

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Departamento de Fisiologia
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

**EFEITO DO TRATAMENTO COM ESTRADIOL SOBRE O CONTROLE DA
PRESSÃO ARTERIAL E O ESTRESSE OXIDATIVO**

CRISTINA CAMPOS CARRARO

Orientadora: Dra KATYA RIGATTO

Co-orientadora: Dra ADRIANE BELLÓ-KLEIN

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, área de concentração: Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas-Fisiologia.

Porto Alegre, Março de 2012

“Tudo vem para quem age enquanto espera”.

Thomas Edison

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelas bênçãos a mim concedidas, sendo uma delas a conclusão deste doutorado. E por me presentear com suas palavras que são lâmpadas para os meus pés e luz para os meus caminhos.

À minha orientadora Dra Katya Rigatto por mostra-me o caminho do doutorado, pelos momentos de aprendizado, pela atenção e por sua confiança no meu trabalho.

À minha co-orientadora Dra Adriane Belló-Klein, pelo exemplo como pesquisadora, por sua serenidade e atenção que proporcionaram a oportunidade deste aprendizado, e pelo eterno compromisso com o desenvolvimento da ciência e daqueles que nela acreditam.

À professora Suzana Llessuy, pela amizade, pelas orientações, e por todas as suas contribuições e ensinamentos.

Aos amigos Dra Carmem Luíza Sartório, Dra Karina Rabello Casali e professor Alex Sander da Rosa Araújo pelas indispensáveis colaborações para a tese e por sua maneira atenciosa e delicada de contribuir para o meu desenvolvimento pessoal.

Aos colegas Tânia, Dhâniel e Adriana por estarem sempre dispostos e prontos para ajudar e por me auxiliarem na realização dos experimentos.

Aos meus pais pelo amor, pelo incentivo e por sempre acreditarem em mim.

Ao Marcelo, meu marido, um grande incentivador, pelo amor, carinho, apoio, paciência e ajuda em todos os momentos.

À minha linda e amada filhinha, Isabella, por trazer mais alegria à minha vida.

Aos professores da banca de defesa da tese: obrigada por aceitarem prontamente o convite.

E a todos que colaboraram, direta e indiretamente, pela elaboração deste trabalho.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS	X
RESUMO	XII
ABSTRACT	XIV
1- INTRODUÇÃO	1
1.1- Importância da Terapia hormonal	2
1.2- Papel do Estrogênio na Regulação da Pressão Arterial	4
1.3- Estrogênio e endotélio	5
1.4- Papel do estrogênio como antioxidante	7
1.5- Equilíbrio NO/EROS	9
1.6- O sistema renina-angiotensina e o estrogênio	10
1.7- Papel do estrogênio sobre o sistema nervoso simpático e parassimpático.	11
1.8- Análise do domínio da frequência	12
2-HIPÓTESES	14
3-OBJETIVOS	15
3.1-Objetivo geral	15
3.2-Objetivos específicos	15
4- METODOLOGIA	16
4.1- Animais	16

4.2- Procedimentos Experimentais	16
4.3- Ovariectomia	17
4.4- Protocolos experimentais	17
4.4.1- Protocolo I	17
4.4.2- Protocolo II	18
4.4.3- Protocolo III	18
4.5- Cateterização	18
4.6-Avaliações hemodinâmicas	19
4.6.1- Registro de pressão arterial e processamento de sinais	19
4.6.2- Infusão de Angiotensina II e Losartan	20
4.6.3- Registro da pressão intraventricular	20
4.7- Análise Espectral	21
4.8- Remoção e preparo de órgãos e tecidos	22
4.9- Preparo dos homogeneizados	22
4.9.1- Homogeneizado de coração	22
4.9.2- Homogeneizado de aorta	23
4.10- Avaliações bioquímicas	24
4.10.1- Medidas Hormonais	24
4.10.2- Dosagem da concentração de peróxido de hidrogênio	24
4.10.3- Determinação da concentração de glutathiona reduzida e oxidada	24
4.10.4- Nitritos totais	25
4.10.5- Determinação da atividade das NADH e NADPH oxidases	25
4.10.6- Determinação das atividades das enzimas antioxidantes	25

4.10.7- Capacidade antioxidante total (TRAP)	26
4.10.8- Determinação da concentração de ânion superóxido	27
4.11- Análise por “Western Blot”	27
4.12- ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
5- RESULTADOS	30
5.1- Ovariectomia e TE	30
5.2- Resultados obtidos no protocolo I	31
5.2.1 - Pressão arterial e frequência cardíaca basais, e efeitos da administração de angiotensina II e do bloqueio do receptor AT1	31
5.2.2 - Avaliações autonômicas	32
5.2.3 - Atividades da NADH oxidase, NADPH oxidase e nitritos totais	34
5.3 - Resultados obtidos no protocolo II	35
5.3.1 - Parâmetros hemodinâmicos	36
5.3.2 - Avaliação autonômica	36
5.3.3 – Concentração de peróxido de hidrogênio	37
5.3.4 - Metabolismo da glutatona	38
5.3.5 - Concentração de ânion superóxido	39
5.3.6 - TRAP e atividade das enzimas antioxidantes	40
5.3.7- Relação entre TRAP e HRV	40
5.4- Resultados obtidos no protocolo III	41
5.4.1 - Avaliação hemodinâmica	41
5.4.2 - Avaliação autonômica	42

5.4.3 - Concentração de peróxido de hidrogênio	43
5.4.4 - Determinação da glutathiona reduzida e oxidada	44
5.4.5 - Nitritos totais	45
5.4.6 - Atividade da enzima NADPH Oxidase	45
5.4.7 - Expressão protéica de Gp91phox, Trx e p-Akt/Akt total	46
6- DISCUSSÃO CONCLUSIVA	49
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
ANEXOS	69
Anexo I: Artigo referente ao protocolo I	69
Anexo II: Artigo referente ao protocolo II	96
Anexo III: Artigo referente ao protocolo III	125

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Formação e degradação de NO e EROS.	6
Figura 2: Apresentação do eixo elaborado a partir dos protocolos desenvolvidos	31
Figura 3: Eixo esquemático apresentando o protocolo I.	31
Figura 4: Atividade da NADH Oxidase em aorta.	35
Figura 5: Atividade da NADPH oxidase em aorta.	35
Figura 6: Nitritos totais no plasma	36
Figura 7: Eixo esquemático apresentando o protocolo II.	36
Figura 8: Concentração de peróxido de hidrogênio no miocárdio	39
Figura 9: Concentração de anion superóxido no miocárdio	41
Figura 10: Relação entre VFC e TRAP	42
Figura 11 Eixo esquemático apresentando o protocolo III	43
Figura 12: Concentração de peróxido de hidrogênio	45
Figura 13: Concentração de nitritos totais	47
Figura 14: Atividade da enzima NADPH Oxidase	47
Figura 15: Expressão protéica da Gp91phox	48
Figura 16: Expressão protéica da Trx	49
Figura 17: relação p-Akt/Akt total	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Anticorpos utilizados	29
Tabela 2: Dados hormonais e morfométricos	32
Tabela 3: Freqüência cardíaca, pressão arterial e variações (Δ) após administração de drogas vaso-ativas	33
Tabela 4 – Parâmetros cardiovasculares. Análise da variabilidade da freqüência cardíaca e variabilidade da pressão arterial	34
Tabela 5: Dados morfométricos	37
Tabela 6: Avaliações hemodinâmicas no ventrículo esquerdo	38
Tabela 7: Avaliação autonômica	39
Tabela 8: Metabolismo da glutathiona no miocárdio	40
Tabela 9: Defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas no miocárdio	41
Tabela 10: Avaliação hemodinâmica	44
Tabela 11 - Avaliação autonômica	44
Tabela 12: Glutathiona reduzida e oxidada	46

LISTA DE ABREVIATURAS

AE: análise espectral

Akt: proteína quinase B

AngII: angiotensina II

AT1: receptor tipo I para angiotensina II

BSV: balanço simpato-vagal

CAT: catalase

CO: grupo controle

+dP/dt: índice de contratilidade cardíaca

-dP/dt: índice de relaxamento cardíaco

EA: grupo tratado com alta dose de estrogênio

EB: grupo tratado com baixa dose de estrogênio

EM: grupo tratado com média dose de estrogênio

EROS: espécies reativas ao oxigênio

FC: frequência cardíaca

GSH: glutathiona reduzida

GSSG: dissulfeto de glutathiona ou glutathiona oxidada

HF: alta frequência

HFabs: alta frequência absoluta

HFnu: alta frequência normalizada

LF: baixa frequência

LFabs: baixa frequência absoluta

LFnu: baixa frequência normalizada

NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NO: óxido nítrico

NOS: enzima óxido nítrico sintase

PA: pressão arterial

PAS: pressão arterial sistólica

PAD: pressão arterial diastólica

PAM: pressão arterial média

PD: pressão diastólica

PDFVE: pressão diastólica final no ventrículo esquerdo

PMSF: fluoreto de fenil metil sulfonil

PS: pressão sistólica

PSVE: pressão sistólica ventricular esquerda

SNA: sistema nervoso autônomo

SOD: superóxido dismutase

SRA: sistema renina angiotensina

TE: terapia estrogênica

TRAP: capacidade antioxidante total

Trx: tiorredoxina

VFC: variabilidade da frequência cardíaca

VLf: muito baixa frequência

VPA: variabilidade da pressão arterial

RESUMO

Baseado na hipótese de que o tratamento com 17 β -Estradiol, reduz a modulação simpática, o estresse oxidativo e a participação do sistema renina angiotensina sobre o sistema cardiovascular, propomos estudar o balanço simpátovagal e o equilíbrio entre o óxido nítrico (NO) e as espécies reativas ao oxigênio (EROS) em ratas Wistar ovariectomizadas. Além disso, buscamos verificar a efetividade do 17 β -Estradiol no controle da PA e na proteção cardiovascular contra os danos causados pelo estresse oxidativo usando doses menores do que as convencionais. Para isso, desenvolvemos três protocolos, usando ratas ovariectomizadas como um modelo experimental de menopausa, onde avaliamos parâmetros morfométricos, funcionais e bioquímicos que permitem a avaliação dos mecanismos relacionados ao objetivo deste trabalho de pesquisa. No primeiro protocolo (I) demonstramos o efeito do estrogênio, em uma dose alta, equivalente àquela praticada na clínica (5mg%), em melhorar o balanço autonômico para o sistema cardiovascular, provavelmente devido a uma melhora no equilíbrio entre as forças vasodilatadoras, representadas pelo NO, e as forças vasoconstritoras, representadas pelas EROS vasculares. O estudo também mostra uma forte associação entre o sistema nervoso simpático e a atividade da enzima NADPH oxidase neste modelo animal. No segundo protocolo (II) buscamos testar se 40% da dose convencional de estrogênio seria tão eficaz quanto a dose alta na melhora do controle da pressão arterial e estresse oxidativo cardíaco. Verificamos uma redução significativa na PA e nas concentrações de

EROS, como ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, um aumento das defesas antioxidantes não enzimáticas, avaliadas através do balanço redox e antioxidantes totais, e das enzimáticas, avaliadas pelas atividades das enzimas superóxido dismutase e catalase. Finalmente, realizamos o terceiro protocolo (III). Através deste testamos se uma dose de estrogênio ainda mais baixa, apenas 10% da dose convencional, seria tão eficaz quanto uma dose elevada para melhorar o controle da pressão arterial e diminuir o estresse oxidativo vascular. Verificamos que independente da dose usada, o estrogênio foi eficaz para reduzir a atividade da enzima NADPH oxidase, a concentração de peróxido de hidrogênio e a pressão arterial. Além de aumentar a concentração plasmática de nitritos totais e o estado redox. Dessa forma, demonstramos que uma dose baixa de estrogênio é tão eficaz como uma dose farmacológica para promover a proteção cardiovascular.

ABSTRACT

In this thesis was studied the sympathovagal and the nitric oxide (NO)/reactive oxygen species (ROS) balances in ovariectomized female rats. It was verified the effectiveness of 17 β -estradiol in the blood pressure (BP) control and cardiovascular oxidative stress using low doses of estrogen. Then, we developed three protocols to evaluate morphometric, hemodynamic and biochemical parameters. In the first protocol (I), we demonstrate the estrogen effects with a pharmacological dose (5 mg%) to improve cardiovascular system autonomic balance. This result was probably due to an improvement in the balance between the vasodilator forces, represented by NO, and vasoconstrictive forces represented by vascular ROS. The study also showed a strong association between the sympathetic nervous system and the NADPH oxidase enzyme activity in this animal model. In the second protocol (II), we tested whether 40% of estrogen conventional dose would be as effective as a high dose in improving the control of blood pressure and oxidative stress. We found a significant reduction in BP and in ROS concentrations such as superoxide anion and hydrogen peroxide, an increase in non-enzymatic antioxidant defenses, as measured by the redox balance and total antioxidants, and enzymes, as assessed by the activities of superoxide dismutase and catalase. Finally, we performed the third protocol (III), which allowed us to test if a low estrogen dose (10% of conventional one), would be as effective as a high dose to improve the control of blood pressure and decrease the vascular oxidative stress. We found that estrogen was effective in reducing the activity of NADPH oxidase, the concentration of hydrogen peroxide and blood pressure in all dose used. Moreover, estrogen increased the total nitrite

plasma concentration and redox state. Thus, we have demonstrated that a low dose of estrogen is as effective as a pharmacological dose to promote cardiovascular protection.

1- INTRODUÇÃO

A redução progressiva do estrogênio, que acontece no climatério, promove efeitos profundos no organismo feminino. Em alguns casos, as conseqüências dessa deficiência hormonal são sintomas desagradáveis e, algumas vezes, sérias doenças. De fato, o desenvolvimento de algumas doenças crônicas se relaciona à deficiência de estrogênio. Entre elas, podemos citar a osteoporose, a demência e as atrofias do tecido genital (Montgomery and Studd, 1991).

Além disso, o declínio natural da produção estrogênica, característico do climatério, pode ser responsável por alterações bioquímicas e fisiológicas na saúde feminina. Essas alterações contribuem para o desenvolvimento de enfermidades cardiovasculares que representam a principal causa de mortalidade e morbidade de mulheres acima de 50 anos (Stramba-Badiale et al., 2006).

Como a expectativa de vida das mulheres vem apresentando expressivo aumento, hoje em torno dos 80 anos nos países desenvolvidos (Arias, 2011) e segundo o IBGE de 77 anos para as brasileiras (Belon and Barros, 2011), já se admite, atualmente, que as mulheres viverão um terço de suas vidas em estado de deficiência estrogênica, ou seja, após a menopausa. Assim sendo, a saúde e a qualidade de vida da mulher na menopausa e depois dela passa a merecer especial atenção. Em vista disso, se o estrogênio é tão importante, nada mais lógico que a base do tratamento seja a reposição hormonal com esse hormônio.

1.1- Importância da Terapia hormonal

As ações do estrogênio parecem ser mais significativas em órgãos reprodutivos, entretanto, esse hormônio também pode atuar em diversos órgãos e sistemas, dentre eles o cardiovascular, onde causa efeitos benéficos levando a uma importante redução no risco de doença arterial coronariana (Mendelsohn and Karas, 1999). Realmente, estudos mostram que mulheres na pré-menopausa apresentam um menor risco de doenças cardiovasculares, morbidade e mortalidade do que homens da mesma idade. No entanto, esses efeitos cardioprotetores desaparecem após a menopausa, possivelmente pela diminuição de estrogênio, típica desse período (Mendelsohn and Karas, 1999).

Além de exercer um importante papel protetor sobre o sistema cardiovascular, a terapia estrogênica (TE) pode ser usada para controlar sintomas típicos da menopausa, tais como a atrofia vaginal, fogachos, osteoporose e distúrbios do sono, melhorando a qualidade de vida das mulheres (Luoto, 2009). Por outro lado, em doses elevadas, vários efeitos adversos, incluindo maior risco para câncer de mama, acidente vascular encefálico e tromboembolismo venoso superam os benefícios da TE (Colditz, 1998; Gairard et al., 2009).

O câncer de mama é um grave efeito adverso da TE, e segundo a Organização Mundial da Saúde (2005), é atualmente a neoplasia maligna de maior incidência e prevalência, e a segunda em mortalidade entre mulheres de todo o mundo. Dessa forma, a TE deve ser prescrita de forma cautelosa e, considerando os efeitos adversos, postula-se a busca de doses menores mas ainda eficazes. Ao se estudar a relação custo-benefício do tratamento com

estrogênio, pode-se afirmar que os inegáveis benefícios principalmente para o sistema cardiovascular e para o organismo feminino de um modo geral, justificam plenamente o seu uso (Mendelsohn and Karas, 1999).

Como já mencionado anteriormente, as doenças cardiovasculares são uma condição altamente prevalente após a menopausa (Matthews et al., 1989) e a TE é comumente usada neste período (Ouyang et al., 2006). No entanto, um tratamento mais seguro para a menopausa tem sido foco de pesquisas e altamente recomendado. Por conta disso, alguns estudos avaliaram diferentes esquemas de terapia hormonal e descobriram que uma dose baixa de estrogênio está associada com diminuição significativa da densidade mamográfica, sendo mais segura com relação ao seu efeito adverso de maior gravidade, o câncer de mama (Lundstrom et al., 2001; Miller et al., 1996).

De acordo com Mercurio e colaboradores (2000), baixas doses de estrogênio são tão eficazes quanto doses convencionais para melhorar o perfil lipídico e a função endotelial. Além disso, segundo Schurmann e colaboradores (2004) uma dose baixa de estrogênio é eficaz para o alívio dos sintomas do climatério (Schurmann et al., 2004) e tem uma boa tolerabilidade associada a uma baixa incidência de efeitos colaterais (van de Weijer et al., 2007).

Assim, sabendo que doenças cardiovasculares, incluindo alterações do tônus vascular (Celermajer et al., 1994), têm alta incidência em mulheres na menopausa (Matthews et al., 1989) e que a terapia hormonal é comumente utilizada para reduzir os sintomas associados ao climatério (Hong et al., 1992; Luoto, 2009), seria de grande importância identificar opções mais seguras de tratamento e que estivessem associadas a benefícios para o sistema cardiovascular.

1.2- Papel do Estrogênio na Regulação da Pressão Arterial

Segundo a organização mundial da saúde, a hipertensão é definida como o aumento persistente da pressão arterial (PA) acima de 140 mmHg para a pressão sistólica (PS) e/ou 90 mmHg para a pressão diastólica (PD). A elevação da PA que caracteriza a hipertensão é inicialmente assintomática e pode precocemente contribuir para lesão em órgãos-alvo (Lenfant et al., 2003), sendo o principal fator de risco para doenças cardiovasculares. Além disso, a incidência das doenças cardiovasculares é quatro vezes maior em mulheres após a menopausa do que mulheres de mesma idade na pré-menopausa (Tremollieres et al., 1999). Neste período, as mulheres são vinte vezes mais suscetíveis à hipertensão do que mulheres na pré-menopausa (Kannel and Wilson, 1995). Tal fato está correlacionado, entre outras causas, com a deficiência estrogênica, típica dessa fase da vida da mulher (Reckelhoff and Fortepiani, 2004).

Além disso, nas duas últimas décadas, estudos epidemiológicos demonstram que a TE no climatério pode diminuir a morbi-mortalidade por hipertensão (Rosano et al., 2009). Nesse caso, a TE, como medida coadjuvante a outras formas de tratamento, usando uma baixa dose de estrogênio, poderia ser muito útil, já que em doses menores esse hormônio parece ser mais seguro em relação aos seus efeitos indesejados, além de apresentar um possível efeito benéfico no controle da PA.

1.3- Estrogênio e endotélio

Em condições normais, a PA deve ser mantida em uma estreita faixa de variação, permitindo uma adequada perfusão tecidual. Esta manutenção é feita momento a momento de forma a ajustar a frequência cardíaca (FC) além de um grande número de substâncias e de sistemas fisiológicos que interagem de maneira complexa para regular a pressão de perfusão. Estes sistemas regulam o calibre e a reatividade vascular, a distribuição de fluido dentro e fora dos vasos e o débito cardíaco nas mais diversas situações fisiopatológicas (Bohr et al., 1991).

Quando se fala em fisiopatologia da hipertensão arterial, além do controle neural devemos destacar a participação do endotélio vascular. O principal componente deste importante sistema de modulação da PA é o óxido nítrico (NO), cuja síntese é catalisada pela enzima NO sintase (NOS) (Dominiczak and Bohr, 1996; Moncada et al., 1991). Está bem documentado na literatura que o NO é um mensageiro molecular e que desempenha um papel crítico no relaxamento vascular, na transmissão neuronal e na modulação da resposta imune (Morris and Billiar, 1994).

A NOS endotelial está estrategicamente ancorada à membrana da célula endotelial (Busconi and Michel, 1993), produzindo NO que se difunde rapidamente para a célula muscular lisa e para o lúmen vascular (Figura 1) provocando vasodilatação.

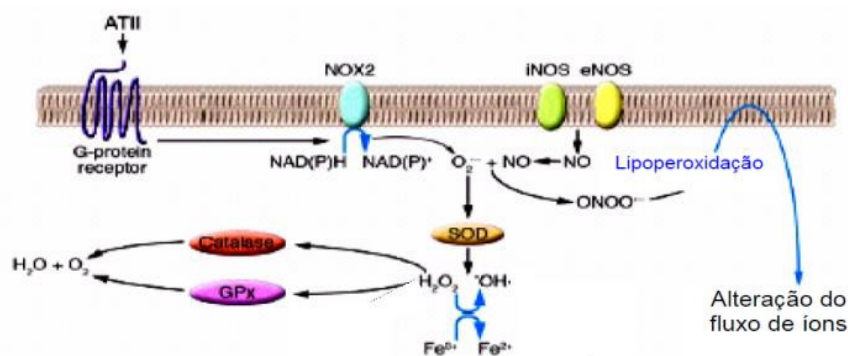


Figura 1: Formação e degradação de NO e de espécies reativas de oxigênio.

Adaptado de Giordano (2005)

No entanto, as doenças cardiovasculares, como a hipertensão, são associadas a uma redução da biodisponibilidade do NO, cujo consumo é aumentado devido às espécies reativas de oxigênio (EROS) ou por prejuízo na síntese de NO (Moncada and Higgs, 1993). A biodisponibilidade do NO pode ser avaliada através da mensuração da concentração de seus metabólitos (Granger et al., 1996), já que este sofre reações oxidativas e redutoras para produzir vários derivados, como por exemplo o nitrito (Ford et al., 1993), que é uma forma de armazenamento estabilizada de NO no sangue (Gladwin et al., 2004).

Por outro lado, o estrogênio é capaz de aumentar a atividade da NOS endotelial, e consequentemente a biodisponibilidade do NO, através da ativação da proteína quinase B (Akt), aumentando a produção de NO (Simoncini et al., 2000). Sendo assim, o estrogênio apresenta efeito protetor

contra o processo hipertensivo ao aumentar a produção de um importante vasodilatador.

Além disso, na parede muscular dos vasos, os estrogênios promovem diminuição do tônus, alteração da resposta aos agentes vasoativos (Khalil, 2005), aumento da síntese de prostaciclina, indução da expressão da prostaciclina sintase e ciclo-oxigenase (Hermenegildo et al., 2006), redução da síntese de potentes vasoconstritores como a angiotensina II (AngII), endotelina-1, catecolaminas (Mendelsohn and Karas, 1999; Ylikorkala et al., 1995) e ainda previnem o remodelamento vascular (Cavasin et al., 2003). Ademais, o estradiol estimula a expressão do RNA mensageiro para NOS em células endoteliais de aorta e artéria pulmonar fetal de ratos (MacRitchie et al., 1997; Miller et al., 1996) ficando claro a grande participação do estrogênio na melhora da função vascular.

Além do estradiol apresentar um de seus efeitos vasodilatadores através do aumento da síntese de NO endotelial, o envolvimento da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase também exige especial atenção. Essa enzima forma ânion superóxido e, portanto prejudica o balanço ânion superóxido/óxido nítrico, tão importante no equilíbrio das forças pró e antioxidantes que estão intimamente envolvidas no controle da PA (Miller et al., 2007).

1.4- Papel do estrogênio como antioxidante

A menopausa está associada com um prejuízo no controle da PA, que pode estar relacionado com estresse oxidativo (Lopez-Ruiz et al., 2008). O

estresse oxidativo se caracteriza por uma condição em que há um aumento de EROS e/ou diminuição de antioxidantes que pode causar danos oxidativos às células e várias doenças cardiovasculares (Yung et al., 2011).

As células têm uma série de mecanismos de defesa para se proteger da toxicidade das EROS, sendo o estrogênio capaz de aumentar essas defesas intra e extracelularmente, contribuindo para manter o equilíbrio no balanço redox. Como exemplo podemos citar as enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD) que está presente em quase todos os organismos vivos. Essa enzima representa uma importante defesa, essencial para a sobrevivência em condições aeróbicas, pois remove o ânion superóxido ao converte-lo a peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas como a Catalase (CAT), que rapidamente o converte à água (Figura 1) (Onal et al., 2007; Strehlow et al., 2003).

Outros sistemas antioxidantes, como o da tioredoxina (Trx), também tem merecido destaque por apresentar importantes efeitos sobre o estado redox celular e atuar através da interação das proteínas oxidadas com seu centro redox ativo (World et al., 2006). Este sistema está envolvido na homeostase redox e também pode atuar como um antioxidante, eliminando hidroperóxidos, incluindo peróxido de hidrogênio (Barranco-Medina et al., 2007).

Além disso, a glutathiona reduzida (GSH) faz parte de outro considerável sistema antioxidante. A glutathiona participa diretamente de muitas reações celulares, removendo radicais livres e EROS como o radical hidroxila e o peróxido de hidrogênio, e indiretamente, através de reações enzimáticas. Em

tais reações, a GSH é oxidada para formar dissulfeto de glutathione, também conhecido por glutathione oxidada (GSSG) (Soriani et al., 1994). A GSH é o principal e mais abundante tiol envolvido na defesa antioxidante celular e é produzida em todos os órgãos. O estado redox, representado pela razão entre GSH e GSSG (GSH/GSSG), determina o estado redox das células (Soriani et al., 1994) e, portanto, a medida desse balanço representa uma importante ferramenta para avaliar essas defesas.

Está muito bem estabelecido na literatura que as ações antioxidantes do estrogênio também são mediadas pela ativação Akt, uma importante proteína de sinalização redox-sensível (Sugden and Clerk, 2001). Quando ativada, além de estimular a enzima NOS endotelial, a Akt também fosforila uma gama de substratos intracelulares que regulam o metabolismo de crescimento e sobrevivência (Tanaka et al., 2005). Em situações de estresse oxidativo ocorrem mudanças conformacionais nas proteínas da membrana, o que pode modular a via da Akt (Yang et al., 2004). Em pequenas concentrações, as EROS como o peróxido de hidrogênio, são estimulantes para a fosforilação da Akt que atua protegendo as células do estresse oxidativo (Tanaka et al., 2005).

Tendo em vista os efeitos cardioprotetores do estrogênio, seria oportuna a utilização desse hormônio, em baixas doses, com o propósito de ativar a Akt, aumentar a expressão da NOS endotelial modulando a PA, além de atuar como antioxidante.

1.5- Equilíbrio NO/EROS

O estrogênio também pode exercer seu papel antioxidante através da modulação da atividade NADPH oxidase (Dantas et al., 2002). Esta enzima é a maior fonte de ânion superóxido em cardiomiócitos e nas células vasculares (Griendling et al., 2000; Paravicini and Touyz, 2006). A produção de superóxido na parede vascular inativa o NO e forma peroxinitrito (Figura 1). Essa reação não só provoca a diminuição da biodisponibilidade do NO e da vasodilatação dependente do endotélio (Beckman et al., 1990; Beckman et al., 1994; Zielonka et al., 2010) como também eleva os níveis de peroxinitrito que é protonado a ácido peroxinitroso gerando a mais reativa espécie de oxigênio do sistema biológico (Auch-Schwelk et al., 1989). Dessa forma, o balanço entre NO e superóxido é mais importante do que os níveis absolutos de cada um. Ademais, estudos têm demonstrado que o superóxido pode atuar como agente vasoconstritor (Alvarez et al., 2008; Cosentino et al., 1994). Além disso, a relevância da NADPH oxidase nas patologias vasculares é ressaltada devido ao fato da ativação dessa enzima ser induzida por AngII aumentando a geração de ânion superóxido (Brandes et al., 2010; Karjalainen et al., 2004)

1.6- O sistema renina-angiotensina e o estrogênio

O sistema renina-angiotensina (SRA) corresponde a um complexo sistema hormonal, cujo papel fundamental está relacionado com a homeostasia hidroeletrólítica do organismo e o controle da PA, estimulando também a liberação de aldosterona pelo córtex da supra renal. No entendimento clássico do SRA, a substância ativa AngII é a responsável pela maioria dos efeitos vasoconstritores observados (Mehta and Griendling, 2007).

O SRA é modulado pelo estrogênio, uma vez que sua administração promove redução plasmática de AngII (Karjalainen et al., 2004; Zacharieva et al., 2002). A deficiência de estrogênio tem sido associada com aumento da síntese e atividade da enzima conversora de angiotensina (Yung et al., 2011), e aumento do número de receptores tipo I (AT1) para AngII, o mediador primário das ações hemodinâmicas, mitogênicas e endócrinas da AngII (Nickenig et al., 1998).

A AngII aumenta a atividade da NADPH oxidase, sendo que o estrogênio se contrapõe a esse efeito reduzindo a concentração de ânion superóxido (Miller et al., 2007), contribuindo para o balanço a favor do NO. Além disso, as ações centrais do estrogênio sobre a produção de NO desempenham um papel protetor importante no desenvolvimento da hipertensão induzida por AngII. Este efeito protetor, pelo menos em parte, é devido a uma melhora na modulação do sistema nervoso autônomo (SNA) (Xue et al., 2009).

1.7- Papel do estrogênio sobre o sistema nervoso simpático e parassimpático

Adicionalmente, o estrogênio está envolvido na regulação do SNA, provocando reduções no tônus simpático (Vongpatanasin et al., 2001), o que pode ser clinicamente relevante para a redução de fatores de risco para doenças cardiovasculares (Gillman et al., 1993). Além disso, outros estudos mostraram que os níveis reduzidos de estrogênio, que ocorrem na menopausa, estão associados com uma piora no balanço simpato-vagal (BSV) (Moodithaya e Avadhany, 2009). Um desequilíbrio no SNA pode provocar um aumento na

PA e em sua variabilidade. Esta associação é um determinante importante para o risco de doenças cardiovasculares (Stauss et al., 1999; Stauss et al., 2000), já que durante a menopausa a hipertensão é uma doença comum (Yanes et al., 2010).

O BSV pode ser estudado usando variabilidade da frequência cardíaca (VFC), por meio de métodos não invasivos (Petrofsky et al., 2009). Alterações na VFC, que refletem principalmente a modulação autonômica tônica, podem ter importantes implicações clínicas. Uma baixa VFC, que tem sido demonstrada em mulheres na pós-menopausa, está associada com um aumento do risco de doenças cardiovasculares (Mercurio et al., 2000). Além disso, alguns estudos indicam que mulheres na menopausa apresentam um desequilíbrio no SNA, porém a TE melhora o BSV diminuindo o tônus simpático e aumentando o tônus parassimpático (McCabe et al., 1981).

Não há na literatura estudos que documentem a ação do estrogênio, em baixas doses, sob o controle autonômico cardiovascular. Considerando que os fatores que agem diretamente nos espectros desses sinais, como modificações nas paredes dos vasos e dificuldades na circulação, sofram alterações sob ausência de estrogênio. Neste estudo, utilizamos um método invasivo de medição da PA devido à necessidade de injetar drogas vasoativas que complementam essa pesquisa. No entanto, avaliamos o BSV através da análise do domínio da frequência, um método não invasivo.

1.8- Análise do domínio da frequência

A análise espectral (AE) é uma metodologia que pode permitir o diagnóstico precoce de disfunções no BSV e com isso favorecer a utilização de

medidas preventivas para o controle da hipertensão arterial, isquemia miocárdica, morte súbita cardíaca e insuficiência cardíaca, cujos fatores neurais desencadeantes ou agravantes ainda são desconhecidos (Dampney, 1994).

Avaliações no domínio da freqüência da regulação neural cardiovascular podem mostrar alterações na modulação simpato-vagal (Cooley et al., 1998), o que possibilita a utilização dessa importante ferramenta no estudo do controle reflexo da PA e da FC e sua relação com o estrogênio.

Em ratos, as oscilações rítmicas de PA e FC apresentam três faixas distintas: a faixa HF (alta freqüência) de freqüências de 0,75 a 3,04 Hz, similar a atividade respiratória; a faixa LF (baixa freqüência) de freqüências em torno de 0,25 a 0,75 Hz; e a VLF (muito baixa freqüência) entre 0,02 e 0,25 Hz. Tais oscilações variam em amplitude e freqüência, de acordo com o comportamento e condições, apresentando inclusive alterações em certas situações patológicas (Malliani et al., 1991; Stauss, 2007).

A variabilidade natural de parâmetros cardiovasculares reflete uma interação de diversos fatores que, em sua maioria, envolvem a influência do SNA sobre o funcionamento cardiovascular, como por exemplo, modulações autonômicas sobre os vasos. Quanto menor a variabilidade da freqüência cardíaca, maior será o risco de doenças cardíacas (van de Borne et al., 1997). Quanto maiores os valores de pressão (hipertensão) ou quanto maior for a idade do paciente, maior será a variabilidade da pressão arteial (VPA) (Mancia et al., 2000).

A VPA pode indicar as alterações no controle da PA (Mancia et al., 2000). Atribui-se a faixa LF à modulação simpática e a faixa HF à modulação vagal cardíacas (Dias et al., 2010).

2-HIPÓTESES

O tratamento com 17β -Estradiol em três diferentes doses diminui a participação do eixo AngII - AT1, aumenta a modulação parassimpática e reduz a simpática sobre o sistema cardiovascular, além de diminuir o estresse oxidativo em ratas Wistar ovariectomizadas.

3-OBJETIVOS

3.1-Objetivo geral

Estudar os efeitos cardiovasculares do estrogênio na regulação da pressão arterial em um modelo animal de ratas Wistar ovariectomizadas, além de testar o efeito de diferentes doses de 17- β estradiol no estresse oxidativo.

3.2-Objetivos específicos

Estudar o efeito de três diferentes doses de estrogênio sobre:

- 1- A modulação simpática e parassimpática sobre o sistema cardiovascular, a variabilidade da pressão arterial e frequência cardíaca;
- 2- As concentrações de espécies reativas de oxigênio, de metabólitos do óxido nítrico, e avaliação de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos;
- 3- O sistema renina angiotensina na modulação da pressão arterial.

4- METODOLOGIA

4.1- Animais

Para este estudo, foram utilizadas nove ratas Wistar em cada grupo, pesando entre 180 e 210g. Os animais foram obtidos no Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL), órgão auxiliar do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da UFRGS, e mantidos em caixas plásticas de 270 x 260 x 310 mm, com 3 ratas cada. O assoalho das caixas era coberto com serragem, e estas e foram mantidas num ambiente onde a temperatura (22 a 24°C) e a luz eram controladas (ciclo claro-escuro de 12 horas). Comida e água eram oferecidas de modo irrestrito para todos os animais. Todos os procedimentos experimentais adotados nos animais obedeceram às normas estabelecidas pela Comissão de Pesquisa e ética da UFRGS.

4.2- Procedimentos Experimentais

Nos procedimentos cirúrgicos utilizados neste experimento, as ratas foram colocadas sobre uma mesa cirúrgica própria para animais de pequeno porte. Os animais foram anestesiados com uma mistura de quetamina-xilazina (70:7mg/kg) intramuscular e, foram colocados sobre um sistema de aquecimento (37°C) após as cirurgias para evitar hipotermia provocada pelo esquema anestésico.

4.3- Ovariectomia e administração de 17 β -estradiol

Ao completar 12 semanas de idade, as ratas foram submetidas à ovariectomia. Os animais foram anestesiados, e uma incisão de aproximadamente 1,5 cm de comprimento foi feita na pele e tecido subcutâneo bilateralmente entre a crista ilíaca e as costelas. Uma segunda incisão atingiu a camada muscular. O ovário foi exposto, ligado abaixo da trompa uterina e extraído. A camada muscular e a cutânea foram suturadas em planos separados (Campbell and Febbraio, 2002). Após sete dias da realização desta cirurgia, cada animal recebeu após anestesia, uma cápsula de sillastic (comprimento=10mm, diâmetro interno=1,02mm, Sanitech, Havant, UK) implantada subcutaneamente em seu dorso, preenchida com solução de 17 β -estradiol (concentração de acordo com cada protocolo), com liberação do hormônio por 21 dias, ou veículo (óleo de girassol) para o grupo controle.

4.4- Protocolos experimentais

Este estudo foi subdividido em 3 etapas, a fim de proporcionar a elaboração de três artigos para publicação (Anexos I, II e III), com os seguintes protocolos experimentais:

4.4.1- Protocolo I:

Neste protocolo foram utilizados dois grupos experimentais: fêmeas ovariectomizadas (controles = CO) e fêmeas ovariectomizadas + estradiol dose alta (EA), que receberam uma cápsula de sillastic 10 μ L de estradiol 5 mg%.

4.4.2- Protocolo II:

Neste protocolo foram utilizados três grupos experimentais: fêmeas ovariectomizadas (controles = CO), fêmeas ovariectomizadas + estradiol dose alta (EA), que receberam uma cápsula de sillastic 10 µL de estradiol 5 mg%, e fêmeas ovariectomizadas + estradiol dose intermediária (EM), que receberam uma cápsula de sillastic 10 µL de estradiol 2 mg%.

4.4.3- Protocolo III:

Neste protocolo foram utilizados quatro grupos experimentais: fêmeas ovariectomizadas (controles = CO), fêmeas ovariectomizadas + estradiol dose alta (EA), que receberam uma cápsula de sillastic 10 µL de estradiol 5 mg%, fêmeas ovariectomizadas + estradiol dose intermediária (EM), que receberam uma cápsula de sillastic 10 µL de estradiol 2 mg%, e fêmeas ovariectomizadas + estradiol dose baixa (EB), que receberam uma cápsula de sillastic 10 µL de estradiol 0,5 mg% (Campbell and Febbraio, 2002).

4.5- Cateterização

A cateterização foi realizada após o término do tratamento com estradiol. Cateteres de polietileno (PE-10, com diâmetro interno de 0,01 mm) preenchidos com soro fisiológico foram introduzidos, através de uma pequena incisão na região esquerda do pescoço, na artéria carótida e veia jugular, para obtenção dos registros de PA, FC e administração das drogas. Os cateteres foram fixados com fio de algodão, passados subcutaneamente e exteriorizados

no dorso da região cervical. As cânulas foram mantidas desobstruídas usando-se 0,02 mL de heparina sódica (Liquemine - Roche, 5.000 U/mL) em 0,5 mL de solução fisiológica de NaCl 0,9%, durante a lavagem que precedeu cada registro de pressão.

4.6-Avaliações hemodinâmicas

As avaliações hemodinâmicas foram realizadas através de procedimento cirúrgico de canulação intraventricular (protocolo 2) e intra-arterial (protocolos 1 e 3).

4.6.1- Registro de pressão arterial e processamento de sinais

Um dia após a cateterização, foi feita a medição direta da PA e a administração de drogas. Os animais permaneceram conscientes e com livre movimentação durante as medidas cardiovasculares, pois a cânula arterial foi conectada a uma extensão de 20 cm (PE-50), que permitiu livre movimentação do animal pela caixa durante todo o período do experimento. Para registrar as modificações na PA e FC, a extensão estava conectada a um transdutor de sinal (modelo 041-500503A; Argon, Athens, TX), calibrado e conectado a um sistema computadorizado de aquisição de dados (CODAS, 1Kz, DATAQ Instruments, Akron, OH, EUA), especialmente desenvolvido para obtenção de medidas cardiovasculares. PA sistólica (PAS), PA diastólica (PAD) e FC foram obtidas a uma frequência de amostragem de 2000Hz por canal e gravadas usando computador (XPS-D300; Dell Computer Corporation, Austin, TX). Um

disco removível foi utilizado para armazenar os resultados. A PA média (PAM) foi calculada pela fórmula $PAM = PAD + (PAS - PAD)/3$. Após realizar os registros, a PAM e a FC (determinada a partir do intervalo entre dois picos de PAS) foram analisadas observando um intervalo de 0,5 segundos, o que permite a verificação de todos os batimentos cardíacos do rato (Souza et al., 2001).

4.6.2- Infusão de AngII e Losartan

Após o registro da PA e FC de repouso durante 20 minutos, foram injetados AngII e Losartan. As injeções endovenosas de AngII (1 ug/kg) um potente vasoconstritor, e de Losartan (30 mg/Kg), um antagonista do receptor AT1, foram administradas “in bolus”, em dose única (volume de 0,12 a 0,16 mL). Após a injeção de losartan, foi repetida a injeção de AngII, para verificar o efeito do bloqueio aos receptores AT1 (Matys et al., 2000). Entre cada injeção aguardou-se o tempo necessário para que a pressão arterial retornasse aos valores basais.

4.6.3- Registro da pressão intraventricular

Após o tratamento, os animais foram pesados e anestesiados. Foi utilizado para canulação do ventrículo esquerdo, via carótida direita, um cateter de polietileno (PE50) conectado a um transdutor de pressão (Strain Gauge Narco Biosystem Transducer RP-155 Houston, Texas, USA) e acoplado a um amplificador de sinais (Pressure Amplifier HP8805C). O catéter foi inserido até

o ventrículo e sua posição foi determinada pela observação da onda característica de pressão ventricular. Após 5 minutos de estabilização, foram registradas a pressão sistólica ventricular esquerda (PSVE) e a pressão diastólica final no ventrículo esquerdo (PDFVE). Os sinais analógicos da pressão foram digitalizados (CODAS- Data Acquisition System, PC 486) com taxa de amostragem de 1000Hz. Este programa permite a derivação da onda de pressão ventricular esquerda e detecção dos valores máximos e mínimos destas curvas, batimento a batimento, fornecendo os valores das derivadas positivas (+dP/dt, índice de contratilidade) e negativas (-dP/dt, índice de relaxamento) expressas em mmHg/s (Li et al, 2000).

4.7- Análise Espectral

Neste estudo, foi utilizado o modelo auto-regressivo para a construção dos espectros e a escolha da ordem foi feita automaticamente pelo software utilizado.

A AE dos sinais captados foi feita em um PC, utilizando o pacote de softwares e utilitários elaborados pelo Engenheiro Alberto Porta da Università Degli Studu di Milano, que permite a escolha da ordem do modelo auto-regressivo e fornece os espectros do trecho selecionado com uso do algoritmo de modelagem auto-regressivo. Os espectros obtidos foram avaliados quantitativamente considerando os valores de variabilidade do sinal, amplitude média das componentes LF (atividade simpática) e HF (atividade parassimpática), modulação simpática percentual (LFnu), modulação parassimpática percentual (HFnu) e a relação LF/HF (balanço simpatovagal). O

índice de sensibilidade espontânea do baroreflexo arterial foi calculado pelo método espectral conhecido como índice alfa na banda de LF que é obtido pela razão entre potência espectral da FC pela da PAS na banda LF dado em ms/mmHg (Furlan et al., 2003).

4.8- Remoção e preparo de órgãos e tecidos

Após as avaliações hemodinâmicas, o coração e a aorta foram usados para análises de estresse oxidativo e expressão de proteínas por western blot. O útero foi removido e pesado. Amostras de sangue foram coletadas para a quantificação de estrogênio e nitritos totais. Anéis de aorta foram separados, processados e imediatamente submetidos a avaliação da atividade da enzima NADPH oxidase. O restante da aorta foi dividido em anéis e imediatamente congelados para posteriores análises da concentração de peróxido de hidrogênio, glutathione e expressão de proteínas. Parte do coração foi homogeneizado e o restante foi dividido para análises da concentração de ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, glutathione e análise por western blot. As amostras foram imersas imediatamente após a extração, em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C .

4.9- Preparo dos homogeneizados

4.9.1- Homogeneizado de coração

Os corações foram homogeneizados por 30 segundos em Ultra-Turrax, na presença de cloreto de potássio 1,15% (5mL/g de tecido) e de fluoreto de fenil metil sulfonil (PMSF) na concentração de 100nmol/L em isopropanol (10µL/mL de KCl adicionado). O PMSF é um inibidor de proteases e foi utilizado para que não ocorresse degradação das enzimas das quais a atividade foi medida. Em seguida os homogeneizados foram centrifugados por 10 minutos a 1000g em centrífuga refrigerada (Sorwal RC 5B-rotor SM 24) e o sobrenadante foi retirado e congelado em freezer a -80°C para as dosagens posteriores da capacidade antioxidante total (TRAP) e atividades das enzimas CAT e SOD.

4.9.2- Homogeneizado de aorta

As amostras de aorta foram homogeneizadas em tampão gelado RIPA (NaCl 150 mmol / L; Tris-HCl 50 mmol / L; EDTA 5 mmol / L; Nonidet-P 40 1%; 0,5% deoxycolate; NaF 10 mmol / L; pirofosfato de sódio 10 mmol / L; flúor fenilmetilsulfonil 100 mmol / L; aprotinina 2 mg / mL; 2 mg leupeptin / mL), através de maceração com nitrogênio líquido e com auxílio de grau e pistilo (Sartório et al, 2007). Logo após foram sonicadas por 30 segundos em equipamento Sonicator-Ultrasonic Processor (Heat Systems Inc., New York, EUA). Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado por 15 minutos a 1000g em centrífuga refrigerada a -4°C (Sorvall RC 5B – Rotor SM 24) e o sobrenadante foi retirado e congelado em freezer a -80°C para posteriores análises por western blot (Sartorio et al., 2007).

4.10- Avaliações bioquímicas

4.10.1- Medidas Hormonais

As concentrações de estradiol foram avaliados no plasma sangüíneo dos animais por radioimunoensaio, através de um kit comercial (Biomedical Technologies, Inc., Stoughton, MA, USA).

4.10.2- Dosagem da concentração de peróxido de hidrogênio

O método está baseado na oxidação do vermelho de fenol pelo peróxido de hidrogênio mediado pela peroxidase de rabanete, resultando num produto que absorve em 610nm. Os resultados foram expressos em nmoles de peróxido de hidrogênio por grama de tecido (Pick and Keisari, 1980).

4.10.3- Determinação da concentração de glutathiona reduzida e oxidada

A razão (GSH/GSSG) entre a concentração de GSH e GSSG foi determinada no homogeneizado de tecido cardíaco e de aorta conforme descrito por Akerboom & Sies (1981). Para isso, as amostras foram desproteinizadas, centrifugadas e o sobrenadante foi neutralizado. Para determinar a GSSG adicionou-se ao sobrenadante N-etilmaleimida . A leitura foi feita em espectrofotômetro com o comprimento de onda de 412 nm e os

valores obtidos foram expressos em mmol por grama de tecido.

4.10.4- Nitritos totais

A quantidade total de nitritos foi determinada no plasma, de acordo com a técnica descrita por Granger e colaboradores (1999; Granger et al., 1996). Para converter nitrito a nitrato as amostras foram incubadas com cofatores enzimáticos e nitrato redutase. A reação foi finalizada pela adição do reagente de Griess. A coloração final foi detectada espectrofotometricamente a 542nm.

4.10.5- Determinação da atividade das NADH e NADPH oxidases

A lucigenina é utilizada para detecção de ânion superóxido em vasos sanguíneos, e o mecanismo proposto envolve a redução monoeletrônica da lucigenina a cátion radical (luc⁺) por nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e NADPH oxidases. Este radical reage com superóxido para formar um intermediário dioxetano que decai por um processo de emissão de luz. Amostras de aorta foram preparadas e o procedimento experimental foi realizado segundo a técnica descrita por Liochev e Fridovich (1997). Os resultados foram expressos em nmol/g peso seco.

4.10.6- Determinação das atividades das enzimas antioxidantes

Foram medidas as atividades das enzimas antioxidantes SOD e CAT em tecido cardíaco. A técnica utilizada nesse trabalho para determinação da SOD

está baseada na inibição da reação do radical superóxido com o pirogalol. O superóxido é gerado pela auto-oxidação do pirogalol em meio básico. A SOD presente na amostra em estudo compete pelo radical superóxido com o sistema de detecção. A oxidação do pirogalol foi detectada espectrofotometricamente a 420nm. A atividade da SOD foi determinada medindo a velocidade de formação do pirogalol oxidado. Os resultados foram expressos em U SOD/mg de proteína (Marklund, 1985).

A atividade da CAT é diretamente proporcional à taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio e obedece a uma cinética de pseudo-primeira ordem. Sendo assim, sua atividade pode ser medida através da avaliação do consumo do peróxido de hidrogênio. Este teste consiste em avaliar a diminuição da absorbância no comprimento de onda de 240nm, que é onde ocorre maior absorção pelo peróxido de hidrogênio. Os resultados foram expressos em pmoles/mg de proteína (Aebi, 1984; Boveris and Chance, 1973).

A dosagem de proteínas foi realizada seguindo o método de Lowry e colaboradores (Lowry et al., 1951).

4.10.7- Capacidade antioxidante total

O método consiste em incubar uma mistura de 2,2'-azo-bis (2-amidinopropano) (ABAP), usado como uma fonte de radicais livres, com luminol em tampão glicina. Esta mistura foi levada ao contador e a luminescência surgiu da oxidação do luminol pelos radicais livres. A adição de Trolox (vitamina E hidrossolúvel) reduz quase que completamente a emissão de luz, produzindo um tempo de indução que está linearmente relacionado com

a concentração de Trolox. Elaborou-se uma curva de calibração com Trolox. O homogeneizado de tecido cardíaco foi adicionado ao invés de Trolox e se observou o tempo de indução que também está relacionado com a quantidade de amostra adicionada. O TRAP foi avaliado medindo o tempo de indução de uma dada quantidade de homogeneizado. A quantidade total de antioxidantes presentes no tecido foi avaliada (em unidades de Trolox) pela interpolação da medida do tempo de indução com a curva de calibração obtida com o Trolox (Evelson et al., 2001).

4.10.8- Determinação da concentração de ânion superóxido

O método baseia-se na medição espectrofotométrica da reação de oxidação de adrenalina com ânion superóxido presente na amostra, levando à formação de um composto mensurável em 480 nm. Os homogeneizados de coração foram submetidos a centrifugação para isolamento das mitocôndrias. A reação é iniciada pela adição de adrenalina (Boveris, 1984).

4.11- Expressão proteica por “Western Blot”

Primeiramente, determinou-se a concentração de proteína para normalizar sua quantidade em cada amostra. Em seguida, alíquotas de amostras previamente homogeneizadas foram misturadas com tampão de carregamento sob condições redutoras. Logo após, 100 µg de proteína foram expostas à eletroforese de gel monodimensional de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) em um sistema descontínuo usando 15% (p/v) de

gel separador e 5% (w/v) de gel fixador. As proteínas separadas foram transferidas através de eletroforese para membranas PVDF usando tampão tris glicina em uma unidade de transferência Bio-Rad resfriada. Após, os sítios de proteínas inespecíficas foram bloqueados através de 1h de incubação em solução bloqueadora 15% (p/v) de leite desnatado em tampão Tris salina 0,1% (p/v), tween-20. As membranas foram processadas por imunodeteção usando-se os seguintes anticorpos primários citados na tabela 1.

Tabela 1: Anticorpos primários utilizados

Anticorpo	Peso Molecular (kDa)
Fosfo Akt e Akt total	60
Trx-1	12
Gp91phox	65

Akt, proteína quinase B; Trx, tioredoxina 1; Gp91phox, sub-unidade da NADPH oxidase.

Como anticorpos secundários foram utilizados os anticorpos monoclonais anti-coelho e anti-camundongo (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). As membranas foram incubadas com solução de ECL adaptada do kit comercial (Amersham Biosciences) e reveladas por quimi-luminescência. Os filmes autoradiográficos foram analisados e quantificados através de um densitômetro de imagem (Imagemaster VDS CI, Amersham Biosciences Europe, IT) e os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de pixels.

Os pesos moleculares de bandas de proteínas foram determinados utilizando como referência um padrão de peso molecular (RPN 800 rainbow full

range Bio-Rad, CA, ESA). Os resultados foram normalizados pelo método de Ponceau red (Klein et al., 1995).

4.12- ANÁLISE ESTATÍSTICA

A comparação entre os dois grupos no protocolo 1, foi testada através do teste T de Student.

Para a comparação entre os diferentes grupos nos protocolos 2 e 3 usou-se a análise de variância para medidas repetidas (ANOVA), seguida do teste de Student-Newman-Keuls.

As correlações entre duas variáveis (nos protocolos 1 e 2) foram calculadas utilizando o teste de correlação de Pearson.

Os valores apresentados são as médias \pm desvio padrão da média e são considerados significantes quando $P < 0,05$.

O software utilizado para a realização da análise estatística foi o SigmaPlot, versão 11.0.

5- RESULTADOS

Os resultados obtidos neste estudo foram descritos separadamente, conforme os três protocolos apresentados anteriormente, a fim de serem submetidos a revistas internacionais na forma de artigos (anexos I, II e III). A divisão dos resultados bem como a ordem da sua apresentação segue a seqüência proposta na figura 2.

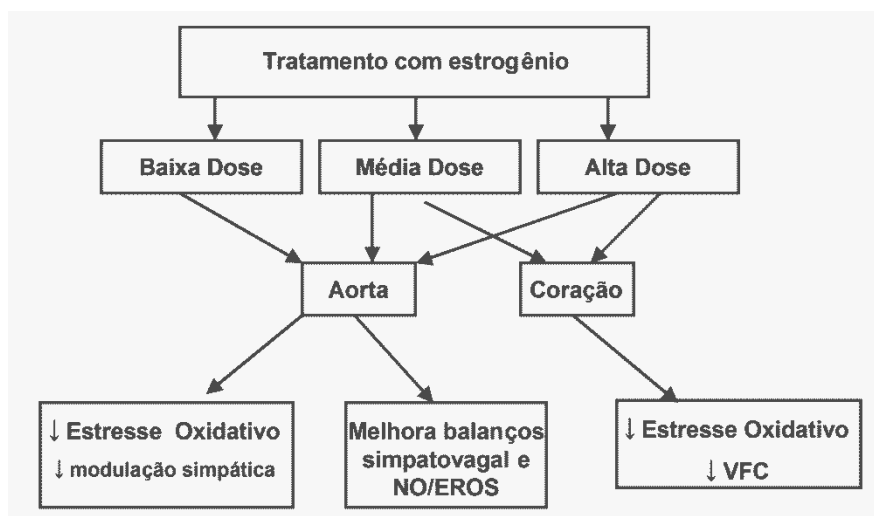


Figura 2: Apresentação do eixo elaborado a partir dos protocolos desenvolvidos

5.1 Ovariectomia e TE

O tratamento com 17-beta estradiol por 21 dias aumentou a concentração plasmática desse hormônio (EB = 124 ± 3 , EM = 600 ± 19 , EA = 1.818 ± 39 pg / mL vs CO = 61 ± 8 pg / mL). Além disso, observamos uma significativa ($P < 0,001$) redução do peso corporal (EB = 222 ± 13 ; EM = 214 ± 14 ; EA = 216 ± 9 vs CO = 247 ± 15) e aumento do peso uterino (EB = $0,29 \pm 0,11$, EM = $0,61 \pm 0,06$, EA = $0,86 \pm 0,15$ vs CO = $0,15 \pm 0,02$) nos animais tratados.

5.2- Resultados obtidos no protocolo I:

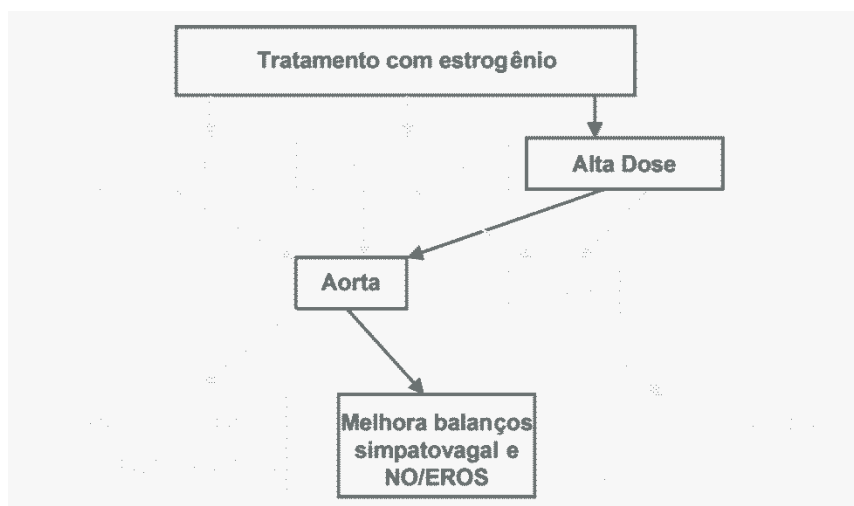


Figura 3: Eixo esquemático apresentando o protocolo I.

5.2.1 - PA e FC basais, e efeitos da administração de AngII e do bloqueio do receptor AT1

A PA diminuiu significativamente no grupo EA, mas não houve alteração na FC após o tratamento com estrogênio. A administração de AngII causou um aumento significativo na PA, enquanto que o Losartan reduziu a mesma. Além disso, a administração de AngII após o Losartan não alterou a PA (Tabela 2).

Tabela 2: Frequência cardíaca, pressão arterial e variações (Δ) após administração de drogas vaso-ativas

	CO	EA
PAM basal (mmHg)	121 \pm 8	113 \pm 5*
Frequência cardíaca basal (bpm)	332 \pm 30	341 \pm 25
Δ PA (mmHg) Resposta a AngII (1 μ g/Kg)	44 \pm 4	56 \pm 4*
Δ PA (mmHg) Resposta ao Losartan (30mg/Kg)	-13 \pm 2	-6 \pm 1*
Δ PA (mmHg) Resposta a AngII após Losartan	0,06 \pm 0,05	0,09 \pm 0,04

* $P < 0,05$ vs CO. Dados apresentados como média \pm desvio padrão. Grupo controle=CO; grupo tratado com estrogênio = EA. Variação de PA antes e após administração das drogas = Δ PA. N= 8 animais por grupo.

5.2.2 - Avaliações autonômicas

Não houve diferença significativa na variabilidade total da FC, porém o valor absoluto da componente LF mostrou-se significativamente no grupo tratado, não havendo diferença no valor de HF entre os grupos. Os valores normalizados, que expressam o percentual de cada componente sobre o total, mostraram um aumento em HF nu ($P < 0,05$) acompanhado de uma diminuição significativa ($P < 0,05$) nos valores do LF nu e no índice LF / HF no grupo EA.

A análise do sinal pressórico mostrou redução na componente LF da VPAS no grupo EA (Tabela 3), sem alteração no índice α LF. Além disso,

demonstramos uma correlação positiva entre a atividade da NADPH oxidase e o componente LF da VFC ($P < 0,05$; $r = 0,902$).

Tabela 3 – Parâmetros cardiovasculares. Análise da VFC e VPA

	CO	EA
VFC (s ²)	18,38±6,94	21,86±19,84
LFa (s ²)	3,45±1,78	1,17±1,04*
HFa (s ²)	10,03±4,07	9,88±11,37
LF nu	27,65±4,67	11,94±3,42*
HF nu	77,30±9,15	87,79±3,83*
Razão LF/HF	0,24±0,09	0,14±0,05*
VPA (mmHg ²)	18,85±15,08	8,19±4,07
LFa (mmHg ²)	5,32±4,34	1,55±0,77*
HFa (mmHg ²)	3,35±2,38	2,04±1,40
Índice α_{LF} (s/mmHg)	0,86±0,36	0,86±0,31

* $p < 0,05$ vs CO. Dados apresentados como média \pm desvio padrão. Grupo controle=CO; grupo tratado com estrogênio = EA. VFC = variabilidade da frequência cardíaca; LF= componente de baixa frequência; HF= componente de alta frequência; a=absoluto; nu= normalizado; VPA= variabilidade da pressão arterial; Índice α_{LF} = sensibilidade baroreflexa espontânea. N= 5 animais por grupo.

5.2.3 - Atividades da NADH oxidase, NADPH oxidase e nitritos totais

A atividade da enzima NADH oxidase (nmol/g de peso seco), avaliada em aorta, foi significativamente menor ($P < 0,001$) no grupo EA (27536 ± 11036) do que no CO (66996 ± 10085 ; Figura 4).

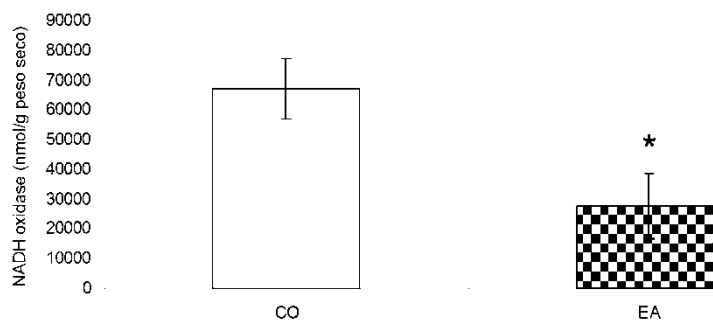


Figura 4: Atividade da NADH Oxidase em aorta. * $P < 0,05$ vs CO. Dados apresentados como média \pm desvio padrão. Grupo controle=CO; grupo tratado com estrogênio = EA, N= 9 animais por grupo.

Da mesma forma, a atividade da enzima NADPH oxidase (nmol / g de peso seco), avaliada em aorta, foi significativamente menor ($P < 0,05$) no grupo EA (7475 ± 2866) do que no CO (37747 ± 9977 ; Figura 5). Além disso, observamos uma correlação negativa entre nitritos totais e atividade da NADPH oxidase ($P < 0,001$; $r = - 0,976$).

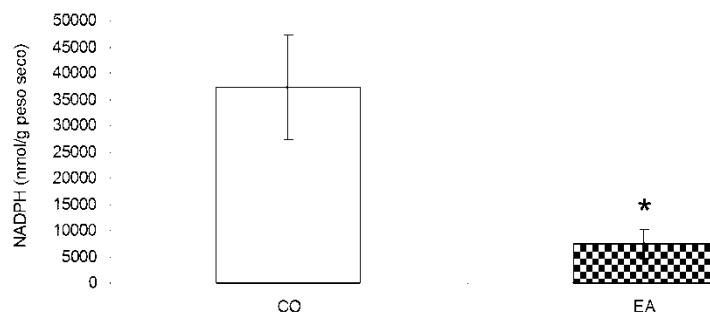


Figura 5: Atividade da NADPH oxidase em aorta.*P<0,05 vs CO. Dados apresentados como média ± desvio padrão. Grupo controle=CO; grupo tratado com estrogênio = EA, N= 9 animais por grupo.

Os nitritos totais (umol/L), avaliados em plasma, foram significativamente maiores (P <0,05) no grupo EA (0,23 ± 0,03) do que no CO (0,12 ± 0,07; Figura 6).

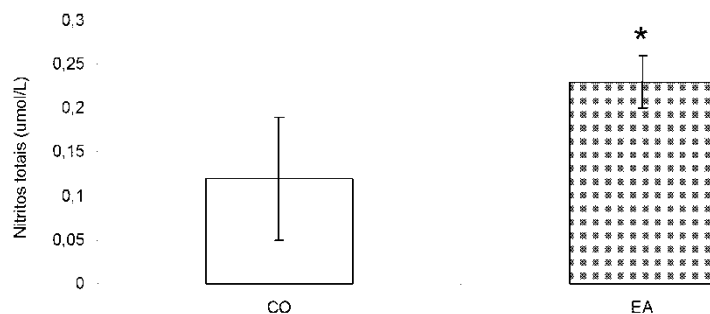


Figura 6: Nitritos totais no plasma; *P<0,05 vs CO. Dados apresentados como média ± desvio padrão. Grupo controle=CO; grupo tratado com estrogênio = EA, N= 8 animais por grupo.

5.3- Resultados obtidos no protocolo II:

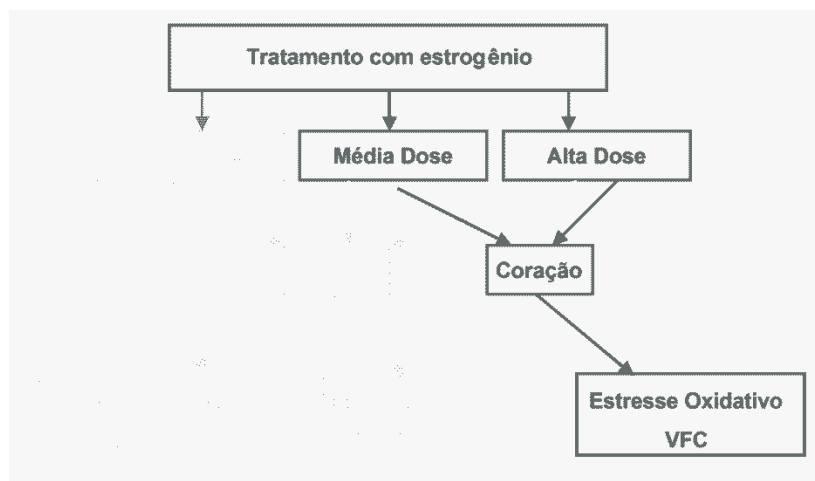


Figura 7: Eixo esquemático apresentando o protocolo II.

5.3.1 - Parâmetros hemodinâmicos

A PDFVE reduziu significativamente ($P < 0,05$) nos grupos tratados com estrogênio. Não houve modificações em PSVE, FC, + dP/dt e -dP/dt (Tabela 4).

Tabela 4: Avaliações hemodinâmicas no ventrículo esquerdo

	CO	EM	EA
PDFVE (mmHg)	12,17±4,54	5,10±1,98*	7,95±2,21*
PSVE (mmHg)	101,71±12,78	120,91±20,71	110,40±7,51
FC (bat/s)	212±12,78	221±22,59	183,81±20,83
+dP/dt (mmHg/s)	5809±924	6435±549	5505±450
-dP/dt (mmHg/s)	-3946±786	-5262±890	-4098±251

* $P < 0,05$ vs CO. Dados apresentados como média \pm desvio padrão. Grupo controle=CO; grupo tratado com estrogênio dose intermediária = EM; grupo tratado com estrogênio alta dose = EA, + dP/dt = índice de contratilidade do miocárdio, -dP/dt = índice de relaxamento do miocárdio, PDFVE= pressão

diastólica final no ventrículo esquerdo, PSVE= pressão sistólica no ventrículo esquerdo. N= 5 animais por grupo.

5.3.2 - Avaliação autonômica

A VFC foram significativamente maiores ($P < 0,05$) nos grupos tratados com estrogênio, quando comparados ao grupo controle. Além disso, o grupo EA também apresentou o componente HF significativamente maior ($P < 0,05$) quando comparado ao grupo CO. Não houve alterações significativas em LF, LFnu, HFnu e a razão LF/HF após o tratamento com estrogênio (Tabela 5).

Tabela 5: Avaliação autonômica

	CO	EM	EA
VFC (s ²)	14,34±3,56	39,98±11,00*	69,62±27,32*
LF abs (s ²)	2,49±1,53	5,03±1,89	8,09±7,04
HF abs (s ²)	9,78±2,84	28,04±9,718	53,35±29,96*
LF nu	20,22±5,20	16,67±5,12	11,05±3,03
HF nu	79,77±5,14	83,32±5,10	88,95±15,74
LF/HF	0,25±0,07	0,2±0,07	0,12±0,08

* $P < 0,05$ vs CO. Dados apresentados como média \pm desvio padrão. Grupo controle=CO; grupo tratado com estrogênio dose intermediária = EM; grupo tratado com estrogênio alta dose = EA, N= 4 animais por grupo.

5.3.3 – Concentração de peróxido de hidrogênio

A concentração de peróxido de hidrogênio (nmol / g de tecido), avaliada no tecido cardíaco, diminuiu significativamente ($P < 0,05$) nos grupos tratados (EM = $0,43 \pm 0,10$; EA = $0,38 \pm 0,14$), quando comparados aos animais controle (CO = $0,83 \pm 0,32$; Figura 8).

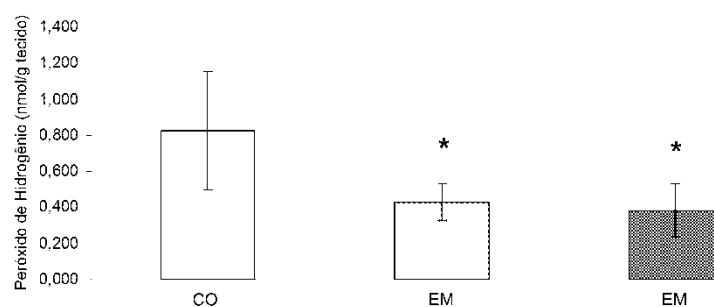


Figura 8: Concentração de peróxido de hidrogênio em tecido cardíaco (nmol/g tecido). * $P < 0,05$ vs CO. Dados apresentados como média \pm desvio padrão. Grupo controle=CO; grupo tratado com estrogênio dose intermediária = EM; grupo tratado com estrogênio alta dose = EA, N= 5 animais para os grupos CO e EM e 8 para o EA.

5.3.4 - Metabolismo da glutathione

O tratamento com estrogênio significativamente ($P < 0,05$) reduziu a concentração de GSSG e aumentou a de GSH no tecido cardíaco. Além disso, aumentou a razão GSH/GSSG, nos grupos tratados ($P < 0,05$) (Tabela 6).

Tabela 6: Metabolismo da glutatona no tecido cardíaco

	CO	EM	EA
GSH (nmol/mg tecido)	0,15±0,07	0,29±0,05*	0,27±0,10*
GSSG (nmol/mg tecido)	0,026±0,008	0,022±0,005	0,014±0,005*
GSH/GSSG (estado redox)	5,98±2,45	13,57±2,23*	19,55±9,03*
Glutationas Totais (nmol/ mg tecido)	0,18±0,08	0,32±0,06	0,28±0,14

*P<0,05 vs CO. Dados apresentados como média ± desvio padrão. Grupo controle=CO; grupo tratado com estrogênio dose intermediária = EM; grupo tratado com estrogênio alta dose = EA, N= 6 animais por grupo.

5.3.5 - Concentração de ânion superóxido

A concentração de ânion superóxido (mmol / mg de proteína), avaliada no tecido cardíaco foi significativamente (P <0,05) menor nos grupos tratados (CO = 12,22 ± 3,90; EM = 6,87 ± 3,13; EA = 2,65 ± 1,37) (Figura 9).

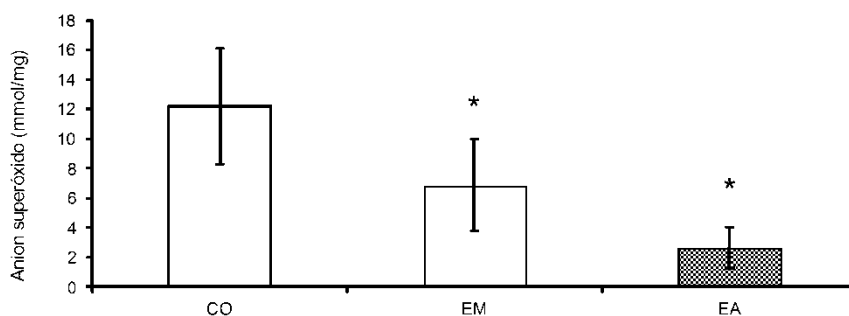


Figura 9: Concentração de anion superoxido no tecido cardíaco (mmol/mg proteína). *P<0,05 vs CO. Dados apresentados como média ± desvio padrão. Grupo controle=CO; grupo tratado com estrogênio dose intermediária = EM; grupo tratado com estrogênio alta dose = EA, N= 6 animais por grupo.

5.3.6 - TRAP e atividade das enzimas antioxidantes:

O TRAP, e atividades das enzimas SOD e CAT, avaliados em tecido cardíaco aumentaram significativamente nos grupos tratados com estrogênio (Tabela 7).

Tabela 7: Defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas no tecido cardíaco

	CO	EM	EA
SOD (U/mg proteína)	22,24±3,00	33,65±5,54*	32,10±6,80*
CAT (pmol/mg proteína)	0,89±0,14	1,25±0,20*	1,28±0,29*
TRAP (unidades de Trolox/mg proteína)	25,50±7,96	57,60±24,13*	53,55±16,15*

*P<0,05 vs CO vs EM. Dados apresentados como média ± desvio padrão. Grupo controle=CO; grupo tratado com estrogênio dose intermediária = EM; grupo tratado com estrogênio alta dose = EA, N= 8 animais por grupo para as enzimas, e 6 para o TRAP.

5.3.7- Relação entre TRAP e VFC

Encontramos uma correlação positiva entre a VFC e TRAP (P <0,01; r = 0,8922; Figura 10).

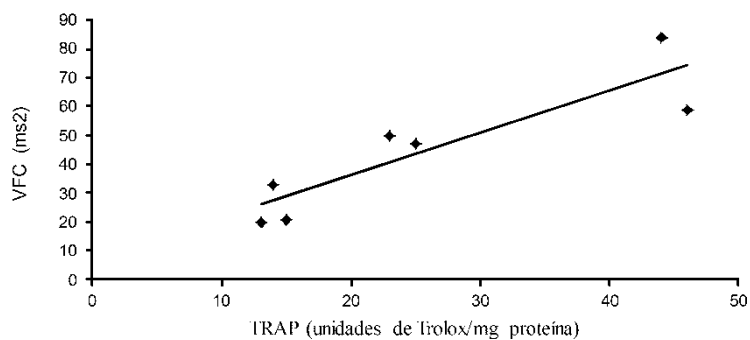


Figura 10: Relação entre VFC e TRAP ($P < 0,01$; $r = 0,8922$).

5.4- Resultados obtidos no protocolo III:

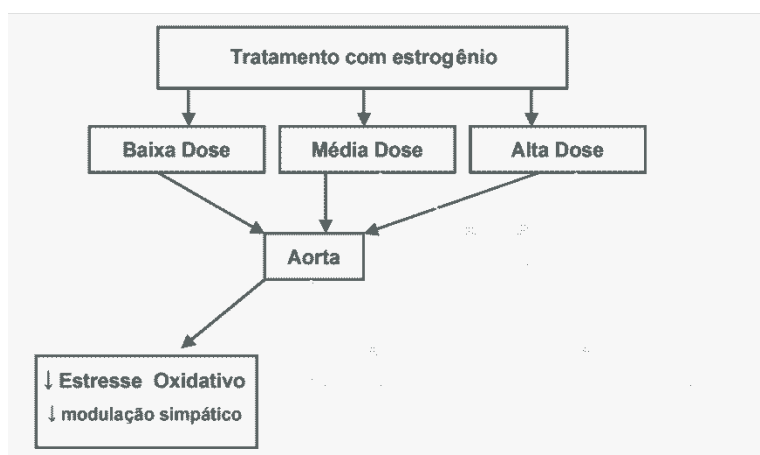


Figura 11 Eixo esquemático apresentando o protocolo 3.

5.4.1 - Avaliação hemodinâmica

Observamos uma significativa ($P < 0,05$) redução na PAM e PAD nos grupos tratados com estrogênio quando comparados com CO. Não houve diferença em FC e PAS entre os grupos (Tabela 8).

Tabela 8: Avaliação hemodinâmica

	CO	EB	EM	EA
PAS (mmHg)	141±2	128±14	139±5	134±9
PAD (mmHg)	105±4	94±9*	94±4*	90±2*
PAM (mmHg)	118±3	105±6*	109±4*	104±4*
FC (bpm)	360±42	338±46	349±32	338±28

*P<0,05 vs CO. Dados apresentados como média ± desvio padrão. Grupo controle=CO; grupo tratado com estrogênio alta dose = EA; grupo tratado com estrogênio dose intermediária = EM; grupo tratado com estrogênio baixa dose = EB; PAS= pressão arterial sistólica, PAD= pressão arterial diastólica; PAM= pressão arterial média; FC= frequência cardíaca, N= 9 animais por grupo.

5.4.2 - Avaliação autonômica

Observamos uma significativa (P <0,05) redução na VPAS nos grupos tratados estrogênio quando comparados com CO. Porém, o componente LF, que está associado com a modulação simpática vascular, diminuiu apenas nos grupos EB e EM (Tabela 9).

Tabela 9 - Avaliação autonômica:

	CO	EB	EM	EA
VPAS (mmHg ²)	11,54±3,64	4,26±1,19*	5,22±1,58*	5,24±2,18*
LF (mmHg ²)	3,60±2,21	0,59±0,25*	2,01±1,13	1,00±0,46*
HF (mmHg ²)	3,17±2,33	1,32±0,65	1,16±0,3	1,78±1,18

*P<0,05 vs CO. Dados apresentados como média ± desvio padrão. Grupo controle=CO; grupo tratado com estrogênio alta dose = EA; grupo tratado com estrogênio dose intermediária = EM; grupo tratado com estrogênio baixa dose = EB. VPA= variabilidade da pressão arterial; LF= componente de baixa frequência; HF= componente de alta frequência, N= 4 animais por grupo.

5.4.3 - Concentração de peróxido de hidrogênio

A concentração de peróxido de hidrogênio (em nmol/g de tecido), avaliada em aortas, foi significativamente (P<0,01) menor nos grupos tratados (EB=0,69±0,05, EM=0,44±0,10, EA=0,2±0,03) em relação ao grupo controle (CO=1,46±0,39; Figura 12).

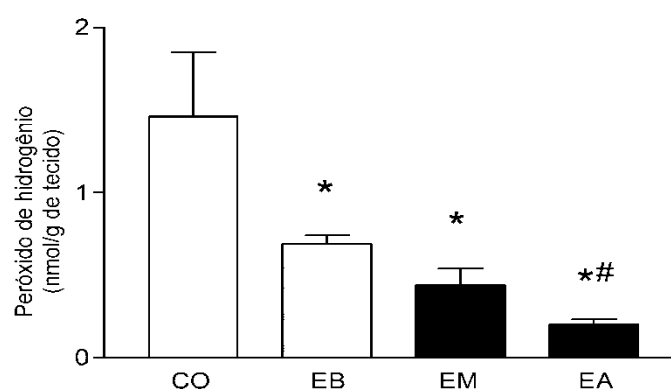


Figura 12: Concentração de peróxido de hidrogênio em aorta. *P<0,05 vs CO; #P<0,05 vs EB. Dados apresentados como média ± desvio padrão. Grupo

controle=CO; grupo tratado com estrogênio alta dose = EA; grupo tratado com estrogênio dose intermediária = EM; grupo tratado com estrogênio baixa dose = EB, N= 9 animais por grupo.

5.4.4 - Determinação da glutathiona reduzida e oxidada

O tratamento com estrogênio significativamente ($P < 0,05$) aumentou a concentração de GSH e o estado redox (GSH/GSSG), e diminuiu a concentração de GSSG em aorta. A concentração de glutathiona total não foi diferente entre os grupos (Tabela 10).

Tabela 10: Glutathiona reduzida e oxidada em aorta

	CO	EB	EM	EA
GSH (nmol/mg proteína)	0,0026±0,0022	0,0056±0,0001*	0,0070±0,0001*	0,0056±0,0001*
GSSG (nmol/mg proteína)	0,0094±0,0037	0,0018±0,0001*	0,0030±0,0003*	0,0026±0,00021*
GSH/GSSG (estado redox)	0,67±0,27	1,76±0,51*	1,41±0,35*	1,71±0,65*
Glutathionas Totais (nmol/mg prot)	0,011±0,008	0,006±0,001	0,02±0,01#	0,011±0,005

* $P < 0,05$ vs CO; # $< 0,05$ vs EB. Dados apresentados como média ± desvio padrão. Grupo controle=CO; grupo tratado com estrogênio alta dose = EA; grupo tratado com estrogênio dose intermediária = EM; grupo tratado com estrogênio baixa dose = EB, N= 7 animais por grupo.

5.4.5 - Nitritos totais

A concentração plasmática de nitritos totais (em mmol/L) apresentou-se significativamente ($P < 0,05$) maior em todos os grupos tratados com estrogênio (EB = $0,231 \pm 0,034$; EM = $0,237 \pm 0,068$; EA = $0,215 \pm 0,023$), quando comparado ao grupo controle (CO = $0,126 \pm 0,04$; Figura 13).

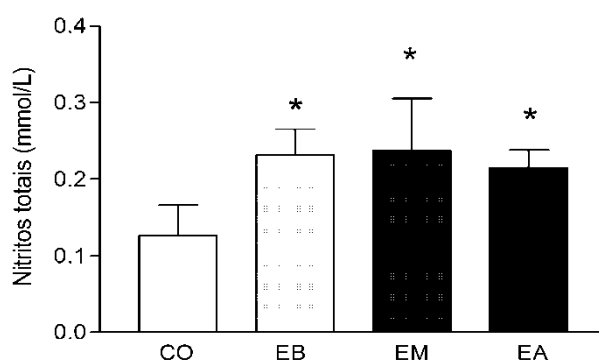


Figura 13: Concentração plasmática de nitritos totais. * $P < 0,05$ vs CO; # $< 0,05$ vs EB. Dados apresentados como média \pm desvio padrão. Grupo controle=CO; grupo tratado com estrogênio alta dose = EA; grupo tratado com estrogênio dose intermediária = EM; grupo tratado com estrogênio baixa dose = EB, N= 9 animais por grupo.

5.4.6 - Atividade da enzima NADPH Oxidase

A atividade da enzima NADPH oxidase (em nmol/g de peso seco), em aorta, apresentou-se significativamente menor ($P < 0,01$) nos grupos tratados estrogênio (EB = 22838 ± 3636 , EM = 17195 ± 7090 , EA = 7470 ± 2850) quando comparados ao CO (37750 ± 9900 ; Figura 14).

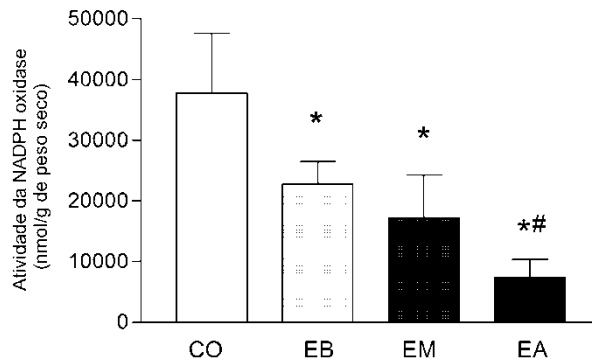


Figura 14: Atividade da enzima NADPH Oxidase em aorta. *P<0,05 vs CO; #P<0,05 vs EB. Dados apresentados como média \pm desvio padrão. Grupo controle=CO; grupo tratado com estrogênio alta dose = EA; grupo tratado com estrogênio dose intermediária = EM; grupo tratado com estrogênio baixa dose = EB, N= 9 animais por grupo.

5.4.7 - Expressão protéica de Gp91phox, Trx e p-Akt/Akt total

Não observamos diferença significativa, entre os grupos, na expressão da subunidade Gp91phox da enzima NADPH oxidase (em% de pixels, CO=92 \pm 14; EB=114 \pm 9; EM=89 \pm 10; EA=91 \pm 13; Figura 15), avaliada em aorta.

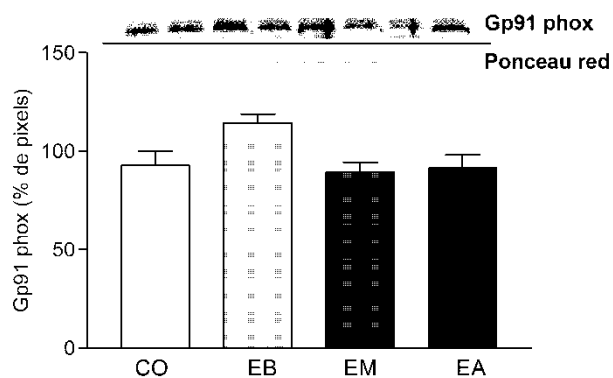


Figura 15: Expressão protéica da Gp91phox. Western blot em homogeneizados de aorta utilizando anticorpo Gp91phox. Um gel representante mostrando duas

bandas para cada grupo experimental. Dados apresentados como média \pm desvio padrão. Grupo controle=CO; grupo tratado com estrogênio alta dose = EA; grupo tratado com estrogênio dose intermediária = EM; grupo tratado com estrogênio baixa dose = EB. N= 4 animais por grupo.

Por outro lado, o tratamento com estrogênio reduziu de forma significativa ($P < 0,05$) a expressão da Trx (em% de pixels CO=150 \pm 36; EB=80 \pm 20; EM=62 \pm 20; EA=80 \pm 14; Figura 16) , avaliada em aorta.

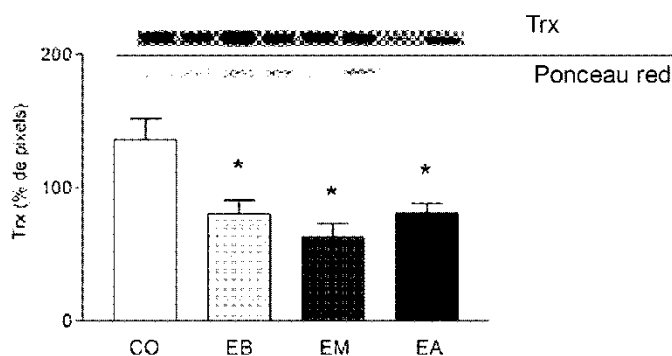


Figura 16: Expressão protéica da Trx. Western blot em homogeneizados de aorta utilizando anticorpo Trx. Um gel representante mostrando duas bandas para cada grupo experimental.* $P < 0,05$ vs CO. Dados apresentados como média \pm desvio padrão. Grupo controle=CO; grupo tratado com estrogênio alta dose = EA; grupo tratado com estrogênio dose intermediária = EM; grupo tratado com estrogênio baixa dose = EB. . N= 4 animais por grupo.

Além disso, a relação p-Akt/Akt total foi significativamente ($P < 0,05$) maior nos grupos tratados (EB=109 \pm 19; EM=94 \pm 6; EA=128 \pm 9), quando comparado ao grupo controle (CO = 66 \pm 13; Figura 17), avaliada em aorta.

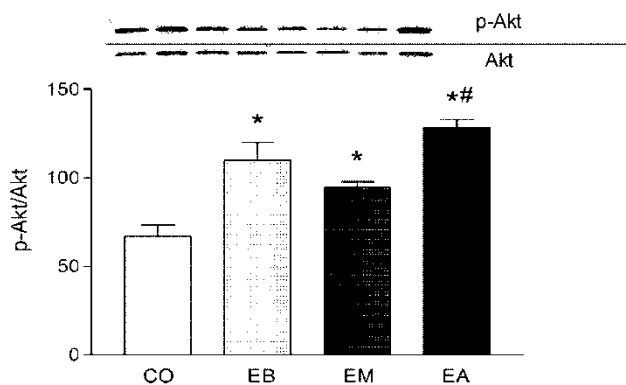


Figura 17: relação p-Akt/Akt total. Western blot em homogeneizados de aorta utilizando anticorpo p-Akt e Akt. Um gel representante mostrando duas bandas para cada grupo experimental. *P<0,05 vs; #P<0,05 vs EM. Dados apresentados como média \pm desvio padrão. Grupo controle=CO; grupo tratado com estrogênio alta dose = EA; grupo tratado com estrogênio dose intermediária = EM; grupo tratado com estrogênio baixa dose = EB. N= 4 animais por grupo.

6- DISCUSSÃO CONCLUSIVA

A menopausa está associada com um estado hipoestrogênico que provoca alterações fisiológicas acompanhadas de um aumentado risco para doenças cardiovasculares (Stramba-Badiale et al., 2006). E, apesar dos indesejáveis efeitos adversos especialmente por aumentar o risco de câncer, sabe-se que a TE é ainda muito utilizada por mulheres para tratar vários sintomas típicos dessa fase da vida (Abdel-Dayem and Elgendy, 2009). Por essa razão, e considerando que baixas doses de estrogênio são mais seguras com relação ao seu efeito adverso de maior gravidade, o câncer de mama (Lundstrom et al., 2001; Miller et al., 1996), nós estudamos os efeitos cardiovasculares de diferentes doses desse hormônio na regulação da PA e estresse oxidativo em um modelo animal de ratas Wistar castradas.

Neste estudo, a efetividade do tratamento com estrogênio foi confirmada por meio de avaliações hormonais e morfométricas. Observou-se um aumento no peso uterino de acordo com a cada dose de estrogênio administrada.

Como esperado, nossos resultados demonstraram uma redução da PAM em todos os protocolos de TE utilizados neste estudo. Esses resultados estão de acordo com estudos anteriores documentando uma diminuição da PA após tratamento com estrogênio (Elias et al., 1982; Li et al., 2004).

Além disso, no protocolo II, tanto a alta quanto a dose intermediária de estrogênio, provocou uma diminuição significativa na PDFVE, sem alteração na PSVE nos grupos tratados. Este resultado indica que o tratamento com estrogênio pode estar facilitando o relaxamento ventricular que resulta na redução da pressão diastólica sem alterar a pressão sistólica. Esses resultados

em conjunto com a redução da PAM indicam que provavelmente o aumento da biodisponibilidade do NO seja responsável pela maior facilidade em promover o relaxamento da musculatura vascular e cardíaca nos animais sob TE, uma vez que a disponibilidade do NO foi significativamente maior em todas as doses utilizadas.

De fato, dados da literatura demonstram que o tratamento com estrogênio pode evitar o aumento da PDFVE por aumentar a atividade da NOS no coração (Nuedling et al., 1999) e nos vasos (Hinojosa-Laborde et al., 2000; Rossouw et al., 2007). Esse achado concorda com o estudo de Prendergast e colaboradores que demonstraram que o NO favorece o relaxamento da musculatura tanto do miocárdio (Prendergast et al., 1997), quanto lisa dos vasos (Busconi and Michel, 1993). Nosso resultado está de acordo com o estudo de Nekoeian and Pang (1998), que também documentou uma diminuição na PDFVE em ratos tratados com estrogênio. Essa redução da PDFVE observada nos grupos tratados sugere um relaxamento dos vasos possivelmente provocado pelo aumento do NO nesses animais. Esse resultado foi comprovado pela $+dP/dt$, um índice de contratilidade do miocárdio e pela $-dP/dt$, um índice de relaxamento do miocárdio, os quais não diferiram significativamente entre os grupos, demonstrando que a contração cardíaca não foi prejudicada.

No terceiro protocolo, onde foram estudadas três doses de estrogênio: EA, EM e EB, não encontramos uma diferença significativa na FC e na PAS entre os grupos. Esses resultados estão de acordo com os estudos de He e colaboradores (1999) e Masi e colaboradores (2006) que também não demonstraram alterações nestes parâmetros após o tratamento com

estrogênio. No entanto, também neste protocolo, nós observamos uma diminuição significativa na PAM e PAD em todos os grupos tratados. Nossos resultados concordam com estudos anteriores documentando uma diminuição da PAM após TE (Elias et al., 1982; He et al., 1999). Estes achados foram confirmados por Magness e Rosenfeld (1989) que também demonstraram uma redução na PAM e no tônus vascular. A diminuição observada na PAM dos animais tratados foi devido à redução na PAD, indicando que o estrogênio, independentemente da dose, induziu uma diminuição da resistência periférica total nos grupos tratados. É muito bem estabelecido na literatura que, em animais (Hayashi et al., 1992) e em humanos (Wellman et al., 1996), o estrogênio tem um papel vasodilatador (He et al., 1999) e que a vasodilatação induzida por estrogênio é mediada por NO (Haynes et al., 2000), reafirmando o que foi discutido anteriormente.

Além disso, nos experimentos realizados no protocolo I, observou-se que a injeção de AngII provocou um aumento significativamente maior da PAM no grupo tratado com estrogênio. Este achado sugere que a TE provavelmente aumenta a expressão de receptores AT1 nas paredes dos vasos, possivelmente pela diminuição da AngII circulante nesses grupos que favorece a formação de mais receptores. Esta conclusão é embasada na literatura (Auch-Schwelk et al., 1989) que demonstra uma maior sensibilidade pressora para AngII em ratos tratados com estrogênio.

Nosso resultado é confirmado ainda pela menor resposta depressora ao Losartan observada no grupo EA. A redução dessa resposta sugere uma menor participação da AngII, via receptor AT1, na modulação da PA, pois quanto menos AngII na circulação, menor será a resposta depressora quando o

seu receptor é bloqueado. Este fenômeno poderia ser explicado pelo fato de que a redução da concentração AngII aumentaria a expressão de receptores AT1, já que os receptores são, por si só, sujeitos a regulação fisiológica. Quando uma reduzida concentração extracelular de um mensageiro é mantida durante algum tempo, o número total de receptores da célula alvo para esse mensageiro pode ser aumentado (Nunes and Braga, 2011). O bloqueio farmacológico dos receptores AT1 foi também confirmado através da ausência de resposta pressora à AngII pós-injeção de Losartan.

Esses achados estão de acordo com outros estudos relatando que a atividade da AngII é modulada pelo estrogênio (Karjalainen et al., 2004), e que a atividade da enzima conversora de angiotensina é maior em aortas de ratas ovariectomizadas (Dean et al., 2005). Ademais, de acordo com a literatura, a atividade da enzima conversora de angiotensina diminui após 4 semanas de administração de estradiol (Florian et al., 2004), indicando que o estrogênio pode modular a formação de AngII na circulação. O aumento da biodisponibilidade de NO e a menor PA, associados ao possível aumento dos receptores AT1, podem explicar porque a vasoconstrição foi mais intensa após a injeção de AngII no grupo EA do que no CO.

Observamos também que, no protocolo I, houve uma redução na VPA no grupo EA, indicando uma melhora no controle da PA após a TE. Este resultado provavelmente se deva a uma diminuição da modulação simpática tanto cardíaca como vascular. Esta associação é fundamentada pela diminuição nos componentes LF da VFC e da VPA, que representam a modulação simpática cardíaca e vascular, respectivamente. No entanto, não foram observadas alterações na sensibilidade barorreflexa espontânea

determinada pelo índice α LF. Estes resultados podem ser explicados pelo fato de que o componente LF, ou modulação simpática da PA, estava diminuído após a TE. Em conjunto, a redução da LF e a HF inalterada não são favoráveis para uma melhora do barorreflexo. Estes resultados estão de acordo com Vongpatanasin e colaboradores (2001) que também demonstraram que o tratamento com estrogênio não teve nenhum efeito detectável sobre a sensibilidade do barorreflexo, verificado também através desse índice.

Além disso, nossos resultados demonstram que o estrogênio não afetou significativamente a FC basal e a VFC no protocolo I, apesar de melhorar o balanço autonômico cardíaco. O fato da variabilidade total da FC não ter sido alterada significativamente, mas ter havido redução tanto no componente simpático (LF) normalizado quanto absoluto, indica uma mudança no padrão autonômico em favor da modulação parassimpática cardíaca. Por outro lado, Neves e colaboradores (2007) demonstraram um aumento na VFC em mulheres na pós-menopausa tratadas com estrogênio. Provavelmente a dose, e o tempo de tratamento, bem como o grande desvio padrão observado, poderiam explicar as diferenças encontradas nos resultados. De fato, no grupo tratado, houve uma redução na relação LF/HF, indicando uma melhora na modulação autonômica após o tratamento com estrogênio. Esse resultado é confirmado pela diminuição relativa da componente LF, representada pela LFnu ou modulação simpática percentual, e um aumento correspondente na modulação parassimpática, como demonstrado por HFnu. Da mesma forma, resultados semelhantes foram relatados em humanos (Grodstein et al., 1997; Mercurio et al., 2000; Neves et al., 2007) e em modelos experimentais tratados com estrogênio (El-Mas and Abdel-Rahman, 2009), mostrando que este

hormônio causa uma redução na componente LF e um aumento na HF. Além disso, Mercurio e colaboradores (2000) demonstraram uma associação inversa entre hormônios sexuais femininos e atividade do sistema simpático e concentração de noradrenalina no plasma de mulheres na menopausa.

No protocolo II não verificamos mudanças na FC. No entanto, como esperado, nosso estudo demonstrou que a VFC foi significativamente maior nos grupos tratados. Este resultado destaca a eficácia do tratamento com estrogênio, mesmo com uma dose menor, para melhorar a VFC. A VFC é geralmente considerada um importante índice da modulação autonômica cardíaca (Montano et al., 1994) e, concordando com nossos resultados, Liu e colaboradores (2004) documentaram que a TE é capaz de melhorar a modulação simpato-vagal cardíaca provocada pela menopausa.

Os resultados de VFC diferem entre os protocolos I e II provavelmente devido ao fato de, que no protocolo II, as medidas foram realizadas no animal anestesiado e o cateter estava localizado no ventrículo. No entanto, no protocolo I as ratas estavam conscientes e com livre movimentação pela caixa durante o registro da pressão realizado na artéria. Nesse caso, a livre movimentação pode ter sido responsável pelo grande desvio padrão observado nesse grupo que impediu a detecção de uma diferença estatisticamente significativa na VFC. De uma maneira geral é consenso na literatura que a TE melhora a VFC.

No protocolo II, em que os animais estavam anestesiados, não encontramos alterações significativas em LF, LFnu, HFnu e LF/HF entre os grupos. Estes resultados são consistentes com Schuchert e colaboradores (2002) que também demonstraram resultados semelhantes após o tratamento

com estrogênio. Por outro lado, a modulação parassimpática foi significativamente maior nos grupos tratados com estrogênio o que provavelmente representou a causa do aumento da VFC nesses animais.

Alem disso, no segundo protocolo encontramos uma correlação positiva entre a VFC e o TRAP, sugerindo que um aumento na capacidade antioxidante pode estar contribuindo para uma melhora na VFC. Essa correlação suporta a hipótese de que a administração de estrogênio pode ser útil para melhorar o equilíbrio simpato-vagal cardíaco via redução de estresse oxidativo. De fato, Semen e colaboradores (2010) observaram que a atenuação de sinais de estresse oxidativo resulta em uma melhora nos parâmetros da VFC. Ademais, dados da literatura têm confirmado que a TE é acompanhada por um aumento do TRAP, resultando em uma melhora do estado antioxidante (Darabi et al., 2010).

Assim como no protocolo I, no protocolo III também observamos uma diminuição significativa na VPAS nos grupos tratados. Este resultado indica que a TE melhora o controle da PA e concorda com Head e colaboradores (2004) que também observaram uma menor VPAS na presença desse hormônio. No nosso estudo, a melhora no controle da PA provavelmente se deva a diminuição da modulação simpática para os vasos uma vez que o componente LF, associada à modulação simpática vascular, foi reduzido após o tratamento com estrogênio. Nossos achados também concordam com El-Mas e Abdel-Rahman (2009) que observaram redução no componente LF da PAS em ratos tratados com estrogênio. Nossos achados destacam a eficácia do estrogênio, mesmo em dose baixa, para diminuir a participação do sistema nervoso simpático e da variabilidade da PA. Este resultado tem forte impacto

na ocorrência de eventos cardiovasculares, uma vez que pacientes com PAS normal, mas com alta variabilidade, apresentam um maior risco para o aparecimento de doenças cardiovasculares (Rothwell et al., 2010).

Além disso, está bem estabelecido na literatura que o sistema nervoso simpático (SNS) é estimulado pela AngII (Grodstein et al., 1996). Por sua vez, a AngII também é um potente estimulador de EROS (Ferrario, 1983) via NADPH oxidase, reduzindo a biodisponibilidade do NO. Se o NO exerce uma inibição tônica na atividade do SNS, é razoável acreditar que sob estresse oxidativo a atividade simpática também esteja aumentada. De fato, no protocolo I nós encontramos uma correlação positiva entre o componente LF e a atividade da NADPH oxidase, o que pode ter contribuído para um aumento na formação de ânion superóxido. Dessa forma, a diminuição na produção de superóxido, observada no grupo EA, poderia também estar reduzindo a participação do SNS (Abdel-Dayem and Elgendy, 2009) no controle da PA, e vice-versa.

Além disso, é bem documentado que as NADPH/NADH oxidases são consideradas as mais importantes fontes de ânion superóxido na parede dos vasos (Florian et al., 2004; Strehlow et al., 2003). AngII induz a geração de ânion superóxido via ativação da NADPH oxidase em células endoteliais vasculares (Karjalainen et al., 2004). Uma vez que o estrogênio reduz as concentrações de AngII (Yanes et al., 2010), é compreensível que nossos resultados mostrem também uma redução na atividade NADPH oxidase, como observado nos protocolos I e III em todas as doses testadas.

No protocolo II foi demonstrada uma diminuição significativa nas concentrações de EROS como ânion superóxido e peróxido de hidrogênio no coração dos animais tratados. Estes resultados concordam com um estudo de

Lam e colaboradores (2006) que demonstrou um aumento significativo na produção de ânion superóxido em ratas ovariectomizadas, enquanto que o tratamento com estrogênio preveniu significativamente esses efeitos. Além disso, já está bem estabelecido que o estrogênio pode exercer seus efeitos antioxidantes através do grupo hidroxila fenólico presente em sua molécula, que pode atuar como um varredor de EROS (Behl et al., 1997). Nossos resultados sugerem que o estrogênio, mesmo em doses baixas, é capaz de atuar como um antioxidante diminuindo as concentrações de EROS, como demonstrado pela redução das concentrações de anion superóxido e peróxido de hidrogênio em todos os grupos tratados.

No terceiro protocolo, também verificamos uma diminuição significativa na atividade da NADPH oxidase. Este resultado possivelmente venha a apresentar grande impacto na saúde da mulher, uma vez que a dose baixa de estrogênio também foi capaz de diminuir a produção de ânion superóxido. Além disso, de acordo com Wagner e colaboradores (2001), o 17β -estradiol poderia inibir a expressão da gp91phox em células endoteliais humanas. Em nosso estudo não encontramos diferenças entre os grupos na expressão da gp91phox, uma subunidade da NADPH oxidase. Este resultado provavelmente se deva ao tempo de tratamento e o estado redox celular, importantes para influenciar a expressão dessa subunidade da NADPH oxidase. Coletivamente, o aumento da biodisponibilidade de NO e a concentração reduzida de EROS indicam que houve uma melhora no balanço de espécies reativas de nitrogênio/oxigênio em todos os grupos tratados. De fato, nós observamos uma correlação negativa entre nitritos totais, que são metabólitos do NO, e atividade da NADPH oxidase.

Além disso, o presente estudo documentou, no terceiro protocolo, o aumento na fosforilação da Akt em todos os animais tratados com estrogênio. Segundo a literatura, o estrogênio ativa a NOS endotelial através da via da Akt, promovendo a produção de NO também no coração (Simoncini et al., 2000). Assim, um aumento na fosforilação da Akt é importante para um aumento da NOS endotelial induzida por estrogênio. Confirmando esta idéia, observamos um aumento significativo dos metabólitos do NO em todos os grupos tratados, sugerindo que o estrogênio mais uma vez, independentemente da dose administrada, foi capaz de ativar a Akt e aumentar a biodisponibilidade de NO.

Neste sentido, GSH e GSH/GSSG, um importante índice do equilíbrio redox (Lenfant et al., 2003), também foram significativamente maiores nos grupos tratados. Este resultado indica que houve uma redução do estresse oxidativo após o tratamento com estrogênio mesmo na baixa dose. Nossos dados estão de acordo com o estudo realizado por Baeza e colaboradores (2010), que também demonstrou a capacidade do estrogênio em diminuir o estresse oxidativo de ratas ovariectomizadas.

O presente estudo também investigou se uma dose intermediária de 17- β estradiol seria capaz de aumentar a atividade das enzimas antioxidantes no coração (protocolo II). O que observamos foi que as atividades das enzimas SOD e CAT foram significativamente maiores nos grupos tratados com estrogênio. Estes resultados estão coesos com os demais dados de estresse desse estudo e também estão de acordo com outros da literatura, que mostraram que o estradiol aumenta a atividade da CAT (Gomez-Zubeldia et al., 2002) e da SOD, além de diminuir a atividade da enzima NADPH oxidase e a

produção de superóxido (Gomez-Zubeldia et al., 2002; Ji et al., 2007; Miller et al., 2007).

Ainda corroborando com todos os resultados acima discutidos, tanto no tecido cardíaco quanto na aorta a razão GSH/GSSG também foi significativamente maior nos animais tratados (protocolo III). Este resultado indica que houve uma redução no estresse oxidativo vascular desses animais. Esse achado foi confirmado em todos os grupos tratados com estrogênio pela diminuição significativa da GSSG e pelo aumento da GSH, ficando claro mais uma vez que a baixa dose da TE foi tao eficiente quanto as demais doses.

Além disso, a Trx-1 também tem sido sugerida como um marcador de estresse oxidativo (Nakamura et al., 1997). Haendeler e colaboradores (2004) demonstraram que no estresse oxidativo moderado houve um aumento significativo da expressão protéica de Trx-1 em células endoteliais. De fato, nos grupos tratados, a presença de estrogênio fornece uma proteção contra o estresse oxidativo e reduz a expressão da Trx-1. Como a Trx-1 participa de um complexo sistema envolvido na detoxificação do peróxido de hidrogênio (Drechsel and Patel, 2010), a sua redução pode ser uma conseqüência da redução das EROS. Nossos dados mostraram claramente que o tratamento com estrogênio foi capaz de diminuir a concentração de peróxido de hidrogênio na aorta de uma maneira dose-dependente. Coletivamente, estes resultados explicam os efeitos benéficos do estrogênio como um antioxidante agindo como um varredor de EROS. Assim, a dose mais baixa de estrogênio foi tão eficaz como a maior dose utilizada neste estudo para melhorar o balanço entre espécies reativas de nitrogênio/oxigênio provavelmente através de uma redução da participacao da AngII na regulação da PA e da formação de EROS.

Com isso, favoreceu o aumento na biodisponibilidade de NO. Estas mudanças podem ter influenciado a redução do tônus simpático para os vasos sanguíneos (Stauss et al., 2000), contribuindo para a melhora no BSV.

Em conjunto, nossas observações indicam que a TE foi eficaz para diminuir a participação da AngII e melhorar o equilíbrio NO/EROS. Possivelmente esses benefícios foram decisivos para aumentar a biodisponibilidade do NO e melhorar o BSV.

No nosso estudo ficam claros os benefícios da baixa dose de estrogênio que devem ser levados em conta quando se considera a terapia de reposição hormonal. Uma vez que baixas doses de estrogênio podem ser mais seguras no que diz respeito aos efeitos colaterais, mais estudos são necessários para demonstrar claramente esta eficácia e segurança, não só para prevenir as doenças cardiovasculares, o câncer de mama bem como melhorar todos os sintomas decorrentes do climatério.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Dayem MM, Elgendy MS. 2009. Effects of chronic estradiol treatment on the thyroid gland structure and function of ovariectomized rats. *BMC Res Notes* 2:173.
- Aebi H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121-126.
- Akerboom TP, Sies H. 1981. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol* 77:373-382.
- Alvarez Y, Briones AM, Hernanz R, Perez-Giron JV, Alonso MJ, Salaices M. 2008. Role of NADPH oxidase and iNOS in vasoconstrictor responses of vessels from hypertensive and normotensive rats. *Br J Pharmacol* 153(5):926-935.
- Arias E. 2011. United States life tables, 2007. *Natl Vital Stat Rep* 59(9):1-60.
- Auch-Schwelk W, Katusic ZS, Vanhoutte PM. 1989. Contractions to oxygen-derived free radicals are augmented in aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 13(6 Pt 2):859-864.
- Baeza I, Fdez-Tresguerres J, Ariznavarreta C, De la Fuente M. 2010. Effects of growth hormone, melatonin, oestrogens and phytoestrogens on the oxidized glutathione (GSSG)/reduced glutathione (GSH) ratio and lipid peroxidation in aged ovariectomized rats. *Biogerontology* 11(6):687-701.
- Barranco-Medina S, Krell T, Finkemeier I, Sevilla F, Lazaro JJ, Dietz KJ. 2007. Biochemical and molecular characterization of the mitochondrial peroxiredoxin PsPrxII F from *Pisum sativum*. *Plant Physiol Biochem* 45(10-11):729-739.
- Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. 1990. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(4):1620-1624.
- Beckman JS, Chen J, Ischiropoulos H, Crow JP. 1994. Oxidative chemistry of peroxynitrite. *Methods Enzymol* 233:229-240.
- Behl C, Skutella T, Lezoualc'h F, Post A, Widmann M, Newton CJ, Holsboer F. 1997. Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: structure-activity relationship. *Mol Pharmacol* 51(4):535-541.
- Belon AP, Barros MB. 2011. Reduction of social inequalities in life expectancy in a city of Southeastern Brazil. *Int J Equity Health* 10(1):36.
- Bohr DF, Dominiczak AF, Webb RC. 1991. Pathophysiology of the vasculature in hypertension. *Hypertension* 18(5 Suppl):III69-75.
- Boveris A. 1984. Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. *Methods Enzymol* 105:429-435.
- Boveris A, Chance B. 1973. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 134(3):707-716.
- Brandes RP, Weissmann N, Schroder K. 2010. NADPH oxidases in cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med* 49(5):687-706.
- Busconi L, Michel T. 1993. Endothelial nitric oxide synthase. N-terminal myristoylation determines subcellular localization. *J Biol Chem* 268(12):8410-8413.
- Campbell SE, Febbraio MA. 2002. Effect of the ovarian hormones on GLUT4 expression and contraction-stimulated glucose uptake. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282(5):E1139-1146.

- Cavasin MA, Sankey SS, Yu AL, Menon S, Yang XP. 2003. Estrogen and testosterone have opposing effects on chronic cardiac remodeling and function in mice with myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284(5):H1560-1569.
- Celermajer DS, Sorensen KE, Spiegelhalter DJ, Georgakopoulos D, Robinson J, Deanfield JE. 1994. Aging is associated with endothelial dysfunction in healthy men years before the age-related decline in women. *J Am Coll Cardiol* 24(2):471-476.
- Colditz GA. 1998. Relationship between estrogen levels, use of hormone replacement therapy, and breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 90(11):814-823.
- Cooley RL, Montano N, Cogliati C, van de Borne P, Richenbacher W, Oren R, Somers VK. 1998. Evidence for a central origin of the low-frequency oscillation in RR-interval variability. *Circulation* 98(6):556-561.
- Cosentino F, Sill JC, Katusic ZS. 1994. Role of superoxide anions in the mediation of endothelium-dependent contractions. *Hypertension* 23(2):229-235.
- Dampney RA. 1994. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. *Physiol Rev* 74(2):323-364.
- Dantas AP, Tostes RC, Fortes ZB, Costa SG, Nigro D, Carvalho MH. 2002. In vivo evidence for antioxidant potential of estrogen in microvessels of female spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 39(2 Pt 2):405-411.
- Darabi M, Ani M, Movahedian A, Zarean E, Panjehpour M, Rabbani M. 2010. Effect of hormone replacement therapy on total serum anti-oxidant potential and oxidized LDL/beta2-glycoprotein I complexes in postmenopausal women. *Endocr J* 57(12):1029-1034.
- Dean SA, Tan J, O'Brien ER, Leenen FH. 2005. 17beta-estradiol downregulates tissue angiotensin-converting enzyme and ANG II type 1 receptor in female rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288(3):R759-766.
- Dias DP, Oliveira M, Salgado HC, Fazan R, Jr. 2010. Ovariectomy does not affect the cardiac sympathovagal balance of female SHR but estradiol does. *Braz J Med Biol Res* 43(10):969-975.
- Dominiczak AF, Bohr DF. 1996. Nitric oxide and hypertension in 1995. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 5(2):174-180.
- Drechsel DA, Patel M. 2010. Respiration-dependent H₂O₂ removal in brain mitochondria via the thioredoxin/peroxiredoxin system. *J Biol Chem* 285(36):27850-27858.
- El-Mas MM, Abdel-Rahman AA. 2009. Longitudinal assessment of the effects of oestrogen on blood pressure and cardiovascular autonomic activity in female rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 36(10):1002-1009.
- Elias AN, Meshkinpour H, Valenta LJ. 1982. Attenuation of hypertension by conjugation estrogens. *Nephron* 30(1):89-92.
- Evelson P, Travacio M, Repetto M, Escobar J, Llesuy S, Lissi EA. 2001. Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. *Arch Biochem Biophys* 388(2):261-266.
- Ferrario CM. 1983. Neurogenic actions of angiotensin II. *Hypertension* 5(6 Pt 3):V73-79.
- Florian M, Freiman A, Magder S. 2004. Treatment with 17-beta-estradiol reduces superoxide production in aorta of ovariectomized rats. *Steroids* 69(13-14):779-787.
- Ford PC, Wink DA, Stanbury DM. 1993. Autoxidation kinetics of aqueous nitric oxide. *FEBS Lett* 326(1-3):1-3.

- Furlan R, Diedrich A, Rimoldi A, Palazzolo L, Porta C, Diedrich L, Harris PA, Sleight P, Biagioni I, Robertson D, Bernardi L. 2003. Effects of unilateral and bilateral carotid baroreflex stimulation on cardiac and neural sympathetic discharge oscillatory patterns. *Circulation* 108(6):717-723.
- Gairard B, Guldenfels C, Haehnel P, Mathelin C. 2009. [Breast density: a major parameter to follow during hormone replacement therapy]. *Gynecol Obstet Fertil* 37(7-8):657-660.
- Gillman MW, Kannel WB, Belanger A, D'Agostino RB. 1993. Influence of heart rate on mortality among persons with hypertension: the Framingham Study. *Am Heart J* 125(4):1148-1154.
- Giordano FJ. 2005. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest* 115(3):500-508.
- Gladwin MT, Crawford JH, Patel RP. 2004. The biochemistry of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin: role in blood flow regulation. *Free Radic Biol Med* 36(6):707-717.
- Gomez-Zubeldia MA, Corrales S, Arbues J, Nogales AG, Millan JC. 2002. Influence of estradiol and gestagens on oxidative stress in the rat uterus. *Gynecol Oncol* 86(3):250-258.
- Granger DL, Anstey NM, Miller WC, Weinberg JB. 1999. Measuring nitric oxide production in human clinical studies. *Methods Enzymol* 301:49-61.
- Granger DL, Taintor RR, Boockvar KS, Hibbs JB, Jr. 1996. Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. *Methods Enzymol* 268:142-151.
- Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. 2000. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 86(5):494-501.
- Grodstein F, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Manson JE, Joffe M, Rosner B, Fuchs C, Hankinson SE, Hunter DJ, Hennekens CH, Speizer FE. 1997. Postmenopausal hormone therapy and mortality. *N Engl J Med* 336(25):1769-1775.
- Grodstein F, Stampfer MJ, Manson JE, Colditz GA, Willett WC, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH. 1996. Postmenopausal estrogen and progestin use and the risk of cardiovascular disease. *N Engl J Med* 335(7):453-461.
- Haendeler J, Tischler V, Hoffmann J, Zeiher AM, Dimmeler S. 2004. Low doses of reactive oxygen species protect endothelial cells from apoptosis by increasing thioredoxin-1 expression. *FEBS Lett* 577(3):427-433.
- Hayashi T, Fukuto JM, Ignarro LJ, Chaudhuri G. 1992. Basal release of nitric oxide from aortic rings is greater in female rabbits than in male rabbits: implications for atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(23):11259-11263.
- Haynes MP, Sinha D, Russell KS, Collinge M, Fulton D, Morales-Ruiz M, Sessa WC, Bender JR. 2000. Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells. *Circ Res* 87(8):677-682.
- He XR, Wang W, Crofton JT, Share L. 1999. Effects of 17beta-estradiol on the baroreflex control of sympathetic activity in conscious ovariectomized rats. *Am J Physiol* 277(2 Pt 2):R493-498.
- Head GA, Obeyesekere VR, Jones ME, Simpson ER, Krozowski ZS. 2004. Aromatase-deficient (ArKO) mice have reduced blood pressure and baroreflex sensitivity. *Endocrinology* 145(9):4286-4291.
- Hermenegildo C, Oviedo PJ, Cano A. 2006. Cyclooxygenases regulation by estradiol on endothelium. *Curr Pharm Des* 12(2):205-215.

- Hinojosa-Laborde C, Lange DL, Haywood JR. 2000. Role of female sex hormones in the development and reversal of dahl hypertension. *Hypertension* 35(1 Pt 2):484-489.
- Hong MK, Romm PA, Reagan K, Green CE, Rackley CE. 1992. Effects of estrogen replacement therapy on serum lipid values and angiographically defined coronary artery disease in postmenopausal women. *Am J Cardiol* 69(3):176-178.
- Ji H, Zheng W, Menini S, Pesce C, Kim J, Wu X, Mulrone SE, Sandberg K. 2007. Female protection in progressive renal disease is associated with estradiol attenuation of superoxide production. *Gend Med* 4(1):56-71.
- Kannel WB, Wilson PW. 1995. Risk factors that attenuate the female coronary disease advantage. *Arch Intern Med* 155(1):57-61.
- Karjalainen AH, Ruskoaho H, Vuolteenaho O, Heikkinen JE, Backstrom AC, Savolainen MJ, Kesaniemi YA. 2004. Effects of estrogen replacement therapy on natriuretic peptides and blood pressure. *Maturitas* 47(3):201-208.
- Khalil RA. 2005. Sex hormones as potential modulators of vascular function in hypertension. *Hypertension* 46(2):249-254.
- Klein D, Kern RM, Sokol RZ. 1995. A method for quantification and correction of proteins after transfer to immobilization membranes. *Biochem Mol Biol Int* 36(1):59-66.
- Lam KK, Lee YM, Hsiao G, Chen SY, Yen MH. 2006. Estrogen therapy replenishes vascular tetrahydrobiopterin and reduces oxidative stress in ovariectomized rats. *Menopause* 13(2):294-302.
- Lenfant C, Chobanian AV, Jones DW, Roccella EJ. 2003. Seventh report of the Joint National Committee on the Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure (JNC 7): resetting the hypertension sails. *Hypertension* 41(6):1178-1179.
- Li J, Li W, Su J, Liu W, Altura BT, Altura BM. 2004. Peroxynitrite induces apoptosis in rat aortic smooth muscle cells: possible relation to vascular diseases. *Exp Biol Med (Maywood)* 229(3):264-269.
- Liochev SI, Fridovich I. 1997. Lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a mediator of superoxide anion production. *Arch Biochem Biophys* 337(1):115-120.
- Lopez-Ruiz A, Sartori-Valinotti J, Yanes LL, Iliescu R, Reckelhoff JF. 2008. Sex differences in control of blood pressure: role of oxidative stress in hypertension in females. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295(2):H466-474.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1):265-275.
- Lundstrom E, Wilczek B, von Palffy Z, Soderqvist G, von Schoultz B. 2001. Mammographic breast density during hormone replacement therapy: effects of continuous combination, unopposed transdermal and low-potency estrogen regimens. *Climacteric* 4(1):42-48.
- Luoto R. 2009. Hot flushes and quality of life during menopause. *BMC Womens Health* 9:13.
- MacRitchie AN, Jun SS, Chen Z, German Z, Yuhanna IS, Sherman TS, Shaul PW. 1997. Estrogen upregulates endothelial nitric oxide synthase gene expression in fetal pulmonary artery endothelium. *Circ Res* 81(3):355-362.
- Magness RR, Rosenfeld CR. 1989. Local and systemic estradiol-17 beta: effects on uterine and systemic vasodilation. *Am J Physiol* 256(4 Pt 1):E536-542.
- Malliani A, Pagani M, Lombardi F, Cerutti S. 1991. Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. *Circulation* 84(2):482-492.

- Mancia G, Omboni S, Parati G. 2000. The importance of blood pressure variability in hypertension. *Blood Press Monit* 5 Suppl 1:S9-S15.
- Marklund SL. 1985. Superoxide dismutase isoenzymes in tissues and plasma from New Zealand black mice, nude mice and normal BALB/c mice. *Mutat Res* 148(1-2):129-134.
- Masi CM, Hawkey LC, Berry JD, Cacioppo JT. 2006. Estrogen metabolites and systolic blood pressure in a population-based sample of postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 91(3):1015-1020.
- Matthews KA, Meilahn E, Kuller LH, Kelsey SF, Caggiula AW, Wing RR. 1989. Menopause and risk factors for coronary heart disease. *N Engl J Med* 321(10):641-646.
- Matys T, Pawlak R, Kucharewicz I, Chabielska E, Buczko W. 2000. Hypotensive effect of angiotensin II after AT1-receptor blockade with losartan. *J Physiol Pharmacol* 51(1):161-166.
- McCabe PM, Porges SW, Carter CS. 1981. Heart period variability during estrogen exposure and withdrawal in female rats. *Physiol Behav* 26(3):535-538.
- Mehta PK, Griendling KK. 2007. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* 292(1):C82-97.
- Mendelsohn ME, Karas RH. 1999. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med* 340(23):1801-1811.
- Mercuro G, Podda A, Pitzalis L, Zoncu S, Mascia M, Melis GB, Rosano GM. 2000. Evidence of a role of endogenous estrogen in the modulation of autonomic nervous system. *Am J Cardiol* 85(6):787-789, A789.
- Miller AA, Drummond GR, Mast AE, Schmidt HH, Sobey CG. 2007. Effect of gender on NADPH-oxidase activity, expression, and function in the cerebral circulation: role of estrogen. *Stroke* 38(7):2142-2149.
- Miller VM, Barber DA, Fenton AM, Wang X, Sieck GC. 1996. Gender differences in response to endothelin-1 in coronary arteries: transcription, receptors and calcium regulation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 23(3):256-259.
- Moncada S, Higgs A. 1993. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329(27):2002-2012.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43(2):109-142.
- Montano N, Ruscone TG, Porta A, Lombardi F, Pagani M, Malliani A. 1994. Power spectrum analysis of heart rate variability to assess the changes in sympathovagal balance during graded orthostatic tilt. *Circulation* 90(4):1826-1831.
- Montgomery JC, Studd JW. 1991. Psychological and sexual aspects of the menopause. *Br J Hosp Med* 45(5):300-302.
- Morris SM, Jr., Billiar TR. 1994. New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am J Physiol* 266(6 Pt 1):E829-839.
- Nakamura H, Nakamura K, Yodoi J. 1997. Redox regulation of cellular activation. *Annu Rev Immunol* 15:351-369.
- Nekoeian AA, Pang CC. 1998. Estrogen restores role of basal nitric oxide in control of vascular tone in rats with chronic heart failure. *Am J Physiol* 274(6 Pt 2):H2094-2099.
- Neves VF, Silva de Sa MF, Gallo L, Jr., Catai AM, Martins LE, Crescencio JC, Perpetuo NM, Silva E. 2007. Autonomic modulation of heart rate of young and

- postmenopausal women undergoing estrogen therapy. *Braz J Med Biol Res* 40(4):491-499.
- Nickenig G, Baumer AT, Grohe C, Kahlert S, Strehlow K, Rosenkranz S, Stablein A, Beckers F, Smits JF, Daemen MJ, Vetter H, Bohm M. 1998. Estrogen modulates AT1 receptor gene expression in vitro and in vivo. *Circulation* 97(22):2197-2201.
- Nordberg J, Arner ES. 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 31(11):1287-1312.
- Nuedling S, Kahlert S, Loebbert K, Doevendans PA, Meyer R, Vetter H, Grohe C. 1999. 17 Beta-estradiol stimulates expression of endothelial and inducible NO synthase in rat myocardium in-vitro and in-vivo. *Cardiovasc Res* 43(3):666-674.
- Nunes FC, Braga VA. 2011. Chronic angiotensin II infusion modulates angiotensin II type I receptor expression in the subfornical organ and the rostral ventrolateral medulla in hypertensive rats. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 12(4):440-445.
- Onal B, Levin RM, Kogan BA, Guven A, Leggett RE, Mannikarottu AS. 2007. Novel alterations in superoxide dismutase and catalase activities in the female rabbit bladder subjected to hormonal manipulations. *Int Urol Nephrol* 39(4):1049-1054.
- Ouyang P, Michos ED, Karas RH. 2006. Hormone replacement therapy and the cardiovascular system lessons learned and unanswered questions. *J Am Coll Cardiol* 47(9):1741-1753.
- Paravicini TM, Touyz RM. 2006. Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc Res* 71(2):247-258.
- Petrofsky JS, Lohman E, Lohman T. 2009. A device to evaluate motor and autonomic impairment. *Med Eng Phys* 31(6):705-712.
- Pick E, Keisari Y. 1980. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods* 38(1-2):161-170.
- Prendergast BD, Sagach VF, Shah AM. 1997. Basal release of nitric oxide augments the Frank-Starling response in the isolated heart. *Circulation* 96(4):1320-1329.
- Reckelhoff JF, Fortepiani LA. 2004. Novel mechanisms responsible for postmenopausal hypertension. *Hypertension* 43(5):918-923.
- Rosano GM, Vitale C, Fini M. 2009. Cardiovascular aspects of menopausal hormone replacement therapy. *Climacteric* 12 Suppl 1:41-46.
- Rossouw JE, Prentice RL, Manson JE, Wu L, Barad D, Barnabei VM, Ko M, LaCroix AZ, Margolis KL, Stefanick ML. 2007. Postmenopausal hormone therapy and risk of cardiovascular disease by age and years since menopause. *Jama* 297(13):1465-1477.
- Rothwell PM, Howard SC, Dolan E, O'Brien E, Dobson JE, Dahlof B, Sever PS, Poulter NR. 2010. Prognostic significance of visit-to-visit variability, maximum systolic blood pressure, and episodic hypertension. *Lancet* 375(9718):895-905.
- Sartorio CL, Fraccarollo D, Galuppo P, Leutke M, Ertl G, Stefanon I, Bauersachs J. 2007. Mineralocorticoid receptor blockade improves vasomotor dysfunction and vascular oxidative stress early after myocardial infarction. *Hypertension* 50(5):919-925.
- Schuchert A, Liebau M, Behrens G, Mueck AO, Meinertz T. 2002. [Are the acute effects of transdermal estradiol in postmenopausal women with coronary disease related to changes of the autonomic tone?]. *Z Kardiol* 91(2):156-160.

- Schurmann R, Holler T, Benda N. 2004. Estradiol and drospirenone for climacteric symptoms in postmenopausal women: a double-blind, randomized, placebo-controlled study of the safety and efficacy of three dose regimens. *Climacteric* 7(2):189-196.
- Semen KO, Yelisyeyeva OP, Kaminsky DV, Cherkas AP, Zarkovic K, Lutsyk O, Cipak A, Jaganjac M, Zarkovic N. 2010. Interval hypoxic training in complex treatment of *Helicobacter pylori*-associated peptic ulcer disease. *Acta Biochim Pol* 57(2):199-208.
- Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, Ley K, Chin WW, Liao JK. 2000. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 407(6803):538-541.
- Soriani M, Pietraforte D, Minetti M. 1994. Antioxidant potential of anaerobic human plasma: role of serum albumin and thiols as scavengers of carbon radicals. *Arch Biochem Biophys* 312(1):180-188.
- Souza HC, Ballejo G, Salgado MC, Da Silva VJ, Salgado HC. 2001. Cardiac sympathetic overactivity and decreased baroreflex sensitivity in L-NAME hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280(2):H844-850.
- Stauss HM. 2007. Identification of blood pressure control mechanisms by power spectral analysis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34(4):362-368.
- Stauss HM, Godecke A, Mrowka R, Schrader J, Persson PB. 1999. Enhanced blood pressure variability in eNOS knockout mice. *Hypertension* 33(6):1359-1363.
- Stauss HM, Nafz B, Mrowka R, Persson PB. 2000. Blood pressure control in eNOS knock-out mice: comparison with other species under NO blockade. *Acta Physiol Scand* 168(1):155-160.
- Stramba-Badiale M, Fox KM, Priori SG, Collins P, Daly C, Graham I, Jonsson B, Schenck-Gustafsson K, Tendera M. 2006. Cardiovascular diseases in women: a statement from the policy conference of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 27(8):994-1005.
- Strehlow K, Rotter S, Wassmann S, Adam O, Grohe C, Laufs K, Bohm M, Nickenig G. 2003. Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. *Circ Res* 93(2):170-177.
- Sugden PH, Clerk A. 2001. Akt like a woman: gender differences in susceptibility to cardiovascular disease. *Circ Res* 88(10):975-977.
- Tanaka T, Nakamura H, Yodoi J, Bloom ET. 2005. Redox regulation of the signaling pathways leading to eNOS phosphorylation. *Free Radic Biol Med* 38(9):1231-1242.
- Tremollieres FA, Pouilles JM, Cauneille C, Ribot C. 1999. Coronary heart disease risk factors and menopause: a study in 1684 French women. *Atherosclerosis* 142(2):415-423.
- van de Borne P, Montano N, Pagani M, Oren R, Somers VK. 1997. Absence of low-frequency variability of sympathetic nerve activity in severe heart failure. *Circulation* 95(6):1449-1454.
- van de Weijer PH, Mattsson LA, Ylikorkala O. 2007. Benefits and risks of long-term low-dose oral continuous combined hormone therapy. *Maturitas* 56(3):231-248.
- Vongpatanasin W, Tuncel M, Mansour Y, Arbique D, Victor RG. 2001. Transdermal estrogen replacement therapy decreases sympathetic activity in postmenopausal women. *Circulation* 103(24):2903-2908.
- Wagner AH, Schroeter MR, Hecker M. 2001. 17beta-estradiol inhibition of NADPH oxidase expression in human endothelial cells. *Faseb J* 15(12):2121-2130.

- Wellman GC, Bonev AD, Nelson MT, Brayden JE. 1996. Gender differences in coronary artery diameter involve estrogen, nitric oxide, and Ca(2+)-dependent K⁺ channels. *Circ Res* 79(5):1024-1030.
- World CJ, Yamawaki H, Berk BC. 2006. Thioredoxin in the cardiovascular system. *J Mol Med (Berl)* 84(12):997-1003.
- Xue B, Singh M, Guo F, Hay M, Johnson AK. 2009. Protective actions of estrogen on angiotensin II-induced hypertension: role of central nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297(5):H1638-1646.
- Yanes LL, Romero DG, Ilescu R, Zhang H, Davis D, Reckelhoff JF. 2010. Postmenopausal hypertension: role of the Renin-Angiotensin system. *Hypertension* 56(3):359-363.
- Yang ZZ, Tschopp O, Baudry A, Dummler B, Hynx D, Hemmings BA. 2004. Physiological functions of protein kinase B/Akt. *Biochem Soc Trans* 32(Pt 2):350-354.
- Ylikorkala O, Orpana A, Puolakka J, Pyorala T, Viinikka L. 1995. Postmenopausal hormonal replacement decreases plasma levels of endothelin-1. *J Clin Endocrinol Metab* 80(11):3384-3387.
- Yung LM, Wong WT, Tian XY, Leung FP, Yung LH, Chen ZY, Yao X, Lau CW, Huang Y. 2011. Inhibition of renin-angiotensin system reverses endothelial dysfunction and oxidative stress in estrogen deficient rats. *PLoS One* 6(3):e17437.
- Zacharieva S, Kirilov G, Kalinov K, Shigarminova R, Nachev E, Orbetzova M, Atanassova I. 2002. Effect of different hormone replacement therapy regimens on circadian blood pressure profile and active renin in postmenopausal women. *Gynecol Endocrinol* 16(6):461-467.
- Zielonka J, Sikora A, Joseph J, Kalyanaraman B. 2010. Peroxynitrite is the major species formed from different flux ratios of co-generated nitric oxide and superoxide: direct reaction with boronate-based fluorescent probe. *J Biol Chem* 285(19):14210-14216.

ANEXOS:

Anexo I: Artigo referente ao protocolo I

Estrogen treatment improves sympathovagal balance and oxidative stress in rats

Cristina Campos¹; Karina Rabello Casali²; Mariane Bertagnolli¹; Rafaela Siqueira¹;
Adriane Belló-Klein¹; Katya Rigatto³.

1- Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre - RS - Brasil; 2 -Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS - Brasil; 3- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre - RS - Brasil.

Corresponding author:

Katya Rigatto Ph.D.

E-mail address: krigatto@gmail.com

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Sarmento Leite, 245 – Cidade Baixa - Porto Alegre, Brasil

CEP: 90050-170

Telephone number: 55 (51) 3303-8753

ABSTRACT

This study was conducted to determine if estrogen treatment improves the sympathovagal balance (SVB) through an improvement in reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) balance. 4-month-old ovariectomized female Wistar rats (n=9/group) were divided in two groups: control (CO; sunflower oil pellets) and animals treated with estrogen for 21 days (ES; 0.5 mg/estrogen pellet). Blood pressure (BP) measurements and the autonomic nervous system modulation, evaluated by spectral analysis of heart rate variability, were performed. Then, rats received an angiotensin II bolus injection (1µg/Kg, i.v.) followed by losartan (30 mg/Kg, i.v.) and, after ten minutes, a second dose of AngII was injected. Aorta and blood were collected to measure NADPH oxidase activity, total nitrites, and estrogen levels. ES group showed a significant decrease in BP and an improvement in the SVB (P<0.05). We found a significant (P<0.05) increase in BP after angiotensin II and a decrease after losartan injections in ES group. NADPHox activity (in nmol/g dry weight) was decreased in ES group (7475±2866 vs. 37347±9976). Total plasma nitrites was significantly higher in ES group (P<0.05).

In conclusion, the findings of this study demonstrate that estrogen treatment represents an improvement of autonomic modulation, being potentially beneficial in reducing cardiovascular risk.

KEY WORDS: Hormone treatment; reactive oxygen species; autonomic nervous system, NADPH oxidase, blood pressure, heart rate variability, Angiotensin II.

INTRODUCTION

Experimental and clinical studies have suggested that estrogen has protective effects on the cardiovascular system (Ouyang et al., 2006; Barton et al., 2007). The incidence of cardiovascular disease (CVD) increases sharply after menopause (Hong et al., 1992) and the estrogen treatment CVD prevents the development (Rossouw et al., 2007).

Moreover, the overall effect seems estrogen to be reducing angiotensin II (AngII) activity (Schunkert et al., 1997). In postmenopausal women, the estrogen deficiency is accompanied by an increase in AngII, considered a major contributor to the CVD (Mendelsohn and Karas, 1999). Estrogens are also reported to have a role in free radical scavenging, being wellness important to reduce AT1 receptor expression, NADPH oxidase activity (Wing et al., 2009), and to increase nitric oxide (NO) production (Lam et al., 2006).

The oxidative stress associated to menopause been has implicated in the pathophysiology of CVD, such as hypertension, coronary heart disease and atherosclerosis (Wenger et al., 1993, Hu et al., 2000; Stramba-Badiale et al., 2006). In addition, there studies documenting that estrogens are potent antioxidants (Ayres et al., 1996; Shwaery et al., 1997). The antioxidant common mechanisms involve the estrogen superoxide anion formation inhibition (Vanhoutte, 1997; Ayres et al., 1998) and lipid peroxidation by scavenging reduction reactive oxygen species (ROS) (Ayres et al., 1998).

On the other hand, that it has been postulated estrogen therapy restores total antioxidant capacity, leading to an improvement in NO-mediated vasodilatation in ovariectomized rats (Vanhoutte, 1997, Cave et al., 2006). NO deficiency has been

associated with several CVD including hypertension, atherosclerosis and heart failure (Taddei et al., 1996). Studies have suggested that the direct estrogen action on endothelial cells may contribute to excellent protective effects (Dantas et al., 1999; Viridis et al., 2000). For example, the vasodilatory effects of estrogen are related to excellent increasing effect synthesis and release NO (Cicinelli et al., 1998). These results are confirmed by some investigators who have demonstrated an increase in plasma NO concentration in women with estrogen treated (Taddei et al., 1996, Chen et al., 1999, Mendelsohn and Karas, 1999).

Moreover, it has demonstrated been that, during menopause, estrogen deficiency causes a decrease in endothelium-dependent relaxation (Panza, 1997). The NO regulates cardiovascular autonomic function through excellent neuromodulatory activity to improve the sympathovagal balance (SVB) (Chowdhary and Townend, 1999). The spectral analysis is a simple method that would allow the physicians and outside researchers to collect information about autonomic nervous system (ANS) in Patients. An improvement in the ANS modulation could potentially adverse reduce the risk for cardiovascular events (Gillman et al., 1993), and may be clinically relevant. In fact, the estrogen levels is declined associated with an impairment on SVB (Moodithaya and Avadhany, 2009) and its increase reduces sympathetic tone (Vongpatanasin et al., 2001). Furthermore, it is very well established after menopause that increases the blood pressure, baroreflex sensitivity decreases, contributing to the increase CVD (Schunkert et al., 1997, Hu et al., 2000).

We hypothesized that estrogen therapy ameliorates ROS and NO balance. This estrogenic effect would improve the SVB and decrease AngII participation.

MATERIALS AND METHODS

Animals and groups:

In total, 18 female Wistar rats (four months old, weighting 180-250g) from the Federal University of Rio Grande do Sul Were studied. They Were Kept at 20-22 ° C and with a 12:12 h dark / light photoperiod, and were subjected to bilateral ovariectomy performed according to the procedure of Baker & Warenn (1966). After one week, they received silastic capsules that were filled with 17 β -estradiol in sesame oil (5mg/100 μ L) or sesame oil as a vehicle. Were subcutaneously implanted capsules (one capsule for 21 days / animal). The animals were divided into two experimental groups: control group (CO, n = 9), and estrogen replacement group (S, N = 9). All animals had access to water and regular rodent chow ad libitum and the experiments were approved by the institutional animal care and conducted in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (1996, published by National Academy Press, 2101 Constitution Ave NW, Washington, DC 20055, USA).

Cardiovascular Evaluations:

24 hours before the experiment, under ketamine hydrochloride (80 mg / kg ip; Lab König SA, SP, Brazil) and xylazine anesthesia (16 mg / kg IP, ip Virbac from Brazil, SP, Brazil), two catheters (PE-10) were filled with saline implanted in the carotid artery and jugular vein, for blood pressure measurement and drugs administration, respectively. The arterial catheter was attached to 20-cm PE-90 tubing connected to a strain-gauge transducer (Narco Bio-Systems Miniature Pressure Transducer RP 1500) for direct measurements of blood pressure (BP) and HR in conscious animals. After animals were allowed to acclimate, BP signals were recorded for 20 min. with a microcomputer equipped with an analog-to-digital converter board

(codas, 1 kHz, DATAQ Instruments, Akron, OH). After the cardiovascular evaluations, rats were killed by decapitation and the uterus was harvested and weighed. Blood was collected to measure hormone concentrations and total nitrites, and the aorta was excised to evaluate NADPH / NADH oxidase activities.

Autonomic evaluation

Time series of pulse intervals (PI, tachograms) and systolic arterial pressure (SAP, systograms) were obtained from blood pressure records. Stationary fragments with about 300 beats, tachogram and coincident in systogram, were selected and spectral analysis was performed using an autoregressive model. The spectral bands for rats (very low frequency, VLF: 0.0-0.2 Hz, LF: 0.2-0.75 Hz, HF: 0.75-3.0 Hz) defined were according to previous references (Malliani et al., 1991). Tachogram systogram spectra and, for each stationary fragment, were evaluated quantitatively and values of heart rate variability (HRV) and SAP variability (SAPV) were obtained. HR oscillations at high frequency (HF) reflects parasympathetic modulation, while low frequency oscillations (LF) are considered to an index of cardiac sympathetic modulation to the heart. Among the parameters obtained by spectral analysis, those distinguished for physiological their significance are the relationship between the powers of LF and HF components of HRV - the LF / HF index - or sympathetic-vagal balance (Montano et al., 2009), and the absolute power of the LF component of SAPV, related to vascular sympathetic modulation (Stauss, 2007). Power spectral components are also reported the normalized units (nu) at low and high frequencies. Moreover, the relationship expressed by the root of the ratio between the absolute powers of LF components of HRV and SAPV - the LF alpha index - is known to express spontaneous baroreflex sensitivity (Fazan et al., 2005).

Losartan and Angiotensin II infusions

After baseline blood pressure and heart rate measurements, it was performed the AngII bolus injection (1µg/Kg). After the blood pressure returned to base line levels, the AT1 receptor antagonist (losartan 30mg/Kg) was injected, and after an interval of ten minutes, the second dose of AngII was injected to confirm the AT1 receptor blockade (Matys et al. , 2000).

Determination of NADH / NADPH oxidase Activities

NADH / NADPH oxidase activities were evaluated through the superoxide anion production in aortic ring segments using lucigenin-enhanced chemiluminescence the described previously (Pick and Keisari, 1980).

NO Metabolites

Total were determined in plasma nitrites. To convert nitrate to nitrite, samples were incubated with enzymatic cofactors and nitrate reductase (1.75U/mL; Sigma, St. Louis, MO) for 30 minutes at room temperature. The reaction was finished by the addition of the Griess reagent. The final obtained colored substance was determined spectrophotometrically at 542nm (Griendling et al., 2000).

Statistical Analysis

The data shown are the mean \pm standard deviation. Comparisons between the two groups studied were performed by using the Student t-test. The Pearson correlation was used to assess the association between variables in the two groups. Significantly the level was established at $P < 0.05$.

RESULTS

Ovariectomy and estradiol therapy

The 17- β estradiol treatment significantly ($P<0.001$) decreased the body weight and increased estrogen serum concentration and uterine weight ($P<0.05$) (Table 1).

Angiotensin II injection and AT1 blockade effects over BP

BP was significantly lower in ES group but heart rate did not change after estrogen treatment. AngII injection caused a significant increase in BP. On the other hand, losartan induced a drop in BP and totally blunted the AngII hypertensive effect. Moreover, the AngII injection administered after losartan did not change BP (Table 2).

NADH/NADPH oxidase activities and total nitrites

Total nitrites (umol/L), measured in plasma, were significantly higher ($P<0.05$) in ES group (0.23 ± 0.03) than CO (0.12 ± 0.07 ; Figure 1). The NADH oxidase activity (nmol/g dry weight), measured in aorta, was significantly lower ($P<0.001$) in ES group (27536 ± 11036) than CO (66996 ± 10085 ; Figure 2). Similarly, NADPH oxidase activity (nmol/g dry weight) was significantly lower ($P<0.05$) in ES group (7475 ± 2866) than CO (37747 ± 9977 ; Figure 3). Moreover, we had observed a negative correlation between total nitrites and NADPH oxidase activity ($P<0.001$; $r=-0.976$).

Autonomic evaluations

HF nu was significantly higher ($P<0.05$) in ES group than CO. There was a significant decrease ($P<0.05$) in LF, LF/HF ratio and LFnu in ES group, as compared to CO. On the other hand, there was no difference in α_{LF} index, HRV and HF between groups. HRV did not show any statistically significant change after estrogen treatment.

LF components of HRV and SAPV were decreased in ES group (Table 3). Furthermore, we demonstrated a positive correlation between LF and NADPH oxidase activity ($P < 0.05$; $r = 0.902$).

DISCUSSION

We have demonstrated that estrogen treatment 1) and BP decreases ROS production, 2) Increases angiotensin II-induced pressure response and NO metabolites, and 3) Improves sympatovagal balance.

In this study, the estrogen treatment was confirmed by means of hormone and morphometric measurements (Table 1). Our results are in agreement with previous studies documenting that have been a decrease in blood pressure in women (Elias et al., 1982), and in experimental model (Liu et al., 2005) treated with estrogen. Few studies did not find changes in cardiovascular parameters after estrogen therapy. For example, Hernandez et al (1998) demonstrated in rats that estrogen therapy was not efficient to decrease BP, and other studies (Trial, 1995, Hulley et al., 1998), in a follow up 4 years of estrogen treatment, demonstrated in that women did not estrogen reduce coronary heart disease. According to Masood et al (2010) these discrepancies in the results could be related to the act, fri that could change the hormone synthesis and metabolism, the vascular estrogen receptor subtypes, structure, expression, distribution, and signaling pathways in the endothelium and vascular smooth muscle, along with limiting factors related to the design of randomized clinical trials and preexisting CVD condition. Therefore, the meticulous analysis of this context should identify the causes of the changes in the vascular effects of estrogen with age. More studies are necessary to determine the best way to treat each woman with less adverse effects.

In the present study, we observed that the AngII injection provoke a significant increase in bp in es compared to control group. This finding suggests that probably estrogen replacement up-regulates the expression AT1 receptors in the vessel walls probably due to a decrease in serum anгий levels in this group. Thus, the sensitivity to

AngII is probably bigger in estrogen treated rats (Vanhoutte, 1997). This hypothesis is reinforced by the depressor response caused by losartan injection which was smaller in ES group and confirms the decrease in AngII participation through AT1 receptor on BP regulation. Moreover, the effectiveness of AT1 receptor blockade was confirmed by no changes in BP after a second injection of AngII. Our findings are in agreement with other studies which reported that Ang II activity is modulated by estrogen (Karjalainen et al., 2004), and angiotensin conversor enzyme (ACE) activity is increased in aortas of ovariectomized rats. The ACE activity decreases following 4 weeks estradiol administration (Harvey et al., 1999), indicating that estrogen can modulate AngII formation. In addition, the increase in NO bioavailability and a lower BP found in ES group can explain why the vasoconstriction was more intense after AngII injection in ES group than in CO.

Moreover, it is well documented that NADPH/NADH oxidases are considered the most important sources of superoxide anion in the vessel wall (Florian et al., 2004; Wassmann et al., 2005). Ang II induces superoxide anion generation via NADPH oxidase activation in vascular endothelial cells (Karjalainen et al., 2004). Since estrogen reduces AngII levels (Zhang et al., 1999), it is completely understandable that our results showed also a reduction in NADPH oxidase activity in ES group. Additionally, an increased ROS production is linked to a decrease in NO bioavailability (Bello-Klein et al., 2001). In fact, we also observed an increase in NO bioavailability after estrogen treatment and a negative correlation between total nitrites and NADPH oxidase activity. Collectively, these results indicate that estrogen probably is improving the NO/ROS balance.

In agreement to these conclusions, we also observed a decrease in SAPV in ES group. This decrease indicates an improvement in BP control after estrogen treatment

probably due to a decrease in sympathetic modulation to the vessels. This association is supported by the decrease in the LF component of SAPV, which represents the sympathetic modulation to the heart. However, no changes were observed in HF and baroreflex sensitivity. These results could be explained by the fact that LF component of BP was decreased after estrogen treatment. Together, the reduction in LF with no change in HF are not favorable for baroreflex improvement. These results are in agreement to Vongpatanasin et al (2001) who also found that estrogen treatment had no detectable effect on baroreflex sensitivity seen as α LF index.

In addition, our results demonstrate that estrogen did not affect basal HR, but improves the autonomic balance of HR. In the ES group, there was a reduction in the sympathetic modulation as seen by the reduction of LFa values. In fact, the normalized LF and HF, and also the LF/HF ratio indicate an improvement in autonomic modulation after estrogen treatment. It was demonstrated in ES group a relative decrease in LFnu, or the sympathetic modulation, and a corresponding increase in the parasympathetic modulation, as demonstrated by HFnu. Likewise, similar findings have been reported in women (Grodstein et al., 1997; Mercuro et al., 1999; Neves et al., 2007) and in animal models (El-Mas and Abdel-Rahman, 2009) treated with estrogen. These results demonstrate that there was a decrease in LF and LF/HF ratio with the estrogen treated group. In fact, Mercuro et al (1999) demonstrated an association between female sex hormones and sympathetic system activity. In their study, it was showed higher norepinephrine levels in plasma of postmenopausal women.

We also have to point out that HRV was not significantly different between the two groups. As mentioned above, this result is probably due to a significant decrease in sympathetic tonus, as observed in LFa and LFnu data after estrogen treatment. It is known that, when there is a decrease in LF and/or HF absolute values, usually the HRV

does not change significantly (Ferrario, 1983; Neves et al., 2007). On the other hand, although the HRV decreases with aging, Neves et al (2007) demonstrated an increase in HRV in postmenopausal women treated with estrogen. Probably the dose and time of treatment, as well the species, could explain the differences found in the results.

It is well established that AngII stimulates sympathetic nervous system (SNS) (Grodstein et al., 1996) and it is a potent ROS stimulator (Ferrario, 1983), reducing NO bioavailability. Since NO exerts a tonic inhibition on central SNS activity, it is reasonable to believe that under oxidative stress the sympathetic activity is also increased. In fact, we did find a positive correlation between LF and NADPH oxidase activity, suggesting that increased sympathetic activity may be contributing to superoxide anion formation. The decrease in superoxide production, seen in ES group, may reduce the SNS participation (Ye et al., 1997) on BP control.

In addition, besides the fact that estrogen increases NO bioavailability, our results also agree with Stefano et al (2000) who demonstrated that estradiol directly reduced the sympathetic tonus centrally. It is very well established in the literature that estrogen receptors are located in areas related to cardiovascular control, such as the nucleus of solitarii tractus, paraventricular nucleus, and preoptic area.

Collectively, our observations indicate that estrogen therapy was effective to improve the sympathovagal and NO/ROS balance, possibly through an increase in NO bioavailability. Moreover, the complex interactions between vascular function, inflammatory process and angiogenesis should be further examined by a customized approach for each individual patient in order to enhance the vascular benefits of estrogen therapy in postmenopausal CVD.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to acknowledge CNPq (Brazilian agency).

REFERENCES

Ayres S, Abplanalp W, Liu JH and Subbiah MT. 1998. Mechanisms involved in the protective effect of estradiol-17beta on lipid peroxidation and DNA damage. *Am J Physiol* 274:E1002-1008.

Ayres S, Tang M and Subbiah MT. 1996. Estradiol-17beta as an antioxidant: some distinct features when compared with common fat-soluble antioxidants. *J Lab Clin Med* 128:367-375.

Barker KL and Warren JC. 1966. Estrogen control of carbohydrate metabolism in the rat uterus: pathways of glucose metabolism. *Endocrinology* 78:1205-1212.

Barton M, Meyer MR and Haas E. 2007. Hormone replacement therapy and atherosclerosis in postmenopausal women: does aging limit therapeutic benefits? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:1669-1672.

Bello-Klein A, Bock PM, Travacio M, Senna SM, Llesuy S, de Bittencourt PI, Jr., Irigoyen MC, Bello AA, Kumar D and Singal PK. 2001. Myocardial oxidative stress and antioxidants in hypertension as a result of nitric oxide synthase inhibition. *Cardiovasc Toxicol* 1:43-50.

Cave AC, Brewer AC, Narayanapanicker A, Ray R, Grieve DJ, Walker S and Shah AM. 2006. NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. *Antioxid Redox Signal* 8:691-728.

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

Chowdhary S and Townend JN. 1999. Role of nitric oxide in the regulation of cardiovascular autonomic control. *Clin Sci (Lond)* 97:5-17.

Cicinelli E, Ignarro LJ, Schonauer LM, Matteo MG, Galantino P and Balzano G. 1998. Effects of short-term transdermal estradiol administration on plasma levels of nitric oxide in postmenopausal women. *Fertil Steril* 69:58-61.

Dantas AP, Scivoletto R, Fortes ZB, Nigro D and Carvalho MH. 1999. Influence of female sex hormones on endothelium-derived vasoconstrictor prostanoid generation in microvessels of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 34:914-919.

El-Mas MM and Abdel-Rahman AA. 2009. Longitudinal assessment of the effects of oestrogen on blood pressure and cardiovascular autonomic activity in female rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 36:1002-1009.

Elias AN, Meshkinpour H and Valenta LJ. 1982. Attenuation of hypertension by conjugation estrogens. *Nephron* 30:89-92.

Fazan R, Jr., de Oliveira M, da Silva VJ, Joaquim LF, Montano N, Porta A, Chapleau MW and Salgado HC. 2005. Frequency-dependent baroreflex modulation of blood pressure and heart rate variability in conscious mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289:H1968-1975.

Ferrario CM. 1983. Neurogenic actions of angiotensin II. *Hypertension* 5:V73-79.

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

Gillman MW, Kannel WB, Belanger A and D'Agostino RB. 1993. Influence of heart rate on mortality among persons with hypertension: the Framingham Study. *Am Heart J* 125:1148-1154.

Griendling KK, Sorescu D and Ushio-Fukai M. 2000. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 86:494-501.

Grodstein F, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Manson JE, Joffe M, Rosner B, Fuchs C, Hankinson SE, Hunter DJ, Hennekens CH and Speizer FE. 1997. Postmenopausal hormone therapy and mortality. *N Engl J Med* 336:1769-1775.

Grodstein F, Stampfer MJ, Manson JE, Colditz GA, Willett WC, Rosner B, Speizer FE and Hennekens CH. 1996. Postmenopausal estrogen and progestin use and the risk of cardiovascular disease. *N Engl J Med* 335:453-461.

Harvey PJ, Wing LM, Savage J and Molloy D. 1999. The effects of different types and doses of oestrogen replacement therapy on clinic and ambulatory blood pressure and the renin-angiotensin system in normotensive postmenopausal women. *J Hypertens* 17:405-411.

Hernandez I, Delgado JL, Carbonell LF, Perez MC and Quesada T. 1998. Hemodynamic effect of 17 beta-estradiol in absence of NO in ovariectomized rats: role of angiotensin II. *Am J Physiol* 274:R970-978.

Hong MK, Romm PA, Reagan K, Green CE and Rackley CE. 1992. Effects of estrogen replacement therapy on serum lipid values and angiographically defined coronary artery disease in postmenopausal women. *Am J Cardiol* 69:176-178.

Hu FB, Stampfer MJ, Manson JE, Grodstein F, Colditz GA, Speizer FE and Willett WC. 2000. Trends in the incidence of coronary heart disease and changes in diet and lifestyle in women. *N Engl J Med* 343:530-537.

Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B and Vittinghoff E. 1998. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *Jama* 280:605-613.

Karjalainen AH, Ruskoaho H, Vuolteenaho O, Heikkinen JE, Backstrom AC, Savolainen MJ and Kesaniemi YA. 2004. Effects of estrogen replacement therapy on natriuretic peptides and blood pressure. *Maturitas* 47:201-208.

Lam KK, Lee YM, Hsiao G, Chen SY and Yen MH. 2006. Estrogen therapy replenishes vascular tetrahydrobiopterin and reduces oxidative stress in ovariectomized rats. *Menopause* 13:294-302.

Liu ML, Xu X, Xie P, Lu J, Chen SH, Zeng WM and Song HP. 2005. [Effects of long-term estrogen replacement treatment on the blood pressure and expression of IR and IRS-1 in myocardium]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 30:38-40, 56.

Malliani A, Pagani M, Lombardi F and Cerutti S. 1991. Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. *Circulation* 84:482-492.

Masood DE, Roach EC, Beauregard KG and Khalil RA. 2010. Impact of sex hormone metabolism on the vascular effects of menopausal hormone therapy in cardiovascular disease. *Curr Drug Metab* 11:693-714.

Matys T, Pawlak R, Kucharewicz I, Chabielska E and Buczko W. 2000. Hypotensive effect of angiotensin II after AT1-receptor blockade with losartan. *J Physiol Pharmacol* 51:161-166.

Mendelsohn ME and Karas RH. 1999. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med* 340:1801-1811.

Mercuro G, Longu G, Zoncu S and Cherchi A. 1999. Impaired forearm blood flow and vasodilator reserve in healthy postmenopausal women. *Am Heart J* 137:692-697.

Montano N, Porta A, Cogliati C, Costantino G, Tobaldini E, Casali KR and Iellamo F. 2009. Heart rate variability explored in the frequency domain: a tool to investigate the link between heart and behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 33:71-80.

Moodithaya SS and Avadhany ST. 2009. Comparison of cardiac autonomic activity between pre and post menopausal women using heart rate variability. *Indian J Physiol Pharmacol* 53:227-234.

NASPE T. 1996. Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. *Eur Heart J* 17:354-381.

Neves VF, Silva de Sa MF, Gallo L, Jr., Catai AM, Martins LE, Crescencio JC, Perpetuo NM and Silva E. 2007. Autonomic modulation of heart rate of young and postmenopausal women undergoing estrogen therapy. *Braz J Med Biol Res* 40:491-499.

Ouyang P, Michos ED and Karas RH. 2006. Hormone replacement therapy and the cardiovascular system lessons learned and unanswered questions. *J Am Coll Cardiol* 47:1741-1753.

Panza JA. 1997. Endothelial dysfunction in essential hypertension. *Clin Cardiol* 20:II-26-33.

Petrofsky JS, Lohman E and Lohman T. 2009. A device to evaluate motor and autonomic impairment. *Med Eng Phys* 31:705-712.

Pick E and Keisari Y. 1980. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods* 38:161-170.

Robinson BF, Epstein SE, Beiser GD and Braunwald E. 1966. Control of heart rate by the autonomic nervous system. Studies in man on the interrelation between baroreceptor mechanisms and exercise. *Circ Res* 19:400-411.

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

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

Shwaery GT, Vita JA and Keaney JF, Jr. 1997. Antioxidant protection of LDL by physiological concentrations of 17 beta-estradiol. Requirement for estradiol modification. *Circulation* 95:1378-1385.

Stauss HM. 2007. Identification of blood pressure control mechanisms by power spectral analysis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34:362-368.

Stefano GB, Prevot V, Beauvillain JC, Cadet P, Fimiani C, Welters I, Fricchione GL, Breton C, Lassalle P, Salzet M and Bilfinger TV. 2000. Cell-surface estrogen receptors mediate calcium-dependent nitric oxide release in human endothelia. *Circulation* 101:1594-1597.

Stramba-Badiale M, Fox KM, Priori SG, Collins P, Daly C, Graham I, Jonsson B, Schenck-Gustafsson K and Tendera M. 2006. Cardiovascular diseases in women: a statement from the policy conference of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 27:994-1005.

Taddei S, Viridis A, Ghiadoni L, Mattei P, Sudano I, Bernini G, Pinto S and Salvetti A. 1996. Menopause is associated with endothelial dysfunction in women. *Hypertension* 28:576-582.

Trial P. 1995. Effects of estrogen or estrogen/progestin regimens on heart disease risk factors in postmenopausal women. The Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Trial. The Writing Group for the PEPI Trial. *Jama* 273:199-208.

Vanhoutte PM. 1997. Endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Eur Heart J* 18 Suppl E:E19-29.

Viridis A, Ghiadoni L, Pinto S, Lombardo M, Petraglia F, Gennazzani A, Buralli S, Taddei S and Salvetti A. 2000. Mechanisms responsible for endothelial dysfunction associated with acute estrogen deprivation in normotensive women. *Circulation* 101:2258-2263.

Vongpatanasin W, Tuncel M, Mansour Y, Arbique D and Victor RG. 2001. Transdermal estrogen replacement therapy decreases sympathetic activity in postmenopausal women. *Circulation* 103:2903-2908.

Wassmann K, Wassmann S and Nickenig G. 2005. Progesterone antagonizes the vasoprotective effect of estrogen on antioxidant enzyme expression and function. *Circ Res* 97:1046-1054.

Wenger NK, Speroff L and Packard B. 1993. Cardiovascular health and disease in women. *N Engl J Med* 329:247-256.

Wing LY, Chen YC, Shih YY, Cheng JC, Lin YJ and Jiang MJ. 2009. Effects of oral estrogen on aortic ROS-generating and -scavenging enzymes and atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Exp Biol Med (Maywood)* 234:1037-1046.

Ye S, Nosrati S and Campese VM. 1997. Nitric oxide (NO) modulates the neurogenic control of blood pressure in rats with chronic renal failure (CRF). *J Clin Invest* 99:540-548.

Zhang H, Schmeisser A, Garlichs CD, Plotze K, Damme U, Mugge A and Daniel WG. 1999. Angiotensin II-induced superoxide anion generation in human vascular endothelial cells: role of membrane-bound NADH-/NADPH-oxidases. *Cardiovasc Res* 44:215-222.

TABLES

Table 1: Hormonal and morphometric data

	CO	ES
Serum estradiol levels (pg/mL)	61±8	1818±40*
Uterine weight	0.15±0.02	0.86±0.15*
Body weight	247±15	216±9*

*P<0.001 vs CO. Data are mean ± SD. Control group=CO; Estrogen-treated group=ES

Table 2: Heart rate, resting blood pressure and variations (Δ) after vasoactive drugs administration

	CO	ES
Rest Blood Pressure (mmHg)	121 \pm 8	113 \pm 5*
Heart rate (bpm)	332 \pm 30	341 \pm 25
Δ BP (mmHg) Responses to AngII (1 μ g/Kg)	44 \pm 4	56 \pm 4 \dagger
Δ BP (mmHg) Responses to Losartan (30mg/Kg)	-13 \pm 2	-6 \pm 1 \dagger
Δ BP (mmHg) Responses to AngII after losartan	0.06 \pm 0.05	0.09 \pm 0.04

* P<0.05 vs CO; \dagger P<0.001 vs CO. Data are mean \pm SD. Control group=CO; Estrogen-treated group=ES. Δ BP = BP variation before and after drug injection.

Table 3 - Cardiovascular parameters: Heart rate variability (HRV) and systolic arterial pressure variability (SAPV) analysis

(s ²)	CO	ES
HRV	18.38±6.94	21.86±19.84
LFa	3.45±1.78	1.17±1.04*
HFa	10.03±4.07	9.88±11.37
LF nu	27.65±4.67	11.94±3.42*
HF nu	77.30±9.15	87.79±3.83*
LF/HF ratio	0.24±0.09	0.14±0.05*
SAPV (mmHg ²)	18.85±15.08	8.19±4.07
LFa (mmHg ²)	5.32±4.34	1.55±0.77*
HFa (mmHg ²)	3.35±2.38	2.04±1.40
α_{LF} Index (s/mmHg)	0.86±0.36	0.86±0.31

*p<0,05 vs CO. Data are mean ± SD. Control group=CO; Estrogen-treated group=ES.

HRV=Heart rate variability; LF= Low frequency component; HF= High frequency component; a=absolute; nu= normalized; SAPV= Systolic arterial pressure variability; α_{LF} Index= spontaneous baroreflex sensitivity.

Figure caption:

Figure 1:

Total nitrites in plasma; *P<0.05 vs CO. Data are mean \pm SD. Control group=CO;

Estrogen-treated group=ES

Figure 2:

NADH oxidase activity in aorta; *P<0.001 vs CO. Data are mean \pm SD. Control group=CO;

Estrogen-treated group=ES

Figure 3:

NADPH oxidase activity in aorta; *P<0.05 vs CO. Data are mean \pm SD. Control group=CO;

Estrogen-treated group=ES

Figure 1

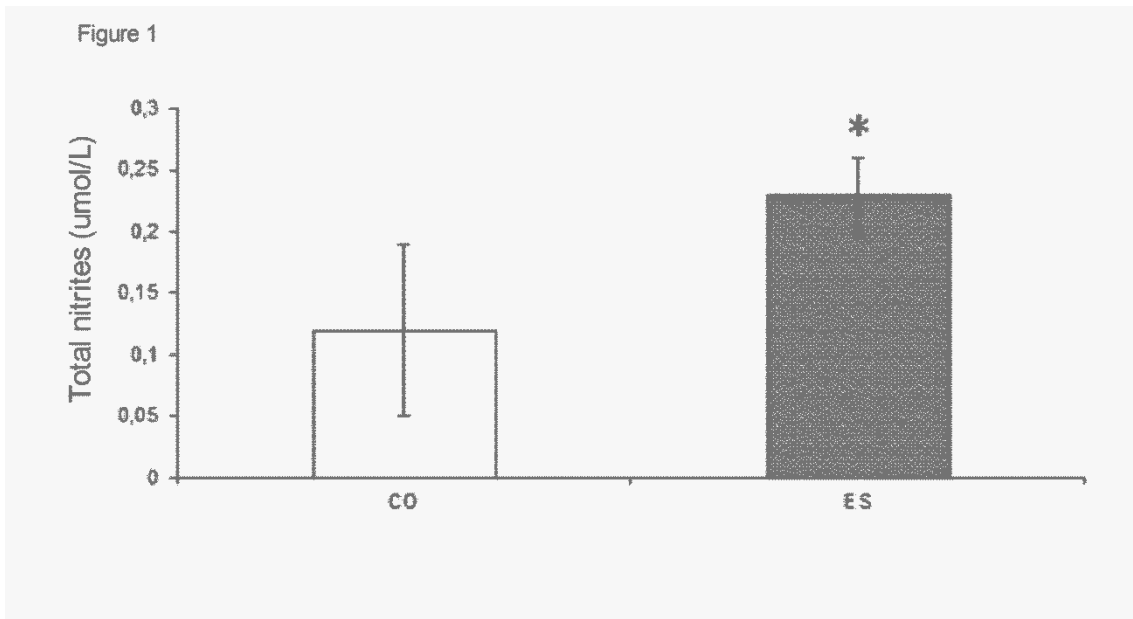


Figure 2

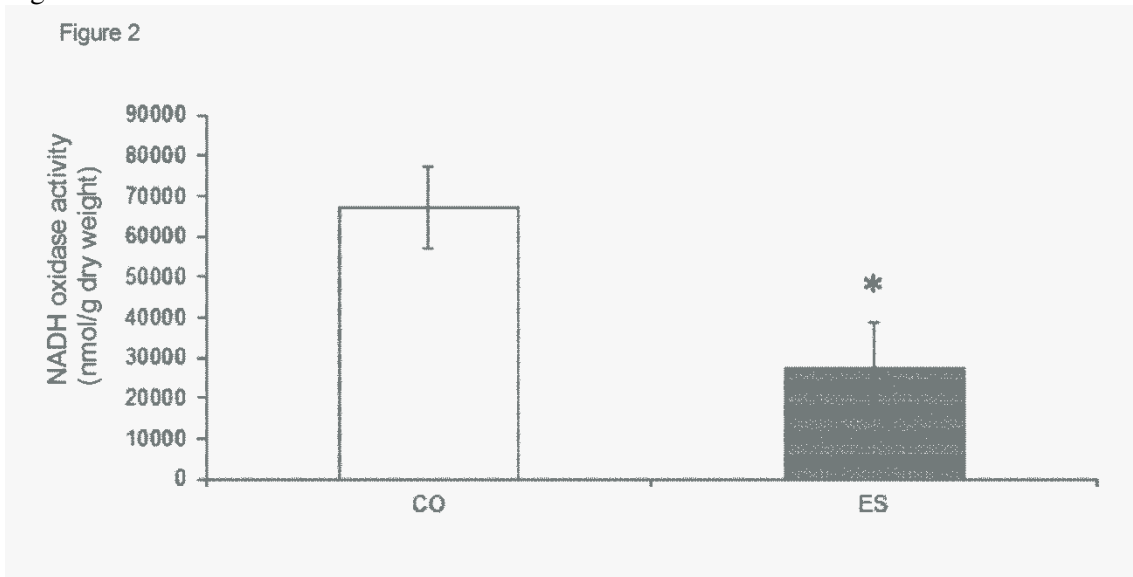
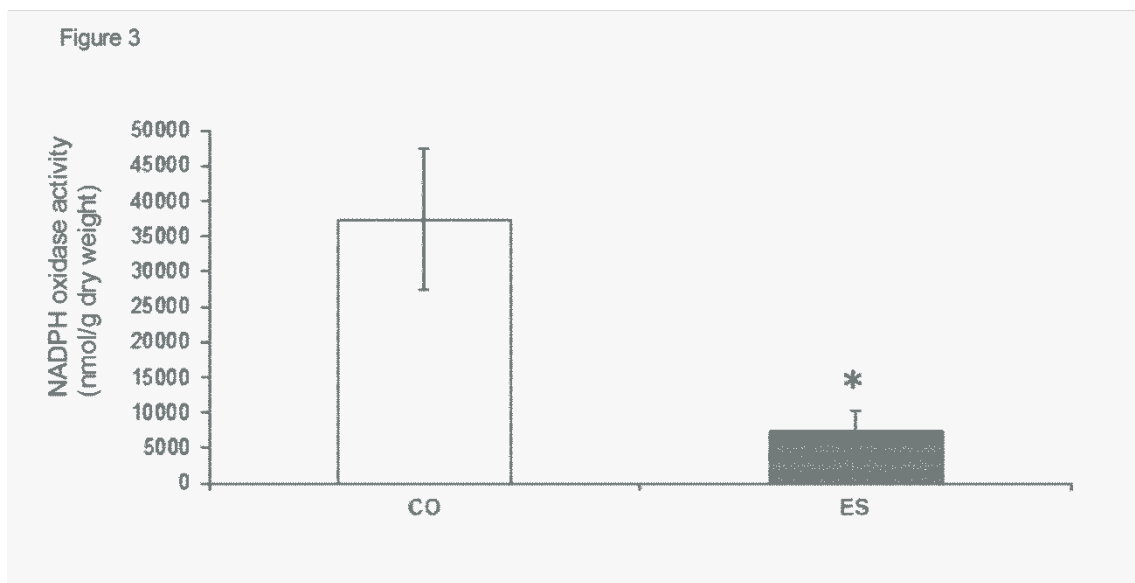



Figure 3



Anexo II: Artigo referente ao protocolo II



H O R M O N E S
International Journal of Endocrinology and Metabolism

Homepage Editorial Board Past Issues Search Instructions to Authors Contact Us

[Members Area](#) Thursday, 9 February 2012 19:06 GMT

Cristina Campos: [logged in as Author](#) - [log out](#)

[Back to Author's Main Page](#)

SUBMISSIONS UNDER REVIEW

Reference ID	Date Submitted	Type	Status
1528	25/01/2012	Research Paper	Under Review

Manuscript title

A low dose of estrogen increases antioxidant defenses and improves heart rate variability

A low dose of estrogen increases antioxidant defenses and improves heart rate variability.

Cristina Campos^a; Karina Rabello Casali^b; Dhãniel Baraldi^a; Adriana Conzatti^a; Adriane Belló-Klein^a; Katya Rigatto^c.

^aUniversidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre - RS - Brasil; ^bInstituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS - Brasil; ^cUniversidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre - RS - Brasil.

Short title: Estrogen and heart rate variability

Sources of support: CNPq (Brazilian agency)

Word count: 4076

Figures: 3

Tables: 5

Corresponding author:

Katya Rigatto Ph.D.

E-mail address: krigatto@gmail.com

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Sarmento Leite, 245 – Bairro Farroupilha - Porto Alegre, Brasil

CEP: 90050-170

Telephone number: 55 (51) 3303-8753

ABSTRACT

This study was conducted to test whether a low dose of 17- β estradiol would be as effective as a high dose to improve blood pressure (BP) control and decrease cardiac oxidative stress. 4-month-old ovariectomized female Wistar rats (n=9/group) were divided in three groups: 1) Control (CO); and animals treated with a pellet of estrogen for 21 days: 2) Low dose (LE; 0.2mg estrogen) and 3) High dose (HE; 0.5mg estrogen). Animals were assessed hemodynamically and sympathetic nervous system modulation was evaluated by spectral analysis. Superoxide dismutase and catalase activities, the reactive oxygen species (ROS) concentrations, such as hydrogen peroxide and superoxyde anion, the non enzymatic antioxidant defenses, total antioxidant capacity and redox status were evaluated in the heart. Treated groups showed a significant decrease in BP and ROS concentrations, as well as higher enzymatic and non enzymatic antioxidant defenses (P<0.05). Collectively, our results indicate that a low dose of estrogen is as effective as a high dose to promote cardiac protection.

Key words: estrogen therapy, reactive oxygen species; autonomic nervous system, ovariectomized rats, redox balance.

INTRODUCTION

It is well known that, after menopause, the cardiovascular risk progressively increases (Kaur et al., 2011). Furthermore, the incidence of cardiovascular disease (CVD) is higher in the postmenopausal than in pre-menopausal women (Hong et al., 1992), and it represents the main cause of mortality and morbidity for women over 50 years (Stramba-Badiale et al., 2006). Estrogen helps to protect women against CVD during the childbearing years and, after menopause, the CVD can be prevented, or at least partially reduced, by estrogen therapy (ET) (Hsia et al., 2006; Rossouw et al., 2007).

The menopause is also associated with oxidative stress, a condition where there is an increase in reactive oxygen species (ROS) which may cause oxidative damage to cells and several cardiovascular diseases (Vassalle et al., 2009). On the other hand, cells have mechanisms to protect themselves from the ROS toxicity. The antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), that removes superoxide anions by converting them to hydrogen peroxide, and catalase (CAT), that rapidly converts hydrogen peroxide to water (Onal et al., 2007) are good examples of the cells ability to minimize oxidative stress. In addition, estrogen can increase intracellular and extracellular antioxidant defenses that maintain the equilibrium in the redox balance (Mooradian, 1993). Glutathione (GSH) is the major intracellular and extracellular aminothiols compound and its quantification can be considered an oxidative stress marker. GSH participates in many cellular reactions, scavenging directly free radicals and other ROS such as hydroxyl radical, lipid peroxyl radical, peroxynitrite and hydrogen peroxide, and also indirectly through enzymatic reactions. In such reactions, GSH is oxidized to form glutathione disulfide (GSSG). Redox status, represented by

GSH/GSSG ratio, is the major redox couple that determines the antioxidative capacity of cells (Wu et al., 2004). Oxidative stress plays an important role in the production of proinflammatory mediators, lipid peroxidation and the reduced nitric oxide bioavailability which may change sympathovagal balance (SVB) (Dursun et al., 2005). Moreover, some studies have reported a link between menopause and SVB (Kaya et al., 2003; Moodithaya and Avadhany, 2009).

SVB can be studied using heart rate variability (HRV), by means non invasive methods (Petrofsky et al., 2009). Alterations in HRV, that primarily reflect the tonic autonomic modulation, may have substantial clinical implications. Low HRV, which has been shown in postmenopausal women, is associated with an increased risk of CVD (Mercurio et al., 2000). In addition, some studies indicate that menopausal women have a sympatho-vagal imbalance and that estrogen improves the SVB centrally and peripherally by decreasing sympathetic and increasing parasympathetic tone (McCabe et al., 1981).

Since it is very well established in the literature that estrogen therapy (ET) improves women's quality of life (Yildirim, 2010), it is widely used for controlling typical menopausal symptoms such as vaginal atrophy, hot flashes, osteoporosis, and sleep disturbances (Rozenberg et al., 2011). On the other hand, at standard doses, several adverse effects, including higher risk for breast cancer, stroke, and venous thromboembolism, outweigh the benefits of ET (Vaze and Joshi, 2010). The breast cancer is a serious side effect of ET. It represents the most common cancer diagnosis and second leading cause of cancer-related death among women in the United States (Draper, 2006).

Because cardiovascular diseases are a highly prevalent condition after menopause (Matthews et al., 1989) and ET is the most commonly used treatment to

reduce menopause symptoms (Yildirim, 2010), the importance to find a safer estrogen dose to control menopause discomforts has been recommended. Indeed, studies evaluating different regimens of hormone therapy have demonstrated that a low dose of estrogen is also associated with significant decrease in mammographic density (Wang et al., 2007). According to Mercurio et al (2003), low doses of estrogen are as effective as conventional doses to improve the lipid profile and the endothelial function. Moreover, a low dose of estrogen has demonstrated to be effective for the alleviation of climacteric symptoms (Schurmann et al., 2004) and it has good tolerability associated to a low incidence of the most common side effects (van de Weijer et al., 2007).

As far as we search in the literature, a study testing a low dose of estrogen in oxidative stress associated to the cardiac autonomic control has never been done. Considering that a low dose of estrogen might be safer because it has fewer side effects, our aim was to test whether a low dose of 17- β estradiol could also improve the oxidative stress and the SVB.

METHODS

Drugs and reagents:

Ketamine hydrochloride was purchased from König Lab S.A., SP, Brazil and xylazine, from Virbac do Brasil I.P., SP, Brazil. Estradiol and all other drugs/reagents were purchased from Sigma Chemical Co., St. Louis

Animals and groups:

In total, 27 female Wistar rats (weight 200-230g) from the Federal University of Rio Grande do Sul were kept at 20-22°C and a 12:12h dark/light photoperiod. They were submitted to bilateral ovariectomy under ketamine hydrochloride (80 mg/kg i.p.) and xylazine (16 mg/kg i.p.) anesthesia (Chrissobolis and Sobey, 2001). After one week, under ketamine and xylazine anesthesia each animal received subcutaneously silastic capsules filled with 17 β -estradiol diluted in sunflower oil (treated groups) or only sunflower oil as a vehicle (control group). Rats were divided into three experimental groups (n=9, each): 1) Control (CO); 2) Animals treated with 40% of the pharmacological (LE: 0.2mg/pellet – 21 days) dose of estradiol, and 3) Animals treated with a pharmacological (HE; 0.5 mg/pellet - 21 days) dose of estradiol (Campbell and Febbraio, 2002). All animals had access to water and regular rodent chow ad libitum. All procedures were approved by the institutional animal ethical committee and the experiments were conducted in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 86-23).

Hemodynamic measurements

Under anesthesia (ketamine 90 mg/kg; xylazine 10 mg/kg, i.p.), the left carotid artery was cannulated with a PE 50 catheter connected to a strain gauge transducer (Narco Biosystem Pulse Transducer RP-155, Houston, TX, USA) linked to a pressure amplifier (HP 8805C, Hewlett Packard). Pressure readings were taken in a microcomputer equipped with an analog-to-digital conversion board (CODAS 1 kHz sampling frequency, Dataq Instruments, Inc., Akron, OH, USA). The catheter was advanced into the left ventricle (LV) to record the left ventricular systolic pressure (LVSP, mmHg) and the left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP, mmHg). After hemodynamic measurements, animals were killed by decapitation for heart and blood collection.

Autonomic evaluation

After detecting the pulse intervals, the heart period was automatically calculated on a beat-to-beat basis as the time interval between two consecutive systolic peaks or pulse interval (PI). All detections were carefully checked to avoid erroneous or missed beats. Sequences of 150–160 beats were randomly chosen and if they were not notoriously stationeries, they were discarded and a new random selection was performed. Frequency domain analysis of HRV and blood pressure variability (BPV) were performed with an autoregressive algorithm (Malliani et al., 1991) on the PI interval sequences (tachogram) and on respective systolic sequences (systogram). The power spectral density was calculated for each time series. In this study, three spectral components were considered: very low frequency (VLF), from 0 to 0.10 Hz; low frequency (LF), from 0.10 to 1.00 Hz; and high frequency (HF), from 1.00 to 5.00 Hz. The spectral components were expressed in absolute (s^2 or $mm\ Hg^2$) and normalized

units. Normalization consisted of dividing the power of a given spectral component by the total power, then multiplying the ratio by 100 (Montano et al., 1994). All recordings were performed in a sound attenuated room.

Plasma hormone determination

Plasma estradiol was measured by electrochemiluminescence (Roche Diagnostics). Briefly, this test employs the principle of competitive assay using a polyclonal antibody against the 17 β -estradiol.

Determination of oxidized and reduced glutathione concentration

To determine oxidized and reduced glutathione concentration, tissue was deproteinized with 2 mol/L perchloric acid, centrifuged for 10 min at 1000 g, and the supernatant was neutralized with 2 mol/L potassium hydroxide. The reaction medium contained 100 mmol/L phosphate buffer (pH 7.2), 2 mmol/L nicotinamide dinucleotide phosphate acid, 0.2 U/mL glutathione reductase, and 70 μ mol/L 5,5' dithiobis (2-nitrobenzoic acid). To determine reduced glutathione, the supernatant was neutralized with 2 mol/l potassium hydroxide, to react with 70 μ mol/l 5,5' dithiobis (2-nitro benzoic acid), and the absorbance values measured at 420 nm. The results were expressed in nmol/mg protein. The redox status was represented by GSH/GSSG ratio (Akerboom and Sies, 1981).

Hydrogen peroxide measurement

The assay was based in the horseradish peroxidase (HRPO)-mediated oxidation of phenol red by H₂O₂, leading to the formation of a compound that absorbs at 610nm. Heart slices were incubated for 30min at 37°C in phosphate buffer 10mmol/L (NaCl

140mmol/L and dextrose 5mmol/L). The supernatants were transferred to tubes with phenol red 0.28mmol/L and 8.5U/mL HRPO. After 5 min incubation, NaOH 1mol/L was added and it was read at 610nm. The results were expressed in nmol H₂O₂/g tissue (Pick and Keisari, 1980).

Determination of superoxide anion concentration

It was based upon the spectrophotometric measurement of the epinephrine oxidation reaction in which superoxide anion is a reactant, leading to the formation of a compound measurable at 480 nm. The results were expressed in mmol/mg protein (Boveris, 1984).

Heart homogenates preparation:

Heart was homogenized in an ultra-Turrax blender using 1g of tissue for 5mL of 150nmol/L potassium chloride added to 20nmol/L phosphate buffer, pH 7.4. The homogenates were centrifuged at 1000g for 20min at -2°C (Llesuy et al., 1985).

TRAP

TRAP, which indicates the total antioxidant capacity, was measured by chemiluminescence using 2,2'-azo-bis(2-amidinopropane) (ABAP, a source of alkyl peroxy free radicals) and luminol. A mixture consisting of 20 mmol/L ABAP, 40 µmol/L luminol, and 50 mmol/L phosphate buffer (pH=7.4) was incubated to achieve a steady-state luminescence from the free radical-mediated luminol oxidation. A calibration curve was obtained by using different concentrations (between 0.2 and 1 µmol/L) of Trolox (hydrosoluble vitamin E). Luminescence was measured in a liquid

scintillation counter using the out-of-coincidence mode and the results were expressed in units of Trolox/mg protein (Evelson et al., 2001).

Determination of antioxidant enzyme activities:

Superoxide dismutase activity, determined in heart homogenates and expressed as units per milligram of protein, was based on the inhibition of superoxide radical reaction with pyrogallol (Marklund, 1985). Catalase activity was determined in heart homogenates, by following the decrease in 240nm absorption of hydrogen peroxide. It was expressed as pmol/mg protein (Aebi, 1984). Protein was measured in heart homogenates, using bovine serum albumin as described by Lowry et al (1951).

Statistical Analysis

Data are shown as mean \pm standard deviation. Statistical analysis were performed using one way ANOVA follow by Student Newman-Kews post hoc test. The Pearson correlation was used to assess the association among variables. $P < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Ovariectomy and Estradiol Replacement Therapy

As expected, the ovariectomy decreased estrogen plasma concentration (pg/mL), and 17-beta estradiol treatment increased its serum concentration (LE=600±19.8, HE=1818±39.9 pg/mL vs CO=61±8). The 17-beta estradiol treatment also significantly (P<0.001) decreased the body weight and increased the uterine weight (Table 1), confirming the effective suppression of ovarian hormonal activity.

Hemodynamic parameters

LVEDP was significantly (P<0.05) decrease in estrogen treated groups when compared to control. No changes were found in LVSP, HR, +dP/dt and -dP/dt (Table 2) .

Autonomic evaluations

HF and HRV were significantly higher (P<0.05) in HE group when compared to other groups. Moreover, HRV was also significantly higher (P<0.05) in LE when compared to CO group. LFa, LFnu, HFnu and LF/HF ratio did not show any statistically significant change after estrogen treatment (Table 3).

Association between TRAP and HRV

We found a positive correlation between TRAP and HRV (P<0.01; r=0.8922). (Figure 1).

Glutathione metabolism

The estrogen treatment increase GSH e decreases GSSG indicating that the redox status (GSH/GSSG), an oxidative stress indicator, was significantly higher in estrogen treated groups when compared to control (P<0.05) (Table 4).

Hydrogen peroxide concentration

Heart H₂O₂ concentration (nmol/g) was significantly decreased (P<0.05) in estrogen groups (LE=0.43±0.10; HE=0.38±0.14) when compared to control animals (CO=0.83±0.32; Figure 2).

Superoxide anion concentration

Heart superoxide anion concentration (mmol/mg protein) was significantly (P<0.05) decreased in treated groups (CO=12.22±3.90; LE=6.87±3.13; HE=2.65±1.37; Figure 3).

TRAP and Antioxidant enzyme activities:

Total antioxidant capacity, SOD and CAT activities were significantly higher in estrogen treated groups (Table 5).

DISCUSSION

The present study showed that a low dose of estrogen is as effective as a high dose to improve the blood pressure control and redox balance in ovariectomized rats.

In this study we did find a significant decrease in LVEDP in estrogen treated groups, accompanied by no changes in LVSP, suggesting a reduction in preload and afterload. This result indicates that estrogen treatment may induce a peripheral vasodilatation in the resistance vessels accompanied by unaltered myocardial contractility. Indeed, we did not observe significant differences in $+dP/dt$, an index of myocardial contractility, or $-dP/dt$, an index of myocardial relaxation. Moreover, since nitric oxide increases diastolic distensibility in the myocardium (Prendergast et al., 1997), estrogen treatment may prevent the increase of LVEDP by increasing nitric oxide synthase activity in the heart (Nuedling et al., 1999). Our result is in agreement with Nekooeian and Pang (1998) who also documented a decrease in LVEDP in estrogen treated rats. In addition, estradiol also plays a role in mediating a reduction in blood pressure in some hypertensive female animal models (Hinojosa-Laborde et al., 2000; Wu et al., 2003).

We did not find changes in LFa, LFnu, HFnu and LF/HF ratio among groups. This results are consistent with Schuchert et al (2002) who also have demonstrated no changes in these parameters after estrogen treatment.

On the other hand, HRV, an important index of cardiac autonomic modulation (Montano et al., 1994) was consistently improved after estrogen treatment. This result is in agreement to Liu et al (2003) who described that estrogen therapy is able to decrease cardiac sympathovagal imbalance caused by menopause. Indeed, although no changes were found in HR, our results demonstrated that there was a significant increase in HRV

after estrogen treatment. This result highlights the estrogen effectiveness, even in a low dose, to increase HRV and potentially lower the risk factors for adverse cardiovascular events (Gillman et al., 1993). Importantly, in our current study, we did find a positive correlation between HRV and TRAP, suggesting that an increase in the antioxidant capacity might contribute to the improvement in HRV. This association support the hypothesis that estrogen administration might be useful for improving cardiac sympathovagal balance by reducing oxidative stress. Indeed, according to Semen et al (2010), an oxidative stress attenuation results in an improved HRV It has been reported that estrogen therapy leads to an increase in total antioxidant capacity resulting in an improvement in the antioxidant status (Darabi et al., 2010). Accordingly, we have observed in treated groups, an increase in TRAP that represents an index of non enzymatic antioxidants, especially the hydrosoluble ones.

Furthermore, also a non enzymatic antioxidant and an important index of the redox balance (Lenfant et al., 2003), GSH and GSH/GSSG ratio were significantly increased in our treated groups. These results indicate that there was a reduction in the oxidative stress after estrogen treatment. Our data are in consonance with Baeza et al (2010), who also demonstrated that estrogen was able to decrease oxidative stress in ovariectomized rats.

The present study also investigated whether a low dose of 17- β estradiol is able to increase antioxidant enzyme activities. We observed that SOD and CAT activities were significantly higher after estrogen treatment. These results are in agreement with others in the literature showing that estradiol has antioxidant properties because it increases CAT (Gomez-Zubeldia et al., 2002) and SOD activities, and decreases NADPH oxidase enzyme activity and superoxide production (Gomez-Zubeldia et al., 2002; Ji et al., 2007; Miller et al., 2007).

In accordance with the above results, the present study also documented a significant decrease in ROS concentrations such as, superoxide anion and hydrogen peroxide in animals treated with estrogen. These results are in consonance with a study from Lam et al (2006), who demonstrated a significant increased in superoxide anion production in ovariectomized rats, whereas estrogen treatment significantly prevented these effects. Moreover, Wang et al (2003) reported estrogen-mediated protection against hydrogen peroxide-induced oxidative stress. Additionally, it is widely recognized that estrogen exhibits protective antioxidant effects through the phenolic hydroxyl group of 17 β -estradiol that can act as a ROS scavenger (Behl et al., 1997). Our findings do suggest that estrogen, even in a low dose, is able to improve the antioxidant defenses seen by the decrease in ROS concentrations.

In conclusion, we demonstrated that estrogen dosage should be taken into account when considering hormonal replacement therapy. Once a low dose of estrogen have similar beneficial effects on cardioprotection than a high dose and, considering that a low dose is probably clinically safer, we strongly recommend more studies to demonstrate the advantages also regarding to the side effects.

References

- Aebi H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121-126.
- Akerboom TP, Sies H. 1981. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol* 77:373-382.
- Baeza I, Fdez-Tresguerres J, Ariznavarreta C, De la Fuente M. 2010. Effects of growth hormone, melatonin, oestrogens and phytoestrogens on the oxidized glutathione (GSSG)/reduced glutathione (GSH) ratio and lipid peroxidation in aged ovariectomized rats. *Biogerontology* 11(6):687-701.
- Behl C, Skutella T, Lezoualc'h F, Post A, Widmann M, Newton CJ, Holsboer F. 1997. Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: structure-activity relationship. *Mol Pharmacol* 51(4):535-541.
- Boveris A. 1984. Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. *Methods Enzymol* 105:429-435.
- Campbell SE, Febbraio MA. 2002. Effect of the ovarian hormones on GLUT4 expression and contraction-stimulated glucose uptake. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282(5):E1139-1146.
- Chrissobolis S, Sobey CG. 2001. Evidence that Rho-kinase activity contributes to cerebral vascular tone in vivo and is enhanced during chronic hypertension: comparison with protein kinase C. *Circ Res* 88(8):774-779.
- Darabi M, Ani M, Movahedian A, Zarean E, Panjehpour M, Rabbani M. 2010. Effect of hormone replacement therapy on total serum anti-oxidant potential and oxidized LDL/beta2-glycoprotein I complexes in postmenopausal women. *Endocr J* 57(12):1029-1034.

Draper L. 2006. Breast cancer: trends, risks, treatments, and effects. *Aaohn J* 54(10):445-451; quiz 452-443.

Dursun N, Arifoglu C, Suer C, Keskinol L. 2005. Blood pressure relationship to nitric oxide, lipid peroxidation, renal function, and renal blood flow in rats exposed to low lead levels. *Biol Trace Elem Res* 104(2):141-149.

Evelson P, Travacio M, Repetto M, Escobar J, Llesuy S, Lissi EA. 2001. Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. *Arch Biochem Biophys* 388(2):261-266.

Gillman MW, Kannel WB, Belanger A, D'Agostino RB. 1993. Influence of heart rate on mortality among persons with hypertension: the Framingham Study. *Am Heart J* 125(4):1148-1154.

Gomez-Zubeldia MA, Corrales S, Arbues J, Nogales AG, Millan JC. 2002. Influence of estradiol and gestagens on oxidative stress in the rat uterus. *Gynecol Oncol* 86(3):250-258.

Hinojosa-Laborde C, Lange DL, Haywood JR. 2000. Role of female sex hormones in the development and reversal of dahl hypertension. *Hypertension* 35(1 Pt 2):484-489.

Hong MK, Romm PA, Reagan K, Green CE, Rackley CE. 1992. Effects of estrogen replacement therapy on serum lipid values and angiographically defined coronary artery disease in postmenopausal women. *Am J Cardiol* 69(3):176-178.

Hsia J, Langer RD, Manson JE, Kuller L, Johnson KC, Hendrix SL, Pettinger M, Heckbert SR, Greep N, Crawford S, Eaton CB, Kostis JB, Caralis P, Prentice R. 2006. Conjugated equine estrogens and coronary heart disease: the Women's Health Initiative. *Arch Intern Med* 166(3):357-365.

- Ji H, Zheng W, Menini S, Pesce C, Kim J, Wu X, Mulrone SE, Sandberg K. 2007. Female protection in progressive renal disease is associated with estradiol attenuation of superoxide production. *Gend Med* 4(1):56-71.
- Kaur M, Singh H, Ahuja GK. 2011. Cardiac performance in relation to age of onset of menopause. *J Indian Med Assoc* 109(4):234-237.
- Kaya D, Cevrioglu S, Onrat E, Fenkci IV, Yilmazer M. 2003. Single dose nasal 17beta-estradiol administration reduces sympathovagal balance to the heart in postmenopausal women. *J Obstet Gynaecol Res* 29(6):406-411.
- Lam KK, Lee YM, Hsiao G, Chen SY, Yen MH. 2006. Estrogen therapy replenishes vascular tetrahydrobiopterin and reduces oxidative stress in ovariectomized rats. *Menopause* 13(2):294-302.
- Lenfant C, Chobanian AV, Jones DW, Roccella EJ. 2003. Seventh report of the Joint National Committee on the Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure (JNC 7): resetting the hypertension sails. *Hypertension* 41(6):1178-1179.
- Liu CC, Kuo TB, Yang CC. 2003. Effects of estrogen on gender-related autonomic differences in humans. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285(5):H2188-2193.
- Llesuy SF, Milei J, Molina H, Boveris A, Milei S. 1985. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice. *Tumori* 71(3):241-249.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1):265-275.
- Malliani A, Pagani M, Lombardi F, Cerutti S. 1991. Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. *Circulation* 84(2):482-492.

Marklund SL. 1985. Superoxide dismutase isoenzymes in tissues and plasma from New Zealand black mice, nude mice and normal BALB/c mice. *Mutat Res* 148(1-2):129-134.

Matthews KA, Meilahn E, Kuller LH, Kelsey SF, Caggiula AW, Wing RR. 1989. Menopause and risk factors for coronary heart disease. *N Engl J Med* 321(10):641-646.

McCabe PM, Porges SW, Carter CS. 1981. Heart period variability during estrogen exposure and withdrawal in female rats. *Physiol Behav* 26(3):535-538.

Mercuro G, Podda A, Pitzalis L, Zoncu S, Mascia M, Melis GB, Rosano GM. 2000. Evidence of a role of endogenous estrogen in the modulation of autonomic nervous system. *Am J Cardiol* 85(6):787-789, A789.

Mercuro G, Vitale C, Fini M, Zoncu S, Leonardo F, Rosano GM. 2003. Lipid profiles and endothelial function with low-dose hormone replacement therapy in postmenopausal women at risk for coronary artery disease: a randomized trial. *Int J Cardiol* 89(2-3):257-265.

Miller AA, Drummond GR, Mast AE, Schmidt HH, Sobey CG. 2007. Effect of gender on NADPH-oxidase activity, expression, and function in the cerebral circulation: role of estrogen. *Stroke* 38(7):2142-2149.

Montano N, Ruscone TG, Porta A, Lombardi F, Pagani M, Malliani A. 1994. Power spectrum analysis of heart rate variability to assess the changes in sympathovagal balance during graded orthostatic tilt. *Circulation* 90(4):1826-1831.

Moodithaya SS, Avadhany ST. 2009. Comparison of cardiac autonomic activity between pre and post menopausal women using heart rate variability. *Indian J Physiol Pharmacol* 53(3):227-234.

Mooradian AD. 1993. Antioxidant properties of steroids. *J Steroid Biochem Mol Biol* 45(6):509-511.

Nuedling S, Kahlert S, Loebbert K, Doevendans PA, Meyer R, Vetter H, Grohe C. 1999. 17 Beta-estradiol stimulates expression of endothelial and inducible NO synthase in rat myocardium in-vitro and in-vivo. *Cardiovasc Res* 43(3):666-674.

Onal B, Levin RM, Kogan BA, Guven A, Leggett RE, Mannikarottu AS. 2007. Novel alterations in superoxide dismutase and catalase activities in the female rabbit bladder subjected to hormonal manipulations. *Int Urol Nephrol* 39(4):1049-1054.

Petrofsky JS, Lohman E, Lohman T. 2009. A device to evaluate motor and autonomic impairment. *Med Eng Phys* 31(6):705-712.

Pick E, Keisari Y. 1980. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods* 38(1-2):161-170.

Prendergast BD, Sagach VF, Shah AM. 1997. Basal release of nitric oxide augments the Frank-Starling response in the isolated heart. *Circulation* 96(4):1320-1329.

Rossouw JE, Prentice RL, Manson JE, Wu L, Barad D, Barnabei VM, Ko M, LaCroix AZ, Margolis KL, Stefanick ML. 2007. Postmenopausal hormone therapy and risk of cardiovascular disease by age and years since menopause. *Jama* 297(13):1465-1477.

Rozenberg S, Vandromme J, Antoine C. 2011. [Menopausal hormone treatment in 2011]. *Rev Med Brux* 32(4):239-242.

Schuchert A, Liebau M, Behrens G, Mueck AO, Meinertz T. 2002. [Are the acute effects of transdermal estradiol in postmenopausal women with coronary disease related to changes of the autonomic tone?]. *Z Kardiol* 91(2):156-160.

Schurmann R, Holler T, Benda N. 2004. Estradiol and drospirenone for climacteric symptoms in postmenopausal women: a double-blind, randomized, placebo-controlled study of the safety and efficacy of three dose regimens. *Climacteric* 7(2):189-196.

Semen KO, Yelisyeyeva OP, Kaminsky DV, Cherkas AP, Zarkovic K, Lutsyk O, Cipak A, Jaganjac M, Zarkovic N. 2010. Interval hypoxic training in complex treatment of *Helicobacter pylori*-associated peptic ulcer disease. *Acta Biochim Pol* 57(2):199-208.

Stramba-Badiale M, Fox KM, Priori SG, Collins P, Daly C, Graham I, Jonsson B, Schenck-Gustafsson K, Tendera M. 2006. Cardiovascular diseases in women: a statement from the policy conference of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 27(8):994-1005.

van de Weijer PH, Mattsson LA, Ylikorkala O. 2007. Benefits and risks of long-term low-dose oral continuous combined hormone therapy. *Maturitas* 56(3):231-248.

Vassalle C, Mercuri A, Maffei S. 2009. Oxidative status and cardiovascular risk in women: Keeping pink at heart. *World J Cardiol* 1(1):26-30.

Vaze N, Joshi S. 2010. Yoga and menopausal transition. *J Midlife Health* 1(2):56-58.

Wang PH, Horng HC, Cheng MH, Chao HT, Chao KC. 2007. Standard and low-dose hormone therapy for postmenopausal women--focus on the breast. *Taiwan J Obstet Gynecol* 46(2):127-134.

Wang X, Simpkins JW, Dykens JA, Cammarata PR. 2003. Oxidative damage to human lens epithelial cells in culture: estrogen protection of mitochondrial potential, ATP, and cell viability. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(5):2067-2075.

Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. 2004. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* 134(3):489-492.

Wu Z, Maric C, Roesch DM, Zheng W, Verbalis JG, Sandberg K. 2003.
Estrogen regulates adrenal angiotensin AT1 receptors by modulating AT1 receptor
translation. *Endocrinology* 144(7):3251-3261.

Yildirim A. 2010. [Postmenopausal hormone replacement therapy and the
cardiovascular system]. *Turk Kardiyol Dern Ars* 38 Suppl 1:32-40.

TABLES

Table 1: Morfometric data

	CO	LE	HE
Uterine weight (g)	0.15±0.02	0.61±0.06*	0.86±0.15*†
Body weight (g)	247±15	214±14*	216±9*

Data are mean ± SD. Control group=CO; High-dose estrogen-treated group=HE; Low-dose estrogen-treated group =LE. *P<0.05 vs CO; † P<0.05 vs LE

Table 2: Left Ventricular hemodynamic evaluation

	CO	LE	HE
LVEDP(mmHg)	12.17±4.54	5.10±1.98*	7.95±2.21*
LVSP(mmHg)	101.71±12.78	120.91±20.71	110.40±7.51
FC (beats/min)	212±12.78	221±22.59	183.81±20.83
+dP/dt	5809±924	6435±549	5505±450
-dP/dt	-3946±786	-5262±890	-4098±251

Data are mean ± SD. Data are mean ± SD. Control group=CO; High-dose estrogen-treated group=HE; Low-dose estrogen-treated group =LE. *P<0.05 vs CO.

Table 3: Spectral analysis

	CO	LE	HE
HRV(s2)	14.34±3.56	39.98±11.00*	69.62±27.32*
LFa (s2)	2.49±1.53	5.03±1.89	8.09±7.04
HFabs (s2)	9.78±2.84	28.04±9.718	53.35±29.96*
LFnu	20.22±5.20	16.67±5.12	11.05±3.03
HFnu	79.77±5.14	83.32±5.10	88.95±15.74
LF/HF ratio	0.25±0.07	0.2±0.07	0.12±0.08

Data are mean ± SD. Control group=CO; High-dose estrogen-treated group=HE; Low-dose estrogen-treated group =LE. *P<0.05 vs CO; † P<0.05 vs LE.

Table 4: Status of glutathione metabolism in myocardium

	CO	LE	HE
GSH (nmol/mg tissue)	0.15±0.07	0.29±0.05*	0.27±0.10*
GSSG (nmol/mg tissue)	0.026±0.008	0.022±0.005	0.014±0.005*
GSH/GSSG (redox status)	5.98±2.45	13.57±2.23*	19.55±9.03*
Total GSH (nmol/ mg tissue)	0.18±0.08	0.32±0.06	0.28±0.14

Data are mean ± SD. Control group=CO; High-dose estrogen-treated group=HE; Low-dose estrogen-treated group =LE. *P<0.05 vs CO.

Table 5: Enzymatic and non-enzymatic antioxidant defences in myocardium

	CO	LE	HE
SOD (U/mg protein)	22.24±3.00	33.65±5.54*	32.10±6.80*
CAT (pmol/mg protein)	0.89±0.14	1.25±0.20*	1.28±0.29*
TRAP(units of Trolox/mg protein)	25.50±7.96	57.60±24.13*	53.55±16.15*

Data are mean ± SD. Control group=CO; High-dose estrogen-treated group=HE; Low-dose

estrogen-treated group =LE. *P<0.05 vs CO.

Figure Captions

Figure 1: Relationship between HRV and TRAP

$P < 0.01$; $r = 0.8922$; n

Figure 2: Hydrogen peroxide concentration in myocardium (in nmol/g tissue)

Data are mean \pm SD. Control group=CO; High-dose estrogen-treated group=HE; Low-dose estrogen-treated group =LE. * $P < 0.05$ vs CO.

Figure 3: Superoxide anion concentration in myocardium (in mmol/mg protein)

Data are mean \pm SD. Control group=CO; High-dose estrogen-treated group=HE; Low-dose estrogen-treated group =LE. * $P < 0.05$ vs CO.

Figure 1

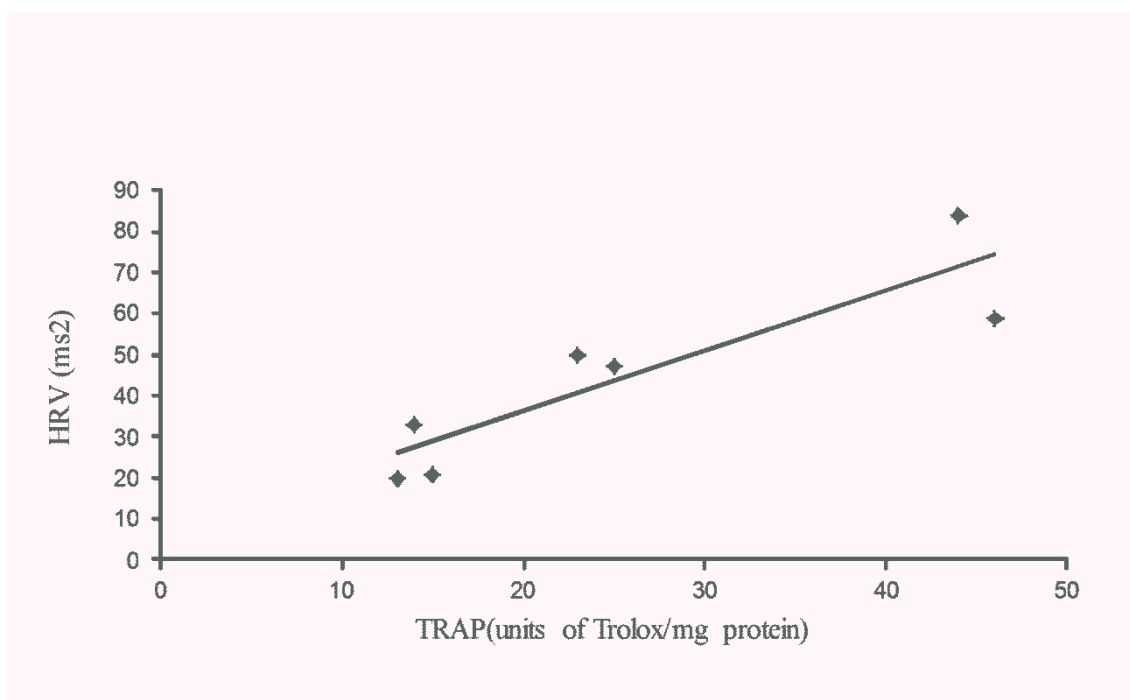


Figure 2

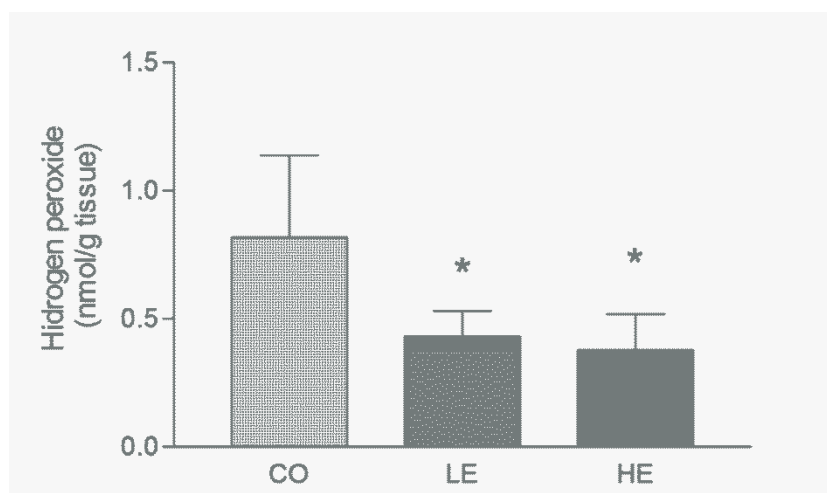
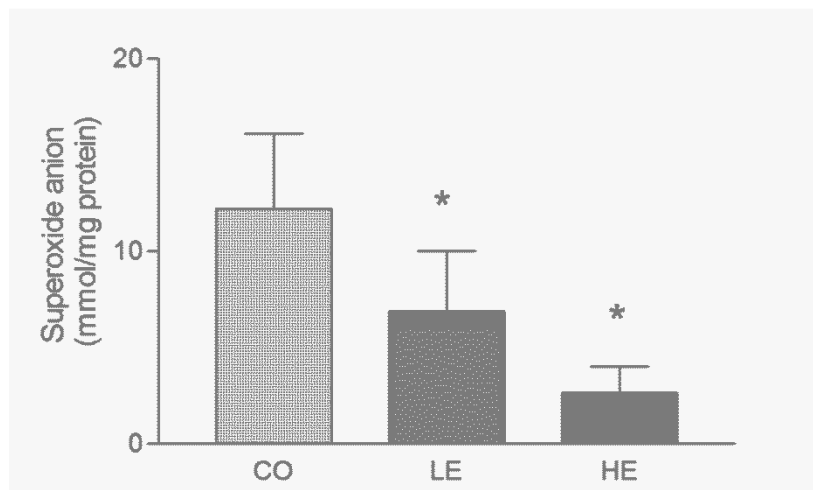


Figure 3



Anexo III: Artigo referente ao protocolo III

A low dose of estrogen improves reactive nitrogen/oxygen species balance and blood pressure control

Cristina Campos^a; Carmem Luiza Sartorio^a; Karina Rabello Casali^b; Alex Sander da Rosa Araújo^a; Adriane Belló-Klein^a; Katya Rigatto^c.

^aUniversidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre - RS - Brasil; ^bInstituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS - Brasil; ^cUniversidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre - RS - Brasil.

Short title: A low dose of estrogen improves blood pressure control

Sources of support: CNPq (Brazilian agency)

Word count: 3063

Figures: 2

Tables: 2

Corresponding author:

Katya Rigatto Ph.D.

E-mail address: krigatto@gmail.com

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Sarmento Leite, 245 – Bairro Floresta - Porto Alegre, Brasil

CEP: 90050-170

Telephone number: 55 (51) 3303-8753

ABSTRACT

This study was conducted to test whether a low dose of 17- β estradiol would be as effective as a high dose to decrease oxidative stress and to improve blood pressure (BP) control. 4-month-old ovariectomized female Wistar rats (n=10/group) were divided in four groups: 1) Control (CO); and animals treated with a pellet of estrogen for 21 days: 2) Low dose (LE; 0.05mg estrogen); 3) Medium dose (ME; 0.2mg estrogen) and, 4) High dose (HE; 0.5mg estrogen). BP and sympathetic nervous system modulation was evaluated by spectral analysis. Aorta was collected to evaluate reactive nitrogen/oxygen species balance. Treated groups showed a significant decrease ($P<0.05$) in BP and sympathetic vascular tonus, and in NADPH oxidase activity and H_2O_2 concentration. Total plasma nitrites and redox status were significantly higher in the treated groups ($P<0.05$). Then, we showed that a low dose of estrogen is as effective as a high dose to promote cardiocirculatory protection.

Key words: estrogen therapy, sympathetic nervous system, ovariectomized rats, redox balance.

INTRODUCTION

Menopause is characterized by a natural decline in the estrogen production, which is responsible for physiological and biochemical changes in the woman health status. These changes can contribute to the development of cardiovascular diseases (Yang and Reckelhoff, 2011), that represent the main cause of mortality and morbidity for women over fifty years (Stramba-Badiale et al., 2006).

The menopause is also associated with oxidative stress, a condition where there is an overproduction and/or inadequate removal of reactive oxygen species (ROS). A primary source of ROS in the vascular wall is NADPH oxidase (Muzaffar et al., 2005), a membrane-associated enzyme that generates superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) (Bengtsson et al., 2003). There are substantial evidences showing that the excessive generation of $O_2^{\bullet-}$ by NADPH-oxidase contributes to oxidative stress associated with cardiovascular diseases (Miller et al., 2006). On the other hand, estrogens are known by their cardioprotective effects (O'Lone et al., 2007), inhibiting NADPH oxidase activity by downregulating the expression of important subunits of this enzyme (Wagner et al., 2001).

Endogenous protective systems, such as thioredoxin (Trx) and glutathione (GSH), act against oxidative stress (Nordberg and Arner, 2001). They are essential for cell survival and for the maintenance of cellular thiol redox balance (Nordberg and Arner, 2001). GSH, an important antioxidant, is a ROS scavenger, that generates oxidized glutathione (GSSG). The GSH/GSSG ratio is one of the most important redox couple that determines the cells antioxidant capacity (Jones, 2006). In addition, Trx acts as an antioxidant to balance the ROS production involved in redox signaling (Nordberg and Arner, 2001). Furthermore, 17β -estradiol increases Trx expression in endothelial cells, suggesting a possible involvement of this oxidoreductase in the estrogen

antioxidant protection (Ejima et al., 1999). It is very well established in the literature that estrogen antioxidant actions are also mediated by protein kinase B (Akt) activation, an important redox-sensitive signaling protein (Sugden and Clerk, 2001). When activated, Akt phosphorylates a range of intracellular substrates that regulate growth, metabolism and survival (Tanaka et al., 2005). ROS can cause conformational changes on proteins which might modulate the Akt phosphorylation (Yang et al., 2004) to protect cells from oxidative stress (Tanaka et al., 2005).

Estrogen is able to increase endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activity through Akt pathway that enhances nitric oxide (NO) release (Florian et al., 2004). In fact, estrogen-mediated eNOS activation was also demonstrated in cultured human endothelial cells (Haynes et al., 2000). In addition, vascular NO is very important to modulate the responses to increases in arterial BP and in the modulation of the sympathetic and parasympathetic nervous systems (Stauss and Persson, 2000).

It is very well established in the literature that NO deficiency and an imbalance in autonomic nervous system induce an increase in BP and its variability (BPV). This association is an important determinant for cardiovascular risk (Stauss et al., 1999; Stauss et al., 2000). During postmenopause, hypertension is a common disease (Yanes et al., 2010) and it is not completely understood. On the other hand, it has been reported that estrogen increases NO bioavailability (Gavin et al., 2009) affecting cardiovascular function via direct actions on blood vessels and brain centers involved in autonomic nervous system regulation (Xue et al., 2009).

As estrogen therapy (ET) improves women's quality of life (Yildirim, 2010), it is commonly used for controlling menopausal symptoms. However, at high doses, estrogen has been associated with an increased risk of uterine and breast cancer, stroke and thromboembolic heart disease (Colditz, 1998; Gairard et al., 2009). Considering

that cardiovascular diseases incidence is very high after menopause (Innes et al., 2008), and ET is a common used treatment to reduce the menopause symptoms , it is important to explore new and safe options for the management of menopause.

According to our knowledge, a study testing the effect of different doses of estrogen over oxidative stress in aorta and cardiovascular autonomic control has never been performed. Researchers who have studied different hormone therapies have found that estrogen at low doses is associated with significant decrease in mammographic density (Lundstrom et al., 2001; Wang et al., 2007) and it appears to be effective to minimize climacteric symptoms (Ettinger, 2007), providing an effective protection against the postmenopausal decrease of bone mineral density (Gambacciani et al., 2008). It is also described that a low dose has a good tolerability associated to low incidence of the most common and harmful estrogen side effect: the breast cancer (Wang et al., 2007). Thus, our aim was to test whether a low dose of 17- β estradiol would also be effective to decrease the oxidative stress and to improve the blood pressure control .

METHODS

Drugs and reagents:

Ketamine hydrochloride was purchased from König Lab S.A., SP, Brazil and xylazine, from Virbac do Brasil I.P., SP, Brazil. Estradiol and all other drugs/reagents were purchased from Sigma Chemical Co., St. Louis.

Animals and groups:

All procedures were approved by the institutional animal ethics committee. In total, 40 female Wistar rats (four months age, weight 200-230g) from the Federal University of Rio Grande do Sul were studied. They were kept at 20-22°C and with a 12:12h dark/light photoperiod, and were submitted to bilateral ovariectomy under ketamine hydrochloride (80 mg/kg i.p.) and xylazine anesthesia (16 mg/kg i.p.) (37). After one week, each animal received silastic capsules that were filled with 17 β -Estradiol diluted in sunflower oil (under ketamine hydrochloride and xylazine anesthesia). The control group received only sunflower oil as a vehicle. All animals had access to water and regular rodent chow ad libitum and the experiments were conducted in accordance with institutional guidelines and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 86-23). The animals were divided into four experimental groups: 1) Control (CO; N=10); 2) Low dose (LE; N=10); animals treated with a dose designed to be near to the physiological 17-beta estradiol dose (0.05 mg/pellet – 21 days) (Campbell and Febbraio, 2002); 3) Medium dose (ME; N=10); animals treated with 40% of the high dose of 17-beta estradiol (0.2 mg/pellet – 21 days); and, 4) High dose (HE; N=10); animals treated with, high dose of 17-beta estradiol (0.5 mg/pellet - 21 days) (Campbell and Febbraio, 2002).

Cardiovascular evaluations:

24 hours before the experiment, under ketamine hydrochloride (80 mg/kg i.p.; König Lab S.A., SP, Brazil) and xylazine anesthesia (16 mg/kg i.p.; Virbac do Brasil, SP, Brazil), a catheter (PE-10) filled with saline was implanted in the carotid artery for arterial pressure measurement. This catheter was connected to a strain-gauge transducer (Narco Bio-Systems Miniature Pressure Transducer RP 1500) for direct measurements of mean arterial pressure (MAP) and HR. MAP signals were recorded for 20 min with a microcomputer equipped with an analog-to-digital converter board (CODAS, 1 kHz, Dataq Instruments, Akron, OH). After the cardiovascular evaluations, rats were killed by decapitation, exsanguinated and the uterus was harvested and weighed. The blood was collected to measure hormone and total nitrites concentrations, and aorta were excised to western blot and biochemical measurements.

Autonomic evaluation

Time series of systolic arterial pressure (SAP, systograms) were obtained from blood pressure records. Stationary fragments with about 300 beats, were selected and spectral analysis was performed by autoregressive model. The spectral bands for rats (low frequency, LF: 0.2-0.75 Hz, high frequency, HF:0.75-3.0 Hz) were defined according to previous references (Malliani et al., 1991). LF band is related to sympathetic modulation (Stauss, 2007). Systogram spectra, for each stationary fragment, were evaluated quantitatively and values SAP variability (SAPV) were obtained.

Plasma hormone determination

Plasma estradiol was measured by electrochemiluminescence (Roche Diagnostics) at Weinmann Clinical Analysis Laboratory. Briefly, this test employs the principle of competitive assay using a polyclonal antibody against the 17- β estradiol.

NADPH Oxidase Activity

Superoxide production by carotid artery ring segments was measured using 5 μ mol/L lucigenin-enhanced chemiluminescence, as previously described (Liochev and Fridovich, 1997).

NO Metabolites:

Total nitrites were determined in plasma according to Granger. To convert nitrite to nitrate, samples were incubated with enzymatic cofactors and nitrate reductase (1,75U/mL; Sigma, St. Louis, MO) for 30 minutes at room temperature. The reaction was finished by the addition of Griess reagent. The colored final product obtained was determined spectrophotometrically at 542nm (Granger et al., 1999).

Hydrogen peroxide measurement

The assay was based on the horseradish peroxidase (HRPO)-mediated oxidation of phenol red by H₂O₂, leading to the formation of a compound that absorbs at 610 nm. Aorta rings were incubated for 30min at 37°C in phosphate buffer 10 mmol/L (NaCl 140 mmol/L and dextrose 5 mmol/L). The supernatants were transferred to tubes with phenol red 0.28 mmol/L and 8.5 U/mL HRPO. After 5 min incubation, NaOH 1mol/L was added and it was read at 610 nm. The results were expressed in nmoles H₂O₂/g tissue (Pick and Keisari, 1980).

Determination of reduced and oxidized glutathione

To determine oxidized and reduced glutathione concentration, aorta was deproteinized with 2 mol/L perchloric acid, centrifuged for 10 min at 1000 g, and the supernatant was neutralized with 2 mol/L potassium hydroxide. The reaction medium contained 100 mmol/L phosphate buffer (pH 7.2), 2 mmol/L nicotinamide dinucleotide phosphate acid, 0.2 U/mL glutathione reductase, and 70 μ mol/L 5,5' dithiobis (2-nitrobenzoic acid). To determine reduced glutathione, the supernatant was neutralized with 2 mol/L potassium hydroxide, to react with 70 μ mol/L 5,5' dithiobis (2-nitrobenzoic acid), and the absorbance values measured at 420 nm (Akerboom and Sies, 1981).

Western blot analysis

Aortic samples were homogenized in ice-cold RIPA buffer (NaCl 150 mmol/L; Tris-HCl 50 mmol/L; EDTA 5 mmol/L; Nonidet-P 40 1%; deoxycolate 0.5%; NaF 10 mmol/L; sodium pyrophosphate 10 mmol/L; phenylmethylsulfonyl fluoride 100 mmol/L; aprotinin 2 μ g/mL; leupeptin 2 μ g/mL) (Sartorio et al., 2007). Aortic extracts were mixed with sample loading buffer and separated under reducing conditions on 12% SDS-polyacrylamide gel. Proteins were electro-transferred on polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Immuno-Blot 0.2 μ m, Bio-Rad). The membranes were processed for immunodetection using rabbit anti-total Akt1 polyclonal antibody, rabbit anti-phospho-Akt1 (ser657; 60kDa), rabbit anti-gp91phox polyclonal antibody (65kDa) and mouse anti-Trx (12kDa) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Trx-1 protein expression was performed because Trxs has been shown to be involved in defense against oxidative stress (Holmgren, 1984). We also performed Gp9phox

protein expression because it is a NADPH oxidase subunit (Wagner et al., 2001). And this enzyme is a primary source of ROS in the vascular wall (Muzaffar et al., 2005).

The bound primary antibodies were detected using rabbit anti-mouse or goat anti-rabbit HRP-conjugate secondary antibodies and membranes were revealed for chemiluminescence. The autoradiographies generated were quantitatively analyzed for the protein levels with an image densitometer (Image master VDS CI, Amersham Biosciences Europe). The molecular weights of the bands were determined by reference to a standard molecular weight marker (RPN 800 rainbow full range Bio-Rad). The results from each membrane were normalized by Ponceau red method (Klein et al., 1995).

Statistical Analysis

The data are shown as mean \pm standard deviation. Statistical analysis was performed using one way ANOVA complemented with Student-Newman-Keuls post hoc test. The P value lower than 0.05 was considered significant.

RESULTS

Ovariectomy and Estradiol Replacement Therapy

To confirm the effectiveness of estrogen treatment, hormonal and morphometric measurements were performed. As expected, the ovariectomy decreased 17-beta estradiol plasma concentration (CO=61±8 pg/mL). On the other hand, 17-beta estradiol treatment increased its serum concentration (LE=124±3, ME=600±19, HE=1818±39 pg/mL). The treatment significantly (P<0.001) decreased the body weight (LE=222±13; ME=214±14; HE=216±9 vs CO=247±15) and increased the uterine weight (LE=0.29±0.11, EM=0.61±0.06, HE=0.86±0.15 vs CO=0.15±0.02).

Hemodynamic and Autonomic evaluations

MAP, DAP and SAPV were significantly (P<0.05) decreased in estrogen-treated groups when compared to CO, while the LF, which is associated with the vascular sympathetic modulation, was decreased only in LE and HE groups. HR, HF and SAP did not show any differences among groups (Table 1).

NADPH Oxidase Activity

NADPH oxidase activity (in nmol/g dry weight) was significantly lower (P<0.01) in estrogen treated groups (LE=22838±3636, ME=17195±7090, HE=7470±2850) when compared CO (37750±9900; Figure 1A).

Total Nitrites

Total nitrites (in µmol/L) were significantly (P<0.05) higher in all groups treated with estrogen (LE=0.231±0.034; ME=0.237±0.068; HE=0.215±0.023) , when compared to control (CO= 0.126±0.04; Figure 2A).

Hydrogen peroxide concentration

H₂O₂ concentration (in nmol/g tissue), measured in aortas, was significantly (P<0.01) lower in treated groups (LE=0.69±0.05, ME=0.44±0.10, HE=0.2±0.03) when compared to control (CO=1.46±0.39; Figure 1C).

Determination of reduced and oxidized glutathione

The treatment with estrogen significantly (P<0.05) increases the redox status (GSH/GSSG) and GSH, and decreases GSSG, in comparison to control. Total glutathione was not different among groups (Table 2).

Gp91phox, Trx and p-Akt/total Akt protein expression

Gp91phox expression (in % of pixels, CO=92±14; EB=114±9; ME=89±10; HE=91±13) was not significantly different among groups (Figure 1B). On the other hand, estrogen treatment significantly (P<0.05) decreases Trx expression (in % of pixels CO=150±36; LE=80±20; ME=62±20; HE=80±14; Figure 1D). In addition, the p-Akt/total Akt ratio was significantly (P<0.05) increased in treated groups (LE=109±19; ME=94±6; HE=128±9) when compared to control (CO=66±13; Figure 2B).

DISCUSSION

A novel finding of the present study was that a low dose of estrogen, which is 10% of a high dose, is as effective as high dose to improve the blood pressure control and redox balance in ovariectomized rats.

Our results did not show a significant difference in HR and SAP among the groups. These results are in agreement with studies from He et al (1999) and Masi et al (2006), who also did not find changes in these parameters after estrogen treatment. However, we did find a significant decrease in both MAP and DAP in all treated groups. These results agree with previous studies documenting a decrease in blood pressure in subjects (Elias et al., 1982) and in experimental models (He et al., 1999) after estrogen treatment. These results were confirmed by Magness and Rosenfeld (1989) who also demonstrated that there was a reduction in the vascular tone and in the MAP. The decrease in MAP was due to reduction in DAP, indicating that estrogen induced a decrease in total peripheral resistance. It is very well established in the literature that, estrogen has a vasodilatory role on the vasculature (Hayashi et al., 1992; He et al., 1999; Wellman et al., 1996) and that the estrogen-induced vasorelaxation is mediated by NO (Haynes et al., 2000). These data are in consonance with our results, suggesting an increase in NO bioavailability after estrogen treatment.

Indeed, we also found a decrease in SAPV in estrogen treated groups. This result is in keeping with Head et al (2004) who observed a lower SAPV in the estrogen presence. Our findings indicate an improvement in BP control probably due to a decrease in sympathetic modulation to the vessels. This conclusion is reinforced by the fact that LF component, associated to the vascular sympathetic modulation, was reduced after estrogen treatment. The present findings also agree with El-Mas and Abdel-Rahman (2009) who observed reduced LF oscillations of SAP in rats treated with

estrogen. Our results highlight the estrogen effectiveness, even in a low dose, to decrease sympathetic nervous system participation and the BP variability. This result has strong impact in occurrence of cardiovascular events, since patients with normal mean systolic BP but high variability are at increased risk (Rothwell et al., 2010).

In addition, the present study documented a significant activation of a protein involved in survival pathways, such as the increase in Akt phosphorylation in all estrogen treated rats. The Akt is a downstream target of nonnuclear estrogen signaling. According to the literature, estrogen activates eNOS through the Akt pathway, promoting NO production also in the heart (Simoncini et al., 2000). Thus, under this situation, an increase in Akt phosphorylation is important for estrogen-induced eNOS upregulation. Confirming this idea, we observed a significant increase in NO metabolites in all groups treated suggesting that estrogen was able to activate Akt and increase NO bioavailability.

Another important contribution to regulate vascular tone is the balance between NO and ROS. Our results showed a significant decrease in NADPH oxidase activity, suggesting a reduction in superoxide anion production in all animals treated with estrogen. This indicates that a low dose of estrogen was also able to decrease the superoxide anion production. Indeed, our results are in consonance with a study from Dantas et al (2002) who demonstrated that estrogen has a strong antioxidant potential. On the other hand, we did not find differences among groups in gp91phox expression, a NADPH oxidase subunit. However, according to Wanger and colleagues (2001), the 17 β -estradiol could inhibit the gp91phox expression in human endothelial cells. Probably the time of treatment, as well the specie and cellular redox status, could explain the differences found in the results. Collectively, the increase in NO

bioavailability and the reduced concentration of ROS indicate that there was an improvement in reactive nitrogen/oxygen species balance in all treated groups.

In this direction, GSH/GSSG ratio, an important redox balance index (Jones, 2006), was significantly increased indicating that there was a reduction in oxidative stress. This finding was confirmed in all estrogen treated groups by the significant decrease in GSSG and increase in GSH. A reduction in the oxidized glutathione is required for the optimal redox state of thiol groups and ROS detoxification reactions.

In addition, Trx-1 has been suggested as a marker of oxidative stress (Nakamura et al., 1997), since it is released during these situations (Nordberg and Arner, 2001). Haendeler et al (2004) showed that, in moderate oxidative stress, there was a significant increase in Trx-1 protein expression and mRNA in endothelial cells. Indeed, in the treated groups, the presence of estrogen protected against oxidative stress and reduced Trx-1 expression. Since Trx-1 participates of a complex system involved in the detoxification of hydrogen peroxide (Drechsel and Patel, 2010), its reduction could be a consequence of ROS reduction. Our data showed that the estrogen treatment was able to decrease tissue hydrogen peroxide concentration in a dose dependent manner. Collectively, these results explain the beneficial effects of estrogen as an antioxidant, which may act as a ROS scavenger. Thus, the lower dose of estrogen was as effective as the highest dose used in this study to improve the reactive nitrogen/oxygen species balance probably through a reduction in ROS and an increase in NO bioavailability. These changes could have a role in the reduction of sympathetic tonus to the blood vessels, contributing to the improvement in the blood pressure control (Stauss and Persson, 2000).

CONCLUSION

Our data indicate a cardioprotection provided by a low dose of estrogen. This lower dose might be safer than high doses (Lundstrom et al., 2001; Wang et al., 2007) being a potential therapeutical approach to minimize the menopause symptoms.

Acknowledgements

CNPq Brazilian research agency supported this study. We would like to thank the Weinmann Clinical Analysis Laboratory for performing the hormone measurements.

References

- Akerboom TP, Sies H. 1981. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol* 77:373-382.
- Bengtsson SH, Gulluyan LM, Dusting GJ, Drummond GR. 2003. Novel isoforms of NADPH oxidase in vascular physiology and pathophysiology. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 30(11):849-854.
- Campbell SE, Febbraio MA. 2002. Effect of the ovarian hormones on GLUT4 expression and contraction-stimulated glucose uptake. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282(5):E1139-1146.
- Colditz GA. 1998. Relationship between estrogen levels, use of hormone replacement therapy, and breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 90(11):814-823.
- Dantas AP, Tostes RC, Fortes ZB, Costa SG, Nigro D, Carvalho MH. 2002. In vivo evidence for antioxidant potential of estrogen in microvessels of female spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 39(2 Pt 2):405-411.
- Drechsel DA, Patel M. 2010. Respiration-dependent H₂O₂ removal in brain mitochondria via the thioredoxin/peroxiredoxin system. *J Biol Chem* 285(36):27850-27858.
- Ejima K, Nanri H, Araki M, Uchida K, Kashimura M, Ikeda M. 1999. 17beta-estradiol induces protein thiol/disulfide oxidoreductases and protects cultured bovine aortic endothelial cells from oxidative stress. *Eur J Endocrinol* 140(6):608-613.
- El-Mas MM, Abdel-Rahman AA. 2009. Longitudinal assessment of the effects of oestrogen on blood pressure and cardiovascular autonomic activity in female rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 36(10):1002-1009.
- Elias AN, Meshkinpour H, Valenta LJ. 1982. Attenuation of hypertension by conjugation estrogens. *Nephron* 30(1):89-92.

Ettinger B. 2007. Rationale for use of lower estrogen doses for postmenopausal hormone therapy. *Maturitas* 57(1):81-84.

Florian M, Lu Y, Angle M, Magder S. 2004. Estrogen induced changes in Akt-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase and vasodilation. *Steroids* 69(10):637-645.

Gairard B, Guldenfels C, Haehnel P, Mathelin C. 2009. [Breast density: a major parameter to follow during hormone replacement therapy]. *Gynecol Obstet Fertil* 37(7-8):657-660.

Gambacciani M, Cappagli B, Ciaponi M, Pepe A, Vacca F, Genazzani AR. 2008. Ultra low-dose hormone replacement therapy and bone protection in postmenopausal women. *Maturitas* 59(1):2-6.

Gavin KM, Seals DR, Silver AE, Moreau KL. 2009. Vascular endothelial estrogen receptor alpha is modulated by estrogen status and related to endothelial function and endothelial nitric oxide synthase in healthy women. *J Clin Endocrinol Metab* 94(9):3513-3520.

Granger DL, Anstey NM, Miller WC, Weinberg JB. 1999. Measuring nitric oxide production in human clinical studies. *Methods Enzymol* 301:49-61.

Haendeler J, Tischler V, Hoffmann J, Zeiher AM, Dimmeler S. 2004. Low doses of reactive oxygen species protect endothelial cells from apoptosis by increasing thioredoxin-1 expression. *FEBS Lett* 577(3):427-433.

Hayashi T, Fukuto JM, Ignarro LJ, Chaudhuri G. 1992. Basal release of nitric oxide from aortic rings is greater in female rabbits than in male rabbits: implications for atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(23):11259-11263.

Haynes MP, Sinha D, Russell KS, Collinge M, Fulton D, Morales-Ruiz M, Sessa WC, Bender JR. 2000. Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial

nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells. *Circ Res* 87(8):677-682.

He XR, Wang W, Crofton JT, Share L. 1999. Effects of 17beta-estradiol on the baroreflex control of sympathetic activity in conscious ovariectomized rats. *Am J Physiol* 277(2 Pt 2):R493-498.

Head GA, Obeyesekere VR, Jones ME, Simpson ER, Krozowski ZS. 2004. Aromatase-deficient (ArKO) mice have reduced blood pressure and baroreflex sensitivity. *Endocrinology* 145(9):4286-4291.

Holmgren A. 1984. Enzymatic reduction-oxidation of protein disulfides by thioredoxin. *Methods Enzymol* 107:295-300.

Innes KE, Selfe TK, Taylor AG. 2008. Menopause, the metabolic syndrome, and mind-body therapies. *Menopause* 15(5):1005-1013.

Jones DP. 2006. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 8(9-10):1865-1879.

Klein D, Kern RM, Sokol RZ. 1995. A method for quantification and correction of proteins after transfer to immobilization membranes. *Biochem Mol Biol Int* 36(1):59-66.

Liochev SI, Fridovich I. 1997. Lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a mediator of superoxide anion production. *Arch Biochem Biophys* 337(1):115-120.

Lundstrom E, Wilczek B, von Palffy Z, Soderqvist G, von Schoultz B. 2001. Mammographic breast density during hormone replacement therapy: effects of continuous combination, unopposed transdermal and low-potency estrogen regimens. *Climacteric* 4(1):42-48.

Magness RR, Rosenfeld CR. 1989. Local and systemic estradiol-17 beta: effects on uterine and systemic vasodilation. *Am J Physiol* 256(4 Pt 1):E536-542.

- Malliani A, Pagani M, Lombardi F, Cerutti S. 1991. Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. *Circulation* 84(2):482-492.
- Masi CM, Hawkey LC, Berry JD, Cacioppo JT. 2006. Estrogen metabolites and systolic blood pressure in a population-based sample of postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 91(3):1015-1020.
- Miller AA, Drummond GR, Sobey CG. 2006. Novel isoforms of NADPH-oxidase in cerebral vascular control. *Pharmacol Ther* 111(3):928-948.
- Muzaffar S, Shukla N, Jeremy JY. 2005. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase: a promiscuous therapeutic target for cardiovascular drugs? *Trends Cardiovasc Med* 15(8):278-282.
- Nakamura H, Nakamura K, Yodoi J. 1997. Redox regulation of cellular activation. *Annu Rev Immunol* 15:351-369.
- Nordberg J, Arner ES. 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 31(11):1287-1312.
- O'Lone R, Knorr K, Jaffe IZ, Schaffer ME, Martini PG, Karas RH, Bienkowska J, Mendelsohn ME, Hansen U. 2007. Estrogen receptors alpha and beta mediate distinct pathways of vascular gene expression, including genes involved in mitochondrial electron transport and generation of reactive oxygen species. *Mol Endocrinol* 21(6):1281-1296.
- Pick E, Keisari Y. 1980. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods* 38(1-2):161-170.
- Rothwell PM, Howard SC, Dolan E, O'Brien E, Dobson JE, Dahlof B, Sever PS, Poulter NR. 2010. Prognostic significance of visit-to-visit variability, maximum systolic blood pressure, and episodic hypertension. *Lancet* 375(9718):895-905.

Sartorio CL, Fraccarollo D, Galuppo P, Leutke M, Ertl G, Stefanon I, Bauersachs J. 2007. Mineralocorticoid receptor blockade improves vasomotor dysfunction and vascular oxidative stress early after myocardial infarction. *Hypertension* 50(5):919-925.

Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, Ley K, Chin WW, Liao JK. 2000. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 407(6803):538-541.

Stauss HM. 2007. Identification of blood pressure control mechanisms by power spectral analysis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34(4):362-368.

Stauss HM, Godecke A, Mrowka R, Schrader J, Persson PB. 1999. Enhanced blood pressure variability in eNOS knockout mice. *Hypertension* 33(6):1359-1363.

Stauss HM, Nafz B, Mrowka R, Persson PB. 2000. Blood pressure control in eNOS knock-out mice: comparison with other species under NO blockade. *Acta Physiol Scand* 168(1):155-160.

Stauss HM, Persson PB. 2000. Role of Nitric Oxide in Buffering Short-Term Blood Pressure Fluctuations. *News Physiol Sci* 15:229-233.

Stramba-Badiale M, Fox KM, Priori SG, Collins P, Daly C, Graham I, Jonsson B, Schenck-Gustafsson K, Tendera M. 2006. Cardiovascular diseases in women: a statement from the policy conference of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 27(8):994-1005.

Sugden PH, Clerk A. 2001. Act like a woman: gender differences in susceptibility to cardiovascular disease. *Circ Res* 88(10):975-977.

Tanaka T, Nakamura H, Yodoi J, Bloom ET. 2005. Redox regulation of the signaling pathways leading to eNOS phosphorylation. *Free Radic Biol Med* 38(9):1231-1242.

Wagner AH, Schroeter MR, Hecker M. 2001. 17beta-estradiol inhibition of NADPH oxidase expression in human endothelial cells. *Faseb J* 15(12):2121-2130.

Wang PH, Horng HC, Cheng MH, Chao HT, Chao KC. 2007. Standard and low-dose hormone therapy for postmenopausal women--focus on the breast. *Taiwan J Obstet Gynecol* 46(2):127-134.

Wellman GC, Bonev AD, Nelson MT, Brayden JE. 1996. Gender differences in coronary artery diameter involve estrogen, nitric oxide, and Ca(2+)-dependent K⁺ channels. *Circ Res* 79(5):1024-1030.

Xue B, Singh M, Guo F, Hay M, Johnson AK. 2009. Protective actions of estrogen on angiotensin II-induced hypertension: role of central nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297(5):H1638-1646.

Yanes LL, Romero DG, Iliescu R, Zhang H, Davis D, Reckelhoff JF. 2010. Postmenopausal hypertension: role of the Renin-Angiotensin system. *Hypertension* 56(3):359-363.

Yang XP, Reckelhoff JFE, hormonal replacement therapy and cardiovascular disease. 2011. Estrogen, hormonal replacement therapy and cardiovascular disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 20(2):133-138.

Yang ZZ, Tschopp O, Baudry A, Dummler B, Hynx D, Hemmings BA. 2004. Physiological functions of protein kinase B/Akt. *Biochem Soc Trans* 32(Pt 2):350-354.

Yildirim A. 2010. [Postmenopausal hormone replacement therapy and the cardiovascular system]. *Turk Kardiyol Dern Ars* 38 Suppl 1:32-40.

Figure Caption

Figure 1:

(A) NADPH oxidase activity (mol/g dry weight) in aorta, (B) western blot analysis in aorta homogenates using gp91phox antibody, one representative gel showing two bands for each experimental group.; (C) hydrogen peroxide concentration (nmol/g tissue) in aorta and (D) western blot analysis in aorta homogenates using Trx antibody in aorta, one representative gel showing two bands for each experimental group. * $p < 0.01$ vs. CO group, # $P < 0,05$ vs LE group. Data are mean \pm SD. Control group=CO; High-dose estrogen-treated group=HE; Mid-dose estrogen-treated group=ME; Low-dose estrogen-treated group =LE.

Figure 2:

(A) plasma total nitrites ($\mu\text{mol/L}$); (B) western blot analysis in aorta homogenates using p-Akt (ser657) (p-Akt (ser657)/Akt ratio) antibody. One representative gel showing two bands for each experimental group. * $P < 0.05$ vs. CO group, # $P < 0,05$ vs ME group. Data are mean \pm SD. Control group=CO; High-dose estrogen-treated group=HE; Mid-dose estrogen-treated group=ME; Low-dose estrogen-treated group

Figure 1

Figure 1

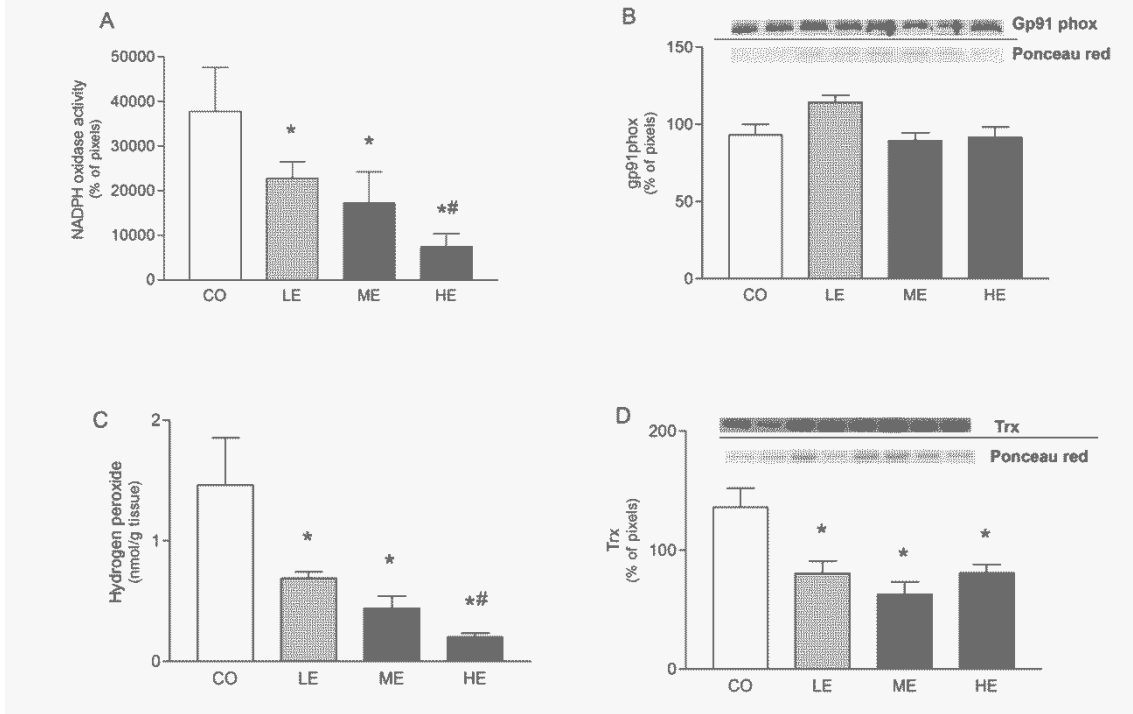


Figure 2

Figure 2

