS, Chang AJ, Rossoni LV, Michelini LC. Time course of training-induced microcirculatory changes of vegf expression in skeletal muscles of spontaneously hypertensive female rats. *Braz J Med Biol Res*. 2008; 41: 424-431.

Amaral SL, Zorn TM, Micheline LC. Exercise training normalizes wall-to-lumen ratio of the gracilis muscle arterioles and reduces pressure in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 2000; 18: 1563-1572.

Anderson GL, Limacher M, Assaf AR, *et al*. Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*. 2004; 291:1701-1712.

Andreollo NA, dos Santos EF, Araújo MR, Lopes LR. Rat's age versus human's age: What is the relationship? *ABCD, Arq Bras Cir Dig*. 2012; 25(1):2012.

Baiardi G, Macova M, Armando I, Ando H, Tyurmin D, Saavedra JM. Estrogen upregulates renal angiotensin II AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> receptors in the rat. *Regulatory Peptides*. 2005; 124:7-17.

Barber MN, Sampey DB, Widdop RE. AT(2) receptor stimulation enhances antihypertensive effect of AT(1) receptor antagonist in hypertensive rats. *Hypertension*. 1999; 34: 1112-1116.

Batenburg WW, Garrelts IM, Bernasconi CC, Juillerat-Jeanneret L, van Kats JP, Saxena PR, Jan Danser AH. Angiotensin II type 2 receptor-mediated vasodilation in human coronary microarteries. *Circ Res*, 109:2296-2301, 2004.

Batenburg WW, Tom B, Schuijt MP, Danser AH. Angiotensin II type 2 receptor-mediated vasodilation. Focus on bradykinin, NO and endothelium-derived hyperpolarizing factor(s). *Vascul Pharmacol*. 2005; 42(3):109-18.

Bertagnolli M, Schenkel PC, Campos C, Mostarda CT, Casarini DE, Belló-Klein A, Irigoyen MC, Rigatto K. Exercise training reduces sympathetic modulation on cardiovascular system and cardiac oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens*. 2008; 21(11):1188-93.

Yang L, Lo CW, Lee JT, Su CT. Enhancement of vasorelaxation in hypertension following high-intensity exercise. *Chin J Physiol*. 2011; 54(2): 87-95.

Best PJ, Berger PB, Miller VM, Lerman A. The effect of estrogen replacement therapy on plasma nitric oxide and endothelin-1 levels in postmenopausal women. *Ann Intern Med*. 1998; 28:285-288.

Borelli CL. Doenças cardiovasculares e as terapias de reposição hormonal. *Hipertensão*. 2005; 3:91-94:723-9. 1994.

Botelho, L. M., C. H. Block, et al. Plasma angiotensin(1-7) immunoreactivity is increased by salt load, water deprivation, and hemorrhage. *Peptides*, 1994; 15(4): 723-9.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72:248:54.

Bronishan KB, Weddle D, Anthony MS, Heise C, Li P, Ferrario CM. Effects of chronic hormone replacement on the renin-angiotensin system in cynomolgus monkeys. *J Hypertension*. 1997; 15:719-726.

Brosnihan KB, Li P, Ferrario CM. Angiotensin-(1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. *Hypertension*. 1996;27: 523-528.

Brum PC, Da Silva GJ, Moreira ED, Ida F, Negrao CE, Krieger EM. Exercise training increases baroreceptor gain sensitivity in normal and hypertensive rats. *Hypertension*. 2000; 36: 1018-1022.

Buñang RD. Validation in a awake rats of a tail-cuff method for measuring systolic pressure. *Journal Applied Physiology*. 1973; 34(2): 279-82.

Burger HG, Hale GE, Robertson DM, Dennerstein L. A review of hormonal changes during the menopause transition: focus on findings from the Melbourne Women's Midlife Health Project. *Human Reprod Update*. 2007; 13:559-65.

Burl VL, Welton P, Roccella EJ, Brown C, Cutler JA, Higgins M, Horan MJ, Labarthe D. Prevalence of hypertension in the US adult population. Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1991. *Hypertension*. 1995;25:305-313.

Butler L, Santoro N. The reproductive endocrinology of menopause transition. *Steroids*. 2011; 76(7): 627-635.

Cardoso CG Jr, Gomides RS, Queiroz AC, Pinto LG, da Silveira LF, Tinucci T, et al. Acute and chronic effects of aerobic and resistance exercise on ambulatory blood pressure. *Clinics*. 2010; 65: 317-325.

Carey RM, Howell NL, Jin X, Helmy MS. Angiotensin type 2 receptor-mediated hypotension in angiotensin type-1 receptor-blocked rats. *Hypertension*. 38:1272-1277, 2001.

Carey RM, Siragy HM. Newly components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev*. 24:261-271, 2003.

Castro CH, Santos RA, Ferreira AJ, Bader M, Alenina N, Almeida AP. Evidence for a functional interaction of the angiotensin-(1-7) receptor Mas with AT<sub>1</sub> ou AT<sub>2</sub> receptors in the mouse heart. *Hypertension*. 2005; 46:937-42.

Caulin-Glaser T, Garcia-Cardena G, Sarrel P, *et al.* 17β-Estradiol regulation of human endothelial cell basal nitric oxide release, independent of cytosolic Ca<sup>2+</sup> mobilization. *Circ Res*. 1997;81:885-892.

Chambliss KL, Shaul PW. Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase. *Endocrine reviews*. 2002; 23(5): 665-686.

Chansel D, Vandermeersch S, Oko A, Curat C & Ardaillou R. Effects of angiotensin IV and angiotensin-(1-7) on basal and angiotensin II-stimulated cytosolic Ca<sup>2+</sup> in mesangial cells. *European Journal of Pharmacology*. 2001; 414 165-175.

Chappell MC, Gallagher PE, Averill DB, Ferrario CM, Brosnihan KB. Estrogen or AT1 antagonist olmesartan reverses the development of profound hypertension in the congenic mRen2.Lewis rat. *Hypertension*. 2003; 42:781-786.

Chen H, Chiang I, Chausing JJ. Exercise training increases acetylcholine-stimulated endothelium-derived nitric oxide release in spontaneously hypertensive rats. *J Biomed Sci*. 1996; 3:454-460.

Chen YF, Naftilan AJ, Oparil S. Androgen-dependent angiotensinogen and renin messenger RNA expression in hypertensive rats. *Hypertension*. 1992;19:456-463.

Chies AB, Rosignoli PS, Daniel EF. Exercise increases the angiotensin II effects in isolated portal vein of trained rats. *Peptides*, 31:883-888, 2010.

Ciampone S, Borges R, de Lima IP, Mesquita FF, Cambiucci EC, Gontijo JÁ. Long-term exercise attenuates blood pressure responsiveness and modulates kidney angiotensin II signaling and urinary sodium excretion in SHR. *J Renin Angotensin Aldosterone Syst*. 2011; 12(4): 394-403.

Claudio ERG, Endlich PW, Santos RL, Moyses 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.

Coimbra R, Sanchez LS, Potenza JM, Rossoni LV, Amaral SL, Michelini LC. Is gender crucial for cardiovascular adjustments induced by exercise training in female hypertensive rats? *Hypertension*. 2008; 52: 514-521.

Colditz GA. Relationship between estrogen levels, use of hormone replacement therapy, and breast cancer. [J Natl Cancer Inst](#). 1998; 90(11):814-23.

Collison M, Glazier AM, Graham D, et al. Cd36 and molecular mechanisms of insulin resistance in the stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Diabetes*. 2000;49:2222-6.

Collister JP, Hendel MD. The role of Ang (1–7) in mediating the chronic hypotensive effects of losartan in normal rats. *J Renin Angioten Aldost Syst*. 2003;4:176–179.

Crane MG, Harris JJ. Estrogens and hypertension: effect of discontinuing estrogens on blood pressure, exchangeable sodium, and the renin-aldosterone system. *Am J Med Sci*. 1978; 276:33-55.

Dalpiaz PLM, Lamas AZ, Caliman IF, Medeiros ARS, Abreu GR, Moyses MR, Andrade TU, Alves MF, Carmona AK, Bissoli NS. The chronic blockade of angiotensin I-converting enzyme eliminates the sex differences of serum cytokine levels of spontaneously hypertensive rats. *Braz J Med Biol Res*. 2013; 46:171-177.

Dantas AP, Tostes RC, Fortes ZB, Costa SG, Nigro D, Carvalho MH. *In vivo* evidence for antioxidant potential of estrogen in microvessels of female Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension*. 2002; 39(Pt2 2):405-411.

Darimont C, Delansorne R, Paris J, et al. Influence of estrogenic status on the lipolytic activity of parametrial adipose tissue *in vivo*: an *in situ* microdialysis study. *Endocrinology*. 1997;138:1092-6.

De Souza AM, Lopes AG, Pizzino CP, Fossari RN, Miguel NCO, Cardozo FP, Abi-Abib R, Fernandes MS, Santos DPA, Caruso-Neves C. Angiotensin II and angiotensin-(1–7) inhibit the inner cortex Na<sup>+</sup>-ATPase activity through AT<sub>2</sub> receptor. *Regul Pept*. 2004;120:167–175.

Dean SA, Tan J, O'Brien ER, Leenen FHH. 17β-Estradiol downregulates tissue angiotensin-converting enzyme and ANG II type 1 receptor in female rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005; 288:R759-R766.

Dinh DT, Frauman AG, Johnston CI, Fabiani ME. Angiotensin receptors: distribution, signaling and function. *Clinical Science*. 2001; 100:481-492.

Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N *et al*. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res*. 2000; 87: p.E1-E9.

Dunne FP, Barry DG, Ferriss JB, Grealy G, Murphy D. Changes in blood pressure during the normal menstrual cycle. *Clin Sci*. 1991;81:515 – 518.

Endlich PW, Claudio ERG, Gonçalves WLS, Gouvêa SA, Moyses MR, Abreu GR. Swimming training prevents fat deposition and decreases angiotensin II-induced coronary vasoconstriction in ovariectomized rats. *Peptides*. 2013; 47:29-35.

Endlich PW, Firmes L, Gonçalves WLS, Gouvea SA, Moyses MR, Bissoli NS, Reis AM, Abreu GR. Involvement of the atrial natriuretic peptide in the reduction of arterial pressure induced by swimming but not by running training in hypertensive rats. *Peptides*. 2008; 32(8): 1706-12.

Fazan Jr R, Silva VJD, Salgado HC. Modelos de hipertensão arterial. *Rev Bras Hipertens*. 2001; 8:19-29.

Felix JV, Michelini LC. Training-induced pressure fall in spontaneously hypertensive rats is associated with reduced angiotensinogen mRNA expression within the nucleus tractus solitarius. *Hypertension*. 2007; 50: 780-785.

Fernandes L, Fortes ZB, Nigro D, Tostes RC, Santos RA, Catelli De Carvalho MH. Potentiation of bradykinin by angiotensin-(1-7) on arterioles of spontaneously hypertensive rats studied *in vivo*. *Hypertension*. 2001;37:703-709.

Fernandes T, Hashimoto NY, Magalhães FC, Fernandes FB, Casarini DE, Carmona AK, Krieger JE, Phillips MI, Oliveira EM. Aerobic exercise training-induced left ventricular hypertrophy involves regulatory MicroRNAs, decreased angiotensin-converting enzyme-angiotensin ii, and synergistic regulation of angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin (1-7). *Hypertension*. 2011; 58(2): 182–189.

Ferreira AJ; Santos RAS. Cardiovascular actions of angiotensin-(1,7). *Braz J Med Biol Res*. 2005; 38:499-507.

Figard H, Gaume V, Mouglin F, Demougeot C, Berthelot A. Beneficial effects of isometric strength training on endothelial dysfunction in rats. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*. 2006; 31(5): 621-630.

Filho AG, Ferreira AJ, Santos SH, Neves SR, Silva Camargos ER, Becker LK, Belchior HA, Dias-Peixoto MF, Pinheiro SV, Santos RA. Selective increase of angiotensin(1-7) and its receptor in hearts of spontaneously hypertensive rats subjected to physical training. *Exp Physiol*. 2008; 93(5):589-98.

Flues K, Paulini J, Brito S, Sanches IC, Consolim-Colombo F, Irigoyen MC, De Angelis K. Exercise training associated with estrogen therapy induced cardiovascular benefits after ovarian hormones deprivation. *Maturitas*. 2010; 65(3):267-71.

Fortepiani LA, Zhang H, Racusen L, Roberts LJ, Reckelhoff JF. Characterization of an animal model of postmenopausal hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2003; 41:640–645.

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

Garg UC, Assid C. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest*. 1989; 83(5):1774-7.

Geraldes P, Sirois MG, Bernatchez PN, Tanguay JF. Estrogen regulation of endothelial and smooth muscle cell migration and proliferation: Role of p38 and p42/44 Mitogen-Activated Protein Kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22:1585-1590.

Gorelik G, Carbini LA, Scicli AG. Angiotensin-(1-7) induces bradykinin-mediated relaxation in porcine coronary artery. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998;286:403-410.

Graham DA; Rush JWE. Exercise training improves aortic endothelium-dependent vasorelaxation and determinants of nitric oxide bioavailability in spontaneously hypertensive rats. *J Appl Physiol.* 2004; 96: 2088-2096.

Grobe JL, Katovich MJ Alterations in aortic vascular reactivity to angiotensin 1-7 in 17-beta-estradiol-treated female SD rats. *Regul Pept.* 2006; 133:62-67.

[Gu Q, Wang B, Zhang XF, Ma YP, Liu JD, Wang XZ. Contribution of hydrogen sulfide and nitric oxide to exercise-induced attenuation of aortic remodeling and improvement of endothelial function in spontaneously hypertensive rats. \*Mol Cell Biochem.\* 2013; 375\(1-2\):199-206.](#)

Haarbo J, Marslew U, Gotfredsen A, Christiansen C. Postmenopausal hormone replacement therapy prevents central distribution of body fat after menopause. *Metabolism.* 1991; 40:1323-6.

Habouzit E, Richard H, Sanchez H, Koulmann N, Serrurier B, Monnet R, Ventura-Clapier R, Bigard X. Decreased muscle ACE activity enhances functional response to endurance training in rats, without change in muscle oxidative capacity or contractile phenotype. *J Appl Physiol.* 2009;107:346-353.

Hannan RE, Davis EA, Widdop RE. Functional role of angiotensin II AT2 receptor in modulation of AT1 receptor-mediated contraction in rat uterine artery: involvement of bradykinin and nitric oxide. *Br J Pharmacol.* 2003; 140:987-995.

Hansen FM, Fahmy N, Nielsen JH. The influence of sexual hormones on lipogenesis and lipolysis in rat fat cells. *Acta Endocrinol.* 1980;95:566-70.

Heitsch H, Brovkovich S, Malinski T, Wiemer G. Angiotensin-(1-7)-stimulated nitric oxide and superoxide release from endothelial cells. *Hypertension.* 2001;37:72-76.

Hernández I, Delgado JL, Díaz J. 17β-Estradiol prevents oxidative stress and decreases blood pressure in ovariectomized rats. *Am J Physiol.* 2000;279:1599-605.  
Houck JA. "What do these woman want?". Feminist responses to feminine forever, 1963-1980. *Bull Hist Med.* 2003; 77(1):103-32.

Hsia J, Langer RD, Manson JE, Kuller L, Johnson KC, Hendrix SL, *et al.* Conjugated equine estrogens and coronary heart disease: the Women's Health Initiative. *Arch Intern Med.* 2006; 166:357-65.

Hu G, Barengo NC, Tuomilehto J, Lakka TA, Nissinen A, Jousilahti P. Relationship of physical activity and body mass index to the risk of hypertension: A Prospective Study in Finland. *Hypertension*. 2004; 43: 25-30.

Huley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B, Vittinghoff E. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study (HERS) Research group. *JAMA*. 1998; 280(7):605-13.

Ikeda T, Gomi T, Sasaki Y. Effects of swim training on blood pressure, catecholamines and prostaglandins in Spontaneously Hypertensive Rats. *Jpn Heart J*. 1994; 35: 205-211.

Iyer SN, Ferrario CM, Chappell MC. Angiotensin-(1-7) contributes to the antihypertensive effects of blockade of the renin-angiotensin system. *Hypertension*. 1998;31(pt 2):356-361.

Izawa T, Morikawa M, Inoue M, Mizuta T, Yamashita H, Ohno H, Komabayashi T. Acute or chronic exercise alters angiotensin II-induced contraction of rat aorta. *Jpn J Physiol*. 1995; 45:1093-1100.

Jiang CW, Sarrel PM, Lindsay DC, *et al*. Endothelium-independent relaxation of rabbit coronary artery by 17-oestradiol in vitro. *Br J Pharmacol*. 1991; 104:1033-1037.

Jiroutek MR, Chen MH, Johnston CC, Longcope C. Changes in reproductive hormones and sex hormone-binding globulin in a group of postmenopausal women measured over 10 years. *Menopause*. 1998; 5(2):90-4.

Kang LS, Chen B, Reyes RA, Leblanc AJ, Teng B, Mustafa SJ, *et al*. Aging and estrogen alter endothelial reactivity to reactive oxygen species in coronary arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011; 300:2105-2115.

Kannel WB. The Framingham study: Historical insight on the impact of cardiovascular risk factors in men versus women. *J Gend Specif Med*. 2002; 5:27-37

Kawano H, Motoyama T, Kugiyama K, *et al*. Gender difference in improvement of endothelium-dependent vasodilation after estrogen supplementation. *J Am Coll Cardiol*. 1997;30:914-919.

Kissebah AH, Peiris AN. Biology of regional body fat distribution: relationship to non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab Ver*. 1989;5:83-109.

Kletzky OA, Marrs RP, Howard WF, McCormock W, Mishell Jr. DR. Prolactin synthesis and release during pregnancy and puerperium. *Am J Obstet Gynecol* .1980;136:545-550.

Kuru O, Senturk UK, Kocuer G, Ozdem S, Baskurt OK, *et al*. Effect of exercise training on resistance arteries in rats with chronic NOS inhibition. *J Appl Physiol*. 2009; 107: 896-902.

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

Laterza MC, de Matos LD, Trombetta IC, Braga AM, Roveda F, Alves MJ, *et al.* Exercise training restores baroreflex sensitivity in never-treated hypertensive patients. *Hypertension.* 2007; 49: 1298-1306.

Laughlin MH, Welshons WV, Sturek M, Rush JW, Turk JR, Taylor JA, Judy BM, Henderson KK, Ganjam VK. Gender, exercise training, and eNOS expression in porcine skeletal muscle arteries. *J Appl Physiol.* 2003; 95(1): 250-64.

LeBlanc AJ, Reyes R, Kang LS, Dailey RA, Stallone JR, Moningka NC, *et al.* Estrogen replacement restores flow-induced vasodilation in coronary arterioles of aged and ovariectomized rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009; 297:1713-1723.

Lee SK, Kim CS, Kim HS, Cho EJ, Joo HK, Lee JY, Lee EJ, Park JB, Jeon HB. [Endothelial nitric oxide synthase activation contributes to post-exercise hypotension in spontaneously hypertensive rats.](#) *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2009; 382(15): 711-714.

Lellouch A, Segal A. [Gerontology and endocrinology at the beginning of the 20<sup>th</sup> century: Dr. Voronoff (1866-1951)]. *Hist Sci Med.* 2001; 35(4):425-34.

Lemos VS, Silva DM, Walther T, Alenina N, Bader M, Santos RAS. The endothelium-dependent vasodilator effect of the nonpeptide Ang(1-7) mimic AVE 0991 is abolished in the aorta of Mas-knockout mice. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2005;46:274-9.

Li P, Chappell MC, Ferrario CM, Brosnihan KB. Angiotensin-(1-7) augments bradykinin-induced vasodilation by competing with ACE and releasing nitric oxide. *Hypertension.* 1997; 29:394 - 400.

Lieberman EH, Gerhard MD, Uehata A, *et al.* Estrogen improves endothelium-dependent, flow-mediated vasodilation in postmenopausal women. *Ann Intern Med.* 1994; 121:936-941.

Mahon JM, Carr RD, Nicol AK & Henderson IW. Angiotensin(1-7) is an antagonist at the type 1 angiotensin II receptor. *Journal of Hypertension.* 1994; 12 1377-1381.

Manson JE, Martin KA. Clinical practice. Postmenopausal hormone-replacement therapy. *N Engl J Med.* 2001; 345(1):34-40.

McAllister RM, Price EM. Effects of exercise training on vasodilatory protein expression and activity in rats. *Eur J Appl Physiol.* 2010; 110: 1019-1027.

Melo RM, Martinho E Jr, Michelini LC. Training-induced, pressure-lowering effect in SHR: wide effects on circulatory profile of exercised and nonexercised muscles. *Hypertension.* 2003; 42: 851-857.

Mosca, L.; Edelman, D.; Mochari, H.; Christian, A.H.; Paultre, F.; Pollin, I. Waist circumference predicts cardiometabolic and global Framingham risk among women screened during National Woman's Heart Day. *J. Womens Health (Larchmt.).* 2006; 15(1): p. 24-34.

Moura RS, Resende AC, Emiliano AF, Tano T, Mendes-Ribeiro AC, Correia MLG,

Carvalho LCRM. The role of bradykinin, AT<sub>2</sub> and angiotensin 1-7 receptors in the EDRF-dependent vasodilator effect of angiotensin II on the isolated mesenteric vascular bed of the rat. *Br J Pharmacol*. 2004; 141:860-866.

Munzel T, Daiber A, Ullrich V, Mulsch A. Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25(8): 1551-7.

Musch TI, Friedman DB, Pitetti KH, Haidet GC, Stray-Gundersen J, Mitchell JH, Ordway GA. Regional distribution of blood flow of dogs during graded dynamic exercise. *J Appl Physiol* 1987; 63:2269-77.

Nelson, H.D., 2008. Menopause. *Lancet* 371, 760–770.

Neves LA, Williams AF, Averill DB, Ferrario CM, walkup MP, Bronishan KB. Pregnancy enhances the angiotensin (Ang)-(1-7) vasodilator response in mesenteric arteries and increases the renal concentration and urinary excretion of Ang-(1-7). *Endocrinology*. 2003; 144:3338-3343.

[Neves LA, Averill DB, Ferrario CM, Aschner JL, Brosnihan KB](#). Vascular responses to Angiotensin-(1-7) during the estrous cycle. [Endocrine](#). 2004; 24(2):161-5.

Nickenig G, Baumer AT, Grohe C, Kahlert S, Strelow K, Rosenkranz S, Stablein A, Beckers F, Smits JF, Daemen MJ, Vetter H, Bohm M. Estrogen modulates AT<sub>1</sub> receptor gene expression in vitro and in vivo. *Circulation*. 97:2197-2201, 1998.

Oddie CJ, Dilley RJ, Bobik A. Long-term angiotensin II antagonism in spontaneously hypertensive rats: effects on blood pressure and cardiovascular amplifiers. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1992;19(5):392–5.

Oliveira EM, Sasaki MS, Cerêncio M, Baraúna VG, Krieger JE. Local renin-angiotensin system regulates left ventricular hypertrophy induced by swimming training independent of circulating renin: a pharmacological study. *Journal of the rennin-angiotensin aldosterone system*. 2009; 10:15.

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

Park JH, Iemitsu M, Maeda S, Kitajima A, Nosaka T, Omi N. Voluntary running exercise attenuates the progression of endothelial dysfunction and arterial calcification in ovariectomized rats. *Acta Physiol*. 2008; 193(1): 47-55.

Paula RD, Lima CV, Khosla MC, Santos RA. Angiotensin-(1–7) potentiates the hypotensive effect of bradykinin in conscious rats. *Hypertension*. 1995;26:1154–1159.

Pinheiro SV, Simoes e Silva AC, Sampaio WO, Paula RD, Mendes EP, Bontempo ED, Pesquero JB, Walther T, Alenina N, Bader M, Bleich M, Santos RAS. Nonpeptide AVE 0991 is an angiotensin-(1–7) receptor Mas agonist in the mouse kidney. *Hypertension*. 2004;44:490 – 496.

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

Proudler AJ, Ahmed AI, Crook D, *et al.* Hormone replacement therapy and serum angiotensin-converting enzyme activity in postmenopausal women. *Lancet*. 1995; 346:89-90.

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. *Br J Pharmacol*. 1987; 92(1):181-7.

Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, Harrison DG. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation: contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest*. 1996; 97:1916–1923.

Rannevik G, Jeppsson S, Johnell O, Bjerre B, Laurell-Boruf Y, Svanberg L. A longitudinal study of the perimenopausal transition: altered profiles of steroid and pituitary hormones, SHBG and bone mineral density. *Maturitas*. 2008; 61(1-2): 67-77.

Reckelhoff JF, Fortepiani LA. Novel mechanisms responsible for postmenopausal hypertension. *Hypertension*. 2004; 43:918-923.

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

Reckelhoff JF, Zhang H, Srivastava K. Gender differences in development of hypertension in spontaneously hypertensive rats: Role of Renin-Angiotensin System. *Hypertension*. 2000; 35: 480-483.

Reckelhoff JF. Cardiovascular disease, estrogen deficiency, and inflammatory cytokines. *Hypertension*. 2006; 48(3):372-3.

Roks AJ, van Geel PP, Pinto YM, Buikema H, Henning RH, de Zeeuw D, *et al.* Angiotensin-(1-7) is a modulator of the human renin angiotensin system. *Hypertension*. 1999; 34:296-301.

Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy menopausal women: principal results from the Women's Health Initiative Randomized Controlled Trial. *JAMA*, 288:321-333, 2002.

Rossouw JE, Prentice RL, Manson JE, Wu L, Barad D, Barnabei VM, Ko M, LaCroix AZ, Margolis KL, Stefanick ML. Postmenopausal hormone therapy and risk of cardiovascular disease by age and years since menopause. *JAMA*. 2007;297:1465–1477.

Rowe BP, Saylor DL, Speth RC & Absher DR. Angiotensin-(1–7) binding at angiotensin II receptors in the rat brain. *Regulatory Peptides*. 1995; 56 139–146.

Rush JWE, Aultman CD. Vascular biology of angiotensin and the impact of physical activity. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2008; 33:162-172.

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

Sampaio WO, Henrique de Castro C, Santos RA, Schiffrin EL & Touyz RM. Angiotensin-(1–7) counterregulates angiotensin II signaling in human endothelial cells. *Hypertension*. 2007a 50 1093–1098.

Sampaio WO, Souza dos Santos RA, Faria-Silva R, da Mata Machado LT, Schiffrin EL, Touyz RM. Angiotensin-(1–7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. *Hypertension*. 2007b; 49 185–192.

Sampson AK, Moritz KM, Jones ES, Flower RL, Widdop RE, Denton KM. Enhanced Angiotensin II type 2 receptor mechanisms mediate decreases in arterial pressure attributable to Chronic Low-Dose Angiotensin II in Female Rats. *Hypertension*. 2008; 52:666-671.

Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I, Heringer-Walther S, Pinheiro SV, Lopes MT, Bader M, Mendes EP, Lemos VS, Campagnole-Santos MJ, Schultheiss HP, Speth R, Walther T. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(14):8258-63.

Santos RAS Campagnole-Santos MJ, Andrade SP. Angiotensin-(1–7): an update. *Regulatory Peptides*. 2000; 91:45–62.

Santos RAS, Ferreira AJ, Verano-Braga T, Bader M. Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1–7) and Mas: new players of the renin–angiotensin system. *Journal of endocrinology*. 2013; 216:2; R1-R17.

Santos RAS, Ferreira AJ, Verano-Braga T, Bader M (2013). Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: New players of the renin-angiotensin system. *Journal of Endocrinology*. 2013; 216(2): R1-17.

Santos RAS, Ferreira AJ. Angiotensin-(1-7) and the renin-angiotensin system. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2007; 16: 122-128, 2007.

Santos RAS, Haibara AS, Campagnole-Santos MJ, Simões e Silva AC, Paula RD, Pinheiro SVB, et al. Characterization of a new selective antagonist for angiotensin-(1–7), D-Pro7-angiotensin-(1–7). *Hypertension*. 2003; 41:737–43.

Sare GM, Gray LJ, Bath PM. Association between hormone replacement therapy and subsequent arterial and venous vascular events: a meta-analysis. *Eur Heart J*. 2008. 29: 2031-41.

Schneider CD, Oliveira AR. Radicais livre de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Rev Bras Med Esporte*. 2004; 10: 308-313.

Schiavone MT, Santos RAS, Brosnihan KB, Khosla MC, Ferrario CM. Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophyseal system by angiotensin (1-7) heptapeptide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988; 85:4095-4098.

Schunkert H, Danser AH, Hense HW, Derkx FH, Kurzinger S, Riegger GA. Effects of estrogen replacement therapy on the renin-angiotensin system in postmenopausal women. *Circulation*. 1997;95:39–45.

Shinoda M, Latour MG, Lavoie JM. Effects of physical training on body composition and organ weights in ovariectomized and hyperestrogenic rats. *Int J Obes*. 2002; 26: 335–343.

Siamopoulos KC, Papanikolaou S, Elisaf M et al. Ambulatory blood pressure monitoring in normotensive pregnant women. *J Hum Hypertens*. 1996;10(Suppl. 3):S51–S54.

Silva DM, Vianna HR, Cortes SF, Campagnole-Santos MJ, Santos RA, Lemos VS. Evidence for a new angiotensin-(1-7) receptor subtype in the aorta of Sprague-Dawley rats. *Peptides*. 2007; 28(3):702-7.

Silva DMR, Gomes-Filho A, Olivon VC, Santos TMS, Becker LK, Santos RS, Lemos VS. Swimming training improves the vasodilator effect of angiotensin-(1-7) in the aorta of spontaneously hypertensive rat. *J Appl Physiol*. 2011; 111:1272-1277.

Siragy HM, Carey RM. The subtype-2 (AT<sub>2</sub>) angiotensin II receptor regulates renal guanosine cyclic 3', 5' monophosphate and AT<sub>1</sub> receptor-mediated prostaglandin E<sub>2</sub> production in conscious rats. *J Clin Invest*. 1996; 97:1978-1982.

Siragy HM; Carey RM (1997). The subtype 2 (AT<sub>2</sub>) angiotensin receptor mediates renal production of nitric oxide in conscious rats. *J clin Investi*. 1997; 100:264-269.

Spritzer PM, Wender MC. Hormone therapy in menopause: when not to use. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2007; 51(7): 1058-63.

Stebbins CL, Symons D. Role of angiotensin II in hemodynamic responses to dynamic exercise in miniswine. *J Appl Physiol*, 78:185-190, 1995.

Stennett AK, Qiao X, Falone A, Koledova VV, Khalil RA. Increased vascular angiotensin type 2 receptor expression and NOS-mediated mechanisms of vascular relaxation in pregnant rats. *Am J Heart Circ Physiol*. 2009; 296: H745-H755.

Strehlow K, Rotter S, Wassmann, S, Adam, O, Grohe, C, Laufs, K, Bohm, M, and Nickenig, G. Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. *Circulation Research*. 2003; 93, 170–177.

Sullivan JC, Pardieck JL, Brinson K, Kang KT. Effects of estradiol on renal cyclic guanosine monophosphate and oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. *Gen Med*. 2009; 6(3):498-510.

Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem*. 2000; 275:33238-33243.

Tsutsumi Y, Matsubara H, Masaki H, Kurihara H, Murasawa S, Takai S, Miyazaki M, Nozawa Y, Ozono R, Nakagawa K, Miwa T, Kawada N, Mori Y, Shibasaki Y, Tanaka Y,

- Fujiyama S, Koyama Y, Fujiyama A, Takahashi H, Iwasaka T. Angiotensin II type 2 receptor overexpression activates the vascular kinin system and causes vasodilation. *J Clin Invest*. 1999; 104(7):925-35.
- Van Esch JHM, Schuijt MP, Sayed J, Choudhry Y, Walther T, Jan Danser AH. AT<sub>2</sub> receptor-mediated vasodilation in the mouse heart depends on AT<sub>1A</sub> receptor activation. *British Journal of Pharmacology*. 2006; 148:452-458.
- Vaz-Silva J, Tavares RL, Ferreira MC, Honorato-Sampaio K, Cavallo IK, Santos RA, dos Reis AM, Reis FM. Tissue specific localization of angiotensin-(1-7) and its receptor in the uterus of ovariectomized rats. *J Mol Histol*. 2012; 43:597-602.
- Vickers C, Hales P, Kaushik V, Dick L, Gavin J, Tang J, *et al*. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem*. 2002; 277:14838-14843.
- Wagner AH, Schoeter MR, Hecker M. 17 $\beta$ -estradiol inhibition of NADPH oxidase expression in human endothelial cells. *FASEB J*. 2001; 15:2121-2130.
- Walters PE, Gaspari TA & Widdop RE. Angiotensin-(1-7) acts as a vasodepressor agent via angiotensin II type 2 receptors in conscious rats. *Hypertension*. 2005; 45 960-966.
- Wassmann S, Baumer AT, Strehlow K, van Eickels M, Grohe C, Ahibory K, Rosen R, *et al*. Endothelial dysfunction and oxidative stress during estrogen deficiency in spontaneously hypertensive rats. *Circulation*. 2001; 103: 435-441.
- Wenger NK, Speroff L, Packard B. Cardiovascular health and disease in women. *N Engl J Med*. 1993; 329:247-256.
- Wiinberg N, Hoegholm A, Christensen HR, Bang LE, Mikkelsen KL, Nielsen PE, Svendsen TL, Kampmann JP, Madsen NH, Bentzon MW. 24-h ambulatory blood pressure in 352 normal danish subjects, related to age and gender. *Am J Hypertens*. 1995; 8:978-986.
- Windler E, Zyriax BC, Eidenmuller B, Boeing H. Hormone replacement therapy and risk for coronary heart disease. Data from the CORA-study-a case-control study on women with incident coronary heart disease. *Maturitas*. 2007; 20;57(3):239-46.
- Wu JM, Zelinski MB, Ingram DK, Ottinger MA. Ovarian aging and menopause: current theories, hypotheses, and research models. *Experimental Biology and Medicine*. 2005; 230:818-838.
- Wu JN, Berecek KH. Prevention of genetic hypertension by early treatment of spontaneously hypertensive rats with the angiotensin converting enzyme inhibitor captopril. *Hypertension*. 1993;22(2):139-46.
- Xu B, Pamidimukkala J, Hay M. Sex differences in the development of angiotensin-II induced hypertension in conscious mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005; 288(5):H2177-84.
- Xu JW, Ikeda K, Yamori Y. Genistein inhibits expressions of NADPH oxidase p22phox and angiotensin II type 1 receptor in aortic endothelial cells from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res*. 2004; 27:675-683.

Xu X, Wan W, Ji L, Lao S, Powers AS, Zhao W, Erikson JM, Zhang JQ. Exercise training combined with angiotensin II receptor blockade limits post-infarct ventricular remodeling in rats. *Cardiovas Res*. 2008; 78:523-532.

Xu X, Xiao JC, Luo LF, Wang S, Zhang JP, Huang JJ, Liu ML, Liu CG, Xu KG, Li YJ, Song HP. Effects on ovariectomy and 17 $\beta$ -estradiol treatment on the renin-angiotensin system, blood pressure, and endothelial ultrastructure. *Int J Cardiol*. 2008; 130:196-204.

Yamamoto K, Chappell K, Brosnihan KB, Khosla MC, Ferrario CM. *In vivo* metabolism of angiotensin I by neutral endopeptidase (EC3.4.24.11) in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1992; 19:1202-1211.

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.

Yanes LL, Romero DG, Cucchiarelli VE, Fortepiani LA, Gomez-Sanchez CE, Santacruz F, Reckelhoff JF. Role of endothelin in mediating postmenopausal hypertension in a rat model. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005; 288:R229-233.

Yanes LL, Romero DG, Iliesco R, Zhang H, Davis D, Reckelhoff JF. Postmenopausal hypertension: Role of Renin Angiotensin System. *Hypertension*. 2010; 56(3): 359-363.

Yung LM, Wong WT, Tian XY, Leung FP, Yung LH, Chen ZY, Yao X, Lau CW, Huang Y. Inhibition of renin-angiotensin system reverses endothelial dysfunction and oxidative stress in estrogen deficient rats. *PLoS One*. 2011; 6(3):e17437.

Zamo FS, Barauna VG, Chiavegatto S, Irigoyen MC, Oliveira EM. The renin-angiotensin system is modulated by swimming training depending on the age of spontaneously hypertensive rats. *Life Sciences*. 2011; 18:93-9.

Zarrow MX. *Experimental Endocrinology: a sourcebook of basic techniques*. Academic Press (New York), 1964.

Zhang C, Hein TW, Wang W, Kuo L. Divergent roles of angiotensin II AT1 and AT2 receptors in modulating coronary microvascular function. *Circ Res*. 2004; 109:2296-2301.

Zoth N, Weigt C, Laudenschlager U, Diel P. Physical activity and estrogen treatment reduce visceral body fat and serum levels of leptin in an additive manner in a diet induced animal model of obesity. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010; 122: 100-105.