

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
(CiPharma)

**AVALIAÇÃO DA POSSÍVEL INTERAÇÃO ENTRE A
CANDESARTANA E A IPRIFLAVONA, VEICULADAS EM UM
SISTEMA AUTOEMULSIONÁVEL, SOBRE A FUNÇÃO SEXUAL DE
RATAS HIPERTENSAS E NORMOTENSAS**

LEIDIANE VIEIRA SIMÕES

Ouro Preto – MG – BRASIL

Agosto de 2017

LEIDIANE VIEIRA SIMÕES

**AVALIAÇÃO DA POSSÍVEL INTERAÇÃO ENTRE A
CANDESARTANA E A IPRIFLAVONA, VEICULADAS EM UM
SISTEMA AUTOEMULSIONÁVEL, SOBRE A FUNÇÃO SEXUAL DE
RATAS HIPERTENSAS E NORMOTENSAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (CiPharma) da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Linha de Pesquisa: Química e Farmacologia de Substâncias Bioativas

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos

Orientador: Prof. Dr. Romulo Leite

**Ouro Preto – MG
2017**

S593a

Simões, Leidiane Vieira.

Avaliação da possível interação entre a candesartana e a ipriflavona, veiculadas em um sistema autoemulsionável, sobre a função sexual de ratas hipertensas e normotensas [manuscrito] / Leidiane Vieira Simões. - 2017.

64f.: il.: color; graf; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Romulo Leite.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Departamento de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos.

1. Hipertensão . 2. Disfunção sexual feminina. 3. Ipriflavona. 4. Candesartana.
I. Leite, Romulo. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 616.12-008.331

Catálogo: www.sisbin.ufop.br



UFOP
Universidade Federal
de Ouro Preto



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Escola de Farmácia



LISTA DE PRESENÇA

Sessão de defesa da 132ª dissertação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, que conferiu o grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas a **Leidiane Vieira Simões**, com a defesa da dissertação intitulada: “Avaliação da possível interação entre a Candesartana e Ipriflavona, veiculadas em um sistema autoemulsionável, sobre a função sexual de ratas hipertensas e normotensas”, avaliada pela banca examinadora abaixo:

Ouro Preto, 28 de agosto de 2017.

Prof. Dr. Luciano dos Santos Aggum Capettini
UFMG

Prof. Dr. Leonardo Máximo Cardoso
UFOP

Prof. Dr. Romulo Leite
UFOP

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pelo dom da vida, aos meus pais pelo incentivo e apoio, ao amado Alex por toda paciência e companheirismo, aos meus familiares e amigos por estarem ao meu lado de forma carinhosa e por entenderem minhas ausências. Quero deixar também meus agradecimentos aos amigos que, de uma forma ou de outra, me prestaram inestimável ajuda no desenvolvimento deste trabalho: ao Professor Romulo Leite, pela amizade, paciência e valiosa orientação, às Professoras Vanessa Carla Furtado Mosqueira e Andrea Grabe Guimarães pelo acolhimento e pelas proveitosas críticas e sugestões, ao Sr. Wilson Silvestre Vicente pelo apoio técnico, aos colegas de laboratório Thales de Andrade Martins, Josemar da Conceição Mendes, Gisele Vieira Rodovalho, Renata Branquinho e muitos outros pela amizade e pacienciosa colaboração, à PROPP-UFOP, PPG CiPharma, CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio institucional, e finalmente a todos aqueles que me ofereceram sua atenção, ideias e laboratórios.

“Não existe arte patriótica ou ciência patriótica. Ambas pertencem, como todo sublime bem, ao mundo inteiro, e só podem ser fomentadas pelo intercâmbio geral e livre de todos os simultaneamente vivos, em constante respeito pelo que nos foi transmitido e nos é conhecido do passado.”

(Goethe)

RESUMO

A disfunção sexual é caracterizada por distúrbios e alterações psicofisiológicas no ciclo de resposta sexual. A hipertensão arterial (HA), doença de elevada prevalência no Brasil, foi apontada como uma das causas da disfunção sexual também em mulheres. Sabe-se que algumas classes de medicamentos utilizadas para reduzir e controlar a pressão arterial também comprometem o processo de resposta sexual, porém, estudos demonstraram que os antagonistas dos receptores de angiotensina II (ARA), além de eficazes no tratamento da HA, aparentemente não provocam, ou até mesmo atenuam as disfunções sexuais. O efeito benéfico dos ARA tem sido observado em estudos realizados em modelos experimentais de disfunção erétil em animais machos. Outro forte candidato a ser estudado em relação à melhora função sexual feminina é a ipriflavona, um derivado sintético do fitoestrógeno daidzeína (isoflavona), cuja estrutura química é similar ao estradiol, podendo ligar-se aos receptores de estrógeno, provocando um efeito semelhante ao referido hormônio. A ipriflavona já é utilizada para a prevenção e tratamento de osteoporose e estudos demonstraram o seu elevado potencial em minimizar os sintomas da menopausa, podendo substituir a terapia de reposição hormonal, cuja utilização é atualmente controversa devido à sua relação com o surgimento de câncer do endométrio, ovário e mamas. Nesse contexto, objetivou-se avaliar o potencial terapêutico da ipriflavona, da candesartana e da combinação dos mesmos na resposta de excitação sexual de ratas hipertensas (SHR) e normotensas (WKY). Como a biodisponibilidade desses fármacos por via oral é baixa, ambos foram administrados veiculados em um sistema autoemulsionável para entrega de fármacos (SEDDS). Os parâmetros fisiológicos avaliados por meio de estimulação do nervo pélvico mostraram que a pressão intravaginal foi significativamente maior em ratas SHR tratadas com 30 mg/kg de ipriflavona e em ratas WKY tratadas com ipriflavona e candesartana nas doses 30 mg/kg e 2 mg/kg, respectivamente. O aumento na variação da temperatura foi significativo apenas para o grupo SHR tratado com ipriflavona 30 mg/kg em comparação ao grupo tratado com ipriflavona e candesartana (30 mg/kg e 5 mg/kg, respectivamente). A lubrificação vaginal de fêmeas normotensas foi maior em relação às hipertensas tanto a nível basal quanto pós-estímulo. Verificou-se que a resposta de excitação sexual em fêmeas é comprometida pela hipertensão arterial, tendo em vista o perfil de resposta significativamente maior nas fêmeas normotensas. A análise das respostas vasocongestivas não apresentou resultados satisfatórios para os fármacos estudados, como esperado em relação ao processo de excitação sexual. Não foram observadas variações do perfil lipídico, parâmetros hematológicos e enzimas indicadoras da função hepática. A candesartana isolada ou em associação com a ipriflavona nas doses utilizadas, veiculada em SEDDS, por tratamento durante 30 dias foi capaz de reduzir a pressão arterial, mas não alterou a resposta sexual e nem o efeito facilitador da ipriflavona sobre a resposta de excitação sexual em ratas normotensas ou hipertensas. Conclui-se, portanto, que o tratamento da hipertensão com a candesartana pode ser uma alternativa para evitar-se a disfunção sexual feminina em pacientes hipertensas e que a utilização da ipriflavona pode promover melhora da resposta de excitação sexual em fêmeas.

Palavras-chave: Ipriflavona, Candesartana, Disfunção sexual feminina, Hipertensão, SEDDS, Óxido Nítrico, SHR, WKY.

ABSTRACT

Sexual dysfunction is characterized by disturbances and psychophysiological changes in the sexual response cycle. Hypertension (HA), a disease of high prevalence in Brazil, was pointed out as one of the causes of sexual dysfunction in women. It is known that some classes of drugs used to reduce and control blood pressure also compromise the sexual response process; however, studies have shown that angiotensin II receptor antagonists (ARBs), besides being effective in the treatment of hypertension, apparently do not induce, or even ameliorate sexual dysfunction. The beneficial effect of ARBs has been observed in studies conducted in experimental models of erectile dysfunction in male animals. Another strong candidate to be studied in relation to improvement of the female sexual function is ipriflavone, a synthetic derivative of the phytoestrogen daidzein (isoflavone), whose chemical structure is similar to estradiol, and can bind to estrogen receptors, causing a hormonal-like effect. Ipriflavone is already used for the prevention and treatment of osteoporosis and studies have demonstrated its high potential in minimizing the symptoms of menopause and may replace hormone replacement therapy, which use is a bit controversial now a days due to the increased chance of incidence of endometrium, ovary and breast cancer. In this context, we aimed to evaluate the therapeutic potential of ipriflavone, candesartan and their combination in the arousal sexual response of hypertensive (SHR) and normotensive (WKY) rats. As the oral bioavailabilities of these drugs are low, both were administered in a self-emulsifying drug delivery system (SEDDS). Physiological parameters assessed by pelvic nerve stimulation showed that intravaginal pressure was significantly higher in SHR rats treated with 30 mg/kg ipriflavone and in WKY rats treated with ipriflavone and candesartan at doses of 30 mg/kg and 2 mg/kg, respectively. The augmentation of the temperature range was significant only for the SHR group treated with ipriflavone 30 mg/kg compared to the ipriflavone and candesartan group (30 mg/kg and 5 mg/kg, respectively). The vaginal lubrication of normotensive females was higher in relation to the hypertensive ones at both basal and post-stimulus levels. It was verified that the arousal sexual response in females is compromised by arterial hypertension, since of the response profile is significantly higher in normotensive females. The analysis of the vasocongestive responses did not present satisfactory results for the drugs studied, as expected in relation to the sexual arousal process. There were no changes in the lipid profile, hematological parameters and the enzymes that usually as markers of the hepatic function. Candesartan alone or in combination with ipriflavone at doses used, delivered on SEDDS, by treatment for 30 days were able to reduce blood pressure, but did not alter the sexual response or the facilitating effect of ipriflavone on the sexual arousal response in Normotensive or hypertensive rats. It is concluded, therefore, that the treatment of hypertension with candesartan may be an alternative to prevent female sexual dysfunction in hypertensive patients and that the use of ipriflavone can promote an improvement in the sexual arousal response in females.

Key words: Ipriflavone, Candesartan, Female Sexual Dysfunction, Hypertension, SEDDS, SHR, WKY.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da síntese de estrógeno e progesterona.....	04
Figura 2: Fatores fisiológicos que influenciam a resposta sexual feminina.....	06
Figura 3: Distúrbios envolvidos na disfunção sexual feminina.....	07
Figura 4: Distúrbios da excitação e as principais áreas afetadas em relação às respostas genitais.....	08
Figura 5: Estrutura química da candesartana cilexetila e da candesartana.....	11
Figura 6: Comparação estrutural da molécula da dadzeína, da ipriflavona do 17 β – estradiol.....	12
Figura 7: Representação do ciclo reprodutivo da mulher (A) e da rata (B) e suas respectivas variações hormonais.....	15
Figura 8: Representação esquemática do modelo usado para avaliação da excitação sexual em ratas conscientes induzida pela administração subcutânea de apomorfina.....	22
Figura 9: Mudanças no tamanho dos glóbulos após incorporação dos fármacos em estudo (n=3).....	25
Figura 10: Índices de polidispersão das 4 formulações preparadas (n=3).....	25
Figura 11: Fotomicrografias de lâminas coradas (papanicolau) de esfregaço vaginal de ratas SHR (1 a 4) e WKY (5 a 8).....	26
Figura 12: Variações da massa corporal de ratas SHR e WKY.....	27
Figura 13: Valores da pressão arterial sistólica de ratas SHR e WKY.....	28
Figura 14: Valores da pressão arterial média (após canulação) de ratas SHR e WKY.....	29
Figura 15: Valores da pressão arterial (sistólica e diastólica) de ratas SHR e WKY.....	30
Figura 16: Valores da frequência cardíaca (BPM) de ratas SHR e WKY.....	31
Figura 17: Valores da pressão arterial sistólica de ratas SHR medidos por pletismografia (n=10) e após canulação (n=10).....	32
Figura 18: Valores da pressão arterial sistólica de ratas WKY medidos por pletismografia (n=10) e após canulação (n=10).....	32
Figura 19: Respostas vasocongestivas, após administração de ácido ascórbico (SC), de ratas SHR e WKY.....	33
Figura 20: Respostas vasocongestivas, após administração de apomorfina (SC), de ratas SHR e WKY.....	34
Figura 21: Comparativo das respostas vasocongestivas (após administração subcutânea de ácido ascórbico e apomorfina) de ratas SHR e WKY.....	35
Figura 22: Variações na lubrificação vaginal basal (g) e sob estimulação elétrica do nervo pélvico de ratas SHR e WKY.....	36

Figura 23: Variação da temperatura intravaginal (°C) induzida pela estimulação do nervo pélvico em ratas SHR e WKY.....	37
Figura 24: Mudanças na pressão intravaginal (mmHg) induzida pela estimulação do nervo pélvico em ratas SHR e WKY.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS

- ANG-(1-7): Angiotensina 1 – 7
- ANOVA: Análise de variância
- ARA: Antagonistas de receptores da angiotensina II
- AT₁: Receptor de angiotensina do tipo AT1
- BPM: Batimentos por minuto
- CAN: Candesartana
- CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais
- COL: Colesterol
- CYP: Citocromo P450
- D2: Receptores dopaminérgicos periféricos - subtipo D2
- D4: Receptores dopaminérgicos centrais - subtipo D4
- DS: Disfunção sexual
- DSF: Disfunção sexual feminina
- ECA: enzima conversora de angiotensina
- ECA2: Enzima conversora da angiotensina 2
- eNOS: Óxido nítrico sintase endotelial
- EPM: Erro padrão da média
- FSH: Hormônio folículo estimulante
- GnRH: Hormônio liberador gonadotrófico
- HA: Hipertensão arterial
- HAS: Hipertensão arterial sistêmica
- HDL: Lipoproteínas de alta densidade (do inglês: High Density Lipoproteins)
- ICB/USP: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo
- IP: Ipriflavona
- IP+CAN: Ipriflavona associada à candesartana
- LAPAC: Laboratório Piloto de Análises Clínicas da Universidade Federal de Ouro Preto

LDL: Lipoproteínas de baixa densidade (do inglês: Low Density Lipoproteins)

LH: Hormônio luteinizante

log P: Coeficiente de partição

nNOS: Óxido nítrico sintase neuronal

NO: Óxido nítrico

NOS: Enzima produtora de óxido nítrico

PA: Pressão arterial

PAS: Pressão arterial sistólica

PVDF: Fluoreto de polivinilideno

SC: Subcutâneo

SEDDS: Sistema autoemulsionável para liberação de fármacos

SHR: Spontaneously hypertensive rat (ratos espontaneamente hipertensos)

SMEDDS: Sistema autoemulsionável sólido

SNC: Sistema nervoso central

SRAA: Sistema renina angiotensina aldosterona

TGO: Transaminase glutâmico-oxalacética

TGP: Transaminase glutâmico-pirúvica

TRH: Terapia de reposição hormonal

TRIG: Triglicérides

UFOP: Universidade Federal de Ouro Preto

WKY: Wistar Kyoto

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 – Resposta sexual feminina: anatomia e fisiologia	4
2.2 – Disfunção sexual feminina.....	6
2.3 – Disfunção sexual, hipertensão arterial e anti-hipertensivos.....	9
2.4 – Tratamento da disfunção sexual feminina e o potencial dos fitoestrógenos.....	11
2.5 – Sistemas autoemulsionáveis para liberação de fármacos (SEDDS)	13
2.6 – Modelo animal: ratas espontaneamente hipertensas (SHR) e normotensas (WKY) ...	14
3. OBJETIVOS	16
3.1 - Objetivo Geral	16
3.2 - Objetivos Específicos	16
4.1 - Delineamento experimental	17
4.2 - Animais.....	17
4.3 - Monitoramento do ciclo estral das ratas	17
4.4 - Medida da pressão arterial sistólica por meio de pletismografia de cauda	18
4.5 - Monitoramento da pressão arterial direta	19
4.6 - Desenvolvimento e caracterização do sistema autoemulsionável	19
4.6.1 – Preparo do SEDDS e incorporação dos fármacos	19
4.6.2 – Caracterização do SEDDS: tamanho e índice de polidispersão	20
4.7 - Tratamento via oral por meio de gavagem	20
4.7.1 - Tratamento com ipriflavona veiculada em SEDDS (gavagem).....	20
4.7.2 - Tratamento com a candesartana veiculada em SEDDS (gavagem).....	21
4.7.3 - Tratamento com candesartana e ipriflavona veiculadas em SEDDS (gavagem)...	21
4.8 - Respostas vasocongestivas induzidas por apomorfina em ratas conscientes	21
4.9 - Estimulação do nervo pélvico.....	22
4.10 - Medida da temperatura da cavidade vaginal	23
4.11 - Determinação da lubrificação vaginal	23
4.12 - Medida de pressão intravaginal	23
4.13 - Análise dos parâmetros hematológicos	24
4.14 - Avaliação do perfil lipídico e dos indicadores a função hepática (TGO/TGP).....	24
4.15 - Análise estatística	24
5. RESULTADOS	25
5.1 - Caracterização do SEDDS	25
5.1.1 - Tamanho dos glóbulos	25
5.1.2 - Índice de polidispersão	25

5.2 - Monitoramento do ciclo estral	26
5.3 - Variação da massa corporal (g) ao longo dos tratamentos	26
5.4 - Monitoramento da pressão arterial	27
5.4.1 - Medida indireta por meio de pletismografia de cauda	27
5.4.2 - Medida direta por meio de canulação da artéria femoral esquerda	28
5.4.3 - Frequência cardíaca	30
5.4.4 - Pressão arterial sistólica (pletismografia) X (medida direta por canulação da artéria femoral)	31
5.5 - Respostas vasocongestivas induzidas por apomorfina em ratas conscientes	33
5.5.1 – Solução salina contendo ácido ascórbico (veículo para a apomorfina)	33
5.5.2 - Apomorfina	34
5.5.3 - Ácido ascórbico X Apomorfina	35
5.6 - Lubrificação vaginal	35
5.7 - Temperatura intravaginal	36
5.8 - Pressão intravaginal	37
6. DISCUSSÃO	40
8. REFERÊNCIAS	47
9. ANEXO	53

1. INTRODUÇÃO

A disfunção sexual feminina pode ser definida como síndrome clínica, momentânea ou permanente, caracterizada por falta, excesso, desconforto e/ou dor na expressão e no desenvolvimento do ciclo de resposta sexual, podendo afetar uma ou mais das fases deste (ABDO, 2006; TOZO, 2007). Grande parte dos casos de disfunção sexual está relacionada a problemas psicológicos ou problemas no relacionamento, mas podem também ser consequência de problemas orgânicos ou resultado do uso de drogas, medicamentos ou exposição a toxinas (BRASIL, 2010).

Estudos sugerem que os mesmos processos patológicos e fatores de risco associados à disfunção erétil em homens, incluindo o envelhecimento, a hipertensão, o tabagismo, a hipercolesterolemia e as cirurgias pélvicas, também têm relação com a disfunção sexual feminina (BERMAN, 2005).

Em relação à hipertensão arterial, pesquisas apontam que mulheres hipertensas apresentam distúrbios sexuais com maior frequência quando comparadas àquelas não hipertensas ou recém-diagnosticadas com a doença. Infelizmente, muitos trabalhos sobre o tratamento da hipertensão arterial e outras doenças crônicas negligenciam as mulheres e sua história sexual (DUNCAN *et al.*, 2001; OKEAHIALAM, 2006; SILVA, 2013).

Anormalidades estruturais e funcionais dos órgãos genitais têm sido relatadas por pacientes hipertensas. É fato que um relaxamento vascular adequado se faz necessário para que ocorram a lubrificação vaginal e o ingurgitamento clitoriano apropriados e, alterações morfológicas dos vasos pélvicos podem ser fatores relevantes na gênese da disfunção sexual feminina em mulheres com elevada pressão arterial (PA) (DUNCAN *et al.*, 2001).

Dos medicamentos utilizados para o controle da hipertensão arterial, alguns são elencados como responsáveis pela ocorrência da disfunção sexual, principalmente em homens (OKEAHIALAM, 2006). Estudos mostram que a utilização de diuréticos, vasodilatadores diretos, e simpaticolíticos como bloqueadores β -adrenérgicos não seletivos, bloqueadores α -adrenérgicos e fármacos de ação central, está relacionada ao aumento de disfunção sexual (BATISTA, 2001).

Já em relação aos bloqueadores de canais de cálcio, inibidores da ECA (enzima conversora de angiotensina) e antagonistas dos receptores da angiotensina II (ARA), não foram observados sinais de disfunção sexual durante a utilização dos mesmos. A candesartana, um ARA, seletivo para receptores AT1, com forte ligação e lenta dissociação dos mesmos, além de apresentar elevado potencial terapêutico na diminuição e no controle da hipertensão, com efeitos adversos pouco pronunciados, também apresenta bons resultados em

relação à resposta sexual, em estudos realizados em animais machos e hipertensos (BATISTA, 2001; NEVES, 2011).

Além disso, pesquisas realizadas com a irbesartana, cujo mecanismo de ação é o mesmo da candesartana, apresentaram resultados positivos em relação à melhoria da função sexual (desejo, excitação e orgasmos) em mulheres hipertensas, possivelmente como resultado do seu efeito superior na redução do estresse oxidativo (MA *et al.*, 2012).

Em relação ao tratamento indicado para a melhoria da função sexual feminina, em alguns casos, a terapia de reposição hormonal (TRH) é realizada com estrógenos e progestógenos. Sabe-se que mulheres com baixos níveis de estrogênio e/ ou testosterona, normalmente, apresentam sintomas de diminuição da libido, diminuição da sensibilidade, secura vaginal, dispareunia (dor durante o ato sexual) e diminuição da excitação (BERMAN, 2005).

A TRH é indicada para o controle de manifestações vasomotoras e urogenitais consequentes da diminuição de produção de esteroides ovarianos, principalmente em mulheres na menopausa (WANNMACHER, 2004). Contudo, evidências recentes sugerem que a terapia de reposição hormonal está associada ao aumento no risco da incidência de eventos isquêmicos cardiovasculares, bem como de tromboembolismo venoso. (GRADY *et al.*, 1998; HULLEY *et al.*, 1998; ROSSOUW *et al.*, 2002; ANDERSON *et al.*, 2004).

Além disso, o emprego da TRH a longo prazo é contraindicado, devido a sua relação com o surgimento de câncer de mama, ovário e endométrio. Diante disso, pesquisas relacionadas ao potencial dos fitoestrógenos em melhorar os transtornos sexuais femininos têm um papel relevante (WANNMACHER, 2004; ZHANG *et al.*, 2010).

A ipriflavona (7-isopropoxi-3-fenil-4H-benzopiran-4-ona), é um derivado sintético da daidzeína, uma isoflavona encontrada na forma de glicosídeo, ou seja, ligada a uma molécula de açúcar. A ipriflavona apresenta estrutura química similar ao estradiol e, portanto, liga-se aos receptores de estrógenos, desencadeando um efeito semelhante ao hormonal (FERNANDES, 2001). Dietas ricas em isoflavonas estão associadas a um menor risco de câncer de mama e de próstata e podem desempenhar um papel relevante na prevenção de outras doenças relacionadas ao hipoestrogenismo (ADLERCREUTZ, 1995).

Estudos recentes verificaram que a ipriflavona é capaz de promover a formação e o desenvolvimento dos ossos, além de ser um fármaco efetivo na prevenção e tratamento da síndrome da menopausa, comprovando o seu potencial terapêutico (ZHANG *et al.*, 2010).

Uma alternativa promissora para a administração da ipriflavona e da candesartana por via oral é o sistema autoemulsionável de liberação de fármacos (do inglês: Self-Emulsifying Drug Delivery System - SEDDS). A elevada estabilidade física desse sistema, quando

comparado às emulsões tradicionais que são sensíveis e metaestáveis, somada ao seu potencial em melhorar a biodisponibilidade de fármacos com propriedades altamente lipofílicas são fatores que justificam a sua aplicação na administração dos fármacos supracitados (GURSOY e BENITA, 2004).

Diante disso, torna-se relevante estudar o papel da candesartana e do fitoestrógeno ipriflavona, veiculados em SEDDS, assim como a possível interação entre os dois agentes na função sexual de ratas hipertensas SHR (do inglês: Spontaneously Hypertensive Rat) e de ratas normotensas WKY (do inglês: Wistar Kyoto) adultas jovens.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – Resposta sexual feminina: anatomia e fisiologia

O sistema reprodutor feminino é constituído pelos órgãos sexuais primários (ovários), responsáveis pela formação dos óvulos (gametas) e pela produção e secreção dos hormônios sexuais femininos (estrógenos). Os órgãos sexuais secundários (vagina, genitais externos, tubas uterinas, útero e glândulas mamárias) também constituem esse sistema e são estruturas essenciais para a fecundação, desenvolvimento embrionário e fetal e parto (VAN DE GRAAFF, 2003).

Em relação aos órgãos genitais externos (monte púbico, lábios maiores, lábios menores, estruturas eréteis e glândulas vestibulares), destacam-se a anatomia e fisiologia das estruturas eréteis (clitóris e bulbo do vestíbulo), homólogas às estruturas eréteis do sistema genital masculino (DANGELO, 2002; VAN DE GRAAFF, 2003).

O processo de síntese (Figura 1) e secreção dos hormônios sexuais femininos (estrógeno e progesterona) é controlado pelos hormônios hipofisários FSH (hormônio folículo estimulante) e LH (hormônio luteinizante) e a secreção destes pela hipófise depende do GnRH (hormônio liberador gonadotrófico) secretado pelo hipotálamo (LINDA, 1995; VAN DE GRAAFF, 2003).

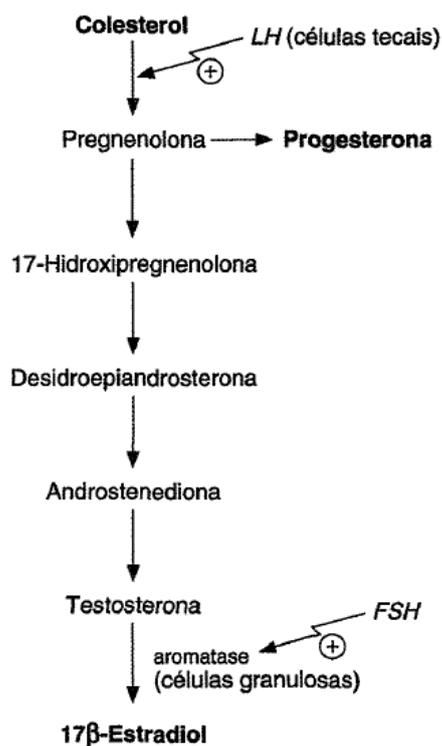


Figura 1 – Representação esquemática da síntese de estrógeno e progesterona (LINDA, 1995).

O estrógeno promove o espessamento da camada funcional do endométrio, sendo auxiliado pela progesterona, e possui importante papel no desenvolvimento e manutenção dos órgãos e caracteres sexuais secundários (distribuição da gordura das mamas e quadris, distribuição dos pelos, largura da pelve e outros). Um déficit de estrógeno resulta em acúmulo de colágeno intramural, espessamento da parede perivascular, atrofia e alterações no pH vaginal. Dependendo de sua concentração no organismo, afeta as células ao longo de todo o sistema nervoso periférico e central, influenciando a transmissão nervosa. (BERMAN, 2005; LINDA, 1995; VAN DE GRAAFF, 2003).

Além disso, o estrógeno possui efeitos vasodilatadores e vasoprotetores que, conseqüentemente, levam a um aumento do fluxo sanguíneo arterial vaginal, clitoriano e uretral, resultando na manutenção da resposta sexual feminina e impedindo o comprometimento das artérias e arteríolas pélvicas (BERMAN, 2005).

Os órgãos genitais femininos (internos e externos) recebem suprimento de sangue arterial por meio da artéria vaginal, do ramo vaginal da artéria uterina, da artéria pudenda interna e dos ramos vaginais da artéria retal média. Esses vasos formam uma rede de anastomose que está diretamente relacionada ao processo de vasocongestão pélvica (PARK *et al.*, 1997).

Durante o processo de excitação sexual, impulsos nervosos provocam a dilatação das artérias dirigidas ao clitóris e aos bulbos do vestíbulo que, simultaneamente ao aumento do fluxo sanguíneo, incham-se, expandindo e alongando a vagina para acomodar o pênis ereto. A vasocongestão também promove a lubrificação do canal vaginal por meio de secreções das glândulas uterinas e de um transudado com origem no leito vascular subepitelial, passivamente transportado através dos canais intercelulares. Ao mesmo tempo, as glândulas vestibulares são estimuladas e secretam um muco que lubrifica os tecidos da vagina, facilitando a penetração. (BERMAN, 2005; VAN DE GRAAFF, 2003).

Pelo menos três regiões supraespinhais foram identificadas como essenciais em vários aspectos do comportamento sexual feminino. São elas o núcleo ventromedial do hipotálamo (reflexo de lordose), a área medial pré-óptica (controle do reflexo de lordose e vasocongestão) e a matéria cinzenta periaquedutal do mesencéfalo (integra informações de várias regiões do cérebro) (MCCARTHY, 1994; PFAFF E SAKUMA, 1979). É fato que são necessários mais estudos que analisem a contribuição específica destes circuitos cerebrais e de seus neurotransmissores na regulação das respostas sexuais femininas (MARSON E MURPHY; 2006).

Diversos neurotransmissores e neuromoduladores estão envolvidos no processo de resposta sexual e, dentre eles, destaca-se o óxido nítrico (NO), uma pequena molécula gasosa

que se difunde facilmente através das membranas celulares, reagindo intracelularmente com alvos moleculares. Esse mediador fisiológico age principalmente no músculo liso vascular e exerce um importante papel no controle do fluxo sanguíneo e da permeabilidade capilar vaginal, desencadeando, portanto, processos que levam ao ingurgitamento clitoriano, relaxamento e lubrificação vaginal (BERMAN, 2005; HOYLE *et al.*, 1996; TRAISH *et al.*, 2004).

É fato que uma cascata de processos bioquímicos e fisiológicos (Figura 2) ocorre em consequência do estímulo sexual ou das variações hormonais. Quaisquer distúrbios ou alterações em uma das vias relacionadas ao processo de resposta sexual podem acarretar no comprometimento da mesma (TRAISH *et al.*, 2004).

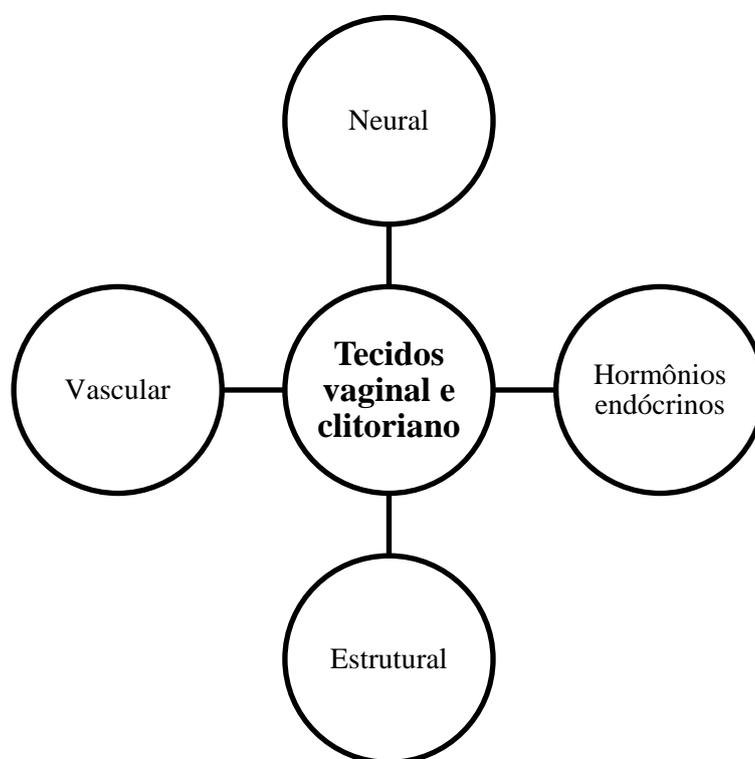


Figura 2: Fatores fisiológicos que influenciam a resposta sexual feminina (traduzido de MIN *et al.*, 2001)

2.2 – Disfunção sexual feminina

Estudos em relação às disfunções sexuais femininas (DSF) cresceram nos últimos anos, porém, ainda assim não houve avanços na abordagem utilizada para avaliar este problema (FERREIRA, 2007).

Grande parte dos casos de disfunção sexual (DS) estão relacionados a problemas psicológicos ou problemas de relacionamento. Mas, sabe-se que a DS também pode ser uma consequência de alterações orgânicas, fisiológicas ou resultado do uso de drogas, medicamentos ou exposição a toxinas (BRASIL, 2010).

A disfunção sexual é caracterizada, de modo geral, por falta, excesso, desconforto e/ou dor na expressão e no desenvolvimento do ciclo de resposta sexual (desejo, excitação, orgasmo e resolução), podendo afetar uma ou mais das fases deste (BASSON, 2000; ABDO, 2006).

Os esquemas apresentados nas figuras 3 e 4 representam a complexidade e os diversos mecanismos e distúrbios envolvidos no processo de disfunção sexual feminina. Ressalta-se que os sintomas dentro de cada categoria podem interferir em outras. O esquema da figura 4 foca, exclusivamente, nas respostas de excitação vaginal.

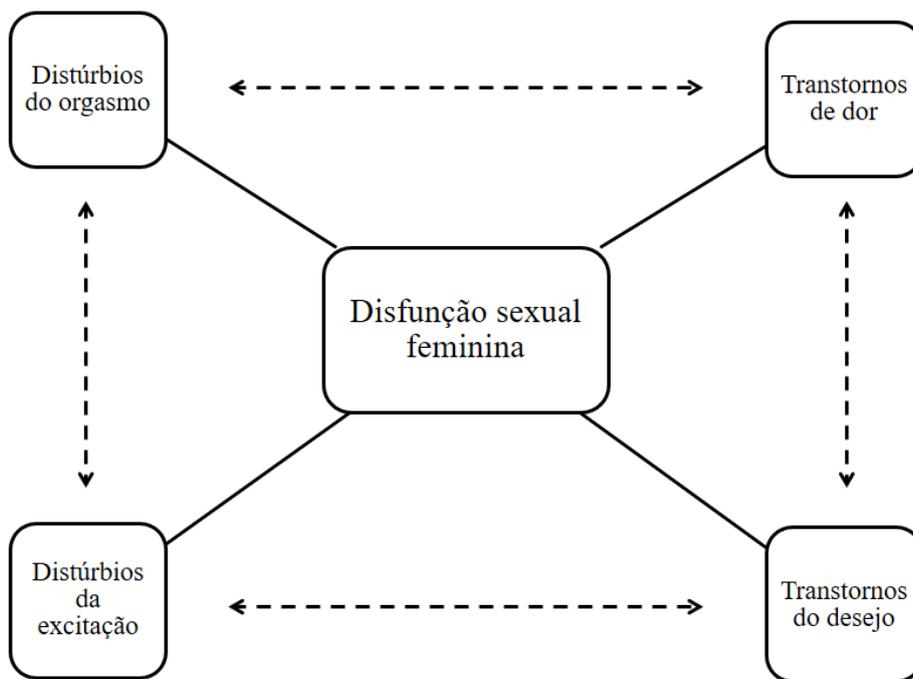


Figura 3 – Distúrbios envolvidos na disfunção sexual feminina (traduzido e adaptado de Traish et al., 2004)

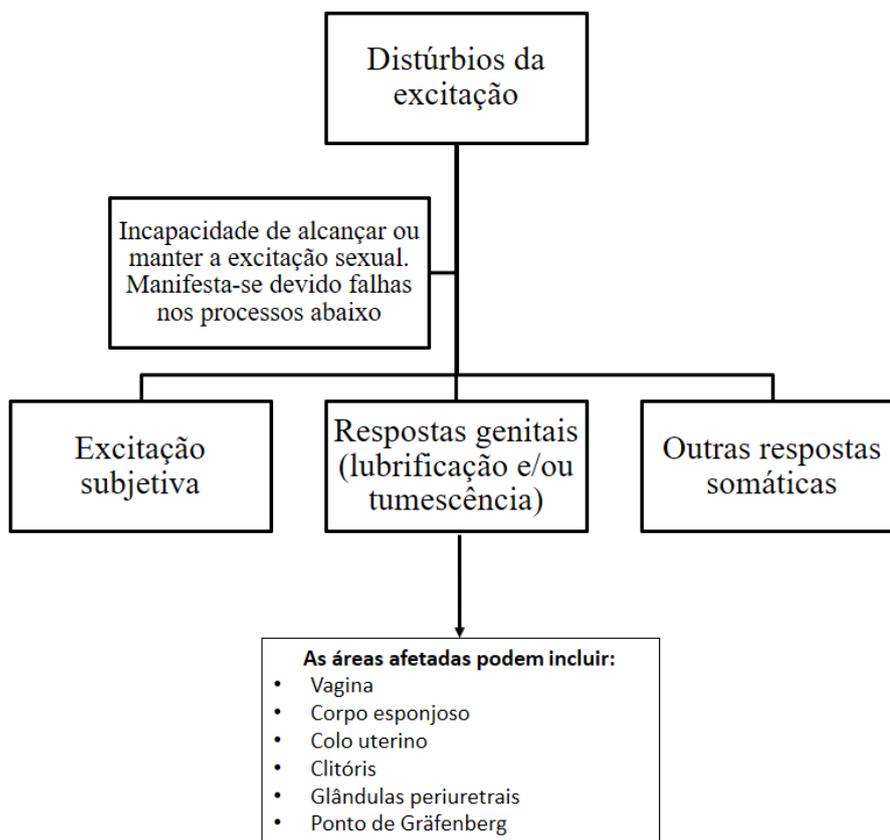


Figura 4 – Distúrbios da excitação e as principais áreas afetadas em relação às respostas genitais (traduzido e adaptado de Traish et al., 2004)

De acordo com a classificação das disfunções sexuais, realizada pela Associação Psiquiátrica Americana, em 2002, os transtornos sexuais podem ser resultado de fatores psicológicos/emocionais e/ou fisiológicos. Qualquer perturbação no equilíbrio hormonal feminino (menopausa, intervenções cirúrgicas, utilização de medicamentos, desordens endócrinas e alguns tipos de doenças) e/ou alterações orgânicas podem resultar em um dos transtornos listados abaixo (BERMAN, 2005; ABDO, 2006):

- Transtornos do desejo sexual;
- Transtornos da excitação sexual;
- Transtornos do orgasmo;
- Transtornos sexuais dolorosos;
- Disfunção sexual devido a uma condição médica geral;
- Disfunção sexual induzida por substância.

Tozo e colaboradores (2007) mostraram que há uma alta prevalência de DS (20% a 40%) em mulheres com idade entre 18 a 59 anos. Nos EUA, Reino Unido e Suécia, dos cerca de 40% das mulheres que apresentaram queixas sexuais significativas, 33% envolveram problemas de desejo sexual, 24% relataram anorgasmia, 19% relataram dificuldade de

excitação/lubrificação, 15% queixaram-se de dispareunia (dor durante o ato sexual) e 9% referiram-se a outras queixas. Tais transtornos mostram-se mais prevalentes e intensos nas mulheres do que nos homens.

Estudos apontam que o envelhecimento, a hipertensão, o tabagismo, a hipercolesterolemia e as cirurgias pélvicas, fatores de risco associados à disfunção erétil em homens, também têm relação com a disfunção sexual feminina (BERMAN, 2006).

2.3 – Disfunção sexual, hipertensão arterial e anti-hipertensivos

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é conceituada como uma condição clínica multifatorial em que o paciente apresenta níveis elevados e sustentados de pressão arterial (PA \geq 140/90 mmHg). Essa doença possui elevada prevalência, sendo um dos principais fatores de risco para inúmeros problemas cardiovasculares, insuficiência renal e acidente vascular cerebral (MALACHIAS, 2016).

A hipertensão arterial apresenta prevalência semelhante em ambos os gêneros, principalmente a partir da quinta década de vida, provocando um remodelamento nos vasos sanguíneos de todo o organismo. É fato que os vasos responsáveis pela irrigação sanguínea dos órgãos genitais não poderiam ser uma exceção (MANOLIS E DOUMAS, 2012; MALACHIAS, 2016).

Estudos que avaliaram a relação da HAS com a DS apontam que o número de mulheres apresentando algum tipo de DS (dispareunia, lubrificação inadequada ou anorgasmia) foi maior nas hipertensas em comparação àquelas não hipertensas ou recém-diagnosticadas. Ainda assim, muitos trabalhos sobre o tratamento da hipertensão arterial e outras doenças crônicas negligenciam as mulheres e sua história sexual (OKEAHIALAM, 2006; SILVA, 2013; MANOLIS E DOUMAS, 2012).

O remodelamento vascular, causado pela elevação da pressão arterial, pode estar associado à diminuição da síntese e ação do óxido nítrico (NO). Considerando-se que a perda de bioatividade desse neuromodulador ocorre por lesão tecidual, secundária à disfunção endotelial, ou ainda devido a fatores genéticos, tem-se um ambiente anti-apoptótico, proliferativo e com maior propensão ao remodelamento vascular anormal (CHAO *et al.*, 2004; YU *et al.*, 2012).

A idade e a hipertensão podem produzir alterações no relaxamento induzido pelo NO endotelial. Estudos que observaram a distribuição celular da enzima produtora de óxido nítrico (NOS) na genitália de ratas sugerem que o NO pode modular a oferta de sangue tanto

para a mucosa quanto para a musculatura lisa vaginal (HOYLE *et al.*, 1996; SHIRASAKI *et al.*, 1988; CHOU *et al.*, 1998).

Além disso, pacientes hipertensas relataram anormalidades fisiológicas e estruturais nos órgãos genitais. Considerando-se que o relaxamento vascular adequado é necessário para a ocorrência da lubrificação vaginal e do ingurgitamento clitoriano, alterações morfológicas do endotélio vascular podem ser fatores importantes na gênese da disfunção sexual feminina, em mulheres com elevada pressão arterial (KOCHAR *et al.*, 1999; DUNCAN *et al.*, 2001).

Dos fármacos disponíveis para o controle da HAS, sabe-se que algumas classes farmacológicas também são apontadas como responsáveis pela ocorrência ou intensificação da disfunção sexual, principalmente em pacientes do sexo masculino (OKEAHIALAM, 2006). Pesquisas apontam que a utilização dos β -bloqueadores não cardiosseletivos, dos diuréticos e dos simpaticolíticos de ação central está relacionada ao aumento de disfunção sexual em homens e mulheres (BATISTA, 2001; MANOLIS E DOUMAS, 2012).

Já em relação às classes farmacológicas dos bloqueadores de canais de cálcio, dos inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) e dos bloqueadores de receptores de angiotensina II (ARA), não foram observados sinais de disfunção sexual durante e após a utilização de qualquer um destes. A candesartana, um ARA, seletivo para receptores do tipo AT₁, com forte ligação e lenta dissociação, além de apresentar elevado potencial terapêutico na diminuição e no controle da hipertensão, com efeitos adversos pouco pronunciados, também apresenta bons resultados em relação à resposta sexual, em estudos realizados em animais machos e hipertensos (BATISTA, 2001; NEVES, 2011; BANDYOPADHYAY, 2013).

A candesartana é o fármaco da classe dos ARA que apresenta a maior afinidade e capacidade de inibição prolongada do sistema renina angiotensina aldosterona. Sua metabolização ocorre durante o processo de absorção no tubo digestivo, pela isoenzima citocromo P450 (CYP) 2C9, com excreção ocorrendo de forma majoritária pelo sistema hepático (MEREDITH, 2010; BANDYOPADHYAY, 2013; MORAES, 2013).

Atualmente, a candesartana é comercializada em comprimidos contendo 8 ou 16 mg de candesartana cilexetila (medicamento de referência: Atacand®-AstraZeneca) com indicação para insuficiência cardíaca e hipertensão arterial leve, moderada ou grave (Figura 4). A posologia indicada é de 1 comprimido por dia.

A candesartana cilexetila é um pró-fármaco não peptídico de ação prolongada, altamente lipofílico ($\log P = 6,1$) com baixa solubilidade aquosa de $5 \times 10^{-5} \text{ g.L}^{-1}$, classificado como classe II pelo sistema de classificação biofarmacêutica, ou seja, apresenta baixa solubilidade e alta permeabilidade (BANDYOPADHYAY, 2013). Devido à baixa

solubilidade e ao metabolismo hepático de primeira passagem, a candesartana apresenta baixa biodisponibilidade oral (DUDHIPALA, 2017).

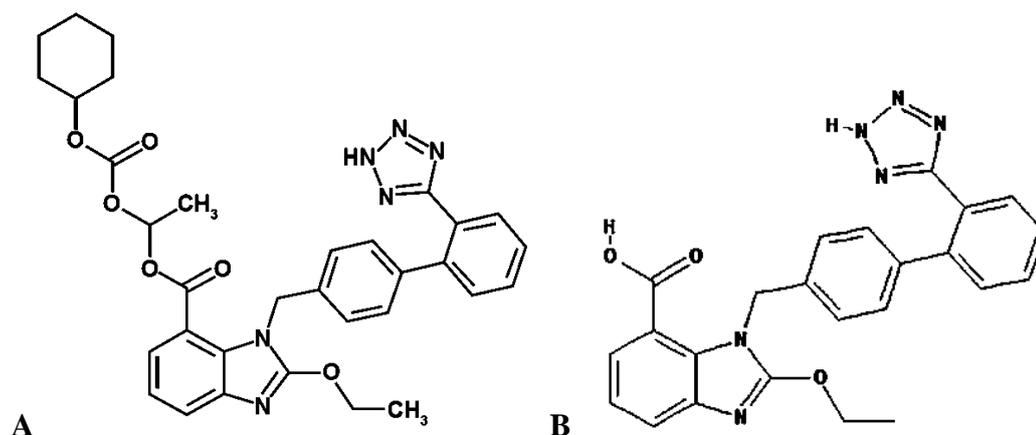


Figura 5 – Estrutura química da (A) candesartana cilexetila (pró-fármaco utilizado neste estudo) e da (B) candesartana

É importante ressaltar que estudos desenvolvidos com a irbesartana, cujo mecanismo de ação é o mesmo da candesartana, apresentaram resultados positivos em relação à melhoria da função sexual (desejo, excitação e orgasmos) em mulheres hipertensas, possivelmente como resultado do seu efeito superior na redução do estresse oxidativo (MA *et al*, 2012).

2.4 – Tratamento da disfunção sexual feminina e o potencial dos fitoestrógenos

Mulheres que apresentam baixos níveis de estrogênio e/ou testosterona, normalmente, desenvolvem sintomas de diminuição da libido, diminuição da sensibilidade, secura vaginal, dispareunia, e diminuição da excitação. Atualmente, o tratamento indicado e disponível no mercado para a melhoria da função sexual feminina, em alguns casos, é a terapia de reposição hormonal (TRH), realizada com estrógenos e progestógenos (BERMAN, 2005).

A TRH é recomendada para o controle de manifestações vasomotoras e urogenitais como consequência da diminuição de produção de esteróides ovarianos, principalmente em mulheres menopausadas (WANNMACHER, 2004).

A reposição estrogênica aumenta de forma significativa a expressão das isoformas da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS) no tecido vaginal e reduz a apoptose e a atrofia vaginal (GOLDSTEIN, 1998). Confirmando esta hipótese, um estudo realizado por Rosenfeld *et al.* (2003) demonstrou que ratas ovariectomizadas tratadas com 17-beta-estradiol exibiram um aumento na expressão de RNAm e proteína para nNOS na musculatura lisa vascular das artérias uterinas.

A aplicação da TRH para o tratamento da disfunção sexual tornou-se uma técnica efetiva, uma vez que diminui o trofismo e melhora a lubrificação vaginal. No entanto, evidências recentes sugerem que a TRH está associada a um aumento no risco da incidência de eventos isquêmicos cardiovasculares, bem como de tromboembolismo venoso. (GRADY *et al.*, 1998; HULLEY *et al.*, 1998; ROSSOUW *et al.*, 2002; ANDERSON *et al.*, 2004).

Além disso, o emprego da TRH a longo prazo é contraindicado, devido à sua relação com o desenvolvimento de câncer de mama, ovário e endométrio. Diante disso, pesquisas relacionadas ao potencial de novas substâncias capazes de promover a melhora da função sexual de mulheres têm um papel relevante na busca por novas terapias para a disfunção sexual (WANNMACHER, 2004; ZHANG *et al.*, 2010).

A ipriflavona (7-isopropoxi-3-fenil-4H-benzopirano-4-ona), um derivado sintético da daidzeína (fitoestrógeno), uma isoflavona encontrada na forma de glicosídeo (ligada a uma molécula de açúcar), apresenta estrutura química similar ao estradiol (Figura 5) e, dessa forma, liga-se aos receptores de estrógenos, simulando um efeito semelhante ao hormonal (FERNANDES, 2001).

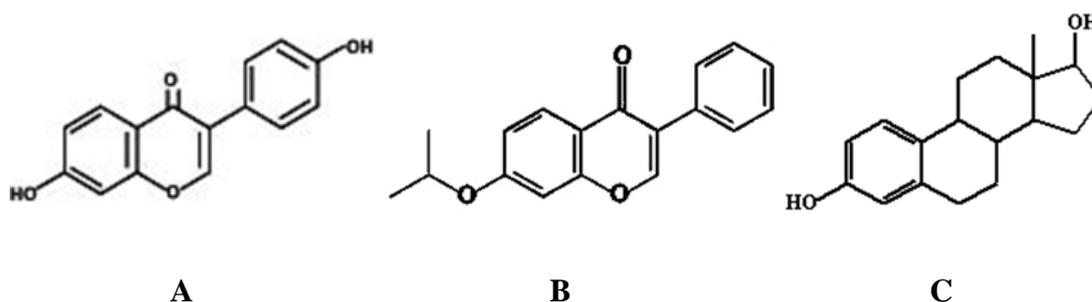


Figura 6: Comparação estrutural da molécula da Daidzeína (A) fitoestrógeno de ocorrência natural, da ipriflavona (B) isoflavona semissintética e do 17β-estradiol (C).

Ao interagir com os receptores estrogênicos, ainda que com baixa afinidade, as isoflavonas são capazes de desencadear mecanismos que possuem efeitos antioxidantes, propriedades de inibição enzimática e podem levar à indução da transcrição genética (VINCENT E FITZPATRICK, 2000).

Sabe-se que existem dois tipos de receptores estrogênicos (alfa e beta) cuja distribuição e concentração variam entre os tecidos alvos. O SNC, as mamas, o endométrio e o fígado possuem maior expressão dos receptores alfa, enquanto os receptores beta apresenta-se de forma predominante no SNC, ossos, parede vascular e trato urogenital. A afinidade de ligação da isoflavona varia em função do tipo do receptor estrogênico, sendo muito mais marcante nos receptores do tipo beta (GREENWOOD, 2000; EWIES, 2002).

Dietas ricas em isoflavonas estão relacionadas a um menor risco de câncer de mama e de próstata, podendo desempenhar um papel relevante na prevenção de outras doenças relacionadas com o hipoestrogenismo, tais como a osteoporose e as doenças cardiovasculares (ADLERCREUTZ, 1995).

Estudos realizados recentemente verificaram que a ipriflavona é capaz de promover a formação e o desenvolvimento dos ossos, além de ser um fármaco efetivo para a prevenção e tratamento da síndrome da menopausa, comprovando o seu potencial terapêutico (ZHANG *et al.*, 2010).

A extensão da biodisponibilidade oral absoluta da ipriflavona é de aproximadamente 24% e a fração não absorvida no trato gastrointestinal de ratos foi de aproximadamente 12% da dose administrada (KIM E LEE, 2002). A baixa biodisponibilidade ocorreu, principalmente, devido ao efeito de primeira passagem. A excreção da ipriflavona ocorre principalmente pela urina, mas também por via biliar e fecal, atingindo nível sérico máximo em ratos com 1,5h apresentando meia-vida de 5,8h (YOSHIDA *et al.*, 1985; MONOSTORY *et al.*, 1998).

Moon *et al.* (2007) demonstraram que as isoenzimas hepáticas CYP3A4 e CYP1A2 são as principais responsáveis pela formação dos metabólitos da ipriflavona e que a CYP2C9 é responsável por sua oxidação.

A ipriflavona é atualmente comercializada no Brasil (Rebone®-Aché e Osteoplus®-Farmalab) em cápsulas gelatinosas contendo 300 mg, com posologia de uma cápsula de 12 em 12 horas para o tratamento da osteoporose. Além disso, as isoflavonas daidzeína e genisteína são utilizadas na fitomedicina, com indicação para o controle dos principais sintomas da menopausa, como por exemplo, a fadiga, a sudorese noturna, a dispareunia e as ondas de calor (fogachos). O medicamento fitoterápico Soyfemme® (Aché) é indicado nestes casos e contém 60 mg das isoflavonas da soja, com posologia de uma cápsula ao dia.

2.5 – Sistemas autoemulsionáveis para liberação de fármacos (SEDDS)

Os sistemas autoemulsionáveis para liberação de fármacos (SEDDS, do inglês “self-emulsifying drug delivery systems”) têm se mostrado como uma ferramenta interessante na solução de questões como baixa biodisponibilidade de substâncias que são pouco solúveis. Fármacos hidrofóbicos, por exemplo, podem ser dissolvidos nestes sistemas, permitindo uma administração dos mesmos com dosagem unitária, por via oral (KOHLI *et al.*, 2010).

Ao entrar em contato com o conteúdo luminal do trato gastrointestinal, este sistema dispersa-se para formar uma emulsão (micrométrica / nanométrica) com o auxílio do próprio

fluido gastrointestinal. Isto leva à dispersão do fármaco em micelas mistas, que pode ser subsequentemente absorvido pelas vias linfática, contornando o efeito de primeira passagem hepática (KOHLI *et al.*, 2010).

Basicamente, os SEDDS são soluções isotrópicas e termodinamicamente estáveis constituídas por óleo, tensoativos, co-tensoativos, e misturas de fármacos que formam, espontaneamente, microemulsões de óleo em água, quando misturados com água sob agitação suave (motilidade gastro-intestinal) (SHAH *et al.*, 1994).

Dessa forma, uma alternativa promissora para a administração da ipriflavona e da candesartana, que apresentam propriedades altamente lipofílicas, por via oral é o sistema autoemulsionável, devido à sua elevada estabilidade física quando comparada com as emulsões tradicionais que são sensíveis e metaestáveis (GURSOY e BENITA, 2004).

Um estudo de liberação *in vitro* demonstrou que o sistema autoemulsionável (SEDDS) otimizou a liberação da ipriflavona em meios aquosos. A ipriflavona foi liberada a partir do sistema autoemulsionável quatro vezes mais rápido em relação à ipriflavona livre, nos primeiros 10 min, e após 24 horas houve liberação de 85% da ipriflavona presente no sistema autoemulsionável. Já a ipriflavona livre apresentou liberação de apenas 59% (LEÃO, 2009).

Portanto, o sistema autoemulsioável foi capaz de aumentar a velocidade de dissolução do fármaco aproximadamente 3 vezes. A principal consequência do aumento da dissolução da ipriflavona é o aumento de sua biodisponibilidade, já que foi possível contornar o fator limitante da absorção do fármaco (AMIDON *et al.*, 1995; LEÃO, 2009).

Estudo envolvendo a incorporação da candesartana cilexetila em um sistema autoemulsionável sólido (SMEDDS) demonstrou que a veiculação do fármaco por meio desse sistema foi capaz de melhorar a solubilidade, a dissolução e, concomitantemente, a biodisponibilidade do mesmo após testes *in vitro* (NEKKANTI *et al.*, 2010).

Além disso, GAO *et al.* (2011) observaram que a concentração plasmática de candesartana foi aumentada 27 vezes após a veiculação da mesma em um sistema nanoemulsionado, em comparação com a suspensão de candesartana cilexetila livre.

2.6 – Modelo animal: ratas espontaneamente hipertensas (SHR) e normotensas (WKY)

Um bom modelo animal é imprescindível para o estudo dos efeitos do regime anti-hipertensivo com candesartana, da utilização do fitoestrógeno ipriflavona e da combinação destes agentes sobre a função sexual em mulheres hipertensas.

Dessa forma, ratas espontaneamente hipertensas (Spontaneously Hypertensive Rats – SHR), que desenvolvem a hipertensão arterial com 5 semanas de vida, apresentando um nível

de pressão considerado como hipertensão espontânea entre a 7ª e a 15ª semana, atingindo um platô entre a 20ª e 28ª semana, compõem o modelo animal de escolha para este estudo (OKAMOTO E AOKI, 1963; FAZAN *et al*, 2001).

A hipertensão do SHR adulto está relacionada a um aumento da resistência periférica total e um débito cardíaco normal ou diminuído. Além disso, faz-se necessário um estudo paralelo em animais normotensos, com a finalidade de comparar os efeitos da candesartana e da ipriflavona, principalmente, na função sexual das fêmeas. Sendo assim, também foram utilizadas ratas da linhagem Wistar Kyoto (WKY) como ratas controle normotensas (FAZAN *et al*, 2001; FORTEPIANI *et al*, 2003).

A maior parte do conhecimento sobre a função reprodutiva de mamíferos que ovulam espontaneamente é resultado de estudos realizados em ratas. A rata é um animal não sazonal que constitui um bom modelo experimental por também apresentar ovulação espontânea e perfil de variações hormonais muito semelhantes ao da mulher (FORTEPIANI *et al*, 2003).

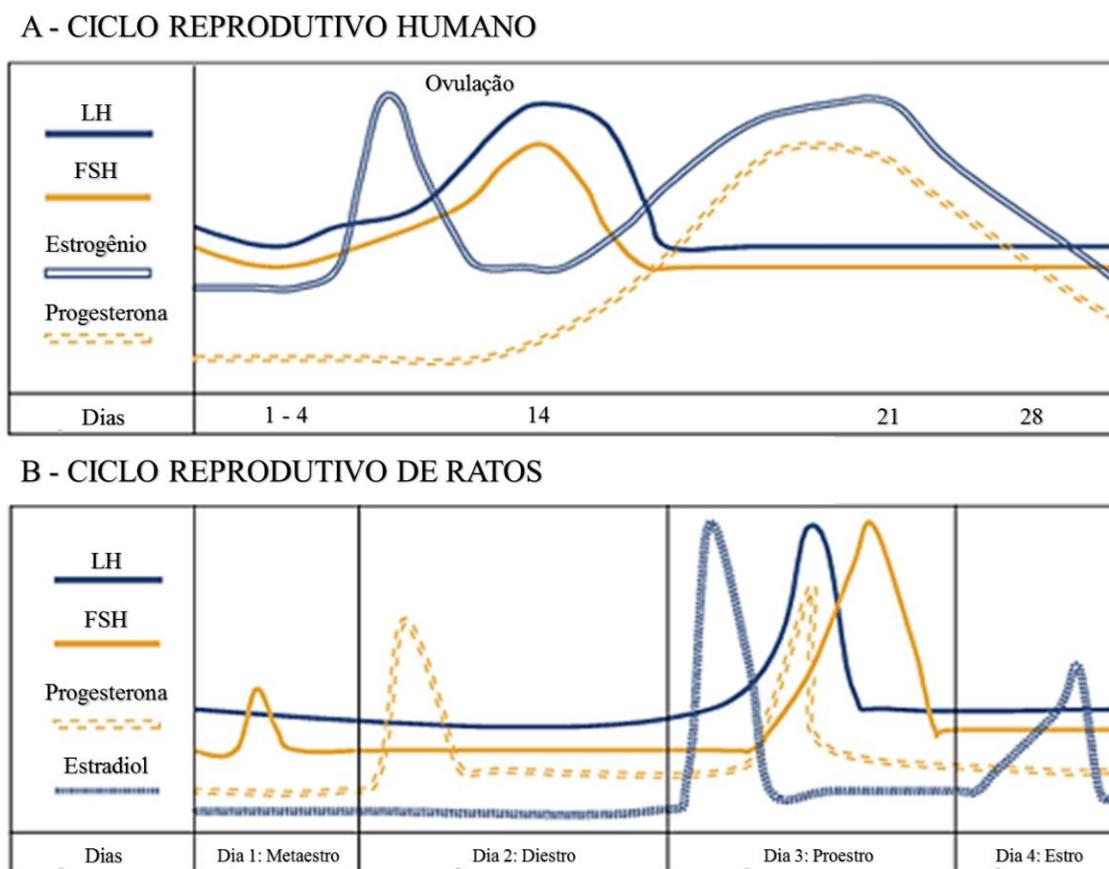


Figura 7: Representação do ciclo reprodutivo da mulher (A) e da rata (B) e suas respectivas variações hormonais (Fonte: traduzido de EMANUELE, 2002).

Ressalta-se que a vagina de mulheres e ratas apresentam semelhanças histológicas e compartilham a mesma estrutura celular básica, incluindo um epitélio escamoso estratificado

e uma lâmina própria ricamente vascularizada rodeada por uma bicamada de músculo liso (MIN *et al*, 2001).

3. OBJETIVOS

3.1 - Objetivo Geral

Avaliar e comparar os possíveis efeitos do tratamento com ipriflavona, com o anti-hipertensivo candesartana e a combinação dos mesmos, veiculados em um sistema autoemulsionável de liberação de fármacos (SEDDS), na função sexual de ratas hipertensas SHR e de ratas normotensas WKY adultas, com idade entre 5 e 7 meses.

3.2 - Objetivos Específicos

- ✓ Comparar as diferenças nas respostas vasocongestivas e de excitação sexual (temperatura, lubrificação e pressão intravaginal) entre ratas WKY e SHR adultas.
- ✓ Avaliar o efeito do tratamento crônico (30 dias) com ipriflavona, candesartana, combinação desses fármacos, todos veiculados em SEDDS e respectivo veículo (controle) em ratas SHR e WKY sobre:
 - O ciclo estral;
 - A pressão arterial;
 - As respostas vasocongestivas em ratas conscientes;
 - As respostas de excitação sexual em ratas anestesiadas;
 - O perfil lipídico;
 - A função hepática;
 - Os parâmetros hematológicos;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Delineamento experimental

Ratas hipertensas SHR e ratas normotensas WKY adultas (com idade entre 5 e 7 meses) foram tratadas por 30 dias com ipriflavona (30 mg/kg/dia) veiculada em SEDDS, com candesartana (2 mg/kg/dia para a linhagem WKY e 5 mg/kg/dia para a linhagem SHR) veiculada em SEDDS, com a combinação destes fármacos ou apenas com o veículo (grupo controle). Foram realizados o monitoramento do ciclo estral, a medida da pressão arterial (por meio de pletismografia de cauda) e a análise das respostas vasocongestivas induzidas por apomorfina, antes, após 15 e 30 dias de tratamento. Ao final dos 30 dias, a pressão arterial direta (sistólica e diastólica) e a frequência cardíaca foram monitoradas (em ratas acordadas), após a canulação da artéria femoral dos animais. Foram avaliadas as alterações de temperatura, lubrificação e pressão intravaginal durante a estimulação do nervo pélvico (em ratas anestesiadas). Por fim, as ratas foram eutanasiadas por decapitação e o sangue das mesmas foi coletado para análise do perfil lipídico, dos parâmetros hematológicos e dos indicadores de função hepática TGO e TGP.

4.2 - Animais

Foram utilizadas ratas espontaneamente hipertensas (SHR) com idades entre 5 e 7 meses provenientes do Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto e ratas WKY com idade entre 5 e 7 meses provenientes do Biotério de Produção de Ratos - ICB/USP. As ratas foram mantidas em caixas de polipropileno (40 x 32 x 17 cm), em número de 5 animais por caixa, sendo fornecida alimentação e água à vontade. Durante a realização dos experimentos, os animais foram mantidos no Laboratório de Farmacologia Experimental. Todos os procedimentos experimentais foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFOP, protocolo 2015/42 (Anexo I).

4.3 - Monitoramento do ciclo estral das ratas

O ciclo estral de ratas tem duração média de 4 a 5 dias, sendo dividido em quatro fases: proestro, estro, metaestro (ou diestro I) e diestro (ou diestro II). As fases do ciclo estral

podem ser determinadas através do monitoramento dos tipos de células que aparecem no esfregaço vaginal (MARCONDES *et al.* 2002).

O proestro caracteriza-se pela predominância de células epiteliais estratificadas e nucleadas, o estro por células epiteliais estratificadas queratinizadas, e as fases de metaestro e diestro por células leucocitárias. Tais variações celulares presentes no esfregaço vaginal estão relacionadas às variações cíclicas do estradiol, durante o ciclo estral (MARCONDES *et al.* 2002).

O monitoramento do esfregaço vaginal foi realizado diariamente (antes e ao longo dos tratamentos) nas ratas SHR e WKY, por meio da análise de lavado vaginal a fresco em microscópio óptico (Olympus Japan BH-2) com objetivas de 10 e 40 vezes para verificar-se a ciclicidade das ratas e se os tratamentos foram capazes de alterar a morfologia das células do esfregaço vaginal.

4.4 - Medida da pressão arterial sistólica por meio de pletismografia de cauda

Um dos métodos utilizados para o monitoramento da pressão arterial foi o de pletismografia de cauda. As ratas SHR e WKY foram acondicionadas em tubos contentores de acrílico para limitar seus movimentos. Em seguida, envolveu-se a cauda do animal com um manguito (*tail-cuff*) acoplado a uma bomba insufladora de ar (Eletro-esfignomanômetro, Narco Bio-Systems) para promover o enchimento do manguito e consequente oclusão do fluxo sanguíneo na cauda, além de um sensor piezoelétrico para a detecção do pulso. A cauda da rata foi levemente aquecida por uma lâmpada, para promover a dilatação da artéria caudal e possibilitar a detecção do pulso pelo sensor. Tanto o manguito quanto o sensor foram acoplados a um sistema de aquisição de dados (DATAQ/Windaq, versão 2.63) para registro do pulso correspondente ao fluxo sanguíneo, bem como da pressão necessária (mmHg) para ocluir a artéria caudal.

A bomba insufladora foi acionada (após calibração do sistema, com pressão máxima de 200 mmHg) e conseqüentemente o manguito foi inflado, causando a oclusão do fluxo sanguíneo. A oclusão foi observada pela ausência de sinal detectado pelo sensor de pulso. Em seguida, o manguito foi desinflado, ocorrendo o retorno do fluxo sanguíneo.

Considerou-se que o primeiro sinal de pulso detectado e observado representou o momento em que a pressão do sistema tornou-se menor do que a pressão sanguínea na cauda da rata. Este valor de pressão da oclusão do manguito que permitirá o aparecimento do primeiro sinal de pulso foi considerado equivalente à pressão arterial sistólica (PAS).

4.5 - Monitoramento da pressão arterial direta

Após o último dia de tratamento, realizou-se a canulação da artéria femoral das ratas SHR e WKY. A cânula utilizada foi confeccionada com tubos de polietileno PE-10 (Clay Adams, Parsipanny, NJ, EUA) com comprimento de 3,5 a 5,0 cm, soldados em outro tubo de polietileno PE-50 (Clay Adams, Parsipanny, NJ, EUA) com comprimento de 10 a 15 cm. Previamente à canulação, as cânulas de polietileno foram preenchidas com solução salina 0,9% e em seguida uma das suas extremidades livres foi obstruída com um pino metálico. Após ser realizada a anestesia com solução de Ketamina e Xilazina 10:1 (0,1 mL/100 gramas de peso, via intraperitoneal), os animais foram submetidos a uma incisão na face ventral da pata traseira esquerda, onde a artéria femoral foi dissecada e exposta. A artéria foi cateterizada com PE-10 e as porções PE-50 foram transpassadas por sob a pele do dorso onde as extremidades destas cânulas foram exteriorizadas e fixadas por meio de fios de sutura. Após a cirurgia e antes que fossem instrumentados para realização dos registros, os animais foram acondicionados em gaiolas individuais mantidas na sala de experimentos sob condições de temperatura, luminosidade e níveis de ruído controlados durante 24 horas para recuperação. Durante este período continuaram recebendo água e ração *ad libitum*. A cânula posicionada na artéria foi utilizada para registro da pressão arterial pulsátil com derivações eletrônicas para registro da frequência cardíaca e da pressão arterial sistólica e diastólica em frequência de amostragem de 300 Hz.

4.6 - Desenvolvimento e caracterização do sistema autoemulsionável

4.6.1 – Preparo do SEDDS e incorporação dos fármacos

Os fármacos em estudo foram incorporados a um sistema autoemulsionável descrito por Leão e colaboradores (2009), contendo 60% de óleo de milho, 20% de capryol, 10% de lecitina de soja e 10% de álcool etílico.

Para preparar o sistema autoemulsionável o óleo de milho e a lecitina (Lipoid R LPC 20, Lipoid) foram misturados (solução I) em um recipiente de vidro à temperatura de 37°C. A dissolução da lecitina é lenta e foram necessárias 48 horas de agitação constante (1400 rpm). Em seguida, 70% do volume total de capryol foi adicionado à solução I sob agitação constante (1400 rpm) e, por fim, a solução I foi filtrada. Em paralelo, os fármacos foram solubilizados em uma mistura de álcool etílico com o volume restante do capryol (solução II)

à temperatura ambiente. Finalmente, as soluções I e II foram misturadas sob agitação de 1400 rpm também à temperatura ambiente.

Foram preparadas 4 formulações: a primeira contendo ipriflavona 30 mg/kg/dia, a segunda contendo candesartana (2 mg/kg/dia para WKY e 5 mg/kg/dia para SHR), na terceira formulação foram incorporados os dois fármacos nas mesmas concentrações anteriormente citadas e, por último, uma formulação contendo apenas os excipientes do SEDDS, que foi utilizada como controle para os tratamentos. As doses farmacológicas utilizadas para o preparo das formulações foram escolhidas com base nos dados da literatura e estudos prévios realizados em nosso laboratório (dados não publicados) (LEÃO, 2009).

4.6.2 – Caracterização do SEDDS: tamanho e índice de polidispersão

O tamanho médio das gotículas da autoemulsão e o índice de polidispersão foram determinados através de espectroscopia de correlação de fótons, utilizando-se o equipamento Malvern Zetasizer Nano®. Uma alíquota de 100 µL foi retirada de cada uma das formulações preparadas e a este volume foram adicionados 10 mL de água ultrafiltrada à 37°C para, deste modo, obter-se o sistema emulsionado. Em seguida, foi retirada uma nova alíquota de 50 µL (apenas SEDDS - veículo) e 35 µL (SEDDS com o fármaco) do sistema emulsionado e adicionou-se 5 mL de água ultrafiltrada. Por fim, utilizou-se uma cubeta de quartzo preenchida com as soluções. Esta cubeta foi posicionada no aparelho para determinação do tamanho médio dos glóbulos e o índice de polidispersão em um ângulo de 90°, à 37°C.

4.7 - Tratamento via oral por meio de gavagem

Para a realização da gavagem, o animal foi manuseado na posição vertical, estendendo-se a cabeça e o pescoço do mesmo de modo que o focinho, a cabeça e a boca do animal ficassem alinhados e o esôfago reto. Foi utilizada uma agulha para gavagem de tamanho adequado, de acordo com o tamanho do animal, e uma quantidade reduzida do volume de SEDDS (500 µL para cada 100 g de massa corpórea do animal) para evitar um grande enchimento estomacal.

4.7.1 - Tratamento com ipriflavona veiculada em SEDDS (gavagem)

A dose utilizada foi a de 30 mg/kg/dia de ipriflavona, definida a partir de resultados obtidos em outro estudo do nosso grupo de pesquisa, o qual avaliou a função sexual em ratas

com menopausa induzida pela ovariectomia e ratas senescentes. A ipriflavona veiculada em SEDDS foi administrada por via oral (gavagem) em dose única diária, durante 30 dias. Os grupos controle receberam apenas os excipientes (veículo) do SEDDS.

Estudo recente de nosso laboratório demonstrou que a liberação de ipriflavona pelo sistema autoemulsionável é quatro vezes mais rápida em relação à ipriflavona livre (LEÃO, 2009).

4.7.2 - Tratamento com a candesartana veiculada em SEDDS (gavagem)

Inicialmente, utilizou-se a dose de 5 mg/kg/dia de candesartana cilexetila (Pharma Nostra) incorporada ao sistema autoemulsionável de entrega de fármacos. Todos os animais da linhagem SHR foram tratados com candesartana na dose de 5 mg/kg/dia, porém, a linhagem WKY tratada com a dose de 5 mg/kg/dia apresentou complicações cardiorrespiratórias e redução considerável da pressão arterial com consequente morte. Diante disso, os animais da linhagem WKY foram então tratados com candesartana cilexetila na dose de 2 mg/kg/dia. A candesartana veiculada em SEDDS foi administrada por via oral (gavagem) em dose única diária, durante 30 dias.

4.7.3 - Tratamento com candesartana e ipriflavona veiculadas em SEDDS (gavagem)

A ipriflavona e a candesartana foram administradas simultaneamente, veiculadas no sistema autoemulsionável de liberação de fármacos, nas respectivas doses de 30 mg/kg/dia e 5 mg/kg/dia para a linhagem SHR e 30 mg/kg/dia e 2 mg/kg/dia para a linhagem WKY.

4.8 - Respostas vasocongestivas induzidas por apomorfina em ratas conscientes

A excitação sexual fisiológica envolvendo vasocongestão genital ocorre tanto nos machos quanto nas fêmeas. Essa resposta vascular ocorre devido ao relaxamento do músculo vascular, aumentando assim o fluxo de sangue para o pênis e genitália feminina.

Este comportamento pode ser estudado estimulando-se receptores dopaminérgicos centrais (D4) e periféricos (D2), utilizando-se agonistas dopaminérgicos como a apomorfina. A administração da apomorfina em doses baixas causa mudança distinta na morfologia da genitália externa da rata. Esta mudança é caracterizada pelo inchaço da genitália, que pode durar em média 3 segundos e, de forma análoga, ocorre a ereção peniana em ratos (BEHARRY, 2003; CHEN *et al.*, 1999; SENBEL, 2011; STIEF, 2003).

Para monitorar as respostas vasocongestivas induzidas por apomorfina, as ratas foram adaptadas em caixas de madeira com frente e fundo de vidro, durante 30 minutos por três dias. Após o período de adaptação, foi administrada solução diluída de apomorfina ($80 \mu\text{g}/1000 \mu\text{L}$ de salina 0,9% contendo ácido ascórbico 0,1% ou apenas salina 0,9% contendo ácido ascórbico - grupo controle para esse teste), no volume de 0,1 mL de solução diluída de apomorfina para cada 100 g de peso do animal, por via subcutânea.

Em seguida, os animais foram colocados nas caixas de vidro e o seu comportamento foi gravado por 30 minutos. Dessa forma, foi possível analisar o comportamento sexual contabilizando o número de descidas da cabeça para a área genital com posterior lambedura da genitália (BEHARRY, 2003).

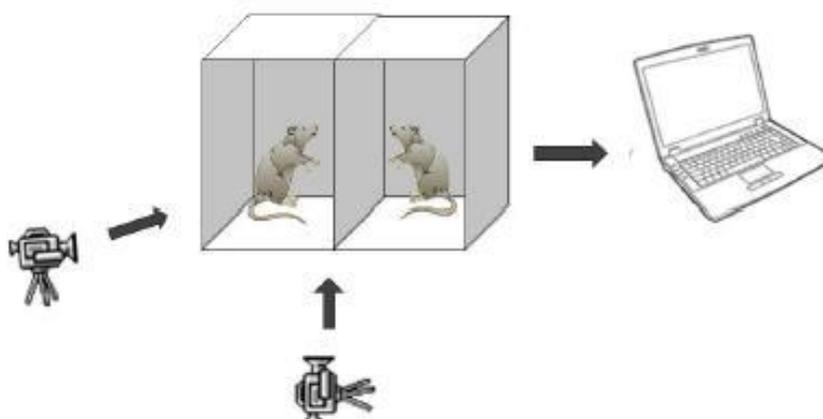


Figura 8: Representação esquemática do modelo usado para avaliação da excitação sexual em ratas conscientes induzida pela administração subcutânea de apomorfina - $80 \mu\text{g}/\text{kg}$ (adaptado de Eduardo Damasceno Costa, 2011).

4.9 - Estimulação do nervo pélvico

A estimulação do nervo pélvico foi realizada como já descrito previamente por Kim e cols., 2004. Após anestesia, uma incisão de 2 cm foi feita abaixo da linha média abdominal para a exposição do nervo pélvico. A bexiga foi descomprimida e sua exposição foi maximizada através de um afastador. Após a identificação da sínfise púbica, os tecidos adiposos que recobrem a parede vaginal lateral foram delicadamente deslocados para visualizar o aspecto lateral da vagina. O nervo pélvico origina-se dorsalmente ao gânglio pélvico e ascende ventralmente para impelir uma distribuição tipo leque de ramos paravaginais. Com a rata em decúbito dorsal, a orientação do nervo pélvico é perpendicular ao canal vaginal, aproximando-se da parede vaginal bilateralmente a partir do ligamento inguinal, sendo coplanar ao mesométrio. Um fio eletrodo bipolar de platina foi cuidadosamente posicionado no ponto onde o nervo pélvico prolonga seus ramos

paravaginais. Uma estimulação unilateral esquerda do nervo pélvico foi realizada com um estimulador Grass S9 (Grass Instruments, Quincy, Massachusetts), fixado em polaridade normal e modo de repetição para gerar um trem de 30 segundos de ondas quadradas com 6 V de amplitude de pulso e 0,8 milissegundos de duração a várias frequências (10, 20 e 30 Hz). O intervalo entre as estimulações foi de 5 minutos.

4.10 - Medida da temperatura da cavidade vaginal

Um sensor de temperatura de alta precisão em formato de haste, com 0,15 mm de diâmetro e 1,5 cm de comprimento de ponta ativa (modelo 451, Measurement Specialties) acoplado a um termômetro de precisão (Serie 4600, Measurement Specialties) foi inserido diretamente na parte distal do canal vaginal para a determinação da temperatura vaginal. As medidas instantâneas da temperatura basal e durante o procedimento de estimulação no nervo pélvico foram armazenadas no computador para posterior análise, utilizando o software Datalog SoftTemp. (Measurement Specialties). A variação de temperatura vaginal durante a estimulação do nervo pélvico foi considerada uma medida indireta do aumento do ingurgitamento (fluxo sanguíneo) vaginal.

4.11 - Determinação da lubrificação vaginal

A lubrificação vaginal é um dos indicadores da excitação genital e da integridade do tecido vaginal. Para a medida da lubrificação, utilizou-se uma haste flexível com ponta de algodão (cotonete) previamente pesada. O cotonete foi inserido na parte distal do canal vaginal e, 5 minutos após a estimulação do nervo pélvico o cotonete foi novamente pesado. Assumiu-se que a lubrificação vaginal tenha sido proporcional a quantidade de fluido absorvido pelo cotonete (Min e cols., 2003).

4.12 - Medida de pressão intravaginal

Para a obtenção da medida de pressão intravaginal, utilizou-se um aparato de medida de pressão que foi desenvolvido no próprio laboratório. O sistema consiste em um pequeno balão de látex firmemente amarrado a uma das extremidades de um tubo de polietileno em formato de Y, preenchido com solução salina 0,9%, enquanto a outra extremidade foi acoplada a uma seringa responsável pelo controle do volume/pressão de líquido dentro do

balão e a outra extremidade do sistema em Y foi conectada a um transdutor de pressão que por sua vez foi acoplado a um sistema de aquisição de dados.

No momento da medida, introduziu-se o pequeno balão no canal vaginal da rata, que foi ligeiramente insuflado com salina para gerar uma pressão basal intracanal (aproximadamente 20 mmHg). Com o eletrodo cuidadosamente posicionado no nervo pélvico, realizou-se a estimulação progressiva do nervo. Os dados de variação da pressão intavaginal adquiridos foram gravados com o auxílio do software Windaq e analisados posteriormente.

4.13 - Análise dos parâmetros hematológicos

O sangue foi coletado em tubos contendo anticoagulante e encaminhado para o Laboratório Piloto de Análises Clínicas (LAPAC) da Universidade Federal de Ouro Preto, onde foram realizados os ensaios hematológicos (hemograma).

4.14 - Avaliação do perfil lipídico e dos indicadores a função hepática (TGO/TGP)

As dosagens bioquímicas foram feitas após a coleta do soro dos animais em tubo sem anticoagulante. Foram avaliados o perfil lipídico (colesterol total, HDL, LDL e triglicerídeos) e os indicadores relacionados à função hepática: enzimas transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) e transaminase glutâmico-pirúvica (TGP).

As análises foram executadas pelo Laboratório Piloto de Análises Clínicas (LAPAC) da Universidade Federal de Ouro Preto. Todos os exames foram feitos no aparelho *Cobas Integra 400 plus*. Foi utilizado o soro de 5 ratas tratadas por grupo (5 ratas SHR e 5 ratas WKY adultas).

4.15 - Análise estatística

Os dados obtidos foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). As análises foram feitas pelo método de “análise de duas vias de variância” (two way ANOVA), seguido de pós-teste de *Bonferroni*, utilizando o programa GraphPad Prism versão 7.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA-EUA). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para valores de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 - Caracterização do SEDDS

5.1.1 - Tamanho dos glóbulos

O tamanho dos glóbulos formados após adição de água e emulsificação do SEDDS apresentou variações (figura 9). É possível observar elevação do tamanho dos glóbulos, variando de 217 a 434 nm, após a incorporação dos fármacos.

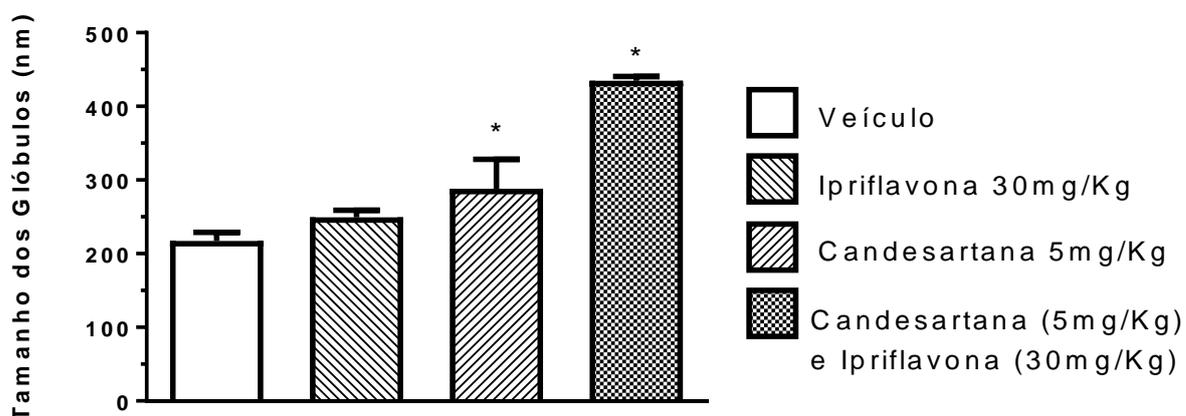


Figura 9: Mudanças no tamanho dos glóbulos após incorporação dos fármacos em estudo (n=3). Os valores representam $media \pm EPM$ – ANOVA seguido do pós-teste Bonferroni. $*(p<0.05)$ em relação ao veículo.

5.1.2 - Índice de polidispersão

O índice de polidispersão também foi avaliado para verificar a estabilidade do SEDDS após emulsificação (figura 10). De modo geral, as formulações apresentaram um índice de polidispersão médio entre 0,3 e 0,4.

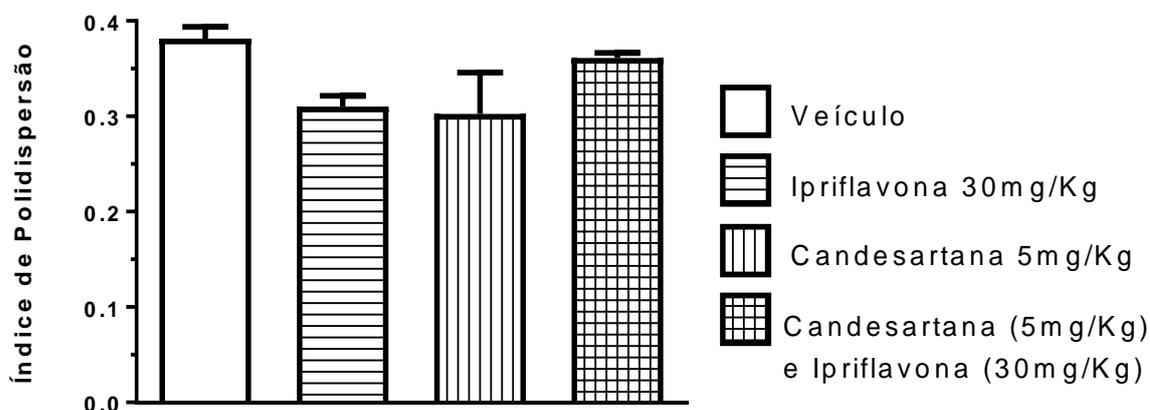


Figura 10: Índices de polidispersão das 4 formulações preparadas (n=3). Os valores representam $media \pm EPM$.

5.2 - Monitoramento do ciclo estral

O monitoramento do ciclo estral, além de ser utilizado como critério de exclusão amostral, visto que animais que não ciclam corretamente possivelmente apresentam algum distúrbio hormonal, também foi realizado com o objetivo de avaliar se os tratamentos causariam alguma alteração na ciclicidade das ratas.

As ratas (SHR e WKY) tratadas com veículo (SEDDES), ipriflavona (30 mg/kg), candesartana (5 mg/kg para SHR e 2 mg/kg para WKY) e ipriflavona com candesartana (30 mg/kg e 5 mg/kg para SHR – 30 mg/kg e 2 mg/kg para WKY) não apresentaram mudança epitelial em seus respectivos esfregaços (figura 11), ciclando de forma regular, conforme descrito na literatura (MARCONDES *et al.* 2002; VILELA *et al.*, 2012).

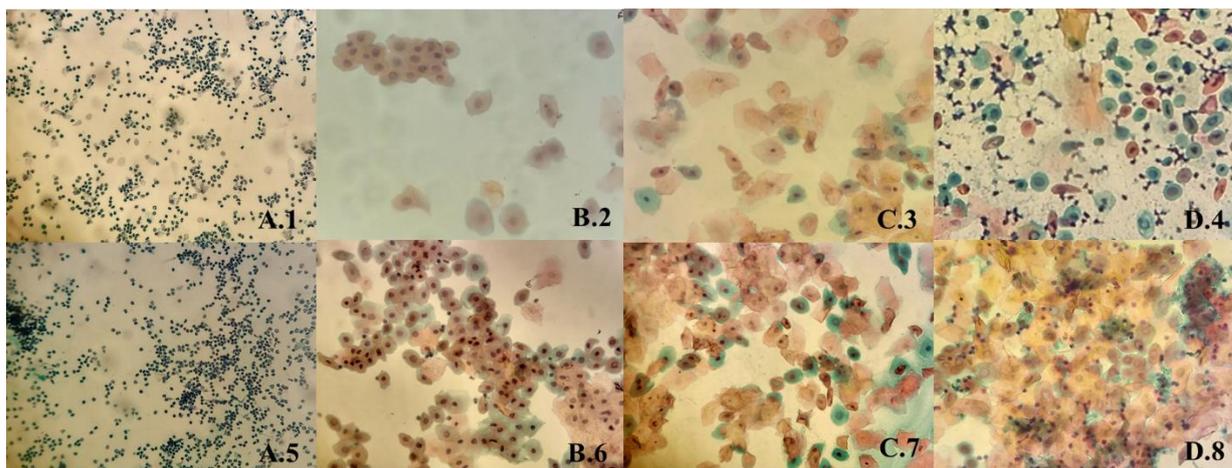


Figura 11: Fotomicrografias de lâminas coradas (papanicolau) de esfregaço vaginal de ratas SHR (1 a 4) e WKY (5 a 8). Fases: (A) diestro, (B) proestro, (C) estro, (D) metaestro (Fonte: dados do autor).

5.3 - Variação da massa corporal (g) ao longo dos tratamentos

Foram observadas variações na massa corporal das ratas SHR e WKY ao longo dos tratamentos (figura 12). As diferenças foram significativas apenas para os animais da linhagem WKY tratados com candesartana na dose 2 mg/kg (média início: 230,5 g; média 15 dias 202,83 g; média 30 dias: 207,66 g) e ipriflavona com candesartana nas doses 30 mg/kg e 2 mg/kg, respectivamente (média início: 230,4 g; média 15 dias 204,6 g; média 30 dias: 229,9 g).

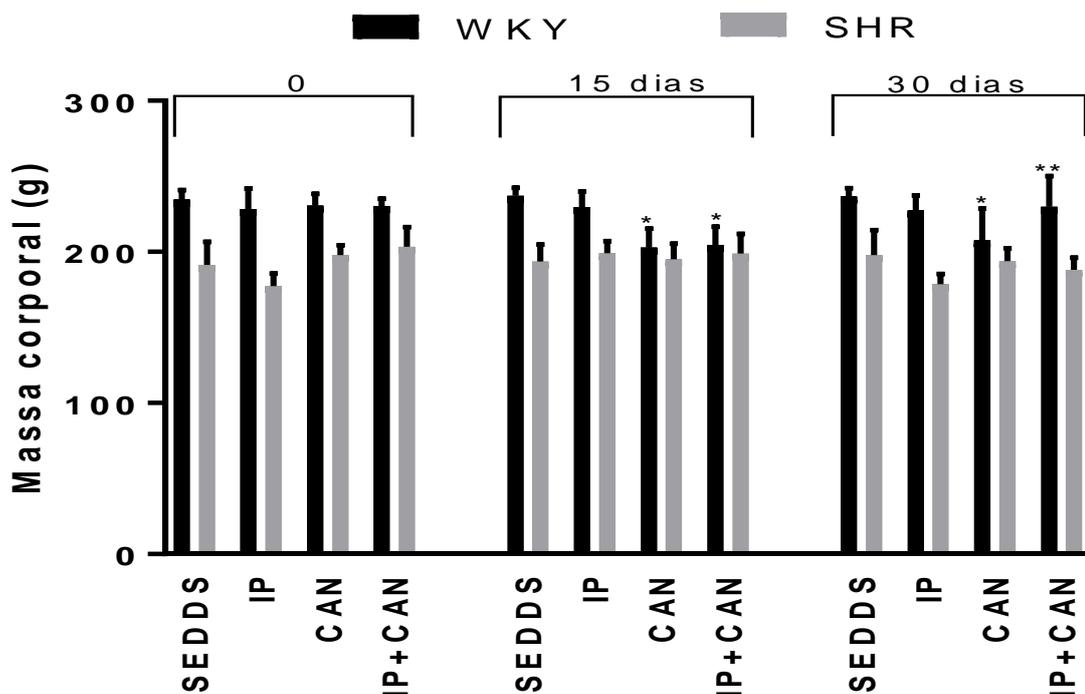


Figura 12: Variações da massa corporal de ratas SHR (5 a 7 meses; $n=10$) ao longo dos tratamentos com veículo (SEDDS), ipriflavona (30 mg/kg), candesartana (5 mg/kg) e ipriflavona com candesartana (30 mg/kg e 5 mg/kg, respectivamente) e de ratas WKY (5 a 7 meses; $n=6$) ao longo dos tratamentos com veículo (SEDDS), ipriflavona (30 mg/kg), candesartana (2 mg/kg) e ipriflavona com candesartana (30 mg/kg e 2 mg/kg, respectivamente). Os valores representam a média \pm EPM. *($p<0.05$) em relação ao respectivo grupo no início e **($p<0.05$) em relação ao respectivo grupo após 15 dias.

5.4 - Monitoramento da pressão arterial

5.4.1 - Medida indireta por meio de pletismografia de cauda

A pressão sistólica média (figura 13) das ratas SHR e WKY, determinada por meio de pletismografia de cauda, não apresentou variação significativa durante e após os tratamentos tanto para os grupos controle (veículo - SEDDS) quanto para os grupos tratados com 30 mg/kg de ipriflavona em SEDDS. Houve diferença significativa em relação à pressão sistólica dos animais SHR que receberam candesartana (5 mg/kg/dia) e ipriflavona associada à candesartana (30 mg/kg/dia e 5 mg/kg/dia, respectivamente). Também houve redução significativa da pressão arterial sistólica de ratas WKY tratadas com candesartana (2 mg/kg/dia).

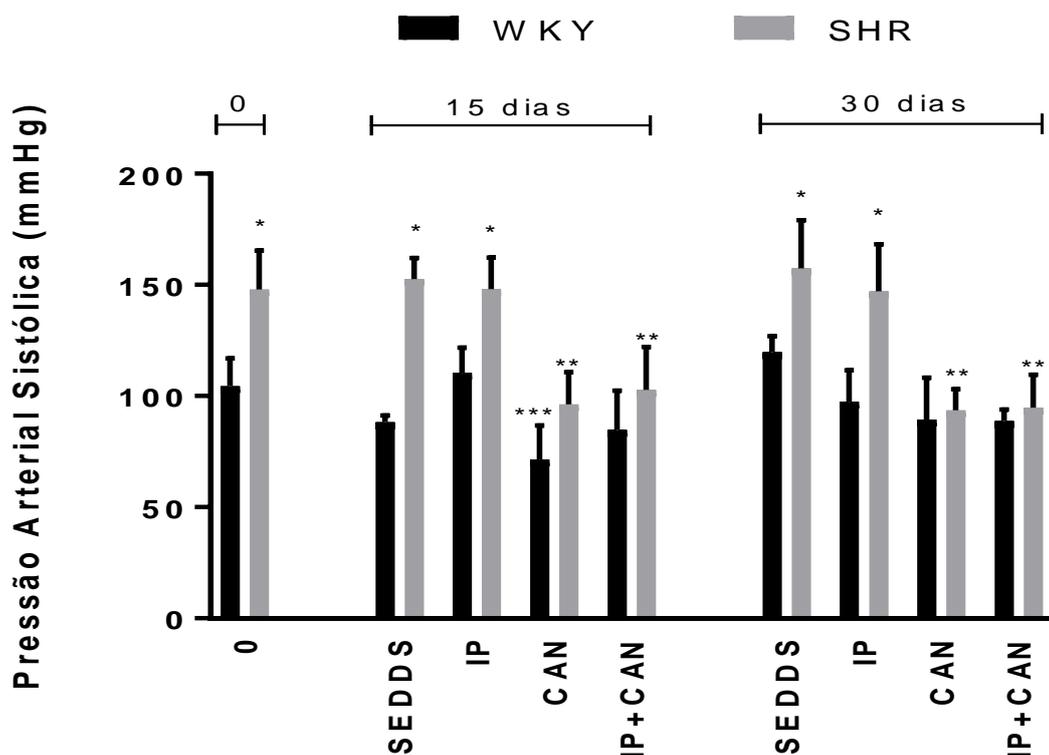


Figura 13: Valores da pressão arterial sistólica de ratas SHR e WKY (5-7 meses; n=10) antes (t = 0), após 15 (t = 15) e 30 (t = 30) dias de tratamento com veículo (SEDDS), ipriflavona (30 mg/kg), candesartana (5 mg/kg para SHR e 2 mg/kg para WKY) e ipriflavona com candesartana (30 mg/kg e 5 mg/kg para SHR - 30 mg/kg e 2 mg/kg para WKY). Os valores representam média ± EPM. *(p<0.05) entre linhagens, **(p<0.05) em relação ao SEDDS e ao IP, *** (p<0,05) em relação ao IP.

5.4.2 - Medida direta por meio de canulação da artéria femoral esquerda

A pressão arterial média (PAM) foi medida 24 horas após a canulação da artéria femoral esquerda das ratas SHR e WKY (animais conscientes). Foi observada uma redução significativa da PAM nos animais SHR tratados tanto com candesartana 5 mg/kg quanto com candesartana e ipriflavona associados (5 mg/kg e 30 mg/kg, respectivamente). Observou-se ainda que os animais SHR tratados com a associação dos fármacos apresentaram PAM menor que os animais WKY tratados apenas com o veículo (SEDDS).

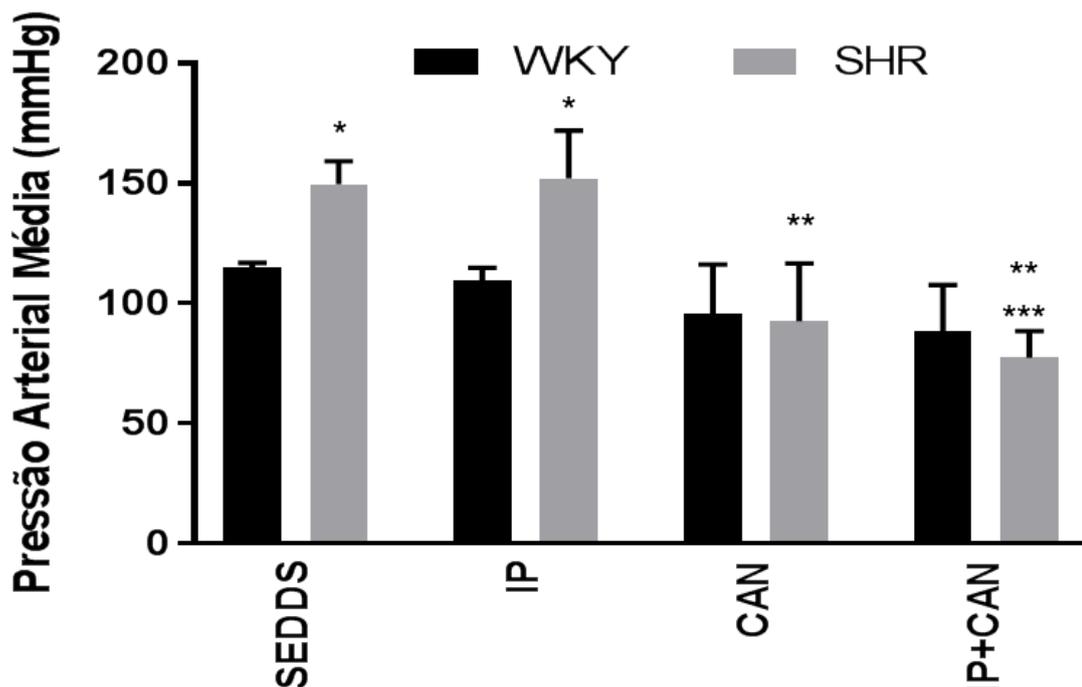


Figura 14: Valores da pressão arterial média (após canulação) de ratas SHR e WKY (5-7 meses; $n=6$) tratadas com veículo (SEDDS), ipriflavona (30 mg/kg), candesartana (5 mg/kg para SHR e 2 mg/kg para WKY) e ipriflavona com candesartana (30 mg/kg e 5 mg/kg para SHR - 30 mg/kg e 2 mg/kg para WKY). Os valores representam média \pm EPM. *($p<0.05$) entre linhagens, **($p<0.05$) em relação aos tratamentos SEDDS e IP para SHR, ***($p<0.05$) em relação ao WKY no tratamento com SEDDS.

As medidas da pressão arterial sistólica e diastólica também foram registradas e analisadas 24 horas após a canulação da artéria femoral esquerda das ratas SHR e WKY (animais conscientes). Observou-se (figura 15) diferença significativa nos valores pressóricos entre as linhagens e redução significativa da PA (sistólica e diastólica) nos animais SHR tratados tanto com candesartana 5 mg/kg quanto com candesartana e ipriflavona associados (5 mg/kg e 30 mg/kg, respectivamente). Também foi observado que a PA dos animais pertencentes à linhagem WKY, que receberam SEDDS apresentaram os níveis pressóricos elevados em relação aos valores esperados e descritos na literatura (PA sistólica de aproximadamente 100 mmHg).

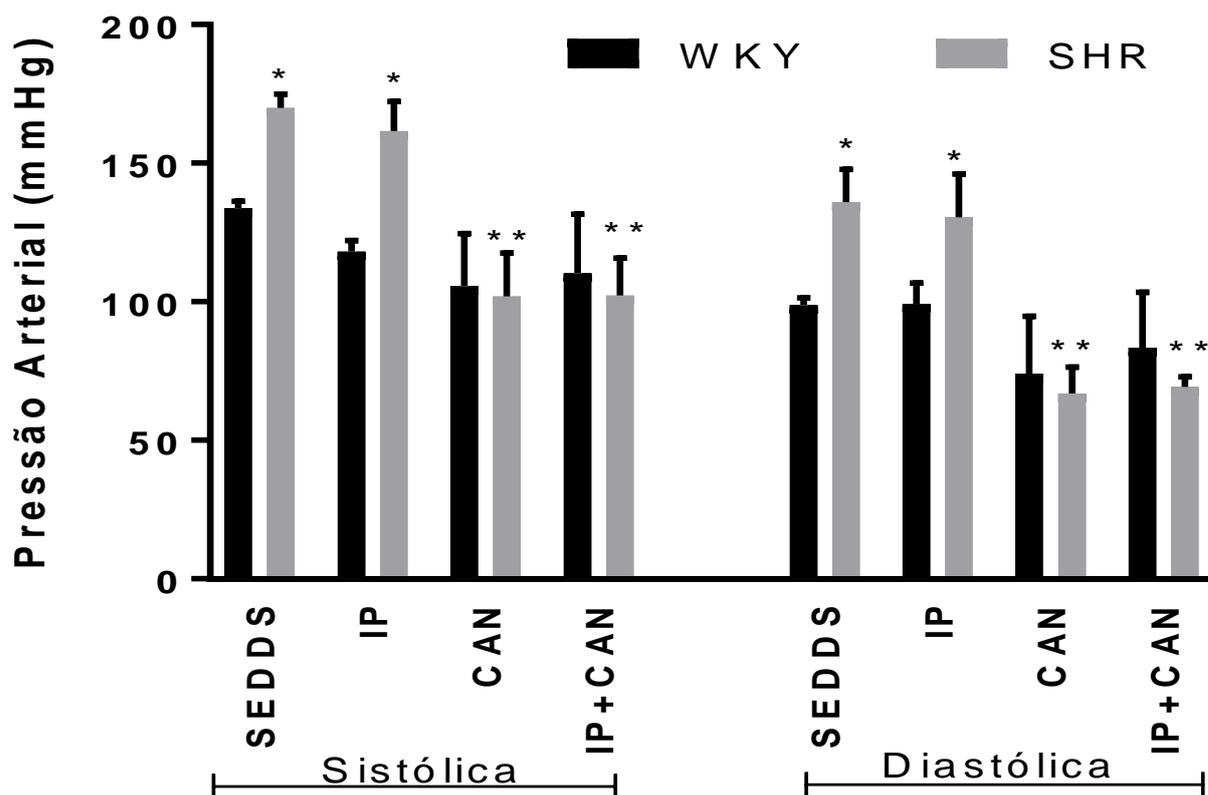


Figura 15: Valores da pressão arterial (sistólica e diastólica) de ratas SHR e WKY (5-7 meses; n=6) tratadas com veículo (SEDDS), ipriflavona (30 mg/kg), candesartana (5 mg/kg para SHR e 2 mg/kg para WKY) e ipriflavona com candesartana (30 mg/kg e 5 mg/kg para SHR - 30 mg/kg e 2 mg/kg para WKY). Os valores representam média \pm EPM. *($p < 0.05$) entre linhagens, **($p < 0.05$) em relação ao SEDDS e ao IP.

5.4.3 - Frequência cardíaca

Os registros de frequência cardíaca (batimentos por minuto - bpm) também foram avaliados (figura 16). Observou-se diferença significativa entre as linhagens estudadas, porém, não foram observadas diferenças significativas entre os valores de frequência cardíaca para cada linhagem nos diferentes tratamentos.

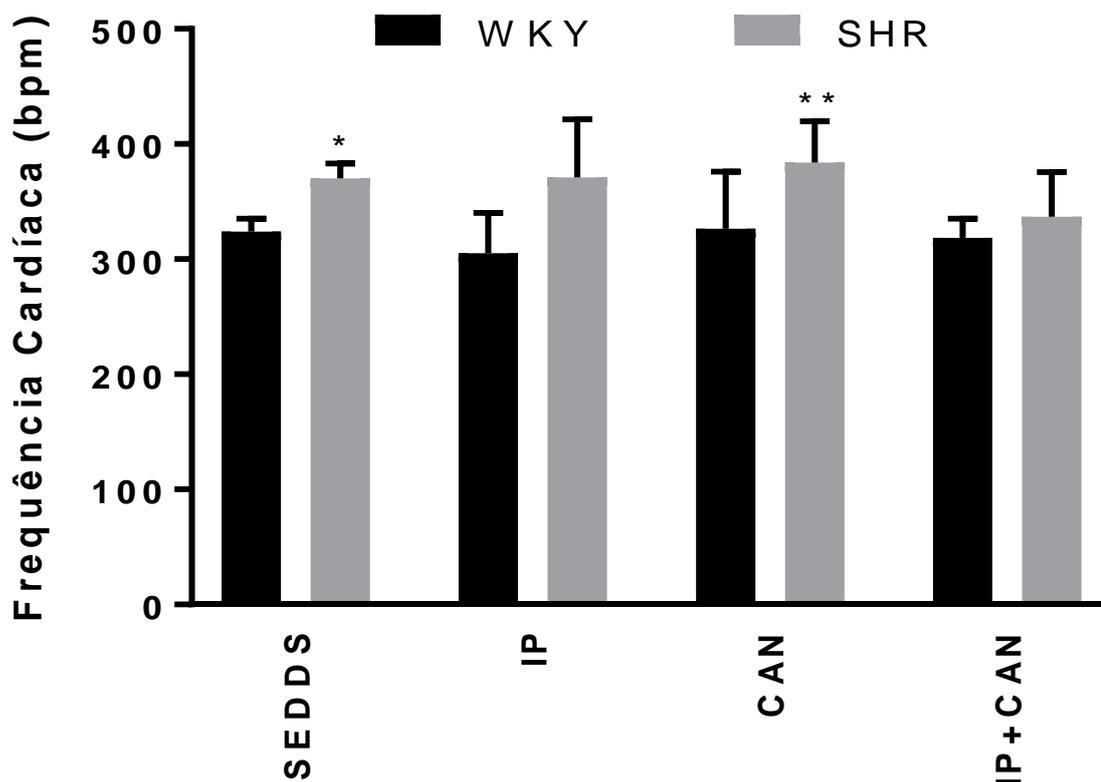


Figura 16: Valores da frequência cardíaca (BPM) de ratas SHR e WKY (5-7 meses; n=6) tratadas com veículo (SEDDS), ipriflavona (30 mg/kg), candesartana (5 mg/kg para SHR e 2 mg/kg para WKY) e ipriflavona com candesartana (30 mg/kg e 5 mg/kg para SHR - 30 mg/kg e 2 mg/kg para WKY). Os valores representam média \pm EPM. *($p < 0.05$) entre linhagens, **($p < 0.05$) em relação ao WKY no tratamento com IP.

5.4.4 - Pressão arterial sistólica (pletismografia) X (medida direta por canulação da artéria femoral)

Os dados obtidos após a execução das duas metodologias de monitoramento da PA (pletismografia de cauda e canulação da artéria femoral) foram comparados. Não foi observada diferença significativa em relação à pressão arterial sistólica dos animais SHR (figura 17), obtida por diferentes métodos, após o 30º dia de tratamento. Em relação aos animais da linhagem WKY (figura 18), observou-se diferença significativa apenas entre os valores de pressão arterial sistólica das ratas tratadas com ipriflavona.

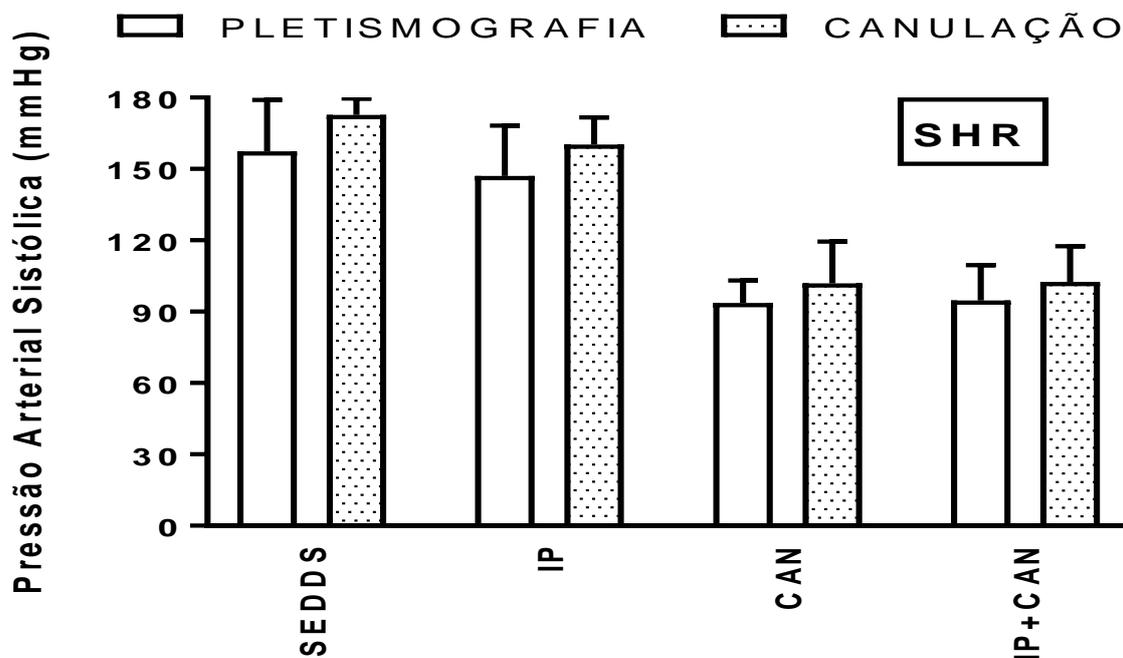


Figura 17: Valores da pressão arterial sistólica de ratos SHR medidos por pletismografia (n=10) e após canulação (n=10). Os valores representam média ± EPM.

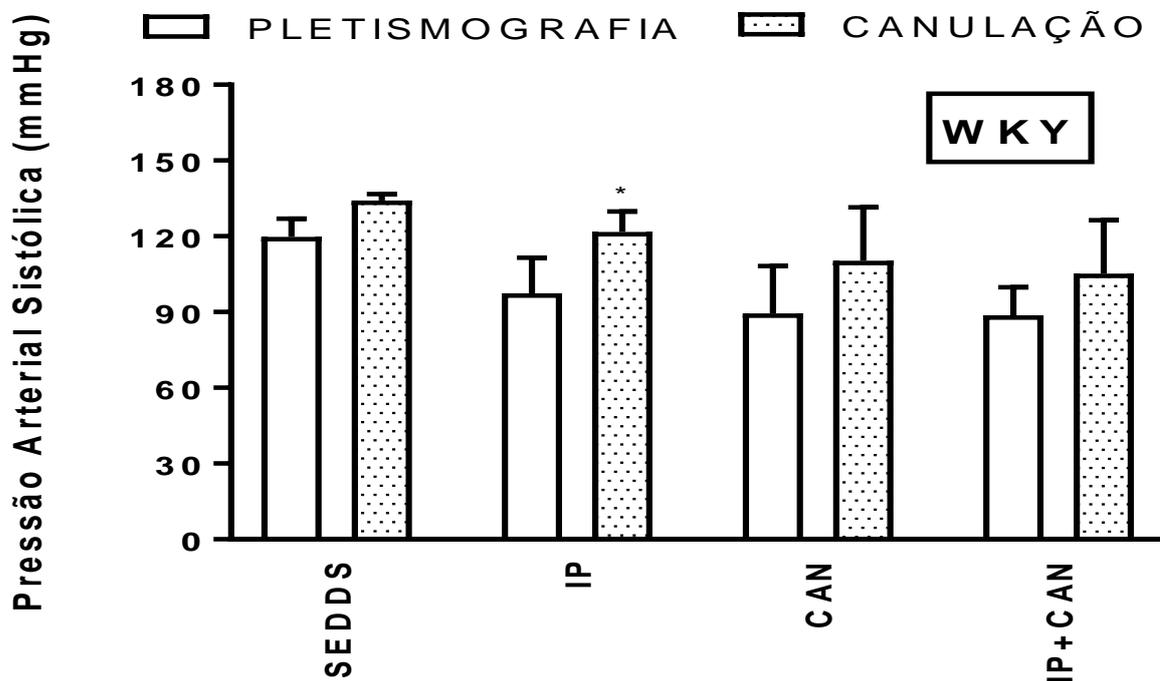


Figura 18: Valores da pressão arterial sistólica de ratos WKY medidos por pletismografia (n=10) e após canulação (n=10). Os valores representam média ± EPM. *(p<0.05) em relação à medida por pletismografia no tratamento com IP.

5.5 - Respostas vasocongestivas induzidas por apomorfina em ratas conscientes

5.5.1 – Solução salina contendo ácido ascórbico (veículo para a apomorfina)

De modo geral, o número de respostas vasocongestivas de ratas que receberam apenas o ácido ascórbico (via SC) foi maior no grupo das normotensas. Após 15 dias de tratamento com candesartana as fêmeas SHR apresentaram de forma significativa mais respostas vasocongestivas quando comparadas com as SHR que receberam apenas SEDDS ou que não receberam tratamento.

Em relação às fêmeas WKY, após 15 dias de tratamento, registrou-se um número significativamente maior de respostas para o tratamento com ipriflavona, em comparação com as que receberam apenas SEDDS, candesartana (2 mg/kg/dia) ou nenhum tratamento.

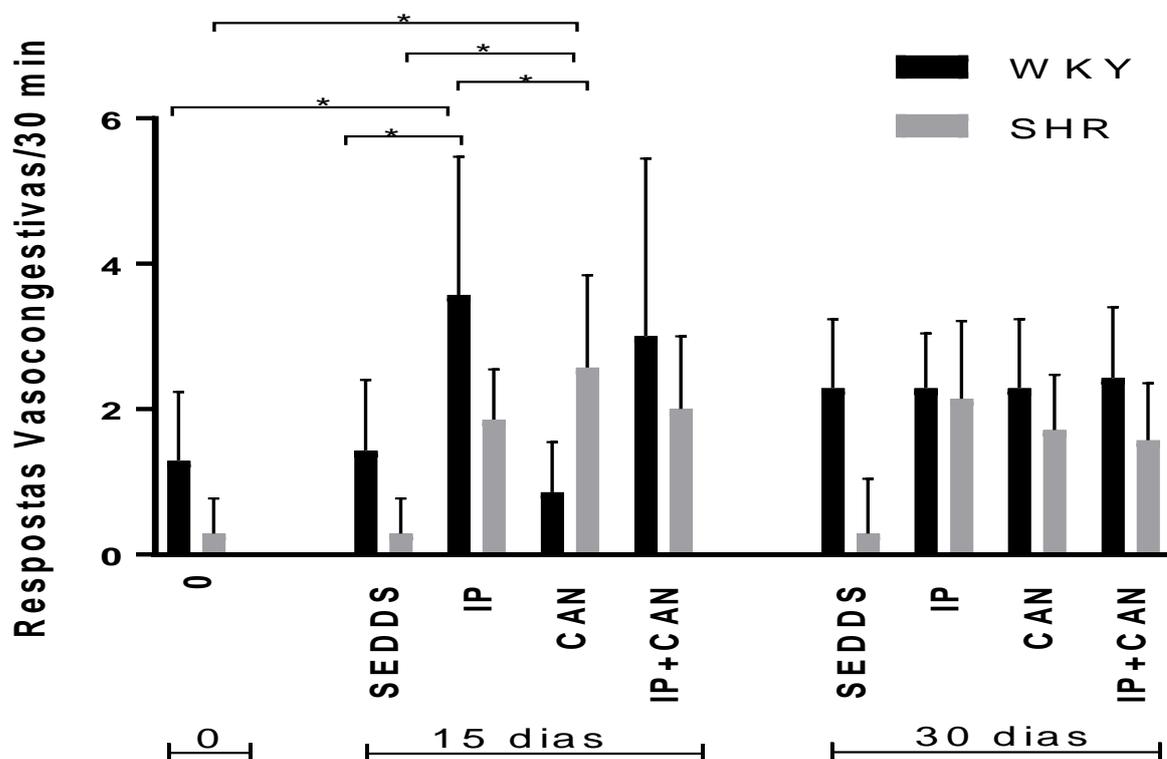


Figura 19: Respostas vasocongestivas, após administração de ácido ascórbico (SC), de ratas SHR e WKY (5-7 meses; n=7) tratadas com veículo (SEDDS), ipriflavona (30 mg/kg), candesartana (5 mg/kg para SHR e 2 mg/kg para WKY) e ipriflavona com candesartana (30 mg/kg e 5 mg/kg para SHR - 30 mg/kg e 2 mg/kg para WKY). Os valores representam média ± EPM. *(p<0.05).

5.5.2 - Apomorfina

Após a administração de apomorfina (SC) foi possível observar (figura 20) diferença significativa nas respostas vasocongestivas após 30 dias de tratamento com candesartana e ipriflavona apenas entre as linhagens WKY e SHR.

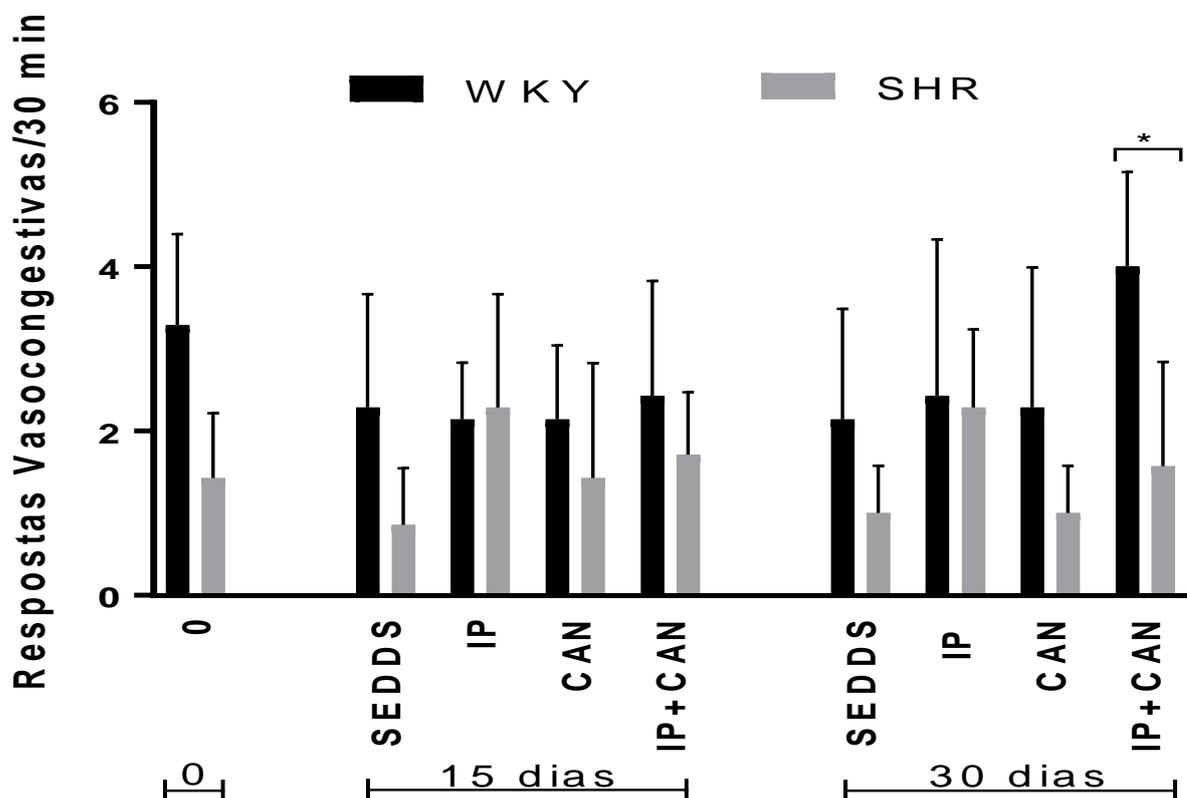


Figura 20: Respostas vasocongestivas, após administração de apomorfina (SC), de ratas SHR e WKY (5-7 meses; n=7) tratadas com veículo (SEDSS), ipriflavona (30 mg/kg), candesartana (5 mg/kg para SHR e 2 mg/kg para WKY) e ipriflavona com candesartana (30 mg/kg e 5 mg/kg para SHR – 30 mg/kg e 2 mg/kg para WKY). Os valores representam média ± EPM. *(p<0.05).

5.5.3 - Ácido ascórbico X Apomorfina

Comparação (figura 21) entre as respostas vasocongestivas induzidas por apomorfina e respostas observadas em animais que receberam apenas a solução de ácido ascórbico (controle).

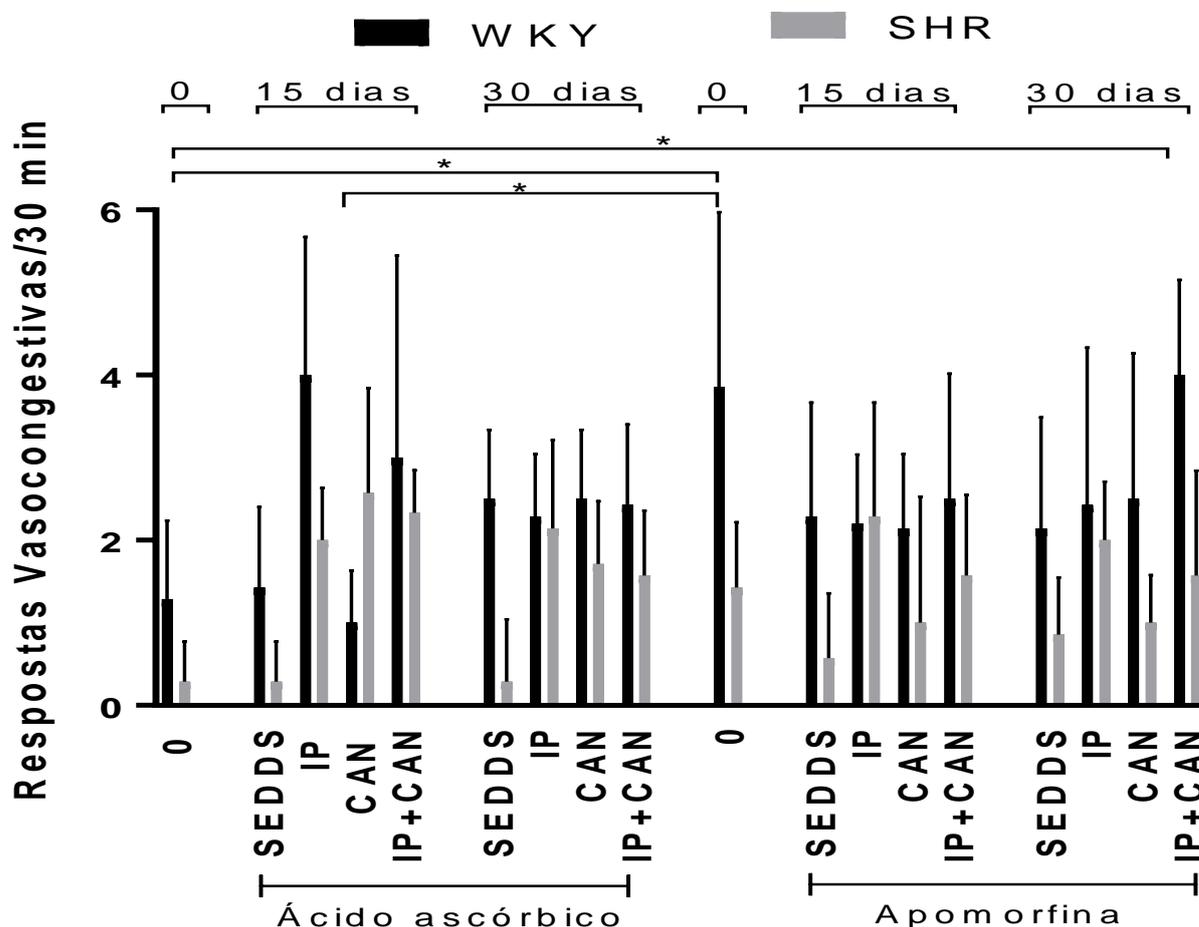


Figura 21: Comparativo das respostas vasocongestivas (após administração subcutânea de ácido ascórbico e apomorfina) de ratas SHR e WKY (5-7 meses; n=7) tratadas com veículo (SEDDS), ipriflavona (30 mg/kg), candesartana (5 mg/kg para SHR e 2 mg/kg para WKY) e ipriflavona com candesartana (30 mg/kg e 5 mg/kg para SHR - 30 mg/kg e 2 mg/kg para WKY). Os valores representam média \pm EPM. *($p < 0.05$)

5.6 - Lubrificação vaginal

Os dados referentes à lubrificação vaginal basal demonstram (figura 22) que há uma diferença significativa no processo de lubrificação entre animais normotensos (WKY) e hipertensos (SHR) que não receberam tratamento farmacológico (apenas SEDDS). Também foi possível observar um perfil de resposta pós-estímulo consideravelmente maior para as fêmeas WKY que receberam veículo ou candesartana 2 mg/kg.

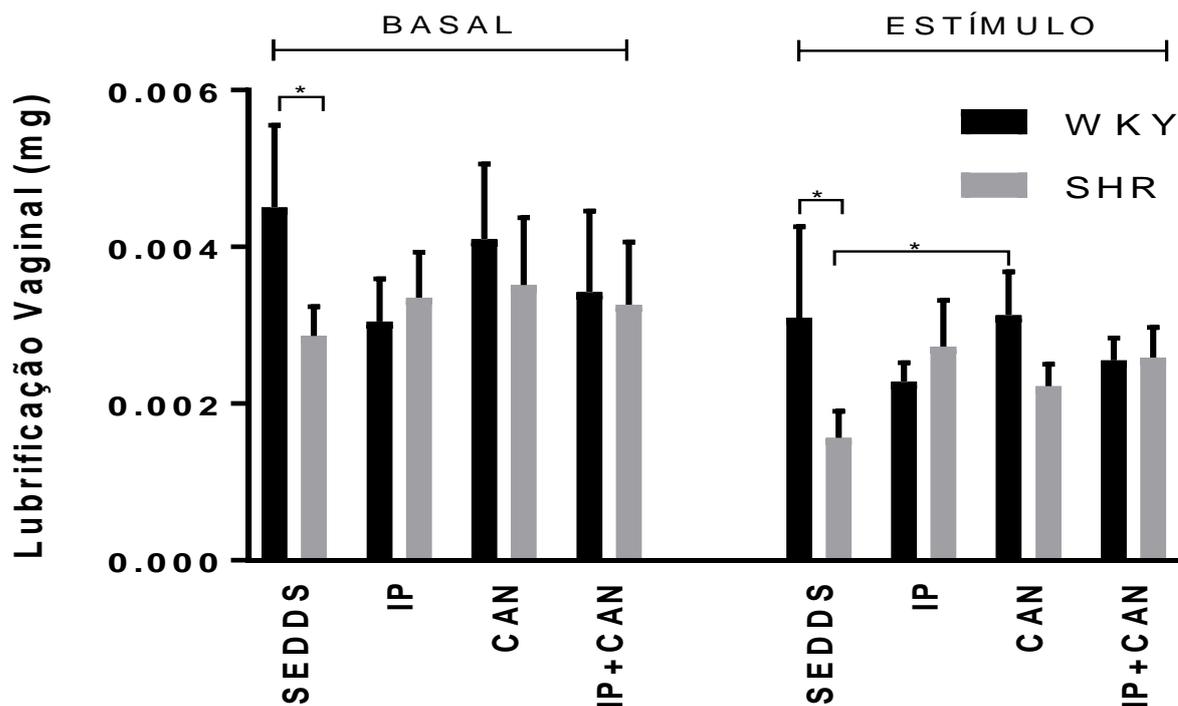


Figura 22: Variações na lubrificação vaginal basal (g) e sob estimulação elétrica do nervo pélvico de ratas SHR e WKY (5-7 meses; n=6) tratadas com veículo (SEDDS), ipriflavona (30 mg/kg), candesartana (5 mg/kg para SHR e 2 mg/kg para WKY) e ipriflavona com candesartana (30 mg/kg e 5 mg/Kg para SHR - 30 mg/kg e 2 mg/kg para WKY). Os valores representam media \pm EPM. *($p < 0.05$).

5.7 - Temperatura intravaginal

A variação da temperatura intravaginal durante o procedimento de estímulo do nervo pélvico foi maior e significativa apenas para o grupo SHR tratado com ipriflavona, em comparação com o grupo SHR tratado com ipriflavona e candesartana (figura 23).

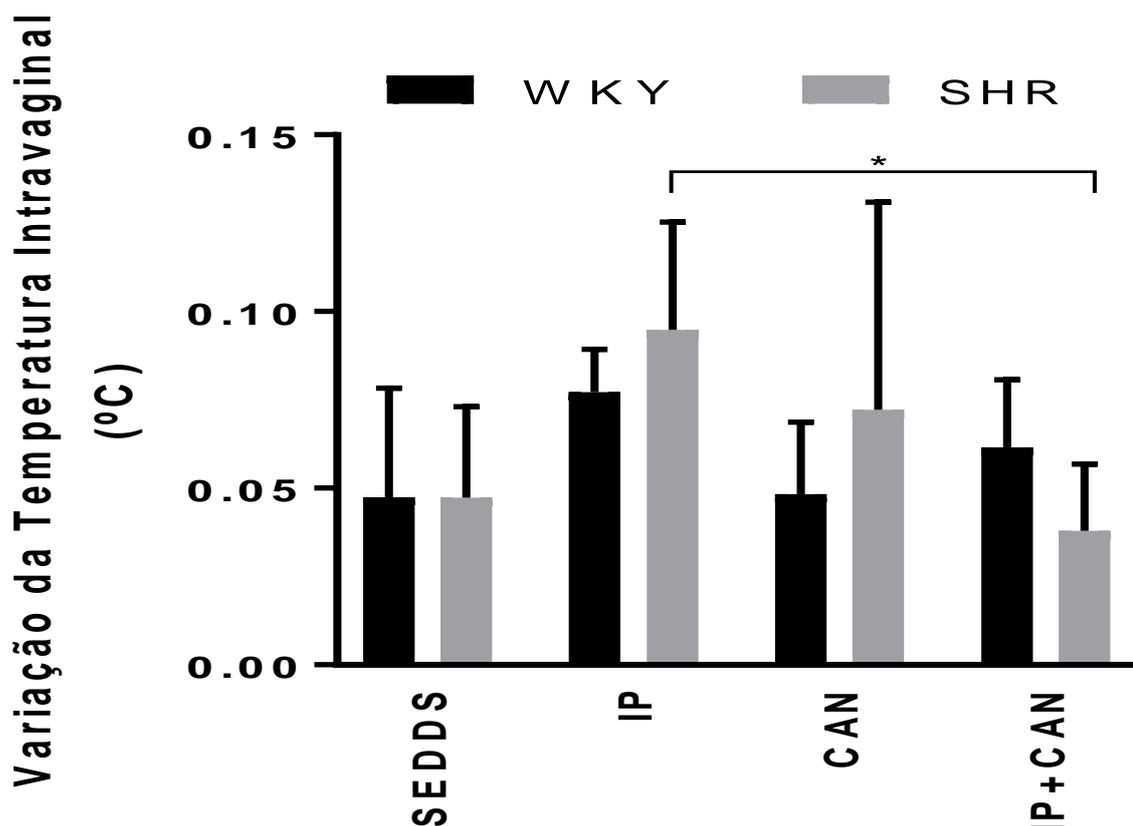


Figura 23: Variação da temperatura intravaginal (°C) induzida pela estimulação do nervo pélvico em ratas SHR e WKY (5-7 meses; n=7) tratadas com veículo (SEDDS), ipriflavona (30 mg/kg), candesartana (5 mg/kg para SHR e 2 mg/kg para WKY) e ipriflavona com candesartana (30 mg/kg e 5 mg/kg para SHR - 30 mg/kg e 2 mg/kg para WKY). Os valores representam média ± EPM. *($p < 0.05$).

5.8 - Pressão intravaginal

A força de contração intravaginal, induzida por estimulação do nervo pélvico, apresentou (figura 24) diferença significativa entre os diversos tratamentos. É possível observar que as ratas normotensas (WKY) apresentaram um perfil de resposta consideravelmente maior em relação às hipertensas (SHR), após receber SEDDS por gavagem durante 30 dias. A pressão intravaginal das fêmeas SHR tratadas com ipriflavona foi significativamente maior em relação aos outros esquemas de tratamento.

Além disso, as fêmeas normotensas (WKY) apresentaram melhor resposta para o tratamento com ipriflavona e candesartana quando comparadas com as tratadas apenas com candesartana.

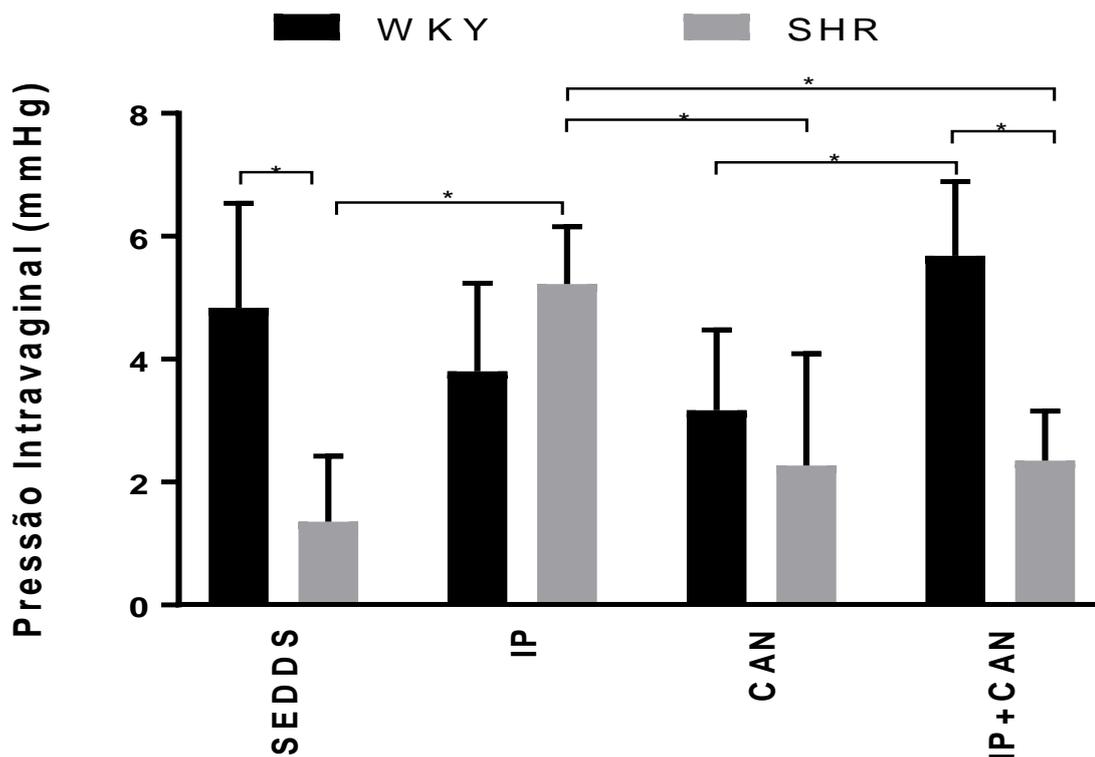


Figura 24: Mudanças na pressão intravaginal (mmHg) induzida pela estimulação do nervo pélvico em ratas SHR e WKY (5-7 meses) tratadas com veículo (SEDDS), ipriflavona (30 mg/kg), candesartana (5 mg/kg para SHR e 2 mg/kg para WKY) e ipriflavona com candesartana (30 mg/Kg e 5 mg/kg para SHR - 30 mg/kg e 2 mg/kg para WKY). Os valores representam média \pm EPM *($p < 0.05$).

5.9 - Avaliação do perfil lipídico e dos indicadores da função hepática

A tabela abaixo apresenta os valores das enzimas transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) e transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) e dados referentes ao perfil lipídico. Não foram observadas diferenças significativas em relação aos valores de TGO e TGP tanto comparando-se os tratamentos quanto as linhagens. Em relação ao perfil lipídico, as diferenças significativas detectadas estão relacionadas às linhagens. Os tratamentos não influenciaram de forma significativa nos níveis de colesterol, triglicérides, HDL e LDL.

Tabela 1: Dados bioquímicos de enzimas hepáticas e perfil lipídico de ratas SHR e WKY (média de 5 determinações ± EPM)

Tratamento/grupo		ALT (TGP) UI/L	AST (TGO) mg/dl	COL mg/dl	HDL mg/dl	TRIG mg/dl	LDL mg/dl
IP	SHR	139,6 ± 10,9	1120,8 ± 120,5	44,6 ± 4,0	32,6 ± 5,2	87,6 ± 22,0	5,4 ± 2,0
CAN		608 ± 443,6	1598,8 ± 585,9	47,4 ± 4,3	43,8 ± 3,7	42,6 ± 20,6	4,4 ± 2,4
IP + CAN		246 ± 84,3	1351 ± 240,1	54,9 ± 5,2	47,5 ± 4,3	59,5 ± 24,1	4,8 ± 2,7
SEEDS	WKY	218,5 ± 49,6	1309,5 ± 114,7	77,8 ± 6,8	54,8 ± 3,8	141,8 ± 49,3	5,2 ± 2,4
IP		190,5 ± 13,7	1596,2 ± 131,1	73,7 ± 3,8	57,3 ± 1,9	98,2 ± 28,3	3,2 ± 1,8
CAN		225,8 ± 118,4	1155,3 ± 369,7	79,0 ± 6,9	61,8 ± 5,2	85,6 ± 30,5	1,0 ± 0,3
IP + CAN		185,8 ± 37,0	1371,2 ± 348,1	83,0 ± 4,7	59,4 ± 3	128,8 ± 55,5	1,6 ± 0,7

5.10 - Avaliação dos parâmetros hematológicos

As tabelas abaixo apresentam os valores encontrados para os hemogramas (tabela 2) e para a contagem diferencial de glóbulos brancos (tabela 3) das ratas WKY e SHR. Não foram observadas diferenças significativas em relação aos parâmetros avaliados para cada tratamento e linhagem, indicando que os tratamentos não interferiram no perfil hematológico das fêmeas SHR e WKY.

Tabela 2: Hemograma de ratas SHR e WKY (média de 4 determinações ± EPM)

Grupo/Tratam.		Leuc. (10 ³ /mL)	Hem. (10 ⁶ /mL)	Hemog. (g/dL)	Hemat. (%)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)	Plaq. (10 ³ /mL)
SHR	IP	3,0±0,1	6,1±2,2	11,0±0,8	30±0,21	52,8±10,2	18,0±1,2	34,1±2,2	479,5±60,1
	CAN	5,6±1,1	5,1±1,3	8,9±0,4	30±0,14	50,6±6,20	17,3±2,2	34,2±4,2	514,8±60,0
	IP+CAN	3,3±0,4	5,3±0,7	9,1±1,2	30±0,11	51,0±4,12	17,2±1,4	33,6±7,5	383,1±82,2
WKY	SEEDS	5,4±0,4	6,1±1,1	11,4±2,2	33±0,11	54,2±11,3	18,6±0,1	34,3±1,1	349,0±99,3
	IP	5,3±1,5	5,8±0,8	10,8±2,4	31±0,13	54,2±8,40	18,7±4,2	34,2±0,8	313,5±40,1
	CAN	3,9±0,1	6,0±1,6	11,7±2,7	33±0,30	55,8±4,25	19,5±5,2	35,1±4,2	329,2±45,2
	IP+CAN	3,1±0,2	5,0±1,3	9,1±0,4	30±0,16	53,8±8,10	18,2±3,2	33,7±7,7	222,0±30,9

Tabela 3: Comparação de contagens diferenciais de glóbulos brancos entre ratas SHR e WKY (média de 4 determinações ± EPM)

Grupo	Tratamento	Linfócito (%)	Neutrófilo (%)	Basófilo (%)	Eosinófilo (%)	Monócito (%)
SHR	IP	60±3,1	37±0,4	0	2	1±0,34
	CAN	60±1,7	40±4,4	0	0	0
	IP+CAN	65±0,7	32±0,1	1±0,1	0	2±1,4
WKY	SEEDS	72±2,1	20±0,5	0	7±2,7	1±0,11
	IP	80±1,7	19±0,2	0	0	1±2,4
	CAN	70±3,3	27±1,4	0	0	3±0,3
	IP+CAN	86±1,4	14±2,1	0	0	0

6. DISCUSSÃO

Através do monitoramento do ciclo estral, metodologia muito aplicada em estudos que envolvem a função neuroendócrina e que é executada de forma prática e não invasiva, foi possível observar as mudanças diárias da citologia vaginal de acordo com as alterações nos níveis de estradiol. Tais níveis começam a aumentar em metaestro, atingindo níveis de pico durante proestro e retornando à produção basal em estro (SMITH *et al.*, 1975; SPORNITZ *et al.*, 1999). De modo geral, a duração do ciclo estral dos animais em estudo foi de 4 dias e não foram observadas alterações na ciclicidade das ratas (WKY e SHR), em todos os esquemas de tratamento, indicando que os fármacos em estudo não afetaram as funções hormonais e o ciclo de hipertrofia e descamação uterina (figura 11).

A verificação da massa corporal de cada animal, realizada antes, após 15 e 30 dias de tratamento, permitiu o ajuste dos volumes de gavagem para que as doses corretas dos fármacos fossem administradas (figura 12). As fêmeas SHR não apresentaram variação significativa de massa corporal. No entanto, as fêmeas WKY tratadas com candesartana (2 mg/kg/dia) ou com ipriflavona associada à candesartana (30 mg/kg/dia e 2 mg/kg/dia) apresentaram uma redução significativa da massa corporal após 15 dias de tratamento.

Inicialmente, sugere-se que essa redução de massa esteja relacionada à gavagem, visto que tal metodologia pode interferir na alimentação dos animais e que, após 30 dias de tratamento e maior adaptação das ratas ao método, a massa corporal normalizou-se.

Em relação à pressão arterial, medida por dois métodos distintos (pletismografia de cauda e canulação da artéria femoral esquerda), foi possível constatar que as ratas da linhagem SHR apresentavam valores de PAM, pressão sistólica e diastólica significativamente maiores que das ratas WKY. A metodologia de pletismografia de cauda utilizada neste estudo foi empregada para monitorar os níveis de pressão arterial sistólica ao longo do tratamento (0, 15 e 30 dias), por ser uma técnica não invasiva, de fácil manuseio e baixo custo. Verificou-se uma excelente correlação entre as medidas indiretas e diretas da pressão arterial sistólica para o grupo de animais SHR, em todos os esquemas de tratamento (figura 17). Apenas o grupo WKY tratado com ipriflavona apresentou diferença significativa entre os métodos (figura 18).

Nesse estudo, o tratamento com a ipriflavona não alterou significativamente os níveis pressóricos (figuras 13, 14 e 15). Estudos apontam a relação entre a redução dos níveis estrogênicos com a elevação gradativa da PA (FORTEPIANI *et al.*, 2003). Tal fato ocorre de forma relevante em ratas senescentes menopausadas. Considerando-se que as ratas deste estudo estavam em idade fértil e ciclando corretamente, não foram observadas modificações na PA por influência da ipriflavona.

Já o tratamento com a candesartana (5 mg/kg), associado ou não com a ipriflavona (30 mg/kg), reduziu consideravelmente a pressão arterial das fêmeas SHR (figuras 13, 14 e 15). Tal resultado era esperado, considerando-se o potencial terapêutico da candesartana na diminuição e controle da hipertensão. Ressalta-se que o grupo SHR tratado com ipriflavona associada à candesartana, após 30 dias, apresentou pressão arterial significativamente menor em relação às ratas normotensas (WKY) que receberam apenas o veículo (SEDDES) por 30 dias (BANDYOPADHYAY, 2013; MORAES, 2013).

Após o 15º e 30º dia de tratamento, a pressão arterial das fêmeas normotensas WKY, que receberam candesartana (agora na dose de 2 mg/kg), apresentou redução significativa, quando comparada com os grupos tratados apenas com ipriflavona ou veículo.

Inicialmente, as ratas WKY, foram tratadas com candesartana na dose de 5 mg/kg/dia (dose também administrada para a linhagem SHR). Porém, após 10 dias de tratamento, as fêmeas WKY, além da perda de massa corporal e da redução considerável da PA (dados não mostrados), apresentaram pelos arrepiados, manchas acobreadas e escuras nas patas e na cauda e respiração ofegante. Todos os animais desse grupo morreram entre o 15º e o 20º dia de tratamento. A necropsia dos animais revelou alterações no fígado (friável e com coloração amarelada), rins pálidos e retraídos, glândula adrenal aumentada, pulmão aumentado com sufusão (acúmulo de líquido) e, em alguns animais, pulmão direito em estágio de hepatização (termo que indica consolidação inflamatória dos pulmões devido a aparência e a textura do fígado, indicando estado crônico). Foram retirados baço, rins, fígado, glândula adrenal, pulmão, esôfago, traqueia, estômago, coração e ceco para futuras análises histopatológicas (órgãos armazenados em formalina 10%).

Os achados da necropsia sugerem que a hipótese mais provável seria de que esses animais evoluíram para um quadro clínico de complicações cardiorrespiratórias por consequência da redução considerável da pressão arterial, após o tratamento com candesartana veiculada em SEDDES na dose de 5 mg/kg/dia. Acredita-se que a formulação em estudo tenha propiciado maior biodisponibilidade da candesartana que, somada à maior afinidade deste fármaco aos receptores AT₁ e ação inibidora do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) mais prolongada (BANDYOPADHYAY, 2013), tenha causado a redução brusca da PA dos animais normotensos e queda na taxa de perfusão tecidual e falência múltipla de vários órgãos vitais.

Devido à debilidade e morte dos animais WKY tratados com candesartana na dose de 5 mg/Kg/dia, decidiu-se reduzir a dose para 2 mg/kg/dia para que fosse possível retomar os estudos com as ratas WKY que já estavam em idade ideal para a execução dos tratamentos e

testes. Os estudos com as ratas SHR já tinham sido concluídos e nesse momento o laboratório não dispunha de mais ratas dessa linhagem, introduzindo assim uma falha no protocolo.

A frequência cardíaca foi significativamente maior para as fêmeas SHR que receberam SEDDS em relação às fêmeas WKY que também receberam SEDDS. Tal dado corrobora com as informações descritas na literatura, onde animais SHR apresentam frequência cardíaca elevada por volta da 3ª semana de vida, correlacionando-se positivamente com os níveis de pressão arterial atingidos até a 6ª semana de vida (DICKHOUT *et al.*, 1998; FAZAN, 2001). Não foram observadas diferenças significativas na frequência cardíaca em função dos diversos tratamentos para ambas as linhagens.

Em relação ao SEDDS (figuras 9 e 10), foi possível observar uma elevação do tamanho de suas partículas após a incorporação dos fármacos (variando de 200 a 450 nm) com índice de polidispersão entre 0,3 e 0,4. O aumento de tamanho não interfere na estabilidade do sistema (nanoemulsões), porém, índices de polidispersão acima de 0,3 podem indicar problemas de estabilidade com possíveis processos de agregação das partículas e sedimentação. Ainda assim, tendo em vista sua aplicação por via oral, os índices de polidispersão determinados são aceitáveis e satisfatórios (GURSOY e BENITA, 2004).

Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa mostraram que essa formulação aqui utilizada propicia uma maior taxa de liberação *in vitro* (LEÃO, 2009) e maior biodisponibilidade oral da ipriflavona em ratas (RODOVALHO *et al.*, dados ainda não publicados). Serão necessários mais estudos em relação à capacidade de liberação e aumento da biodisponibilidade dos demais fármacos e suas combinações, veiculados nessa formulação de SEDDS, usados nesse estudo.

A avaliação da resposta sexual em ratas conscientes foi feita por meio de monitoramento das respostas vasocongestivas, causadas pelo aumento de fluxo sanguíneo para a região pélvica, com conseqüente ereção clitoriana, induzidas pela administração de apomorfina (80 µg/kg). Essa metodologia tem sido demonstrada em diversos estudos e aplicada por nosso grupo de pesquisa (BERRARY, 2003; HANNAN *et al.*, 2006).

O processo de excitação central, estimulado pela apomorfina ocorre devido sua ação agonista dopaminérgica não seletiva, comprovando a importância do papel das vias dopaminérgicas no controle central da excitação sexual através da ativação dos receptores centrais dopaminérgicos D4 e dos receptores periféricos D2 (CHEN *et al.*, 1999; SENBEL, 2011; STIEF, 2003).

Os dados referentes às respostas vasocongestivas, tanto para os grupos que receberam apenas o ácido ascórbico (salina 0,9% contendo ácido ascórbico 0,1% - controle) quanto para os grupos que receberam apomorfina (solução de 80 µg/mL de salina 0,9% contendo ácido

ascórbico 0,1%) mostraram, claramente, que os animais normotensos possuem um melhor perfil de resposta sexual quando comparados aos animais hipertensos.

Esses resultados corroboram estudos anteriores que mostram que a hipertensão afeta o sistema vascular da genitália podendo causar uma redução no fluxo sanguíneo e na secreção de muco vaginal, provocando, conseqüentemente, a disfunção sexual (KAYA *et al.*, 2007). Dados da literatura sugerem que a hipertensão arterial pode estar associada ao aumento da disfunção sexual nas mulheres, incluindo complicações como: desejo sexual e excitação reduzidos, lubrificação inadequada, dificuldade de atingir o orgasmo, dispareunia e falta de satisfação sexual (OKEAHIALAM e OBEKA, 2006).

Neste estudo, não foi observado o aumento estatisticamente significativo das respostas vasocongestivas induzidas por apomorfina, após 15 ou 30 dias, para todos os esquemas de tratamento envolvendo ipriflavona. Tal fato foi inesperado, visto que estudos anteriores de nosso grupo obtiveram bons resultados em relação ao tratamento crônico de fêmeas castradas e fêmeas SHR jovens ou senescentes com ipriflavona (RODOVALHO *et al.* e MARTINS *et al.*, dados não publicados). Todos os testes com apomorfina foram realizados na fase de estro que, geralmente, apresenta maior número de respostas vasocongestivas (BERRY, 2003).

Assim, a falha em obter melhora no padrão de respostas vasocongestivas após tratamento com ipriflavona pode ser atribuída talvez a um número insuficiente de animais testados, à falha do experimentador na leitura das respostas (pouco provável) ou ao estresse dos animais devido a alterações bruscas de temperatura, ruídos elevados nas salas de manutenção e/ou experimentação ou perda do controle do ciclo claro-escuro na sala de manutenção.

As variações observadas em relação à lubrificação vaginal mostram que o perfil de resposta de excitação sexual dos animais normotensos foi maior em relação aos animais hipertensos, indicando novamente a interferência da hipertensão no processo de resposta sexual. Ressalta-se que anormalidades estruturais e funcionais nos órgãos genitais têm sido relatadas por pacientes hipertensas (KOCHAR *et al.*, 1999; DUNCAN *et al.*, 2001). O relaxamento vascular adequado é necessário para atingir uma lubrificação vaginal e ingurgitamento clitoriano apropriados e, alterações morfológicas são fatores importantes na gênese de disfunção sexual feminina, em pacientes com elevada pressão sanguínea (DUNCAN *et al.*, 2001).

Nesse estudo não foi observada melhora estatisticamente significativa na lubrificação após os diversos tratamentos. Tal resultado foi mais uma vez inesperado, uma vez que já tinha sido observado anteriormente que a lubrificação vaginal aumenta após o tratamento crônico de fêmeas castradas e fêmeas SHR jovens ou senescentes com ipriflavona (RODOVALHO e

cols. e MARTINS e cols., dados não publicados). As justificativas para a não reprodutibilidade dos dados pode da mesma forma, atribuída a um número insuficiente de animais testados, às diferentes condições dos animais utilizados ou mesmo às condições do ambiente durante o experimento.

Nesse estudo não foi observado aumento estatisticamente significativo da variação da temperatura intravaginal após estímulo do nervo pélvico para os diversos tratamentos. A variação da temperatura seria um indicador indireto do aumento de fluxo sanguíneo para a região pélvica. Nesse caso, a variação pode ter sido mascarada por uma variação na temperatura ambiente e consequente perda de calor pela rata que estava anestesiada e com parte da pelve exposta. Inesperadamente foi observada uma redução significativa da variação de temperatura apenas para o grupo SHR tratado com ipriflavona e candesartana, comparado com o grupo tratado com ipriflavona. Novamente, talvez o número de animais estudado e/ou as condições de experimentação tenham impedido uma resposta favorável de melhora da função sexual após tratamento com a ipriflavona.

A pressão intravaginal apresentou elevação significativa nos grupos que receberam o tratamento com ipriflavona 30 mg/kg por 30 dias. É provável que essa resposta seja consequência da ação do NO que promove a elevação da circulação sanguínea e fortalece a musculatura lisa vaginal (STERNBERG *et al.*, 1995). Após análise dos dados referentes à pressão intravaginal, constatou-se diferença significativa entre o grupo tratado apenas com ipriflavona (WKY) e o grupo tratado com a associação de ipriflavona e candesartana (WKY). Diante dessa resposta, sugere-se que a ipriflavona é o fator que interfere positivamente no processo de resposta sexual. Tal fato torna-se relevante ao considerar-se que o tratamento com ipriflavona foi capaz de melhorar a pressão intravaginal em ratas hipertensas que sabidamente apresentam disfunção sexual, assim como em ratas normotensas tratadas com candesartana.

De modo geral, a candesartana não influenciou (negativamente e positivamente) os processos de resposta de excitação sexual, confirmando-se o fato de que tal fármaco é interessante para o tratamento de hipertensos, sem prejudicar ou melhorar a resposta sexual em homens e em ratos (YAMAMOTO, 2003; NEVES, 2011).

Esperava-se uma melhora nas respostas vasocongestivas e de excitação sexual em relação aos animais SHR tratados com candesartana visto que dados da literatura mostraram respostas satisfatórias em mulheres tratadas com irbesartana. Esse fármaco pertencente à classe dos ARA proporcionou um meio hormonal e oxidativo favorável para a função sexual em mulheres hipertensas (MA *et al.*, 2012). Além disso, estudos de nosso grupo de pesquisa demonstraram melhora significativa da resposta sexual em machos hipertensos (modelo DOCA-sal) tratados com candesartana (NEVES, 2011).

Diante disso, é válido inferir que as causas da hipertensão, bem como o grau de hipertensão podem estar relacionados ao surgimento e nível de disfunção sexual tanto em machos quanto em fêmeas. A hipertensão de ratas SHR está diretamente relacionada à elevada resistência vascular periférica, conseqüente de alterações vasculares presentes nas primeiras semanas de vida do animal. Sendo assim, é possível que o tratamento com candesartana por apenas 30 dias não tenha sido suficiente para promover alterações positivas na resposta sexual (FAZAN *et al*, 2001; FORTEPIANI *et al*, 2003).

Outro fator relevante sobre o uso de ARA e a resposta sexual envolve o aumento do vasodilatador ANG-(1-7) em fêmeas tratadas com candesartana (ZIMMERMAN *et al.*, 2014). A elevação de ANG-(1-7), formada via ECA2, pode estar relacionada ao processo de vasodilatação via liberação de NO (SANTOS *et al.*, 2008; COSTA, 2011).

A dosagem sérica de aminotransferases (aspartato aminotransferase - AST/TGO e alanina aminotransferase - ALT/TGP) possibilita a determinação do aumento da atividade hepática, caso seus níveis estejam elevados no sangue. Tal elevação pode ter causa medicamentosa e, devido ao extenso metabolismo de primeira passagem dos fármacos em estudo. Não foi observada diferença estatística em nenhum dos grupos tratados (SEDDS, ipriflavona, candesartana ou ipriflavona associada à candesartana) quanto à dosagem de TGO e TGP, o que sugere uma ausência de hepatotoxicidade. Ressalta-se que os valores elevados encontrados para as enzimas TGO e TGP diferem de dados anteriores do laboratório e podem estar relacionados à administração de anestesia para os procedimentos de canulação e estímulo do nervo pélvico, antes da eutanásia e coleta de sangue.

Pelos dados encontrados em nosso laboratório, considera-se que o veículo (SEDDS) e tratamento crônico com ipriflavona não causam alterações significativas nos níveis de enzimas marcadoras de função hepática e nem alterações histológicas, sugerindo baixa ou nenhuma hepatotoxicidade.

O tratamento crônico por 30 dias com ipriflavona, candesartana ou a combinação dos mesmos, veiculadas em SEDDS não afetaram significativamente o perfil lipídico e nem os parâmetros hematológicos das ratas SHR e das ratas WKY. Tais resultados sugerem mais uma vez baixa ou nenhuma toxicidade sobre o metabolismo lipídico/lipoproteico, assim como para o sistema hematopoiético.

7. SUMÁRIO E CONCLUSÃO

- Foi possível verificar que o processo de resposta sexual em ratas é comprometido pela hipertensão arterial;
- A candesartana não influenciou de forma negativa o processo de resposta sexual das fêmeas e foi eficaz na redução da pressão arterial de animais SHR na dose de 5 mg/kg/dia;
- A administração da candesartana na dose de 5 mg/kg/dia, veiculada em SEDDS, para animais WKY culminou na debilidade e morte dos mesmos após possível quadro de deficiência cardiorrespiratória;
- O SEDDS veiculou os dois fármacos em estudo de forma satisfatória, porém, são necessários mais estudos para avaliar o perfil de liberação dos fármacos nessa formulação;
- A ipriflavona apresentou considerável potencial na melhoria das respostas de excitação sexual após análise da variação da temperatura e pressão intravaginal. Além disso, fêmeas WKY tratadas com ipriflavona e candesartana por 30 dias apresentaram respostas vasocongestivas, após administração de apomorfina, significativamente maiores que as fêmeas que receberam apenas candesartana.
- Não foram observadas alterações nos níveis de TGO e TGP indicando ausência de hepatotoxicidade.
- Não foram observadas variações no perfil lipídico e dos parâmetros hematológicos após os tratamentos;

Nossos dados corroboram achados prévios de nosso laboratório obtidos em modelos de ratas castradas e ratas SHR senescentes, sugerindo um papel de melhora da função sexual em fêmeas para a ipriflavona veiculada em um sistema autoemulsionável de entrega de fármacos. O tratamento concomitante com candesartana, nas doses utilizadas e por um intervalo de 30 dias, parece não alterar esse efeito sobre a melhora da função sexual, indicando que na pior das hipóteses, não potencializa, mas também não prejudica o efeito da ipriflavona. Essa formulação de ipriflavona veiculada em SEDDS pode ser útil não só no tratamento da osteoporose como vem sendo utilizado na clínica atualmente, como também para melhorar a função sexual de mulheres no período da menopausa/climatério, justificando a importância deste trabalho como um avanço na busca de alternativas para a terapia de reposição hormonal convencional.

8. REFERÊNCIAS

ABDO, C. H. N.; FLEURY, H. J. Aspectos diagnósticos e terapêuticos das disfunções sexuais femininas. *Revista de Psiquiatria Clínica*, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 162 - 167, 2006.

ADLERCREUTZ, H. Phytoestrogens: epidemiology and a possible role in cancer protection. *Environ Health Perspect*, v. 103 Suppl 7, p. 103-12, Oct 1995.

ANDERSON, G. L. *et al.* Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*, v. 291, n. 14, p. 1701-12, Apr 14 2004.

AMIDON, G. L. *et al.* A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharmaceutical research*, v. 12, n. 3, p. 413-420, 1995.

BANDYOPADHYAY, Shantanu; BHURIA, Lohit; LAL, Devi. An Explicit Review on Quantitative Estimation of Candesartan Cilexetil Employing Various Analytical Techniques. *Pharmaceutica Analytica Acta*, v. 2013, 2013.

BASSON R. *et al.* Report on the international consensus development conference of female sexual dysfunction: definitions and classifications. *J Urol* 2000; 163: 888–893.

BATISTA, Marcelo Costa. Anti-hipertensivos e disfunção sexual. *Rev. Hipertensão*, Ribeirão Preto, v. 4, n. 2, p. 64-66, 2001.

BEHARRY, Rochard KS *et al.* Evidence for centrally initiated genital vasocongestive engorgement in the female rat: Findings from a new model of female sexual arousal response. *International journal of impotence research*, v. 15, n. 2, p. 122-128, 2003.

BERMAN, J. R. Physiology of female sexual function and dysfunction. *International journal of impotence research*, v. 17, p. S44-S51, 2005.

BRASIL, Ministério da Saúde. Saúde sexual e saúde reprodutiva. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Brasília, Cadernos de Atenção Básica, n. 26, Série A. Normas e Manuais Técnicos, 2010, 300 p.

CHAO, J. I.; KUO, P. C.; HSU, T. S. Down-regulation of survivin in nitric oxide-induced cell growth inhibition and apoptosis of the human lung carcinoma cells. *J Biol Chem*, v. 279, n. 19, p. 20267-76, May 7 2004.

CHEN, Chuansheng *et al.* Population migration and the variation of dopamine D4 receptor (DRD4) allele frequencies around the globe. *Evolution and Human Behavior*, v. 20, n. 5, p. 309-324, 1999.

CHOU, K. C. *et al.* Prediction and classification of domain structural classes. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, v. 31, n. 1, p. 97-103, 1998.

COSTA, Eduardo Damasceno. Possível interação do Eixo ECA2/Ang-(1-&)/receptor MAS com receptores muscarínicos, B2 e AT2 na função erétil de ratos. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da

- Universidade Federal de Ouro Preto para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Orientador: Romulo Leite; Co-orientadora: Andrea Grabe Guimarães. 2011.
- DANGELO, J. G.; FATTINI, C. A. Anatomia humana básica. 2. ed. Rio de Janeiro: Atheneu. 2002. 200p.
- DICKHOUT, Jeffrey G.; LEE, Robert MKW. Blood pressure and heart rate development in young spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, v. 274, n. 3, p. H794-H800, 1998.
- DUNCAN, L. E. *et al.* Sex, drugs, and hypertension: a methodological approach for studying a sensitive subject. *Int J Impot Res*, v. 13, n. 1, p. 31-40, Feb 2001.
- DUDHIPALA, Narendar; VEERABRAHMA, Kishan. Candesartan cilexetil loaded nanodelivery systems for improved oral bioavailability. 2017.
- EMANUELE, Mary Ann; WEZEMAN, Frederick; EMANUELE, Nicholas V. Alcohol's effects on female reproductive function. *Alcohol Research and Health*, v. 26, n. 4, p. 274-281, 2002.
- EWIES, Ayman AA. Phytoestrogens in the Management of the Menopause:: Up-To-Date. *Obstetrical & gynecological survey*, v. 57, n. 5, p. 306-313, 2002.
- FAZAN JR, Rubens; SILVA, V. J. D.; SALGADO, Hélio Cesar. Modelos de hipertensão arterial. *Rev. Bras. Hipertens*, v. 8, p. 19-29, 2001.
- FERNANDES *et al.* Evaluation of the potential of interceptive ipriflavone in wistar rats. *Revista interdisciplinar de estudos experimentais*, v. 3, n. único, p. 07 – 12, 2001.
- FERREIRA, Ana Laura Carneiro Gomes; SOUZA, Ariani Impieri de; AMORIM, Melania Maria Ramos de. Prevalência das disfunções sexuais femininas em clínica de planejamento familiar de um hospital escola no Recife, Pernambuco. *Rev. bras. saúde matern. infant*, v. 7, n. 2, p. 143-150, 2007.
- FORTEPIANI, Lourdes A. *et al.* Characterization of an animal model of postmenopausal hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, v. 41, n. 3, p. 640-645, 2003.
- GAO, Fang *et al.* Nanoemulsion improves the oral absorption of candesartan cilexetil in rats: performance and mechanism. *Journal of Controlled Release*, v. 149, n. 2, p. 168-174, 2011.
- GRADY, D. *et al.* Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS): design, methods, and baseline characteristics. *Control Clin Trials*, v. 19, n. 4, p. 314-35, Aug 1998.
- GREENWOOD, S. *et al.* The role of isoflavones in menopausal health: consensus opinion of the North American Menopause Society. *MENOPAUSE-THE JOURNAL OF THE NORTH AMERICAN MENOPAUSE SOCIETY*, v. 7, n. 4, p. 215-229, 2000.
- GOLDSTEIN I, BERMAN J. Vasculogenic female sexual dysfunction. *Int J Impot Res* 1998; 10: 84.
- GURSOY, R. N.; BENITA, S. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. *Biomed Pharmacother*, v. 58, n. 3, p. 173-82, Apr 2004. ISBN.

- HANNAN JL1, SMALLEGANGE C, HALE TM, HEATON JP, ADAMS MA. Impact of antihypertensive treatments on erectile responses in aging spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 2006 Jan;24(1):159-68.
- HOYLE, C. H. *et al*. Innervation of vasculature and microvasculature of the human vagina by NOS and neuropeptide-containing nerves. *Journal of anatomy*, v. 188, n. Pt 3, p. 633, 1996.
- HULLEY, S. *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*, v. 280, n. 7, p. 605-13, Aug 19 1998.
- KIM, S. H.; LEE, M. G. Pharmacokinetics of ipriflavone, an isoflavone derivative, after intravenous and oral administration to rats hepatic and intestinal first-pass effects. *Life Sci*, v. 70, n. 11, p. 1299-315, Feb 1 2002.
- KOHLI, K. *et al*. Self-emulsifying drug delivery systems: an approach to enhance oral bioavailability. *Drug Discov Today*, v. 15, n. 21-22, p. 958-65, Nov 2010.
- KOCHAR, Mahendr S.; MAZUR, Larisa I.; PATEL, Amar. What is causing your patient's sexual dysfunction? Uncovering a connection with hypertension and antihypertensive therapy. *Postgraduate medicine*, v. 106, n. 2, p. 149-157, 1999.
- LEÃO, K. A. Avaliação da atividade cardioprotetora da ipriflavona veiculada em um sistema autoemulsionável em modelo de isquemia do miocárdio em ratos fêmeas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Orientadora: Andrea Grabe Guimarães. 2009.
- LINDA, S. C. *Fisiologia*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1995. 320p.
- MA, Ruixin *et al*. Effect of felodipine with irbesartan or metoprolol on sexual function and oxidative stress in women with essential hypertension. *Journal of hypertension*, v. 30, n. 1, p. 210-216, 2012.
- MALACHIAS, M. V. B. *et al*. 7ª Diretriz brasileira de hipertensão arterial. *Arq Bras Cardiol*, v. 107, n. 3 supl 3, p. 1-83, 2016.
- MANOLIS, Athanasios; DOUMAS, Michael. Antihypertensive treatment and sexual dysfunction. *Current hypertension reports*, v. 14, n. 4, p. 285-292, 2012.
- MARCONDES, F. K., BIANCHI, F. J. and TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. Departamento de Ciências Fisiológicas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas. *Brazilian Journal of Biology*., 62(4A): 609-614, 2002.
- MARSON, L.; MURPHY, A. Z. Identification of neural circuits involved in female genital responses in the rat: a dual virus and anterograde tracing study. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 291, n. 2, p. R419-R428, 2006.
- MEREDITH, P. Comparative ARB pharmacology. *Br J cardiol*. 2010;17(Suppl 2):s3-s5.

- MIN, Kweonsik *et al.* Hemodynamic evaluation of the female sexual arousal response in an animal model. *Journal of Sex & Marital Therapy*, v. 27, n. 5, p. 557-565, 2001.
- MORAES, Aline; GONZAGA, Carolina; JÚNIOR, Oswaldo Passarelli. Qual o melhor bloqueio do sistema renina angiotensina aldosteronana hipertensão?. *hipertensão*, v. 20, n. 2, p. 20, 2013.
- MONOSTORY, Katalin *et al.* Ipriflavone as an inhibitor of human cytochrome P450 enzymes. *British journal of pharmacology*, v. 123, n. 4, p. 605-610, 1998.
- MOON, Y. *et al.* Characterization of cytochrome P450s mediating ipriflavone metabolism in human liver microsomes. *Xenobiotica*, v. 37, n. 3, p. 246-259, 2007.
- MCCARTHY, M. M. *et al.* Infusion of antisense oligo-deoxynucleotides to the oxytocin receptor in the ventromedial hypothalamus reduces estrogen-induced sexual receptivity and oxytocin receptor binding in the female rat. *Neuroendocrinology*, v. 59, n. 5, p. 432-440, 1994.
- NEKKANTI, Vijaykumar *et al.* Solid self-microemulsifying formulation for candesartan cilexetil. *Aaps Pharmscitech*, v. 11, n. 1, p. 9-17, 2010.
- NEVES, Nívea Cristina Vieira. Manipulação do eixo “ECA2/ANGIOTENSINA-(1-7)/RECEPTOR MAS” no tratamento da disfunção erétil de ratos hipertensos e diabéticos. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Orientador: Romulo Leite; Co-orientadora: Andrea Grabe Guimarães. 2011.
- OKAMOTO, Kozo; AOKI, Kyuzo. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Japanese circulation journal*, v. 27, n. 3, p. 282-293, 1963.
- OKEAHIALAM, Basil N.; OBEKA, Ndudim C. Sexual dysfunction in female hypertensives. *Journal of the National Medical Association*, v. 98, n. 4, p. 638, 2006.
- PARK, K. *et al.* Vasculogenic female sexual dysfunction: the hemodynamic basis for vaginal engorgement insufficiency and clitoral erectile insufficiency. *International Journal of Impotence Research*, v. 9, p. 27-38, 1997.
- PFAFF, D. W.; SAKUMA, Y. Deficit in the lordosis reflex of female rats caused by lesions in the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *The Journal of physiology*, v. 288, p. 203, 1979.
- ROSENFELD, C. R. *et al.* Estrogen selectively up-regulates eNOS and nNOS in reproductive arteries by transcriptional mechanisms. *J Soc Gynecol Investig*, v. 10, n. 4, p. 205-15, May 2003.
- ROSSOUW, J. E. *et al.* Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*, v. 288, n. 3, p. 321-33, Jul 17 2002.
- SENBEL, Amira M. Interaction between nitric oxide and dopaminergic transmission in the peripheral control of penile erection. *Fundamental & clinical pharmacology*, v. 25, n. 1, p. 63-71, 2011.

SHAH, N. H. *et al.* Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) with polyglycolized glycerides for improving in vitro dissolution and oral absorption of lipophilic drugs. *International journal of pharmaceutics*, v. 106, n. 1, p. 15-23, 1994.

SHIRASAKI, Y. *et al.* Endothelial regulation of cyclic GMP and vascular responses in hypertension. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 245, n. 1, p. 53-58, 1988.

STERNBERG, Wendy F. *et al.* Neonatal testosterone exposure influences neurochemistry of non-opioid swim stress-induced analgesia in adult mice. *Pain*, v. 63, n. 3, p. 321-326, 1995.

STIEF, C. G. Central mechanisms of erectile dysfunction: what a clinician may want to know. *International journal of impotence research*, v. 15, n. S2, p. S3, 2003.

SILVA, Gustavo Maximiliano Dutra da; LIMA, Sônia Maria Rolim Rosa; MORAES, José Cássio de. Avaliação da função sexual em mulheres após a menopausa portadoras de síndrome metabólica. *Rev. bras. ginecol. obstet*, v. 35, n. 7, p. 301-308, 2013.

SPORNITZ, U. M.; SOCIN, CD; DRAVID, A. A. Estrous stage determination in rats by means of scanning electron microscopic images of uterine surface epithelium. *The Anatomical Record*, v. 254, n. 1, p. 116-126, 1999.

TOZO, I. *et al.* Disfunção sexual feminina: a importância do conhecimento e do diagnóstico pelo ginecologista. *Arquivos de Medicina Hospitalar*, v. 52, n. 3, p. 94-99, 2007.

TRAISH, A. M. *et al.* Female genital sexual arousal: biochemical mediators and potential mechanisms of dysfunction. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, v. 1, n. 1, p. 91-97, 2004. ISSN 1740-6765.

VAN DE GRAAFF, K. M. *Anatomia humana*. 6. ed. São Paulo: Manole, 2003. 900 p.

VINCENT, Ann; FITZPATRICK, Lorraine A. Soy isoflavones: are they useful in menopause?. In: *Mayo Clinic Proceedings*. Elsevier, 2000. p. 1174-1184.

VILELA, Márcio Gomes *et al.* Determinação do ciclo estral em ratas por lavado vaginal. *Femina*, v. 35, n. 10, p. 667-670, 2012.

VANHOUTTE, P. Ageing and endothelial dysfunction. *European Heart Journal-Supplements*, v. 4, p. A8, 2002.

WANNMACHER, Lenita; LUBIANCA, Jaqueline Neves. Terapia de reposição hormonal na menopausa: evidências atuais. *Uso racional de medicamentos: temas selecionados*, v. 1, n. 6, p. 1-6, 2004.

YAMAMOTO S1, KAWASHIMA T, KUNITAKE T, KOIDE S, FUJIMOTO H. The effects of replacing dihydropyridine calcium-channel blockers with angiotensin II receptor blocker on the quality of life of hypertensive patients. *Blood Press Suppl*. 2003 Dec;2:22-8.

YU, B. P.; CHUNG, H. Y. Stress resistance by caloric restriction for longevity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 928, n. 1, p. 39-47, 2001.

YU, J. *et al.* Endothelium derived nitric oxide synthase negatively regulates the PDGF-survivin pathway during flow-dependent vascular remodeling. *PLoS One*, v. 7, n. 2, p. e31495, 2012.

ZHANG *et al.* Effects of ipriflavone on postmenopausal syndrome and osteoporosis. Department of Obstetrics and Gynecology, Medical School, The Second Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, China. *Gynecological Endocrinology*, February 2010; 26(2): 76–80.

ZIMMERMAN, Margaret A.; HARRIS, Ryan A.; SULLIVAN, Jennifer C. Female spontaneously hypertensive rats are more dependent on ANG (1-7) to mediate effects of low-dose AT 1 receptor blockade than males. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, v. 306, n. 10, p. F1136-F1142, 2014.

9. ANEXO



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro - ICEB-II, Sala 29
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil
Fone (31) 3559-1368 Fax: (31) 3559-1370
Email: ceua@propp.ufop.br



CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo do projeto com uso de animais nº. **2015/42**, intitulado **"Avaliação da possível interação entre a candesartana e o fitoestrógeno "ipriflavona" na função sexual de ratas hipertensas SHR e normotensas WKY"**, que tem como responsável o/a Prof(a). Dr(a). **Romulo Leite**, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP – CEUA/UFOP, de acordo com tabela abaixo:

Dados dos Animais Aprovados			
Espécie/linhagem	N.º de Animais	Idade	Sexo
RATO SHR	96	04 MESES	FEMEAS
RATO KYOTO	96	04 MESES	FEMEAS

Restrição de dieta: () sim (X) não

Especificar:

Este Certificado expira em: 30/11/2017

Ouro Preto, 1 de dezembro de 2015.

Prof.ª Dr.ª Lenice Kappes Becker
Coordenadora da CEUA/UFOP