

**EFEITOS DA TERAPIA DE REPOSIÇÃO HORMONAL COM
ESTRADIOL E PROGESTINAS SOBRE O SISTEMA RENINA-
ANGIOTENSINA VASCULAR DE RATAS OVARIETOMIZADAS**

Laís Almeida Menezes

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

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

Vitória-ES, Setembro de 2018

LAÍS ALMEIDA MENEZES

**EFEITOS DA TERAPIA DE REPOSIÇÃO HORMONAL COM
ESTRADIOL E PROGESTINAS SOBRE O SISTEMA RENINA-
ANGIOTENSINA VASCULAR DE RATAS OVARIECTOMIZADAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof.^aDr^a. Gláucia Rodrigues deAbreu.

**Vitória
2018**

**EFEITOS DA TERAPIA DE REPOSIÇÃO HORMONAL COM
ESTRADIOL E PROGESTINAS SOBRE O SISTEMA RENINA-
ANGIOTENSINA VASCULAR DE RATAS OVARIETOMIZADAS**

LAÍS ALMEIDA MENEZES

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas na Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em _____ de 2018.

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof^a Dr^a Gláucia Rodrigues de Abreu
Departamento de Ciências Fisiológicas - UFES
Orientadora

Prof.^a Dr^a Lívia Carla de Melo Rodrigues
Departamento de Ciências Fisiológicas - UFES

Prof. Dr. Helder Mauad
Departamento de Ciências Fisiológicas - UFES

**Universidade Federal do Espírito Santo
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Vitória, Setembro de 2018.**

Menezes, Laís Almeida 1991

Efeitos da Terapia de Reposição Hormonal com Estradiol e Progestinas sobre o Sistema Renina-Angiotensina Vascular de Ratas Ovariectomizadas. [Vitória] 2018

xiv, 61p., 29,7 cm (UFES, M. Sc., Ciências Fisiológicas, 2018)

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Gláucia Rodrigues de Abreu Dissertação,

Universidade Federal do Espírito Santo - PPGCF.

Dedico este trabalho, especialmente,
à minha mãe e meu pai por sempre
acreditarem em mim e me apoiarem

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre iluminar e guiar os meus caminhos, me mostrando por onde devo trilhar, dando sabedoria, capacitando e ajudando a atingir mais essa meta em na vida. Sempre me abençoando e guardando.

A minha família, meus pais, Marinalva e Zenilton; e minha irmã, Laylah; que sempre estiveram me apoiando, incentivando e torcendo pelo meu sucesso. Por todos os sacrifícios que eles fizeram para me ajudarem a chegar onde estou. Gratidão!

A minha orientadora, prof^a Dr^a Gláucia Rodrigues de Abreu, pela oportunidade, apoio em confiança no desenvolvimento do meu mestrado. Muito obrigada!!!

Ao Erick Roberto Gonçalves Claudio, por toda a ajuda imensurável na elaboração desse trabalho, pela atenção, disponibilidade e conhecimento. Sua ajuda foi indispensável e fundamental, sem você esse trabalho não seria possível, sou muito grata!

Gostaria de agradecer a prof^a Livia de Melo e ao prof^o Helder Muad, por aceitaram compor a banca examinadora dessa dissertação. Obrigada pelas significativas contribuições!

Aos meus queridos amigos de graduação Renato, Larissa e Maycon; pela parceria constante, incentivo e conselhos, sempre estando presentes, mesmo que a distância. Obrigada pela amizade!

A Mariana VeronezBorgo, que me acolheu como aluna de iniciação científica na graduação, pelo aprendizado, generosidade, paciência, confiança e ajuda constante. Obrigada pela oportunidade!

Aos meus colegas pós-graduandos do Laboratório de Regulação Neuro-Humoral da Circulação; Simone, Fabrício, Bruno e Demétrius, que colaboraram direta ou indiretamente na elaboração desse trabalho, pelos conselhos, conversas, constante apoio e troca de conhecimentos. Obrigada!

Aos meus colegas de mestrado; Pollyana, Antônio e Edgar, pela parceria constante, pelos conselhos, incentivos, apoio, auxílio, conversas e disponibilidade. Obrigada por estarem presentes!

Aos demais colegas da pós-graduação e funcionários que de alguma maneira contribuíram e ajudaram nessa trajetória.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas pelo conhecimento científico ensinado e gerado, em especial a Prof^aDr^a Silvana dos Santos Meyrelles pela constante atenção, carinho e generosidade. Você é luz!

Ao apoio financeiro do CNPq.

Muito obrigada a todos!!!

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”
(Madre Teresa de Calcutá)*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVOS	Erro! Indicador não definido.
2.1. OBJETIVO GERAL	29
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS	31
3.2. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	31
3.2.1. Ovariectomia	31
3.2.3. Determinação da Fase do Ciclo Estral	32
3.2.4. Dissecção e Reatividade Vascular em Anéis Isolados da Aorta Torácica	33
3.2.5. Western Blotting	34
3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
4. RESULTADOS	36
4.1. EFEITOS DA OVARIECTOMIA TERAPIAS HORMONAIAS SOBRE OS PARÂMETROS PONDERAIS.....	36
4.2. REATIVIDADE VASCULAR EM ANÉIS DE AORTA EM RESPOSTA A ANG 1-7	37
4.2.1. Avaliação da participação do mediador endotelial NO e dos receptores AT2 e Mas	38
4.3. EXPRESSÃO PROTEICA.....	39
5. DISCUSSÃO	41
6. CONCLUSÃO	46
7. REFERÊNCIAS	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Menopausa e seus efeitos biológicos no organismo da mulher	20
Figura 2: Efeitos cardioprotetores do estrogênio mediante a ativação de seus receptores	21
Figura 3: Efeitos da aldosterona na doença cardiovascular. PARA, progestógenos antagonistas do receptor de aldosterona	25
Figura 4: Efeitos biológicos da Ang II através de seus receptores AT1 e AT2.....	26
Figura 5: Efeitos biológicos da Ang 1-7 através do receptor Mas	27
Figura 6. Curva concentração-resposta a Ang 1-7 (10^{-10} – $10^{-5,5}$) em aorta de ratas Wistar	37
Figura 7. Curva concentração-resposta a Ang 1-7 (10^{-10} – $10^{-5,5}$) sozinha (controle) e na presença de PD123,319; A-779 e L-NAME em aorta de ratas Wistar.....	38
Figura 8. Immunoblotting representativo mostrando a presença de AT1, AT2, enzima conversora de angiotensina 2 (ECA-2), Mas e óxido nítrico sintase endotelial (e-NOS, E) em aortas de ratas Wistar	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 : Peso corporal, peso de útero seco, peso do útero seco corrigido pelo comprimento da tíbia, coxins de gordura parametrial, gordura retroperitoneal, gordura mesentérica e a somatória total de gordura das ratas Wistar 36

LISTA DE ABREVIATURAS

A-779: 5-L-isoleucina-7-D-alanina-1-7-angiotensina II

Ach: Acetilcolina

Ang 1-7: Angiotensina – (1-7)

Ang I: Angiotensina I

Ang II: Angiotensina II

ANOVA: Análise de Variância

AR: Receptor de Andrógenos

AT1: Receptor da Angiotensina II do tipo 1

AT2: Receptor da Angiotensina II do tipo 2

BSA: Albumina de Soro Bovino

cm: Centímetros

CMC: Carboximetilcelulose

CMLV: Células do Músculo Liso Vascular

CT: Comprimento da Tíbia

DAC: Doença Arterial Coronariana

DCV's: Doenças Cardiovasculares

DRSP: Drospirenona

DRSP+OE₂: Grupo Ovariectomizado tratado com DRSP e E₂

DOCA: Acetato de Deoxicorticosterona

E₂: 17β-estradiol

ECA: Enzima Conversora de Angiotensina

ECA-2: Enzima Conversora de Angiotensina tipo 2

EDHF: Fator Hiperpolarizante derivado do Endotélio

e-NOS: Isoforma Endotelial da Enzima Óxido Nítrico Sintase

EPM: Erro Padrão da Média

EROS: Espécies Reativas de Oxigênio

ER: Receptor de Estrogênio

ER α : Receptor de Estrogênio alfa

ER β : Receptor de Estrogênio beta

g: Grama

g/cm: Grama por centímetro

GM: Gordura Mesentérica

GP β : Receptor de Estrogênio de Membrana acoplado a proteína G

GP: Gordura Parametrial

GR: Receptor de Glicocorticóides

GRe: Gordura Retroperitoneal

GT: Gordura Total

HDL: Lipoproteína de Alta Densidade

HERS: Heart and Estrogens/Progestin Replacement Study

h: Horas

IMC: Índice de Massa Corporal

Kg: Quilograma

KHS: Krebs-Henseleit

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

mg/g: Miligrama por grama

mL: Mililitros

mm: Milímetros

MPA: Acetato de Medroxiprogesterona

NBT/BCIP: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphatenitrobluetetrazolium/ 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate

NEP: Neutralendopeptidase

NHS: Nurse's Health Study

NO: Óxido Nítrico

NOS: Óxido Nítrico Sintase

OE₂: Grupo Ovariectomizado tratado com E₂

OVX:Ovariectomia

OVX+MPA: Grupo Ovariectomizado tratado com MPA

PA: Pressão Arterial

PC: Peso Corporal

PD12319: (6S)-1-[[4-(dimetilamino)-3-metilfenil]metil]-5-(2,2-difenilacetil)-6,7-dihidro-4H-imidazo[4,5-c]piridine-6-ácido carboxílico,di(2,2,2-trifluoroacetato)

PEP:Prolil-Endopeptidase

PGI₂:Prostaciclina

Phe: Fenilefrina

PR: Receptor de Progesterona

PUS: Peso de Útero Seco

PVDF: Fluoreto de Polivinilideno

RM: Receptor de Mineralocorticóides

SBCAL:Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório

SHAM: Grupo submetido à falsa cirurgia

SHR:Ratas Espontaneamente Hipertensas

SRA: Sistema Renina-Angiotensina

SRAA: Sistema Renina Angiotensina Aldosterona

SUS:Sistema Único de Saúde

TRH:Terapia de Reposição Hormonal

V:Volts

WHI:Women's Health Initiative

RESUMO

As doenças cardiovasculares representam a maior causa de morbimortalidade entre mulheres mundialmente e se tornam mais prevalentes após a menopausa, o que confere ao estrogênio papel cardioprotetor. A terapia de reposição hormonal (TRH) estrogênica isolada ou combinada com progestinas tem sido alvo de estudos como potencial alternativa na abordagem das condições associadas a fase pós-menopausa. Nesse contexto, o acetato de medroxiprogesterona (MPA) é a progestina mais estudada e utilizada na TRH, porém suas ações sobre o sistema cardiovascular têm demonstrado efeitos antagônicos aos benefícios da progesterona, e a drospirenona (DRSP) exerce uma potente ação antimineralocorticóide, havendo evidências clínicas e experimentais de sua atuação positiva. O sistema renina-angiotensina (SRA) é um componente-chave no controle da homeostase cardiovascular, o qual é modulado pela condição estrogênica, e sendo assim, a deficiência estrogênica modula desfavoravelmente esse sistema. Os efeitos vasculares do estrogênio são bem elucidados, porém há escassez de estudos que investiguem os efeitos da terapia hormonal com MPA e DRSP sobre o sistema cardiovascular. Sendo o SRA um importante eixo endócrino para a manutenção da hemodinâmica cardiovascular e a TRH uma medida terapêutica aos prejuízos, sintomas e riscos apresentados na menopausa, faz-se necessário conhecer os efeitos da terapia hormonal com essas progestinas sobre esse sistema. Os experimentos foram conduzidos em ratas Wistarsham e ovariectomizadas, as quais foram divididas aleatoriamente em 5 grupos experimentais: SHAM, ovariectomizadas (OVX), OVX tratadas com 17β -estradiol [E_2] (OE_2); OVX tratado com DRSP e E_2 (DRSP+ OE_2) e OVX tratado com MPA (OVX+MPA) via oral. Após 4 semanas de tratamento, foi realizada a reatividade vascular, com curvas dose-resposta a angiotensina – (1-7) (Ang 1-7), tanto sozinha quanto na presença dos inibidores L-NAME, PD123319 e A-779. Adicionalmente, a aorta foi dissecada e avaliada a expressão proteica de AT-1, AT-2, Mas, ECA-2 e eNOS. Houve um aumento de peso corporal dos animais OVX e OVX+MPA, a eficácia da ovariectomia foi comprovada com a redução do peso uterino das ratas OVX e os tratamentos de reposição hormonal reverteram essa atrofia. Houve um prejuízo na reatividade vascular aórtica mediada pela Ang 1-7 nas ratas OVX, sendo prevenido pelas terapias, sendo que as ratas OE_2 melhoraram esse efeito. A

vasodilatação foi abolida na presença de L-NAME e houve redução da resposta na presença de PD123319 nas ratas OE₂. Não houve diferença na expressão proteica de AT1 e ECA-2 entre os grupos, a expressão de Mas foi maior nos grupos OE₂ e DRSP+OE₂ e AT2 e eNOS foi mais expressa em OVX+MPA. Diante dos resultados expostos, pode-se concluir que a hipoestrogenia prejudica a vasodilatação induzida pela Ang 1-7 na reatividade vascular em anéis aórticos; as terapias com estradiol e progestinas restauram esses parâmetros, sendo esta a primeira vez que são relatados os efeitos das terapias hormonais de MPA e DRSP+E₂ sobre a Ang 1-7 vascular.

Palavras-chave: Deficiência estrogênica, sistema renina-angiotensina, terapia de reposição hormonal, 17β-estradiol , acetato de medroxiprogesterona, drospirenona.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases represent the major cause of morbidity and mortality among women of the world and become more prevalent after menopause, which gives the estrogen cardioprotective role. Estrogenic hormone replacement therapy (HRT) alone or in combination with progestins has been the target of studies as an alternative potential in the management of conditions associated with the postmenopausal phase. In this context, medroxyprogesterone acetate (MPA) is the most studied and used progestin in HRT, but its actions on the cardiovascular system have demonstrated antagonistic effects to the benefits of progesterone, and drospirenone (DRSP) exerts a potent antimineralocorticoid action, clinical and experimental evidence of its positive performance. The renin-angiotensin system (RAS) is a key component in the control of cardiovascular homeostasis, which is modulated by the estrogenic condition, and thus, estrogen deficiency modulates this system unfavorably. The vascular effects of estrogen are well elucidated, but there is a shortage of studies investigating the effects of hormonal therapy with MPA and DRSP on the cardiovascular system. Since RAS is an important endocrine axis for the maintenance of cardiovascular hemodynamics and HRT is a therapeutic measure for the damages, symptoms and risks presented at menopause, it is necessary to know the effects of hormonal therapy with these progestins on this system. The experiments were conducted in Wistar sham and ovariectomized rats, which were randomly divided into 5 experimental groups: SHAM, ovariectomized (OVX), OVX treated with 17 β -estradiol [E₂] (OE₂); OVX treated with DRSP and E₂ (DRSP + OE₂) and OVX treated with MPA (OVX + MPA) orally. After 4 weeks of treatment, vascular reactivity was performed with angiotensin-1-7 (Ang 1-7) dose-response curves, both alone and in the presence of the inhibitors L-NAME, PD123319 and A779. In addition, the aorta was dissected and the protein expression of AT-1, AT-2, MAS, ECA-2 and eNOS were evaluated. There was an increase in body weight of OVX and OVX + MPA animals, the efficacy of ovariectomy was confirmed by the reduction of the uterine weight of OVX rats and the hormone replacement treatments reversed this atrophy. There was an impairment in Ang 1-7-mediated aortic vascular reactivity in OVX rats, being prevented by the therapies, and OE₂ rats improved this effect. Vasodilation was abolished in the presence of L-NAME and there was a reduction of the response in the presence of PD123319 in OE₂ rats. There was no difference in

the protein expression of AT1 and ECA-2 between the groups, Mas expression was higher in the OE₂ and DRSP + OE₂ and AT2 groups and eNOS was more expressed in OVX + MPA. In view of the abovementioned results, it can be concluded that hypoestrogenism impairs Ang 1-7 induced vasodilatation in vascular reactivity in aortic rings; and the therapies with estradiol and progestins restore these parameters, being this the first time that the effects of the hormonal therapies of MPA and DRSP + E2 on the vascular Ang 1-7 are reported.

Keywords: Deficiency estrogenous; renin-angiotensin system; therapy hormonal replace; 17 β -estradiol, acetate of medroxyprogesterone, drospirenone.

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV's) representam a maior causa de morbimortalidade entre homens e mulheres da população mundial, correspondendo a cerca de 20% das mortes (Mensah & Browm, 2007; Wang *et al.*, 2014; Simsekyilmaz *et al.*, 2015). As DCV's são também a maior causa de internação no Sistema Único de Saúde (SUS); se tornando um importante problema de saúde pública no Brasil (Mansur & Favarato, 2012; Malta *et al.*, 2011). Alguns fatores são identificados como de risco para o desenvolvimento das DCV's: tabagismo, sedentarismo, hábitos alimentares, obesidade e sobrepeso, diabetes *mellitus*, hipertensão arterial e a menopausa (Moreira *et al.*, 2010; Lima *et al.*, 2012).

A menopausa é caracterizada pela cessação do ciclo menstrual, onde, em decorrência da falência ovariana, ocorre uma queda nos níveis dos estrógenos circulantes – 17 β -estradiol (E_2), estriol e a estrona – hormônios que desempenham um papel fundamental na regulação da homeostase cardiovascular das mulheres, lhes atribuindo um papel cardioprotetor (Yang & Reckelhoff, 2011; Meyer *et al.*, 2011). De maneira geral, as mulheres apresentam uma expectativa de vida maior comparada à média masculina, e é conhecido que os homens tendem a desenvolver maiores riscos de eventos cardiovasculares do que as mulheres em idade semelhante no período fértil, porém, ao suceder a menopausa, a incidência de DCV's nas mulheres aumentam consideravelmente, podendo se igualar ou até mesmo exceder a da população masculina, se tornando uma das principais causas de morte entre as mulheres de todo o mundo na pós-menopausa (White, 2002; Mosca *et al.*, 2007).

A condição de hipoestrogenismo progressivo exerce um importante impacto fisiológico no organismo feminino, associando-se a: sintomas vasomotores, prejuízo cognitivo, atrofia urogenital e um aumento no risco de desenvolvimento de doenças crônicas degenerativas; como a osteoporose, a diabetes do tipo II e o Alzheimer (Maturana *et al.*, 2007; Spritzer & Wender, 2007; O'Hagan *et al.*, 2012). A redução dos hormônios ovarianos se relaciona com uma alteração no perfil lipídico, na glicemia de jejum, aumento na pressão arterial (PA) e da deposição de gordura na região abdominal, fatores que são considerados de risco para o surgimento de eventos cardiovasculares, os quais contribuem para o desenvolvimento de DCV's (Versiani *et al.*, 2013; Matthew *et al.*, 2001) (Fig. 1).

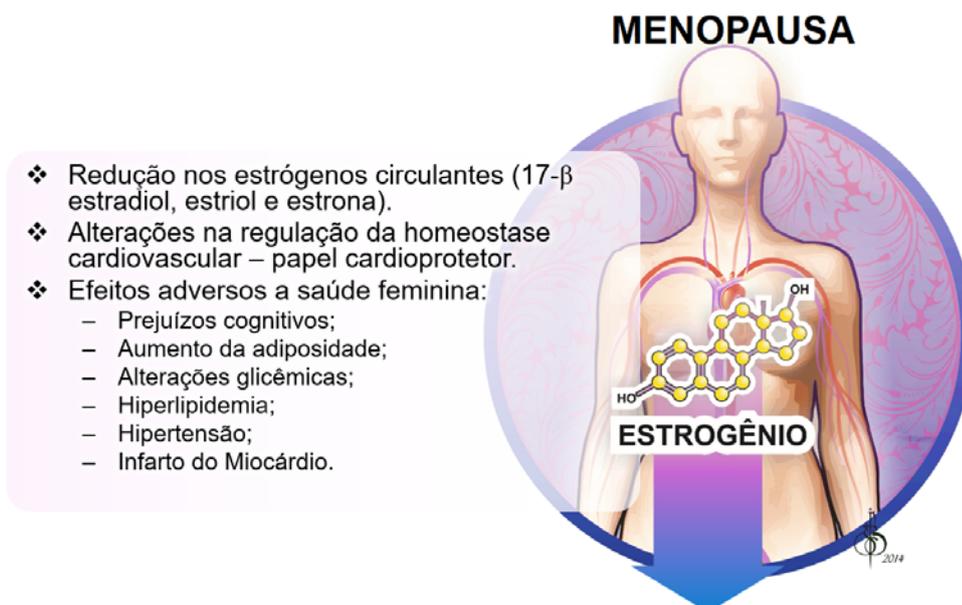


Figura 1: Menopausa e seus efeitos biológicos no organismo da mulher (acervo do laboratório).

O E₂ é o mais potente dos estrógenos endógenos e seu papel cardioprotetor está relacionado a capacidade de regular uma grande variedade de processos fisiológicos, incluindo funções do sistema nervoso; reprodutoras; cardiovasculares e imunológicas. Ele exerce um papel importante na homeostase vascular, agindo na síntese de substâncias vasoativas, através de fatores dependentes e independentes do endotélio (Edwards, 2005; Khalil, 2013; Dos Santos *et al.*, 2014). Foi demonstrado que o E₂ previne a disfunção endotelial através do aumento da expressão de enzimas antioxidantes e intensifica a biodisponibilidade de óxido nítrico (NO), o que promove uma redução na produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), impedindo o estresse oxidativo vascular (Strehlow *et al.*, 2003; Meyer *et al.*, 2006). Além disso, esse hormônio age aumentando a síntese de outras substâncias vasodilatadoras, como a prostaciclina (PGI₂) vascular, e diminui a síntese de substâncias vasoconstritoras, como a angiotensina II (Ang II) e a enzima conversora de angiotensina (ECA) (Wang *et al.*, 2013).

As ações biológicas do E₂ podem ser mediadas pela regulação da transcrição de genes ou via sinalização intracelular, que se relaciona aos seus efeitos não-genômicos (Meyer *et al.*, 2006; Meyer & Barton, 2009; Meyer *et al.*, 2011). Os receptores estrogênicos nucleares ER α e ER β são responsáveis pelas ações clássicas do estrogênio, os quais são distribuídos amplamente pelo sistema

cardiovascular, sendo expressos no endotélio, células do músculo liso vascular (CMLV) e na camada adventícia (Bolegoet *al.*, 2006; Ross *et al.*, 2008). Atuam como fatores de transcrição ativados por ligantes, sendo que a ligação com o E₂ resulta em sua translocação para o núcleo, dimerização e recrutamento de cofatores, alterando a transcrição de genes (Murphy, 2011). Além dos receptores clássicos, foi identificado um outro receptor estrogênico, o qual é um receptor de membrana acoplado a proteína G (GPER), com fortes evidências que o indica como responsável pela sinalização intracelular que permeia os efeitos agudos do estrogênio, os quais são produzidos em um intervalo de tempo curto, denominados efeitos rápidos (Revankaret *al.*, 2005; Lindseyet *al.*, 2013; Revelliet *al.*, 1998; Hammes&Levin, 2007) (Fig. 2).

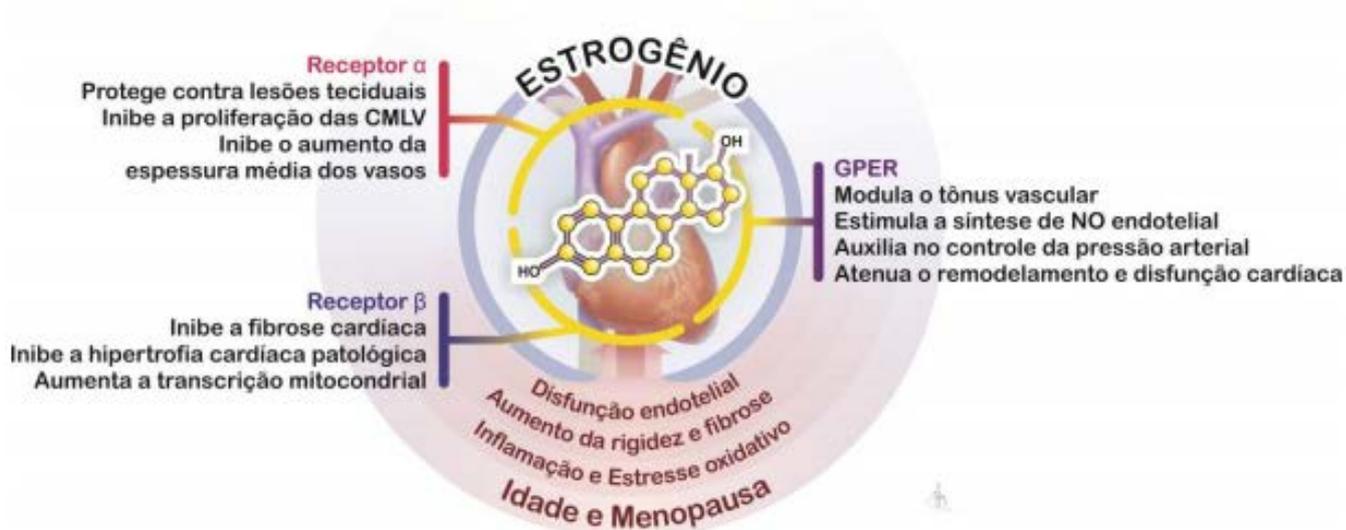


Figura 2: Efeitos cardioprotetores do estrogênio mediante a ativação de seus receptores. CMLV, células do músculo liso vascular; NO, óxido nítrico (acervo do laboratório).

A terapia de reposição hormonal (TRH) é bem estabelecida como medida terapêutica aos prejuízos, sintomas e riscos apresentados na menopausa, porém seus efeitos cardiovasculares são controversos e ainda permanecem como um potencial alvo de estudos (Kahlil, 2013). Os primeiros estudos clínicos observacionais resultaram em efeitos cardiovasculares benéficos, como o Nurse's

Health Study (NHS), um estudo prospectivo que demonstrou que a terapia estrogênica foi capaz de reduzir de 35 a 50% a frequência de DCV's em mulheres pós-menopausadas (Grodstein *et al.*, 2000; Dubey *et al.*, 2004). Estudos experimentais comprovam os efeitos benéficos vasculares do estrogênio, o qual foi capaz de diminuir a pressão arterial, melhorar a reatividade vascular, além de prevenir o estresse oxidativo, a disfunção endotelial e o remodelamento vascular em estágios iniciais da hipertensão em ratas ovariectomizadas (Garcia *et al.*, 2005; Hernandez *et al.*, 2000; Borgo *et al.*, 2011; Claudio *et al.*, 2013). Porém, ensaios clínicos longitudinais randomizados que utilizaram a associação do estrogênio com progestinas, como o Women Health Initiative (WHI) e o Heart and Estrogens/Progestin Replacement Study (HERS I e II), os quais avaliaram os efeitos da TRH no âmbito da prevenção primária e secundária, resultaram em poucos benefícios cardiovasculares e até mesmo eventos adversos, como aumento de acidente vascular cerebral isquêmico e de outros eventos tromboembólicos, além de terem apresentado um aumento da incidência de DVC's e até mesmo de morte pelas mesmas (Grady *et al.*, 2002; Hendrix *et al.*, 2006; Anderson *et al.*, 2004; Rossouw *et al.*, 2002). A ausência de benefícios nesses ensaios pode estar relacionada a diversos fatores, sendo alguns desses: via de administração utilizada, dose do hormônio de escolha, interação com outros hormônios sexuais e o momento o qual a terapia é iniciada (Kahlil, 2013; Rossouw *et al.*, 2007). Apesar desse paradoxo, a TRH é amplamente utilizada na prática clínica, sendo associada a vários estrógenos e progestinas (Schmidt, 2012).

As progestinas são compostos sintéticos que exercem ações pró-gestacionais análogos aos da progesterona natural, sendo empregadas na TRH com o objetivo de prevenir a hiperplasia endometrial ocasionada pela terapia com o estrogênio, condição que predispõe ao câncer (Stanczyk & Henzl, 2001; Anderson *et al.*, 2004). A progesterona age via receptor de progesterona (PR), o qual, assim como os receptores estrogênicos clássicos, é um fator de transcrição ativado por ligante e membro da família de receptores nucleares de esteróides (Lu *et al.*, 2006). As progestinas se ligam ao PR com alta afinidade e simulam suas ações, contudo, muitas progestinas se ligam a outros membros da família de receptores esteroides, como os receptores de andrógenos (AR), receptores de estrógenos (ER) receptores de glicocorticóides (GR) e receptores de mineralocorticóides (MR), o que geralmente

vai acarretar ao surgimento de efeitos colaterais (Africander *et al.* 2011; Moore *et al.*, 2012). A progesterona foi capaz de reduzir a hiperreatividade coronariana em primatas ovariectomizadas, prejudicou o relaxamento dependente do endotélio em artérias coronárias de suínos, e aumentou a liberação de EROS em células do músculo liso vascular (Cox *et al.*, 2005; Hermsmeyer *et al.*, 2004; Wassmann *et al.*, 2005).

O acetato de medroxiprogesterona (MPA) é uma progestina derivada da 17 α -hidroprogesterona, apresentando um perfil altamente glicocorticoide e andrógeno (Bamberger *et al.*, 1999), sendo a mais estudada e utilizada na TRH (Anderson *et al.*, 2004). Contudo, suas ações sobre o sistema cardiovascular têm demonstrado efeitos antagônicos aos benefícios da progesterona natural, o que tem gerando críticas quanto o seu uso (Hermsmeyer *et al.*, 2008). De fato, estudos clínicos demonstraram que a monoterapia com MPA ou a terapia combinada com o E₂ causaram aumento de tromboembolismo venoso, de HDL-colesterol e de biomarcadores de doença arterial coronariana (DAC) (Wild *et al.*, 2013; Sweetland *et al.*, 2012; Godsland, 2001). Experimentalmente, foi demonstrado que o MPA antagonizou os efeitos protetores da progesterona sobre a função vascular de primatas (Mishra *et al.*, 2005), e outro estudo evidenciou que o MPA aboliu os benefícios do estradiol sobre a PA, hipertrofia cardíaca e a função endotelial de ratas ovariectomizadas tratadas com aldosterona e sobrecarga salina (Arias-loza *et al.*, 2006).

A drospirenona (DRSP) é uma progestina derivada da 17 α -espirolactona e o único progestágeno sintético com propriedade anti-aldosterona, além de exercer efeitos anti-andrógenos importantes (Strike-Ware, 2005). Desempenha uma potente ação antimineralocorticoide, sendo assim antagonista do RM, e é amplamente utilizada como contraceptivo e na TRH (Fuhrmann *et al.*, 1996; Krattenmacher, 2000; Elger *et al.*, 2003). Estudos clínicos demonstraram que a associação da DRSP com o E₂ resulta na excreção de água e sódio, resultando em uma modesta diminuição no peso corporal das mulheres, quando comparado com o contraceptivo oral clássico, e em mulheres pós-menopausadas com hipertensão leve, induz a uma diminuição da pressão sanguínea, além de melhorar a função endotelial em mulheres saudáveis menopausadas (Oelkers, 2005; Archer, 2007; White *et al.*, 2005; Villa *et al.*, 2011).

Estudos experimentais corroboram os efeitos benéficos da DRSP sobre o sistema cardiovascular, em que foi constatada a atuação positiva dessa progestina sobre a síntese de NO e em marcadores bioquímicos cardiovasculares, relacionando-se esses efeitos diretamente com a sua propriedade antiminerlocorticóide (Seeger *et al.*, 2009; Simoncini *et al.*, 2007). Recentemente, Borgo e colaboradores (2016) demonstraram que a terapia combinada de DRSP com o E₂ foi capaz de reduzir a pressão arterial e melhorar a reatividade vascular dependente do endotélio no leito vascular coronariano de ratas espontaneamente hipertensas e ovariectomizadas.

A DRSP antagoniza as ações da aldosterona, um hormônio que se liga ao RM retendo água e sódio, o que resulta na elevação da PA. Apesar dos mineralocorticóides exercerem um importante papel fisiológico sobre os fluidos e eletrólitos, tem-se ciência que os efeitos da aldosterona combinado ao RM podem desencadear uma série de processos fisiopatológicos associados ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, e que as ações desse hormônio atingem outros sistemas e órgãos além dos rins, regulando diretamente a resistência vascular nas células do músculo liso vascular (Feldman & Gros, 2011; Mccurley *et al.*, 2012; Genazzani, 2007). Sendo assim, essa progestina tem a capacidade de atuar mimetizando os efeitos endógenos da progesterona natural sobre o sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) (Fig. 3).

O sistema renina-angiotensina (SRA) é um componente-chave no controle da homeostase cardiovascular, atuando diretamente sobre o tônus vascular (Ferreira & Santos, 2005). A via clássica desse sistema é bem esclarecida, em que a redução do volume e pressão sanguínea leva a uma diminuição da concentração de cloreto de sódio, que sensibiliza as células justaglomerulares dos rins a secretarem renina, enzima responsável por clivar o angiotensinogênio em angiotensina I (Ang I). Por conseguinte, a Ang I é catalisada pela ECA em Ang II, e este peptídeo pode se ligar aos seus receptores de angiotensina II do tipo 1 (AT1) e do tipo 2 (AT2), promovendo efeitos antagônicos (Carey & Siragy; 2003) (Fig. 4).

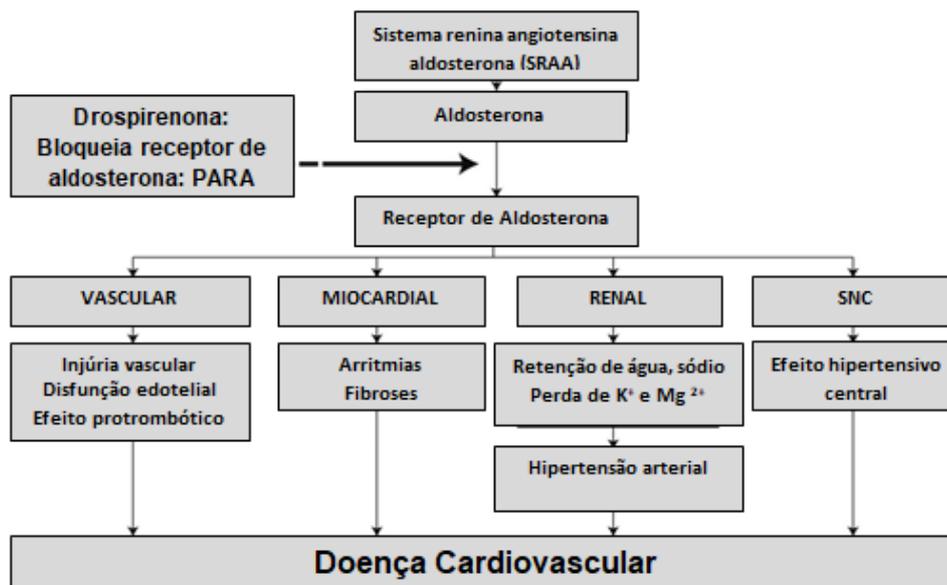


Figura 3: Efeitos da aldosterona na doença cardiovascular. PARA, progestógenos antagonistas do receptor de aldosterona (Adaptado de Genazzaniet al., 2007).

As vias alternativas do SRA não são bem elucidadas, e estão diretamente associadas a efeitos vasodilatadores desse sistema. Dentro desse contexto, se destaca a angiotensina – (1-7), um heptapeptídeo que exerce efeitos fisiológicos vasodilatadores, contrapondo as ações vasoconstritoras da Ang II (Ferreira & Santos, 2005). Esse hormônio pode ser formado a partir da Ang I, por vias independentes da ECA, ou via uma homóloga dela, a enzima catalizadora de angiotensina 2 (ECA-2) (Carey & Siragy; 2003; Donoghue et al., 2000; Tipnis et al., 2000).

Os efeitos desse hormônio são dados pelo receptor Mas acoplado à proteína G, embora existam evidências de respostas fisiológicas correlacionadas aos receptores da Ang II, AT1 e AT2 (Carey & Siragy; 2003). No sistema cardiovascular, este hormônio exerce um efeito cardioprotetor, promovendo a diminuição do remodelamento cardíaco por meio da diminuição de fibrose e hipertrofia (Carey & Siragy, 2003). A sua ação vasodilatadora nos vasos sanguíneos acontece por um mecanismo dependente do endotélio, através da fosforilação da eNOS, aumento na síntese de óxido nítrico (NO), nos níveis de prostanoídes vasodilatadores, fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e diminuição da resposta vasoconstritora de Ang II (Carey & Siragy, 2003). Sendo assim, o eixo vasodilatador

ECA2/Ang-(1-7)/Receptor Mas se mostra como um mecanismo contra-regulatório do eixo vasoconstritor ECA/Ang II/AT1 (Ferreira & Santos, 2005) (Fig. 5).

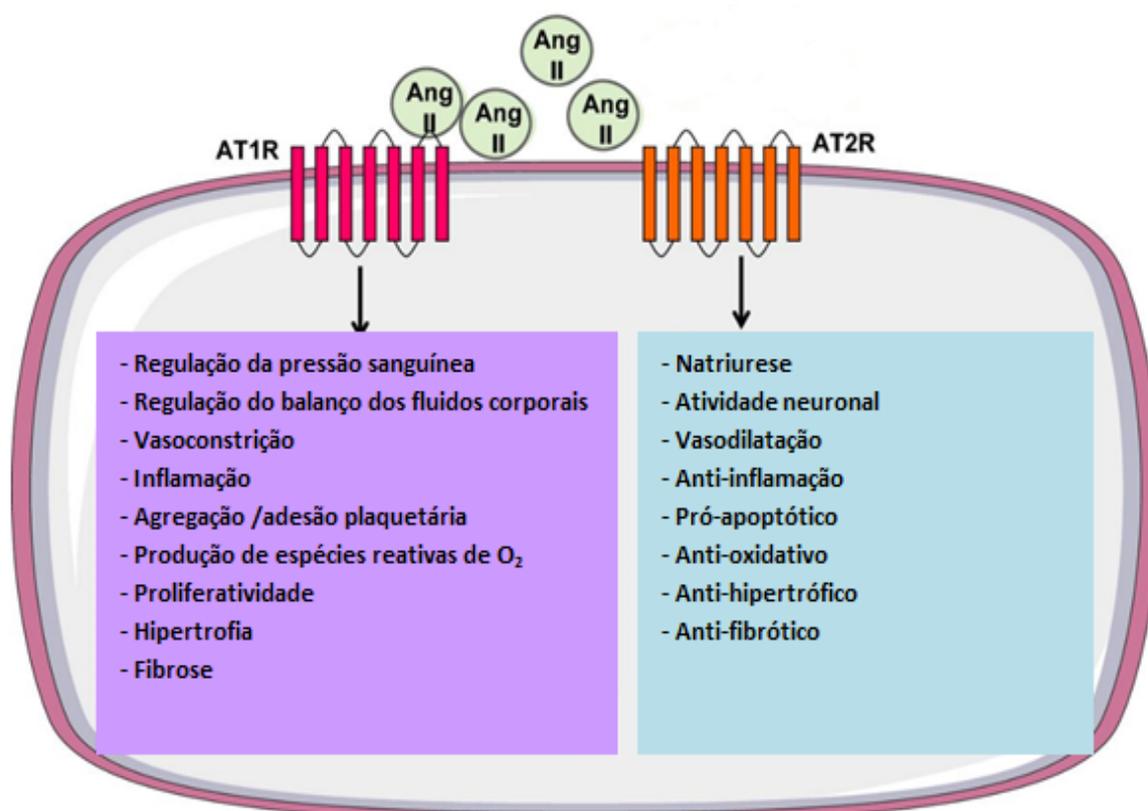


Figura 4: Efeitos biológicos da Ang II através de seus receptores AT1 e AT2 (Adaptado de Chow & Allen, 2016).

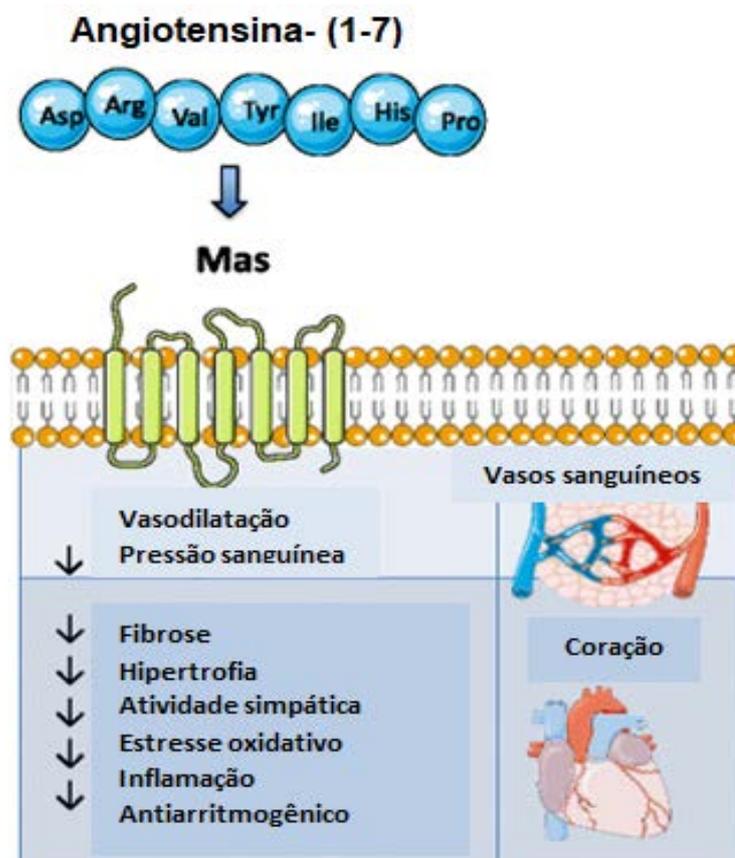


Figura 5: Efeitos biológicos da Ang 1-7 através do receptor Mas (Adaptado de Souza-Neto et al., 2018).

É bem esclarecido na literatura que a condição estrogênica modula o SRA. Estudos demonstram que o E_2 diminuiu a liberação de renina, da ECA plasmática e vascular, além de reduzir os níveis plasmáticos de Ang II e a expressão do receptor AT1 no músculo liso vascular de ratos (Schunkert et al., 1997; Proudler et al., 1995; Gallagher et al., 1999; Nickenig et al., 1998; Yunget al., 2011). Estudos experimentais mostram que o E_2 aumenta os níveis de Ang 1-7 circulantes, expressão renal do receptor AT2 e da ECA-2, além de reduzir a expressão do receptor AT1 (Hillard et al., 2013). Recentemente, Endlich e colaboradores (2017) apresentaram que o estrogênio aumentou a resposta vasodilatadora a Ang 1-7 tanto em ratas espontaneamente hipertensas (SHR) intactas, quanto tratadas com E_2 . A deficiência estrogênica modula desfavoravelmente o SRA, causando uma suprativação do sistema. Estudos prévios demonstraram que a hipoestrogenia acarretou no aumento da atividade da renina no plasma, diminuiu os níveis NO, levou ao aumento da

vasoconstrição induzida por ANG II e reduziu a resposta vasodilatadora a Ang 1-7 em ratas (Xuet *al.*, 2008; Wassmann *et al.*, 2001; Endlicher *et al.*, 2017).

Embora esteja bem descrito e elucidados os efeitos vasculares do estrogênio relacionados ao SRA, há escassez de estudos que investiguem os efeitos das terapias hormonais com DRSP e MPA sobre esse sistema. Sendo o SRA um importante eixo endócrino para a manutenção da hemodinâmica cardiovascular, faz-se necessário conhecer os efeitos dessas progestinas sobre esse sistema, visto que são amplamente utilizadas na TRH em mulheres pós-menopausadas.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos da terapia hormonal contendo uma combinação de progestinas e estrogênio sobre o SRA vascular de ratas ovariectomizadas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a reatividade vascular em anéis de aorta em resposta à angiotensina 1-7 (Ang 1-7) de ratas Wistarovariectomizadas, após 4 semanas de terapia hormonal com E₂.
- Avaliar a reatividade vascular em anéis de aorta em resposta à angiotensina 1-7 (Ang 1-7) de ratas Wistarovariectomizadas, após 4 semanas de terapia hormonal com DRSP+E₂.
- Avaliar a reatividade vascular em anéis de aorta em resposta à angiotensina 1-7 (Ang 1-7) de ratas Wistarovariectomizadas, após 4 semanas de terapia hormonal com MPA.
- Investigar o papel do NO, assim como dos receptores AT-2 e Mas sobre a reatividade vascular em anéis de aorta de ratas Wistarovariectomizadas após 4 semanas de terapia hormonal com E₂.
- Investigar o papel do NO, assim como dos receptores AT-2 e Mas sobre a reatividade vascular em anéis de aorta de ratas Wistarovariectomizadas após 4 semanas de terapia hormonal com DRSP+E₂.
- Investigar o papel do NO, assim como dos receptores AT-2 e Mas sobre a reatividade vascular em anéis de aorta de ratas Wistarovariectomizadas após 4 semanas de terapia hormonal com MPA.
- Analisar a expressão dos receptores AT-1, AT-2 e Mas em anéis de aorta de ratas Wistarovariectomizadas após 4 semanas de terapia hormonal com E₂.
- Analisar a expressão dos receptores AT-1, AT-2 e Mas em anéis de aorta de ratas Wistarovariectomizadas após 4 semanas de terapia hormonal com DRSP+E₂.

- Analisar a expressão dos receptores AT-1, AT-2 e Mas em anéis de aorta de ratas Wistarovariectomizadas após 4 semanas de terapia hormonal com MPA.
- Analisar a expressão das proteínas eNOS e ECA-2 em anéis de aorta de ratas Wistarovariectomizadas após 4 semanas de terapia hormonal com E₂.
- Analisar a expressão das proteínas eNOS e ECA-2 em anéis de aorta de ratas Wistarovariectomizadas após 4 semanas de terapia hormonal com DRSP+E₂.
- Analisar a expressão das proteínas eNOS e ECA-2 em anéis de aorta de ratas Wistarovariectomizadas após 4 semanas de terapia hormonal com MPA.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizadas ratas Wistar adultas (10 a 12 semanas de idade), fornecidas pelo Biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais foram mantidos em caixas coletivas, ambiente com iluminação artificial e ciclo de luz regulado (12h claro/12h escuro), sob condições de temperatura e umidade controladas (22°C a 24°C e 40% a 60%, respectivamente) e livre acesso à ingestão de água e ração (Purina Labina®, São Paulo, SP - Brasil). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as diretrizes de pesquisa biomédica para o cuidado e uso de animais de laboratório, como afirmado pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), e aprovado pela comissão de ética no uso de animais da Universidade Federal do Espírito Santo (protocolo 056/2016). No momento da ovariectomia, os animais foram divididos aleatoriamente em 5 grupos: Sham (SHAM), ovariectomizado (OVX), OVX tratado com estradiol (OE₂), OVX tratado com drospirenona e estradiol (DRSP+OE₂) e OVX tratado com medroxiprogesterona (OVX + MPA).

3.2. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.2.1. Ovariectomia

Após anestesia com ketamina (80 mg/kg) e xilazina (12 mg/kg), as ratas foram submetidas à ovariectomia. Realizou-se uma incisão bilateral de 1 a 1,5 cm na pele, entre o último rebordo costal e a coxa, a um centímetro da linha mediana, seguida de uma incisão na camada muscular, abrindo a cavidade peritoneal para remoção dos ovários e ligadura da tuba uterina, e posterior sutura da musculatura e pele. O grupo SHAM foi submetido a uma pseudo-cirurgia, onde foi realizada uma incisão atingindo pele e músculos, os quais foram suturadas logo em seguida. Ao final do procedimento os animais receberam 0.1ml de Enrofloxacina 2,5% pela via

intramuscular, e para analgesia foi administrado Dipirona monoidratada (100 mg/kg) em dose única. Após 14 dias de recuperação pós-operatória, iniciou-se o tratamento.

3.2.2. Terapias Hormonais

Os animais foram tratados por via oral (gavagem) diariamente por 4 semanas (28 dias). As drogas foram dissolvidas em carboximetilcelulose (CMC), utilizadas imediatamente, e todos os animais receberam o mesmo volume (0.1 ml/100g). Foi administrado 0.1 mg/kg de 17 β -estradiol (Natifa®) no grupo OE₂ o grupo OE₂ + DRSP recebeu 0.075 mg/kg de 17 β -estradiol e 0.15 mg/kg de drospirenona (Angeliq®) e no grupo OVX + MPA administrou-se 1 mg/kg de acetato de medroxiprogesterona (Acetoflux®). Tais concentrações foram escolhidas no sentido de mimetizar as doses utilizadas na conduta clínica como terapia de reposição hormonal em mulheres no período pós-menopausa. As ratas foram pesadas a cada sete dias para o ajuste da dose da droga. Os animais que não receberam nenhuma das terapias tiveram o mesmo volume gavado de CMC. A eficácia da ovariectomia e das terapias experimentais foram avaliadas pelo peso do útero seco e a relação entre peso uterino e o tamanho da tíbia.

3.2.3. Determinação da Fase do Ciclo Estral

O ciclo estral foi realizado ao sacrifício das ratas SHAM, ao final dos 28 dias, sendo monitorado por meio de esfregaços vaginais. As células epiteliais vaginais foram coletadas diariamente entre 08:00 h e 09:00 h e examinados por microscopia óptica conforme descrito por Marcondes *et al.* (2002) para identificação dos tipos de células presentes nas diferentes fases do ciclo estral. As ratas foram consideradas aptas para os protocolos experimentais quando estavam na fase do proestro, caracterizada por altos níveis de estrogênio, para evitar quaisquer influências provocadas pela variação hormonal em diferentes fases do ciclo (DalleLucca *et al.*, 2000).

3.2.4. Dissecção e Reatividade Vascular em Anéis Isolados da Aorta Torácica

Após anestesia com uma mistura contendo ketamina e xilazina (80 mg/kg e 12 mg/kg, respectivamente), as ratas foram sacrificadas por decapitação. O tórax foi aberto, a aorta torácica foi removida e dissecada, sendo mantida em solução de Krebs-Henseleit (KHS, em mM: 118 NaCl, 4.7 KCl, 2.5 CaCl₂.2H₂O, 1.2 MgSO₄.7H₂O, 1.2 KH₂PO₄, 23 NaHCO₃, Glicose 11 e 0.01 EDTA) a 37°C em pH 7.4 e aerada com mistura carbogênica contendo 5% de CO₂ e 95% de O₂ durante o procedimento de dissecção. Ao término da mesma, a aorta foi cortada em segmentos cilíndricos (anéis) e submetida a experimentos de reatividade, sendo que um pequeno anel foi congelado instantaneamente em nitrogênio líquido e conservado a - 80°C para análises posteriores. Após a remoção e dissecção, a aorta torácica foi dividida em seis anéis isolados de aproximadamente 3,5 a 4 mm de comprimento. Cada anel vascular foi colocado em cubas de 5 ml, as quais foram preenchidas com a solução de KHS e aerada com a mistura carbogênica. Dois fios de aço inoxidável em forma de triângulos foram passados através do lúmen dos segmentos, de forma que ficassem paralelos na luz do vaso. Um fio foi fixado à parte inferior da cuba e o outro conectado verticalmente a um transdutor de tensão isométrica (TSD125C, CA, USA). Após a montagem, os anéis aórticos foram submetidos a uma tensão de repouso de aproximadamente 1 grama, reajustada, quando necessário, durante o período de 45 minutos de estabilização. Posteriormente, os anéis foram contraídos duas vezes com cloreto de potássio (KCl, 75 mM). Trinta minutos após a lavagem, a integridade endotelial foi testada com acetilcolina (Ach, 10 µM) nos anéis pré-contraídos com fenilefrina (Phe, 1µM). Um relaxamento igual ou superior a 70% foi considerado demonstrativo da integridade funcional do endotélio. Após lavar por 30 minutos e obter-se novamente os valores basais estáveis, curvas concentração-resposta cumulativas à Ang 1-7 (10⁻¹⁰ a 2 x 10^{-5,5} M; Sigma, St. Louis, MO – USA) foram realizadas. Sua ação vasodilatadora foi avaliada na ausência e presença dos seguintes inibidores: PD 123319 (0,1 µM, um antagonista seletivo do receptor AT₂; Sigma, St. Louis, MO – USA), A-779 (10 µM, um antagonista seletivo do receptor Mas; Sigma, St. Louis, MO – USA) e N^ω-nitro-L-argininemetylester (L-NAME, inibidor não-específico da óxido nítrico sintase (NOS), 100 µM; Sigma, St. Louis, MO – USA). Os anéis foram incubados com os inibidores

por 30 minutos antes de se realizarem as curvas, e as respostas foram registradas utilizando um sistema de aquisição de dados (LabChart 8, AD Instruments Pty Ltd., NSW, AUS) e um computador, acoplados aos transdutores isométricos.

3.2.5. Western Blotting

As amostras foram homogeneizadas em um tampão de lise (em mmol/l: 150 NaCl, 50 Tris-HCL, 5 EDTA.2Na, 1 MgCl₂ mais inibidor de protease; Sigma, St. Louis, MO – USA). O homogenato do tecido foi centrifugado e a concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. O homogenato de tecido (50 µg de proteína) foi submetido à eletroforese (2:30 h a 80V) em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 10% e transferido a uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF, Millipore, Alemanha) por 1:40 - 2:30h a 60V em um sistema de blotting semi-úmido. Após o bloqueio das membranas com TBS-T + leite 5% (molico desnatado) por 2:30 horas, as amostras foram incubadas durante a noite a 4°C com anticorpo primário específico para cada proteína: anti-AT1 ([1:500]; Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA), Anti-AT2 ([1:500], Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA), Anti-eNOS ([1:2500], BD Transduction Laboratories, Lexington, UK), Anti-ECA2 ([1:200], Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) e Anti-Mas ([1:500] Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA). Após a lavagem das membranas com TBS-T, as mesmas foram incubadas com os respectivos anticorpos secundários: anti-mouse IgG (1:2500, Sigma, St. Louis, MO – USA) ou um anti-rabbit (1:7000, A3687, Sigma, St. Louis, MO – USA). As bandas das proteínas foram reveladas utilizando-se o Kit NBT/BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphatenitrobluetetrazolium (NBT) / 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP) – (Invitrogen Corporation, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. A solução de NBT/BCIP foi colocada sobre a membrana de PVDF e sob agitação, as bandas com a expressão foram reveladas. As membranas tiveram suas imagens digitalizadas com o auxílio do scanner e as bandas quantificadas e analisadas com o auxílio do programa ImageJ (National Institutes of Health, USA). Os dados da expressão proteica das proteínas estão demonstrados pela razão da densidade da banda da proteína de interesse pela densidade da β-actina (monoclonal anti-mouse 1:5000, Santa Cruz Biotechnology, USA).

3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A distribuição dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Como os dados obtiveram distribuição considerada normal, os mesmos são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). As médias referentes aos parâmetros ponderais e de expressão proteica foram avaliadas pela análise de variância (ANOVA) de uma via, tendo como fator o tratamento. As curvas concentração-resposta foram analisadas pela ANOVA de duas vias, tendo como fatores o tratamento e a concentração do agonista. As comparações entre as médias foram realizadas pelos pós-testes de Fisher (LeastSignificantDifference – LSD) ou de Dunnett's, quando apropriado. A significância estatística foi estabelecida quando $P < 0,05$. As análises estatísticas e a construção das figuras foram realizadas pelo software GraphPadPrism 6.01 (GraphPad Software, La Jolla, CA – USA).

4. RESULTADOS

4.1. EFEITOS DA OVARIECTOMIA E TERAPIAS HORMONAIIS SOBRE OS PARÂMETROS PONDERAIS

Tabela 1: Peso corporal (PC) das ratas, peso de útero seco (PUS), peso do útero seco corrigido pelo comprimento da tibia (PUS/CT), coxins de gordura parametrial (GP), gordura retroperitoneal (GRe), gordura mesentérica (GM) e a somatória total de gordura (GT). Valores estão expressos como média \pm EPM e (n). * $p < 0.05$ vs. SHAM; $^{\$}p < 0.05$ vs. OVX; $^{\#}p < 0.05$ vs. OE₂; $^{\sim}p < 0.05$ vs. OE₂+ DRSP; $^{\S}p < 0.05$ vs. OVX+MPA. Para análise foi utilizada ANOVA de uma via, seguido de teste post hoc de Fisher.

	SHAM (n)	OVX (n)	OE ₂ (n)	DRSP+OE ₂ (n)	OVX+MPA (n)
PC (inicial)(g)	242.2 \pm 5.4 (11)	245.3 \pm 5.3 (16)	252.2 \pm 5.3 (16)	251.0 \pm 5.6 (16)	251.0 \pm 6.1 (16)
PC (final)(g)	271.3 \pm 5,8 (11)	312,0 \pm 8,0 ^{*#} (16)	287,8 \pm 6,0 (16)	289,3 \pm 4,8 (16)	318,1 \pm 8,3 ^{*#} (16)
PC (% variação)	10,6 \pm 1,0 (11)	21,0 \pm 1,6 ^{*#} (16)	12,2 \pm 1,3 (16)	13,2 \pm 1,3 (16)	21,0 \pm 1,4 ^{*#} (16)
PUS (g)	12,7 \pm 0,6 (14)	3,4 \pm 0,1 ^{*#} (15)	6,0 \pm 0,4 [*] (17)	5,8 \pm 0,3 [*] (16)	4,8 \pm 0,3 ^{*#} (15)
PUS/CT (g/cm)	3,4 \pm 0,1 (14)	0,9 \pm 0,03 ^{*#} (15)	1,6 \pm 0,1 [*] (17)	1,5 \pm 0,08 [*] (16)	1,2 \pm 0,08 ^{*#} (15)
GP (g)	4,5 \pm 0,4 (9)	5,0 \pm 0,5 (9)	4,5 \pm 0,5 (9)	5,6 \pm 0,8 (9)	6,9 \pm 0,8 ^{*\$#} (9)
GRe(g)	3,3 \pm 0,5 (9)	4,2 \pm 0,4 (9)	4,1 \pm 0,4 (9)	4,6 \pm 0,5 (9)	6,2 \pm 0,5 ^{*\$#} (9)
GM (g)	2,7 \pm 0,1 (9)	3,2 \pm 0,2 (9)	3,0 \pm 0,2 (9)	3,1 \pm 0,1 (9)	3,8 \pm 0,3 ^{*#} (9)
GT (g)	10,6 \pm 0,9 (9)	12,4 \pm 1,0 (9)	11,7 \pm 1,1 (9)	13,44 \pm 1,5 (9)	17,0 \pm 1,4 ^{*\$#} (9)

Objetivando analisar os efeitos da deficiência estrogênica e diferentes terapias hormonais sobre os parâmetros ponderais dos animais, foi averiguado o peso corporal dos animais após a ovariectomia e antes das terapias, o peso corporal final, peso de útero e dos coxins adiposos. Não houve diferença significativa entre o peso dos animais no começo do estudo. Ao final das 4 semanas, houve um aumento significativo ($p < 0.05$) no ganho de peso corporal das ratas OVX e OVX+MPA, e os tratamentos com estradiol e drospirenona foram capazes de prevenir esse ganho. A eficácia da ovariectomia foi evidenciada por uma redução no peso do útero seco e na relação útero seco/tibia do OVX, efeito prevenido pela integridade dos ovários e as terapias hormonais, apesar de não restaurar aos valores de SHAM; e o

OE₂apresentou um peso de útero seco maior que o OVX+MPA, que quando corrigido pela tibia, este também se mostrou menor que o OE₂+DRSP, sugerindo que as doses utilizadas nas terapias foram eficazes na reposição hormonal. O tratamento com medroxiprogesterona levou ao aumento dos coxins adiposos, resultando no aumento total de gordura em relação aos demais grupos (Tabela 1).

4.2. REATIVIDADE VASCULAR EM ANÉIS DE AORTA EM RESPOSTA A ANG 1-7

A influência da deficiência estrogênica e terapias hormonais sobre as respostas vasculares à Ang 1-7 foi avaliada em segmentos isolados de aorta. A resposta vasodilatadora concentração-dependente induzida pela Ang 1-7 foi significativamente reduzida no grupo OVX comparada aos demais grupos ($p < 0.05$) (Fig. 1), indicando que o hipoestrogenismo causa um prejuízo na vasodilatação mediada pela Ang 1-7. As terapias hormonais com estradiol e progestinas foram capazes de prevenir essa resposta, e interessante os animais tratados somente com o E₂ apresentaram uma melhora significativa na resposta vasodilatadora da Ang 1-7 ($p < 0.05$) (Fig.6)

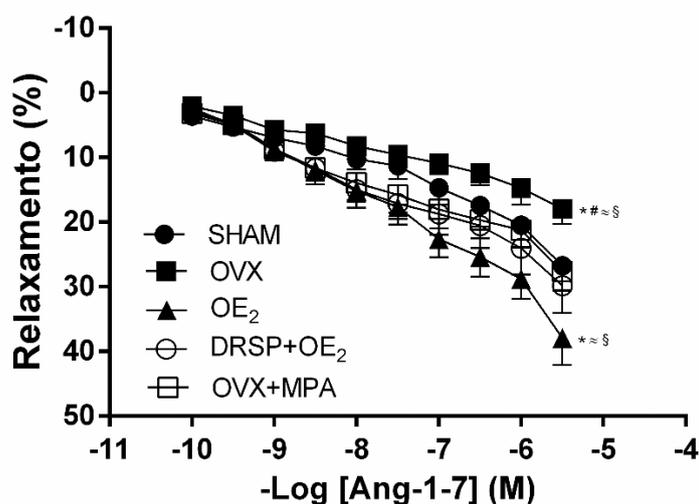


Figura 6. Curva concentração-resposta a Ang 1-7 (10^{-10} – $10^{-5,5}$) em aorta de ratas Wistar dos grupos SHAM (n=12); ovariectomizados (OVX, n=7); ovariectomizados tratados com 17 β -estradiol (OE₂, n=14); ovariectomizados tratados com drospironona e 17 β -estradiol (DRSP+OE₂, n=13) e ovariectomizados tratados com acetato de medroxiprogesterona (OVX+MPA, n=13). Valores estão expressos como média \pm EPM. * $p < 0.05$ vs. SHAM; # $p < 0.05$ vs. OE₂; ~ $p < 0.05$ vs. OE₂+DRSP; § $p < 0,05$ vs. OVX+MPA. Para análise utilizou-se ANOVA de duas vias, seguido do teste *post-hoc* de Fisher.

4.2.1. Avaliação da participação do mediador endotelial NO e dos receptores AT2 e Mas

Para determinar se a resposta vasodilatadora foi modulada pelo NO, foram feitas curvas concentração-resposta a Ang 1-7 na presença do L-NAME, um inibidor não-específico da enzima formadora do NO, a óxido nítrico sintase (NOS). O efeito vasodilatador induzido pela Ang 1-7 em todos os grupos foi completamente abolida na presença de L-NAME, sugerindo que o NO desempenha um papel fundamental na resposta vasodilatadora concentração-dependente induzida pela Ang 1-7, independente dos tratamentos (Fig. 7).

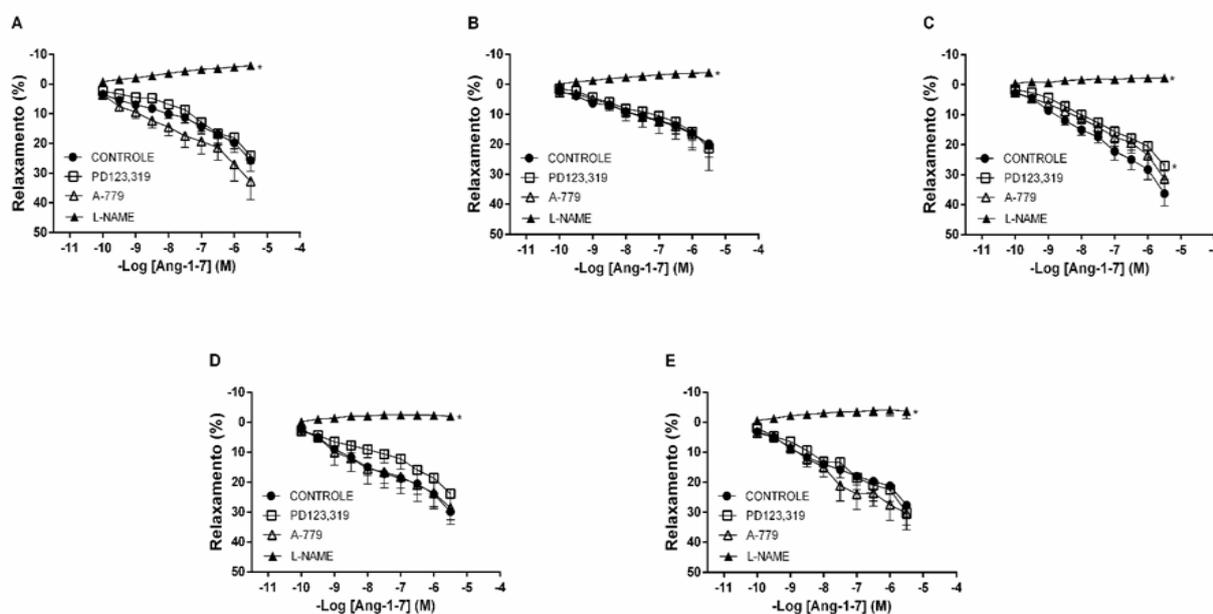


Figura 7. Curva concentração-resposta a Ang 1-7 (10^{-10} – $10^{-5,5}$) sozinha (controle) e na presença de PD123,319 (SHAM: n=5, OVX: n=5, OE₂: n=10, DRSP+OE₂: n=9 e OVX+MPA: n=7); A-779 (SHAM: n=5, OVX: n=5, OE₂: n=10, DRSP+OE₂: n=5 e OVX+MPA: n=7) e L-NAME (SHAM: n=6, OVX: n=6, OE₂: n=8, DRSP+OE₂: n=8 e OVX+MPA: n=6) em aorta de ratas Wistar dos grupos SHAM (A); OVX (B); OE₂ (C); OE₂+DRSP (D) and OVX+MPA (E). Valores estão expressos como média \pm EPM. *p<0.05 comparado com a curva controle. Para análise utilizou-se ANOVA de duas vias, seguido do teste *post-hoc* de Dunnett.

Visando avaliar o mecanismo dos efeitos vasodilatadores da Ang 1-7, foi verificado o envolvimento dos receptores AT2 e Mas pela inibição dos mesmos, através dos seus antagonistas PD123319 e A-779, respectivamente (Fig. 7). Em nenhum dos grupos houve diferença na resposta vasodilatadora mediada pela Ang 1-7 na presença de A-779 e somente o grupo tratado com o E₂ apresentou uma redução na resposta vasodilatadora induzida pela Ang 1-7 na presença do PD123319, o que sugere uma maior interação da Ang 1-7 com o receptor AT2 sob a influência desse hormônio (Fig. 7C).

4.3. EXPRESSÃO PROTEICA

Foi realizado Western Blotting para verificar os efeitos da ovariectomia e das terapias hormonais sobre os componentes do SRA e da enzima produtora de NO endotelial, visto que já é bem descrito na literatura que a resposta da Ang 1-7 é mediada pelo endotélio. Foi avaliada a presença dos receptores AT1; AT2 e Mas, da ECA-2, responsável por produzir Ang 1-7, e da óxido nítrico sintase endotelial (e-NOS), a isoforma endotelial da NOS, que produz NO no endotélio vascular. Não houve diferença na expressão do receptor AT1 (Fig. 8A) e nem da ECA-2 (Fig. 8C) entre os grupos. Os animais tratados com MPA apresentaram um aumento da expressão de AT2 comparado ao SHAM (Fig. 8B). Em relação ao receptor Mas, o grupo DRSP+OE₂ exibiu um aumento significativo ($p < 0.05$) de sua expressão em relação ao grupo SHAM, assim como os animais do grupo OE₂, que além do grupo controle também teve uma expressão maior comparado aos animais OVX (Fig. 8D). O grupo OVX+MPA mostrou um aumento significativo ($p < 0.05$) da expressão de e-NOS comparado aos animais dos grupos SHAM e OVX (Fig. 8E).

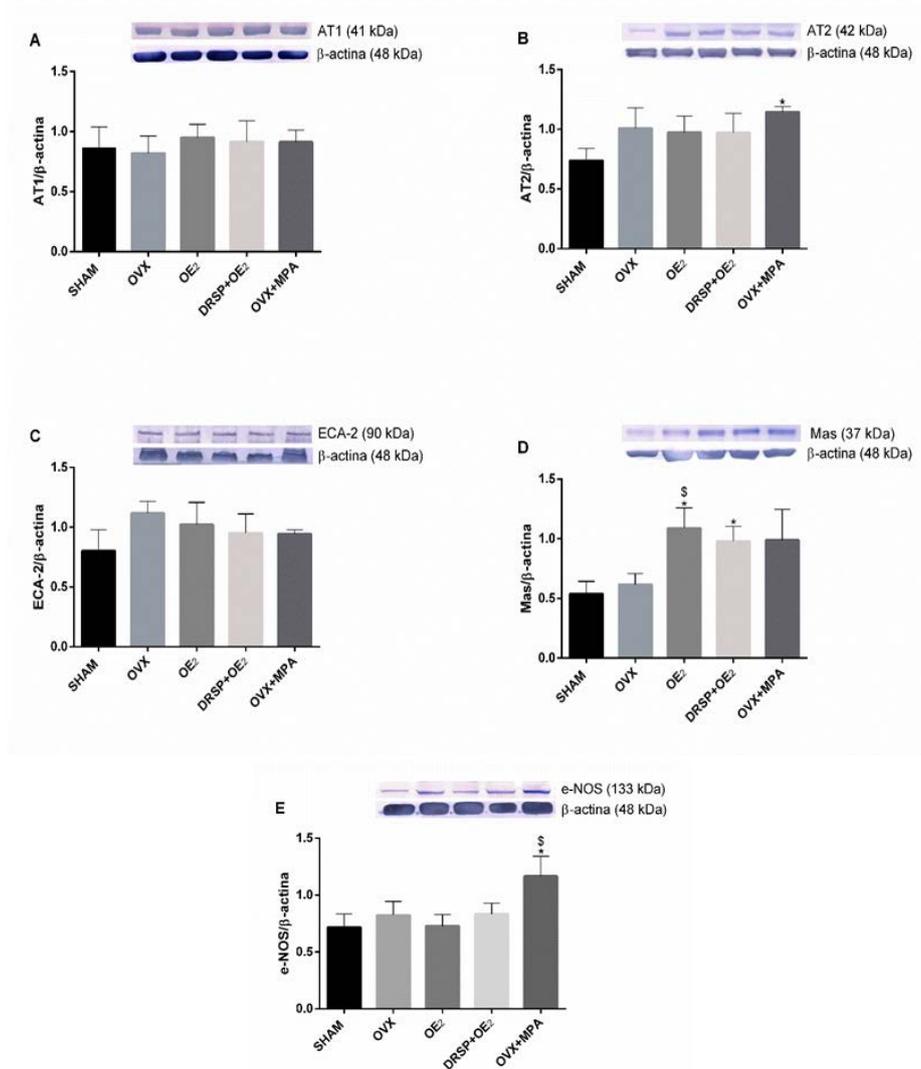


Figura 8. Imunoblotting representativo mostrando a presença de AT1 (A), AT2 (B), enzima conversora de angiotensina 2 (ECA-2, C), Mas (D) e óxido nítrico sintase endotelial (e-NOS, E) em aortas de ratas Wistar. Valores estão expressos como média \pm EPM (n=5). * p <0.05 vs SHAM, \$ p <0.05 vs OVX. Para análise foi utilizada ANOVA de uma via, seguido de teste post-hoc de Fisher.

5. DISCUSSÃO

Os principais achados do nosso estudo podem ser resumidos como a seguir: *i)* a deficiência estrogênica reduz a resposta vasodilatadora mediada pela Ang 1-7 em aorta de ratas Wistar; *ii)* as terapias de reposição hormonal com E₂, DRSP e MPA preveniu esse prejuízo na resposta, a qual é dependente de NO e *iii)* o tratamento em dose terapêutica com o 17 β -estradiol foi capaz de melhorar a vasodilatação induzida pela Ang 1-7 em aorta de ratas Wistar ovariectomizadas.

No presente estudo, as ratas ovariectomizadas e tratadas com MPA apresentaram um aumento no peso corporal comparado aos demais grupos, e estão de acordo com dados da literatura (Sampson *et al.*, 2012; Ohtake *et al.*, 2009; Yunget *et al.*, 2011), propondo que a exposição ao MPA foi suficientemente capaz de mostrar seus efeitos farmacológicos, visto que é comum a progesterona aumentar o ganho de peso corporal das ratas, por ações hormonais gestagênicas (Grey&Wade, 1981; Hervey&Hervey, 1967). As terapias hormonais com E₂ e DRSP foram capazes de prevenir esse aumento no ganho de peso corporal causado pela deficiência estrogênica, corroborando com dados de Borgoet *al.*(2016), um efeito bem documentado na literatura (Xuet *al.*, 2008; Fontana *et al.*, 2014). Em estudos clínicos é observado um aumento no peso corporal, índice de massa corporal (IMC), deposição de gordura e distúrbios metabólicos, os quais são causados pela redução do estrogênio e tratamento com MPA (Gravenaet *al.*, 2013), assim como a restauração desses parâmetros pela reposição com o E₂ e a DRSP (Archer *et al.*, 2005; Huber *et al.*, 2000; Foidartet *al.*, 2000), esta última decorrente da sua atividade antimineralocorticoide, diminuindo a reabsorção de sódio e aumentando a excreção de água.

O SRA atua como regulador da homeostase cardiovascular, influenciando direta e indiretamente as funções cardiovasculares e renais, e a Ang 1-7 é uma substância decorrente de vias alternativas à via clássica do sistema, que exerce efeitos vasodilatadores, contrariando as ações vasoconstritoras da Ang II, atuando como um contra-regulador do SRA. Os resultados mostram que na reatividade aórtica mediada pela Ang 1-7, apresenta um prejuízo da resposta vasodilatadora quando as ratas são ovariectomizadas, o que corrobora com resultados de Endliche *et al.* (2017), que demonstrou uma redução na resposta vasodilatadora mediada pela Ang 1-7 em

aorta de ratas SHR ovariectomizadas. A hipoestrogenia acometida nas mulheres no período pós-menopáusicas e que se apresenta em modelos animais de ovariectomia, tem mostrado estar associada a disfunções hemodinâmicas e vasculares do sistema cardiovascular.

Com o objetivo de conhecer os efeitos das terapias hormonais com o estradiol e progestinas sobre a reatividade induzida pela Ang 1-7, foram realizados estudos em ratas relativos às terapias hormonais com E₂, DRSP+E₂ e MPA. As ratas tratadas foram capazes de prevenir o prejuízo causado pela deficiência estrogênica, o que foi constatado pelo estudo de Endlicher *et al.* (2017), o qual comprovou que ratas SHR tratadas com o 17β-estradiol tiveram a resposta vasodilatadora a Ang 1-7 melhorada em relação às OVX. Pelo que se tem ciência, é a primeira vez que são demonstrados os efeitos das terapias hormonais de MPA e DRSP+E₂ sobre a Ang 1-7 vascular, o que inviabiliza a comparação de resultados. A DRSP é uma progestina utilizada na terapia de reposição hormonal, na qual atua como um potente antimineralocorticoide, mostrando agir positivamente sobre o sistema cardiovascular. Villa *et al.* (2011) mostrou que em mulheres pós-menopausadas tratadas com Angeliq®, houve melhora da reatividade vascular e função endotelial, assim como mulheres pós-menopausadas com angina pectoris apresentaram aumento da perfusão e da reserva de perfusão miocárdica, tratadas com DRSP+E₂ (Knuutiet *et al.*, 2007). O MPA é uma progestina altamente utilizada na terapia de reposição hormonal, e estudos prévios vêm demonstrando que seus efeitos atenuam as ações benéficas do estrogênio e antagonizam os da progesterona natural sobre o sistema cardiovascular. Foi demonstrado que a terapia combinada de MPA+E₂ reduziu a vasodilatação mediada pelo estrogênio em mulheres pós-menopausadas (Wakatsuki *et al.*, 2001). Entretanto, outros estudos revelam efeitos positivos ou neutros relacionados ao MPA. Acs e colaboradores (1999) revelou que a terapia combinada de MPA+E₂ não antagonizou os efeitos benéficos do estradiol e a monoterapia com MPA não induziu mudanças significativas na reatividade de pequenas artérias de ratas. Arrowood *et al.* (2000) publicou claras evidências que o MPA não atenuou a reatividade arterial em mulheres pós-menopausadas e Wender e colaboradores (2011) demonstrou que o tratamento com o MPA combinada ao E₂ foi capaz de reduzir o índice de pulsatilidade da artéria carótida interna de mulheres pós-menopausadas. Diante disso, os achados desse estudo contribuem para

demonstrar o efeito preventivo das terapias hormonais com DRSP e MPA sobre o sistema cardiovascular.

Curiosamente, o tratamento somente com o E₂ foi capaz de melhorar o efeito vasodilatador da Ang 1-7 em aortas de ratas Wistar, o que sugere que essa resposta é modulada pelos níveis circulantes de estrogênio. Similarmente, estudo prévio evidenciou que o estrogênio aumenta a resposta vasodilatadora a Ang 1-7 tanto em ratas intactas, quanto ovariectomizadas tratadas com E₂ em artéria isolada de mesentérica (Neves *et al.*, 2004), porém, contrariamente, Grobe&Katavich(2006) demonstraram que o estrogênio teve um efeito inibitório dose-dependente na resposta vasodilatadora a Ang 1-7 em aorta de ratas Sprague-Dawley. Em ratas hipertensas transgênicas ovariectomizadas, foi demonstrado que o tratamento com estrogênio aumentou a resposta vasodepressora da Ang 1-7 e de seus níveis plasmáticos e, em contrapartida, diminuiu os níveis plasmáticos de Ang II, propondo que o E₂ desempenha um papel protetor ao intensificar os efeitos vasodilatadores da Ang 1-7, diminuindo as ações e formação de Ang II (Brosnihan *et al.*, 1997).

É bem demonstrado na literatura que o efeito vasodilatador da Ang 1-7 na reatividade é mediado pela liberação de NO das células endoteliais (Silva *et al.*, 2007; Fernandes *et al.*, 2001). De fato, os resultados desse estudo mostram que na presença do L-NAME, inibidor da NOS formadora de NO, a vasodilatação foi totalmente abolida em todos os grupos experimentais, corroborando com os estudos prévios, fortemente sugerindo que a resposta da Ang 1-7 é mediada pelo NO. A Ang 1-7 é um peptídeo na qual conhecidamente desempenha seus efeitos biológicos via receptor Mas e estudos evidenciam a existência de provável oligomerizações ou interações com os receptores de Ang II, no desencadeamento de suas ações funcionais (Santos *et al.*, 2013; Castro *et al.*, 2005). No sentido de avaliar as respostas dessas interações, foram construídas curvas de reatividade na presença do PD123319 e o A779, bloqueadores dos receptores AT2 e Mas, respectivamente. Foi Demonstrado que a vasodilatação mediada pela Ang 1-7 na reatividade aórtica não se alterou na presença do A779, corroborando com o estudo de Endlich e colaboradores (2017), o qual não apresentou diferença nas curvas de vasodilatação da Ang 1-7 na reatividade de aorta de ratas SHR (Endlich *et al.*, 2017), da mesma maneira na qual outro trabalho mostrou que a vasodilatação induzida pela Ang 1-7 não sofreu alterações na reatividade em anéis de aorta de ratas Sprague-

Dawley(Silva *et al.*, 2007), especulando-se que exista um subtipo de receptor para a Ang 1-7 ou que a resposta possa depender do leito vascular estudado, assim como da espécie ou modelo animal, visto que no estudo de Lemos e colaboradores (2005) a resposta da vasodilatação mediada pela Ang 1-7 foi totalmente abolida com o A779 na reatividade de aorta em camundongos *knockout* para Mas, do mesmo modo como Silva *et al.*(2011) que evidenciaram abolição com o A779 na resposta vasodilatadora da Ang 1-7 na reatividade vascular de aorta em ratos SHR.

Foi caracterizada que a incubação dos anéis de aorta associada ao bloqueador PD123319 foi capaz de modular o efeito na vasodilatação mediada pela Ang 1-7 nas ratas tratadas somente com o E₂, sugerindo uma maior seletividade da Ang 1-7 pelo receptor AT2. Estudos prévios demonstram que o estrogênio modula o SRAA através do receptor AT2, causando redução da pressão arterial associado à hipertensão (Sampson *et al.*, 2008; Sampson *et al.*, 2012), agindo positivamente sobre a insuficiência cardíaca congestiva (Hudson *et al.*, 2007). Contraditório a esses achados, Endlich *et al.* (2017) mostrou que o estrogênio exógeno não alterou na vasodilatação induzida pela Ang 1-7 em anéis de aorta de ratas SHR bloqueados com o PD123319, e sugere-se que a divergência de dados possa estar relacionada à via de administração e dose do E₂, tempo de tratamento ou modelo de animal estudado.

A Ang 1-7 pode ser formada a partir da Ang I através da neutralendopeptidase (NEP) ou pela prolil-endopeptidase (PEP) ou ainda pela catalisação da Ang II em Ang 1-7 mediante a ECA-2 (Donoghue *et al.*, 2000; Tipnis *et al.*, 2000). Os efeitos desse heptapeptídeo são dados pelo receptor Mas acoplado à proteína G, porém é reportado na literatura evidências de respostas fisiológicas associadas à ligação com os receptores de Ang II, AT1 e AT2, responsáveis por mediar as respostas vasoconstritoras e vasodilatadoras, respectivamente (Castro *et al.*, 2005); e além disso foi demonstrado que a Ang 1-7 pode atuar ligando-se a um subtipo de receptor Mas (Silva *et al.*, 2007). Nos vasos sanguíneos a resposta vasodilatadora da Ang 1-7 acontece por um mecanismo endotélio-dependente via fosforilação da e-NOS, aumento na síntese de NO e outros vasodilatadores, assim como a diminuição da resposta vasoconstritora de Ang II (Carey & Siragy, 2003).

Visto isso, foi analisada a expressão proteica dos componentes do SRA e da eNOS, com o objetivo de elucidar seus mecanismos de ação nas condições de

hipoestrogenia e sobre influência das terapias hormonais. Demonstrou-se que em aorta de ratas Wistarovarietomizadas e tratadas com progestinas e estradiol por 4 semanas não há diferenças na expressão do receptor AT1 e da ECA-2. Esses achados parecem ser contraditórios com estudos anteriores, que demonstraram um aumento de expressão de AT1 em aorta de ratas ovariectomizadas SHR (Endlichet *al.*, 2017) e Sprague-Dawley (Yunget *al.*, 2011), e que a deficiência estrogênica promoveu uma supraexpressão desse receptor (Nickeniget *al.*, 1998) e mostraram uma maior expressão do AT1 no sistema renal de ratas Sprague-Dawleyovarietomizadas (Ramos-filho *et al.*, 2013) ao passo que demonstram que o 17 β -estradiol induziu um *downregulation* na expressão desse receptor em células do músculo liso vascular (Nickeniget *al.*, 2000) e uma menor expressão em aortas de ratas SHR tratadas com E₂(Vera *et al.*, 2007) assim como no sistema renal de ratas Sprague-Dawleyovarietomizadas tratadas (Ramos-filho *et al.*, 2013). Relacionado à ECA-2, foi demonstrado um aumento da enzima em células cardíacas de ratas Sprague-Dawley modelo DOCA-sal de hipertensão tratadas com alta dose de estradiol (Shenoyet *al.*, 2009) e Ji e colaboradores(2008) mostrou uma redução da atividade da ECA-2 em rins de ratas Sprague-Dawley hipertensas ovariectomizadas, o que foi prevenido com o tratamento com 17 β -estradiol. Diante dessas evidências, sugerimos que as divergências de dados possam estar relacionadas a diversos fatores: amostragem(n=5) e sensibilidade ao anticorpo ou até mesmo o modelo animal, tempo, dose e vias de tratamentos estudados. Não foi encontrado na literatura dados que avaliaram os efeitos da terapia hormonal com DRSP e MPA sobre a expressão dessas proteínas.

Foi mostrado que houve uma maior expressão do receptor Mas em aorta de ratas Wistarovarietomizadas tratadas somente com E₂ e combinada com DRSP, o que em parte corrobora para nossos resultados funcionais, visto que a vasodilatação mediada pela Ang 1-7 foi restaurada nas ratas ovariectomizadas tratadas, apesar de não ter sido observado diferenças nos anéis contendo o bloqueador do receptor Mas, o que foi sugerido anteriormente que haja um subtipo de receptor para a Ang 1-7. Na literatura não foram encontrados dados para comparação a esse resultado em relação à terapia hormonal com a DRSP e contrariando esses resultados, em estudo anterior foi demonstrado uma redução na expressão do receptor Mas em

ventrículos esquerdos de camundongos geneticamente OVX tratados com E₂(Wang *et al.*, 2013).

Surpreendentemente, foi observado um aumento na expressão do receptor AT2 e da e-NOS em aorta de ratas tratadas com acetato de medroxiprogesterona. São escassos estudos que relacionam o SRA ao MPA, não sendo encontrado na literatura dados para comparação em relação à expressão do receptor AT2, e sugere-se que talvez esse aumento seja um mecanismo compensatório de defesa para um possível prejuízo funcional que possa estar se instalando. De igual forma, observou-se um aumento da expressão da e-NOS que diverge de alguns trabalhos anteriores, onde demonstraram uma redução na expressão dessa enzima em células endoteliais tratadas com MPA(Simoncini *et al.*, 2004; Liao, 1999; Oishi *et al.*, 2011), isso reforça a hipótese do mecanismo de defesa compensatório citado anteriormente. Evidências mostram que o estresse oxidativo em ratas tratadas com MPA é aumentado (Arias-loza *et al.*, 2011), o que pode gerar desacoplamento da e-NOS, aumentando a sua expressão. Vale a pena citar que o aumento da expressão nem sempre é acompanhado pela ativação da mesma, necessitando que sejam feitos outros estudos a fim de esclarecer esses mecanismos.

6. CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados, podemos concluir que a hipoestrogenia acarreta distúrbios vasculares relacionados ao SRA, um eixo endócrino importante para a homeostase cardiovascular, prejudicando a vasodilatação induzida pela Ang 1-7 na reatividade vascular em anéis aórticos de ratas Wistarovarictomizadas; sendo que as terapias de reposições hormonais com estradiol e progestinas restauram esses parâmetros. Estes dados são de suma importância, considerando paradoxos sobre os efeitos benéficos das terapias com progestinas, sendo esta a primeira vez que são relatados os efeitos das terapias hormonais de MPA e DRSP+E₂ sobre a Ang 1-7 vascular. Com isso, se destaca a importância da terapia hormonal em condições de deficiência estrogênica, na qual se encontra as mulheres pós-menopausadas, e que se associa a distúrbios cardiovasculares como hipertensão, disfunção endotelial, infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral. É salientado a escassez e a necessidade de mais estudos que elucidem os mecanismos de ação das progestinas e ajudem a esclarecer seus efeitos exercidos sobre o sistema cardiovascular.

7. REFERÊNCIAS

ACS, N et al. The effect of ovariectomy and oestrogen replacement on small artery biomechanics in the rat. *Br J ObstetGynecol*, v. 106, p. 148–54, 1999.

AFRICANDER, D; VERHOOG, N; HAPGOOD, JP. Molecular mechanisms of steroid receptormediated actions by synthetic progestins used in HRT and contraception. *Steroids*,v. 76, p. 636–652, 2011.

ANDERSON, GL et al. Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*,v. 291, p. 1701-1712, 2004.

ARCHER, DF et al. Long-term safety of drospirenone-estradiol for hormone therapy: a randomized, double-blind, multicenter trial. *Menopause*, v. 12, p. 716–27, 2005.

ARCHER, DF. Drospirenone and estradiol: a new option for the postmenopausal woman. *Climacteric*, v. 10, p. 3-10, 2007.

ARIAS-LOZA,P et al. Medroxyprogesterone acetate aggravates oxidative stress and left ventricular dysfunction in rats with chronic myocardial infarction. *ToxicologicPathology*,v. 39, p. 867-878, 2011.

ARIAS-LOZA,PA et al. Medroxyprogesterone acetate but not drospirenone ablates the protective function of 17 β -estradiol in aldosterone salt-treated rats. *Hypertension*, v. 48, p. 994-1001, 2006.

ARROWOOD, JA et al. Hormone replacement preserves endothelial function in postmenopausal women with only risk factors for coronary disease. *Circulation Supplement II*, v. 102, p. 108, 2000.

BAMBERGER, CM et al. Dissociative glucocorticoid activity of medroxyprogesterone acetate in normal human lymphocytes. *The J of Clinical Endocrino and Metabv.* 84, n. 11, p. 4055–4061, 1999.

BOLEGO, C et al. Selective agonists of estrogenreceptor isoforms: new perspectives for cardiovascular disease. *ArteriosclerThrombVascBiol*, v. 26, p. 2192-2199, 2006.

BORGO, MV et al. Effect of tamoxifen on the coronary vascular reactivity of spontaneously hypertensive female rats. *Braz J Med Biol Res*, v. 44, n. 8, p. 786–792, 2011.

BORGO, MV et al. Hormonal therapy with estradiol and drospirenone improves endothelium-dependent vasodilation in the coronary bed of ovariectomized spontaneously hypertensive rats. *Braz J Med Biol Res*, v. 49, n. 1, e4655, 2016.

BRADFORD, M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BROSNIHAN, KB; LI, P; GATEN, D; FERRARIO, CM. Estrogen protects transgenic hipertensive rats by shifting the vasoconstrictor-vasodilatador balance of RAS. *Am J Physiol*, v. 273, p. 1908-1915, 1997.

CAREY, RM; SIRAGY, HM. Newly components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *EndocrVer*, v. 24, p. 261-271, 2003.

CASTRO, CH et al. Evidence for a functional interaction of the angiotensin-(1-7) receptor Mas with AT1 ou AT2 receptors in the mouse heart. *Hypertension*, v. 46, p. 937-42, 2005.

CHOW, BSM; ALLEN, TJ. Angiotensin II type 2 receptor (AT2R) in renal and cardiovascular disease. *Clinical Science*, v. 130, p. 1307–1326, 2016.

CLAUDIO, ERG et al. Effects of chronic swimming training and oestrogen therapy on coronary vascular reactivity and expression of antioxidant enzymes in ovariectomized rats. *PLoS ONE*, v. 8, n. 6, e64806, 2013.

COX, MW et al. Effects of progesterone and estrogen on endothelial dysfunction in porcine coronary arteries. *J Surg Res*, v. 124, p. 104–111, 2005.

DALLE LUCCA, JJ; ADEAGBO, ASO; ALSIP, NL. Influence of oestrous cycle and pregnancy on the reactivity of the rat mesenteric vascular bed. *Human Reproduction*, v. 15, n. 4, p. 961-968, 2000.

DONOGHUE, M et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res*, v.87, p.E1-E9, 2000.

DOS SANTOS, R L et al. Sex hormones in the cardiovascular system. *Hormone molecular biology and clinical investigation*, v. 18, n. 2, p. 89-103, 2014.

DUBEY, RK; IMTHURN, B; ZACHARIA, LC; JACKSON, EK. Hormone replacement therapy and cardiovascular disease: what went wrong and where do we go from here?. *Hypertension*, v. 44, p. 789-795, 2004.

EDWARDS, DP. Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annu Rev Physiol*, v. 67, p. 335-376, 2005.

ENDLICH, PW et al. Exercise modulates the aortic renin-angiotensin system independently of estrogen therapy in ovariectomized hypertensive rats. *Peptides*, v. 87, p. 41-49, 2017.

FELDMAN, RD; GROS, R. Unraveling the mechanisms underlying the rapid vascular effects of steroids: sorting out the receptors and the pathways. *Br J Pharmacol*, v. 163, p. 1163-1169, 2011.

FERNANDES, L et al. Potentiation of bradykinin by angiotensin-(1–7) on arterioles of spontaneously hypertensive rats studied in vivo. *Hypertension*, v. 37, p. 703-709, 2001.

FERREIRA, AJ; SANTOS, RAS. Cardiovascular actions of angiotensin-(1,7). *Braz J Med Biol Res*, v. 38, p. 499-507, 2005.

FOIDART, JM et al. The contraceptive profile of a new oral contraceptive with anti-mineralocorticoid and antiandrogenic effects. *Eur. J. Contracept. Reprod. Health Care*, v. 5, n. 3, p. 25–33, 2000.

FONTANA, R et al. Estrogen replacement therapy regulation of energy metabolism in female mouse hypothalamus. *Endocrinology*, v. 155, n. 6, p. 2213–21, 2014.

GALLAGHER, PE et al. Estrogen regulation of angiotensin-converting enzyme mRNA. *Hypertension*, v. 33 (Part II), p. 323-328, 1999.

GARCIA, PM; et al. 17 β -Estradiol exerts a beneficial effect on coronary vascular remodeling in the early stages of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Menopause*; v. 12, n. 4, p. 453-459, 2005.

GENAZZANI, AR; MANNELLA, P; SIMONCINI, T. Drospirenone and its antiandrogenic properties. *Climacteric*, v. 10, p. 11-8, 2007.

GODSLAND, IF. Effects of postmenopausal hormone replacement therapy on lipid, lipoprotein, and apolipoprotein (a) concentrations: analysis of studies published from 1974–2000. *Fertil Steril*, v. 75, p. 898–915, 2001.

GRADY, D et al. Cardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and estrogen/progestin replacement study follow-up (HERS II). *JAMA*, v. 288, p. 49-57, 2002.

GRAVENA, AA et al. Excess weight and abdominal obesity in postmenopausal Brazilian women: a population-based study. *BMC women's health*, v. 13, n. 1, p. 46, 2013.

GRAY, JM; WADE, GN. Food intake, body weight, and adiposity in female rats: actions and interactions of progestins and antiestrogens. *Am J Physiol*, v. 240, n. 5, E474-81, 1981.

GROBE, JL; KATOVICH, MJ. Alterations in aortic vascular reactivity to angiotensin 1-7 in 17-beta-estradiol-treated female SD rats. *RegulPept*, v. 133, p. 62-67, 2006.

GRODSTEIN, F; et al. A prospective, observational study of postmenopausal hormone therapy and primary prevention of cardiovascular disease. *Ann Intern Med*, v. 133, p. 933-941, 2000.

HAMMES, SR; LEVIN, ER. Extranuclear steroid receptors: nature and actions. *Endocr Rev*, v. 28, p. 726-741, 2007.

HENDRIX, SL et al. Effects of conjugated equine estrogen on stroke in the women's health initiative. *Circulation*, v. 113, p. 2425-2434, 2006.

HERMSMEYER, RK et al. Prevention of coronary hyperreactivity in pre-atherogenic menopausal rhesus monkeys by transdermal progesterone. *Arteriosclerosis ThrombVascBiol*, v. 24, p. 955-961, 2004.

HERMSMEYER, RK; THOMPSON, TL; POHOST, GM; KASKI, JC. Cardiovascular effects of medroxyprogesterone acetate and progesterone: a case of mistaken identity? *Nat ClinPractCardiovasc Med*, v. 5, p. 387-395, 2008.

HERNANDEZ, I; DELGADO, JL; DIAZ, J. 17 β -Estradiol prevents oxidative stress and decreases blood pressure in ovariectomized rats. *Am J Physiol*; v. 279, p. 1599-1605, 2000.

HERVEY, E; HERVEY, GR. The effects of progesterone on body weight and composition in the rat. *J Endocrinol*, v. 37, n. 4, p. 361-81, 1967.

HILLIARD, LM; SAMPSON, AK; BROWN, RD; DENTON, KM. The "his and hers" of the renin-angiotensin system. *CurrHypertens Reports*, v. 15, p. 71-79, 2013.

HUBER, J et al. Efficacy and tolerability of a monophasic oral contraceptive containing ethinylestradiol and drospirenone. *Eur J Contracept Reprod Health Care*, v. 5, p. 25-34, 2000.

HUDSON, M et al. Sex differences in the effectiveness of angiotensin receptor blockers and angiotensin converting enzyme inhibitors in patients with congestive heart failure—a population study. *Eur J Heart Fail*, v. 9, n.(6–7), p. 602–609, 2007.

JI, H et al. Role of angiotensin-converting enzyme² and angiotensin(1–7) in 17 β -oestradiol regulation of renal pathology in renal wrap hypertension in rats. *Exp Physiol*, v. 93, n. 5, p. 648–657, 2008.

KHALIL, RA. Estrogen, vascular estrogen receptor and hormone therapy in postmenopausal vascular disease. *Biochem Pharmacol*, v. 86, p. 1627-1642, 2013.

KNUUTI, J et al. Effect of estradiol-drospirenone hormone treatment on myocardial perfusion reserve in postmenopausal women with angina pectoris. *Am J Cardiol*, v. 99, p. 1648–52, 2007.

LEMOS, VS et al. The endotheliumdependent vasodilator effect of the nonpeptide Ang(1–7) mimic AVE 0991 is abolished in the aorta of Mas-knockout mice. *J Cardiovasc Pharmacol*, v. 46, p. 274–79, 2005.

LIAO, JK. Endothelial nitric oxide and vascular inflammation. In: Panza JA, Cannon ROI, editors. *Endothelium, nitric oxide and atherosclerosis*. Armonk (NY): Futura Publishing Co., p. 119–132, 1999.

LIM, SS et al. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, v. 380, p. 2224-2260, 2012.

LINDSEY, S H et al. Reduced vasorelaxation to estradiol and G-1 in aged female and adult male rats is associated with GPR30 downregulation. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, v. 305, n. 1, p. E113-E118, 2013.

LU, NZ et al. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: glucocorticoid, mineralocorticoid, progesterone, and androgen receptors. *PharmacolRev*, v. 58, p. 782–797, 2006.

MALTA, DC; NETO, OLM, JÚNIOR, JBS. Presentation of the Strategic Action Plan for Coping with Chronic Diseases in Brazil from 2011 to 2022. *EpidemiolServSaúde*, v. 20, n. 4, p. 425-38, 2011.

MANSUR, AP; FAVARATO, D. Mortality due to cardiovascular diseases in Brazil and in the metropolitan region of São Paulo: a 2011 update. *ArqBrasCardiol*, v. 99, p. 755-761, 2012.

MARCONDES, FK; BIANCHI, FJ; TANNO, AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology*, v. 62, n. 4A, p. 609-614, 2002.

MATTHEWS, KA et al. Changes in cardiovascular risk factors during the perimenopause and postmenopause and carotid artery atherosclerosis in healthy women. *Stroke*, v. 32, n. 5, p. 1104-1111, 2001.

MATURANA, MA; IRIGOYEN, MC; SPRITZER, PM. Menopause, estrogens, and endothelial dysfunction: current concepts. *Clinics*, v. 62, n. 1, p. 77-86, 2007.

MCCURLEY, A; et al. Direct regulation of blood pressure by smooth muscle cell mineralocorticoid receptors. *Nat Med*, v. 18, n.9, p. 1429-1433, 2012.

MENSAH, GA & BROWN, DW. An overview of cardiovascular disease burden in the United States. *Health affairs*, v. 26, p. 38-48, 2007.

MEYER, M R & BARTON, M. ER α , ER β , and gpER: novel aspects of oestrogen receptor signalling in atherosclerosis. *Cardiovascular research*, v.83, n. 4, p. 605-610, 2009.

MEYER, MR; HAAS, E; BARTON, M. Gender differences of cardiovascular disease: new perspectives for estrogen receptor signaling. *Hypertension*, v. 47, p. 1019 -1026, 2006.

MEYER, MR; PROSSNITZ, ER; BARTON, M. The G protein-coupled estrogen receptor GPER/GPR30 as a regulator of cardiovascular function. *Vascular pharmacology*, v. 55, n. 1, p. 17-25, 2011.

MISHRA, RG et al. Medroxyprogesterone acetate and dihydrotestosterone induce coronary hyperreactivity in intact male rhesus monkeys. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 90, p. 3706-3714, 2005.

MOORE, NL; HICKEY, TE; BUTLER, LM; TILLEY, WD. Multiple nuclear receptor signaling pathways mediate the actions of synthetic progestins in target cells. *Mol Cell Endocrinol*, v. 357, p. 60–70, 2012.

MOREIRA, TMM; GOMES, EB; SANTOS, JC. Cardiovascular risk factors in young adults with arterial hypertension and/or diabetes mellitus. *Rev Gaúcha Enferm*, v. 31, p. 662-669, 2010.

MOSCA, L et al. Evidence-based guidelines for cardiovascular disease prevention in women: 2007 update. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 49, n.11, p. 1230-1250, 2007.

MURPHY, E. Estrogen signaling and cardiovascular disease. *Circ Res*, v. 109, p. 687-696, 2011.

NEVES, LA; AVERILL, DB; FERRARIO, CM; ASCHNER, JL; BROSNIHAN, KB. Vascular responses to Angiotensin-(1-7) during the estrous cycle. *Endocrine*, v. 24, p. 161-5, 2004.

NICKENIG, G et al. Differential effects of estrogen and progesterone on AT(1) receptor gene expression in vascular smooth muscle cells. *Circulation*, v. 102, n. 15, p. 1828-33, 2000.

NICKENIG, G et al. Estrogen modulates AT1 receptor gene expression in vitro and in vivo. *Circulation*, v. 97, p. 2197–2201, 1998.

O'HAGAN, TS; WHARTON, W, KEHOE, PG. Interactions between oestrogen and the renin angiotensin system - potential mechanisms for gender differences in Alzheimer's disease. *Am J Neurodegener Dis*, v. 1, n.3, p. 266-279, 2012.

OELKERS, WH. Drospirenone in combination with estrogens: for contraception and hormone replacement therapy. *Climacteric*, v.8, p. 19-27, 2005.

OHTAKE, S; FUKUI, M; HISADA, S. Collaborative work on evaluation on ovarian toxicity 1) Effects of 2- or 4-week repeated-dose administration and fertility studies with medroxyprogesterone acetate in female rats. *J Toxic Sci*, v. 34, SP23-SP29, 2009.

OISHI, A et al. Role of glucocorticoid receptor in the inhibitory effect of medroxyprogesterone acetate on the estrogen-induced endothelial nitric oxide synthase phosphorylation in human umbilical vein endothelial cells. *FertSter*, v. 95, p. 1168-1170, 2011.

PROUDLER, AJ et al. Hormone replacement therapy and serum angiotensin-converting enzyme activity in postmenopausal women. *Lancet*, v. 346, p. 89-90, 1995.

RAMOS-FILHO, AC Set al. The renin–angiotensin system plays a major role in voiding dysfunction of ovariectomized rats. *Life Sciences*, v. 93, p. 820-29, 2013.

REVANKAR, CM et al. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science*, v. 307, p. 1625–1630, 2005.

REVELLI, A; MASSOBRIO, M; TESARIK, J. Nongenomic actions of steroid hormones in reproductive tissues. *Endocr Rev*, v. 19, p. 3-17, 1998.

ROSS, RL; SEROCK, MR; KHALIL, RA. Experimental benefits of sex hormones on vascular function and the outcome of hormone therapy in cardiovascular disease. *CurrCardiol Rev*, v. 4, p. 309-322, 2008.

ROSSOUW, JE et al. Postmenopausal hormone therapy and risk of cardiovascular disease by age and years since menopause. *JAMA*, v. 297, p. 1465– 1477, 2007.

ROSSOUW, JE et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy menopausal women: principal results from the Women's Health Initiative Randomized Controlled Trial. *JAMA*, v. 288, p. 321-333, 2002.

SAMPSON, AK et al. Enhanced angiotensin II type 2 receptor mechanisms mediate decreases in arterial pressure attributable to chronic lowdose angiotensin II in female rats. *Hypertension*, v. 52, n. 4, p. 666– 71, 2008.

SAMPSON, AK et al. The arterial depressor response to chronic low-dose angiotensin II infusion in female rats is estrogen dependent. *Am J PhysiolRegullIntegr Comp Physiol*, v. 302, n. 1, R159–65, 2012.

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. *Journalofendocrinology*, v. 216, n. 2, R1-R17, 2013.

SCHMIDT, P. The 2012 Hormone Therapy Position Statement of The North American Menopause Society. *Menopause*, v. 19, n. 3, p. 257-271, 2012.

SCHUNKERT, H et al. Effects of estrogen replacement therapy on the renin–angiotensin system in postmenopausal women. *Circulation*, v. 95, p. 39–45, 1997.

SEEGER, H; WALLWIENER, D; MUECK, AO. Effects of drospirenone on cardiovascular markers in human aortic endothelial cells. *Climacteric*, v. 12, n. 1, p. 80-87, 2009.

SHENOY, V et al. 17β -Estradiol modulates local cardiac renin-angiotensin system to prevent cardiac remodeling in the DOCA-salt model of hypertension in rats. *Peptides*, v. 30, p. 2309–2315, 2009.

SILVA, DM et al. Evidence for a new angiotensin-(1-7) receptor subtype in the aorta of Sprague-Dawley rats. *Peptides*, v. 28, n. 3, p. 702-7, 2007.

SILVA, DMR et al. Swimming training improves the vasodilator effect of angiotensin-(1-7) in the aorta of spontaneously hypertensive rat. *J Appl Physiol*, v. 111, p. 1272-1277, 2011.

SIMONCINI, T et al. Differential signal transduction of progesterone and medroxyprogesterone acetate in human endothelial cells. *Endocrinology*, v. 145, p. 5745–5756, 2004.

SIMONCINI, T et al. Drospirenone increases endothelial nitric oxide synthesis via a combined action on progesterone and mineralocorticoid receptors. *Hum Reprod*, v. 22, n. 8, p. 2325-2334, 2007.

SIMSEKYILMAZ, S et al. Progress in interventional cardiology: challenges for the future. *Thrombosis and Haemostasis*, v. 113, n. 3, p. 464-472, 2015.

SITRUK-WARE, R. Pharmacology of different progestogens: the special case of drospirenone. *Climacteric*, v. 8, n. 4-12, 2005.

SOUZA-NETO, FP et al. Angiotensin-(1–7) and Alamandine on Experimental Models of Hypertension and Atherosclerosis. *Current Hypertension Reports* v. 20, p. 1-17, 2018.

SPRITZER, PM; WENDER, MC. Hormone therapy in menopause: when not to use. *Arq Bras Endocrinol Metabol.*, v. 51, n. 7, p. 1058-63, 2007.

STANCZYK, FZ; HENZL, MR. Use of the name "Progestin." *Contraception*, v. 64, p. 1-2, 2001.

STREHLOW, K et al. Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. *Circulation research*, v. 93, n. 2, p. 170-177, 2003.

SWEETLAND, S et al. Venous thromboembolism risk in relation to use of different types of postmenopausal hormone therapy in a large prospective study, *J. Thromb. Haemost*, v. 10, n.11, p. 2277-2286, 2012.

TIPNIS, SR et al. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captoprilinsensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem*, v. 275, p. 33238-33243, 2000.

VERA, R et al. Genistein restores caveolin-1 and AT-1 receptor expression and vascular function in large vessels of ovariectomized hypertensive rats. *Menopause*, v. 14, n. 5, p. 933-940, 2007.

VERSIANI, CM et al. Evaluation of cardiovascular risk in climacteric women aided by Family Health Program. *Rev Bras Clin Med*, v. 11, p. 1-5, 2013.

VILLA, P et al. Low-dose estrogen and drospirenone combination: Effects on glycoinsulinemic metabolism and other cardiovascular risk factors in healthy postmenopausal women. *Fertil Steril*, v. 95, n. 1, p. 158-163, 2011.

WAKATSUKI, A; OKATANI, Y; IKENOUE, N; FUKAYA, T. Effect of medroxyprogesterone acetate on endothelium-dependent vasodilation in postmenopausal women receiving estrogen. *Circulation*, v. 104, n. 15, p. 1773-78, 2001.

WANG, H; et al. Characterization of the Cardiac Renin Angiotensin System in Oophorectomized and Estrogen-Replete mRen2.Lewis Rats. *PLoS One*, v. 8, n. 10, e76992, 2013.

WANG, Q et al. Tetrahydrobiopterin improves endothelial function in cardiovascular disease: a systematic review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2014, p. 1-7, 2014.

WASSMANN, K; WASSMANN, S; NICKENIG, G. Progesterone antagonizes the vasoprotective effect of estrogen on antioxidant enzyme expression and function. *Circulation Research*, v. 11, n. 97, s. 10, p. 1046-54, 2005.

WASSMANN, S et al. Endothelial dysfunction and oxidative stress during estrogen deficiency in spontaneously hypertensive rats. *Circulation*, v. 103, p. 435–441, 2001.

WENDER, MC et al. Effect of conjugated estrogen versus conjugated estrogen associated with medroxyprogesterone acetate in postmenopausal women on internal carotid artery pulsatility index: a randomized pilot study. *J. Obstet Gynaecol Res*, v. 37, p. 815–818, 2011.

WHITE, RE. Estrogen and vascular function. *Vascul Pharmacol*, v. 38, n. 2, p. 73-80, 2002.

WHITE, WB; PITT, B; PRESTON, RA; HANES, V. Antihypertensive effects of drospirenone with 17 beta-estradiol, a novel hormone treatment in postmenopausal women with stage 1 hypertension. *Circulation*, v. 112, p. 1979-1984, 2005.

WILD, RA et al. Coronary heart disease events in the Women's Health Initiative hormone trials: effect modification by metabolic syndrome: a nested case-control study within the Women's Health Initiative randomized clinical trials. *Menopause*, v. 20, p. 254–260, 2013.

XU, X et al. Effects of ovariectomy and 17beta-estradiol treatment on the renin-angiotensin system, blood pressure, and endothelial ultrastructure. *Int J Cardiol*, v. 130, p. 196–204, 2008.

YANG, XP; RECKELHOFF, JF. Estrogen, hormonal replacement therapy and cardiovascular disease. *Current opinion in nephrology and hypertension*, v. 20, n. 2, p. 133-138, 2011.

YUNG, LM et al. Inhibition of renin-angiotensin system reverses endothelial dysfunction and oxidative stress in estrogen deficient rats. *PLoS One*, v. 6, n. 3, e17437, 2011.