

# O SINCRONISMO DAS AÇÕES VASCULARES DE ESTRÓGENOS EM ESTUDOS EXPERIMENTAIS E HUMANOS

Roberta Lélis Dias Pereira<sup>1</sup>

Juliana Otero<sup>2</sup>

Paulo Ricardo Nazário Viecili<sup>3</sup>

Jonatas Zeni Klafke<sup>4</sup>

Os estrogênios, em particular o 17 $\beta$ -estradiol (E2), desempenham um papel crucial no desenvolvimento e na reprodução sexual, estando também implicados em um grande número de processos fisiológicos, incluindo o sistema cardiovascular. Embora os estudos epidemiológicos e em modelos animais de ateroma demonstrem claramente uma ação vasculoprotetora de ambos os estrogênios, endógenos e exógenos, alguns importantes estudos não confirmam a sua ação preventiva contra a doença arterial coronariana (DAC). No entanto, as mulheres que iniciaram a terapia hormonal mais perto de menopausa tendem a ter o risco de DAC reduzido em comparação com o risco aumentado de se ter DAC entre as mulheres que iniciaram o tratamento mais distante da menopausa. Assim, faz-se necessário tentar entender os mecanismos que podem ter influenciado as ações dos estrogênios em vários estágios da aterosclerose e/ou de vida. No presente ensaio teórico, resumir-se-á a nossa compreensão dos potenciais alvos e mecanismos das ações vasculoprotetoras de estrogênios celulares, bem como da falta de ação dos estrogênios quando administrados após um período de privação hormonal. Os mecanismos do papel agravante de progestogênios, tal como acetato de medroxiprogesterona, serão também considerados. Finalmente, vamos analisar as possibilidades de desvincular algumas ações benéficas de outras ações indesejáveis após a ativação seletiva dos receptores de estrogênio.

## 1. O impacto dos estrogênios em ensaios clínicos randomizados

O papel dos estrogênios, particularmente do 17 $\beta$ -estradiol (E2) o principal hormônio sexual endógeno feminino, é bem descrito para o desenvolvimento sexual e para a reprodução, mas os estrogênios também estão envolvidos em muitos dos processos fisiológicos, incluindo o sistema cardiovascular. Em primeiro lugar, estudos epidemiológicos mostraram que as mulheres são protegidas contra a doença coronária antes da menopausa, sugerindo uma ação benéfica dos estrogênios endógenos [1,2]. Em segundo lugar, o estudo “Nurses’ Health Study” sugeriu que as mulheres na pós-menopausa que tomam estrogênio ou terapia estro-progestina tiveram uma diminuição

---

<sup>1</sup> Biomédica, aluna de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde (PPGAIS), Universidade de Cruz Alta, UNICRUZ, RS, Brasil.

<sup>2</sup> Médica, aluna de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde (PPGAIS), Universidade de Cruz Alta, UNICRUZ, RS, Brasil.

<sup>3</sup> Doutor em Medicina: Ciências Médicas pela Universidade de São Paulo, USP, SP, Brasil; Professor e pesquisador do Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde (PPGAIS) e Pesquisador do Grupo Multidisciplinar em Saúde (GMS), Universidade de Cruz Alta, UNICRUZ, RS, Brasil.

<sup>4</sup> Doutor em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica pela Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, RS, Brasil; Professor e pesquisador do Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde (PPGAIS) e Pesquisador do Grupo Multidisciplinar em Saúde (GMS), Universidade de Cruz Alta, UNICRUZ, RS, Brasil.

do risco de doença cardíaca coronária [3]. Em terceiro lugar, a ação de estrogênios vasculoprotetores foi também demonstrada claramente em todos os modelos animais de aterosclerose [4,5,6]. No entanto, o efeito benéfico dos estrogênios exógenos foi questionado após a publicação do estudo “Heart and Estrogen/progestin Replacement Study” (HERS) [7] em 1998, e, em seguida, do estudo “Women's Health Initiative” (WHI) [8] em 2002. Estes ensaios clínicos randomizados placebo controlados envolveram mulheres na pós-menopausa, comparando a terapia de reposição hormonal versus placebo sobre os principais resultados de saúde [9]. Os resultados iniciais sugeriram um dano global da terapia de reposição hormonal, levando a uma diminuição drástica de seu uso mundialmente, levantando preocupações em médicos e autoridades reguladoras. No entanto, um segundo braço do WHI publicado em 2004 com mulheres pós-menopausa e histerectomizadas, comparando o tratamento de estrogênio conjugado equinos (CEE) versus placebo; e publicações posteriores com análises mais detalhadas de ambos os braços do WHI parecem ter revogado estas preocupações iniciais [2,4,10,11].

Duas conclusões importantes foram tiradas posteriormente, relativas a progesterona e o tempo de início no tratamento da menopausa. Em primeiro lugar, ao passo que as mulheres não histerectomizadas, que receberam CEE combinado com acetato de medroxiprogesterona (MPA) (WHI 2002), foram caracterizadas por um aumento da frequência de eventos coronarianos em comparação com as mulheres que tomavam placebo [8], este não era o caso das mulheres histerectomizadas, que receberam ECE (WHI, 2004), nas quais o risco de DAC foi semelhante àquelas que tomavam placebo [12]. Estes dois braços do estudo WHI sugerem, assim, um efeito deletério da progestina no risco arterial. Em segundo lugar, uma grande diferença nos efeitos dos hormônios entre as mulheres mais jovens e mais velhas surgiu, mostrando que os resultados de mulheres com menos de 60 anos ou em 10 anos de menopausa se assemelham aos de coortes observacionais [10,11].

## 2. O efeito dos estrogênios nos fatores de risco cardiovasculares

A dislipidemia está associada ao aumento do risco de aterosclerose em homens e mulheres. As concentrações de lipoproteínas entre mulheres na pré-menopausa diferem dos homens, o colesterol total e as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) são mais baixos, enquanto as lipoproteínas de alta densidade (HDL) estão mais elevadas. Após a menopausa, as mulheres perdem esse perfil lipídico benéfico quando o colesterol total e as LDL tornam-se mais altos e colesterol HDL diminui. A terapia de substituição de estrogênios tem, no entanto, o potencial para restaurar o perfil lipídico na pré-menopausa em mulheres.

Os efeitos do estrogênio nos lipídeos e lipoproteínas dependem do tipo, da dose e da via de administração estrogênio usado. A utilização de estrogênios orais tem demonstrado um aumento dos níveis de triglicérides, de HDL e de apoA1, enquanto diminui as LDL. Por outro lado, a via transdérmica de estrogênio tem resultado em mínima ou nenhuma alteração nos níveis das LDL e das HDL. O fato de que o estrogênio administrado por via transdérmica tem menos efeito sobre lipídeos séricos e lipoproteínas é devido ao desvio da circulação portal e, portanto, um efeito mínimo sobre o metabolismo hepático. As alterações nos níveis de lipídios plasmáticos representam cerca de 30% da proteção global mediada por estrógeno cardiovascular.

Finalmente, ao passo que o impacto dos estrogênios sobre o nível da pressão sanguínea parece ser marginal, deve-se lembrar que os principais ensaios clínicos randomizados revelaram que os estrogênios, sós ou mesmo combinados com MPA, melhoram a sensibilidade à insulina e impedem o desenvolvimento do diabetes tipo 2 em mulheres na pós-menopausa [13,14]. Notável, uma diminuição de 35% e 21% na incidência de diabetes foi respectivamente associada à terapia de reposição hormonal nos estudos HERS e WHI.

### 3. Principais ações benéficas dos estrogênios no endotélio

O endotélio normal, tanto morfológica quanto funcionalmente, é o principal guardião da integridade arterial. A produção de vários mediadores derivados do endotélio, como o óxido nítrico (NO), assim como os mecanismos que determinam a sua biodisponibilidade (estresse oxidativo), prostaciclina e outros derivados de ciclooxigenases (COX), e fatores de hiperpolarização têm estimulado a investigação intensiva nas últimas décadas [15, 16, 17, 18, 19, 20], uma vez que as propriedades antiespásticas e antiagregantes de NO, prostaciclina e de fatores de hiperpolarização parecem desempenhar um papel protetor nas várias fases da fisiopatologia da placa de ateroma.

O endotélio representa um alvo celular eletivo para o E2. O tratamento crônico com estrogênio melhora a função endotelial em um certo número de leitos vasculares. A vasodilatação dependente do endotélio para a acetilcolina na vasculatura periférica é preservada ou mesmo potencializada com o tratamento crônico com estrogênio em animais ovariectomizados incluindo coelhos, ratos, cobaias e camundongos [6, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21]. Além disso, o tratamento crônico com estrogênio aumenta a vasodilatação dependente endotélio em grandes artérias periféricas de mulheres na pós-menopausa [22].

Todos os fatores de risco cardiovasculares que levam ao ateroma favorecem uma "disfunção endotelial". Digno de nota, o risco para as doenças coronárias do coração em homens começa a aumentar aproximadamente na mesma idade em que a vasodilatação mediada pelo fluxo começa a declinar [23]. A disfunção endotelial coronariana contribui para o espasmo coronariano, um evento fisiopatológico chave. Dessa forma, evidenciou-se que mulheres com aterosclerose e artérias coronárias não estenóticas [24], bem como em macacos hipercolesterolêmicos ovariectomizados [25], o E2 impede vasoespasmo coronário induzido por acetilcolina e, assim, reverte a disfunção endotelial.

Os estrogênios também impedem a ativação endotelial tanto *in vitro* como *in vivo*. O E2 impede a indução de moléculas de adesão celular vascular-1 (VCAM-1) nas células endoteliais vasculares umbilicais humanas ativadas por interleucina-1 beta [26], bem como a indução de quimiocinas nas células endoteliais ativadas por fator de necrose tumoral-alfa [27]. Nathan et al. [28] demonstraram em coelhos hipercolesterolêmicos que a adesão de monócitos a células endoteliais e a migração transendotelial é mais baixa em mulheres do que em homens, e que esta diferença de gênero é devido, em parte, ao E2, o qual inibe a adesão de monócitos através da inibição da expressão de VCAM-1.

#### 4. Os estrogênios previnem a formação de ateroma

A evidência direta para um efeito benéfico dos estrogênios sobre a progressão da aterosclerose da artéria coronária foi demonstrada em primatas não-humanos: macacos ovariectomizados que receberam E2 parentérico [29] ou CEE oral [30] apresentaram cerca de 50-70% de redução na aterosclerose da artéria coronária em comparação com os animais do grupo controle. A ovariectomia de camundongos knockout para apolipoproteína E (apoE) ou para o receptor LDL é seguida por um aumento de camadas de gordura na área de lesão e o E2 exógeno impede o depósito de camadas de gordura em ambos os modelos [31, 32]. Em discrepância com primatas humanos ou não-humanos, os estrogênios diminuem tanto as frações das LDL e das HDL em camundongos.

Recentemente, o papel-chave do receptor de estrogênio alfa (ER $\alpha$ ) endotelial para a ação ateroprotetora de E2 em camundongos foi demonstrado diretamente, graças a um modelo que permitiu a deleção específica deste receptor em células endoteliais [33].

A indução de COX-2 e a produção de prostaciclina parece desempenhar um papel significativo na ação ateroprotetora de E2 [34]. Em contraste, à prevenção do início do ateroma por E2 é essencialmente independente da produção de NO [35, 36].

#### 5. Os estrogênios aceleraram a cicatrização endotelial e previnem a formação da neoíntima

A estenose da artéria coronária ou periférica é comumente tratada por angioplastia com implante de stent. Entre várias estratégias com o objetivo de promover o crescimento endotelial após lesão arterial, E2 representa um atrativo [37]. Além disso, E2 aumenta tanto a migração e proliferação de células endoteliais cultivadas in vitro [38] e estas contribuem para ações diretas que aceleram a reendotelização in vivo [39].

No entanto, foi recentemente demonstrado que a estimulação endotelial de ER por E2 é necessária, mas não suficiente para induzir a reendotelização, uma vez que uma estimulação concomitante de células derivadas da medula óssea, também é necessário [40], e E2 exerce grandes efeitos sobre as células hematopoiéticas, tais como mobilização de células progenitoras endoteliais, ações sobre células inflamatórias do sistema imunológico e plaquetas[41,42].

#### 6. Os efeitos protetores dos estrogênios contra a isquemia

A ativação de ER também provoca uma poderosa ação anti-isquêmica em vários tecidos. O efeito neuroprotetor em modelos de acidente vascular cerebral parece ser principalmente devido a E2 [43]. Curiosamente, o tratamento com estrogênio na pré-isquemia reduz lesão, mas o tratamento com estrogênio pós-lesão é também eficiente se instituído durante a progressão da lesão, para até 3 horas após o início do acidente vascular cerebral.

Múltiplos mecanismos celulares e moleculares em vários locais poderiam ser responsáveis pela ação benéfica do estrogênio no cérebro, incluindo diminuição de a morte celular; aumento da neurogênese; aumento do suporte neurotrófico; supressão de vias pró-inflamatórias e decréscimo de permeabilidade do vaso. Além disso, uma série de estudos em animais sugeriram um papel cardioprotetor do E2 na lesão de

isquemia/reperfusão [44,45]. Além de lesões miocárdicas, a isquemia cardíaca/reperfusão leva ao desenvolvimento precoce de disfunção endotelial coronariana.

Mais recentemente, Favre et al. [46] demonstraram que a ativação crônica do ER endotelial por E2 provoca tanto efeitos protetores endoteliais e do miocárdio coronariano após isquemia/reperfusão cardíaca.

Os estrogênios também podem prevenir a apoptose in vitro de vários tipos de celulares incluindo neurônios, cardiomiócitos, endotélio, queratinócitos. Diversos mecanismos podem estar envolvidos, incluindo a prevenção da morte celular no nível de cascatas apoptótica [47]. Finalmente, estrógenos promovem não só a mobilização de células progenitoras endoteliais e incorporação isquêmica tecidual [48], mas também proliferação de células tronco mesenquimais [49], bem como a sua produção de VEGF através da ativação de ER [50].

#### 7. Retardo de administração, idade e infiltração de ateroma nas ações vasculares de E2

Três fatores podem correlacionados aos impactos da ação vasculoprotetora de E2: administração tardia de E2, o avanço da idade e / ou ateroma.

Clarkson et al. demonstraram em primatas hipercolesterolêmicos que a eficácia dos estrogênios na progressão da placa foi inversamente relacionada com a duração do período de privação de estrogênio após a ooforectomia [4,15]. Eles forneceram evidências convincentes para: a prevenção primária de aterosclerose coronária quando estrógenos são administrados logo após o início da deficiência hormonal; a perda total o efeito benéfico destes estrogênios se o tratamento for adiado por um período igual a seis anos para as mulheres na pós-menopausa diminuindo a expressão dos receptores de E2 na parede vascular [4]. Além disso, Rosenfeld et al. [51] relataram que E2 inibe a iniciação de estrias gordurosas em toda a vasculatura, mas não inibe a progressão de lesões estabelecidas em camundongos hipercolesterolêmicos.

Finalmente, a idade é o fator de risco mais importante para o desenvolvimento de ateroma e suas complicações, e por si só, também poderia contribuir para comprometer a ação vasculoprotetora de E2.

#### 8. Ações do estrogênio na inflamação e angiogênese: um papel na estabilidade da placa de ateroma

A inflamação e proteólise de tecido por metaloproteinases de matriz parece desempenhar um papel essencial para o desgaste e ruptura da capa fibrosa da placa de ateroma. Contudo, a prova definitiva da placa vulnerável permanece indefinida[52]. Assim, o efeito de E2 sobre a estabilidade das placas não pode ser diretamente explorado em modelos experimentais e os mecanismos propostos depois não tem sido demonstrado diretamente.

Estudos sobre o impacto de E2 em populações de células do sistema imunológico revelou uma resposta dupla inesperada [53]. Por um lado, um tratamento agudo de E2 in vitro conduziu a um efeito antiinflamatório [54]. Por outro lado, várias

células imunes, incluindo macrófagos peritonias [55], os linfócitos T CD4 + [56] e os linfócitos T NK [57], obtidos a partir de camundongos tratados cronicamente (E2), tiveram um aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias. No entanto, enquanto E2 potencializa a capacidade de várias sub-populações de células imunes circulantes ou residente, as células para a produção de citocinas pró-inflamatórias, que aumenta a mesmo tempo, a resistência do endotélio para várias lesões e, assim, impede a ativação endotelial. Assim, se este mecanismo atua durante o processo de ateroma, um defeito na ação protetora do endotélio pode deflagrar a ação pró-inflamatória.

Além disso, a angiogênese contribui para o desenvolvimento de placas aumentando assim o risco de ruptura [58], bem como a progressão da placa, que provavelmente é estimulada por hipóxia, espécies reativas de oxigênio e hipóxia-induzida pelo fator (HIF) de sinalização. A presença de hipóxia na placa é primariamente determinada pela inflamação da mesma, enquanto que a contribuição da espessura da placa parece bem menor. No entanto, a destruição da integridade do endotélio microvascular provavelmente conduz a hemorragia intraplaca com um risco aumentado para a ruptura da placa [58].

Os mecanismos envolvidos nos efeitos pró-angiogênicos dos estrogênios são, provavelmente multifatoriais. E2 induz três principais fatores pró-angiogênicos: fator de crescimento de fibroblastos-2, fator de crescimento vascular endotelial, e NO sintase [6,18-24,59].

Ao todo, as diferentes ações do E2 no músculo liso podem prevenir a constituição da capa fibrosa a favor da desestabilização da placa.

## 9. O papel deletério da associação da MPA com estrogênio

Esta preocupação foi aumentada quando se comparam os resultados dos dois braços de WHI como citado anteriormente.

Um estudo realizado em macacos demonstrou que o tratamento de CEE isolado resultou em uma redução de 72% na aterosclerose coronária comparada com os controles, enquanto que os animais que receberam MPA, ou ECO mais MPA não diferiram significativamente dos controles [9], sugerindo que MPA aboliu os efeitos ateroprotetores dos estrógenios.

Enquanto E2 impede vasoespasmo coronário induzido por acetilcolina em macacos ovariectomizados, a combinação de MPA e E2 falhou para demonstrar este efeito protetor [28].

No total, os estudos concluem, já em 1997, que a MPA aumenta o risco de vasoespasmo coronário, e pode diminuir a ação ateroprotetora dos estrogênios.

## 10. Estrogênios, coagulação e trombose

E2 favorece a produção de fatores circulantes pró-coagulantes [60,61]. Contraceptivos orais e terapia hormonal por via oral podem aumentar os riscos de trombose venosa e arterial provavelmente devido à hipercoagulabilidade sistêmica.

A via de administração de estrogênio pode ser um importante determinante do risco cardiovascular.

No estudo ESTHER, que fez uso de estrogênio transdérmico isolado ou combinado não aumentou o risco de embolia venosa, diferentemente da via oral. No entanto, o tipo de progesterona pode ser um fator determinante. Desta forma, existem evidências convincentes para sugerir que a administração transdérmica de estrogênios em combinação com progesterona natural ou diidroprogesterona devem ser considerados na escolha de um regime hormonal terapêutico, especialmente em mulheres com alto risco de cardiovascular doença.

## 11. Os alvos moleculares: receptor de estrogênio (ER)

ER $\alpha$  e ER $\beta$  pertencem a subfamília de receptores transmembranas e podem ser divididos em seis domínios denominados de A a F.

O mecanismo clássico de ação que envolve a ligação de E2 ao ER envolve elementos de resposta específicos sobre genes-alvo para regular a transcrição gênica, e o intervalo de tempo entre a administração de esteróides e os efeitos observáveis produzidos pela proteína sintetizada de novo é tipicamente na ordem de horas a dias, provocando cascatas de mudanças de expressão de genes.

Ao longo das últimas duas décadas, alguns efeitos da E2, tais como vasodilatação, foram mostradas para ocorrer dentro de minutos de administração de esteróides. Estes efeitos rápidos de E2 a partir do resultado ações de receptores específicos localizados na maioria das vezes na membrana plasmática.

## 12. Conclusões e perspectivas terapêuticas inovadoras

A compreensão dos mecanismos moleculares de ativação ER constitui a base para novos desenvolvimentos farmacológicas, buscando a preservação dos efeitos benéficos dos estrógenos sobre a vasculatura.

Atualmente, os SERMs (receptores seletivos de estrogênio - tamoxifeno, raloxifeno, bazedoxifene), possuem efeito de agonista de estrogênio no osso, e antagonista sobre a mama, sem qualquer efeito positivo sobre os sintomas da menopausa e dos riscos cardiovasculares. Desse modo, a prevenção do câncer de mama e tanto as doenças cardiovasculares por novos SERMs representa, portanto, o grande desafio do futuro tratamento da menopausa.

## REFERÊNCIAS

1. Kalin MF, Zumoff B. Sex hormones and coronary disease: a review of the clinical studies. *Steroids* 1990;55:330–52.

2. Dubey RK, Imthurn B, Barton M, Jackson EK. Vascular consequences of menopause and hormone therapy: importance of timing of treatment and type of estrogen. *Cardiovasc Res* 2005;66:295–306.
3. Grodstein F, Stampfer MJ, Manson JE, Colditz GA, Willett WC, Rosner B, et al. Postmenopausal estrogen and progestin use and the risk of cardiovascular disease. *N Engl J Med* 1996;335:453–61.
4. Clarkson TB, Appt SE. Controversies about HRT—lessons from monkey models. *Maturitas* 2005;51:64–74.
5. Holm P, Andersen HL, Andersen MR, Erhardtsen E, Stender S. The direct antiatherogenic effect of estrogen is present, absent, or reversed, depending on the state of the arterial endothelium. A time course study in cholesterol-clamped rabbits. *Circulation* 1999;100:1727–33.
6. Arnal JF, Scarabin PY, Tremollieres F, Laurell H, Gourdy P. Estrogens in vascular biology and disease: where do we stand today? *Curr Opin Lipidol* 2007;18:554–60.
7. Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B, et al. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *JAMA* 1998;280:605–13.
8. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women’s Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2002;288:321–33.
9. Adams MR, Register TC, Golden DL, Wagner JD, Williams JK. Medroxyprogesterone acetate antagonizes inhibitory effects of conjugated equine estrogens on coronary artery atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:217–21.
10. Rossouw JE, Prentice RL, Manson JE, Wu L, Barad D, Barnabei VM, et al. Postmenopausal hormone therapy and risk of cardiovascular disease by age and years since menopause. *JAMA* 2007;297:1465–77.
11. Stevenson JC, Hodis HN, Pickar JH, Lobo RA. Coronary heart disease and menopause management: the swinging pendulum of HRT. *Atherosclerosis* 2009;207:336–40.
12. Anderson GL, Limacher M, Assaf AR, Bassford T, Beresford SA, Black H, et al. Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women’s Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2004;291:1701–12.
13. Kanaya AM, Herrington D, Vittinghoff E, Lin F, Grady D, Bittner V, et al. Glycemic effects of postmenopausal hormone therapy: the Heart and Estrogen/progestin Replacement Study. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 2003;138:1–9.
14. Margolis KL, Bonds DE, Rodabough RJ, Tinker L, Phillips LS, Allen C, et al. Effect of oestrogen plus progestin on the incidence of diabetes in postmenopausal women: results from the Women’s Health Initiative Hormone Trial. *Diabetologia* 2004;47:1175–87.
15. Rubanyi GM, Johns A, Kauser K. Effect of estrogen on endothelial function and angiogenesis. *Vasc Pharmacol* 2002;38:89–98.
16. Chambliss KL, Shaul PW. Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase. *Endocr Rev* 2002;23:665–86.
17. Miller VM, Clarkson TB, Harman SM, Brinton EA, Cedars M, Lobo R, et al. Women, hormones, and clinical trials: a beginning, not an end. *J Appl Physiol* 2005;99:381–3.

18. Mendelsohn ME, Karas RH. Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences. *Science* 2005;308:1583–7.
19. Simoncini T. Mechanisms of action of estrogen receptors in vascular cells: relevance for menopause and aging. *Climacteric* 2009;12(Suppl. 1):6–11.
20. Kim KH, Bender JR. Membrane-initiated actions of estrogen on the endothelium. *Mol Cell Endocrinol* 2009;308:3–8.
21. Levin ER. Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Mol Endocrinol* 2005;19:1951–9.
22. Sader MA, Celermajer DS. Endothelial function, vascular reactivity and gender differences in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 2002;53:597–604.
23. Celermajer DS, Sorensen KE, Spiegelhalter DJ, Georgakopoulos D, Robinson J, Deanfield JE. Aging is associated with endothelial dysfunction in healthy men years before the age-related decline in women. *J Am Coll Cardiol* 1994;24:471–6.
24. Collins P, Rosano GM, Sarrel PM, Ulrich L, Adamopoulos S, Beale CM, et al. 17 beta-Estradiol attenuates acetylcholine-induced coronary arterial constriction in women but not men with coronary heart disease. *Circulation* 1995;92:24–30.
25. Miyagawa K, Rosch J, Stanczyk F, Hermsmeyer K. Medroxyprogesterone interferes with ovarian steroid protection against coronary vasospasm. *Nat Med* 1997;3:324–7.
26. Nakai K, Itoh C, Hotta K, Itoh T, Yoshizumi M, Hiramori K. Estradiol-17 beta regulates the induction of VCAM-1 mRNA expression by interleukin-1 beta in human umbilical vein endothelial cells. *Life Sci* 1994;54:PL221–227.
27. Rodriguez E, Lopez R, Paez A, Masso F, Montano LF. 17Beta-estradiol inhibits the adhesion of leukocytes in TNF-alpha stimulated human endothelial cells by blocking IL-8 and MCP-1 secretion, but not its transcription. *Life Sci* 2002;71:2181–93.
28. Nathan L, Pervin S, Singh R, Rosenfeld M, Chaudhuri G. Estradiol inhibits leukocyte adhesion and transendothelial migration in rabbits in vivo: possible mechanisms for gender differences in atherosclerosis. *Circ Res* 1999;85:377–85.
29. Adams MR, Kaplan JR, Manuck SB, Koritnik DR, Parks JS, Wolfe MS, et al. Inhibition of coronary artery atherosclerosis by 17-beta estradiol in ovariectomized monkeys. Lack of an effect of added progesterone. *Arteriosclerosis* 1990;10:1051–7.
30. Register TC, Adams MR, Golden DL, Clarkson TB. Conjugated equine estrogen alone, but not in combination with medroxyprogesterone acetate, inhibit aortic connective tissue remodeling after plasma lipid lowering in female monkeys. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1164–71.
31. Bourassa PA, Milos PM, Gaynor BJ, Breslow JL, Aiello RJ. Estrogen reduces atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:10022–7.
32. Elhage R, Arnal JF, Pierragi M-T, Duverger N, Fiévet C, Faye JC, et al. Estradiol-17 $\beta$  prevents fatty streak formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2679–84.
33. Billon-Gales A, Fontaine C, Douin-Echinard V, Delpy L, Berges H, Calippe B, et al. Endothelial estrogen receptor-alpha plays a crucial role in the atheroprotective action of 17beta-estradiol in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation* 2009;120:2567–76.
34. Egan KM, Lawson JA, Fries S, Koller B, Rader DJ, Smyth EM, et al. COX-2-derived prostacyclin confers atheroprotection on female mice. *Science* 2004;306:1954–7.
35. Hodgin J, Maeda N. Estrogen and mouse models of atherosclerosis. *Endocrinology* 2002;143:4495–501.

36. Elhage R, Bayard F, Richard V, Holvoet P, Duverger N, Fievet C, et al. Prevention of fatty streak formation of 17beta-estradiol is not mediated by the production of nitric oxide in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 1997;96:3048–52.
37. Van Belle E, Bauters C, Asahara T, Isner JM. Endothelial regrowth after arterial injury: from vascular repair to therapeutics. *Cardiovasc Res* 1998;38:54–68.
38. Geraldès P, Sirois MG, Bernatchez PN, Tanguay JF. Estrogen regulation of endothelial and smooth muscle cell migration and proliferation: role of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1585–90.
39. Filipe C, Lam Shang Leen L, Bouchet L, Billon A, Benouaich V, Fontaine V, et al. Estradiol accelerates endothelial healing through the retrograde commitment of uninjured endothelium. *Am J Physiol* 2008;294:H2822–2830.
40. Toutain CE, Filipe C, Billon A, Fontaine C, Bouchet L, Guery JC, et al. Estrogen receptor alpha expression in both endothelium and hematopoietic cells is required for the accelerative effect of estradiol on reendothelialization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:1543–50.
41. Strehlow K, Werner N, Berweiler J, Link A, Dirnagl U, Priller J, et al. Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation. *Circulation* 2003;107:3059–65.
42. Iwakura A, Luedemann C, Shastry S, Hanley A, Kearney M, Aikawa R, et al. Estrogen-mediated, endothelial nitric oxide synthase-dependent mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells contributes to reendothelialization after arterial injury. *Circulation* 2003;108:3115–21.
43. Hurn PD, Brass LM. Estrogen and stroke: a balanced analysis. *Stroke* 2003;34:338–41.
44. Delyani JA, Murohara T, Nossuli TO, Lefer AM. Protection from myocardial reperfusion injury by acute administration of 17 beta-estradiol. *J Mol Cell Cardiol* 1996;28:1001–8.
45. Kolodgie FD, Farb A, Litovsky SH, Narula J, Jeffers LA, Lee SJ, et al. Myocardial protection of contractile function after global ischemia by physiologic estrogen replacement in the ovariectomized rat. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:2403–14.
46. Favre J, Gao J, Henry JP, Remy-Jouet I, Fourquaux I, Billon-Gales A, et al. Endothelial estrogen receptor {alpha} plays an essential role in the coronary and myocardial protective effects of estradiol in ischemia/reperfusion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:2562–7.
47. Jover T, Tanaka H, Calderone A, Oguro K, Bennett MV, Etgen AM, et al. Estrogen protects against global ischemia-induced neuronal death and prevents activation of apoptotic signaling cascades in the hippocampal CA1. *J Neurosci* 2002;22:2115–24.
48. Iwakura A, Shastry S, Luedemann C, Hamada H, Kawamoto A, Kishore R, et al. Estradiol enhances recovery after myocardial infarction by augmenting incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells into sites of ischemia-induced neovascularization via endothelial nitric oxide synthase-mediated activation of matrix metalloproteinase-9. *Circulation* 2006;113:1605–14.
49. Yun SP, Lee MY, Ryu JM, Song CH, Han HJ. Role of HIF-1alpha and VEGF in human mesenchymal stem cell proliferation by 17beta-estradiol: involvement of PKC, PI3K/Akt, and MAPKs. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009;296:C317–326.
50. Wang M, Tan J, Coffey A, Fehrenbacher J, Weil BR, Meldrum DR. Signal transducer and activator of transcription 3-stimulated hypoxia inducible factor-1alpha mediates estrogen receptor-alpha-induced mesenchymal stem cell vascular endothelial growth factor production. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2009;138:163–71, 171 e161.

51. Brandes RP, Mugge A. Gender differences in the generation of superoxide anions in the rat aorta. *Life Sci* 1997;60:391–6.
52. Methot J, Hamelin BA, Arsenault M, Bogaty P, Plante S, Poirier P. The ACE-DD genotype is associated with endothelial dysfunction in postmenopausal women. *Menopause* 2006;13:959–66.
53. Zhang F, Ram JL, Standley PR, Sowers JR. 17 Beta-estradiol attenuates voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> currents in A7r5 vascular smooth muscle cell line. *Am J Physiol* 1994;266:C975–80.
54. Chrissobolis S, Budzyn K, Marley PD, Sobey CG. Evidence that estrogen suppresses rho-kinase function in the cerebral circulation in vivo. *Stroke* 2004;35:2200–5.
55. Simoncini T, Scorticati C, Mannella P, Fadiel A, Giretti MS, Fu XD, et al. Estrogen receptor alpha interacts with Galpha13 to drive actin remodeling and endothelial cell migration via the RhoA/Rho kinase/moesin pathway. *Mol Endocrinol* 2006;20:1756–71.
56. Lewandowski KC, Komorowski J, Mikhalidis DP, Bienkiewicz M, Tan BK, O'Callaghan CJ, et al. Effects of hormone replacement therapy type and route of administration on plasma matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:3123–30.
57. Kim J, Kim JY, Song KS, Lee YH, Seo JS, Jelinek J, et al. Epigenetic changes in estrogen receptor beta gene in atherosclerotic cardiovascular tissues and invitro vascular senescence. *Biochim Biophys Acta* 2007;1772:72–80.
58. Collins P, Rosano GM, Sarrel PM, Ulrich L, Adamopoulos S, Beale CM, et al. 17 Beta-estradiol attenuates acetylcholine-induced coronary arterial constriction in women but not men with coronary heart disease. *Circulation* 1995;92: 24–30.
59. Vitale C, Mercurio G, Cerquetani E, Marazzi G, Patrizi R, Pelliccia F, et al. Time since menopause influences the acute and chronic effect of estrogens on endothelial function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:348-52.
60. Gonzales RJ, Ansar S, Duckles SP, Krause DN. Androgenic/estrogenic balance in the male rat cerebral circulation: metabolic enzymes and sex steroid receptors. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007;27:1841-52.
61. Selles J, Polini N, Alvarez C, Massheimer V. Progesterone and 17 beta-estradiol acutely stimulate nitric oxide synthase activity in rat aorta and inhibit platelet aggregation. *Life Sci* 2001;69:815-27.