



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISIOLOGIA E**  
**FARMACOLOGIA**

**ALTERAÇÕES VASCULARES E A PARTICIPAÇÃO DO EIXO ANG-**  
**(1-7)/RECEPTOR MAS EM AORTA DE CAMUNDONGOS FÊMEAS**  
**OVARIECTOMIZADAS**

**ILDERNANDES VIEIRA ALVES**

**BELO HORIZONTE - MG**  
**2019**

**ILDERNANDES VIEIRA ALVES**

**ALTERAÇÕES VASCULARES E A PARTICIPAÇÃO DO EIXO ANG -  
(1-7)/RECEPTOR MAS EM AORTA DE CAMUNDONGOS FÊMEAS  
OVARIECTOMIZADAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

**Orientadora:** Profa. Dra. Rafaela Fernandes da Silva

**Coorientador:** Prof. Dr. Robson Augusto Souza dos Santos

**BELO HORIZONTE - MG  
2019**

043      Alves, Ildernandes Vieira.

Alterações vasculares e a participação do eixo ANG -(1-7)/receptor mas em aorta de camundongos fêmeas ovariectomizadas [manuscrito] / Ildernandes Vieira Alves. – 2019.

81 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Rafaela Fernandes da Silva. Coorientador: Prof. Dr. Robson Augusto Souza dos Santos.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Farmacologia. 2. Ovariectomia. 3. Estrogênios. 4. Angiotensinas. 5. Menopausa. I. Silva, Rafaela Fernandes da. II. Santos, Robson Augusto Souza dos. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 615

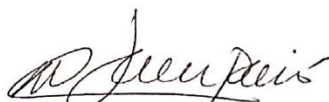
# "ALTERAÇÕES VASCULARES E A PARTICIPAÇÃO DO EIXO ANG-(1-7)/RECEPTOR MAS EM AORTA DE CAMUNDONGOS FÊMEAS OVARIETOMIZADAS"

**ILDERNANDES VIEIRA ALVES**

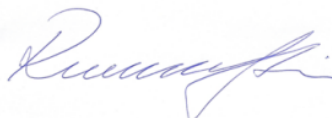
Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 22 de agosto de 2019, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



**PROFA. DR<sup>a</sup>. DANIELLA BONAVENTURA**  
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



**PROFA. DR<sup>a</sup>. WALKYRIA NEYDE DE OLIVEIRA SAMPAIO**  
UNIVERSIDADE DE ITAÚNA/MG



**PROFA. DR<sup>a</sup>. RAFAELA FERNANDES DA SILVA**  
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ORIENTADORA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia  
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

**Belo Horizonte, 22 de agosto de 2019**

**Dedico este trabalho à minha família. Em especial para as mulheres da minha vida: mãe, irmã e avó.**

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Rafaela Fernandes, pelo apoio integral, paciência, incentivo, compreensão, ensinamentos teórico-práticos e presença em todos os momentos da minha formação na pós-graduação. Escolher você como orientadora foi uma das decisões mais assertivas que eu tomei. Tenho uma admiração enorme por você. Muito obrigado.

Ao meu Coorientador Prof. Robson Augusto dos Santos pela colaboração, apoio, orientações e incentivo.

Ao Prof. Luciano Capettini pelos ensinamentos, amizade, acolhimento no Laboratório de Biologia Vascular e pela colaboração para a realização deste trabalho.

À Profa. Maria Aparecida pelos conselhos, cuidado durante esses dois anos de pós-graduação e por abrir as portas do laboratório de Fisiologia Renal Fernando Alzamora para que eu fizesse morada.

À Profa. Adelina Marta Reis, Prof. Cândido Celso Coimbra e Prof. Raphael Escorsim Szawka pelo acolhimento no Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo, apoio e parceria.

À Profa. Virginia Soares Lemos pelos ensinamentos e colaboração.

À Profa. Daniella Bonaventura e a Profa. Walkyria Oliveira Sampaio pelo aceite em participar da banca. Tenho certeza que suas contribuições serão fundamentais para o meu amadurecimento como pesquisador.

À Gleisy Kelly pelo apoio absoluto durante o mestrado. Você é uma das principais responsáveis pelo pesquisador e ser humano que me tornei após este período. Essa vitória também é sua. Obrigado por compartilhar comigo todas as suas experiências, me acalmar, corrigir, cuidar e aconselhar. Você se tornou um dos meus maiores exemplos de vida.

À Simone, técnica do Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo que não mediu esforços para me ajudar e acabou se tornando uma pessoa muito querida.

Aos meus colegas/amigos do Laboratório de Fisiologia Renal: Carol, Bruno, Miriane, Leda, João e Valdirene por compartilharem diariamente as árduas tarefas da pesquisa, pelas risadas, momentos, conhecimentos partilhados e auxílio nos experimentos.

Ao Fernando Pedro, grande amigo. Muito obrigado pelo incentivo, correções, ensinamentos, apoio incondicional e amizade sincera. Você é um dos principais responsáveis pela minha vinda para a UFMG e serei sempre grato por tudo. Tenho você como referência.

Aos colegas/amigos do Laboratório de Biologia Vasculare: Edenil Aguiar, Olga Lúcia, Thaís Lemos, Gianne Campos, Alejandra, Enes Francisco, Wesley, Melissa e Karina. Obrigado por todo apoio, ajuda nos experimentos, conversas, companheirismo, parceria e risadas.

Às minhas amigas Jéssica Rodrigues, Maria de Fátima e Jéssica Fernandes. Mesmo longe, vocês me ajudaram a passar pelos piores e melhores momentos, deram forças e me apoiaram. Sou muito feliz em ter vocês comigo. Muito obrigado.

Aos meus amigos queridos da pós-graduação: Natália Muradas, Emylle Karoline, Natália Ferreira, Elder Koldney, Thatiane Vitoi, Daniela Gusmão, Bruna Nunan, Iara Nogueira, Marina Barcelos, Patrícia Lopes e Irismara Sousa. Vocês tornaram os meus dias mais lindos e felizes, obrigado.

Aos colegas do programa que sempre estiveram de prontidão para me ajudar: Filipe Alex, Juliana Gregório, Itamar Couto, André Luís, Kiany de Oliveira, Sérgio Ricardo, Vanessa Pereira, Katyana Silva, Lucas Alves e Caio Martins.

À coordenação, corpo docente e administrativo do Programa de Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia. Em especial a Cintya Menezes que se tornou uma grande amiga e me ajudou muito durante este período.

À minha família por apoiarem as minhas decisões e estarem comigo em todos os momentos. Cada passo que eu dou é pensando em vocês.

À Deus pela conclusão de mais uma jornada e por me dar forças para matar um leão por dia.

Às agências de fomento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo suporte financeiro.

## RESUMO

Estudos têm demonstrado que os estrógenos exercem importantes efeitos vasculoprotetores tanto em mulheres como em animais de laboratório. Na pesquisa básica, o modelo de ovariectomia em roedores tem sido eficiente para reduzir os níveis estrogênicos e avaliar as possíveis repercussões vasculares. Estudos anteriores mostraram que a ovariectomia pode promover remodelamento vascular, alterar a função vascular e modular certos componentes do sistema renina angiotensina (SRA), dando destaque ao eixo angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] e o seu receptor específico, receptor Mas. No entanto, muito pouco se sabe sobre o efeito da ovariectomia na sinalização vascular do eixo Ang-(1-7)/receptor Mas. Além disso, na literatura atual, existem muitas discrepâncias sobre as repercussões vasculares em modelos experimentais de remoção dos ovários devido à variedade de tempo pós cirurgia e espécie animal, e também à heterogeneidade das respostas em distintos leitos vasculares. Nesse sentido, avaliamos as alterações vasculares e a participação do eixo Ang-(1-7)/receptor Mas na aorta de camundongos fêmeas após duas semanas de ovariectomia. Para isso, foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, pesando em média 20g, e com idade de 10-12 semanas. Os animais foram divididos em grupos Sham (falso operados) e OVX (submetidos a remoção bilateral dos ovários). Após o período de duas semanas, os animais foram sacrificados e, aorta torácica e abdominal foram coletadas para experimentos (CEUA 365/2017). Os nossos resultados demonstraram que duas semanas de ovariectomia reduz drasticamente o peso uterino dos animais, evidenciando a eficácia da cirurgia. No nosso modelo, a ovariectomia não promoveu alterações na dilatação dependente e independente de endotélio, na resposta contrátil para a fenilefrina (Fenil) e nem alterações estruturais na aorta torácica dos animais. No entanto, foi observado que a contração vascular induzida pelo cloreto de potássio (KCl) aumenta após a remoção dos ovários. Ainda, nossos dados mostraram que a Ang-(1-7) diminui a resposta contrátil máxima à Fenil em segmentos da aorta torácica de animais Sham, sendo esse efeito abolido quando a óxido nítrico (NO) sintase foi inibida ou em animais submetidos a ovariectomia. Enquanto a produção basal *in situ* de NO não foi alterada nos grupos, a produção de NO após a estimulação *in situ* com a Ang-(1-7) foi menor nos segmentos aórticos dos animais OVX. A análise proteica do receptor Mas revelou que a expressão vascular do receptor está diminuída após a ovariectomia. Em adição, apesar de não ter sido observado alterações na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), a ovariectomia diminuiu a expressão proteica de enzimas relacionadas ao equilíbrio redox. Em síntese, nosso trabalho mostrou que duas semanas de ovariectomia não promove alterações na resposta vasodilatadora à acetilcolina e remodelamento estrutural na aorta torácica de camundongos fêmeas. No entanto, leva à alterações no eixo Ang-(1-7)/receptor Mas na aorta de camundongos OVX, impedindo a ação do peptídeo em diminuir a resposta contrátil máxima da Fenil devido a diminuição da expressão do receptor Mas e a diminuição da produção de NO em aorta estimuladas *in situ* com a Ang-(1-7). Estas evidências sugerem uma possível modulação estrogênica sobre o eixo Ang-(1-7)/receptor Mas que precede até mesmo uma possível disfunção endotelial.



## ABSTRACT

Previous studies have shown that estrogens exert important vasculoprotective effects on both women and laboratory animals. In basic research, the experimental model of ovariectomy in rodents has been effective in reducing estrogen levels, and to further evaluate vascular alterations. Previous studies have shown that ovariectomy can promote vascular remodeling, alter vascular function and modulate certain components from the renin angiotensin system (RAS), highlighting the axis angiotensin- (1-7) [Ang-(1-7)] and Mas receptor. However, little is known about the effect of ovariectomy on the vascular Ang-(1-7)/Mas receptor axis. In addition, in the actual literature, there are several discrepancies regarding the vascular alterations induced by ovariectomy due to the variety of post-surgery time period, animal species and heterogeneity of vascular responses among distinct vascular beds. Thus, in the present study we evaluated vascular changes and the involvement of the Ang-(1-7)/Mas receptor axis in the aorta of female mice after two weeks of ovariectomy. For this purpose, female C57BL/6 mice were used, weighing on average 20 g and 10-12 weeks aged. The animals were divided into sham (false operated) and OVX (bilateral ovarian removal) groups. After 2 weeks, the animals were sacrificed and, thoracic and abdominal aorta were collected for experiments (CEUA 365/2017). Our results demonstrated that two weeks of ovariectomy drastically reduce the uterine weight of the animals, evidencing the efficacy of the surgery. In our model, ovariectomy did not alter endothelium-dependent and -independent vasodilation, neither contractile responses to phenylephrine (phenyl), nor structural changes in the thoracic aorta of animals. In contrast, it was observed that potassium chloride (KCl)-induced vascular contraction increases after ovarian removal. Moreover, our data showed that Ang-(1-7) decreases the maximum contractile response to phenyl in thoracic aorta segments from Sham animals, and this effect was abolished when nitric oxide (NO) synthase was inhibited or when animals were submitted ovariectomy. We showed that *in situ* basal production of NO was not altered between the groups, however, after Ang-(1-7) stimulation, NO production was lower in the aortic segments of OVX animals when compared to Sham. Protein analysis of the receptor Mas revealed that the vascular expression of the receptor is decreased after ovariectomy. In addition, although we did not observe changes in reactive oxygen species (ROS) production between the groups, ovariectomy decreased protein expression of certain enzymes associated to redox balance. In summary, our work showed that two weeks of ovariectomy does not promote changes in endothelial-dependent vasorelaxation, neither alter structural parameters in the thoracic aorta of female mice. However, removal of ovaries lead to changes in the Ang-(1-7)/Mas receptor axis, inhibiting the action of the peptide in decreasing the maximum contractile response to phenyl, as a consequence to the decreased Mas receptor expression and reduced vascular NO production in response to Ang-(1-7) stimulation in OVX animal. Altogether, our results suggest a possible estrogenic modulation of Ang-(1-7)/Mas receptor that precedes endothelial dysfunction.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mecanismos genômicos e não-genômicos do E2 estimulando a produção de NO vascular.....	19
<b>Figura 2.</b> Alterações citológicas e hormonais durante o ciclo estral em roedores.....	23
<b>Figura 3.</b> Peso corporal e uterino de camundongos fêmeas Sham e OVX.....	38
<b>Figura 4.</b> Avaliação de parâmetros morfométricos da aorta torácica de camundongos fêmeas Sham e OVX.....	39
<b>Figura 5.</b> Resposta vasodilatadora para ACh e NPS em aorta de camundongos fêmeas Sham e OVX.....	41
<b>Figura 6.</b> Resposta vasoconstritora para Fenil e KCl em aorta de camundongos fêmeas Sham e OVX.....	43
<b>Figura 7.</b> Resposta vasoconstritora para Fenil na ausência ou presença do L-NAME em segmentos da aorta torácica.....	45
<b>Figura 8.</b> Resposta vasoconstritora para Fenil na ausência ou presença da Ang-(1-7) em segmentos da aorta torácica.....	47
<b>Figura 9.</b> Resposta vasoconstritora da Fenil na presença da Ang-(1-7) e L-NAME em segmentos da aorta torácica.....	51
<b>Figura 10.</b> Avaliação da produção de NO em cortes transversais de aorta torácica por meio do DAF-2.....	49
<b>Figura 11.</b> Expressão do receptor Mas na aorta de camundongos fêmeas Sham e OVX.....	52
<b>Figura 12.</b> Expressão proteica das subunidades phox do NADPH na aorta de camundongos fêmeas Sham e OVX.....	53
<b>Figura 13.</b> Expressão proteica da catalase, SOD 2 e NRF2 na aorta camundongos fêmeas Sham e OVX.....	54
<b>Figura 14.</b> Avaliação da produção de EROs em cortes transversais da aorta torácica por meio do DHE.....	55

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

17 $\beta$ -HSOR	17 $\beta$ -hidroxiesteróide oxidorreductase
A779	D-Ala <sup>7</sup> -Ang-(1-7)
ACh	Acetilcolina
Akt	Proteína quinase B
Ang II	Angiotensina II
Ang-(1-7)	Angiotensina-(1-7)
Ang-(1-9)	Angiotensina-(1-9)
ANOVA	Análise de variância
apoE	Apolipoproteína E
AT1	Receptor da angiotensina II tipo 1
AT2	Receptor da angiotensina II tipo 2
Ca <sup>2+</sup>	Cálcio
cAMP	Monofosfato de adenosina cíclico
CEBIO	Centro de bioterismo
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
cGMP	Guanosina monofosfato cíclico
DCVs	Doenças cardiovasculares
DHE	Dihidroetídio
E2	17 $\beta$ -estradiol
ECA	Enzima conversora da angiotensina
EDCF	Fatores de contração derivados do endotélio
EDCF	Fatores de contração dependente do endotélio
EDHF	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
E <sub>max</sub>	Efeito máximo
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPM	Erro Padrão da Média
ERE	Elemento responsivo ao estrógeno
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERs	Receptores de estrógenos
ER- $\alpha$	Receptor de estrógeno tipo alfa

ER- $\beta$	Receptor de estrógeno tipo beta
Fenil	Felinefrina
G1	Agonista seletivo do GPER1
GC	Guanilato ciclase
GPER1	<i>G-protein coupled estrogen receptor 1</i>
GTP	Guanosina trifosfato
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HE	Hematoxilina e eosina
HERS	<i>Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study</i>
HSD	3 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
InsP3R	Receptor do trifosfato de inositol
IP3	Trifosfato de inositol
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>
MLCK	Cinase da cadeia leve da miosina
NEP	Endopeptidase neutra
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NPS	Nitroprussiato de sódio
OVX	Animais ovariectomizados
P450c17	<i>Steroid 17 alpha-hydroxylase/17,20 lyase</i>
P450scc	<i>Cholesterol side-chain cleavage enzyme</i>
PEP	Prolil-endopeptidase
PGI2	Prostaciclina
PI3K	Fosfoinosítido 3-quinase
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol 3-fosfato
RPT	Resistência Periférica Total
SD	Sprague Dawley
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos

SRA	Sistema renina angiotensina
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VCD	4-diepóxido de vinilciclohexano
VSMCs	<i>Vascular smooth muscle cells</i>
WHY	<i>Women's Health Initiative Study Group</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>1.1</b>	<b>O E2 e suas ações vasculares.....</b>	<b>16</b>
<b>1.2</b>	<b>Ovariectomia e repercussões vasculares.....</b>	<b>21</b>
<b>1.3</b>	<b>Participação do E2 nas respostas vasculares mediadas pelo Sistema Renina Angiotensina.....</b>	<b>25</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>29</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>30</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>30</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>30</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
<b>4.1</b>	<b>Animais.....</b>	<b>31</b>
<b>4.2</b>	<b>Ovariectomia bilateral e protocolo experimental.....</b>	<b>31</b>
<b>4.3</b>	<b>Determinação do ciclo estral.....</b>	<b>32</b>
<b>4.4</b>	<b>Mensuração do peso corporal e uterino.....</b>	<b>32</b>
<b>4.5</b>	<b>Estudo por reatividade vascular em anéis de aorta torácica.....</b>	<b>32</b>
<b>4.5.1</b>	<b>Montagem de preparações isoladas.....</b>	<b>32</b>
<b>4.5.2</b>	<b>Protocolos executados para análise da reatividade vascular em aorta de camundongos fêmeas sham e OVX.....</b>	<b>33</b>
<b>4.6</b>	<b>Quantificação de EROs e NO <i>in situ</i> por microscopia de fluorescência.....</b>	<b>34</b>
<b>4.7</b>	<b>Avaliação morfométrica vascular por Hematoxilina e Eosina.....</b>	<b>35</b>
<b>4.8</b>	<b>Extração de proteínas, dosagem e análise por Western Blot.....</b>	<b>35</b>
<b>4.9</b>	<b>Ensaio de Imunofluorescência.....</b>	<b>36</b>
<b>4.10</b>	<b>Análise estatística e expressão dos resultados.....</b>	<b>37</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>38</b>
<b>5.1</b>	<b>Avaliação do peso corporal e uterino de camundongos fêmeas intactas e ovariectomizadas.....</b>	<b>38</b>
<b>5.2</b>	<b>Parâmetros morfométricos de cortes transversais da aorta torácica.....</b>	<b>39</b>
<b>5.3</b>	<b>Resposta vasodilatadora para acetilcolina e nitroprussiato de sódio em segmentos da aorta torácica.....</b>	<b>40</b>

5.4	Resposta vasoconstritora para fenilefrina e cloreto de potássio em segmentos da aorta torácica.....	42
5.5	Resposta vasoconstritora para fenilefrina na ausência ou presença do L-NAME em segmentos da aorta torácica.....	44
5.6	Resposta vasoconstritora da fenilefrina na ausência ou presença da Ang-(1-7) em segmentos da aorta torácica.....	46
5.7	Resposta vasoconstritora da fenilefrina na presença da Ang-(1-7) e L-NAME em segmentos da aorta torácica.....	48
5.8	Produção de NO em cortes transversais da aorta torácica.....	50
5.9	Expressão proteica do receptor Mas na aorta abdominal.....	52
5.10	Expressão proteica de enzimas relacionadas ao balanço redox na aorta abdominal.....	53
5.11	Produção de EROs em cortes transversais da aorta torácica.....	55
6	DISCUSSÃO.....	56
7	CONCLUSÃO.....	62
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 O E2 e suas ações vasculares

Evidências indicam diferença de gênero na incidência de doenças cardiovasculares (DCVs), das quais mulheres em idade fértil, apresentam menores chances de desenvolvê-las comparado aos homens de mesma idade (MAAS & APPELMAN, 2010). Parte desse efeito protetor tem sido atribuído às ações dos hormônios sexuais, em particular aos estrógenos (TOSTES et al., 2003).

Os estrógenos são hormônios esteróides, produzidos principalmente pelas células da teca e granulosa dos ovários, podendo ser produzidos também pelas adrenais e placenta. Nos humanos, o estrógeno mais potente é o estradiol/17 $\beta$ -estradiol (E2), seguido do estriol e estrona (STILLWELL, 2016).

A biossíntese do E2 ocorre através de uma sequência de reações enzimáticas, iniciadas com a ação da P450<sub>scc</sub> (20,22-desmolase) sobre a molécula de colesterol, clivando-a em pregnenolona. Em seguida, a progesterona é formada pela ação da 3 $\beta$ -HSD (3 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase) na pregnenolona e posteriormente em androstenediona pela P450<sub>c17</sub> (17-hidroxilase e 17,20-desmolase). A androstenediona é então reduzida a testosterona pela 17 $\beta$ -HSOR (17 $\beta$ -hidroxiesteróide oxidoreductase), sendo então aromatizada pela ação da aromatase dando origem ao E2 (VRTACNIK et al., 2014; MORSELLI et al., 2017).

A via de sinalização do E2 ganhou maior complexidade nos últimos anos. Até os anos 90, era conhecido apenas o receptor de estrógeno (ER) tipo alfa (ER- $\alpha$ ) (TOFT & GORSKI, 1966), portanto, considerado como o único mediador das ações estrogênicas. Contudo, em 1996 um segundo receptor de estrógeno foi identificado, primariamente na próstata e ovários de ratos, e posteriormente nomeado de receptor de estrógeno tipo beta (ER- $\beta$ ) (KUIPER et al., 1996; MOSSELMAN, POLMAN, & DIJKEMA, 1996). No ano seguinte, um receptor órfão acoplado a proteína G foi identificado em amostras de pulmão, coração e tecido linfóide (KVIINGEDAL & SMELAND, 1997), sendo conhecido atualmente por *G-protein coupled estrogen receptor 1* (GPER1) (BARTON et al., 2018).



Os ERs podem estar localizados no núcleo, citoplasma e na membrana plasmática (PARIKH et al., 1987; RUSSELL et al., 2000; LEVIN & HAMMES, 2016). A expressão deles assim como os efeitos biológicos desencadeados pela sua ativação, variam de acordo com o tecido, podendo serem inclusive antagônicas. No sistema vascular, já foi relatado a expressão dos três tipos de ERs, tanto nas células endoteliais (KIM-SCHULZE et al., 1996; VENKOV, RANKIN, & VAUGHAN, 1996; ISENSEE, et al. 2009), como em células musculares lisas vasculares (VSMCs - *Vascular smooth muscle cells*) (KARAS et al., 1994; ISENSEE, et al., 2009).

Dentre as ações estrogênicas a nível vascular, destaca-se a estimulação da produção de substâncias vasoativas pelo endotélio e auxílio no controle do tônus vascular (TOSTES et al., 2003). Tal efeito é importante, pelo fato das células endoteliais atuarem no controle da homeostase vascular, por meio da produção equilibrada de substâncias vasoconstritoras, como endotelina I, tromboxano A<sub>2</sub>, Angiotensina II (Ang II) e EROs, e de substâncias vasodilatadores, como óxido nítrico (NO) (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980), prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), contribuindo para o controle do tônus vascular, juntamente com as VSMCs (FURCHGOTT & VANHOUTTE, 1991; CARVALHO et al., 2010).

Dentre os agentes vasoativos citados, o NO se destaca pelo seu papel chave no controle vascular em vasos de condutância, tanto pelo seu potente efeito vasodilatador, como pelo envolvimento com o barorreflexo (SENER & SMITH, 2001) e ações anti-inflamatória (BEGHETTI et al., 2003), antioxidante e angiogênico (IGNARRO, 1989; BREDT & SNYDER, 1994). A síntese de NO é medida pelas enzimas NO sintases (NOS), podendo existir em três isoformas: duas sendo constitutivas, denominadas de NOS endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS), e uma induzida por mediadores inflamatórios/imunológicos, a NOS induzida (iNOS). A ativação dessas enzimas leva a catalisação do aminoácido L-arginina gerando a formação de NO e L-citrulina (RADOMSKI, PALMER & MONCADA, 1990).

Ao se difundir para as VSMCs, o NO ativa a guanilato ciclase (GC), que atua transformando a guanosina trifosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclico (cGMP), levando a diminuição da concentração intracelular de Cálcio (Ca<sup>2+</sup>) (ARNOLD et al. 1977). Os íons Ca<sup>2+</sup> são fundamentais para o processo de contração vascular, a molécula forma o complexo cálcio-calmodulina que ativa a cinase da cadeia leve da

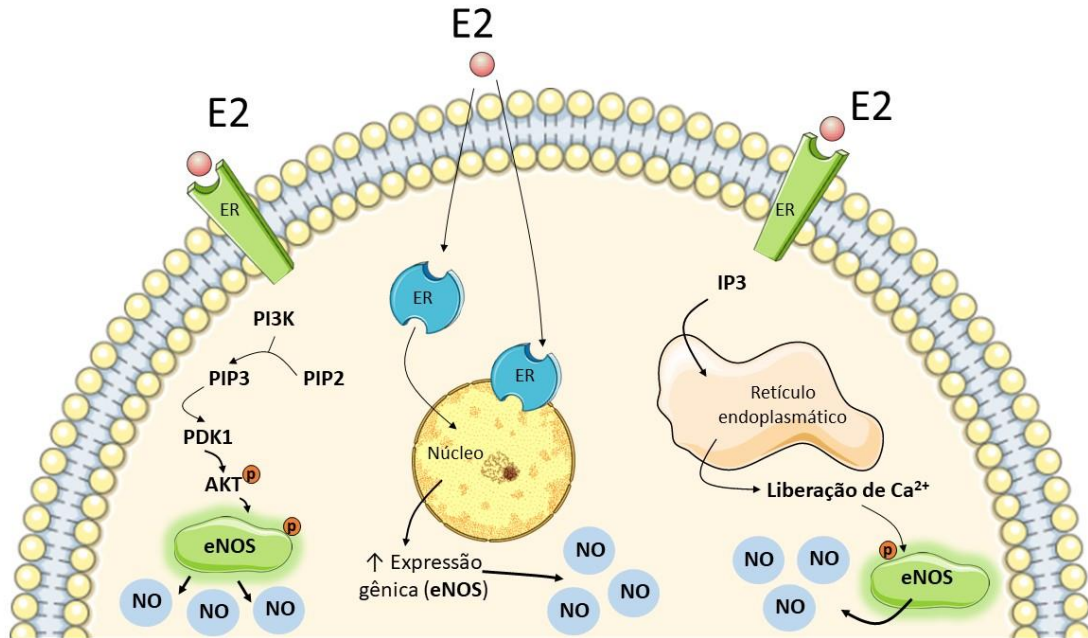
miosina (MLCK), responsável pela formação de pontes cruzadas entre as cabeças da miosina e filamentos de actina e promoção da contração das VSMCs. Como esse processo é altamente sensível aos íons  $\text{Ca}^{2+}$ , com a diminuição do estoque de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, ocorre o relaxamento vascular (WEBB, 2003; MIZUNO et al., 2008).

Alguns estímulos físicos como o *shear stress* (KUCHAN & FRANGOS, 1994) e químicos como a acetilcolina (ACh) (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980; FURCHGOTT & VANHOUTTE, 1991), bradicinina e o E2 (GONZALES, WALKER & KANAGY, 2001; NEVZATI et al., 2014), atuam aumentando a liberação de NO pelas células endoteliais. Com o avanço da compreensão sobre as vias de sinalização do E2, múltiplos caminhos vêm sendo propostos para esse aumento. De forma didática, o E2 contribui para o aumento da síntese/liberação de NO por duas vias, que são divididas em genômica e não-genômica, podendo operar de forma conjunta ou independentes.

Na via genômica, a ativação dos ERs citoplasmáticos/nucleares leva a alterações na conformação da estrutura do receptor, promovendo sua translocação para o núcleo, onde irão se ligar ao elemento responsivo ao estrógeno (ERE), levando ao aumento transcricional da expressão gênica da eNOS, proporcionando elevação dos níveis de NO, o que podem durar horas/dias para acontecer (MACRITCHIE et al., 1997; MENAZZA & MURPHY, 2016) (**figura 1**).

A via não-genômica, está relacionada aos efeitos rápidos e de curto prazo mediado pelo E2, como a vasodilatação. Nesse caso o aumento da produção de NO, pode ocorrer pela ligação do E2 aos seus receptores citoplasmáticos/membrana, aumentando a formação do trifosfato de inositol (IP3), um segundo mensageiro que ao se ligar ao receptor trifosfato de inositol (InsP3R), localizado no retículo endoplasmático, estimula a liberação adicional de  $\text{Ca}^{2+}$ , ativando a eNOS (MIGNERY & SUDHOF, 1990). Ainda, a ligação do E2 aos seus receptores, pode levar a ativação da fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K), que por meio da sua ação catalítica transforma o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) em fosfatidilinositol 3-fosfato (PIP3), que atua como segundo mensageiro ativando a PDK1 (quinase-1 dependente de fosfoinositídeo) que irá fosforilar e ativar a proteína quinase B (Akt), que dentre as suas funções, fosforila a eNOS na porção Ser1177, que corresponde ao sítio de

ativação (FULTON et al., 1999; SIMONCINI et al. 2000; SIMONCINI, RABKIN & LIAO, 2002; NEVZATI et al., 2014) (figura 1).



**Figura 1.** Mecanismos genômicos e não-genômicos do E2 estimulando a produção de NO vascular. O E2 ao se ligar ao seu receptor pode promover aumento da produção de NO por uma via genômica, atuando diretamente no núcleo da célula e aumentando a expressão gênica da eNOS. Ainda, por uma via não-genômica, pela ativação da fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K), levando à produção de fosfatidilinositol 3-fosfato (PIP3), que por sua vez ativa a quinase-1 dependente de fosfoinositídeo (PDK1) que irá ativar a proteína quinase B (Akt). A Akt leva a ativação rápida da eNOS, realizada através da fosforilação na serina 1177. Também, através do aumento da produção de inositol trisfosfato (IP3), por meio da ativação da fosfolipase C. O IP3 ao se ligar ao seu receptor no retículo endoplasmático estimula a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  no citoplasma e ativação da eNOS.

Além do NO, o E2 podem auxiliar no controle do tônus vascular, por meio do aumento da síntese de  $\text{PGI}_2$  (SHERMAN et al., 2002; SOBRINO et al., 2010), fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (LIU et al., 2001) e na diminuição da produção/liberação de endotelina-1 (AKISHITA et al., 1998) e Ang-II, cuja ações vasoconstritoras e pro-inflamatórias já são bem descritas (KAHONEN et al., 1998; BILSEL et al., 2000).

Diferenças na produção de NO entre machos e fêmeas já foram descritas, em artérias torácica de coelhos (HAYASHI et al., 1992) e de ratos (KAUSER & RUBANYI, 1994), na qual a produção/liberação basal de NO é superior em fêmeas. Em mulheres na menopausa, foi identificado uma deterioração da função endotelial vascular quando

comparadas com mulheres de mesma idade, porém com ciclo menstrual normal. Por meio da infusão intrabraquial de ACh, verificou-se que em mulheres na menopausa há diminuição na resposta vasodilatadora, a qual não foi observada ao nitroprussiato de sódio (NPS), doador de NO que atua diretamente nas VSMCs, sugerindo que a redução dos níveis hormonais de estrógeno afeta principalmente a função vascular dependente de endotélio (TADDEI et al., 1996).

Em outro estudo realizado com ratos espontaneamente hipertensos (SHR), observou-se que a ativação seletiva do ER- $\alpha$ , por meio do agonista CPD 1471 ou a ativação não seletiva do ER- $\alpha$  e ER- $\beta$ , utilizando o E2, foi eficaz para promover melhora do relaxamento dependente endotélio em aorta torácica e normalizar a expressão proteica da eNOS após a ovariectomia, que estava previamente diminuída (WIDDER et al., 2003).

A atenuação da resposta vasoconstritora para a fenilefrina (Fenil) foi observada em anéis aórticos de camundongos com o endotélio removido e tratados com E2 por 18 a 20 horas, sendo esse efeito abolido quando tratados concomitantemente com o antagonista não seletivo para receptores de estrógeno, ICI 182,780 (ZHU et al., 2002). A deleção do GPER1 em camundongos já foi relacionada com aumento da incidência de aterosclerose, aumento da concentração sérica do colesterol total, lipoproteína de baixa densidade (LDL), inflamação vascular e diminuição da biodisponibilidade do NO basal em animais ateroscleróticos. No mesmo estudo, foi verificado que em células endoteliais humanas, a ativação seletiva do GPER1, através do agonista G1, leva ao aumento da produção de NO (MEYER et al., 2014).

O E2 pode, de forma indireta, conferir proteção vascular por meio da modulação do metabolismo das lipoproteínas plasmáticas. Pesquisas clínicas demonstraram que mulheres após a menopausa, apresentam níveis plasmáticos da lipoproteína de alta densidade (HDL) diminuídos e de LDL elevado, quando comparado as mulheres antes da menopausa (KILIM & CHANDALA, 2013; PARDHE et al., 2017). Nesta linha, o tratamento com E2 em mulheres na menopausa, conferiu diminuição do colesterol total e aumento de HDL. Interessantemente, esse perfil contribui para o menor risco de desenvolvimento de placas de ateroma (WAKATSUKI, IKENOUE e SAGARA, 1997; MILLER & DUCKLES, 2008).

O estresse oxidativo é descrito como um dos principais desencadeadores da disfunção endotelial vascular. O desequilíbrio entre o balanço redox e a produção exacerbada de EROs, em especial o ânion superóxido, leva a diminuição da biodisponibilidade de NO (GRYGLEWSKI, PALMER & MONCADA, 1986). Nessa discussão, o estrógeno é descrito pela sua ação antioxidante, pois reduz a produção de EROs (HERNANDEZ et al., 2000; KANG et al., 2015).

O E2 exerce efeitos proliferativos distintos nas células endoteliais e VSMCs. No endotélio, o E2 estimula a proliferação e migração celular, por meio do recrutamento de células endoteliais progenitoras da medula óssea, o que favorece a recuperação endotelial após a lesão vascular (KRASINSKI et al., 1997; IWAKURA et al., 2003). Em contraste, nas VSMCs, o E2 diminui a proliferação e migração celular (DUBEY et al., 1999). A proliferação desordenada das VSMCs contribui para o desenvolvimento da aterosclerose e tal efeito estrogênico corrobora para um ambiente com menor perfil aterogênico, além de sua ação bem descrita em diminuir a agregação plaquetária (MENDELSON & KARAS, 1999; HERNANDEZ et al., 2000; KUMAR et al., 2010).

Por todos esses efeitos vasculares, a terapia de reposição estrogênica é foco de discussão no sentido de prevenir as alterações patológicas decorrentes da falência ovariana. Contudo, os estudos clínicos continuam controversos, tanto pelo fato de alguns trabalhos demonstrarem que o tratamento com E2 não confere proteções adicionais, como pelo aumento da mortalidade em decorrência de incidentes cardiovasculares (ROSSOUW et al., 2002; ROSSOUW et al., 2007), o que reforça a necessidade de estudos adicionais.

## **1.2 Ovariectomia e repercussões vasculares**

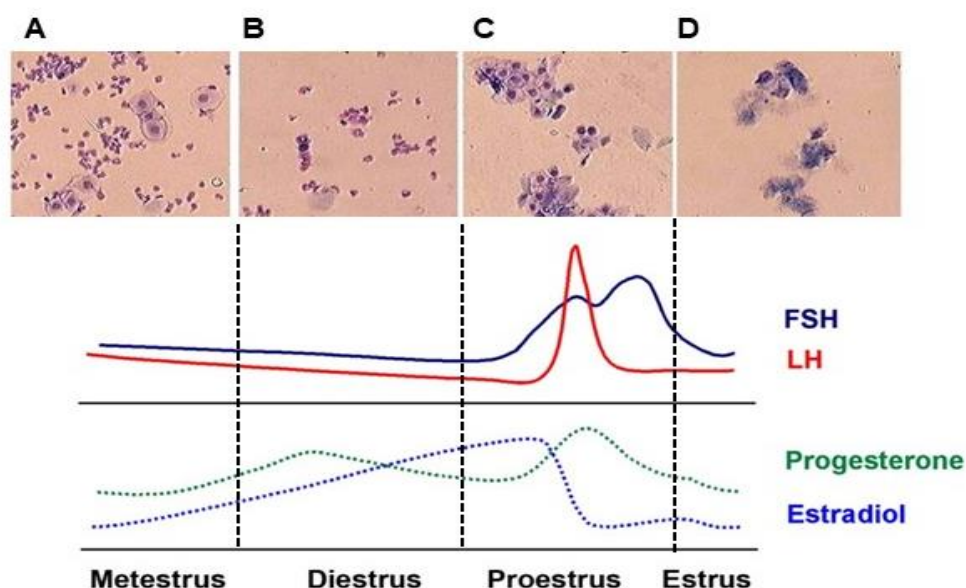
A menopausa compreende o período da vida da mulher onde ocorre cessão dos ciclos menstruais por pelo menos um ano e queda dos hormônios ovarianos, em decorrência da depleção de folículos ovarianos (UTIAN, 1999). Esse período varia de mulher para mulher, contudo geralmente ocorre aos 50 anos e é acompanhado de alterações fisiológicas, metabólicas, imunológicas (GAMEIRO & ROMAO, 2010), psicológicas (FREEMAN et al., 2008) e aumento da incidência de osteoporose (FAISAL-CURY & ZACCHELL, 2001; DALAL & AGARWAL, 2015) e DCVs (KANNEL

et al., 1977; PARDHE et al., 2017). A perda desse fator protetor é atribuída principalmente ao E2, por seus efeitos vasculares, como discutido anteriormente.

No final dos anos 90, dois importantes estudos clínicos avaliaram as repercussões da menopausa e ação estrogênica para a saúde da mulher, o *The Women's Health Initiative Study Group* (WHI, 1998) e o *Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study* (HERS) (SPEROFF, 1998). Contudo, mostraram disparidades e resultados poucos precisos, principalmente devido à dificuldade em manter a homogeneidade dos indivíduos e controle de variáveis, como tempo de menopausa, fatores de risco, uso de medicamentos, hábitos de vida e condições socioculturais.

Nessa discussão, as pesquisas básicas entram como instrumento importante para auxiliar na compreensão dos aspectos fisiológicos envolvendo a falência dos ovários. Dentre os animais de laboratórios disponíveis, os primatas não humanos seriam talvez os animais mais adequados para serem usados, pela semelhança da saúde sexual e reprodutiva de humanos, porém devido ao elevado custo financeiro e manejo delicado, acabam sendo pouco viáveis (BELLINO & WISE, 2003).

Atualmente os animais mais utilizados na área, são os roedores, principalmente os ratos e camundongos, pelo fácil manuseio, custos menores comparado aos primatas não-humanos e ciclo de vida relativamente curto o que favorece a rapidez dos estudos. Assim como as mulheres, com a chegada da falência ovariana estes animais apresentam ciclos ovariano irregulares, oscilações hormonais e diminuição da produção de folículos ovarianos com o envelhecimento (GOSDEN et al., 1983). Enquanto em mulheres, o ciclo menstrual tem duração de aproximadamente 28 dias (OWEN, 1975), em ratos/camundongos o ciclo estral, dura cerca de 4-5 dias e compreende quatro fases, conhecidas como metaestro, diestro proestro e estro. Cada fase é acompanhada de alterações nos níveis séricos de hormônios e no epitélio vaginal (**figura 2**) (MARCONDES, BIANCHI & TANNO, 2002; GOLDMAN, MURR & COOPER, 2007; MILLER & TAKAHASHI, 2014).



**Figura 2.** Alterações citológicas e hormonais durante o ciclo estral em roedores. **(A)** No metaestro, há baixos níveis de estradiol e progesterona sérico e ao esfregaço vaginal é possível observar a presença de três tipos celulares: leucócitos, células epiteliais e cornificadas. **(B)** No diestro os níveis de estradiol e progesterona começam a aumentar e na citologia vaginal há predominância de leucócitos. **(C)** No proestro os roedores apresentam altas concentrações de estradiol e progesterona sérico, o que promove a elevação da atividade proliferativa do epitélio vaginal e aparecimento de células arredondadas e polinucleadas. Este estágio é correspondente ao dia pré-ovulatório, pois corrobora com o aparecimento das ondas de LH e FSH durante a noite, que favorecem a ovulação. A última fase é o **(D)** Estro, que é caracterizada pela diminuição dos níveis de estradiol e elevação dos níveis de progesterona o que leva a ovulação e formação do corpo lúteo. Na citologia vaginal é possível visualizar células epiteliais escamosas cornificadas e corresponde a fase de receptividade sexual. (adaptado de MILLER & TAKAHASHI, 2014).

Em roedores, a senescência natural seria aparentemente o modelo fisiológico mais apropriado para estudar as consequências do declínio da função ovariana. Contudo, evidências mostram que aproximadamente 70% dos roedores envelhecidos podem apresentar um estado anovulatório polifolicular com estro constante e níveis elevados de E2, o que não seria um bom modelo para estudar as alterações decorrentes da falência ovariana. Além disso, como é preciso manter os animais pelo menos até 8 meses de idade para que iniciem a apresentar alterações nos ciclos, alguns modelos experimentais foram desenvolvidos para mimetizar a falência ovariana. Por exemplo, o 4-diepóxido de vinilciclohexano (VCD), descrito como ovotoxinas, tem sido utilizado com ferramenta química, devido a sua capacidade de destruir seletivamente folículos ovarianos de ratos e camundongos sem atingir outros tecidos. Esse modelo acelera a atrofia dos folículos ovarianos por meio do processo

de apoptose, e portanto, reproduz em parte o que acontece nas mulheres em menopausa (MAYER et al., 2002). Contudo, atualmente, o modelo mais utilizado para estudar a menopausa em roedores é a ovariectomia, descrita em meados dos anos oitenta, que consiste na remoção bilateral ou unilateral dos ovários (OLSON & BRUCE, 1986). Apesar da remoção brusca dos ovários não representar o processo transitório natural para a menopausa, é bastante vantajosa pelo fato de ser de fácil realização, custo baixo, rápida recuperação e pelo fato de animais jovens serem mais responsivos em reduzir níveis séricos de E2 que idosos.

Em ratas Sprague Dawley (SD) na fase proestro, as concentrações séricas de E2 giram em torno de 80 pg/ml e após duas semanas de ovariectomia esse valor é reduzido para 25 pg/ml (PELVIPHARM, 2001) e em três semanas é reduzido para valores menores de 20 pg/ml (WISE & RATNER, 1980). Em mulheres em idade fértil, as concentrações fisiológicas de E2 giram em torno de 200-500 pg/mL durante o pico pré-ovulatório, sendo reduzidas para valores menores que 20 pg/mL após a menopausa, o que se assemelha aos níveis estrogênicos antes da puberdade (CARMINA & LOBO, 2009).

As alterações fisiológicas em decorrência da ovariectomia são conflitantes e dependem da linhagem animal e do tempo. Como no caso do peso corporal, enquanto em ratas Wistar a elevação do peso corporal acontece com duas semanas pós-operatória (AINSLIE et al., 2001), em ratas SD não há alteração do peso corporal (SQUADRITO et al., 2000) e em camundongos da linhagem C57BL/6J, é observada apenas com três semanas após a cirurgia (BLAUSTEIN et al., 1976) ou não é alterado (COLA et al., 2010). O peso uterino é expressivamente reduzido em duas e três semanas de cirurgia em ratas SD (SQUADRITO et al., 2000; SAVERGNINI et al., 2012) e em uma semana em camundongos *Swiss* (LEMINI et al., 2015), o que é um forte preditor da redução dos níveis séricos de E2.

Alterações vasculares em decorrência da remoção dos ovários são descritas na literatura, porém apresentam algumas discrepâncias. Em aortas torácicas de ratas SD, oito dias após a cirurgia de ovariectomia a resposta vasoconstritora pra noradrenalina é elevada (ZAMORANO, BRUZZONE & MARTINEZ, 1995) e com três semanas há redução resposta vasodilatadora para ACh (SQUADRITO et al., 2000). Em contraste, cinco meses de ovariectomia em SD, não altera a resposta vasodilatadora para ACh na aorta torácica (SEGREDO et al., 2013).



Nas artérias mesentéricas de ratas SD, com seis semanas da ovariectomia, há redução da resposta vasodilatadora à ACh, diminuição da produção de NO, potencialização da resposta constritora mediada pelos fatores de contração dependente do endotélio (EDCF) e aumento da produção de EROs (WANG et al., 2014).

Além das alterações funcionais nas artérias mesentéricas de SD em decorrência de doze semanas de ovariectomia, há remodelamento vascular, demonstrado pela mudança nos componentes da matriz extracelular, evidenciado pela diminuição da expressão de metaloproteinases tipo II e aumento da deposição de colágeno (SHEN et al., 2017). O remodelamento vascular em decorrência da ovariectomia, também foi observado em artérias coronárias de ratas SHR, após seis semanas de ovariectomia, com aumento da área do lúmen arterial, área vascular total, área da parede do vaso. Ainda, essas alterações foram acompanhadas do aumento da produção de ânion superóxido e elevação da pressão arterial sistólica (BORGIO et al., 2016).

Apesar da maioria dos trabalhos que avaliam as alterações vasculares em decorrência da ovariectomia serem realizadas em ratas, em artérias mesentéricas de camundongos fêmeas C57BL/6J, após trinta dias de ovariectomia, foi observado comprometimento da resposta vasodilatadora para a ACh, para níveis semelhantes de animais com polimorfismos no gene da apolipoproteína E (apoE) (COLA et al., 2010).

### **1.3 Participação do E2 nas respostas vasculares mediadas pelo Sistema Renina Angiotensina**

O sistema renina-angiotensina (SRA) é um dos mais importantes sistemas endócrinos para a manutenção das condições homeostáticas do sistema cardiovascular, exercendo efeito local e sistêmico, controlando os níveis pressóricos, balanço hidroeletrólítico e contribuindo para a homeostase corporal (GRIENGLING, MURPHY E ALEXANDER, 1993). Os peptídeos pertencentes ao sistema derivam de uma cascata enzimática que tem como substrato precursor o angiotensinogênio (DESCHEPPER, 1994).

O eixo clássico do SRA tem como principal peptídeo efetor da Ang II. O angiotensinogênio secretado pelo fígado, é clivado pela ação da renina, enzima produzida principalmente pelas células justaglomerulares dos rins, dando origem ao decapeptídeo Angiotensina I (Ang I) (PERSSON, 2003). A Ang I sofre então, ação da ECA que faz a remoção de dois aminoácidos (histidina e leucina) da cadeia da Ang I e origina o octapeptídeo Ang II (GRIENDLING, MURPHY E ALEXANDER, 1993).

A Ang II age através de dois principais tipos de receptores transmembranares: AT1 e AT2, ambos acoplados a família das proteínas G. Os efeitos mediados pelos receptores da Ang II são distintos. Dentre suas ações, é conhecido que a hiperatividade do eixo AngII/AT1 induz fibrose, hipertrofia cardíaca, vasoconstrição, disfunção endotelial, aterosclerose, arritmias cardíacas e morte celular. Dessa forma, estando associada com o desenvolvimento de algumas patologias, como a hipertensão arterial e insuficiência cardíaca (PAUL, MEHR e KREUTZ, 2006).

Ainda, o sistema dispõe de um eixo contra regulatório tendo como principal peptídeo efetor a Ang-(1-7), que foi caracterizada em 1988 como um peptídeo biologicamente ativo pertencente ao SRA (BLOCK et al., 1988; FERRARIO et al., 1997; FERRARIO et al., 1998; FERRARIO e CHAPPELL, 2004; SANTOS et al., 2013). Em 2003, foi descoberto que a Ang-(1-7) age através do receptor Mas, o qual também está acoplado a proteína G (SANTOS et al., 2003).

A produção do heptapeptídeo Ang-(1-7), pode ser diretamente por meio da clivagem da Ang II pela ação da ECA 2, que retira o N-terminal fenilalanina ou da clivagem da Ang I pela ação da endopeptidase neutra (NEP) ou prolil-endopeptidase (PEP) (VICKERS et al., 2002). Ainda, indiretamente pela ação da ECA 2 na Ang I, removendo o aminoácido leucina da cadeia da Ang I, dando origem ao peptídeo Angiotensina-(1-9) [Ang-(1-9)] (DONOGHUE, 2000), que pela ação da NEP ou ECA, origina a Ang-(1-7) (RICE et al., 2004).

O eixo não clássico ECA2/Ang-(1-7)/receptor Mas é descrito por contrapor alguns dos efeitos do eixo clássico, promovendo vasodilatação, angiogênese, efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e antiapoptóticos e dessa forma, exercer efeitos cardiovasculares protetores. Ainda, a deleção do receptor Mas em camundongos foi acompanhada de disfunção endotelial, diminuição do barorreflexo, aumento da pressão arterial, prejuízos na função cardíaca (SANTOS et al., 2013)

Dentre as ações da Ang-(1-7), destaca-se o efeito de aumentar a liberação de agentes vasoativos como prostanóides, EDHF e/ou NO (BROSNIHAN, LI & FERRARIO, 1996), promovendo vasodilatação que já foi demonstrado em diversos leitos vasculares, como arteríolas aferentes de coelho (REN, GARVIN & CARRETERO, 2002), artérias coronárias de cães (BROSNIHAN, LI & FERRARIO, 1996), aortas de camundongos (LEMOS et al., 2005) e ratos (LEMOS et al., 2002), artérias mesentéricas de ratos (PEIRÓ et al., 2013) e de artérias humanos (SASAKI et al. 2001).

Ao se ligar ao receptor Mas nas células endoteliais, a Ang-(1-7) pode promover vasodilatação por meio da ativação da via PI3K/AKT, aumentando a fosforilação da eNOS e liberação de NO (SAMPAIO et al., 2007). Ainda, pode levar ao aumento da produção da PGI<sub>2</sub> e da concentração intracelular do cAMP e potencialização da ação da bradicinina (BROSNIHAN et al., 1999; HEITSCH et al., 2001; MCKINNEY et al., 2014).

Mais recentemente, a Ang-(1-7) foi apontada como agonista tendencioso do receptor AT1, pelo qual, recruta uma via alternativa medida pela  $\beta$ -arrestina, promovendo diminuição da contração induzida por Fenil (GALANDRIN et al., 2016). A produção e ação da Ang-(1-7) ocorre também localmente na parede dos vasos sanguíneos, mostrando que além de influências da ativação sistêmica do sistema, há um fator local que contribui para as respostas efectoras (SANTOS et al., 1992; PAUL, MEHR & KREUTZ, 2006)

Inúmeras evidências mostram a ativação diferenciada dos componentes do SRA em função do sexo e hormônios sexuais. A ativação da ECA por exemplo, está mais elevada em homens quando comparados às mulheres da mesma idade (ZAPATER et al., 2004) e semelhante quando as mulheres chegam à menopausa (DANSER et al., 1998). Em adição, níveis circulantes de angiotensinogênio (FELDMER et al., 1991), e Ang-(1-7) (SULLIVAN et al., 2015) são maiores em mulheres.

Em pesquisas básicas, estudos mostram a modulação estrogênica sobre a ação do eixo Ang-(1-7)/receptor Mas. Em artérias mesentéricas de ratas SD, foi demonstrado que a resposta vasodilatadora da Ang-(1-7) sofre influência do ciclo estral, ao passo que o efeito dilatador observado na fase proestro é abolido quando os animais estão na fase diestro ou após três semanas de ovariectomia. De forma

interessante, quando os animais submetidos a remoção dos ovários (OVX) foram tratados com E2, houve restauração da resposta vasodilatadora da Ang-(1-7) e potencialização em comparação aos animais na fase proestro. A participação do receptor Mas foi comprovada por meio da incubação dos vasos com antagonista seletivo D-Ala<sup>7</sup>-Ang-(1-7) (A-779), sendo a resposta vasodilatadora bloqueada (NEVES et al., 2004).

Em estudo recente do nosso grupo também foi observado a perda da responsividade vascular à Ang-(1-7) em aorta torácica de camundongos fêmeas idosas C57Bl/6 e de fêmeas jovens após duas semanas de ovariectomia. De forma importante, o tratamento com E2 restabeleceu o perfil vasodilatador da Ang-(1-7) tanto nas fêmeas OVX, como nas idosas (COSTA-FRAGA et al., 2018).

Em outro estudo, oito meses após a ovariectomia não houve a perda da resposta vasodilatadora para Ang-(1-7) em aorta torácica de fêmeas SHR. Apenas foi observado uma redução da resposta vasodilatadora, o que foi acompanhado da elevação da resposta vasoconstritora para Ang II, aumento da concentração plasmática de Ang II e Ang-(1-7) e diminuição da produção local de Ang-(1-7) nas células endoteliais vasculares (ENDLICH et al., 2017).

Os resultados acima evidenciam que alterações na concentração de E2 tanto em ratas como em camundongos fêmeas, seja pelo envelhecimento natural ou pelo método cirúrgico da ovariectomia, afetam à resposta vascular à Ang-(1-7). Contudo, em decorrência das variações em tempo de ovariectomia, leitos vasculares e espécies, estudos adicionais tornam-se necessários para melhor entendimento das alterações vasculares, incluindo o eixo Ang-(1-7)/receptor Mas, desencadeada pela falência ovariana.

## 2 JUSTIFICATIVA

As DCVs são as principais causa de morte no mundo, representando hoje um importante problema de saúde pública (WHO, 2013; WHO, 2016; NASCIMENTO et al., 2018). A maioria dos estudos na área envolvem indivíduos apenas do sexo masculino e interessantemente, mulheres em idade fértil (10 a 49 anos), apresentam menor incidência de DCVs comparado aos homens da mesma idade. Contudo, estudos apontam que após a menopausa, esse efeito cardiovascular protetor é perdido e ambos os sexos apresentam risco similares de desenvolverem patologias que afetam o sistema cardiovascular, dentre elas, a hipertensão arterial, trombose e aterosclerose (WITTEMAN, 1989; KANNEL et al., 1997; CRAWFORD & JOHANNES, 1999; MIKKOLA et al., 2013; DOSI et al., 2014).

Parte desses efeitos protetores, tem sido atribuído ao E2, visto que a menopausa é acompanhada da redução dos níveis do hormônio e pelo fato de algumas pesquisas básicas e clínicas, apontarem ação benéfica do E2 no sistema cardiovascular (MENZA & MURPHY, 2016; ROELFSEMA, YANG & VELDHUIS, 2018).

O modelo de ovariectomia tem se mostrado eficiente para reduzir os níveis circulantes de E2 e mimetizar a falência ovariana. Contudo, existem muitas discrepâncias na caracterização das alterações vasculares no modelo, em decorrência das variedades entre as espécies, leitos vasculares, tempo de cirurgia e níveis de E2. Ainda, dados da literatura demonstram que os níveis circulantes de E2 influenciam a ativação do SRA, dando destaque ao eixo Ang-(1-7)/receptor Mas, por mediar ações vasculoprotetores (SANTOS et al., 2013). Como mostrando recentemente pelo nosso grupo, a ação vasodilatadora da Ang-(1-7) foi abolida em anéis aórticos de camundongos fêmeas idosas e de fêmeas jovens OVX.

Dessa forma, se faz necessário compreender de forma mais detalhada como a falência ovariana estaria envolvida na modulação das respostas vasculares mediadas pelo eixo Ang-(1-7)/receptor Mas e como a ovariectomia afetaria a função vascular. Assim, hipotetiza-se que a ovariectomia leva a alterações vasculares, modulando negativamente o eixo Ang-(1-7)/receptor Mas.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar as alterações vasculares e a participação do eixo Ang-(1-7)/receptor Mas na aorta de camundongos fêmeas após duas semanas de ovariectomia

#### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da ovariectomia sobre o peso corporal e uterino;
- Avaliar o efeito da ovariectomia sobre os parâmetros morfométricos da aorta torácica;
- Avaliar o efeito da ovariectomia sobre as respostas vasoconstritoras e vasodilatadoras de segmentos da aorta torácica;
- Avaliar o efeito da ovariectomia sobre a ação da Ang-(1-7) na resposta contrátil da fenilefrina em segmentos da aorta torácica;
- Avaliar o efeito da ovariectomia sobre a produção *in situ* de NO na aorta torácica;
- Analisar o efeito da ovariectomia sobre a expressão proteica vascular do receptor Mas;
- Analisar o efeito da ovariectomia sobre a expressão proteica vascular de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo;
- Avaliar o efeito da ovariectomia sobre a produção *in situ* de EROs na aorta torácica.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Animais**

Para este estudo, foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem C57BL/J6, entre 10 a 12 semanas de idade, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram mantidos no Biotério de Camundongos do Departamento de Fisiologia e Biofísicas da UFMG, em gaiolas coletivas sob condições controladas de temperatura e luminosidade ( $24 \pm 2^\circ\text{C}$ ; ciclo claro/escuro de 12 h) com acesso *ad libitum* a água e ração (labina).

Todos os procedimentos experimentais foram submetidos ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG, sendo aprovado sob número de protocolo nº 365/2017.

### **4.2 Ovariectomia bilateral e protocolo experimental**

Para redução dos níveis séricos do E2 e objetivando mimetizar a menopausa, foi realizada a remoção bilateral dos ovários no grupo experimental denominado de OVX (COSTA-FRAGA et al., 2018). Os animais foram anestesiados com solução de Ketamina + Xilazina (80 mg e 10 mg /Kg), por via IP, respectivamente. As fêmeas foram colocadas em uma mesa de cirurgia em decúbito dorsal, os membros foram fixados e a tricotomia da área de ambos os flancos do animal foi realizada. Após isso, uma pequena incisão na pele, tecido subcutâneo e músculo foram feitos, permitindo visualização do tecido adiposo parametrial. Os ovários foram retirados com auxílio de uma pinça hemostática e tesoura. A pele foi suturada com fio absorvível 4-0 e os animais receberam antibiótico (Pentabiotico, 0,1 mL - via intramuscular) e analgésico (Banamine, 1mg/ kg; via subcutânea). Para recuperação da ação anestésica, os animais foram mantidos em ambiente aquecido a  $37^\circ\text{C}$ .

O grupo de fêmeas Sham-operadas, foi submetido ao mesmo estresse do procedimento, porém sem a remoção dos ovários. Após duas semanas (14 dias) da cirurgia, os animais foram sacrificados para fins experimentais.

### **4.3 Determinação do ciclo estral**

Para avaliar a ciclicidade dos animais e padronização experimental, foi realizado o lavado vaginal para determinação do ciclo estral (MARCONDES, BIANCHI & TANNO, 2002). Com auxílio de uma pipeta, foi introduzindo cerca de 10ul de salina na vagina dos animais e realizado de 3 a 5 lavagens. Posteriormente, o lavado foi colocado em uma lâmina e visualizado com o auxílio do microscópio de luz na objetiva de 10x. Os experimentos com as fêmeas Sham foram feitos na fase de proestro, momento onde as concentrações séricas de E2 estão mais elevadas.

### **4.4 Mensuração do peso corporal e uterino**

Os animais foram pesados no momento da cirurgia (peso inicial) e no dia do sacrifício (peso final), o útero foi coletado pós a eutanásia e também pesado, sendo este, normalizado por 20 g de peso corporal.

### **4.5 Estudo por reatividade vascular em anéis de aorta torácica**

#### **4.5.1 Montagem de preparações isoladas**

Para os estudos de reatividade vascular em sistema de banho de órgãos isolados, a aorta torácica foi isolada e dissecada do tecido conjuntivo e adiposo perivascular, e seccionada transversalmente em anéis de 2-3 mm de comprimento (CAPETTINI, CORTES & LEMOS, 2010). Duas hastes de metal foram passadas pelo lúmen dos vasos de forma paralela e fixados no banho de órgão isolados. Uma das hastes foi conectada a um suporte fixo e a outra em um transdutor de tensão isométrico (World Precision Instruments, Inc., USA) conectados a um amplificador de sinal (TBM4M, WPI), sendo este acoplado a um computador equipado com uma placa conversora analógico-digital. Para aquisição dos dados foi utilizado o programa WinDaq Data Acquisition (Dataq® Instruments, USA).

As preparações foram banhadas em uma solução de Krebs modificada, mantidas a 37°C (NaCl 118mM; KCl 4,7mM; NaHCO<sub>3</sub> 25mM; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 2,5mM; glicose 11; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2mM; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1,2mM), com pH estável de 7,4 e



aeradas com mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub> e 5 % CO<sub>2</sub>). Após montadas, as preparações permaneceram sob tensão de 1g durante 60 min, sendo realizado a troca da solução nutriente e ajuste da tensão a cada 15 min, a fim de garantir nutrientes aos anéis e evitar acúmulo e metabólitos. Transcorrido o tempo de estabilização, foi realizado a avaliação da integridade do endotélio através da pré-contração com o agonista  $\alpha$ 1-adrenérgico Fenil (10<sup>-7</sup> mol/L), seguida de vasodilatação mediada por Acetilcolina (ACh 10<sup>-4</sup> mol/L). Foram considerados segmentos de aorta com endotélio intacto, preparações apresentando relaxamento vascular em resposta à ACh igual ou superior a 80% à pré-contração com Fenil.

#### **4.5.2 Protocolos executados para análise da reatividade vascular em aorta de camundongos fêmeas sham e OVX**

##### **Relaxamento endotélio-dependente induzido com ACh**

Foram realizadas curvas de concentração-resposta para ACh (10<sup>-9</sup> a 10<sup>-4</sup> mol/L) em segmentos da aorta pré-contraídas com Fenil a 10<sup>-7</sup> mol/L.

##### **Relaxamento endotélio-independente induzido com NPS**

Foram realizadas curvas de concentração-resposta para NPS (10<sup>-11</sup> a 10<sup>-6</sup> mol/L) em segmentos da aorta pré-contraídas com Fenil a 10<sup>-7</sup> mol/L.

##### **Resposta contrátil induzida por KCl**

Foram realizadas curvas de concentração-resposta para KCl (10mM, 20mM, 30mM, 45mM, 90mM e 120 mM) em segmentos da aorta de ambos grupos.

##### **Resposta contrátil induzida por Fenil**

Foram realizadas curvas de concentração-resposta para Fenil (10<sup>-9</sup> a 3x10<sup>-4</sup> mol/L) em preparações de aorta com endotélio íntegro.

### **Participação do NO na resposta contrátil induzida por Fenil**

Foram realizadas curvas de concentração-resposta para Fenil ( $10^{-9}$  a  $3 \times 10^{-4}$  mol/L) pré-incubadas por 20 min com L-N<sup>G</sup>-Nitroargininemethyl ester (L-NAME) ( $10^{-4}$  mol/L) em preparações de aorta com endotélio funcionante.

### **Participação da Ang-(1-7) na resposta contrátil induzida por Fenil**

Para investigar da participação da Ang-(1-7) nos anéis aórticos dos grupos experimentais, foram realizadas curvas de concentração-resposta para Fenil ( $10^{-9}$  a  $3 \times 10^{-4}$  mol/L), na presença ou ausência de Ang-(1-7) ( $10^{-10}$  mol/L, pré-incubação por 30 min).

### **Participação da inibição enzimática das NO-Sintases sobre o efeito da Ang-(1-7) em inibir a resposta contrátil induzida por Fenil**

Objetivando investigar a participação do NO nas respostas vasculares observadas, foram realizadas curva de concentração-resposta para Fenil ( $10^{-9}$  a  $3 \times 10^{-4}$  mol/L), na presença do L-NAME ( $10^{-4}$  mol/L, por 20 min) e 30 min com Ang-(1-7) ( $10^{-10}$  mol/L) (CAPETTINI, CORTES & LEMOS, 2010).

## **4.6 Quantificação de EROs e NO *in situ* por microscopia de fluorescência**

A produção de NO produzida pela aorta torácica, foi realizada através da medida do diacetato de 4,5- diaminofluoresceína (DAF-2), um marcador fluorescente sensível ao NO (AKAMINE et al., 2006) e a geração de EROs foi determinada utilizando-se a dihidroetidina (DHE) (BRAGA et al. 2015) em cortes transversais da aorta torácica, previamente embebidas em meio para congelamento (Tissue-Tek<sup>®</sup> O.C.T. Compound, Sakura), e posteriormente realizado cortes de 8 um utilizando criostato (Leica, CM1850).

As lâminas foram incubadas por 15 min com PBS 1x, a 37°C, em câmara úmida e protegidas da luz. Após isso, foi retirado o excesso de PBS que estava sobre as lâminas, e incubados com solução de DHE (10 µM) ou DAF-2 (8 µM), por 30 min. As

lâminas de controle negativo receberam a mesma quantidade de tampão, mas, sem a sonda fluorescente. Em seguida as lâminas foram fixadas com PFA 4% por 5 min, montadas e seladas utilizando glicerol 60% como meio de montagem. No caso do DAF, os tecidos foram pré-estimulados com Ang-(1-7) por 15 min a 37° minutos, antes da incubação com a sonda, conforme protocolo adaptado (COUTO et al. 2015).

As lâminas foram fotografadas no microscópio ApoTome.2 Zeiss, equipado com fluoresceína e filtro de comprimento de onda 545 nm, usando a objetiva de 40x e sendo posteriormente analisadas com o programa ImageJ.

#### **4.7 Avaliação morfométrica vascular por Hematoxilina e Eosina**

A morfologia vascular da aorta torácica foi realizada por meio da coloração com Hematoxilina e Eosina (H&E), seguindo o protocolo padrão. As imagens foram fotografadas com auxílio de uma câmera conectada ao microscópio de luz na objetiva de 10x. Foram analisados a área do lúmen, camada média, camada da adventícia e área da parede vascular utilizando o ImageJ.

#### **4.8 Extração de proteínas, dosagem e análise por Western Blot**

Foram extraídas proteínas da aorta abdominal dos animais utilizando solução de lise com detergente (NaCl 100 mM; Tris-Base 50 mM; EDTA-2Na 5 mM; Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 50 mM; MgCl<sub>2</sub> 1 mM; Nonidet 1%; Triton X 0,3%; Deoxicolato de sódio 0,5%; Naf 0,5%, pH=8.0) e inibidores de proteases (benzamida, ortovanadato de sódio, aprotinina, pepstatina A, inibidor completo, inibidor de fosfatase e fluoreto de fenilmetilsulfonil). Os tecidos contendo a solução de lise com inibidores, foram triturados por processo físico por 1 min. Por fim, as amostras foram centrifugadas a 8000 rpm por 12 min em temperatura de 4 °C e o sobrenadante coletado.

As amostras de proteínas foram quantificadas pelo ensaio descrito por Bradford (BRADFORD, 1976), que utiliza como curva padrão uma concentração previamente conhecida de albumina do soro bovino (BSA) (1 mg/ml) e tem como princípio, a reação enzimática com o corante *Coomassie brilliant blue*. Ao reagir com proteínas o corante altera a coloração de castanho para tons azuis, de acordo com a

concentração de proteínas amostra. A leitura foi realizada utilizando leitor de microplacas de ELISA (Biotek) utilizando absorvância de 595 nm.

Para realização do Western Blot foram utilizadas 50 ug de amostras diluídas em tampão de amostra (5% de 2-mercaptoethanoel), desnaturadas a 95° por 5 min. As proteínas foram submetidas a corrida com gel 10% de SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) – PAGE (Polyacrylamide Gel Electrophoresis) e em seguidas transferidas por 25 min a 20V (Trans-Blot SD Semi-Dry) para uma membrana de PVDF (*Polyvinylidene difluoride*).

Para avaliar a qualidade da transferência, a membrana foi corada com solução de Ponceau 3%. Em seguida, as membranas foram incubadas por 1 h, em temperatura ambiente com solução de bloqueio ([TBS-Tween (Tris-base, NaCl e tween 0,1%, TBS-T) com 5% de leite em pó desnatado, Molico]), para evitar ligações inespecíficas.

Transcorrido o tempo de bloqueio, as membranas foram incubadas por *overnight*, a 4°C, com anticorpos primários para: Mas receptor (1:500, Alamone labs, AAR-013), Superóxido dismutase 2 (SOD 2), gp91, p22phox, Catalase e NRF2. Após isso, as membranas foram lavadas por 30 min com TBS-T 1x (troca da solução a cada 10 min) e incubadas por 1 h em temperatura ambiente com os anticorpos secundários, diluído em TBS-T 1x com leite em pó desnatado a 1%. A normalização das amostras foi feita pela expressão do GAPDH (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase). Após o término da incubação, as membranas foram novamente lavadas com TBS-T1x durante 30 min (troca da solução a cada 5 min).

Para detecção das bandas foi utilizada a técnica de quimiluminescência, utilizando o kit de revelação ECL- Plus conjugado com a peroxidase (Bio-Rad) aplicada diretamente sobre a membrana. As imagens foram capturadas e quantificadas através do Software Image Quant LAS 4000.

#### **4.9 Ensaio de Imunofluorescência**

Para a realização da imunofluorescência, as lâminas foram inicialmente fixadas com acetona gelada, durante 15 min. Após isto, as mesmas foram lavadas com solução BSA 1%. Em seguida, foi realizado o bloqueio com a solução de BSA 3% diluído em PBS 1x com 0,1% de Triton-X durante 30 min. Após nova lavagem com BSA 1%, as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário anti-Mas (1:500) na

solução de bloqueio, em câmara úmida à 4°C, durante 16 h (overnight). Após lavagem no dia seguinte, o anticorpo secundário anti-coelho (1:200) foi adicionado por 1 h em temperatura ambiente. Após esse tempo, foi utilizado o DAPI (Vector Laboratories) para coloração dos núcleos. As lâminas foram seladas com esmalte incolor e as imagens foram capturadas com o uso do microscópio APOTOME.

#### **4.10 Análise estatística e expressão dos resultados**

As análises estatísticas foram feitas utilizando o software *GraphPad Prism* versão 7.0. Na reatividade vascular os dados de contração foram expressos em mN/mm, referente a força de contração e comprimento do vaso. Os dados de dilatação foram expressos em percentual de redução de contração em resposta a Fenil. Para obtenção do Emax e PD<sub>2</sub> foi realizado regressão não linear.

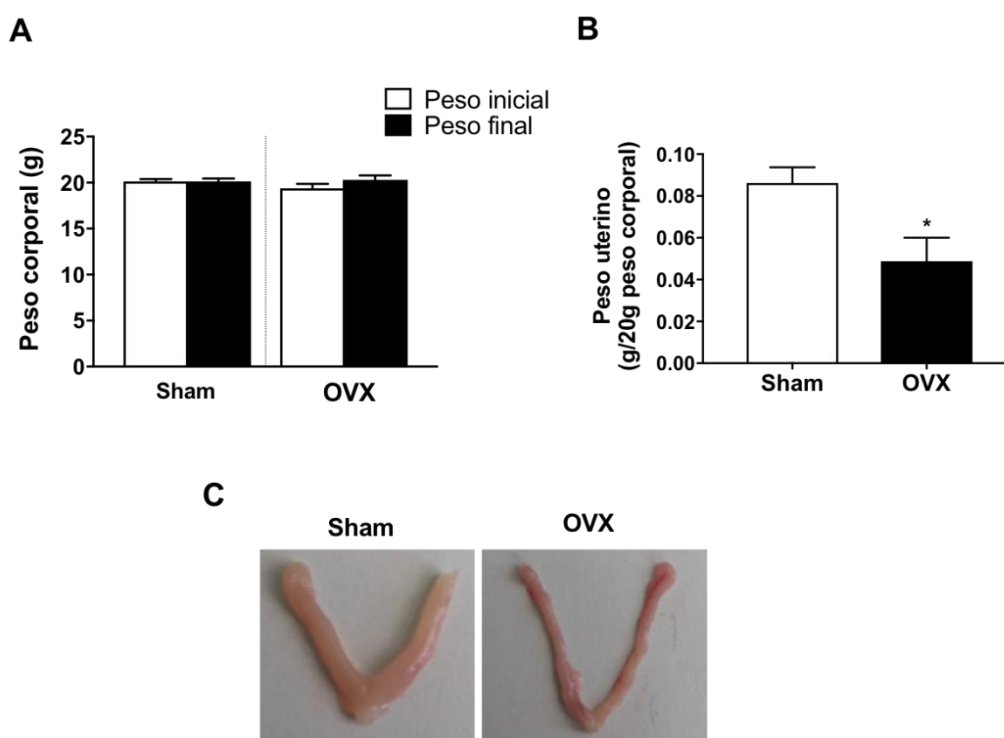
O One-Way ANOVA, seguido do teste de Tukey/Newman-Keuls foi utilizado para comparar o Emax, pD<sub>2</sub> e gráficos de barra, juntamente com o teste t de Student quando indicado. Os dados foram expressos como média ±EPM e foram considerados estatisticamente diferentes, os grupos que apresentaram  $p \leq 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Avaliação do peso corporal e uterino de camundongos fêmeas intactas e ovariectomizadas

Objetivando caracterizar os animais e avaliar a influência da falência ovariana sobre o peso corporal, os animais foram pesados no dia da cirurgia, sendo obtido o peso inicial (g) e no dia do sacrifício, considerado o peso final (g). Como demonstrado na **figura 3A**, não foi observado alterações entre o peso inicial e final no grupo Sham, e nem após duas semanas de remoção dos ovários, grupo OVX.

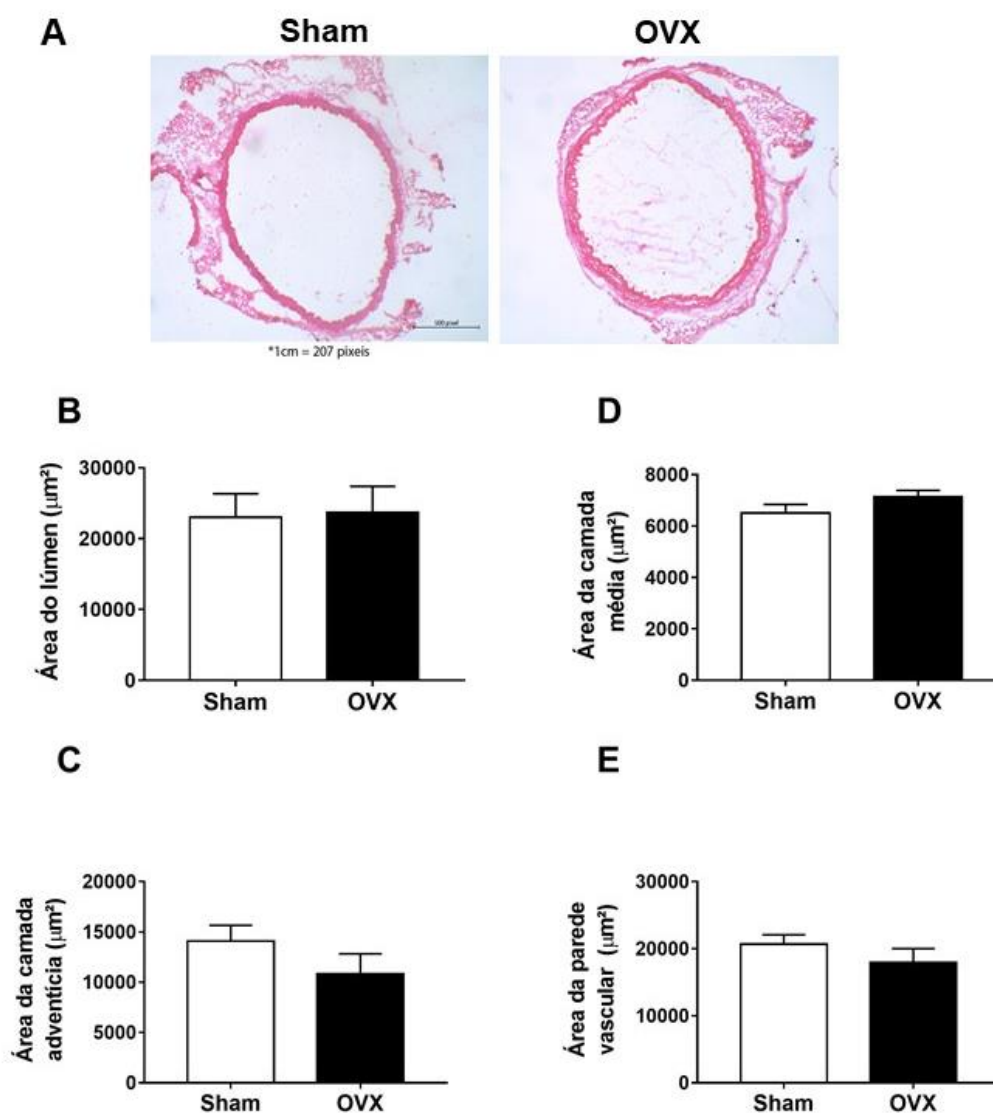
A atrofia uterina é considerada como um importante preditor da falência ovariana e da redução dos níveis plasmáticos de E2. Dessa forma, o peso uterino foi mensurado no dia do sacrifício e normalizado por 20 gramas de peso corporal animal. Como pode ser observado nas **figuras 3B e C**, o peso uterino foi expressivamente reduzido no grupo OVX quando comparado ao grupo Sham ( $p < 0,0001$ ).



**Figura 3.** Peso corporal e uterino de camundongos fêmeas Sham e OVX. **(A)** Peso corporal antes da ovariectomia (peso inicial) e no dia do sacrifício (peso final) **(B)** Peso uterino normalizado por 20g do peso corporal. **(C)** Imagens representativas do útero. Resultados apresentam o grupo Sham (n=6-8) e OVX (n=6-8). Os valores são expressos em média  $\pm$ EPM. Teste t, \* $p < 0,0001$  vs Sham.

## 5.2 Parâmetros morfométricos de cortes transversais da aorta torácica

Como a ausência do E2 pode estar associada ao remodelamento vascular, avaliamos a morfometria de cortes transversais da aorta torácica por meio da coloração com H&E. Na **figura 4** é mostrado os parâmetros morfométricos para a **(B)** área do lúmen, **(C)** área da camada adventícia, **(D)** área da camada média e **(E)** área da parede vascular. Contudo, pode-se observar que a ovariectomia não promoveu alterações nos parâmetros avaliados.



**Figura 4.** Avaliação de parâmetros morfométricos da aorta torácica de camundongos fêmeas Sham e OVX. **(A)** Imagens representativas de cortes transversais da aorta torácica dos animais Sham e OVX coradas com H&E. Gráficos de barra representam a quantificação da **(B)** área do lúmen, **(C)** área da camada média, **(D)** área da camada adventícia e **(E)** área da parede vascular. Os valores são expressos em média  $\pm$ EPM. Resultados representam os grupos Sham (n=5) e OVX (n=5). Teste t.

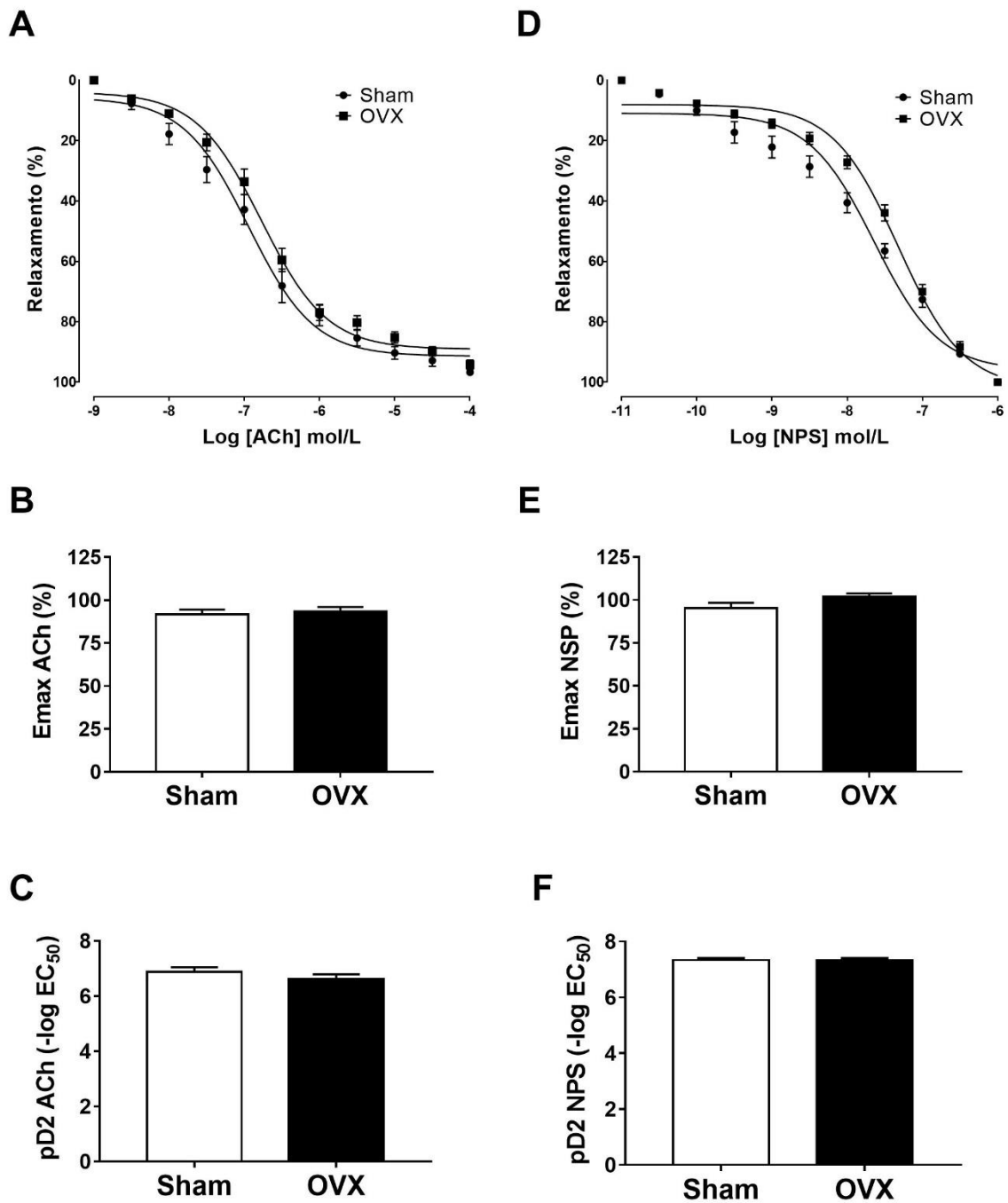
### **5.3 Resposta vasodilatadora para acetilcolina e nitroprussiato de sódio em segmentos da aorta torácica**

Objetivando avaliar os aspectos funcionais vasculares dos animais do estudo, foi realizada reatividade vascular em segmentos da aorta torácica. Inicialmente, para avaliar a dilatação vascular dependente de endotélio, foram realizadas curvas concentração-resposta em aorta de camundongos Sham e OVX, estimuladas com concentrações crescentes e cumulativas de ACh.

A ACh induziu dilatação dependente da concentração em aortas de Sham e OVX (**figura 5A**). Não foram encontradas alterações no efeito máximo dilatador (Sham:  $91,6 \pm 2,7$  %; OVX:  $93,27 \pm 2,7$  %) e nos valores de  $pD_2$  (Sham:  $6,89 \pm 0,15$ ; OVX:  $6,62 \pm 0,07$ ) entre os grupos (**figura 5B e C**, respectivamente).

A dilatação vascular independente de endotélio, foi avaliada por meio da curvas concentração-resposta para o NPS (**figura 5D**). Do mesmo modo que a dilatação dependente de endotélio, não foram observadas diferenças no efeito máximo dilatador (Sham:  $95,1 \pm 3,1$  %; OVX:  $102,0 \pm 1,7$  %) e nos valores de  $pD_2$  (Sham:  $7,33 \pm 0,07$ ; OVX:  $7,33 \pm 0,07$ ) entre os grupos (**figura 5E e F**, respectivamente).





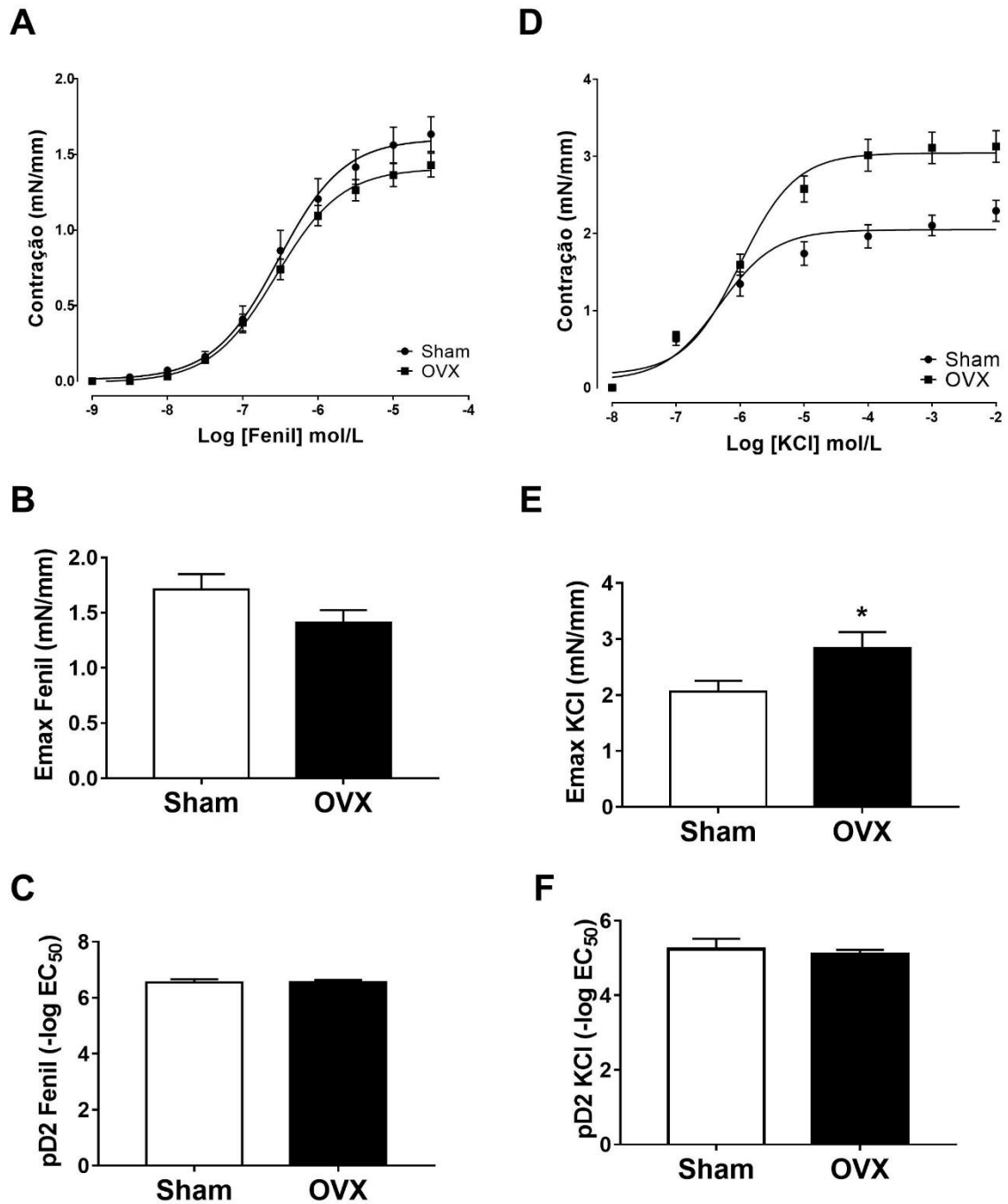
**Figura 5.** Resposta vasodilatadora para ACh e NPS em aorta de camundongos fêmeas Sham e OVX. **(A)** Curvas concentração-resposta para ACh ( $10^{-9}$  a  $10^{-4}$  M). Gráficos de barras com valores de **(B)** Emax e **(C)** pD<sub>2</sub> para ACh. **(D)** Curvas concentração-resposta para NPS sódio ( $10^{-11}$  a  $10^{-6}$  M). Gráficos de barras com valores de **(E)** Emax e **(F)** pD<sub>2</sub> para NPS. Os valores são expressos em média  $\pm$ EPM. Resultados representam os grupos Sham (n=5-8) e OVX (n=5-8). Teste t.

#### 5.4 Resposta vasoconstritora para fenilefrina e cloreto de potássio em segmentos da aorta torácica

A vasoconstrição nos segmentos da aorta torácica foi avaliada por meio de curvas concentração-resposta em aorta de camundongos Sham e OVX, estimuladas com concentrações crescentes e cumulativas de Fenil.

A Fenil induziu contração dependente da concentração em aortas de Sham e OVX (**figura 6A**). Não foram observadas alterações no efeito máximo contrátil (Sham:  $1,70 \pm 0,13$  mN/mm; OVX:  $1,41 \pm 0,11$  mN/mm) (**figura 6B**) e valores de  $pD_2$  (Sham:  $6,54 \pm 0,11$ ; OVX:  $6,56 \pm 0,07$ ) (**figura 6C**) entre os grupos.

Curvas concentração-resposta também foram realizadas para o KCl, exibindo o perfil de contração dependente da concentração (**figura 6D**). A ovariectomia aumentou o efeito máximo contrátil do KCl (Sham:  $2,06 \pm 0,19$  mN/mm; OVX:  $2,84 \pm 0,28$  mN/mm) ( $p < 0,001$ ) (**figura 6E**), o que pode indicar alterações no perfil da mobilização de  $Ca^{2+}$  e canais operados por voltagem. Não foram observadas alterações no  $pD_2$  do KCl entre os grupos (Sham:  $5,23 \pm 0,27$ ; OVX:  $5,102 \pm 0,11$ ) (**figura 6F**).

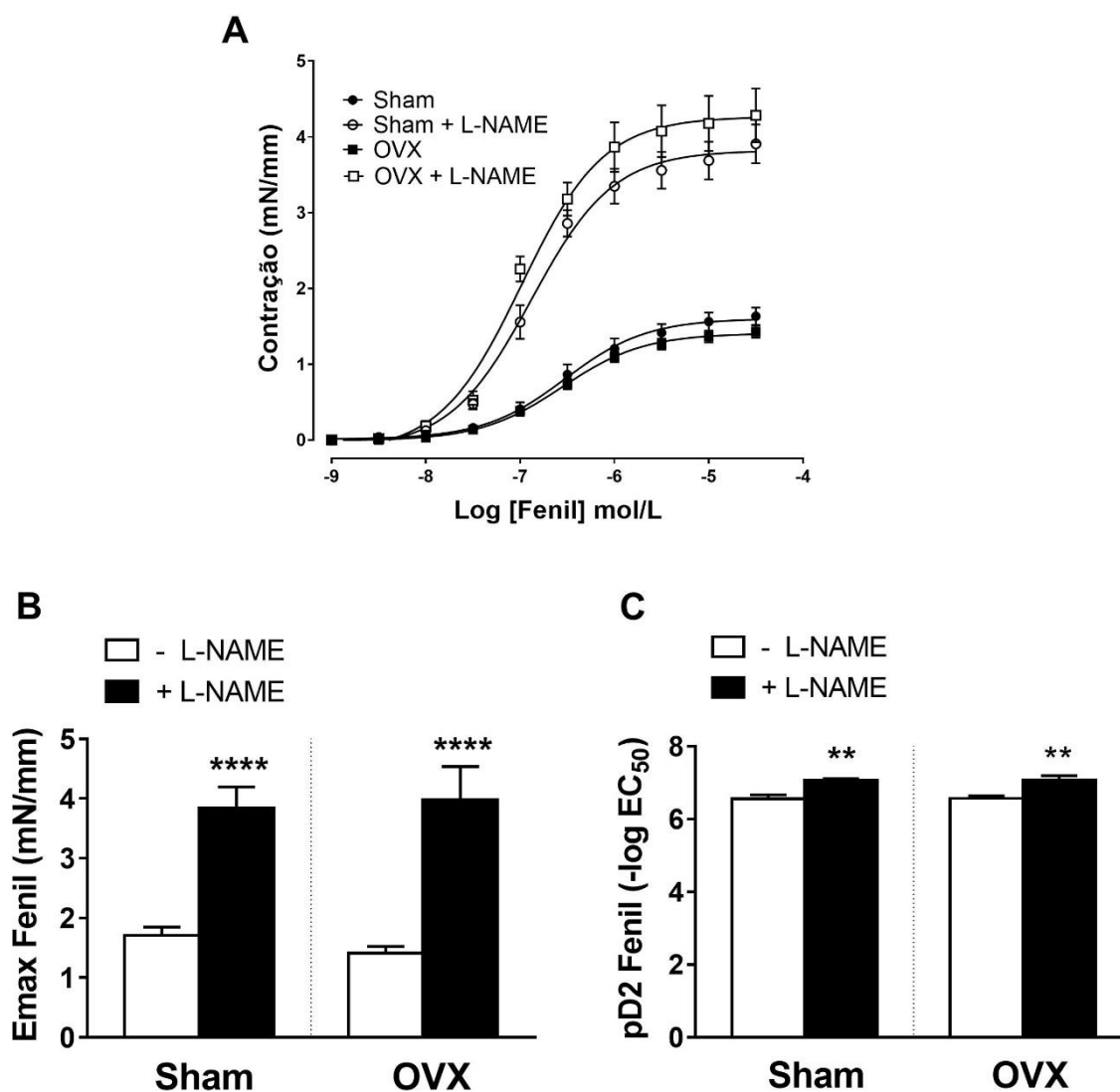


**Figura 6.** Resposta vasoconstritora para Fenil e KCl em aorta de camundongos fêmeas Sham e OVX. **(A)** Curvas concentração-resposta para Fenil ( $10^{-9}$  a  $3 \times 10^{-4}$  M). Gráficos de barras com valores de **(B)** Emax e **(C)**  $pD_2$  para Fenil. **(D)** Curvas concentração-resposta para KCl ( $10^{-8}$  a  $10^{-2}$  M). Gráficos de barras com valores de **(E)** Emax e **(F)**  $pD_2$  para KCl. Os valores são expressos em média  $\pm$  EPM. Resultados representam os grupos Sham (n=6-7) e OVX (n=6-7). Teste t, \* $p < 0.005$ .

## 5.5 Resposta vasoconstritora para fenilefrina na ausência ou presença do L-NAME em segmentos da aorta torácica

Nawate et al. (2005) demonstraram em artéria mesentérica de ratas OVX a ausência de alteração na resposta vasodilatadora à ACh quando comparadas com Sham. Neste estudo, embora a ovariectomia foi capaz de manter a resposta dependente de endotélio, dois fatores endoteliais foram alterados, o NO e o EDRF. Portanto, para investigar o efeito da retirada do NO basal sobre a o perfil de contração vascular, foram realizadas curvas concentração-resposta, estimuladas com concentrações crescentes e cumulativas de Fenil na presença do L-NAME ( $10^{-4}$  mol/L - pré-incubação por 20 minutos), inibidor não seletivo das NOS.

As curvas concentração-resposta para Fenil na ausência e presença do L-NAME são representadas na **figura 7A**. O efeito máximo contrátil foi superior nos segmentos pré-incubados com L-NAME (Sham:  $3,83 \pm 0,35$  mN/mm; OVX:  $3,97 \pm 0,56$  mN/mm) em comparação aos segmentos sem L-NAME (Sham:  $1,70 \pm 0,13$  mN/mm; OVX:  $1,41 \pm 0,11$  mN/mm) ( $p < 0,0001$ ) (**figura 7B**). Os valores de  $pD_2$  também foram superiores nos anéis pré-incubados com L-NAME (Sham:  $7,05 \pm 0,05$ ; OVX:  $7,07 \pm 0,12$ ) quando comparados sem L-NAME (Sham:  $6,54 \pm 0,11$ ; OVX:  $6,56 \pm 0,07$ ) ( $p < 0,05$ ). Apesar da liberação do NO basal ter sido inibida, não foram observadas diferenças entre os grupos Sham e OVX incubados com L-NAME (**figura 7A-C**).

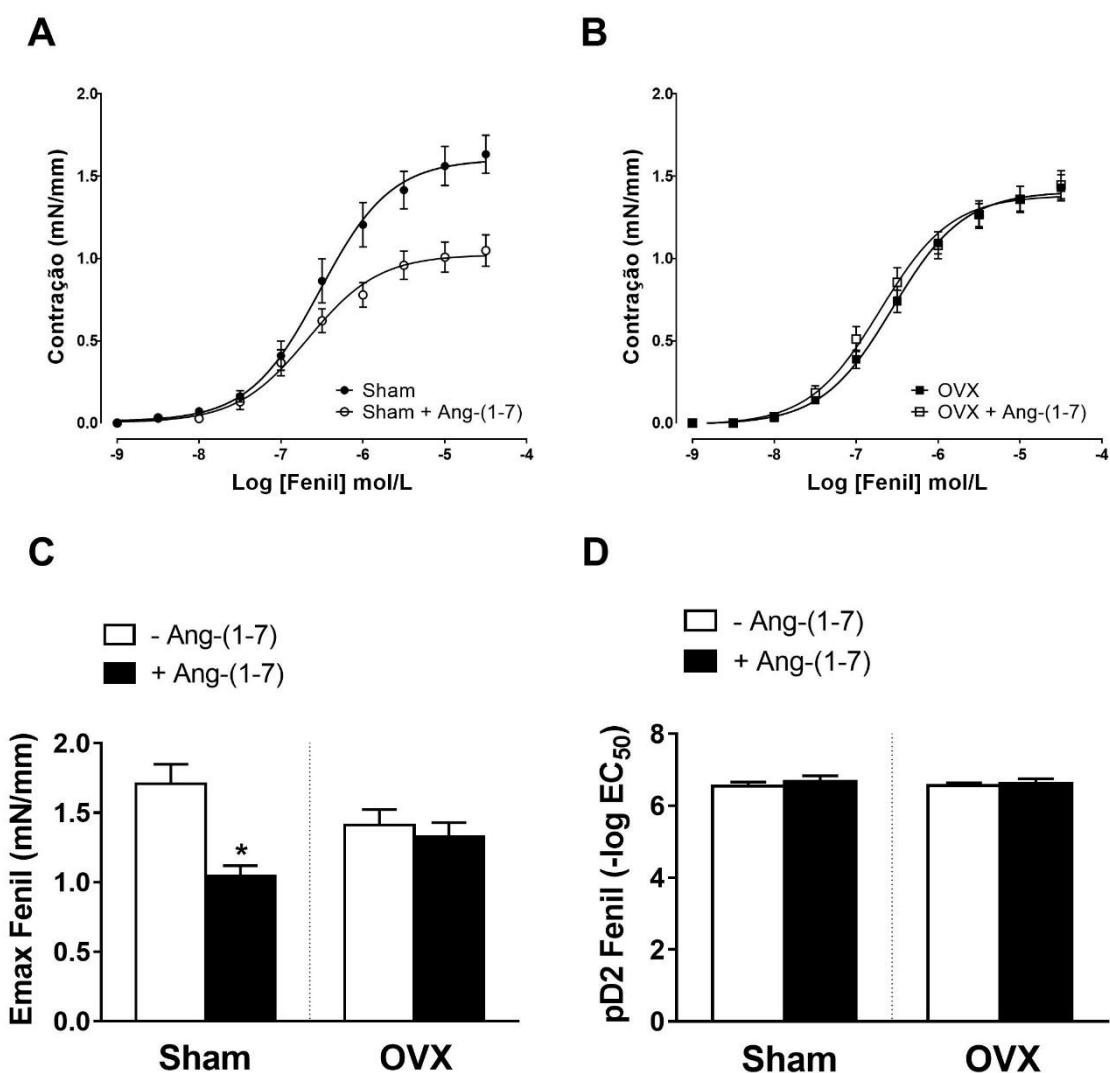


**Figura 7.** Resposta vasoconstritora para Fenil na ausência ou presença do L-NAME em segmentos da aorta torácica. **(A)** Curvas de concentração-resposta para Fenil ( $10^{-9}$  -  $3 \times 10^{-4}$  M) na ausência e presença do L-NAME. Gráficos de barras com valores de Emax **(B)** e  $pD_2$  **(C)** para Fenil na ausência e presença do L-NAME. Os valores são expressos em média  $\pm$ EPM. Resultados representam os grupos Sham (n=5-7) e OVX (n=4-7). One-way ANOVA, pós-teste Tukey. \*\*\*\* $p < 0.0001$  Sham e OVX vs respectivos grupos sem L-NAME. \*\* $p < 0.05$  Sham e OVX vs respectivos grupos sem L-NAME

## 5.6 Resposta vasoconstritora da fenilefrina na ausência ou presença da Ang-(1-7) em segmentos da aorta torácica

Em trabalho recentemente publicado pelo nosso grupo, foi demonstrado bloqueio da resposta vasodilatadora à Ang-(1-7) em aorta de camundongos fêmeas, duas semanas após a ovariectomia quando comparada aos anéis aórticos do grupo Sham. Portanto, embora não tenha sido caracterizado disfunção endotelial nos segmentos da aorta torácica de animais OVX, buscou-se investigar a participação da Ang-(1-7) nas respostas vasculares desses animais. Para isso, curvas concentração-resposta foram realizadas para Fenil na presença da Ang-(1-7) ( $10^{-10}$  mol/L - pré-incubação por 30 minutos).

Na **figura 8A e 8B** são mostradas as curvas concentração-resposta para Fenil em segmentos da aorta torácica de animais Sham e OVX, na ausência e presença da Ang-(1-7). Em animais Sham, a pré-incubação com Ang-(1-7) promoveu diminuição da resposta máxima contrátil da Fenil (Sham:  $1,70 \pm 0,13$  mN/mm; Sham + Ang-(1-7):  $1,04 \pm 0,07$ ) ( $p < 0,005$ ) (**figura 8A e 8C**) e não teve efeito nos valores de  $pD_2$  (Sham:  $6,54 \pm 0,11$ ; Sham + Ang-(1-7):  $6,68 \pm 0,15$  mN/mm) (**figura 8D**). Curiosamente, quando os animais foram submetidos a ovariectomia, a Ang-(1-7) perdeu a ação de reduzir o efeito máximo contrátil da Fenil (OVX:  $1,41 \pm 0,11$  mN/mm; OVX + Ang-(1-7):  $1,32 \pm 0,10$  mN/mm) (**figura 8B e C**). Assim, como no grupo Sham, não foram verificadas alterações nos valores de  $pD_2$  dos animais OVX (OVX:  $6,56 \pm 0,07$ ; OVX + Ang-(1-7):  $6,62 \pm 0,12$ ) (**figura 8D**).



**Figura 8.** Resposta vasoconstritora para Fenil na ausência ou presença da Ang-(1-7) em segmentos da aorta torácica. Curvas concentração-resposta para Fenil ( $10^{-9}$  a  $3 \times 10^{-4}$  M) antes e após pré-incubação com Ang-(1-7) em segmentos da aorta torácica de animais **(A)** Sham e **(B)** OVX. Gráficos de barras com valores de **(C)** Emax e **(D)** pD<sub>2</sub> para Fenil na ausência e presença da Ang-(1-7). Os valores são expressos em média  $\pm$ EPM. Resultados representam os grupos Sham (n=6-7) e OVX (n=7). One-Way ANOVA, pós-teste Tukey, \*p<0.05 vs Sham sem Ang-(1-7).

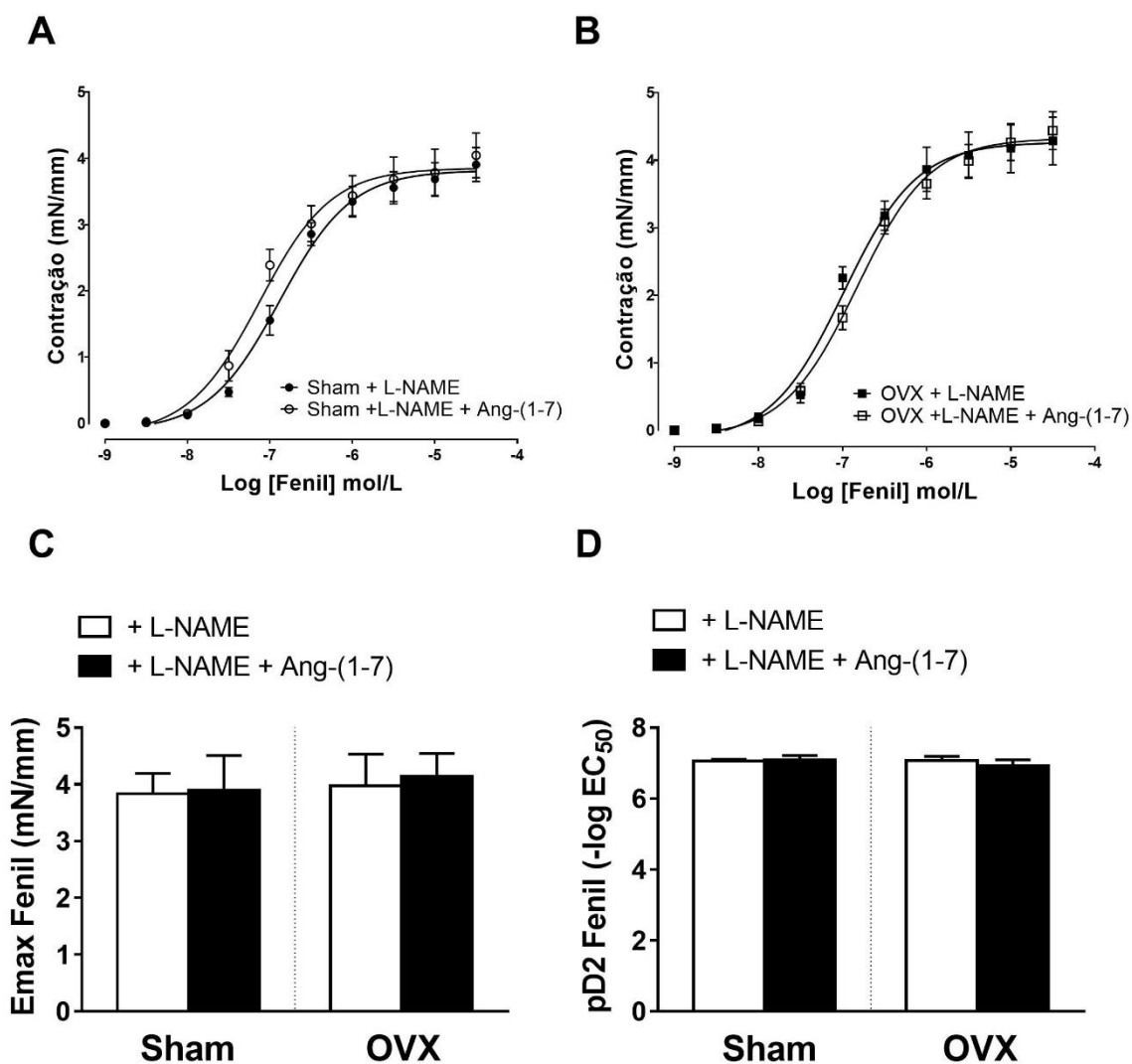
## 5.7 Resposta vasoconstritora da fenilefrina na presença da Ang-(1-7) e L-NAME em segmentos da aorta torácica

Para investigar uma possível participação do NO, no efeito da Ang-(1-7) em diminuir o efeito máximo da Fenil nos segmentos da aorta torácica de animais Sham, foram realizadas curvas concentração-resposta para Fenil na presença do L-NAME a  $10^{-4}$  mol/L por 20 minutos. Essa curva foi utilizada como parâmetro de comparação para uma segunda, na qual os segmentos da aorta torácica foram incubados com L-NAME a  $10^{-4}$  mol/L por 20 minutos e Ang-(1-7) a  $10^{-6}$  mol/L por 30 minutos.

Na **figura 9A** são mostradas as curvas concentração-reposta para Fenil em segmentos da aorta torácica de animais Sham, incubadas com L-NAME e a combinação do L-NAME com a Ang-(1-7). Como pode ser observado nas **figuras 9A e C**, o L-NAME aboliu completamente a ação da Ang-(1-7) em diminuir o efeito máximo contrátil da Fenil (Sham + L-NAME :  $3,83 \pm 0,35$  mN/mm; Sham + L-NAME + Ang-(1-7):  $3,89 \pm 0,61$  mN/mm), sem alterar os valores de  $pD_2$  (Sham + L-NAME:  $7,05 \pm 0,05$ ; Sham + L-NAME + Ang-(1-7):  $7,10 \pm 0,11$ ) (**figura 9D**).

Na **figura 9B** podem ser visualizadas as curvas de concentração-resposta para Fenil na presença do L-NAME e a junção do L-NAME com Ang-(1-7) nos segmentos da aorta torácica de animais OVX. Como demonstrado, não foram observadas alterações no efeito máximo contrátil da Fenil (OVX + L-NAME:  $3,97 \pm 0,56$  mN/mm; OVX + L-NAME + Ang-(1-7):  $4,14 \pm 0,40$  mN/mm) (**figura 9C**) nem nos valores de  $pD_2$  (OVX+L-NAME:  $7,07 \pm 0,12$ ; OVX + L-NAME + Ang-(1-7):  $6,93 \pm 0,15$ ).



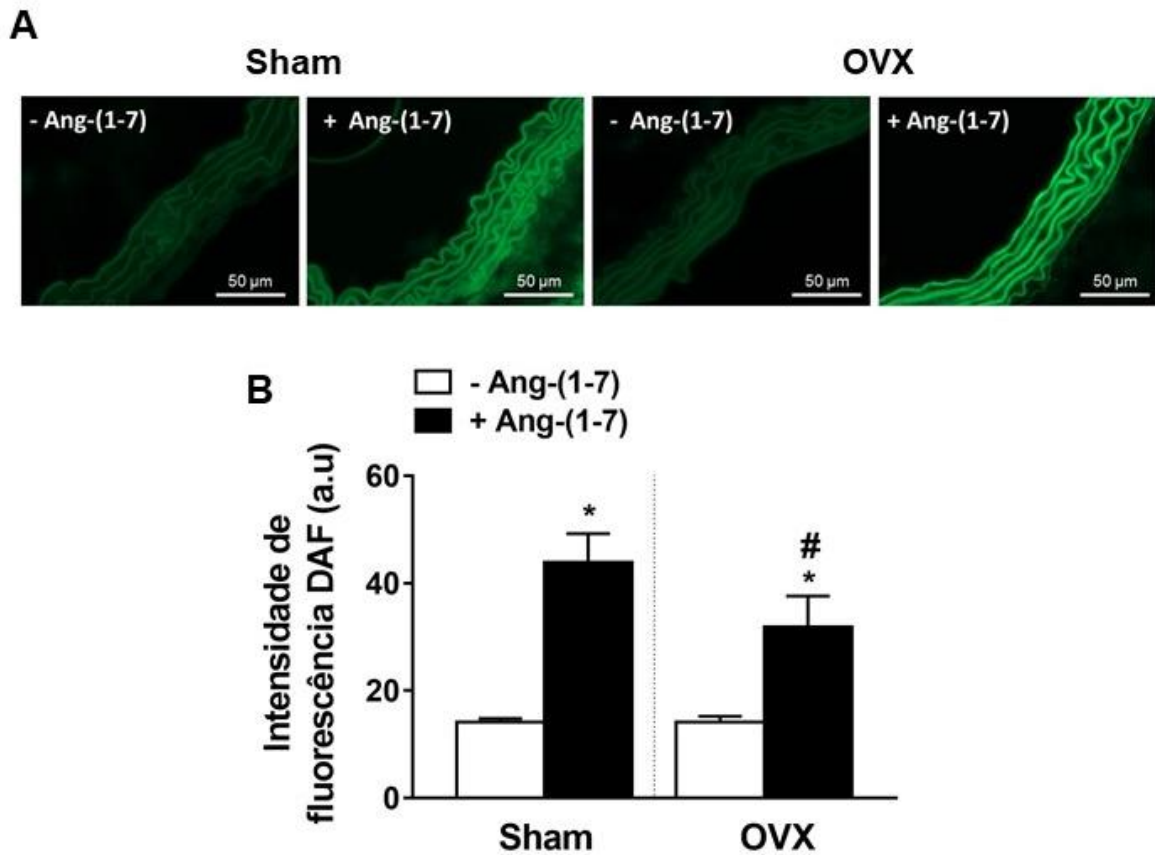


**Figura 9.** Resposta vasoconstritora da fenilefrina na presença da Ang-(1-7) e L-NAME em segmentos da aorta torácica. Curvas concentração-resposta para Fenil ( $10^{-9}$  a  $3 \times 10^{-4}$  M) incubadas com L-NAME na ausência e presença da Ang-(1-7) em segmentos da aorta torácica de animais **(A)** Sham e **(C)** OVX. Gráficos de barras com valores de **(C)** Emax e **(D)** pD<sub>2</sub> para Fenil incubada com L-NAME na ausência e presença Ang-(1-7). Os valores são expressos em média  $\pm$ EPM. Resultados representam os grupos Sham (n= 5) e OVX (n= 4-5). One-Way ANOVA, pós-teste Tukey.

## 5.8 Produção de NO em cortes transversais da aorta torácica

Nas curvas concentração-resposta, verificou-se que a ação da Ang-(1-7) em diminuir a o efeito máximo contrátil para a Fenil é perdido com a ovariectomia e parece ser dependente da biodisponibilidade do NO. Assim, o próximo passo foi investigar a produção de NO *in situ*. Para isto, utilizou-se o DAF-2, um marcador fluorescente para NO, em cortes transversais da aorta torácica.

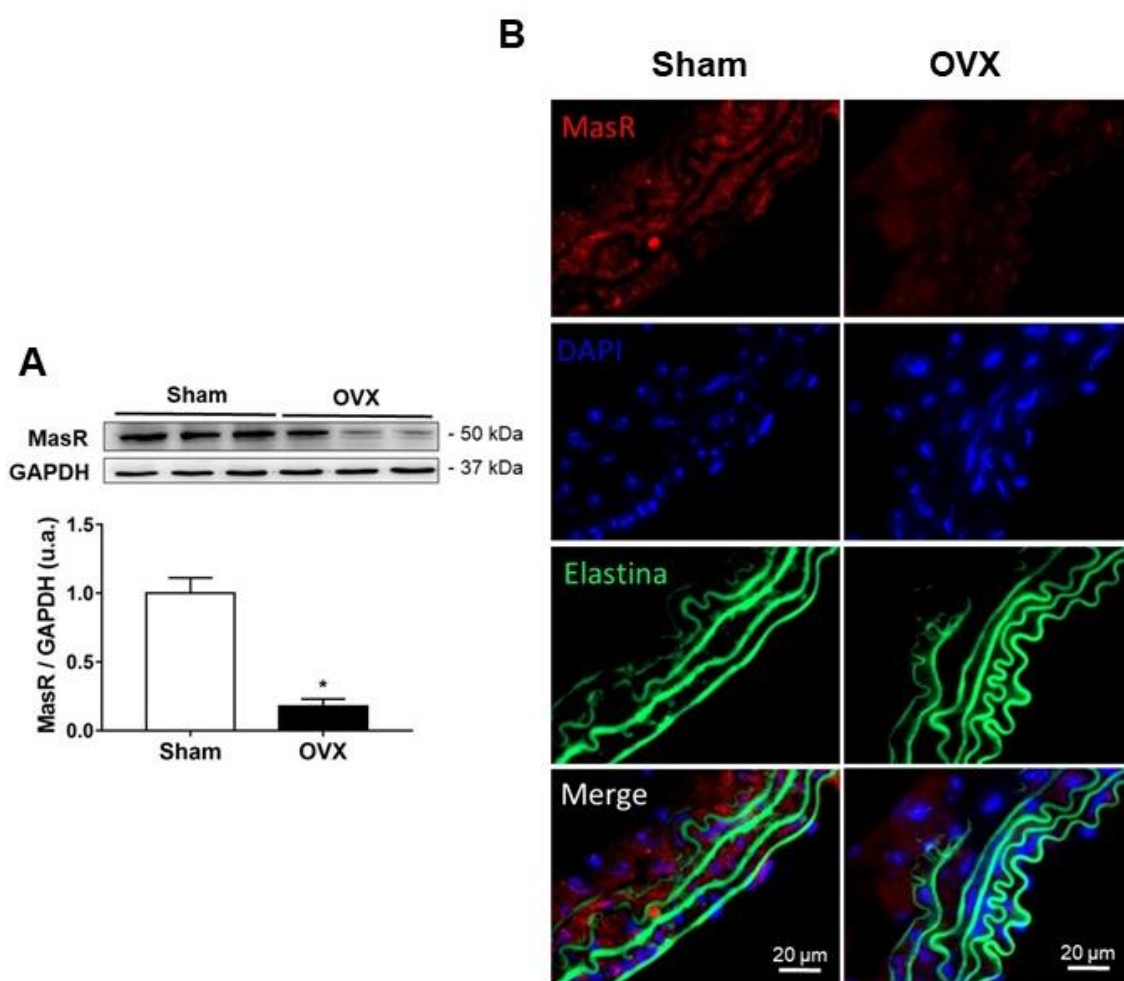
Na **Figura 10** é mostrado a produção de NO na aorta dos animais em condições basais [(-Ang-(1-7))] e após a estimulação com a Ang-(1-7) ( $10^{-10}$  mol/L) por 15 minutos [(+Ang-(1-7))]. Como mostrado na **figura 10A e B**, sob condições basais, não foi verificado alterações na produção de NO nos vasos dos animais Sham e OVX. A estimulação dos vasos com Ang-(1-7) aumentou significativamente a produção de NO em ambos grupos quando comparados com os seus respectivos controles ( $p < 0,05$ ). De forma importante, após a estimulação com a Ang-(1-7), a produção de NO vascular foi significativamente menor no grupo OVX quando comparado ao Sham ( $p < 0,05$ ) (**Figura 10A e B**).



**Figura 10.** Avaliação da produção de NO em cortes transversais da aorta torácica por meio do DAF-2. **(A)** Imagens representativas para fluorescência com DAF-2 em cortes transversais da aorta torácica de animais Sham e OVX, estimuladas (+) e não estimuladas (-) com Ang-(1-7). As fotos foram capturadas utilizando microscópio confocal na objetiva de 40x. **(B)** Quantificação da intensidade de fluorescência em cortes transversais da aorta torácica de animais Sham e OVX, estimuladas e não estimuladas com Ang-(1-7). Os valores são expressos em média  $\pm$ EPM. Resultados representam os grupos Sham (n=4-5) e OVX (n=4-5). One-Way ANOVA, pós-teste Newman-Keuls. \* $p < 0,05$  vs respectivos grupos sem Ang-(1-7); # $p < 0,05$  vs Sham com Ang-(1-7).

## 5.9 Expressão proteica do receptor Mas na aorta abdominal

A ação da Ang-(1-7) se dá principalmente por meio da interação com o receptor Mas. Dessa maneira, buscou-se avaliar a expressão proteica do receptor na aorta, uma vez que a produção de NO foi menor em aorta de animais OVX. Como mostrado na **figura 11A**, a ovariectomia diminuiu significativamente a expressão proteica do receptor Mas ( $p < 0,005$ ). Essa diminuição pôde ser observada também, por meio da imunofluorescência para o receptor Mas, em cortes transversais da aorta torácica (**figura 11B**).

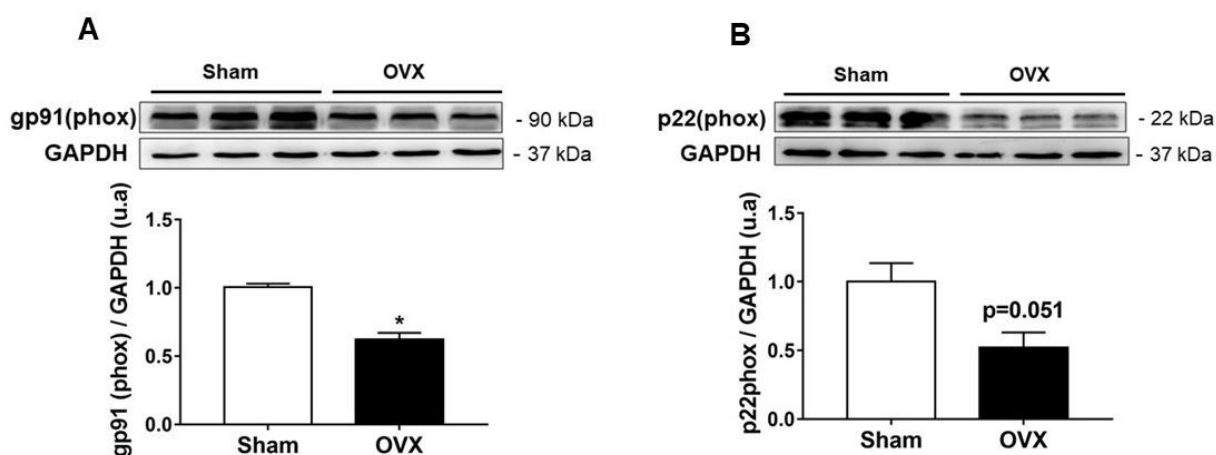


**Figura 11.** Expressão do receptor Mas na aorta de camundongos fêmeas Sham e OVX. **(A)** Imagem representativa do Western blot e a análise quantitativa da expressão proteica do receptor Mas após normalização pelo GAPDH. **(B)** Imagens representativas da imunofluorescência para expressão e localização do receptor Mas na aorta torácica. As fotos foram capturadas utilizando microscópio confocal na objetiva de 63x. Os valores são expressos em média  $\pm$ EPM. Resultados representam os grupos Sham (n=3) e OVX (n=3). Teste t, \*\*  $p < 0,05$ .

## 5.10 Expressão proteica de enzimas relacionadas ao balanço redox na aorta abdominal

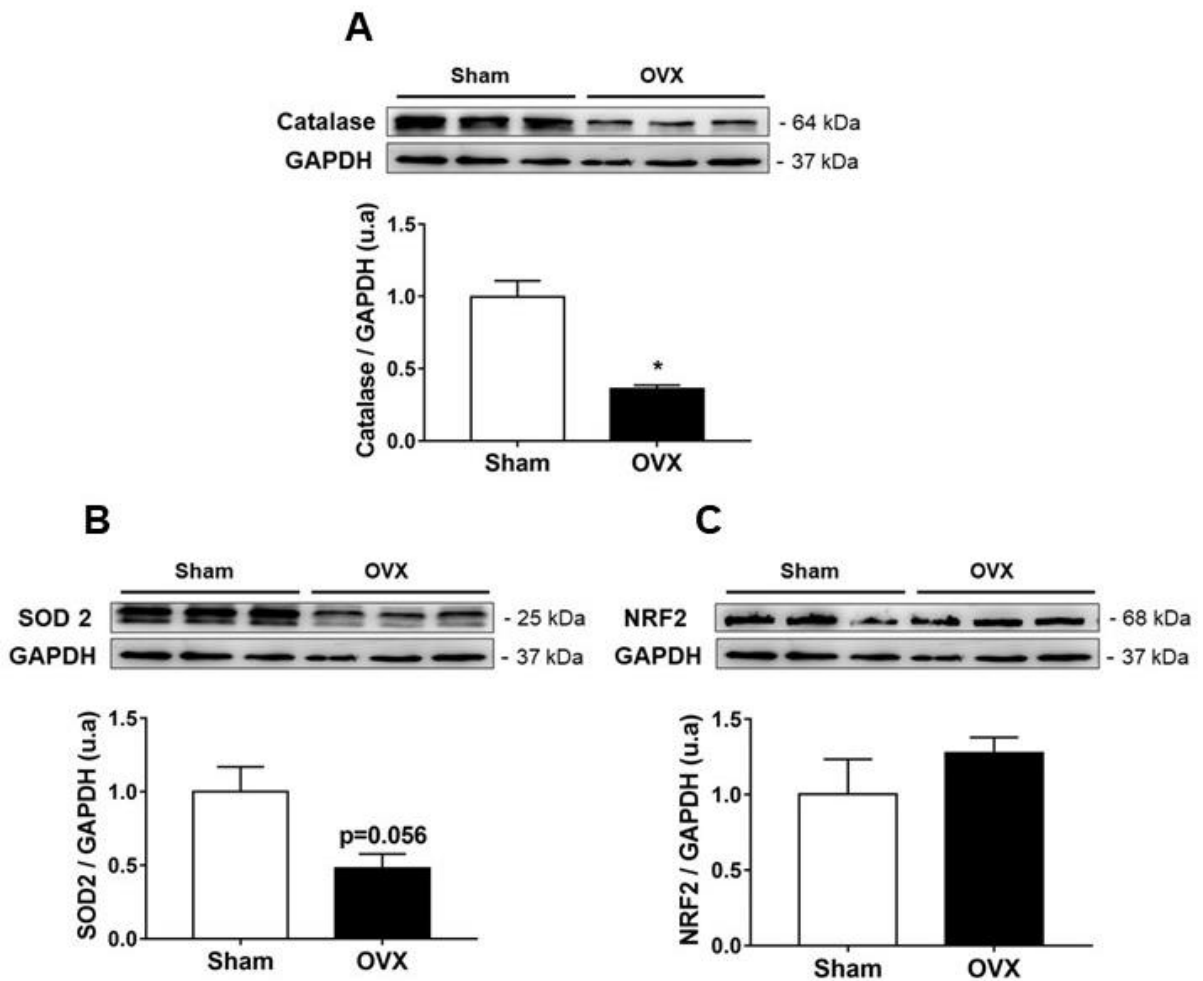
Estudos evidenciam que o E2 têm efeito antioxidante e a que a ovariectomia contribui para o desenvolvimento de um perfil vascular pró-oxidante. O desbalanço entre enzimas pró e antioxidantes podem estar relacionadas ao aumento da produção de EROs e depleção dos níveis de NO. Dessa forma, foi investigado os níveis de expressão proteica de enzimas relacionadas ao balanço redox.

Na **figura 12**, é mostrado a expressão do NADPH, por meio da avaliação dos níveis proteicos das suas subunidades glicosiladas gp91phox e não glicosilada, p22phox. A análise por Western blot mostrou que a expressão do gp91phox foi reduzida nos animais OVX (**figura 12A**) ( $p < 0,005$ ). Apesar dos níveis proteicos da subunidade p22phox não serem estatisticamente diferentes entre os grupos, foi observado uma forte tendência em serem reduzidos nos animais OVX ( $p = 0,051$ ) (**figura 12B**).



**Figura 12.** Expressão proteica das subunidades phox do NADPH na aorta de camundongos fêmeas Sham e OVX. Imagem representativa do Western blot e a análise quantitativa da expressão proteica da subunidade **(A)** gp91phox da NADPH e **(B)** p22phox normalizados pelo GAPDH. Os valores são expressos em média  $\pm$ EPM. Resultados representam os grupos Sham (n=3) e OVX (n=3). Teste t, \*\*  $p < 0,05$  e  $p = 0,051$  vs Sham.

Na **figura 13** são mostrados os gráficos com a análise da expressão proteica de enzimas relacionadas com ações antioxidantes. Como pode ser observado na **Figura 13A**, os níveis da catalase são significativamente reduzidos na aorta abdominal dos animais OVX ( $p < 0,005$ ), enquanto os níveis de SOD2 apresentam tendência em serem reduzidos ( $p = 0,056$ ) (**Figura 13B**). Não foram observadas alterações na expressão proteica do NRF2 entre os grupos (**Figura 13C**).

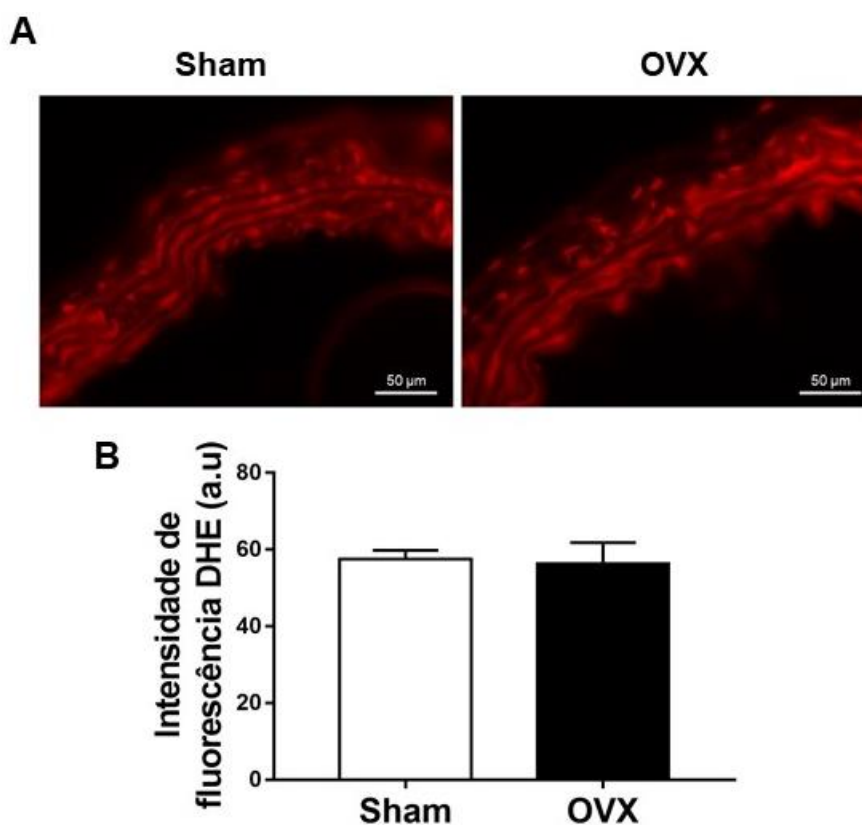


**Figura 13.** Expressão proteica da catalase, Sod 2 e NRF2 na aorta de camundongos fêmeas Sham e OVX. Análise da expressão proteica da (A) Catalase (B) Superóxido dismutase 2 (SOD2) (C) Fator nuclear relacionado ao eritróide 2 (NRF2), normalizados pelo Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), em homogenatos de proteínas da aorta abdominal de animais, por meio da técnica de Western Blot. Os valores são expressos em média  $\pm$ EPM. Resultados representam os grupos Sham (n=3) e OVX (n=3). Teste t, \*\*  $p < 0,05$  vs Sham.

#### 4.11 Produção de EROs em cortes transversais da aorta torácica

Apesar de não ter sido possível concluir se a ovariectomia corroborou para um balanço redox vascular com perfil antioxidante ou pro-oxidante, Borgo et al. (2016) e Claudio et al., (2017), mostraram que a ovariectomia promove aumento da produção de EROs em artérias mesentéricas e na aorta torácica de ratas. Baseando-se nessas evidências e levando em consideração a redução dos níveis de NO na aorta torácica de animais OVX, a produção de EROs em cortes transversais da aorta torácica dos animais foram avaliadas por meio da sonda fluorescente DHE.

Como demonstrado na **figura 14**, a fluorescência emitida pelo DHE mostrou que a produção de EROs não é alterada na aorta torácica dos animais após a ovariectomia (**figura 14A e B**).



**Figura 14.** Avaliação da produção de EROs em cortes transversais da aorta torácica por meio do DHE **(A)** Imagens representativas para fluorescência com DHE em cortes transversais da aorta torácica de animais Sham e OVX. As fotos foram capturadas utilizando microscópio confocal na objetiva de 40x. **(B)** Quantificação da intensidade de fluorescência em cortes transversais da aorta torácica de animais Sham e OVX. Os valores são expressos em média  $\pm$  EPM. Resultados representam os grupos Sham (n=4-5) e OVX (n=4-5).

## 6. DISCUSSÃO

O SRA é um dos principais reguladores da homeostase cardiovascular. Enquanto a hiperatividade do eixo clássico Ang II/AT1 tem sido relacionada com o desenvolvimento de DCVs, a ativação do eixo não clássico Ang-(1-7)/receptor Mas está associada a ações vasculoprotetoras, como a vasodilatação e diminuição da resistência periférica total (RPT).

Dados prévios do nosso laboratório demonstraram que a Ang-(1-7) perde a ação vasodilatadora em segmentos de aorta torácica de camundongos fêmeas idosas quando comparados com fêmeas jovens (COSTA-FRAGA et al., 2018). Dessa maneira, escolhemos o modelo de ovariectomia bilateral para reduzir os níveis de E2 e avaliar uma possível modulação sobre o eixo Ang-(1-7)/receptor Mas. Na literatura são encontrados protocolos experimentais com tempos variados de ovariectomia, como nosso objetivo foi avaliar as repercussões agudas da deficiência estrogênica, optamos pelo tempo de duas semanas de ovariectomia.

Conforme esperado, após duas semanas de cirurgia a eficácia do modelo foi confirmada através da redução significativa do peso uterino. Os efeitos fisiológicos do E2 são bem descritos no útero, onde agem aumentando a proliferação do endométrio. Dessa forma, a atrofia uterina pode ser considerada como um indicativo indireto da redução dos níveis de E2, como mostrado em outros estudos (SQUADRITO et al., 2000; SAVERGNINI et al., 2012; LEMINI et al., 2015).

Trabalhos anteriores mostraram que a ovariectomia promove a aceleração do ganho de peso corporal e aumento da ingestão alimentar, efeito explicado pela ação lipolítica atribuída ao E2. No entanto, no tempo experimental deste estudo não foi observado alterações no peso corporal dos animais. Em trabalho pioneiro de Blaustein et al. (1976), os autores realizaram uma avaliação temporal do peso corporal dos animais durante dez semanas pós ovariectomia e observaram ganho de peso corporal, somente a partir da terceira semana pós-cirurgia. Como nosso protocolo utilizou duas semanas, não foi observado ganho de peso corporal. Ainda, é plausível que os animais tenham perdido algum peso na primeira semana pós-cirurgia em função do procedimento e recuperação cirúrgica, o que poderia explicar a ausência de diferenças entre o peso inicial e final.

O foco inicial do estudo foi avaliar as alterações vasculares no eixo Ang-(1-7)/receptor Mas em condições de baixos níveis de E2, contudo, como na literatura



existem muitas discrepâncias sobre as alterações vasculares promovidas pela ovariectomia devido ao tempo de cirurgia, heterogeneidade de distintos leitos vasculares e linhagem animal, resolvemos avaliar as características estruturais e funcionais da aorta torácica desses animais, após duas semanas de ovariectomia.

No presente estudo, não foi observado alterações nos parâmetros morfológicos avaliados, como área do lúmen, camada média, camada adventícia e parede do lúmen. Em contraste, no trabalho de Borgo et al. (2016), verificaram aumento na área vascular total, área da parede do vaso e área do lúmen em artérias coronárias de ratas com seis semanas. Como o E2 participa do processo de migração e proliferação celular do endotélio e VSMCs (KRASINSKI et al., 1997; DUBEY et al., 1999; IWAKURA et al., 2003), é compreensível essas alterações no estudo citado acima. De forma interessante, Maifrino et al. (2019) demonstraram redução de colágeno do tipo III no endotélio, nas camadas média e adventícia da aorta ascendente após quatro semanas de cirurgia em camundongos. A redução do colágeno foi acompanhada por aumento de apoptose nas camadas íntima e média, porém, de acordo com nossos achados, não houve alteração na espessura da parede vascular.

Diversos estudos têm demonstrado que a ovariectomia leva à disfunção vascular. Em distintos leitos vasculares, os prejuízos na função endotelial são determinados predominantemente através da diminuição da resposta vasodilatadora a ACh (DARBLADE et al. 2002; WANG et al., 2014; SHEN et al., 2017; FABRICIO et al., 2017). No presente estudo, não houve diferença na resposta vasodilatadora a ACh em aortas de camundongos OVX quando comparada ao grupo Sham. Nossos dados estão de acordo com o trabalho de Nawate et al. (2005) que demonstraram em artérias mesentéricas de ratas, que a resposta vasodilatadora para ACh permanece inalterada quatro semanas após a ovariectomia. Apesar da ausência de efeito, os autores demonstraram com experimentos adicionais que a resposta vasodilatadora mediada pelo NO é aumentada com a remoção dos ovários, enquanto o relaxamento envolvendo o EDHF é reduzido, levando, portanto, a uma manutenção da resposta vasodilatadora dependente de endotélio. Nesta linha, Segredo et al. (2009) também demonstraram que a resposta vasodilatadora a ACh permanece inalterada em aorta de ratas, cinco meses após a ovariectomia. Embora a resposta vasodilatadora para ACh tenha sido similar em ratas OVX quando comparada ao grupo controle, a

remoção dos ovários aumentou a produção de TXA<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, PGF<sub>2a</sub> e PGE<sub>2</sub> após a estimulação com ACh. Tendo em vista a complexidade e diversidade da sinalização observada em resposta ACh em distintos protocolos de ovariectomia, estudos adicionais seriam necessários para compreender a similaridade da resposta a ACh no nosso modelo, mais agudo, avaliando as respostas vasculares de duas semanas após a cirurgia.

Os dados da literatura também são controversos no que diz respeito às alterações das respostas vasculares contráteis após a remoção dos ovários. Em artérias mesentéricas de ratas, a resposta contrátil à Fenil foi reduzida em aproximadamente 50% no grupo OVX quando comparada ao grupo controle (NAWATE et al. 2005). Em contraste, no estudo de Sanchez et al. (1996), a resposta contrátil para a Fenil foi aumentada na aorta torácica de coelhos OVX e no trabalho de Oliveira et al. (2019), não houve alterações na resposta contrátil à Fenil na aorta torácica de ratas OVX comparadas ao controle e nem em artérias mesentéricas (SHEN et al. 2017). Esses últimos trabalhos estão de acordo com nosso estudo, o qual não observamos alterações nas respostas vasoconstritoras mediada pelo receptor adrenérgico  $\alpha_1$ .

Dentre as substâncias vasoativas que contribuem para a manutenção do tônus vascular, o NO se destaca como um dos mais importantes agentes vasodilatadores. A formação do NO acontece por meio da ação da NOS, a partir da oxidação do aminoácido L-arginina (RADOMSKI, PALMER & MONCADA, 1990). Como esperado, na presença do inibidor não seletivo da NOS, o L-NAME, a resposta vasoconstritora para a Fenil foi elevada na aorta torácica dos grupos experimentais, o que já é bem documentado na literatura (TABERNERO, GIRALDO & VILA, 1996; DORA et al., 2000; LIU et al., 2001; LEMOS et al., 2005). No entanto, não foram observadas diferenças contráteis entre os vasos dos animais Sham e OVX. Juntamente com os dados de avaliação da produção basal *in situ* do NO, esses achados sugerem que a produção de NO não é alterada sob estas condições experimentais. De forma interessante, os vasos dos animais OVX, apresentaram maior contração vascular para o KCl, um agonista contrátil não dependente de receptor, sugerindo que a ovariectomia, aumenta a sensibilidade das VSMCs para os íons K<sup>+</sup>, que classicamente promove contração vascular por estimular a

despolarização da membrana, promovendo o aumento do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  pelos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por voltagem.

Existem poucos trabalhos na literatura abordando a modulação da via Ang-(1-7)/receptor Mas pelo E2. Neves et al. (2004) observaram ausência de efeito vasodilatador em resposta à Ang-(1-7) em artérias mesentéricas de ratas OVX ou na fase diestro. De forma interessante, o efeito vasodilatador da Ang-(1-7) foi restabelecido no proestro e potencializado com a reposição do E2 nas ratas OVX ou grávidas, onde as concentrações plasmáticas de E2 são elevadas (NEVES et al., 2003; NEVES et al., 2004). Em contraste, Grobe et al. (2006) demonstraram que a Ang-(1-7) induziu dilatação dependente da concentração em aorta de fêmeas por três semanas de ovariectomia, e que a reposição hormonal com E2 foi capaz de inibir este efeito. No presente trabalho demonstramos que pré-incubação com a Ang-(1-7) diminuiu a resposta contrátil à Fenil, e que a ovariectomia aboliu este efeito. Nossos achados corroboram com estudos anteriores do nosso grupo foi demonstrado a perda da ação vasodilatadora da Ang-(1-7) na aorta torácica de camundongos fêmeas idosas e jovens OVX (COSTA-FRAGA et al., 2018). As diferenças nos resultados dos distintos grupos poderiam ser atribuídas ao tempo de ovariectomia, espécie e idade dos animais e heterogeneidade dos leitos vasculares.

O efeito vasodilatador da Ang-(1-7), via ativação do receptor Mas, já está bem estabelecido, sendo observado em distintas espécies, incluindo camundongos (LEMOS et al., 2005), ratos, coelhos (REN, GARVIN & CARRETERO, 2002) e humanos (SASAKI et al. 2001). Ao se ligar ao receptor Mas, a Ang-(1-7) ativa a via da PI3K/Akt/eNOS/ produzindo NO (SAMPAIO et al., 2007). A Ang-(1-7) também é capaz de induzir o relaxamento de forma independente do NO, através do aumento de cAMP. No presente estudo, observamos que a ação da Ang-(1-7) é dependente de NO, pois ao inibir a NOS, utilizando o L-NAME, o efeito anticontrátil da Ang-(1-7) nos segmentos aórticos foi abolido. Esses achados reforçam uma possível modulação estrogênica sobre a Ang-(1-7). No presente estudo, não foi possível avaliar como a Ang-(1-7) estaria diminuindo a contração vascular mediada pela Fenil na aorta torácica de camundongos no proestro. Possivelmente, o peptídeo, ao se ligar ao receptor Mas, leva ao aumento da biodisponibilidade do NO pelo aumento da expressão ou atividade da eNOS, uma ação bem descrita na literatura (SAMPAIO et al., 2007). Em contrapartida, como a expressão do receptor Mas está diminuída no

grupo OVX quando comparada ao controle, a resposta vascular da Ang-(1-7) ficou comprometida. De fato, a remoção dos ovários levou a uma diminuição na produção *in situ* de NO em aorta estimuladas com a Ang-(1-7).

A diminuição da expressão do receptor Mas pode ser um indicativo de que o E2 poderiam modular a expressão proteica do receptor no tecido vascular. Alterações na expressão proteica do receptor Mas também foram observadas por Costa-Fraga (2018), mas diferentemente dos nossos achados, houve aumento da expressão na aorta de camundongos, contudo os animais utilizados no estudos eram fêmeas idosas. Já em HUVEC, não foram observadas alterações na expressão proteica do receptor Mas quando as mesmas foram tratadas com E2 por 24 horas (MOMPÉON et al., 2015).

Dados não publicados do nosso grupo mostraram que a deleção do receptor Mas em camundongos fêmeas, levou a comprometimento da função cardíaca associada com diminuição da RPT em órgãos como rins, fígado e pele. Em machos a deleção gênica do receptor Mas está relacionada com uma importante disfunção endotelial. Esses dados em conjunto, sugerem que alterações na expressão proteica/gênica do receptor Mas, podem trazer prejuízos para a função vascular.

Dessa maneira, sabendo da ação genômica do E2, especulamos que atue como um modulador da expressão gênica e proteica do receptor Mas por meio da sua ligação ao ERE. Por conseguinte, a ovariectomia levaria a uma modulação negativa do receptor Mas, diminuindo a expressão do receptor e prejudicando a ação da Ang-(1-7). Essa hipótese poderia ser reforçada pelos achados de Mompéon et al. (2015), onde o E2 aumentou a expressão gênica/proteica de componentes do SRA.

Neste sentido, apesar de não termos avaliado as concentrações plasmáticas da Ang-(1-7) nos animais, esse *cross-talk* entre o eixo Ang-(1-7)/receptor Mas e o E2 tem sido evidenciado em outros estudos. Em mulheres saudáveis, as concentrações plasmáticas da Ang-(1-7) são maiores que de homens na mesma idade (SULLIVAN et al., 2015). Em ratas, os níveis séricos de Ang-(1-7) são maiores no proestro e estro, quando comparadas a fase de metaestro e diestro (COSTA et al., 2003). De forma interessante, no mesmo estudo foi observado que a Ang-(1-7) induz aumento nas concentrações de estradiol e progesterona, sendo este efeito abolido quando utilizado o A779, antagonista do receptor Mas.

O E2 exibe propriedades antioxidantes (WHITE et al., 2010) e alguns trabalhos já demonstram que a ovariectomia é capaz de promover o estresse oxidativo vascular (WASSMANN et al., 2001; BORGIO et al., 2016; WANG et al., 2014) e diminuição da oxidação das moléculas de LDL (SACK, RADER & CANNON, 1994; GHAFFARI et al., 2018). Ainda, a ativação do eixo Ang-(1-7)/receptor Mas tem sido relacionada com ações antioxidantes (SANTOS et al., 2013; PERNOMIAN et al., 2014). A produção de EROs faz parte do processo fisiológico celular natural, no entanto, a produção exacerbada das mesmas, pode danificar estruturas celulares e comprometer seu funcionamento (BIRBEN et al., 2012).

A maior parte da produção de EROs na vasculatura, se deve ao complexo enzimático NADPH oxidase (GRIENGLING, SORESCU & USHIO-FUKAI, 2002). No nosso trabalho mostramos que duas subunidades do complexo estão diminuídas na aorta dos animais submetidos a ovariectomia, o gp91 e o p22phox, assim como, a expressão proteica de duas importantes enzimas antioxidantes, a SOD2 e a Catalase. Tais achados, reforçam que a ovariectomia é capaz de modular a expressão de componentes enzimáticos responsáveis pela produção e eliminação de EROs. Contudo, no nosso modelo, aparentemente o equilíbrio redox não foi prejudicado, pois a produção de EROs *in situ* não foi alterada com a ovariectomia. Esse dado, vai de encontro com os resultados funcionais, os quais não foram observados prejuízos na função vascular vasodilatadora.

Com nossos achados é plausível sugerir que duas semanas de ovariectomia bilateral, modula negativamente o eixo Ang-(1-7)/receptor Mas, comprometendo a ação vasodilatadora do peptídeo. De forma interessante, essa modulação estrogênica sobre o eixo, acontece mesmo sem ser detectados prejuízos para a função endotelial. Nossos dados sugerem que a via da Ang-(1-7)/receptor Mas poderia contribuir em fases iniciais para a elevação da incidência de DCVs em mulheres após a menopausa.

## 7 – CONCLUSÃO

Em conjunto, nossos resultados demonstram que duas semanas de ovariectomia em camundongos C57BL/6 não promove remodelamento estrutural, estresse oxidativo vascular e prejuízos na dilatação endotélio dependente. Contudo, a remoção dos ovários diminui na aorta a expressão proteica do receptor Mas e reduz a produção de NO em resposta Ang-(1-7), inibindo o efeito anticontrátil da pré-incubação da Ang-(1-7) em curvas concentração-resposta à Fenil.

Desta forma, propomos que a remoção bilateral dos ovários modula negativamente o eixo Ang-(1-7)/receptor Mas, o que precede até mesmo uma possível disfunção endotelial. Esse mecanismo pode explicar em parte, o aumento da incidência de DCVs em mulheres após a menopausa, visto que pode comprometer o funcionamento do SRA, importante modulador da homeostase cardiovascular.

Embora sejam necessários experimentos adicionais para elucidar os mecanismos envolvidos no *cross-talk* entre o E2 e o eixo Ang-(1-7)/receptor Mas, acreditamos que a pesquisa proposta contribuirá para melhor entendimento do funcionamento do eixo em situações de baixos níveis de E2 e para as discussões a respeito da saúde da mulher e fisiologia cardiovascular.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AINSLIE, D.A. Estrogen deficiency causes central leptin insensitivity and increased hypothalamic neuropeptide Y. *Int J Obes Relat Metab Disord*. v. 25, p. 1680-1688. doi: 10.1038/sj.ijo.0801806

AKAMINE, E.H. et al. Correction of endothelial dysfunction in diabetic female rats by tetrahydrobiopterin and chronic insulin. *Journal of Vascular Research*. v.43, p 309-320. Mai. 2006. doi: 10.1159/000093196.

AKISHITA, M. et al. Estrogen attenuates endothelin-1 production by bovine endothelial cells via estrogen receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v.251, p.17-21, Out. 1998. doi: 10.1006/bbrc.1998.9409

ARNOLD, W. P. et al. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. v. 74, n. 8, p. 3203-3207, Ago. 1977. doi: 10.1073/pnas.74.8.3203

BARTON, M. et al. Twenty years of the G protein-coupled estrogen receptor GPER: historical and personal perspectives. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. v. 176, p. 4-15, Fev. 2018. doi: 10.1016/j.jsbmb.2017.03.021.

BEGHETTI, M. et al. Inhaled NO inhibits platelet aggregation and elevates plasma but not intraplatelet cGMP in healthy human volunteers. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. v. 285, p. H637–H642, Mai. 2003. doi: 10.1152/ajpheart.00622.2002.

BELLINO, F.L. & Wise, P.M. Nonhuman Primate Models of Menopause Workshop. *Biology of reproduction*. v. 68, p. 10–18, Out. 2003. doi: 10.1095/biolreprod.102.005215

BILSEL, A.S. et al. 17Beta-estradiol modulates endothelin-1 expression and release in human endothelial cells. *Cardiovascular Research*. v.46, p.579-584, Jun.,2000. doi: 10.1016/S0008-6363(00)00046-8

BIRBEN, E. et al. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ*. v.5, p. 9-19, Jan. 2012. doi: 10.1097/WOX.0b013e3182439613

BLAUSTEIN, J. D. Effects of Ovariectomy and Estradiol on Body Weight and Food Intake in Gold Thioglucose-Treated Mice. *Physiology & Behavior*. v. 17, p. 1027-1030, Dez. 1976. doi: 10.1016/0031-9384(76)90028-7

BLOCK, C.H. et al. Immunocytochemical localization of angiotensin-(1-7) in the rat forebrain. *Peptides*. v.9, p. 1395-1401, Nov.1988.

BORGO, M.V. Hormonal therapy with estradiol and drospirenone improves endothelium-dependent vasodilation in the coronary bed of ovariectomized spontaneously hypertensive rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v.49, Jan. 2016. doi: 10.1590/1414-431X20154655

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, p.248-254,1976.

BRAGA, V.A.V.N. et al. Aerobic Exercise Training Prevents the Onset of Endothelial Dysfunction via Increased Nitric Oxide Bioavailability and Reduced Reactive Oxygen Species in an Experimental Model of Menopause. *PLoS One*. v.10, Abr. 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0125388.

BRETT, D.S. & SNYDER, SH. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. Annual Review of Biochemistry. v.63, p. 175-195,1994. doi: 10.1146/annurev.bi.63.070194.001135.



BROSNIHAN, K.B. et al. Bi-directional actions of estrogen on the renin-angiotensin system. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v. 32, p. 373-381, Abr. 1999. doi: 10.1590/S0100-879X1999000400001

BROSNIHAN, K.B. LI, P. & FERRARIO, C.M. Angiotensin-(1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. *Hypertension*. v. 27, p. 523-528, Mar. 1996. doi: 10.1161/01.hyp.27.3.523.

CAPETTINI, L.S. CORTES, S.F & LEMOS, V.S. Relative contribution of eNOS and nNOS to endothelium-dependent vasodilation in the mouse aorta. *European Journal of Pharmacology*. v. 643, p. Set. 2010. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.06.066.

CARMINA, E. & LOBO, A. Evaluation of Hormonal Status. *Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management*. p. 801-823, 2009. doi: 10.1016/B978-1-4160-4907-4.00032-2

CARVALHO, M.H.C. et al. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. *Revista Brasileira de Hipertensão*. v. 8, p. 76-88, Mar., 2001.

CLAUDIO, E.R.G. et al. Swimming training prevents coronary endothelial dysfunction in ovariectomized spontaneously hypertensive rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v. 50, Nov., 2017. doi: 10.1590/1414-431X20165495

COLA, M.S. et al. Endothelial dysfunction of resistance vessels in female apolipoprotein E-deficient mice. *Lipids Health Disease*. v.19, p.9-51, mai., 2010. doi: 10.1186/1476-511X-9-51.

COSTA-FRAGA, F.P. et al. Age-related changes in vascular responses to angiotensin-(1-7) in female mice. *Journal of the Renin-Angiotensin- Aldosterone System*. p. 1 10, set., 2018. doi: 10.1177/1470320318789332

COUTO, G.K. et al. Enhanced nitric oxide bioavailability in coronary arteries prevents the onset of heart failure in rats with myocardial infarction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. v.86, p. 110-120, Jul. 2015. doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.07.017

CRAWFORD, S. L. & JOHANNES, C. B. The Epidemiology of Cardiovascular Disease in Postmenopausal Women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. v.84, p.1803-1812, Jun, 1999. doi: 10.1210/jcem.84.6.5765-4

DALAL, P. K. & AGARWAL, M. Postmenopausal syndrome. *Indian Journal of Psychiatry*. v. 57, p. S222-S232, Jul. 2015. doi: 10.4103/0019-5545.161483

DARBLADE, B. et al. Estradiol Alters Nitric Oxide Production in the Mouse Aorta Through the  $\alpha$ -, but not  $\beta$ -, Estrogen Receptor. *Circulation Research*. v. 90, p. 413-419, Mar. 2002. doi: 10.1161 / hh0402.105096

DANSER, A.H. et al. Determinants of interindividual variation of renin and prorenin concentrations: evidence for a sexual dimorphism of (pro)renin levels in humans. *Journal of Hypertension*. v. 16, p.853-862, Jun. 1998.

DESCHEPPER, C.F. Angiotensinogen: hormonal regulation and relative importance in the generation of angiotensin II. *Kidney International*, v. 46, p. 1561-1563, Dez., 1994.

DONOGHUE, M. *et al.* A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circulation Research*. v.87, p.1-9, Set., 2000.

DOSI, R. et al. Cardiovascular Disease and Menopause. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. v.8, p. 62-64, Feb., 2014. doi: 10.7860/JCDR/2014/6457.4009

DUBEY, R. K. Phytoestrogens Inhibit Growth and MAP Kinase Activity in Human Aortic Smooth Muscle Cells. *Hypertension*. v.33, 177–182, Jan. 1999. doi: <https://doi.org/10.1161/01.HYP.33.1.177>

ENDLICH, P.W. et al. Exercise modulates the aortic renin-angiotensin system independently of estrogen therapy in ovariectomized hypertensive rats. *Peptides* 87 (2017) 41–49. doi: 10.1016/j.peptides.2016.11.010

FABRICIO, V. et al. Resveratrol Treatment Normalizes the Endothelial Function and Blood Pressure in Ovariectomized Rats. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*. 2017. v. 108, p. 116-121, Fev. 2017. doi: 10.5935/abc.20170012.

FAISAL-CURY, A. & ZACCHELLO, K. P. Osteoporose: prevalência e fatores de risco entre mulheres > 49 anos de idade em ambiente de consultório particular. *Acta Ortopédica Brasileira*. v.15, n.3, 2007.

FELDMER, M. et al. Glucocorticoid- and estrogen-responsive elements in the 5'-flanking region of the rat angiotensinogen gene. *Journal of Hypertension*. v.9, p. 1005-1012, Nov. 1991.

FERRARIO, C. M & CHAPPELL M.C. Novel angiotensin peptides. *Cellular and Molecular life Sciences*. v.61, p.2720, nov., 2004. doi: 10.1007/s00018-004-4243-4

FERRARIO, C.M. et al. Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). *Hypertension*. v.30, p.545-541, Sep., 1997.

FERRARIO, C.M. et al. Novel angiotensin peptides regulate blood pressure, endothelial function, and natriuresis. *Journal of the American Society of Nephrology*. v.9, p.1716-1722, sep.1998.

FREEMAN, E. W. et al. Symptoms in the menopausal transition: hormone and behavioral correlates. *Obstetrics & Gynecology*. v. 111, n. 1, Jan. 2008. doi: 10.1097/01.AOG.0000295867.06184.b1.

FULTON, D. et al. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature*. v. 399, n. 10, p. 597-601, Jun. 1999. doi: 10.1038/21218

FURCHGOTT, R. F. & ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. v. 288, p. 373-376, Nov. 1980.

FURCHGOTT, R.F. & VANHOUTTE, P.M. Endothelium-Derived Relaxing and Contracting Factors. *Journal of Cellular Biochemistry. The FASEB Journal*. v.3, n.9, p.2007-2018, Jul. 1989.

GALANDRIN, S. et al. Cardioprotective angiotensin-(1-7) peptide acts as a natural-biased ligand at the angiotensin II type 1 receptor. *Hypertension*. v.68, p.1365 – 1374, Dez. 2016. Doi 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.08118

GAMEIRO, C. & ROMAO. F. Changes in the immune system during menopause and aging. *Frontiers in Bioscience*. p.1299-1303, Jun. 2010.

GHAFFARI, S. et al. Estrogen Inhibits LDL (Low-Density Lipoprotein) Transcytosis by Human Coronary Artery Endothelial Cells via GPER (G-Protein–Coupled Estrogen Receptor) and SR-BI (Scavenger Receptor Class B Type 1). *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. v.38, n.10, p. 2283–2294, Jul. 2018. doi: 10.1161/ATVBAHA.118.310792.

GOLDMAN, J.M. MURR, A. S. & COOPER, R.L. The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and Its Utility in Toxicological Studies. *Birth Defects Research*. v. 80, p. 84-97, 2007

GONZALES, R. J.; WALKER, B. R. & KANAGY, N. L. 17 $\beta$ -Estradiol increases nitric oxide-dependent dilation in rat pulmonary arteries and thoracic aorta. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. v. 280, p. 555-564, 2001. doi: 10.1152/ajplung.2001.280.3.L555

GOSDEN, R.G. Imminent Oocyte Exhaustion and Reduced Follicular Recruitment Mark the Transition to Acyclicity in Aging C57BL/6J Mice. *Biology of Reproduction*. v. 28, n. 2, p. 255-260, Mar. 1983. doi: 10.1095/biolreprod28.2.255

GRIENGLING, K. K. SORESCU, D. & USHIO-FUKAI, M. NAD(P)H Oxidase Role in Cardiovascular Biology and Disease. *Circulation Research*. v.86, p. 494 -501, Mar. 2000. doi: 10.1161 / 01.res.86.5.494

GRIENGLING, K.K.; MURPHY, T.J. & ALEXANDER, R.W. Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Circulation*, v.87, p.1816, Jun.,1993.

GROBE, J. L. & KATOVICH, M. J. Alterations in aortic vascular reactivity to angiotensin 1–7 in 17- $\beta$ -estradiol-treated female SD rats. *Regulatory Peptides*. v.133, p. 62-67, Jan., 2006. doi: 10.1016/j.regpep.2005.09.018

GRYGLEWSKI, R.J. PALMER, R.M. & MONCADA, S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature*. v. 320, p. 454-456, Abr. 1986. doi: 10.1038/320454a0

HAYASHI, T. Basal release of nitric oxide from aortic rings is greater in female rabbits than in male rabbits: Implications for atherosclerosis. *Proc. Proceedings of the National Academy of Sciences*. v. 89, p. 11259-11263, Dez., 1992. doi: 10.1073/pnas.89.23.11259

HEITSCH, H. et al. Angiotensin-(1-7)-Stimulated Nitric Oxide and Superoxide Release From Endothelial Cells. *Hypertension*. v.37, p.72-76, Jan., 2001.

HERNANDEZ, I. et al. 17beta-estradiol prevents oxidative stress and decreases blood pressure in ovariectomized rats. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. v.279, p.1599-1605, Nov., 2000. doi: 10.1152/ajpregu.2000.279.5.R1599

IGNARRO, L.J. Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties. *The FASEB Journal*. v.3, p. 31-36. 1989.

ISENSEE, J. et al. Expression Pattern of G Protein-Coupled Receptor 30 in LacZ Reporter Mice. *Endocrinology*. v. 150, n. 4, Abr. 2009. doi: 10.1210/en.2008-1488.

IWAKURA, A. et al. Estrogen-mediated, endothelial nitric oxide synthase-dependent mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells contributes to reendothelialization after arterial injury. *Circulation*. v.108, p.3115-3121, Dez. 2003. doi: 10.1161/01.CIR.0000106906.56972.83

KAHONEN, M. et al. Influence of gender on control of arterial tone in experimental hypertension. *American Physiological Society*. v. 275, p.15-22, Jul., 1998. doi: 10.1152/ajpheart.1998.275.1.H15

KANG, L. S. Aging and estrogen alter endothelial reactivity to reactive oxygen species in coronary arterioles. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. v. 300, p. H2105-15, Jun., 2011. doi:10.1152/ajpheart.00349.2010

KANNEL, W. et al. Menopause and risk of cardiovascular disease: The framingham study. *Obstetrical & Gynecological Survey*. v.32(4), p. 239–242, 1977. doi:10.1097/00006254-197704000-00018

KARAS, R.H., PATTERSON, BL & MENDELSON, M.E. Human Vascular Smooth Muscle Cells Contain Functional Estrogen Receptor. *Circulation*. v. 89, n. 5, p. 1943-1950, mai.1994. doi: 10.1161/01.cir.89.5.1943

KAUSER, K. & RUBANYI, G. M. Gender difference in bioassayable endothelium-derived nitric oxide from isolated rat aortae. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. v. 267(6), p. 2311– 2317, 1994. doi: 10.1152/ajpheart.1994.267.6.H2311

KILIM, S.R. & CHANDALA, S.R. Comparative Study of Lipid Profile and estradiol in Pre- and Post-Menopausal Women. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. v.7(8), p.1596-1598, Ago. 2013. doi: 10.7860/JCDR/2013/6162.3234

KIM-SCHULZE, S. Expression of an Estrogen Receptor by Human Coronary Artery and Umbilical Vein Endothelial Cells. *Circulation*. v. 94, n.6, p. 1402–1407, Set. 1996. doi: <https://doi.org/10.1161/01.CIR.94.6.1402>

KRASINSKI, K. et al. Estradiol accelerates functional endothelial recovery after arterial injury. *Circulation*. v.95, p. 1768-1772, Abr. 1997. doi: 10.1161/01.CIR.95.7.1768

KUCHAN, M.J. & FRANGOS, J.A. Role of calcium and calmodulin in flow-induced nitric oxide production in endothelial cells. *American Journal of Physiology*. v. 266, p. 628-636, Mar. 1994. doi: 10.1152/ajpcell.1994.266.3.C628

KUIPER, G.G.J. M. et al. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. v. 93(2), p. 5925–5930, Jun. 1996. doi: 10.1073/pnas.93.12.5925

KUMAR, S. et al. Role of estrogen receptors in pro-oxidative and anti-oxidative actions of estrogens: a perspective. *Biochimica et Biophysica Acta*. v.1800, p. 1127-1135, Out. 2010. doi: 10.1016/j.bbagen.2010.04.011

KVINGEDAL, A.M & SMELAND, E. B. A novel putative G-protein-coupled receptor expressed in lung, heart and lymphoid tissue. *FEBS Letters*. v. 407, p.59-62, Fev. 1997. doi: 10.1016/s0014-5793(97)00278-0

LEMINI, C. et al. Ovariectomy differential influence on some hemostatic markers of mice and rats. *Experimental Animals*. v. 64, n. 1, p.81–89, 2015. doi: 10.1538/expanim.14-0052

LEMOS, V.S. et al. The Endothelium-Dependent Vasodilator Effect of the Nonpeptide Ang(1–7) Mimic AVE 0991 Is Abolished in the Aorta of Mas-Knockout Mice. *Journal of*

Cardiovascular Pharmacology. v.46, p.274-279, Set. 2005. doi: 10.1097/01.fjc.0000175237.41573.63

LEMOS, V.S. et al. Angiotensin-(1-7) is involved in the endothelium-dependent modulation of phenylephrine-induced contraction in the aorta of mRen-2 transgenic rats. *British Journal of Pharmacology*. v. 135, p. 1743-1748, Abr. 2002. doi: 10.1038/sj.bjp.0704630

LEVIN, E.R & HAMMES, S.R. Nuclear receptors outside the nucleus: extranuclear signalling by steroid receptors. *Nature reviews – Molecular cell biology*. v.17(12), p.783-797, Out. 2016. doi: 10.1038/nrm.2016.122

LIU, M.Y. et al. Alterations in EDHF-mediated hyperpolarization and relaxation in mesenteric arteries of female rats in long-term deficiency of oestrogen and during oestrus cycle. *British Journal of Pharmacology*. v. 132, p. 1035-1046, Mar. 2001. doi: 10.1038/sj.bjp.0703899

MAAS, A.H.E.M. & APPELMAN, Y.E.A. Gender differences in coronary heart disease. *Netherlands Heart Journal*. v.18, n.12, Dez. 2010.

MAIFRINO, L.B.M. et al. Avaliação de Fibras de Colágeno, MMP2, MMP9, 8-OH-Dg e apoptose na aorta de ratas LDL nocaute ovariectomizadas submetidas a exercício aeróbico. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*. v.112, p. 180-188, Dez. 2018. doi: 10.5935/abc.20180263.

MACRITCHIE, A.N. et al. Estrogen upregulates endothelial nitric oxide synthase gene expression in fetal pulmonary artery endothelium. *Circulation Research*. v.81, p.355-362, Set.1997. doi: 10.1161/01.res.81.3.355

MARCONDES, F. K. BIANCHI, F. J. & TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology*. v. 62, n.4, Nov. 2002. doi: 10.1590/S1519-69842002000400008



MAYER, L.P. et al. Long-term effects of ovarian follicular depletion in rats by 4-vinylcyclohexene diepoxide. *Reproductive Toxicology*. v.16, p.775-781, Dez. 2002

MCKINNEY, C.A. Angiotensin-(1–7) and angiotensin-(1–9): function in cardiac and vascular remodeling. *Clinical Science*. v. 126, p. 815 – 827, 2014. doi: 10.1042/CS20130436

MENAZZA S. & MURPHY, E. The Expanding Complexity of Estrogen Receptor Signaling in the Cardiovascular System. *Circulation Research*. v.118, p.994-1007, Mar.,2016. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.305376

MENDELSON, M. E. & KARAS, R. H. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *The New England Journal of Medicine*. v.340, p. 1801-1811, Jun., 1999. doi: 10.1056/NEJM199906103402306

MEYER, M.R. et al. G Protein-coupled Estrogen Receptor Protects from Atherosclerosis. *Scientific reports*. v.4: 7564, Dez., 2014. doi: 10.1038/srep07564

MIGNERY, G.A. & SUDHOF, T. C. The ligand binding site and transduction mechanism in the inositol-1,4,5-triphosphate receptor. *The EMBO Journal*. v.9, n.12, p.3893-3898, Dez. 1990.

MIKKOLA, T.S. Sex Differences in Age-Related Cardiovascular Mortality. *Public Library of Science*. v.8, p. e63347, Mai. 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0063347

MILLER, B.H. & TAKAHASHI, J. S. Central circadian control of female reproductive function. *Frontiers endocrinology*. v.4, Jan. 2014. doi: 10.3389/fendo.2013.00195

MILLER, V. M. & DUCKLES, S. P. Vascular actions of estrogens: functional implications. *Pharmacological Reviews*. v.60, p.210-241, Jun.,2008. doi: 10.1124/pr.107.08002

MIZUNO, Y. et al. Myosin light chain kinase activation and calcium sensitization in smooth muscle in vivo. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. v. 295, p. 358-364, Jun. 2008. doi: 10.1152/ajpcell.90645.2007

MOMPÉON, A. et al. Estradiol, acting through ER $\alpha$ , induces endothelial non-classic renin-angiotensin system increasing angiotensin 1-7 production. *Molecular and Cellular Endocrinology*. v.422, p.1-8, Feb., 2016. doi: 10.1016/j.mce.2015.11.004.

MORSELLI, E. et al. The effects of o estrogens and their receptors on cardiometabolic health. *Nature Reviews Endocrinology*. v. 13, p. 352-354, Jun. 2017. doi: 10.1038/nrendo.2017.12

MOSSELMAN, S. POLMAN, J. & DIJKEMA, R. ER $\beta$ : identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Letters*. v. 392, p. 49-53, Mai. 1996. doi: 10.1016/0014-5793(96)00782-x

NASCIMENTO, B.R. et al. Cardiovascular Disease Epidemiology in Portuguese-Speaking Countries: data from the Global Burden of Disease, 1990 to 2016. *Arquivos brasileiroS de cardiologia*. v.110, n.6, p.500-511, 2018. doi: 10.5935/abc.20180098.

NAWATE, S. et al. Reciprocal changes in endothelium-derived hyperpolarizing factor-and nitric oxide-system in the mesenteric artery of adult female rats following ovariectomy. *British Journal of Pharmacology*. v.144, p. 178-189, Jan. 2005. doi: 10.1038/sj.bjp.0706091

NEVES, L. A. A. et al. Vascular Responses to Angiotensin-(1-7) During the Estrous Cycle. *Endocrine*. v. 24, p. 161-165, Jul., 2004. doi: 10.1385/ENDO:24:2:161

NEVZATI, E. et al. Estrogen Induces Nitric Oxide Production Via Nitric Oxide Synthase Activation in Endothelial Cells. *Neurovascular Events After Subarachnoid Hemorrhage*. p. 141-145. 2014. doi: 10.1007/978-3-319-04981-6\_24

OLSON, M.E & BRUCE, J. Ovariectomy, Ovariohysterectomy and Orchidectomy in Rodents and Rabbits. *Canadian Veterinary Journal*. v. 27, n. 12, Dez. 1986.

OWEN, J.J. Physiology of the menstrual cycle. *The American Journal of Clinical Nutrition*. v. 28, Abr. 1975. doi: 10.1093/ajcn/28.4.333

PARDHE, B.D. et al. Elevated Cardiovascular Risks among Postmenopausal Women: A Community Based Case Control Study from Nepal. *Biochemistry Research International*. Mai. 2017. doi: 10.1155/2017/3824903.

PARIKH, I. et al. Are estrogen receptors cytoplasmic or nuclear? Some immunocytochemical and biochemical studies. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. v. 27, p. 185-192, 1987.

PAUL, M. MEHR, A. P. & KREUTZ, R. Physiology of Local Renin-Angiotensin Systems. *Physiological Reviews*. v.86, p.747–803, 2006. doi: 10.1152/physrev.00036.2005

PELVIPHARM. A preclinical model of menopause: the ovariectomized female rat. 2001.

PEIRÓ, C. et al. Complete blockade of the vasorelaxant effects of angiotensin-(1–7) and bradykinin in murine microvessels by antagonists of the receptor Mas. *The Journal of Physiology*. v.591, p. 2275-2285, Mai. 2013. doi: 10.1113/jphysiol.2013.251413

PERSSON, P.B. Renin: origin, secretion and synthesis. *The Journal of Physiology*. v. 552, p. 667-671, Nov., 2003. doi: 10.1113/jphysiol.2003.049890

RADOMSKI, M.W. PALMER, R.M.J. & MONCADA, S. Characterization of the L-arginine: nitric oxide pathway in human platelets. *British Journal of Pharmacology*. v. 101, n.2, p. 325-328, Out. 1990. doi: 10.1111/j.1476-5381.1990.tb12709.x

REN, Y. GARVIN, J.L. & CARRETERO, O. A. Vasodilator Action of Angiotensin-(1-7) on Isolated Rabbit Afferent Arterioles. *Hypertension*. v. 39, p. 799–802, Mar. 2002. doi: 10.1161/hy0302.104673

RICE, G.I. et al. Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. *Biochemical Journal*. v.383, p. 45-51, Oct., 2004. doi: 10.1042/BJ20040634

ROELFSEMA, F. YANK, R. & VELDHUIS, J.D. Differential Effects of Estradiol and Progesterone on Cardiovascular Risk Factors in Postmenopausal Women. *Journal of the Endocrine Society*. v.2, p.704-805, Jul. 2018. doi: 10.1210/js.2018-00073

ROSSOUW, J.E. et al. Postmenopausal hormone therapy and risk of cardiovascular disease by age and years since menopause. *Journal of the American Medical Association*. v.297, p. 1465-1477, apr., 2007. doi: 10.1001/jama.297.13.1465

ROSSOUW, J.E. et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the women's health initiative randomized controlled trial. *Journal of the American Medical Association*. v.288, p. 321–333, Jul., 2002.

RUSSELL, K. S. et al. Human vascular endothelial cells contain membrane binding sites for estradiol, which mediate rapid intracellular signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. v. 23, p.5930-5935, Mai. 2000. doi: 10.1073/pnas.97.11.5930

SACK, M.N. RADER, D.J & CANNON, R.O. O estrogen and inhibition of oxidation of low-density lipoproteins in postmenopausal women. *The Lancet*. v.343, p. 269-270, Jan.1994.

SANCHEZ, A. The effect of ovariectomy on depressed contractions to phenylephrine and KCl and increased relaxation to acetylcholine in isolated aortic rings of female

compared to male rabbits. *British Journal of Pharmacology. British Journal of Pharmacology*. v.118, p. 2017-2022,1996.

SANTOS, R. A. et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. v.100, p. 8258-8263, Jun., 2003. doi: 10.1073/pnas.1432869100

SANTOS, R. A. et al. Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system. *Journal of Endocrinology*. v.216, p. R1-R17, jan., 2013. doi: 10.1530/JOE-12-0341

SANTOS, R. A. et al. Production of angiotensin-(1-7) by human vascular endothelium. *Hypertension*. v. 19, p. 56-61, Fev. 1992. doi: 10.1161/01.hyp.19.2\_suppl.ii56.

SAVERGNINI, S.Q. Effects of short-term administration of estradiol on reperfusion arrhythmias in rats of different ages. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v.45, p.1248-1254, Dez. 2012. doi: 10.1590/S0100-879X2012007500169

SASAKI, S. et al. Angiotensin-(1-7) induces endothelium-independent vasodilation in normotensive control subjects and essential hypertensive patients. *Hypertension*. v. 38, p. 90-94. 2001.

SEGREDO, A. et al. Ovariectomy Increases the Participation of Hyperpolarizing Mechanisms in the Relaxation of Rat Aorta. *Plos One*. v.8, Set., 2013.

SENER, A. & SMITH, F.G. Nitric oxide modulates arterial baroreflex control of heart rate in conscious lambs in an age-dependent manner. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. v. 280, p. 2255–2263, 2001. doi: 10.1152/ajpheart.2001.280.5.H2255

SHEN, H.H. et al. Estrogen Deficiency Modifies Matrix Metalloproteinases Activity and Vascular Function of Mesenteric Arteries in Female Rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v. 37, p. 61-58, 2017. doi: 10.4103/jmedsci.jmedsci\_100\_16

SHERMAN, T.S. et al. Estrogen Acutely Activates Prostacyclin Synthesis in Ovine Fetal Pulmonary Artery Endothelium. *Am J Respir Cell Mol Biol.* v.26, p. 610-616, Mai. 2002. doi: '10.1165/ajrcmb.26.5.4528

SIMONCINI, T. et al. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature.* v. 28, p. 538-541, Set. 2000. doi: 10.1038/35035131

SIMONCINI, T. RABKIN, E. & LIAO, J.K. Molecular Basis of Cell Membrane Estrogen Receptor Interaction With Phosphatidylinositol 3-Kinase in Endothelial Cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* v. 23, p. 198–203, Dez. 2002. doi: 10.1161/01.ATV.0000053846.71621.93

SOBRINO, A. et al. Estradiol selectively stimulates endothelial prostacyclin production through estrogen receptor-(alpha). *Journal of Molecular Endocrinology.* v.44, p.237-246, Abr.,2010. doi: 10.1677/JME-09-0112

SPEROFF, L. The Heart and Estrogen: progestin Replacement Study (HERS). *The European menopause Journal.* v. 31, p. 9 -14, 1998.

SQUADRITO, F. et al. Genistein supplementation and estrogen replacement therapy improve endothelial dysfunction induced by ovariectomy in rats. *Cardiovascular Research.* v.45, p.454-462, Jan., 2000.

STILLWELL, W. An Introduction to Biological Membranes - Chapter 20 - Bioactive Lipids. Elsevier. v.2, p. 453-478. 2016. doi: 10.1016/B978-0-444-63772-7.00020-8.

SULLIVAN, J. C. et al. Differences in angiotensin (1–7) between men and women. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology.* v. 308, mai., 2015. doi: 10.1152/ajpheart.00897.2014

TADDEI, S. et al. Menopause is associated with endothelial dysfunction in women. *Hypertension*. v. 28, p. 566-582, Oct., 1996.

The Women's Health Initiative Study Group (WHI). Design of the Women's Health Initiative Clinical Trial and Observational Study. *Controlled Clinical Trials*. v. 19, p. 61–109, 1998.

TOFT, D. & GORSKI, J. A Receptor Molecule for Estrogens: Isolation from the Rat Uterus and Preliminary Characterization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v.55, n. 55, p. 1574-1581, Jun. 1966. doi: 10.1073/pnas.55.6.1574

TOSTES, R.C. et al. Effects of estrogen on the vascular system. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v.36, p.1143-1158, Sep., 2003; doi: 10.1590/S0100-879X2003000900002

UTIAN, W. H. The International Menopause menopause-related terminology Society definitions. *Climateric*. v. 2, p. 284-286. 1999. doi: 10.3109/13697139909038088

VENKOV, C.D. RANKIN, A.B. & VAUGHAN, D.E. Identification of authentic estrogen receptor in cultured endothelial cells. A potential mechanism for steroid hormone regulation of endothelial function. *Circulation*. v. 94, n.4, p. 727-733, Ago. 1996. doi: 10.1161/01.cir.94.4.727

VICKERS, C. et al. Hydrolysis of Biological Peptides by Human Angiotensin-converting Enzyme-related Carboxypeptidase. *Journal of Biological Chemistry*. Abr., 2002. doi: 10.1074/jbc.M200581200

VRTACNIK, P. et al. The many faces of estrogen signaling. *Biochemia Medica*. v. 24(3), p. 329-342, 2014. doi: 10.11613/BM.2014.035

WAKATSUKI, A.; IKENOUE, N and SAGARA, Y. Effect of estrogen on the size of low-density lipoprotein particles in postmenopausal women. *Obstetrics & Gynecology*. v.90, p.22-25, Jul., 1997. doi: 10.1016/S0029-7844(97)00140-3

SAMPAIO, W.O. et al. Angiotensin-(1-7) Through Receptor Mas Mediates Endothelial Nitric Oxide Synthase Activation via Akt-Dependent Pathways. *Hypertension*. v.49, p. 185-192, Jan. 2007. doi: 10.1161/01.HYP.0000251865.35728.2

WANG, D. et al. Endothelial dysfunction and enhanced contractility in microvessels from ovariectomised rats: roles of oxidative stress and perivascular adipose tissue. *Hypertension*. v. 63(5), p. 1063-1069, mai., 2014. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02284

WASSMANN, S. et al. Endothelial Dysfunction and Oxidative Stress During Estrogen Deficiency in Spontaneously Hypertensive Rats. *Circulation*. v. 103(3), p. 435-441, Jan. 2001. doi: 10.1161/01.cir.103.3.435

WEBB, R.C. Smooth muscle contraction and relaxation. *Advances in Physiology Education*. v.27, p. 201-206, Dez. 2003. doi: 10.1152/advan.00025.2003

WHITE, R.E. et al. Estrogen and oxidative stress: A novel mechanism that may increase the risk for cardiovascular disease in women. *Steroids*. v.75, p. 788-793, Nov. 2010. doi: 10.1016/j.steroids.2009.12.007

WIDDER, J. Improvement of Endothelial Dysfunction by Selective Estrogen Receptor- $\beta$  Stimulation in Ovariectomized SHR. *Hypertension*. v.42, p. 991-996, Nov., 2003. doi: 10.1161/01.HYP.0000098661.37637.89

WISE, P.M. & RATNER, A. Effect of Ovariectomy on Plasma LH, FSH, Estradiol, and Progesterone and Medial Basal Hypothalamic LHRH Concentrations in Old and Young Rats. *Neuroendocrinology*. v.30, p.15-19, 1980. doi: 10.1159/000122968

WITTEMAN, J.C. M. Increased Risk of Atherosclerosis In Women After The Menopause. *BMJ: British Medical Journal*. v.298, p. 642-644, Mar.1989.



World Health Organization (WHO). Global action plan for the prevention and control of noncommunicable diseases 2013-2020. *Who library cataloguing-in-publication data*, 2013.

World Health Organization (WHO). The top 10 causes of death., 2016.

ZAMORANO, B. BRUZZONE, M. E. & MARTINEZ, J. L. Vascular in Smooth Muscle Reactivity to Norepinephrine Ovariectomized Rats: Relationship to Vascular PGE2/PGF2a Ratio. *General Pharmacology*. v.26, p. 1613-1618, Nov.,1995.

ZAPATER, P. et al. Gender Differences in Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) Activity and Inhibition by Enalaprilat in Healthy Volunteers. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. v.43, p. 737-744, Mai. 2004. doi: 10.1097/00005344-200405000-00018

ZHU, Y. et al. Abnormal Vascular Function and Hypertension in Mice Deficient in Estrogen Receptor  $\beta$ . *Science*. v. 295, p. 505-508, Jan., 2002. doi: 10.1126/science.1065250