

PHABLO WENDELL COSTALONGA OLIVEIRA

**METFORMINA REDUZ DISFUNÇÃO VASCULAR  
EM RATAS OVARIECTOMIZADAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup> Nazaré Souza Bissoli

VITÓRIA  
2012

PHABLO WENDELL COSTALONGA OLIVEIRA

**METFORMINA REDUZ DISFUNÇÃO VASCULAR  
EM RATAS OVARIECTOMIZADAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em 28/09/2012

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr<sup>a</sup> Nazaré Souza Bissoli**  
**Dept<sup>o</sup>. Ciências Fisiológicas – UFES**  
**Orientadora**

---

**Prof. Dr<sup>a</sup> Ana Raquel Santos de Medeiros Garcia**  
**Dept<sup>o</sup>. Ciências Fisiológicas – UFES**

---

**Prof. Dr. Roger Lyrio dos Santos**  
**Dept<sup>o</sup>. Ciências Fisiológicas – UFES**

## *DEDICATÓRIA*

**À Deus,**

Que esteve comigo desde o princípio e por todo sempre, me sustentando e me permitindo chegar até aqui. E que jamais me abandonará.

## *AGRADECIMENTOS*

À todos que de alguma forma tornaram possível esse trabalho.

Em especial às alunas de iniciação científica: Lara Nascimento Gusmão e Glauciene Januário de Sousa, que foram grandes amigas e parceiras nesse trabalho.

À aluna de mestrado: Izabela Facco Caliman, pela sua benevolente colaboração nesse trabalho.

À minha orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup> Nazaré Souza Bissoli, pela oportunidade de cursar o mestrado e realizar esse trabalho, e por todo ensinamento e apoio nas dificuldades.

À todos os companheiros de laboratório.

À todos os funcionários que mantem esse programa de pós-graduação funcionando.

À toda população Brasileira, que mesmo talvez não sabendo, sustentam toda essa estrutura de ensino da qual eu felizmente usufrui, através de seus impostos.

Aos meus pais, por toda condição e apoio que me foi dado e me permitiu conseguir chegar até aqui.

E a todos que de alguma forma torceram por mim.

## RESUMO

Oliveira, P. W. C. **Metformina reduz disfunção vascular em ratas ovariectomizadas**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) Departamento de Ciências Fisiológicas – Universidade Federal do Espírito Santo, 2012.

Tanto menopausa como a privação de estrogênio por ovariectomia estão relacionados à disfunção vascular. A metformina é um fármaco hipoglicemiante com efeitos pleiotrópicos ligados a melhoria do sistema cardiovascular. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do tratamento com metformina na função vascular em ratas ovariectomizadas. Ratos Wistar fêmeas, com 8 semanas de idade, foram ovariectomizados (OVX) ou sofreram cirurgia fictícia (SHAM) e após 21 dias foram divididos em 3 grupos e tratados durante 14 dias: SHAM (veículo), OVX (veículo) e MET (ratas OVX tratados com metformina, 300mg/kg/dia). Nestes animais foi estudada a reatividade vascular de relaxamento à acetilcolina (ACh) e ao nitroprussiato de sódio (NPS) no leito vascular mesentérico *ex vivo*. OVX teve prejuízo de resposta à ACh e MET reverteu parcialmente esse prejuízo (SHAM > MET > OVX). Em presença de L-NAME (100µM) essas respostas foram reduzidas e equalizadas, indicando que as diferenças iniciais eram devido a via do óxido nítrico (NO). A adição de indometacina (INDO; 10µM) em conjunto ao L-NAME não alterou a resposta já obtida somente com L-NAME, mostrando não haver participação significativa de prostanoídes nessa resposta. Ao mesmo tempo, não houve diferença entre os grupos na resposta residual em presença conjunta de L-NAME e INDO, que representa a resposta mediada pelo fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). A inibição dos canais de potássio voltagem-dependentes ( $K_v$ ) por 4-aminopiridina (1mM), evocou maior redução de resposta à ACh no MET que no SHAM e OVX, enquanto a inibição da NADPH oxidase (NOX) por apocinina (APO; 30µM) provocou menor alteração de resposta no MET que nos outros grupo, indicando em conjunto um aumento do funcionamento dos  $K_v$  e uma redução do estresse oxidativo via NOX, no

grupo MET. O grupo OVX respondeu menos ao NPS que o SHAM o tratamento crônico com metformina reverteu este prejuízo. A inibição por APO não alterou a resposta ao NPS no SHAM, mas aumentou a resposta no OVX, igualando ao SHAM, indicando que esse prejuízo era relacionado ao estresse oxidativo. No grupo MET, a inibição por APO potencializou a resposta ao NPS. A expressão proteica da eNOS estava reduzida no OVX em relação ao grupo SHAM e a metformina foi capaz de restaurar a expressão da eNOS nos animais ovariectomizados. A expressão proteica da NOX2 estava aumentada no OVX em relação ao grupo SHAM e a metformina foi capaz de reverter esse aumento. Concluímos que a metformina melhora a função vascular em ratas OVX via NO, com aumento da ação do NO e da expressão da eNOS, além de maior participação dos canais  $K_v$  na resposta vasodilatadora à ACh, e redução do estresse oxidativo derivado da NOX e da expressão da NOX2, sugerindo possuir potencial terapêutico para mulheres na pós-menopausa, entretanto mais estudos são necessários para confirmar este potencial.

**Palavras-Chave:** ovariectomia, reatividade vascular, metformina, estresse oxidativo, óxido nítrico.

## ABSTRACT

Oliveira, P. W. C. **Metformin attenuates vascular dysfunction in ovariectomized rats.** 2012. Master thesis (Physiological sciences). Department of Physiological Sciences, Federal University of Espirito Santo, 2012.

Both menopause and estrogen deprivation by ovariectomy are related with vascular dysfunction. Metformin is hypoglycemic drug with pleiotropic effects that are linked with improvement of cardiovascular system. The aim of this study was to evaluate the effects of metformin treatment on vascular function in ovariectomized rats. At 8 weeks of age, female Wistar rats were ovariectomized (OVX) or sham (SHAM) operated and after 21 days was divided into 3 groups and treated for 14 days: SHAM (vehicle), OVX (vehicle) and MET (metformin-treated OVX rats, 300mg/kg/day). Then, was studied the vascular reactivity of relaxation to acetylcholine (ACh) and sodium nitroprusside (SNP) in *ex vivo* mesenteric vascular bed. OVX shows impairment of response to ACh and MET partially reversed this impairment (SHAM > MET > OVX). In presence of L-NAME (100µM) these responses were reduced and equalized, indicating that the initial differences were due to nitric oxide (NO) pathway. The addition of indomethacin (INDO; 10µM) together to the L-NAME did not alter did not alter the response already obtained with L-NAME alone, showing no significant participation of prostanoids in this response. At the same time, there was no difference among groups in the residual response in combined presence of L-NAME and INDO, that representing the endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF)-mediated response. Inhibition of Voltage-Gated Potassium Channels ( $K_v$ ) by 4-aminopyridine (1mM), evoked larger attenuation in ACh-induced response in MET than in SHAM and OVX. The inhibition of NADPH oxidase (NOX) by apocynin (APO; 30µM) lead to a smaller change in MET response than in the other groups, indicating together an enhancement of  $K_v$  function and a reduction in NOX/oxidative stress, in MET group. SNP-induced response of OVX was smaller than SHAM. Metformin treatment was able to normalize this response. APO did not alter

SNP response in SHAM, but increase in OVX, indicating that the impairment was related to NOX/oxidative stress in OVX group. APO enhanced SNP response in MET group. eNOS protein expression was reduced in OVX compared to SHAM group and metformin was able to restore the expression of eNOS in ovariectomized animals. NOX2 protein expression was increased in OVX compared to SHAM group and metformin was able to reverse this increase. We conclude that metformin improves vascular function in OVX rats through NO pathway, with increased action of NO and eNOS expression, beyond a larger participation of  $K_V$  channels, and reduction in NOX/oxidative stress and NOX2 expression, suggesting have therapeutic potential for postmenopausal women, however, more studies are needed to confirm this potential.

**Keywords:** ovariectomy, vascular reactivity, metformin, oxidative stress, nitric oxide.



## LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

4-AP	4-Aminopiridina
ACh	Acetilcolina
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
AMPK	Proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina
APO	Apocinina
COX	Ciclooxigenase
EDHF	Fator hiperpolarizante derivado de endotélio
eNOS	Oxido nítrico sintase endotelial
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
INDO	Indometacina
K <sub>v</sub>	Canal de potássio dependente de voltagem
L-NAME	N $\omega$ -nitro-L-arginina metil ester
LVM	Leito vascular mesentérico
MLV	Musculo liso vascular
NA	Noradrenalina
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma química oxidada)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma química reduzida)
NO	Oxido nítrico
NOS	Oxido nítrico sintase
NOX	NADPH oxidase
NOX2	subunidade da NADPH oxidase
NPS	Nitroprussiato de sódio
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ânion superóxido
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
PGI <sub>2</sub>	Prostaciclina
PP	Pressão de perfusão
R <sub>máx</sub>	Resposta máxima
ROS	Espécies reativas de oxigênio

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1.</b> Ciclicidade estral, níveis de estrogênio, e níveis de FHS.....	15
<b>Figura 2.</b> Mecanismos básicos de relaxamento vascular mediado por células endoteliais.....	18
<b>Figura 3.</b> Mecanismos básicos da metformina.....	20
<b>Figura 4.</b> Organograma resumido do Protocolo Experimental.....	26
<b>Figura 5.</b> Razão do peso úmido do útero das ratas.....	31
<b>Figura 6.</b> Efeito dos inibidores farmacológicos sobre as curvas dose-resposta de relaxamento à acetilcolina.....	32
<b>Figura 7.</b> Efeito da ovariectomia e do tratamento com metformina sobre as curvas dose-resposta de relaxamento à acetilcolina em presença e ausência de inibidores farmacológicos.....	33
<b>Figura 8.</b> Efeito da ovariectomia e do tratamento com metformina sobre as vias mediadoras de relaxamento à acetilcolina.....	34
<b>Figura 9.</b> Comparação dos valores de relaxamento na curva controle (sem inibidores) vs. a soma dos valores de relaxamento via NO e via EDHF obtidos através do uso de inibidores farmacológicos.....	35
<b>Figura 10.</b> Atenuação da resposta de relaxamento à acetilcolina pela inibição da NADPH oxidase por apocinina.....	37
<b>Figura 11.</b> Atenuação da resposta de relaxamento à acetilcolina pelo bloqueio dos canais $K_V$ com 4-aminopiridina.....	38

<b>Figura 12.</b> Efeito da ovariectomia e do tratamento com metformina na curva dose resposta de relaxamento ao nitroprussiato de sódio em presença e ausência de apocinina.....	38
<b>Figura 13.</b> Efeito da apocinina sobre as curvas dose-resposta de relaxamento ao nitroprussiato de sódio.....	39
<b>Figura 14.</b> Expressão relativa de eNOS (eNOS/ $\beta$ -actina) nos ramos vasculares do leito arterial mesentérico.....	40
<b>Figura 15.</b> Expressão relativa de NOX2 (NOX2/ $\beta$ -actina) nos ramos vasculares do leito arterial mesentérico.....	41
<b>Tabela 1.</b> Valor do log negativo da concentração da droga que produz 50% da resposta máxima (pD <sub>2</sub> ) no leito mesentérico em resposta à acetilcolina.....	36
<b>Tabela 2.</b> Valor da área sobre a curva de relaxamento no leito mesentérico em resposta ao nitroprussiato de sódio.....	40

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	Disfunção Vascular na Pós-menopausa humana e Experimental.....	17
1.2	Potencial Terapêutico da Metformina para Melhora da Função Vascular.....	20
2	OBJETIVOS.....	22
2.1	Objetivo Geral.....	22
2.2	Objetivos Específicos.....	22
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1	Animais Experimentais.....	23
3.2	Grupos Experimentais.....	23
3.3	Tratamento dos Grupos.....	23
3.4	Verificação do Ciclo Estral nos Animais SHAM.....	24
3.5	Protocolo Experimental.....	25
3.6	Procedimentos Experimentais.....	26
3.6.1	Procedimentos Cirúrgicos de Ovariectomia.....	26
3.6.2	Reatividade do Leito Vascular Mesentérico.....	26
3.6.2.1	Curvas Dose-resposta e inibidores farmacológicos.....	27
3.6.2.2	Avaliação da Resposta Vascular aos Agonistas Vasodilatadores..	28
3.6.3	Estimativa da Massa dos Úteros.....	29
3.7	Western Blot.....	29
3.8	Análise estatística.....	30
4	RESULTADOS.....	30
4.1	Relação de Peso Úmido dos Úteros.....	30
4.2	Resposta Vascular à Acetilcolina.....	31
4.3	Avaliação da Via do NO e da VIA do EDHF no Relaxamento à Acetilcolina.....	33
4.4	Sensibilidade à Acetilcolina (pD2).....	36
4.5	Participação do H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Derivado da NADPH Oxidase no Relaxamento à Acetilcolina.....	36
4.6	Participação dos Canais KV no Relaxamento à Acetilcolina.....	37

4.7	Resposta Vascular ao Nitroprussiato de Sódio.....	38
4.8	Sensibilidade ao Nitroprussiato de Sódio (pD2).....	39
4.9	Expressão Proteica de eNOS e NOX2.....	40
5	DISCUSSÃO.....	41
5.1	Efeito da Ovariectomia e do Tratamento com Metformina Sobre a Resposta Vascular à Acetilcolina.....	41
5.2	Avaliação da Via do Oxido Nítrico.....	42
5.3	Avaliação da Participação dos Canais KV no Relaxamento à Acetilcolina.....	45
5.4	Participação do H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> como EDHF, Mediando o Relaxamento à Acetilcolina.....	46
5.5	Efeito da Ovariectomia e do Tratamento com Metformina Sobre a NADPH Oxidase e o estresse oxidativo.....	46
6	CONCLUSÕES.....	47
	REFERÊNCIAS.....	49

## 1 INTRODUÇÃO

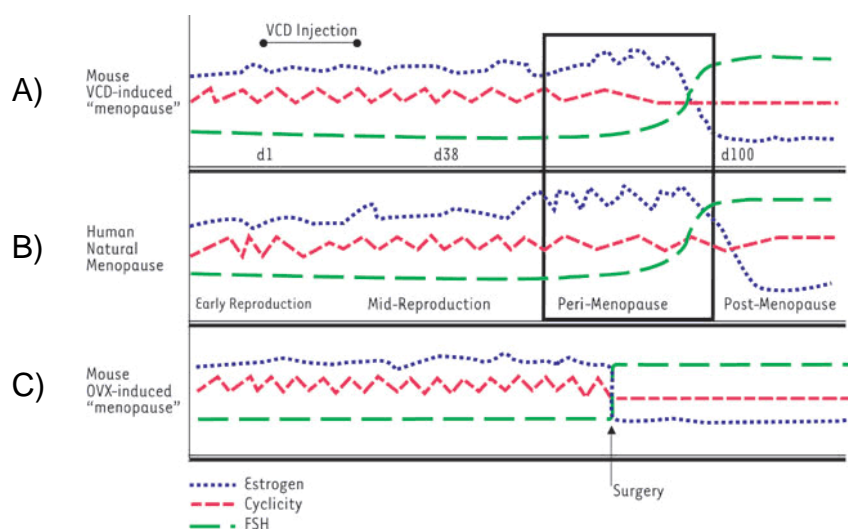
A expectativa de vida das brasileiras vem crescendo nos últimos anos. Assim essas mulheres convivem por mais tempo com as modificações orgânicas que acompanham o envelhecimento. Dentre essas modificações está o processo de menopausa, onde ocorre progressiva queda dos níveis hormonais ovarianos e aumento das gonadotrofinas hipofisárias (Figura 1B). A menopausa pode ser dividida em: pré-menopausa – fase marcada por sintomas que anunciam o início das mudanças orgânicas, perimenopausa – fase de transição onde ocorre cessação da menstruação, e a pós-menopausa – fase que se segue daí em diante e que foi nosso foco de estudo por ser a fase onde ocorre aumento do risco cardiovascular (NOTELOVITZ, 1986; GRACIA et al., 2005; TADDEI et al., 1996).

As doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de mortalidade no mundo (MURRAY & LOPEZ, 1996). Estudos epidemiológicos têm demonstrado um menor risco cardiovascular em mulheres na pré-menopausa do que em homens na mesma faixa etária e mulheres na pós-menopausa, o que está associado com um efeito protetor cardiovascular dos hormônios sexuais ovarianos (JOUSILAHTI et al., 1999; TADDEI et al., 1996). Entretanto a terapia de reposição hormonal, na qual era esperado restauração dessa proteção em mulheres na pós-menopausa, ainda é algo controverso (MANSON et al., 2003; WASSERTHEIL-SMOLLER et al., 2003; YILDIRIR, 2010). Neste sentido, o nosso grupo vem pesquisando o efeito de outras terapias hormonais sobre o sistema cardiovascular e imunológico em modelo animal de pós-menopausa.

Os estudos experimentais em modelo animais ajudam a esclarecer os dados dos estudos epidemiológicos sobre os efeitos da pós-menopausa nas mulheres. Nesse contexto, a ovariectomia em animais experimentais serve como modelo de deficiência estrogênica, mimetizando os efeitos da menopausa mesmo em animais jovens, apesar de que em mulheres a menopausa coexiste, principalmente, com os efeitos do envelhecimento. Esse modelo é adequado para o estudo da pós-menopausa, mas não se

adequa ao estudo da pré-menopausa e perimenopausa, que são processos gradativos de modificação hormonal que acontecem nas mulheres enquanto que a ovariectomia promove uma modificação hormonal abrupta do arranjo hormonal (Figura 1C) (ACOSTA et al., 2009; NOTELOVITZ, 1986; GRACIA et al., 2005). Assim para estudo dessas outras fases o modelo adequado é o de falência ovariana acelerada onde através de injeções de 4-vinilciclohexeno diepoxido o animal desenvolve um processo de menopausa similar ao humano (Figura 1A), porem em velocidade acelerada (VAN KEMPEN et al., 2011).

Para nossos estudos de pós-menopausa, que é a fase onde há aumento do risco cardiovascular, o modelo de ovariectomia foi o escolhido por ser o mais citado na literatura científica, permitindo uma maior comparação de nossos resultados com outros trabalhos (4841 resultados de busca para o termo “ovariectomy” no banco de dados de literatura científica PUBMED, em 24/08/2012).



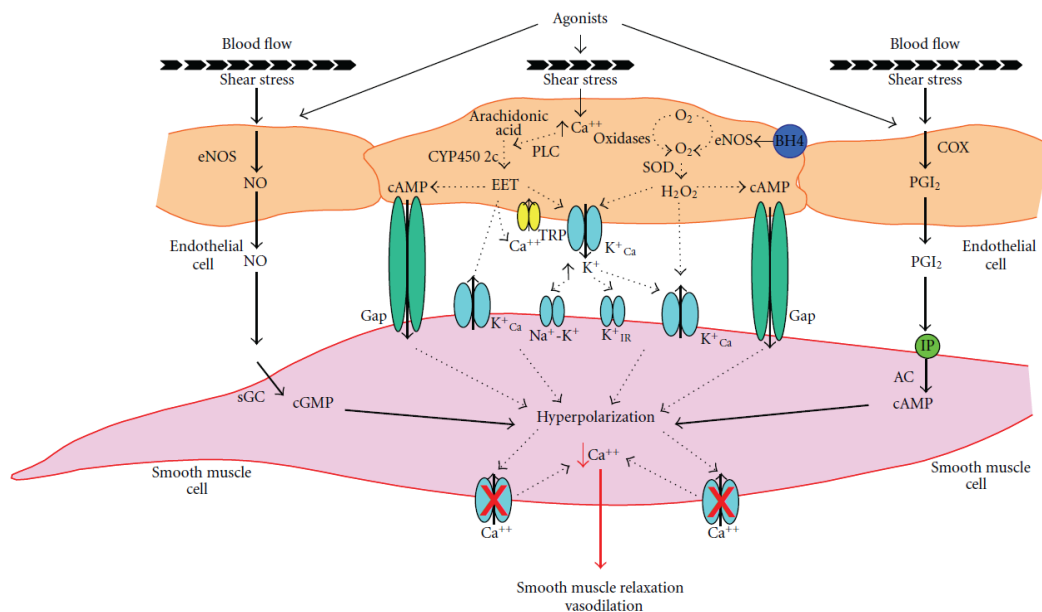
**Figura 1.** Ciclicidade estral, níveis de estrogênio, e níveis de FHS: (A) em ratas com falência ovariana acelerada por 4-vinilciclohexeno diepoxido (VCD) ao longo dos dias após o tratamento químico, (B) em mulheres nas diferentes fases de maturidade sexual, e (C) em ratas ovariectomizadas antes e após a cirurgia. Adaptado de JAX® Notes™ (2005).

Nossos resultados mais recentes mostram que em ratas normotensas ovariectomizadas a tibolona, o raloxifeno e tamoxifeno normalizaram a reatividade vascular coronariana, do leito mesentérico e da aorta, após 21 dias de tratamento, associado à redução de citocinas pro-inflamatórias (TNF-alfa e IL-6) e aumento na concentração de ANP plasmático e cardíaco (LAMAS et al., 2011, CALIMAN et al., 2011; MEDEIROS et al., 2011). Em ratas com hipertensão renal dois rins um clipe, o raloxifeno foi capaz de reduzir a pressão arterial média e esta redução foi correlacionada a aumento na produção de óxido nítrico (NO) plasmático (MORAES et al., 2011). O tamoxifeno, em ratas espontaneamente hipertensas (SHR), normalizou a reatividade coronariana após 90 dias de tratamento, assim como, reduziu a pressão arterial média (BORGIO et al., 2011). Tanto o raloxifeno, o tamoxifeno e a Tibolona apresentam suas ações fisiológicas via os receptores de estrogênios (KUSHNER et al., 2000; ARPINO et AL., 2008), e apesar dos resultados promissores mostrados em estudos clínicos e experimentais (OSBORNE et al., 1998; SATO et al., 1996; TAKAHASHI et al., 2007; MEDEIROS et al., 2011; MORAES et al., 2011; BORGIO et al., 2011), estas terapias também vem apresentando problemas, como surgimento de câncer com a tibolona (BERAL et al., 2005; CUMMINGS et al., 2008) e doenças tromboembólicas com raloxifeno (BARRETT-CONNOR et al., 2006) e tamoxifeno (ONITILLO et al., 2009). Por este motivo, outras terapias que atuam por mecanismos independentes dos receptores de estrogênio devem ser investigadas para que as mulheres na fase perimenopausa ou pós-menopausa possam utilizar para reduzir os riscos cardiovasculares. Neste sentido, no presente trabalho, escolhemos estudar a metformina (N,N-dimetilbiguanida), que é um fármaco recomendado para pacientes com diabetes mellitus tipo 2 não Insulino-dependente (RODBARD et al., 2007), e que além de sua ação hipoglicemiante têm mostrado, em estudos, efeitos pleiotrópicos relacionados a melhora do sistema cardiovascular (LOBATO et al., 2012; BURLÁ et al., 2011).



## 1.1 Disfunção Vascular na Pós-menopausa humana e experimental

As células endoteliais vasculares participam na homeostase do sistema cardiovascular regulando o tônus vascular basal e a resposta vasomotora a diferentes estímulos (Figura 2), controlando a camada muscular subjacente por liberação de fatores vasoconstritores como 20-HETE, PGH<sub>2</sub>, endotelina e angiotensina II, e também por liberação de fatores vasorelaxantes como NO produzido pela NOS, PGI<sub>2</sub> produzida pela COX e o EDHF que é um conjunto de vários fatores produzidos por diferentes fontes (FURCHGOTT & VANHOUTTE, 1989; LEUNG et al., 2006; STANKEVICIUS et al., 2003). Em vasos de condutância, como a aorta, há uma maior participação do NO no relaxamento vascular, enquanto que em vasos de resistência, como no LVM, cresce a participação do EDHF (WOODMAN et al., 2000). Nesse contexto, o estresse oxidativo parece relacionar-se com prejuízo em vias de vasorelaxamento, com redução da biodisponibilidade do NO que reage com o O<sub>2</sub><sup>-</sup> formando peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) (GRYGLEWSKI et al., 1986), e também com inativação do BH<sub>4</sub>, que é um cofator essencial para o funcionamento da NOS e consequente produção de NO. Ao mesmo tempo o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode agir como EDHF promovendo vasorelaxamento, enquanto que em outras situações e dependendo da concentração pode ter ação vasoconstrictora (LUCCHESI et al., 2005).



**Figura 2.** Mecanismos básicos de relaxamento vascular mediado por células endoteliais. Adaptado de OZKOR & QUYYUMI (2011). Um agonista ou a tensão de cisalhamento aumenta a atividade da oxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e da ciclooxygenase (COX), gerando óxido nítrico (NO) e prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) que levam à vasorelaxamento. Existem vários caminhos potenciais para formação de fator hiperpolarizante derivado de endotelio (EDHF). O aumento na concentração de cálcio intracelular ativa a fosfolipase A2 (PLC) para produzir ácido araquidônico que é metabolizado pela citocromo P450 2C (CYP4502c) gerando ácidos eicosatrienóicos (EETs) que podem estimular os canais de potássio ativados por cálcio (K<sub>Ca</sub>) em células endoteliais e do músculo liso. Os EETs também podem ativar diretamente junções tipo Gap e também podem atuar autócrinamente nas células endoteliais por ativação do canal receptor de potencial transiente (TRP) V4, que promove o influxo de cálcio, aumentando ainda mais a concentração de cálcio e ativando canais K<sub>Ca</sub> que causam hiperpolarização e liberação de potássio para o espaço subendotelial. O aumento de potássio no interstício pode ativar canais K<sub>Ca</sub>, canais de potássio retificadores de influxo (K<sub>IR</sub>), ou a bomba sódio/potássio ATPase em células do músculo liso vascular (MLV), gerando hiperpolarização. A hiperpolarização do MLV leva a fechamento dos canais de cálcio promovendo queda na concentração de cálcio e consequente vasodilatação. A eNOS condicionalmente e as oxidases como a NADPH oxidase produzem ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). O peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), gerado por dismutação do superóxido pela superóxido dismutase (SOD), pode também causar hiperpolarização através da ativação de K<sub>Ca</sub> no músculo liso ou por ativação de junções tipo Gap. Adenilciclase: AC; monofosfato cíclico de adenosina: AMPc; monofosfato cíclico de guanosina: GMPc; guanilato ciclase solúvel: GCs; receptor de prostaciclina: IP.

Estudos em mulheres tem demonstrado ocorrência de disfunção vascular na pós-menopausa, com prejuízo de resposta vascular à ACh, verificado por pletismografia no antebraço (TADDEI et al., 1996), como também prejuízo da vasodilatação mediada por fluxo, que é a forma não invasiva comumente utilizada para avaliar a resposta vascular em humanos (MAEDA et al., 2011; MOREAU et al., 2012). E também em mulheres submetidas à ovariectomia, ocorre disfunção vascular, com prejuízo na via do NO (VIRDIS et al., 2000).

Em ratos, a idade avançada, que normalmente acompanha a fase de pós-menopausa em mulheres, leva prejuízo das vias de NO e EDHF em vasos mesentéricos (KHODJA et al., 2012). E adicionalmente aos prejuízos vasculares relacionados à idade, em modelo animal de pós-menopausa por ovariectomia em ratos de senescência acelerada, que mimetiza os efeitos da idade, a ovariectomia leva a um prejuízo ainda maior de resposta à ACh e diminuição da via do NO, igualmente ao que é encontrado em mulheres na pós-menopausa (NOVELLA et al., 2010).

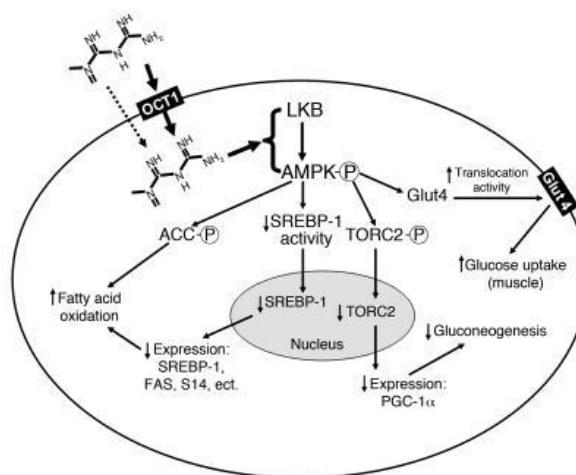
Em ratas ovariectomizadas há prejuízo de relaxamento à ACh com aumento da atividade da NADPH oxidase, do estresse oxidativo, e menor biodisponibilidade de NO (CAMPOREZ et al., 2011; YUNG et al., 2011). Também, em anéis de aorta de coelho a ovariectomia diminui a via do NO (HAYASHI et al., 1992) e em ratas, a ovariectomia diminui o relaxamento via EDHF (LIU et al., 2002).

Assim, em humanos como em modelos experimentais animais, tanto a menopausa como a queda dos estrógenos por ovariectomia e também a idade estão relacionados a aumento do estresse oxidativo com prejuízo nas vias do NO e do EDHF, gerando disfunção vascular, colaborando no aumento do risco cardiovascular. Portanto, em nosso trabalho focamos no estudo dos fatores de relaxamento vascular derivados do endotélio, e do papel do estresse oxidativo nesse relaxamento. Como a maior fonte de ROS nos vasos sanguíneos é a enzima NADPH oxidase (MÜNZEL et al., 1999), que oxida o NADPH à  $\text{NADP}^+$  gerando  $\text{O}_2^-$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ela foi nosso alvo

de investigação quanto ao estresse oxidativo, em especial a NADPH oxidase que contem a subunidade NOX2 (gp91phox), por ser a isoforma mais presente nos vasos sanguíneos (GÖRLACH et al., 2000; RAY & SHAH, 2005). Sendo o mesentérico o maior leito vascular tendo grande influencia sobre a regulação da pressão sanguínea sistêmica (JIN et al., 2010), ele foi o escolhido para realização de nossos estudos.

## 1.2 Potencial Terapêutico da Metformina para Melhora da Função Vascular

A metformina tem como principal alvo celular a fosforilação da AMPK, cuja ativação leva a inibição da produção de glicose pelo fígado, indução da oxidação lipídica, melhora da sensibilidade à insulina e aumento da captação de glicose pelo musculo (Figura 3), colaborando na homeostase energética celular (ANDÚJAR-PLATA et al., 2012). Mas, além disso, tanto a metformina como a AMPK interagem com uma serie de mecanismos intracelulares que participam do controle do tônus vascular.



**Figura 3.** Mecanismos básicos da metformina. Adaptado de SHU et al (2007). A metformina (N,N-dimetilbiguanida) entra nas células com auxílio de transportadores de cátions orgânicos tipo 1 (OCT1), onde promove ativação/fosforilação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) via proteína quinase do fígado (LKB), levando a aumento da oxidação de ácidos graxos e da entrada de glicose com maior translocação de transportador de glicose tipo 4 (GLUT4) para membrana citoplasmática.

A metformina tem efeito agudo de relaxamento vascular em ratos (PEULER et al., 1999), assim como também a ativação da AMPK provoca relaxamento em aorta e vasos mesentéricos de ratos (FORD et al., 2012). Em anéis de aorta de ratos, a metformina, via AMPK, reduziu a vasoconstricção evocada pela fenilefrina (SUNG & CHOI, 2012). Em um estudo in vivo, na artéria íliaca de porcos, a metformina foi capaz de diretamente promover vasodilatação via NO (O'HORA et al., 2012), como também foi mostrado em outro estudo à possibilidade da metformina ser metabolizada liberando NO como metabólito (SEREZHENKOV et al., 2011). A metformina também foi capaz de reduzir os níveis de prostaglandinas vasoconstrictoras e tromboxano A<sub>2</sub> em ratos modelo de síndrome metabólica por sobrecarga de frutose (PUYÓ et al., 2012). Ao mesmo tempo, no leito arterial mesentérico de ratos modelo de obesidade por glutamato, a metformina aumentou a ação do óxido nítrico no ML, diminuiu a produção de ROS e corrigiu o balanço PGI<sub>2</sub>/TXA<sub>2</sub> (LOBATO et al., 2012). Também, o remodelamento vascular de ratos, modelo de obesidade por glutamato, foi atenuado pela metformina (BURLÁ et al., 2011).

A associação de metformina junto à contraceptivo oral promoveu melhora na vasodilatação mediada por fluxo na artéria braquial, em comparação ao tratamento apenas com o contraceptivo, em um estudo duplo-cego em mulheres com sobrepeso e ovário policístico (ESSAH et al., 2011). Já em pacientes com esteatose hepática não-alcoólica, o tratamento crônico com metformina tem efeito benéfico reduzindo a velocidade de onda de pulso (SOFER et al., 2011). Também, em mulheres com angina, mas com artéria coronária normal ao exame de angiografia, a metformina reduziu a incidência de dor e melhorou a resposta à ACh na microcirculação na pele do anti-braço, que foi examinada por laser doppler (JADHAV et al., 2006). Em anéis de aorta de ratos Goto-Kakizaki, modelo de diabetes tipo 2 não-obeso, a metformina corrigiu a disfunção vascular de relaxamento, com aumento da biodisponibilidade de NO e redução do estresse oxidativo,

tanto nos ratos tratados com dieta normal quanto nos ratos tratados com dieta de alta ingestão de gordura (SENA et al., 2011).

A metformina tem efeito agudo de vasorelaxamento em anéis de artéria caudal de ratos, e esse efeito foi associado ao funcionamento dos canais  $K_V$  (PEULER et al., 1999). Além disso, em células HEK293, a AMPK leva a ativação dos canais  $K_V$  (IKEMATSU et al., 2011). Nesse contexto, escolhemos estudar esse canal iônico para verificar o efeito do tratamento crônico com metformina sobre esses canais no LVM. Os canais  $K_V$  são presentes nos vasos sanguíneos participando dos mecanismos de controle vascular (NILIUS & DROOGMANS, 2001; GHISDAL & MOREL, 2001), sendo ativados pela despolarização da membrana citoplasmática e favorecendo a repolarização/hiperpolarização e consequente vasorelaxamento, também podendo ser ativados por ação de agonistas de receptores celulares de controle vasomotor. (GHISDAL & MOREL, 2001)

Diante do exposto, nos hipotetizamos que o tratamento crônico com metformina pode melhorar a disfunção vascular relacionada à deficiência estrogênica, influenciando os fatores vasorelaxantes derivados do endotélio, os canais  $K_V$  e a NADPH oxidase.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar os efeitos do tratamento crônico com metformina na reatividade vascular do leito vascular mesentérico isolado de ratas ovariectomizadas.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar a resposta vascular de relaxamento à acetilcolina e ao nitroprussiato de sódio.
- Avaliar a participação da via do óxido nítrico na resposta à ACh.

- Avaliar a participação da via do EDHF na resposta à ACh.
- Avaliar a participação dos canais  $K_V$  na resposta à ACh.
- Avaliar a participação da NADPH oxidase na resposta à ACh e ao NPS.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais Experimentais**

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), fêmeas com 8 semanas e peso corporal variando entre 180 a 210 g. Esses animais foram fornecidos pelo Biotério de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo. Os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa nº 069/2011. Durante todo o período experimental os animais foram acomodados em gaiolas individuais com livre acesso à água e ração, mantidos em ambiente com temperatura controlada e ciclo claro-escuro de 12h.

#### **3.2 Grupos Experimentais**

Os animais foram aleatoriamente separados em três grupos experimentais:

- 1) SHAM: ratas submetidas à falsa cirurgia de ovariectomia.
- 2) OVX: ratas ovariectomizadas.
- 3) MET: ratas ovariectomizadas tratadas com metformina.

#### **3.3 Tratamento dos Grupos**

Todos os grupos foram tratados por 14 dias. O grupo MET recebeu metformina 300mg/Kg/dia, sendo 200mg/Kg/dia administrado na forma de solução aquosa via oral por gavagem uma vez ao dia, e 100mg/Kg/dia dissolvido na água de beber, de forma similar as dosagens utilizadas em outros trabalhos na faixa de 50-300mg/Kg/dia (GAO et al, 2010; BURLÁ et

al, 2011). Essa dose de 100mg/Kg/dia dissolvida na água de beber foi utilizada para evitar uma queda muito contundente no nível plasmático da droga, devido a sua meia-vida de eliminação de 5h (GRAHAM et al., 2011). A dose foi calculada com base no consumo hídrico médio diário de cada animal, de forma que no volume de água que cada animal bebia por dia, houvesse uma quantidade de metformina equivalente à 100mg da droga por cada quilograma de peso do animal. O consumo de água dos animais do grupo MET era verificado a cada três dias e uma média era feita usando o valor do consumo das últimas três verificações. Utilizamos essa forma mista de administração da metformina, tanto por dose única diária em grande concentração como por dose gradativa em baixa concentração na água de beber, com a finalidade de assegurar que em nosso estudo pudéssemos verificar os efeitos da metformina independentemente da forma de administração. Os grupos SHAM e OVX receberam apenas água (veículo) via oral por gavagem uma vez ao dia. O peso de todos os animais de todos os grupos era verificado todos os dias para ajuste da dose.

### **3.4 Verificação do Ciclo Estral nos Animais SHAM**

No período da manhã, entre 8:00 – 9:00h, a secreção vaginal de cada animal foi recolhida com uma pipeta plástica contendo 1ml de solução salina (NaCl 0,9%). A ponta da pipeta era inserida no interior da vagina do animal, e a solução salina era ejetada e succionada consecutivamente por três vezes. O fluido vaginal coletado de cada animal foi colocado sobre uma lâmina de vidro individual. As lâminas foram observadas sob um microscópio ótico, onde podiam ser reconhecidas as células nucleadas, escamosas, e os leucócitos. A proporção entre esses tipos celulares foi utilizada para a determinação das fases do ciclo estral (LONG & EVANS, 1922; MANDL, 1951). Em nosso trabalho escolhemos a fase proestro para realizar os procedimentos experimentais nos animais, devido a ser a fase de maior nível estrogênico nas ratas.



### 3.5 Protocolo Experimental

Para o ajuste de dose dos tratamentos, o peso de todos os animais de todos os grupos foi verificado todos os dias e o consumo de água dos animais do grupo MET foi verificado a cada três dias.

Para os animais do grupo SHAM, a partir do 30º dia de protocolo, foram feitas diariamente lâminas de esfregaço vaginal para verificação da fase do ciclo ovulatório. Onde os procedimentos experimentais só foram realizados em animais na fase proestro do ciclo ovulatório. Como nos outros grupos esses procedimentos foram realizados no 35º dia de protocolo experimental, nos animais do grupo SHAM houve uma tolerância de até três dias para esperar que o animal estivesse na fase proestro.

Esquematização das etapas de maior relevância do protocolo experimental:

1º dia do protocolo:

- Verificação do peso corporal
- Execução dos procedimentos cirúrgicos de ovariectomia.

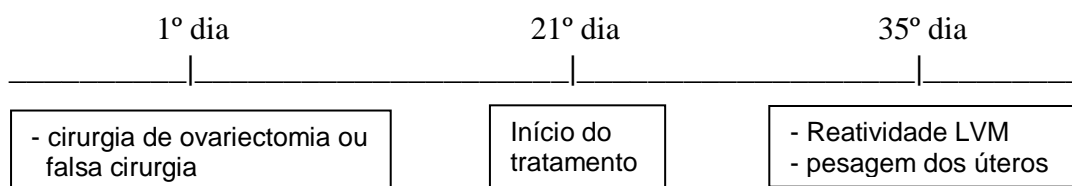
21º dia do protocolo:

- Verificação do peso corporal.
- Início do tratamento dos animais.

35º dia do protocolo:

(podendo ser prorrogado por até mais 3 dias no grupo SHAM, para esperar a fase proestro do ciclo ovulatório)

- Verificação do peso corporal .
- Cateterização da artéria mesentérica superior e isolamento do leito vascular mesentérico para realização de técnica de reatividade vascular.
- Coleta de amostra de sangue.
- Os animais foram sacrificados e o útero foi retirado para obtenção do peso úmido das vísceras.



**Figura 4.** Organograma resumido do Protocolo Experimental.

### 3.6 Procedimentos Experimentais

#### 3.6.1 procedimentos cirúrgicos de Ovariectomia

Após anestesia intraperitoneal por mistura de Ketamina ( $30\text{mg.kg}^{-1}$ ) e xilazina ( $3\text{mg.kg}^{-1}$ ), os animais foram submetidos a uma incisão de 1 a 1,5cm na pele, entre a última costela e a coxa, a 1 cm da linha mediana, seguida de uma incisão na camada muscular, abrindo a cavidade peritoneal para posterior remoção dos ovários e ligadura da trompa uterina. Após a retirada dos ovários, foi realizada sutura da musculatura e pele. O mesmo processo foi realizado no lado oposto. Ao final do procedimento os animais foram recolocados em gaiolas individuais. Para os animais do grupo SHAM os procedimentos foram realizados da mesma forma, porém sem a retirada dos ovários.

#### 3.6.2 Reatividade do Leito Vascular Mesentérico

Foi utilizado o leito vascular mesentérico (LVM) isolado, segundo a descrição de McGregor (1965). Após anestesia por Ketamina ( $30\text{mg.kg}^{-1}$ ) e xilazina ( $3\text{mg.kg}^{-1}$ ), foi realizada laparotomia para acessar a artéria mesentérica superior, que foi isolada e cateterizada com uma cânula de polietileno (PE50). Imediatamente o leito foi perfundido com solução nutritora, composta por: NaCl 130 mM; KCl 4,7 mM;  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1,17 mM;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1,6 mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,18 mM;  $\text{NaHCO}_3$  14,9 mM; EDTA 0,026

mM e Glicose 11,1 mM, mantida a 37°C, com pH de 7,4 e sendo gaseificada por borbulhamento com carbogênio ( 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>). Por meio de uma bomba peristáltica (Ismatec AS LaboratoriumStechnik, Switzerland), foi mantido um fluxo pulsátil de aproximadamente 4,0 ml/min e uma pressão de perfusão (PP) média de 30 ± 5mmHg. O leito como um todo foi cuidadosamente removido, liberado em sua borda dos intestinos, desprovido dos tecidos linfáticos aderentes e colocado num banho de órgão isolado. A pressão de perfusão foi medida através de um transdutor de pressão (Spectramed P23XL) e os dados foram registrados via software (Acqknowledge for Windows; Biopac Inc.). Após um período de estabilização (20 à 30 minutos), foi induzido aumento da PP do LVM, por vasoconstricção com uso de solução nutritora adicionada de quantidade variável de noradrenalina (6-30 µM) que fosse suficiente para elevação de 80-110mmHg na PP. Então foi realizado o estudo da reatividade vascular, como descrito a seguir.

### 3.6.2.1 Curvas Dose-resposta e inibidores farmacológicos

Foram construídas curvas dose-resposta de relaxamento á acetilcolina e, em seguida, ao nitroprussiato de sódio. Para tanto, foram aplicadas doses (10<sup>-13</sup> á 10<sup>-4</sup> M) intervaladas desses agonistas no LVM. Essas curvas foram realizadas em ausência de inibidores farmacológicos (curva controle), e posteriormente em presença de inibidores.

Foram utilizados os seguintes inibidores farmacológicos:

- L-NAME (100µM), inibidor inespecífico da NOS. Para avaliar o papel do NO produzido por essa enzima na resposta vascular ao agonista.
- INDO (10µM), inibidor inespecífico da COX. Para avaliar o papel dos prostanóides produzidos por essa enzima na resposta vascular ao agonista.
- APO (30µM), inibidor inespecífico da NOX. Para avaliar o papel das ROS produzidas por essa enzima na resposta vascular ao agonista.

- 4-AP (1mM), inibidor específico dos canais  $K_V$ . Para avaliar o papel desses canais na resposta vascular ao agonista.

O uso desses inibidores nas curvas dose-resposta foi feito da seguinte forma:

- Em uma amostra de animais experimentais foi utilizado o L-NAME sozinho, e posteriormente o L-NAME associado a INDO, nas curvas de resposta à ACh.
- Em outra amostra de animais experimentais foi utilizado a 4-AP, nas curvas de resposta à ACh.
- Em outra amostra de animais experimentais foi utilizado a APO, nas curvas de resposta à ACh e ao NPS.

### 3.6.2.2 Avaliação da Resposta Vascular aos Agonistas Vasodilatadores

Para cada curva dose-resposta, a sensibilidade à ACh ou ao NPS foi calculada por análise de regressão não-linear como logaritmo negativo da concentração de agonista que produziu metade da  $R_{max}$  ( $pD_2$ ).

A participação do NO no relaxamento foi definida como a redução da resposta de relaxamento evocada pelo L-NAME, que inibe a enzima NOS produtora do NO. A participação da  $PGI_2$  no relaxamento foi definida como a redução da resposta de relaxamento evocada pela INDO, que inibe a enzima COX produtora da  $PGI_2$ . A participação do EDHF no relaxamento foi definida como sendo o relaxamento residual que ocorre após inibição conjunta da NOS e da COX.

Para cada curva dose-resposta foi calculado a AUC, que é a área entre a curva e o eixo das abscissas, e a partir da AUC foi calculado a dAUC, que nesse caso é a diferença entre a AUC antes e a AUC após a presença de um inibidor farmacológico. A AUC foi utilizada tanto para mensurar a resposta na curva controle de relaxamento ao agonista como para mensurar a resposta residual após o uso de algum inibidor, enquanto que a dAUC foi utilizada para mensurar o quanto que a resposta de relaxamento era reduzida na presença de algum inibidor. Tanto AUC como dAUC foram

calculados a partir das curvas dose-resposta de cada animal e foram expressos como valores absolutos, dando ideia da magnitude daquela via, ou como valores percentuais, dando ideia da influência daquela via na resposta total.

### 3.6.3 Estimativa da Massa dos Úteros

Após a remoção do LVM, os animais foram sacrificados o útero foi isolado, lavado com solução fisiológica e o excesso de líquido foi removido com papel de filtro e em seguida foi pesado. Então, para ter uma estimativa de atrofia ou hipertrofia do útero, foi calculado a razão entre o peso do órgão úmido (mg) e o peso corporal do rato (g), o que chamamos de razão do peso úmido (RPU, mg/g).

### 3.7 Western Blot

Os ramos vasculares do leito arterial mesentérico foram rapidamente retirados, imediatamente armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Foi obtido homogeneizado proteico das amostras, que foram mantidas refrigeradas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até serem usadas. As amostras foram então submetidas a uma eletroforese em gel (acrilamida/bisacrilamida 29:1), sendo o gel de separação a 7,5% preparado em tampão contendo 1,5 M tris-HCl pH 8,8 e 0,1% de SDS e o gel de entrada a 4% em tampão 0,5 M tris-HCl pH 6,8 e 0,1% de SDS. A composição do tampão de eletroforese foi 25 mM de tris-HCl pH 8,3, 200 mM de glicina e 1% de SDS. A eletroforese das proteínas foi realizada a 80 Volts com duração de 2h30min. Após a eletroforese, as bandas protéicas foram transferidas para a membrana de PVDF (Bio-rad) utilizando-se tampão com 25 mM de tris, 193 mM de glicina e 20% de metanol. A transferência foi feita em cuba semiseca por 55 minutos, sendo a amperagem estabelecida em função da área da membrana. O bloqueio das membranas de PVDF foi feito com tampão TBS-twenn 0,1% (10 mM de tris-HCl pH 7,4 e 100 mM de NaCl) acrescido de leite em pó desnatado a 5%, à temperatura ambiente sob agitação. Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo monoclonal específico para a proteína a ser

avaliada (eNOS ou NOX2 ou  $\beta$ -actina) por 4 horas a temperatura ambiente. Após este período, a membrana foi lavada em tampão TBS-tween 0,1%, e incubada com o anticorpo secundário (IgG, anti-camundongo conjugado para fosfatase alcalina - 1:2500, Abcam Inc.) por 1 hora, à temperatura ambiente, sob agitação suave. A banda da proteína foi revelada utilizando-se o Kit NBT/BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate nitroblue tetrazolium (NBT)/5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP) - Invitrogen), de acordo com as especificações do fabricante. As membranas tiveram suas imagens digitalizadas com o auxílio do scanner, as quais foram salvas em arquivo tipo "TIF". Em seguida, as bandas foram quantificadas em unidades arbitrárias com o auxílio do programa ImageJ (domínio público). Os dados da expressão proteica das proteínas foram mostrados pela razão da densidade da banda da proteína analisada pela banda da  $\beta$ -actina (proteína normalizadora).

### **3.8 Análise Estatística**

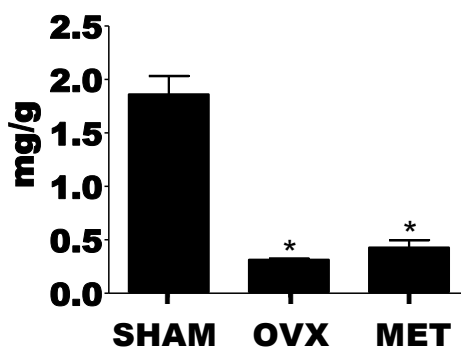
Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Para comparação dos valores de expressão proteica foi utilizado teste exato de Fisher's. As curvas dose-resposta foram analisadas por ANOVA de duas vias seguido do teste de Bonferroni, e para as demais comparações foi utilizado ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey, ambos analisados via software (Graphpad Prism, versão 5.01). O nível de significância estabelecido foi  $p < 0,05$ .

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Relação de Peso Úmido dos Úteros**

Todos os animais que sofreram ovariectomia tiveram redução da RPU do útero em relação ao grupo SHAM, demonstrando que a retirada dos ovários foi realizada com sucesso, onde a falta dos hormônios ovarianos

levou a atrofia do útero (Figura 5). E a metformina não foi capaz de alterar a RPU.

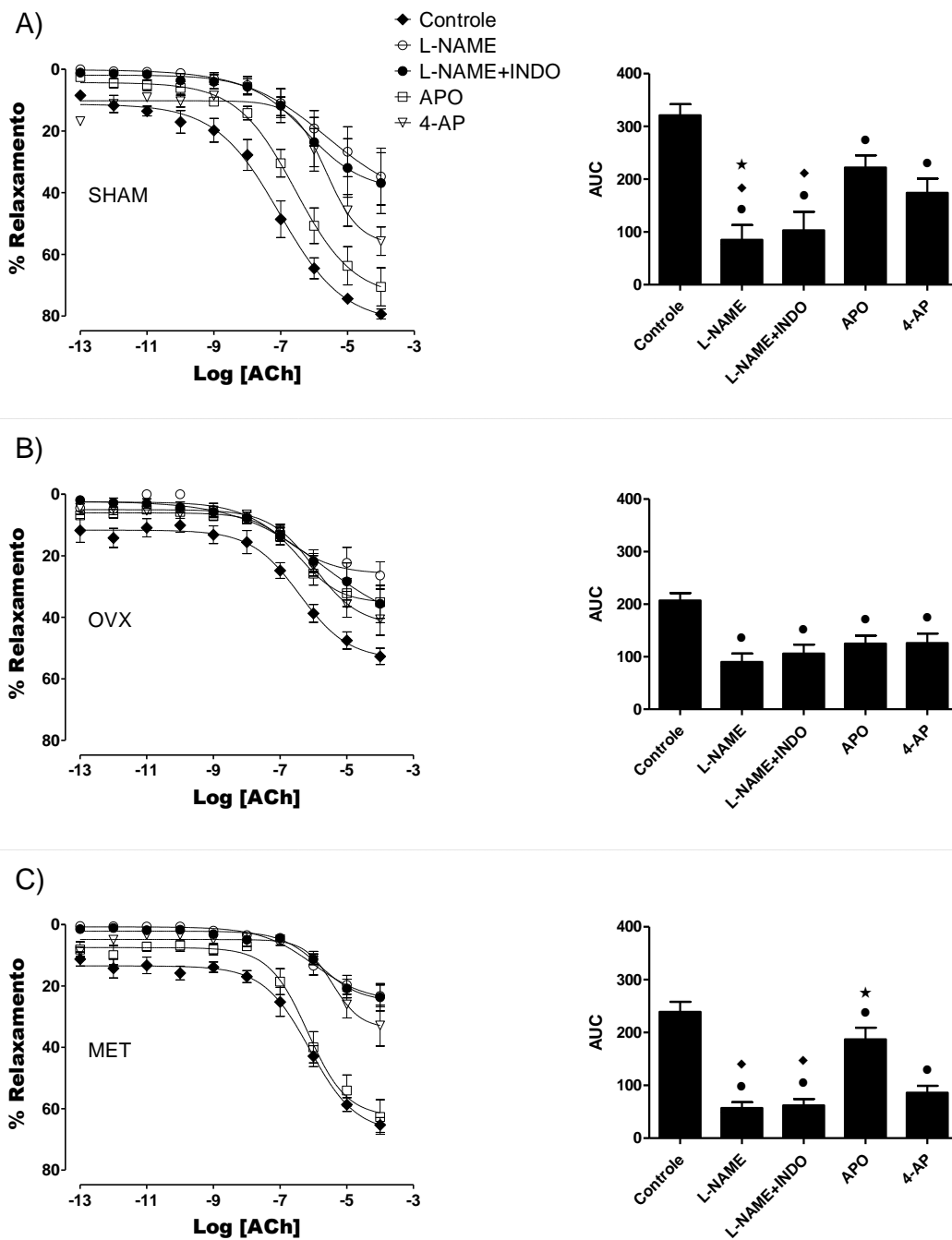


**Figura 5.** Razão do peso úmido do útero das ratas (peso úmido do útero / peso corporal). n = 6 por grupo. \*P < 0,05 vs. SHAM.

#### 4.2 Resposta Vascular à Acetilcolina

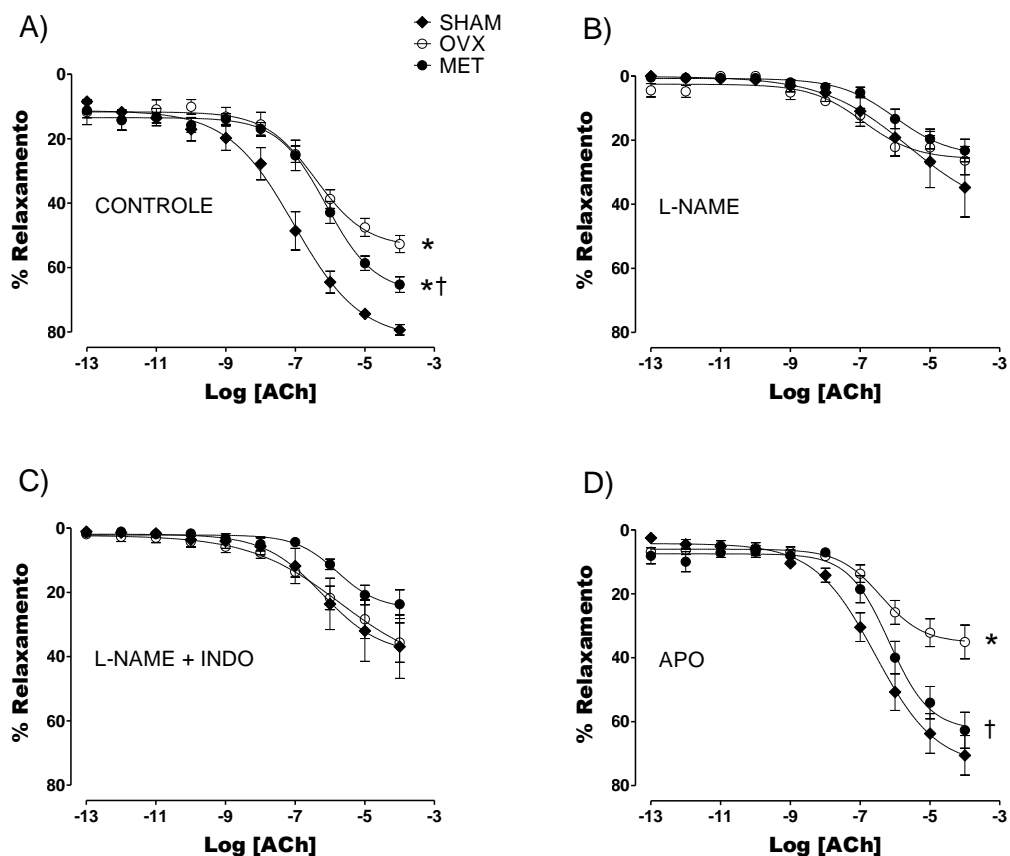
Os inibidores utilizados no estudo reduziram a resposta de vasorelaxamento à ACh em todos os grupos, demonstrando a participação dessas vias no relaxamento do LVM de todos os grupos estudados (Figura 6A-C).

A ovariectomia levou a diminuição da resposta de vasorelaxamento à ACh no LVM em comparação ao grupo SHAM, e este prejuízo foi parcialmente revertido pelo tratamento crônico com metformina (Figura 7A).



**Figura 6.** Efeito dos inibidores farmacológicos sobre as curvas dose-resposta de relaxamento à acetilcolina. (A) Curvas do animal SHAM e suas respectivas AUC, (B) Curvas do animal OVX e suas respectivas AUC, (C) Curvas do animal MET e suas respectivas AUC. ●P<0,05 vs Controle; ♦P<0,05 vs APO; ★P<0,05 vs 4-AP.



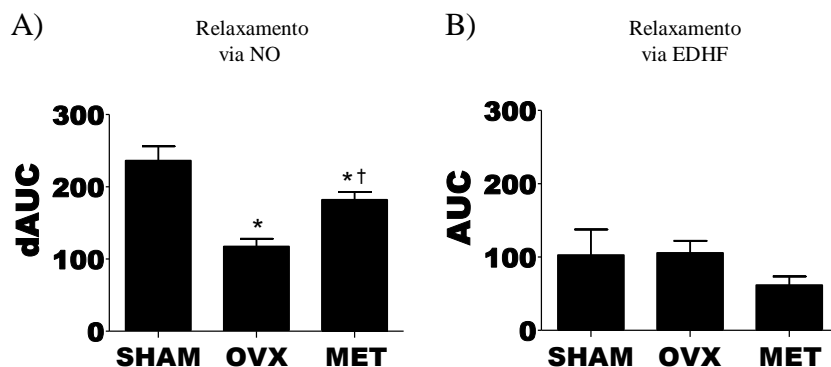


**Figura 7.** Efeito da ovariectomia e do tratamento com metformina sobre as curvas dose-resposta de relaxamento à acetilcolina em presença e ausência de inibidores farmacológicos. (A) Curva controle sem inibidores, (B) em presença de L-NAME, (C) em presença conjunta de L-NAME e Indometacina, e (D) em presença de apocinina.  $n=6$  por grupo. \* $P<0,05$  vs. SHAM; † $P<0,05$  vs. OVX.

#### 4.3 Avaliação da Via do NO e da VIA do EDHF no Relaxamento à Acetilcolina

Em todos os grupos, o L-NAME diminuiu acentuadamente o relaxamento induzido por ACh (Figura 6A-C), igualando as respostas entre os grupos (Figura 7B), mostrando que a diferença de resposta que existia era provavelmente pela via do NO. Além disso, a participação do NO nas respostas de relaxamento à ACh foi acessada por meio da dAUC antes e após a presença de L-NAME (Figura 8A), onde a queda de resposta evocada pelo L-NAME representa a participação do óxido nítrico no vasorelaxamento. Assim, foi mostrado que a ovariectomia reduziu o

relaxamento à ACh via NO em comparação ao grupo SHAM e o tratamento com metformina reverteu parcialmente esse prejuízo.



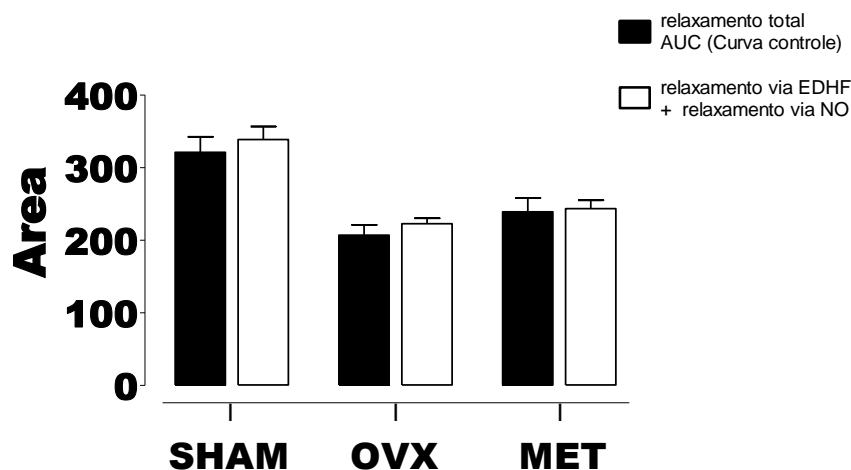
**Figura 8.** Efeito da ovariectomia e do tratamento com metformina sobre as vias mediadoras de relaxamento à acetilcolina. (A) dAUC antes e depois da presença de L-NAME, e (B) AUC na presença conjunta de L-NAME e indometacina. Esses dados dão informação sobre a magnitude da participação das vias de óxido nítrico e EDHF no relaxamento à acetilcolina. n=6 per group. \*P<0.05 vs. SHAM; †P <0.05 vs. OVX.

A participação de EDHF nas respostas de relaxamento foi acessada por inibição simultânea da produção de NO e PGI<sub>2</sub> por presença conjunta de L-NAME e INDO, permanecendo uma resposta residual não-NO/não-PGI<sub>2</sub> que é atribuída ao EDHF. Nessa situação, não houve diferença entre os grupos no vasorelaxamento à ACh mediado por EDHF (Figura 7C). Estes dados mostram que nem a ovariectomia isoladamente nem ovariectomia associada ao tratamento por metformina alteraram o relaxamento mediado por EDHF, como também foi visto ao acessar a participação do EDHF no relaxamento por meio da AUC (Figura 8B).

Comparando os grupos, as respostas de vasorelaxamento à ACh, que eram iguais em presença de L-NAME, permaneceram iguais após a adição de INDO juntamente ao L-NAME (Figura 7B-C). Além disso, não houve mudança, em nenhum grupo, na resposta à ACh na presença conjunta de L-NAME e INDO em comparação a resposta na presença de L-NAME sozinho (Figura 6A-C). Esses dados mostram uma participação não

significativa de prostanoídes nas repostas de vasorelaxamento à ACh em todos os grupos.

Assim, assume-se que a resposta à ACh na curva controle (sem inibidores) é mediada prioritariamente pelas vias do NO e do EDHF conjuntamente no LVM. Em nosso trabalho, a participação do NO e do EDHF na resposta vasorelaxante à ACh foi calculada, respectivamente, pela dAUC antes e após a presença de L-NAME, e pela AUC após a presença conjunta de L-NAME e INDO (Figura 8A-B). Então, para verificar a consistência desses valores de participação de NO e de EDHF obtidos através desse método, foi feito dentro de cada grupo a soma do valor do relaxamento via NO (Figura 8A) com o valor do relaxamento via EDHF (Figura 8B), e o resultado dessa soma foi comparada ao valor da AUC de relaxamento na curva controle (sem inibidores) (Figura 6A-C). Não houve diferenças nessa comparação em nenhum dos grupos, demonstrando a consistência dos valores obtidos por esse método (Figura 9).



**Figura 9.** Comparação dos valores de relaxamento na curva controle (sem inibidores) vs. a soma dos valores de relaxamento via NO e via EDHF obtidos através do uso de inibidores farmacológicos. n=6 por grupo.

#### 4.4 Sensibilidade à Acetilcolina (pD<sub>2</sub>)

Nas curvas dose-resposta de relaxamento à ACh não houveram alterações no pD<sub>2</sub> entre os grupos nas diferentes condições experimentais, indicando que nem a ovariectomia nem o tratamento adicional com metformina alteraram a sensibilidade à ACh (Tabela 1).

**Tabela 1:** Valor do log negativo da concentração da droga que produz 50% da resposta máxima (pD<sub>2</sub>) no leito mesentérico em resposta à acetilcolina.

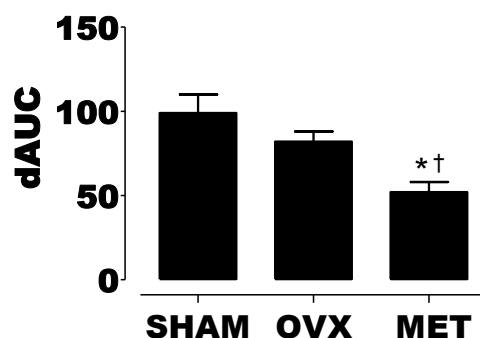
Bloqueio	SHAM	OVX	MET
Controle (sem inibidores)	7,04 ± 0,19	6,41 ± 0,24	6,11 ± 0,18
L-NAME	5,61 ± 1,44	6,91 ± 0,37	6,00 ± 0,35
L-NAME + INDO	6,22 ± 0,64	5,71 ± 1,06	5,79 ± 0,29
APO	6,56 ± 0,23	6,41 ± 0,21	6,17 ± 0,21
4-AP	5,63 ± 0,21	5,98 ± 0,23	5,43 ± 0,23

Os valores foram apresentados como média ± EPM. n=6 por grupo.

#### 4.5 Participação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Derivado da NADPH Oxidase no Relaxamento à Acetilcolina

O EDHF é um conjunto de diferentes fatores vasorelaxantes produzidos no endotélio vascular a partir de diferentes fontes, sendo um destes fatores o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (LUCCHESI et al., 2005), que é formado a partir da dismutação do O<sub>2</sub><sup>-</sup> cuja maior fonte nos vasos sanguíneos é produzido pela NOX (MÜNDEL et al., 1999). Assim, na resposta vasorelaxante à ACh, para acessar a participação desse EDHF que é derivada da NADPH oxidase, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foi calculada a dAUC antes e após a presença de APO, que é um inibidor da NOX. A partir disso, foi observada uma maior participação dessa

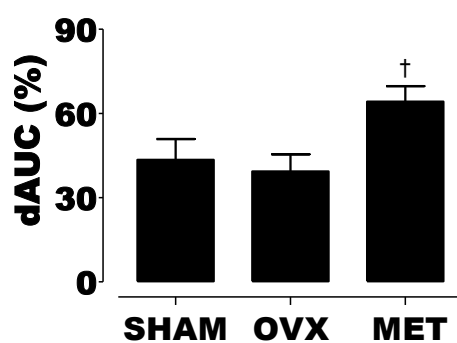
via no vasorelaxamento dos grupos SHAM e OVX em comparação ao MET (Figura 7D e 10), uma vez que houve maior inibição da resposta no SHAM e OVX do que no MET.



**Figura 10.** Atenuação da resposta de relaxamento à acetilcolina pela inibição da NADPH oxidase por apocinina (30 $\mu$ M). n = 6 por grupo. \*P<0,05 vs. SHAM; †P<0,05 vs. OVX.

#### 4.6 Participação dos Canais $K_v$ no Relaxamento à Acetilcolina

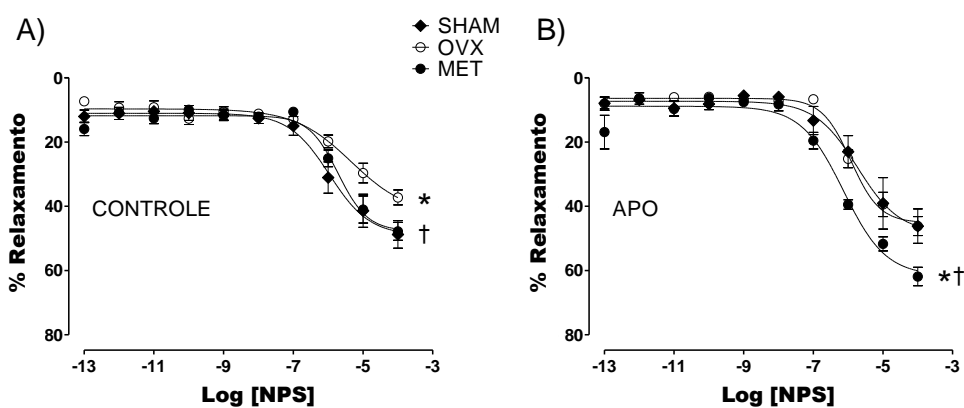
Podendo ser ativados por ação de agonistas, os canais  $K_v$  atuam favorecendo a repolarização/hiperpolarização e conseqüentemente o relaxamento vascular (GHISDAL & MOREL, 2001). Então, como esse canal colabora para hiperpolarização e ativação de todas as vias de vasorelaxamento, para avaliar a influencia desse canal na resposta de relaxamento à ACh, foi calculada a dAUC (%) antes e após a presença de 4-AP, que é um inibidor dos canais  $K_v$ . Onde foi visto uma maior importância desse canal no grupo MET em relação ao OVX, (Figura 6A-C e 11), já que houve maior inibição da resposta no MET do que no OVX.



**Figura 11.** Atenuação da resposta de relaxamento à acetilcolina pelo bloqueio dos canais Kv com 4-aminopiridina (1 mM). n = 6 por grupo. <sup>†</sup>P<0,05 vs OVX.

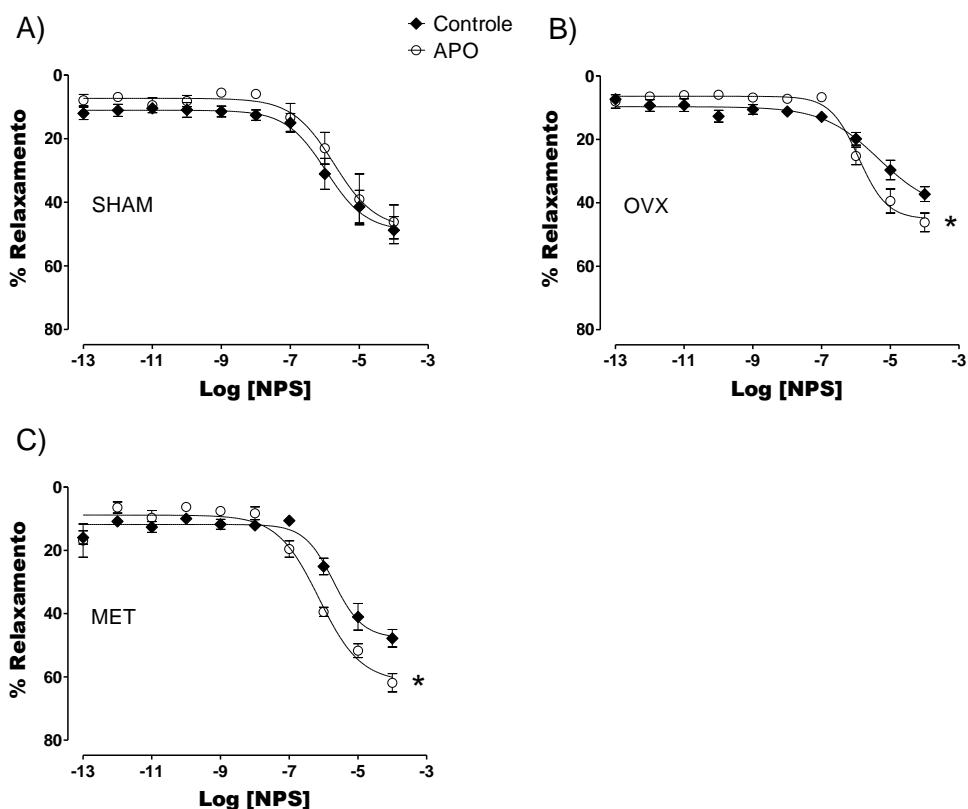
#### 4.7 Resposta Vascular ao Nitroprussiato de Sódio

Na curva dose resposta de relaxamento ao NPS, que é um doador de NO, o grupo OVX apresentou prejuízo de resposta em relação ao grupo SHAM e a metformina foi capaz de normalizar essa resposta prejudicada pela ovariectomia (Figura 12A).



**Figura 12.** Efeito da ovariectomia e do tratamento com metformina na curva dose resposta de relaxamento ao nitroprussiato de sódio em presença e ausência de apocinina. (A) Curva controle sem inibidores, (B) em presença de apocinina. n=5 por grupo. \*P<0,05 vs. SHAM; <sup>†</sup>P<0,05 vs. OVX.

Quando em presença de apocinina, inibidor da NADPH oxidase, não houve alteração na resposta dos animais SHAM (Figura 13A), mas houve aumento na resposta do grupo OVX (Figura 13B), que se igualou ao SHAM (Figura 12B). Por outro lado, na presença da apocinina o grupo MET aumentou a resposta ao NPS (Figura 13C), tendo um relaxamento superior ao dos grupos SHAM e OVX nas mesmas condições (Figura 12B).



**Figura 13.** Efeito da apocinina sobre as curvas dose-resposta de relaxamento ao nitroprussiato de sódio. (A) Curva do animal SHAM, (B) Curva do animal OVX, (C) Curva do animal MET e (D) AUC de todos os grupos.  $n=5$  por grupo. \* $P<0,05$  vs. curva controle.

#### 4.8 Sensibilidade ao Nitroprussiato de Sódio ( $pD_2$ )

Nas curvas dose-resposta de relaxamento ao NPS não houve alterações no  $pD_2$  entre os grupos nas diferentes condições experimentais, indicando que nem a ovariectomia nem o tratamento adicional com metformina alteraram a sensibilidade ao NPS (tabela 2).

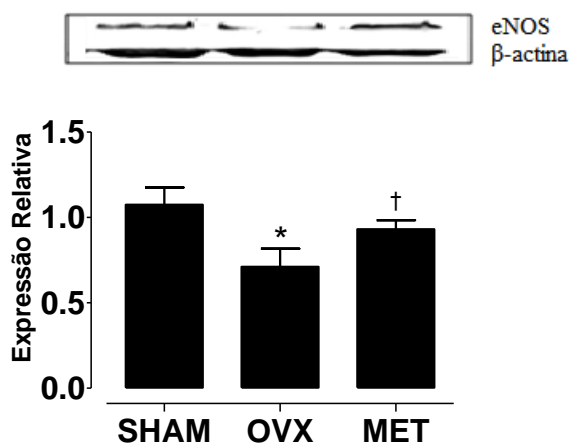
**Tabela 2:** Valor do log negativo da concentração da droga que produz 50% da resposta máxima ( $pD_2$ ) no leito vascular mesentérico em resposta ao nitroprussiato de sódio.

Bloqueio	SHAM	OVX	MET
Controle (sem inibidor)	5,97 ± 0,23	5,33 ± 0,43	5,72 ± 0,14
APO	5,73 ± 0,31	5,92 ± 0,10	6,13 ± 0,16

Os valores foram apresentados como média ± EPM. n=5 por grupo.

#### 4.9 Expressão Proteica de eNOS e NOX2

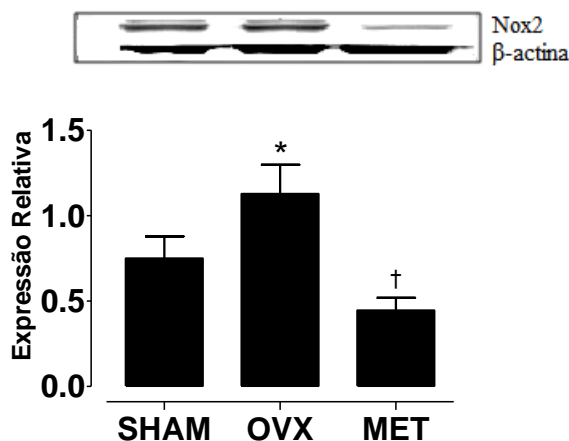
Na avaliação da expressão proteica da eNOS, o grupo OVX apresentou redução dessa enzima em relação ao grupo SHAM e a metformina foi capaz de restaurar a expressão da eNOS nos animais ovariectomizados (Figura 14).



**Figura 14.** Expressão proteica relativa de eNOS (eNOS/β-actina) nos ramos vasculares do leito arterial mesentérico. Análise representativa Western blot com quantificação da expressão proteica de eNOS (140kDa) normalizada pela β-actina (42kDa), que foi usada como controle endógeno. n=6 por grupo. \*P<0,05 vs. SHAM; †P<0,05 vs. OVX.



Na avaliação da expressão proteica da NOX2 (gp91phox), que é uma subunidade da principal isoforma da NADPH oxidase presente nos vasos sanguíneos (GÖRLACH et al., 2000; RAY & SHAH, 2005), o grupo OVX apresentou aumento da NOX2 em relação ao SHAM, e a metformina reverteu esse aumento, igualando ao grupo SHAM.



**Figura 15.** Expressão proteica relativa de NOX2 (NOX2/β-actina) nos ramos vasculares do leito arterial mesentérico. Análise representativa Western blot com quantificação da expressão proteica de NOX2 (58kDa) normalizada pela β-actina (42kDa), que foi usada como controle endógeno. n=6 por grupo. \*P<0,05 vs. SHAM; †P<0,05 vs. OVX.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Efeito da Ovariectomia e do Tratamento com Metformina Sobre a Resposta Vascular à Acetilcolina

Como foi mostrado, a ovariectomia resultou em prejuízo do vasorelaxamento à ACh, como demonstrado em estudos anteriores (CAMPOREZ et al., 2011; CHANAWIRAT et al., 2006), e esse prejuízo pôde ser parcialmente revertido pela metformina. De forma semelhante, estudos em diferentes modelos experimentais mostram a metformina melhorando situações de disfunção vascular, como em modelo de ratos obesos por glutamato (LOBATO et al., 2012), em modelo de diabetes 2 não

obesos (SENA et al., 2011), e em ratos modelo de síndrome metabólica por sobrecarga de frutose (PUYÓ et al., 2012). Igualmente, em estudos em mulheres, a metformina melhorou a vasodilatação mediada por fluxo na artéria braquial de pacientes normoinsulínicas com ovário policístico (ROMUALDI et al., 2008), e melhorou a resposta à ACh na microcirculação na pele do anti-braço em mulheres com angina (JADHAV et al., 2006).

Em nosso estudo, as diferenças de resposta à ACh na curva controle (SHAM > MET > OVX) foram abolidas pelo L-NAME igualando a resposta de todos os grupos (SHAM = MET = OVX), mostrando que a diferença de resposta que existia era pela via do NO, uma vez que, não observamos diferenças entre os grupos no relaxamento mediado por EDHF, e a participação de prostanoídes não foi significativa, confirmando que a via do NO é a responsável pela diferença de resposta à ACh. Além disso, a participação da via do óxido nítrico no vasorelaxamento, visto como dAUC, mostrou que o grupo OVX tem um prejuízo nessa via em comparação ao SHAM e esse prejuízo é parcialmente revertido pela metformina. Tomados em conjunto, estes dados sugerem que a diferença entre os grupos no relaxamento induzido por ACh é devido ao prejuízo na via do NO promovido pela ovariectomia, e o tratamento crônico com metformina reverte parcialmente o prejuízo dessa via. Corroborando com outros trabalhos onde a ovariectomia, em ratos, leva a prejuízo de relaxamento à ACh com prejuízo na via do NO (CAMPOREZ et al., 2011; YUNG et al., 2011), e em coelhos leva a diminuição da via do NO em anéis de aorta (HAYASHI et al., 1992).

## **5.2 Avaliação da Via do Óxido Nítrico**

Para avaliar se o prejuízo na via do NO do grupo OVX e a melhora promovida pela metformina estavam relacionados à alteração de expressão da NOS, que é a enzima produtora do NO, fizemos a avaliação da expressão proteica da eNOS, que é a principal isoforma constitutiva da NOS presente nos vasos sanguíneos. A ovariectomia levou a redução dessa expressão, corroborando com outro estudo onde esse mesmo efeito

foi encontrado (KIM et al., 2010). A redução da expressão desta enzima no OVX pode contribuir para o prejuízo encontrado na via do NO, em resposta à ACh. Por outro lado, o aumento da expressão da eNOS promovido pela metformina pode ajudar a explicar o efeito da metformina em melhorar a via do NO, em resposta à ACh, nas ratas ovariectomizadas. Estes resultados estão em acordo com outros trabalhos, onde a metformina aumentou a expressão da NOS e também promoveu sua fosforilação e consequente ativação via AMPK (DAVIS et al., 2006; WANG et al., 2011). Além disso, um estudo de Kim e colaboradores demonstrou que a metformina, por mecanismo associado à AMPK, foi capaz de restaurar a expressão de NOS que estava reduzida em ratos obesos (KIM et al., 2007). Assim como, Kumar e colaboradores demonstraram no hipotálamo e tecido adiposo marrom de ratos (ob/c), que são o controle de ratos geneticamente obesos (ob/ob), que a metformina promoveu aumento da expressão proteica de NOS (KUMAR et al., 2001).

Para verificar se havia prejuízo na via do NO por diminuição da sua biodisponibilidade ou alteração da sua efetividade no MLV, utilizamos o NPS que é um doador de NO que age por estimulação direta das células do músculo liso vascular independentemente do endotélio, onde o NO liberado pelo NPS, assim como o que é liberado principalmente pelo endotélio vascular, tem como mecanismo final produzir vasodilatação, estimulando a guanilato ciclase e aumentando os níveis de GMPc (INOUE et al., 2011). Em relação ao grupo SHAM o grupo OVX teve um prejuízo de resposta ao NPS e a metformina foi capaz de normalizar essa resposta prejudicada pela ovariectomia. Este resultado pode indicar mais um mecanismo para explicar o prejuízo na via do NO, em resposta à ACh, encontrado nos animais ovariectomizados e a melhora promovida pela metformina nessa via.

Para melhor compreender o mecanismo do prejuízo de resposta ao NPS no grupo OVX e o efeito de melhora promovida pela metformina nesta resposta, investigamos a ação do estresse oxidativo, utilizando a apocinina para inibir a NADPH oxidase que é a principal fonte de ROS nos vasos

sanguíneos (MÜNDEL et al., 1999) e que diminui a biodisponibilidade do NO (GRYGLEWSKI et al., 1986). Na presença deste inibidor, a resposta ao NPS foi melhorada no grupo OVX, desaparecendo o prejuízo de resposta que havia em relação ao grupo SHAM. Enquanto que no grupo SHAM a APO não promoveu nenhum aumento de resposta ao NPS. Dessa forma podemos relacionar esse prejuízo de resposta ao NPS no grupo OVX a um aumento do estresse oxidativo por  $O_2^-$  derivado da NOX, talvez pelo aumento da expressão proteica da NOX2 encontrado no grupo OVX, de forma semelhante a outro trabalho onde a ovariectomia aumentou a expressão da NADPH oxidase (Zhang et al., 2007). Este prejuízo foi revertido pela apocinina, corroborando com outro estudo onde o mesmo prejuízo foi encontrado em ratas OVX e foi corrigido pela supressão do estresse oxidativo (MINOVES et al., 2002). Outros estudos também demonstram em ratas ovariectomizadas o prejuízo de relaxamento à ACh, que parece estar associado com aumento da atividade da NOX, do estresse oxidativo, e com menor biodisponibilidade de NO (CAMPOREZ et al., 2011; YUNG et al., 2011). Assim, a melhora de resposta ao NPS gerada pelo tratamento com metformina, ao menos em parte, pode estar relacionada a mecanismos antioxidantes, de forma semelhante ao observado em outros estudos, talvez pela redução da expressão proteica da NOX2 promovido pela metformina. No leito arterial mesentérico de ratos de modelo de obesidade por glutamato, a metformina diminuiu a produção de ROS e restaurou a resposta prejudicada ao NPS (LOBATO et al., 2012). Em anéis de aorta de ratos Goto-Kakizaki, modelo de diabetes tipo 2 não-obeso, a metformina corrigiu a disfunção vascular de relaxamento, com aumento da biodisponibilidade de NO e redução do estresse oxidativo, tanto nos ratos tratados com dieta normal quanto nos ratos tratados com dieta de alta ingestão de gordura (SENA et al., 2011). Adicionalmente, o efeito antioxidante da metformina pode ser por redução da atividade da NADPH oxidase (PIWKOWSKA et al., 2010). Entretanto, outros mecanismos podem estar envolvidos na melhora promovida pela metformina sobre a ação do NO nas ratas ovariectomizadas, como um efeito direto da metformina no músculo liso vascular, melhorando a capacidade de resposta ao NO (LOBATO et al., 2012).

Nossos dados indicam uma redução do estresse oxidativo derivado da NADPH oxidase pela metformina. Assim, poderia se esperar que a apocinina não alterasse a resposta do grupo MET ao NPS, assim como ocorreu no grupo SHAM. Contudo a APO promoveu um aumento de resposta ao NPS no grupo MET, o que parece ser um efeito paradoxal que necessita de mais estudos para ser melhor entendido, podendo envolver diferenças de comportamento da metformina e da apocinina com as diferentes isoformas da NOX.

### **5.3 Avaliação da Participação dos Canais $K_V$ no Relaxamento à Acetilcolina**

Em nosso estudo detectamos maior participação dos canais  $K_V$  na vasodilatação do grupo MET em relação aos OVX. Esta observação sugere aumento de expressão e/ou ativação de canais  $K_V$  no LVM de ratos pelo tratamento com metformina. Os canais  $K_V$  tem um importante papel no relaxamento agudo à metformina em anéis de artéria caudal (PEULER et al., 1999), mas o efeito do tratamento crônico por metformina nestes canais ainda não é conhecido. Outros trabalhos mostraram que na artéria coronária de ratos diabéticos, as ROS derivadas do aumento da atividade da NADPH oxidase reduz a atividade dos canais  $K_V$  (BUBOLZ et al., 2005), como em células do músculo liso vascular da artéria pulmonar de ratos, o aumento da produção de ROS pela NOX também diminui a atividade dos  $K_V$  (MITTAL et al., 2012; COGOLLUDO et al., 2006). Assim, o efeito antioxidante da metformina com redução da atividade da NOX (PIWKOWSKA et al., 2010; BELLIN et al., 2006), poderia explicar esse aumento do funcionamento dos canais  $K_V$ , talvez pela redução da expressão proteica da NOX2 encontrada no grupo MET. Além disso, a metformina age ativando a AMPK, e em células HEK293 a ativação da via AMPK propicia ativação dos canais  $K_V$  (IKEMATSU et al., 2011). Adicionalmente, o vasorelaxamento direto induzido pela ativação da AMPK pelo AICAR na aorta e vasos mesentéricos de ratos (FORD et al., 2011,

2012), e o agudo promovido pela metformina em anéis de artéria caudal (PEULER et al., 1999), são relacionados a ação dos canais  $K_v$ .

#### **5.4 Participação do $H_2O_2$ como EDHF, Mediando o Relaxamento à Acetilcolina**

No uso da apocinina para avaliar a participação de  $H_2O_2$  derivado da NADPH oxidase como EDHF na resposta a ACh, é interessante lembrar que em vasos de condutância como a aorta há uma maior participação do óxido nítrico no relaxamento vascular, enquanto que em vasos de resistência como no leito arterial mesentérico cresce a participação do EDHF (WOODMAN et al., 2000), dessa forma a apocinina tem uma dupla ação na resposta à ACh, aumentando a biodisponibilidade de NO por reduzir sua degradação pelo estresse oxidativo (YOUN et al., 2012), e ao mesmo tempo abolindo o relaxamento via  $H_2O_2$  derivado da NADPH oxidase (XIE et al., 2012), e o balanço final desses efeitos na resposta no LVM, em que predominam vasos de resistência, pode ocorrer diminuição do relaxamento pela retirada do  $H_2O_2$  que atua como EDHF que tem grande importância no relaxamento desses vasos (XIE et al., 2012), como observamos nos grupos estudados. Entretanto, o grupo MET apresentou menor atenuação da resposta a ACh na presença de APO, em comparação ao SHAM e ao OVX, podendo indicar menor participação do  $H_2O_2$  derivado da NADPH oxidase no seu relaxamento. Como descrito acima, a metformina possui ação antioxidante com redução da atividade da NADPH oxidase (PIWKOWSKA et al., 2010; HOU et al., 2010), e em nosso estudo a metformina promoveu redução da expressão proteica da NOX2, o que poderia explicar os resultados encontrados no grupo MET.

#### **5.5 Efeito da Ovariectomia e do Tratamento com Metformina Sobre a NADPH Oxidase e o estresse oxidativo**

Todos os efeitos da metformina sobre os mecanismos de controle vascular, que foram encontrados no presente trabalho, parecem relacionar-se com menor estresse oxidativo derivado da NADPH oxidase, inclusive com

redução da expressão proteica da NOX2 no grupo MET, o que indica um efeito modulatório da metformina sobre a NOX, como observado em podócitos renais, nos quais a metformina reduziu a ação dessa enzima por ativação da AMPK (PIWKOWSKA et al., 2010). Ainda, em leucócitos estimulados *in vitro*, a metformina apresentou ação antioxidante, sendo sugerido que ela poderia atuar reduzindo a produção intracelular de ânion superóxido, do qual a NOX é o maior produtor (BONNEFONT-ROUSSELOT et al., 2003). Além disso, em células endoteliais humanas estimuladas com alta concentração de glicose ou ácido palmítico, houve aumento da geração de ROS com ativação da NOX, e a metformina foi capaz de reduzir o nível dessas ROS (BELLIN et al., 2006; HOU et al., 2010). Também em células endoteliais de aorta bovina a metformina foi capaz de reduzir a produção de ROS pela NOX mesmo quando as células foram estimuladas com glicose ou angiotensina II (OUSLIMANI et al., 2005), e em outro estudo nessas mesmas células a metformina diminui o estresse oxidativo por redução da atividade da PKC (MAHROUF et al., 2006), que é uma quinase estimuladora da atividade da NADPH oxidase. Ao mesmo tempo, a ausência de AMPK leva a superexpressão da NOX (SCHUHMACHER et al., 2011; WANG et al., 2010), e a ação da AMPK regula negativamente a atividade da NOX (WANG et al., 2012). Assim, nossos dados indicam que em ratas ovariectomizadas a metformina parece exercer inibição sobre o estresse oxidativo derivado da NOX.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo nos permitem concluir que o tratamento crônico com metformina é capaz de reduzir o prejuízo de vasorelaxamento à ACh em ratas ovariectomizadas, melhorando a via de relaxamento por NO. Esta melhora parece ter sido, ao menos em parte, por restaurar a expressão proteica da eNOS e por reverter o prejuízo na ação do NO encontrado nas ratas ovariectomizadas. Esse prejuízo era decorrente do estresse oxidativo via NADPH oxidase, e a redução da expressão proteica da NOX2 pela metformina pode ter colaborado na correção desse prejuízo.

Além disso, a metformina também aumenta a participação dos canais  $K_v$  no vasorelaxamento à ACh de ratas ovariectomizadas.



**REFERÊNCIAS:**

Acosta JI, Mayer L, Talboom JS, Tsang CW, Smith CJ, Enders CK, Bimonte-Nelson HA. Transitional Versus Surgical Menopause in a Rodent Model: Etiology of Ovarian Hormone Loss Impacts Memory and the Acetylcholine System. *Endocrinology*. 2009, 150(9):4248-59.

Andújar-Plata P, Pi-Sunyer X, Laferrère B. Metformin effects revisited. *Diabetes Res Clin Pract*. 2012, 95(1):1-9.

Arpino G, Wiechmann L, Osborne CK, Schiff R. Crosstalk between the estrogen receptor and the HER tyrosine kinase receptor family: molecular mechanism and clinical implications for endocrine therapy resistance. *Endocr Rev*. 2008, 29(2):217-33.

Barrett-Connor E, Mosca L, Collins P, Geiger MJ, Grady D, Kornitzer M, McNabb MA, Wenger NK. Effects of raloxifene on cardiovascular events and breast cancer in postmenopausal women. *N Engl J Med*. 2006, 355(2):125-37.

Bellin C, de Wiza DH, Wiernsperger NF, Rösen P. Generation of reactive oxygen species by endothelial and smooth muscle cells: influence of hyperglycemia and metformin. *Horm Metab Res*. 2006, 38(11):732-9.

Beral V, Bull D, Reeves G. Endometrial cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet*. 2005, 365:1543-5.

Bonnefont-Rousselot D, Raji B, Walrand S, Gardès-Albert M, Jore D, Legrand A, Peynet J, Vasson MP. An intracellular modulation of free radical production could contribute to the beneficial effects of metformin towards oxidative stress. *Metabolism*. 2003, 52(5):586-9.

Borgo MV, Lopes AB, Gouvêa SA, Romero WG, Moyses MR, Bissoli NS, Abreu GR. Effect of tamoxifen on the coronary vascular reactivity of spontaneously hypertensive female rats. *Braz J Med Biol Res.* 2011, 44(8):786-92.

Bubolz AH, Li H, Wu Q, Liu Y. Enhanced oxidative stress impairs cAMP-mediated dilation by reducing Kv channel function in small coronary arteries of diabetic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005, 289(5):H1873-80.

Burlá AK, Lobato NS, Fortes ZB, Oigman W, Neves MF. Cardiac fibrosis and vascular remodeling are attenuated by metformin in obese rats. *International journal of cardiology.* 2011.

Caliman IF; Rocha APB; Moyses MR; dos Reis AM; Bissoli NS. The tamoxifen, modulator of selective estrogen receptor, normalizes cytokines and atrial natriuretic peptide levels in ovariectomized rats. VIII International Symposium Vasoactive Peptides, 2011. v. VIII. p. 69-69.

Camporez JP, Akamine EH, Davel AP, Franci CR, Rossoni LV, Carvalho CR. Dehydroepiandrosterone protects against oxidative stress-induced endothelial dysfunction in ovariectomized rats. *J Physiol.* 2011, 589(Pt10):2585-96.

Chanawirat A, Khemapech S, Patumraj S, Siriviriyakul P. Genistein replacement therapy on endothelial dysfunction and bone loss in bilateral ovariectomized rats. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2006, 34(1-2):309-14.

Cogolludo A, Frazziano G, Cobeño L, Moreno L, Lodi F, Villamor E, Tamargo J, Perez-Vizcaino F. Role of reactive oxygen species in Kv channel inhibition and vasoconstriction induced by TP receptor activation in rat pulmonary arteries. *Ann N Y Acad Sci.* 2006, 1091:41-51.

Cummings SR, Ettinger B, Delmas PD, et al. The effects of tibolone in older postmenopausal women. *N Engl J Med.* 2008, 359:697-708.

Davis BJ, Xie Z, Viollet B, Zou MH. Activation of the AMP-activated kinase by antidiabetes drug metformin stimulates nitric oxide synthesis in vivo by promoting the association of heat shock protein 90 and endothelial nitric oxide synthase. *Diabetes*. 2006, 55(2):496-505.

Essah PA, Arrowood JA, Cheang KI, Adawadkar SS, Stovall DW, Nestler JE. Effect of combined metformin and oral contraceptive therapy on metabolic factors and endothelial function in overweight and obese women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2011, 96(2):501-504.

Ford RJ & Rush JW. Endothelium-dependent vasorelaxation to the AMPK activator AICAR is enhanced in aorta from hypertensive rats and is NO and EDCF dependent. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011, 300(1):H64-75.

Ford RJ, Teschke SR, Reid EB, Durham KK, Kroetsch JT, Rush JW. AMP-activated protein kinase activator AICAR acutely lowers blood pressure and relaxes isolated resistance arteries of hypertensive rats. *J Hypertens*. 2012, 30(4):725-33.

Furchgott RF & Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and constricting factors. *FASEB Journal*. 1989, 3:2007-2018.

Gao Y, Li Y, Xue J, Jia Y, Hu J. Effect of the anti-diabetic drug metformin on bone mass in ovariectomized rats. *Eur J Pharmacol*. 2010, 635(1-3):231-6.

Ghisdal P. & Morel N. Cellular target of voltage and calcium-dependent K<sup>+</sup> channel blockers involved in EDHF-mediated responses in rat superior mesenteric artery. *Br J Pharmacol*. 2001, 134:1021-1028.

Görlach A, Brandes RP, Nguyen K, Amidi M, Dehghani F, Busse R. A gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall. *Circ Res*. 2000, 87(1):26-32.

Gracia CR, Sammel MD, Freeman EW, Lin H, Langan E, Kapoor S, Nelson DB. Defining menopause status: creation of a new definition to identify the early changes of the menopausal transition. *Menopause*. 2005, 12(2):128-35.

Graham GG, Punt J, Arora M, Day RO, Doogue MP, Duong JK, Furlong TJ, Greenfield JR, Greenup LC, Kirkpatrick CM, Ray JE, Timmins P, Williams KM. Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clin Pharmacokinet*. 2011, 50(2):81-98.

Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature*. 1986, 320(6061): 454-6.

Hayashi T, Fukuto JM, Ignarro LJ, Chaudhuri G. 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*. 1992, 89(23):11259-63.

Hou X, Song J, Li XN, Zhang L, Wang X, Chen L, Shen YH. Metformin reduces intracellular reactive oxygen species levels by upregulating expression of the antioxidant thioredoxin via the AMPK-FOXO3 pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010, 396(2):199-205.

Ikematsu N, Dallas ML, Ross FA, Lewis RW, Rafferty JN, David JA, Suman R, Peers C, Hardie DG, Evans AM. Phosphorylation of the voltage-gated potassium channel Kv2.1 by AMP-activated protein kinase regulates membrane excitability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011, 108:18132-7.

Inoue S, Aiba T, Masaoka Y, Shimizu K, Komori Y, Mio M, Takatori S, Kawasaki H, Kurosaki Y. Pharmacodynamic characterization of nitric oxide-mediated vasodilatory activity in isolated perfused rat mesenteric artery bed. *Biol Pharm Bull*. 2011, 34(9):1487-92.

Jadhav S, Ferrell W, Greer IA, Petrie JR, Cobbe SM, Sattar N. Effects of metformin on microvascular function and exercise tolerance in women with angina and normal coronary arteries: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Am Coll Cardiol*. 2006, 48(5):956-63.

JAX® Notes™. A New Hormonally Relevant Model for Human Menopause. 2005, 496. Disponível em:

<<http://jaxmice.jax.org/jaxnotes/archive/496a.html>> Acesso em 01/09/2012.

Jin X, Otonashi-Satoh Y, Zamami Y, Koyama T, Sun P, Kitamura Y, Kawasaki H. Endothelial modulation of agonist-induced vasoconstriction in mesenteric microcirculation. *Yakugaku Zasshi*. 2010, 130(5):723-8.

Jousilahti P, Vartiainen E, Tuomilehto J, Puska P. Sex, age, cardiovascular risk factors, and coronary heart disease: a prospective follow-up study of 14 786 middle-aged men and women in Finland. *Circulation*. 1999, 99(9):1165-72.

Khodja NI, Chataigneau T, Auger C, Schini-Kerth VB. Grape-derived polyphenols improve aging-related endothelial dysfunction in rat mesenteric artery: role of oxidative stress and the angiotensin system. *PLoS One*. 2012, 7(2):e32039.

Kim SO, Song SH, Hwang EC, Park KS, Kwon DD, Ahn KY, Kim DH, Ryu SB. The Expression of AQP1 and eNOS in Menopausal Rat Urinary Bladder. *Int Neurourol J*. 2010, 14(2):78-85.

Kim YW, Park SY, Kim JY, Huh JY, Jeon WS, Yoon CJ, Yun SS, Moon KH. Metformin restores the penile expression of nitric oxide synthase in high-fat-fed obese rats. *J Androl*. 2007, 28(4):555-60.

Kumar VB, Bernardo AE, Vyas K, Franko M, Farr S, Lakshmanan L, Buddhiraju C, Morley JE. Effect of metformin on nitric oxide synthase in genetically obese (ob/ob) mice. *Life Sci.* 2001, 69(23):2789-99.

Kushner PJ, Agard DA, Greene GL, Scanlan TS, Shiau AK, Uht RM, Webb P. Estrogen receptor pathways to AP-1. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2000, 74(5):311-7.

Lamas AZ; Caliman IF; Medeiros ARS; Rocha APB; dos Reis AM; Bissoli NS. Evaluation of cardiovascular biomarkers in ovariectomized rats treated with estrogen or raloxifene. VIII International Symposium Vasoactive Peptides, 2011. v. VIII. p. 68-68.

Leung HS, Leung FP, Yao X, Ko WH, Chen ZY, Vanhoutte PM, Huang Y. Endothelial mediators of the acetylcholine-induced relaxation of the rat femoral artery. *Vascul Pharmacol.* 2006, 44(5):299-308.

Liu MY, Hattori Y, Sato A, Ichikawa R, Zhang XH, Sakuma I. Ovariectomy attenuates hyperpolarization and relaxation mediated by endothelium-derived hyperpolarizing factor in female rat mesenteric artery: a concomitant decrease in connexin-43 expression. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2002, 40(6):938-48.

Lobato NS, Filgueira FP, Hagihara GN, Akamine EH, Pariz JR, Tostes RC, Carvalho MH, Fortes ZB. Improvement of metabolic parameters and vascular function by metformin in obese non-diabetic rats. *Life Sciences.* 2012, 90(5-6):228-35.

Long JA & Evans HM. The estrous cycle in the rat and its associated phenomena. *Memories of University of California.* 1922, 6:1-148.

Lucchesi PA, Belmadani S, Matrougui K. Hydrogen peroxide acts as both vasodilator and vasoconstrictor in the control of perfused mouse mesenteric resistance arteries. *J Hypertens.* 2005, 23(3):571-9.

Maeda M, Nakamura C, Uchigaki A, Yuba K, Utsumi M, Siba M, Sanke T, Miyai N, Arita M. Effects of aging and menopause on women's vascular systems. *Nihon Ronen Igakkai Zasshi*. 2011, 48(2):158-62.

Mahrouf M, Ouslimani N, Peynet J, Djelidi R, Couturier M, Therond P, Legrand A, Beaudeau JL. Metformin reduces angiotensin-mediated intracellular production of reactive oxygen species in endothelial cells through the inhibition of protein kinase C. *Biochem Pharmacol*. 2006, 72(2):176-83.

Mandl AM. The phases of the oestrous cycle in the adult white rat. *Journal of Experimental Biology*. 1951, 28:576-584.

Manson JE, Hsia J, Johnson KC, Rossouw JE, Assaf AR, Lasser NL, Trevisan M, Black HR, Heckbert SR, Detrano R, Strickland OL, Wong ND, Crouse JR, Stein E, Cushman M. Women's Health Initiative Investigators. Estrogen plus progestin and the risk of coronary heart disease. *N Engl J Med*. 2003, 349:523-534.

McGregor DD. The effect of sympathetic nerve stimulation on vasoconstrictor response in the perfused mesenteric blood vessels of the rat. *J. Physiol*. 1965, 177:21-30.

Medeiros ARS, Lamas AZ, Caliman IF; Dalpiaz PLM; Firmes LB; Abreu GR; Moysés MR; Lemos EM; dos Reis AM; Bissoli NS. Tibolone has anti-inflammatory effects in estrogen-deficient female rats on the natriuretic peptide system and TNF-alpha. *Regul Pept*. 2012.

Minoves N, Balfagon G, Ferrer M. Role of female sex hormones in neuronal nitric oxide release and metabolism in rat mesenteric arteries. *Clinical Science*. 2002, 103:239-247.

Mittal M, Gu XQ, Pak O, Pamerter ME, Haag D, Fuchs DB, Schermuly RT, Ghofrani HA, Brandes RP, Seeger W, Grimminger F, Haddad GG, Weissmann N. Hypoxia induces Kv channel current inhibition by increased NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* 2012, 52(6):1033-42.

Moraes AN, Gouvêa SA, Gonçalves WL, Romero WG, Moyses MR, Bissoli NS, Pires JG, Abreu GR. Raloxifene reduces blood pressure in hypertensive animals after ovarian hormone deprivation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2011, 109(5):334-8.

Moreau KL, Meditz A, Deane KD, Kohrt WM. Tetrahydrobiopterin improves endothelial function and decreases arterial stiffness in estrogen-deficient postmenopausal women. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012, 302(5):H1211-8.

Münzel T, Hink U, Heitzer T, Meinertz T. Role for NADPH/NADH oxidase in the modulation of vascular tone. *Ann N Y Acad Sci.* 1999, 874:386-400.

Murray CJL & Lopez AD. The global burden of disease. World Health Organization. 1996.

Nilius B & Droogmans G. Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol Rev.* 2001, 81(4):1415-59.

NOTELOVITZ M. Climacteric Medicine and Science. A societal need. In: Notelovitz M. The climacteric in perspective. Lancaster: MTP Press, 1986: p19-21.

Novella S, Dantas AP, Segarra G, Novensà L, Bueno C, Heras M, Hermenegildo C, Medina P. Gathering of aging and estrogen withdrawal in vascular dysfunction of senescent accelerated mice. *Exp Gerontol.* 2010, 45(11):868-74.



O'Hora TR, Markos F, Wiernsperger NF, Noble MI. Metformin causes nitric oxide-mediated dilatation in a shorter time than insulin in the iliac artery of the anesthetized pig. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2012, 59(2):182-7.

Onitilo AA, McCarty CA, Wilke RA, Glurich I, Engel JM, Flockhart DA, Nguyen A, Li L, Mi D, Skaar TC, Jin Y. Estrogen receptor genotype is associated with risk of venous thromboembolism during tamoxifen therapy. *Breast Cancer Res Treat*. 2009, 115(3):643-50.

Osborne CK. Tamoxifen in the treatment of breast cancer. *N Engl J Med*. 1998, 339:1609-1618.

Ouslimani N, Peynet J, Bonnefont-Rousselot D, Thérond P, Legrand A, Beaudeau JL. Metformin decreases intracellular production of reactive oxygen species in aortic endothelial cells. *Metabolism*. 2005, 54(6):829-34.

Ozkor MA & Quyyumi AA. Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor and Vascular Function. *Cardiol Res Pract*. 2011, 2011:156146.

Peuler JD, Lee JM, Smith JM. 4-aminopyridine antagonizes the acute relaxant action of metformin on adrenergic contraction in the ventral tail artery of the rat. *Life Sciences*. 1999, 65(23):287-293.

Piwkowska A, Rogacka D, Jankowski M, Dominiczak MH, Stepinski JK, Angielski S. Metformin induces suppression of NAD(P)H oxidase activity in podocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010, 393:268-273.

Puyó AM, Borroni JS, Boudou S, Santander Y, Carranza A, Donoso AS, Peredo HA. Metformin reduces vascular production of vasoconstrictor prostanoids in fructose overloaded rats. *Auton Autacoid Pharmacol*. 2012, 32(1 Pt 2):9-14.

Ray R & Shah AM. NADPH oxidase and endothelial cell function. *Clin Sci*. 2005, 109(3):217-26.

Rodbard HW, Blonde L, Braithwaite SS, Brett EM, Cobin RH, Handelsman Y, Hellman R, Jellinger PS, Jovanovic LG, Levy P, Mechanick JI, Zangeneh F. American association of clinical endocrinologists medical guidelines for clinical practice for the management of diabetes mellitus. *Endocrine Practice*. 2007, 13:1-68.

Romualdi D, Costantini B, Selvaggi L, Giuliani M, Cristello F, Macrì F, Bompiani A, Lanzone A, Guido M. Metformin improves endothelial function in normoinsulinemic PCOS patients: a new prospective. *Hum Reprod*. 2008, 23(9):2127-33.

Sato M, Rippey MK, Bryant HU. Raloxifene, Tamoxifen, nafoxidine or estrogen effects on reproductive and nonreproductive tissues in ovariectomized rats. *FASEB J*. 1996, 10:905-912.

Schuhmacher S, Foretz M, Knorr M, Jansen T, Hortmann M, Wenzel P, Oelze M, Kleschyov AL, Daiber A, Keaney JF Jr, Wegener G, Lackner K, Münzel T, Viollet B, Schulz E.  $\alpha$ 1AMP-activated protein kinase preserves endothelial function during chronic angiotensin II treatment by limiting Nox2 upregulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011, 31(3):560-6.

Sena CM, Matafome P, Louro T, Nunes E, Fernandes R, Seiça RM. Metformin restores endothelial function in aorta of diabetic rats. *Br J Pharmacol*. 2011, 163(2):424-37.

Serezhenkov VA, Kuznetsov IS, Romantsova TI, Kuznetsova MI, Vanin AF. Antidiabetes drug metformin is a donor of nitric oxide: ESR measurement of efficiency. *Biofizika*. 2011, 56(6):1125-33.

Shu Y, Sheardown SA, Brown C, Owen RP, Zhang S, Castro RA, Ianculescu AG, Yue L, Lo JC, Burchard EG, Brett CM, Giacomini KM. Effect

of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action. *J Clin Invest*. 2007, 117(5):1422-31.

Sofer E, Boaz M, Matas Z, Mashavi M, Shargorodsky M. Treatment with insulin sensitizer metformin improves arterial properties, metabolic parameters, and liver function in patients with nonalcoholic fatty liver disease: a randomized, placebo-controlled trial. *Metabolism*. 2011, 60(9):1278-84.

Stankevicius E, Kevelaitis E, Vainorius E, Simonsen U. [Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors]. *Medicina (Kaunas)*. 2003, 39(4):333-341.

Sung JY & Choi HC. Metformin-induced AMP-activated protein kinase activation regulates phenylephrine-mediated contraction of rat aorta. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012, 421(3):599-604.

Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Mattei P, Sudano I, Bernini G, Pinto S, Salvetti A. Menopause Is Associated With Endothelial Dysfunction in Women. *Hypertension*. 1996, 28:576-582.

Takahashi K, Mori-Abe A, Takata K, Ohta T, Kawagoe J, Tsutsumi S, et al. Raloxifene improves the ovariectomy induced impairment in endothelium-dependent vasodilation. *Menopause*. 2007, 14:656-6.

Van Kempen TA, Milner TA, Waters EM. Accelerated ovarian failure: a novel, chemically induced animal model of menopause. *Brain Res*. 2011, 1379:176-87.

Virdis A, Ghiadoni L, Pinto S, Lombardo M, Petraglia F, Gennazzani A, Buralli S, Taddei S, Salvetti A. Mechanisms responsible for endothelial dysfunction associated with acute estrogen deprivation in normotensive women. *Circulation*. 2000, 101(19):2258-63.

Wang J, Alexanian A, Ying R, Kizhakekuttu TJ, Dharmashankar K, Vasquez-Vivar J, Gutterman DD, Widlansky ME. Acute exposure to low glucose rapidly induces endothelial dysfunction and mitochondrial oxidative stress: role for AMP kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012, 32(3):712-20.

Wang S, Zhang M, Liang B, Xu J, Xie Z, Liu C, Viollet B, Yan D, Zou MH. AMPKalpha2 deletion causes aberrant expression and activation of NAD(P)H oxidase and consequent endothelial dysfunction in vivo: role of 26S proteasomes. *Circ Res.* 2010, 106(6):1117-28.

Wang XF, Zhang JY, Li L, Zhao XY. Beneficial effects of metformin on primary cardiomyocytes via activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase. *Chin Med J.* 2011, 124(12):1876-84.

Wassertheil-Smoller S, Hendrix SL, Limacher M, Heiss G, Kooperberg C, Baird A, Kotchen T, Curb JD, Black H, Rossouw JE, Aragaki A, Safford M, Stein E, Laowattana S, Mysiw WJ. Effect of estrogen plus progestin on stroke in postmenopausal women: the Women's Health Initiative: a randomized trial. *JAMA.* 2003, 289:2673-2684.

Xie W, Parker JL, Heaps CL. Effect of exercise training on nitric oxide and superoxide/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signaling pathways in collateral-dependent porcine coronary arterioles. *The American Physiological Society.* 2012, 112(9):1546

Woodman OL, Wongsawatkul O, Sobey CG. Contribution of nitric oxide, cyclic GMP and K<sup>+</sup> channels to acetylcholine-induced dilatation of rat conduit and resistance arteries. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2000, 27(1-2):34-40.

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

Youn JY, Wang T, Blair J, Laude KM, Oak JH, McCann LA, Harrison DG, Cai H. Endothelium-specific sepiapterin reductase deficiency in DOCA-salt hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012, 302(11):H2243-9.

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

Zhang L, Fujii S, Kosaka H. Effect of oestrogen on reactive oxygen species production in the aortas of ovariectomized Dahl salt-sensitive rats. *J Hypertens*. 2007, 25(2):407-14.