



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JAQUELINE COSTA CASTARDO DE PAULA

**EFEITOS DO ESTRÓGENO SOBRE ASPECTOS
CARDIOVASCULARES, AUTONÔMICOS E OXIDATIVOS DE
RATAS ENDOTOXÊMICAS:
PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO**

Londrina
2016

JAQUELINE COSTA CASTARDO DE PAULA

**EFEITOS DO ESTRÓGENO SOBRE ASPECTOS
CARDIOVASCULARES, AUTONÔMICOS E OXIDATIVOS DE
RATAS ENDOTOXÊMICAS:
PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO**

Tese apresentada ao Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Doutora em Ciências Fisiológicas, pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Marli Cardoso Martins Pinge.

Londrina
2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

D278e De Paula, Jaqueline Costa Castardo.

Efeitos do estrógeno sobre aspectos cardiovasculares, autonômicos e oxidativos de ratas endotoxêmica: papel do óxido nítrico / Jaqueline Costa Castardo De Paula. – Londrina, 2016.
129 f.: il.

Orientador: Marli Cardoso Martins Pinge.

Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Estrógenos – Teses. 2. Hormônios esteroidianos – Teses. 3. Hormônios esteroidianos – Teses. 4. Pressão arterial – Teses. I. Pinge, Marli Cardoso Martins. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Título.

CDU 612.621.31

JAQUELINE COSTA CASTARDO DE PAULA

**EFEITOS DO ESTRÓGENO SOBRE ASPECTOS
CARDIOVASCULARES, AUTÔNOMICOS E OXIDATIVOS DE RATAS
ENDOTOXÊMICAS:
PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO**

Tese apresentada ao Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Doutora em Ciências Fisiológicas, pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Marli Cardoso Martins
Pinge
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Angelina Zanesco
Universidade Estadual Paulista – UNESP

Prof. Dr. Fabio Henrique Kwasniewski
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Gislaine Garcia Pelosi Gomes
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Daniela Cristina Ceccatto Gerardin
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 05 de Agosto de 2016.

AGRADECIMENTOS

A Deus, força criadora de todos os seres e coisas, meus sinceros agradecimentos por mais esta oportunidade de crescimento, de me tornar uma pessoa melhor e de contribuir para o conhecimento científico.

Meu muito obrigada às ratinhas, por servirem de instrumento ao meu aprendizado e à geração de conhecimento. Obrigada pela sua imprescindível contribuição para a ciência.

Agradeço aos meus pais, por me ensinarem a dar meu máximo, me esforçar para fazer bem feito tudo o que me propuser a fazer, sem nunca perder a fé em mim e na presença de Deus em minha vida.

Agradeço ao meu marido Flávio, meu grande amor, meu melhor amigo. Nestes quase 18 anos de companheirismo, você me ajudou a passar por todos os desafios que a vida impôs, com mais paz e menos peso... você me torna uma pessoa melhor a cada dia. Muito obrigada, amo você.

Agradeço à minha orientadora, professora Marli, primeiramente por me aceitar, pois vim de um longo tempo afastada das atividades de laboratório e comecei do zero na pesquisa cardiovascular. Você, ainda na graduação, me deu a base de fisiologia que carrego até hoje e agora, vários anos depois, veio me ensinar as primeiras técnicas do laboratório, me auxiliou no entendimento das metodologias, permitiu que eu apresentasse meu trabalho em língua estrangeira em outro país e me guiou por este mundo desconhecido. Saio de seu laboratório uma pessoa melhor, uma mulher mais madura, cientista. Obrigada.

Agradeço à Universidade Estadual de Londrina, minha casa desde a graduação, local que amo a ponto de querer passar toda minha vida profissional. Obrigada por me acolher durante mais estes 4 anos da minha vida acadêmica.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos e pela taxa de bancada que auxiliaram financeiramente a realização da maior parte desta tese, e possibilitaram que eu levasse meus resultados a congressos em diversas regiões desse país e, melhor ainda, ao exterior! Graças ao CNPq e à minha orientadora, foi possível levar meus resultados para uma apresentação oral no congresso internacional Experimental Biology, em Boston, nos EUA. Muito obrigada.

Agradeço às alunas de iniciação científica Lorena e Blenda. A Lorena chegou quando eu estava começando e esteve comigo durante todo o processo de aprendizado das técnicas. A Blenda veio mais tarde, mas também vivenciou com intensidade a vida experimental e a forma como eu lido com a mesma. Obrigada meninas, muito obrigada por suportarem meu mau-humor, por doarem seus horários de almoço para que eu tivesse o meu, por se dedicarem ao meu projeto e ao laboratório. Vocês são joias preciosas, nunca percam essa vontade de aprender e de ajudar. Desejo que vocês tenham alunas como vocês para acompanhar seus projetos, pois vocês merecem o melhor.

Muito obrigada ao professor Phileno Pinge Filho, por colaborar no meu trabalho através das dosagens de nitrito, conduzidas por suas competentes e prestativas alunas Rosiane Valeriano da Silva e Nagela Ghabdan Zanluqui, às quais também registro meu agradecimento, inclusive pela generosidade dedicada. Também agradeço ao professor Phileno por ser essa pessoa querida e encorajadora. Tive a oportunidade de tê-lo como professor durante a graduação, tê-lo como colega durante minhas atividades como docente desta universidade, e tê-lo como professor novamente, durante as colaborações na execução desta tese. Nas oportunidades que tive para conviver com você, meus dias foram mais leves professor, sem que eu deixasse de aprender pelo caminho. Obrigada.

Agradeço ao professor Décio Sabbatini Barbosa, pela colaboração nas dosagens bioquímicas e às suas alunas Luciana Higachi e Carine Coneglian de Farias, que executaram as técnicas e, juntamente com o professor, sempre estiveram à disposição para sanar todas as dúvidas que surgiram no decorrer do meu trabalho. Inclusive, foi muito especial ter a Luciana como colaboradora, pois ela foi aluna de uma das minhas primeiras turmas quando me tornei professora de farmacologia. Fiquei muito orgulhosa por reencontrá-la na posição de colega de pesquisa. Obrigada pela ajuda tão amigável de todos vocês!

Aos colegas de laboratório, muito obrigada pelo companheirismo durante os experimentos, pelos conselhos e dicas sob a lâmpada fluorescente, pela colaboração mútua e pelas risadas durante um bolo com café entre um experimento e outro. Sem dúvida, vocês tornam a vida mais leve e o trabalho mais agradável.

Obrigada ao Daniel Penteado Martins Dias, pelas ajudas durante a execução das análises espectrais. Sempre à disposição para sanar dúvidas metodológicas e conceituais. Um colega muito competente.

Agradeço à minha irmã Patrícia, por ser minha irmã, e pelo exemplo de dedicação, profissionalismo e luta pelos ideais que cultivamos.

Agradeço à minha querida amiga e eterna mestra Estefânia, que ainda na graduação, me apresentou o amor ao conhecimento, o amor à farmacologia, o amor ao ensino. Obrigada por enxergar na professora temporária uma mulher que precisava alçar vãos maiores, que precisava fazer um doutorado, e por assim me aconselhar... obrigada "prof" querida, sem seus conselhos, eu talvez estivesse sem iniciar o doutorado até hoje.

Às amigas farmacologistas, obrigada por me ajudarem nas angústias diárias, com seus conhecimentos, com o ombro amigo, o olhar acolhedor, um abraço apertado. Vocês são ótimas! Um obrigada especial à parceira Graziela, a amiga de infância que conheci aos 30 anos! Amo você amiga.

Obrigada à minha prima Haline, minha segunda irmã, por sempre estar ao meu lado. Você acompanhou de perto a batalha que foi o mestrado, e agora me ajudou a manter a forma durante o doutorado... rss. Obrigada "amigo", espero poder retribuir sua amizade diariamente e ter você por perto sempre!

Agradeço a todos os professores e professoras, colegas de pós-graduação, funcionários e funcionárias do departamento. Obrigada pela sua presença, pelo seu auxílio, pelo coleguismo.

Obrigada aos meus orientadores de mestrado, Daniela Cabrini e Michel Otuki. O mestrado não foi fácil, mas vocês fizeram parte dos momentos que me inspiraram a retomar a caminhada científica. Nunca me esquecerei das pessoas amigas e dos mestres que vocês foram para mim.

Obrigada ao meu cunhado/terapeuta/pai Antônio Caetano de Paula Jr, pelo apoio emocional, psicológico e espiritual durante mais esta importante etapa da minha vida.

Enfim, agradeço a todos os familiares e amigos que sempre perguntaram como eu estava e como estava a tese... graças a Deus e a todas essas pessoas que Ele colocou na minha vida a tese está aqui! Pronta!

*Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é
senão uma gota de água no mar.*

Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.

Madre Teresa de Calcutá

CASTARDO-DE PAULA, Jaqueline Costa. **Efeitos do estrógeno sobre aspectos cardiovasculares, autonômicos e oxidativos de ratas endotoxêmicas:** papel do óxido nítrico. 2016. 131 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

A função cardiovascular apresenta diferenças relacionadas ao sexo. A modulação autonômica cardíaca é responsiva aos níveis de hormônios ovarianos, e o estrógeno aumenta a biodisponibilidade de óxido nítrico (NO). Considerando as diferenças entre gêneros nos processos patológicos, fêmeas apresentam menor susceptibilidade à sepse e maior taxa de sobrevivência. Contudo, poucos estudos avaliaram a importância do estrógeno em fêmeas nas respostas cardiovasculares, autonômicas e em parâmetros oxidativos antes e no início da endotoxemia. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo geral investigar aqueles parâmetros em ratas adultas jovens não anestesiadas, na endotoxemia induzida por lipopolissacarídeo (LPS). Em paralelo, as vias constitutiva e induzível da enzima óxido nítrico sintase (NOS) também foram avaliadas, cNOS e iNOS, respectivamente. Avaliou-se as respostas cardiovasculares em fêmeas no estro (SHAM), comparadas às ovariectomizadas (OVX) ou OVX tratadas com estradiol (OVX+E). Efetuou-se a análise espectral da variabilidade da pressão sistólica (VPS) e da frequência cardíaca (VFC), bem como a análise do barorreflexo espontâneo. Foram medidos e comparados os níveis de óxido nítrico (NO), capacidade antioxidante total (TRAP), hidroperóxidos de lipídios (LOOH) e a atividade da paraoxonase 1 (PON1), no plasma dos animais experimentais, tratados previamente com L-nitro-arginina-metil-éster (L-NAME), S-Metilisotiouréia (SMT) ou salina. Para isto, ratas Wistar (220 a 270 g), 8 semanas após a ovariectomia, com ou sem tratamento com estradiol 1mg/Kg/dia, ou falsa OVX (SHAM), foram submetidas à cateterização da artéria e veia femurais e, após 24 horas, tiveram avaliados os parâmetros cardiovasculares antes e após a injeção de LPS (5mg/Kg, IV), precedida por injeção de salina (0,9%), L-NAME (10mg/Kg), ou SMT (3 mg/Kg). 2 horas após o LPS, foram colhidas amostras de plasma para medida de níveis de nitrito, LOOH, TRAP e atividade da PON1. No estado basal, a OVX causou redução da SBR, juntamente com aumentos na VPS e do seu componente de baixa frequência na análise espectral (LF). O tratamento com estradiol não preveniu os efeitos da OVX sobre a VPS, promoveu pouca melhora na sensibilidade barorreflexa (SBR), e gerou maior frequência cardíaca (FC) nos animais. Após 2 horas de registro pressórico, as ratas que receberam salina apresentaram redução da SBR. Tanto a via constitutiva quanto a induzível mostraram-se importantes no controle pressórico das fêmeas dos três grupos, após 2 horas. O L-NAME promoveu aumento da PAM e redução do LF da VPS, sendo o aumento da pressão arterial média (PAM) menor nas OVX, que também apresentaram redução da atividade da PON1. A diminuição da atividade da PON1 pelo L-NAME foi prevenida nas OVX+E. A SMT promoveu aumento da PAM e do LF da VPS nos três grupos experimentais, e as OVX+E apresentaram menores níveis de NO que as OVX. Assim, do ponto de vista fisiológico, o estradiol mostra-se importante para a manutenção cardiovascular das fêmeas, porém não preveniu o aumento da modulação simpática. As NOS parecem exercer funções opostas sobre o sistema nervoso autônomo e, bioquimicamente, enquanto as cNOS contribuem à

manutenção da atividade da PON1 em ratas OVX, a iNOS mantém os níveis de NO nas ratas OVX+E. Após 2 horas de LPS, as ratas responderam com manutenção da PAM, taquicardia, maior VPS, e SBR reduzida. O pré-tratamento com L-NAME fez com que as ratas dos 3 grupos apresentassem queda da PAM após 2 horas de administração do LPS, com redução do LF da VPS e taquicardia. As OVX+E apresentam aumento da PON1 após L-NAME-LPS, em comparação com as OVX. De modo geral, a SMT fez com que as fêmeas dos 3 grupos respondessem igualmente a 2 horas de endotoxemia, com maior LF da VPS, taquicardia, aumento do LFnu da VFC, da razão LF/HF, e redução da SBR. Os 3 grupos também apresentaram aumento da TRAP ao LPS quando pré-tratados com SMT, enquanto as OVX+E apresentaram redução do LOOH. As SHAM apresentaram menores níveis de NO após o LPS quando pré-tratadas com L-NAME ou SMT, em comparação com o pré-tratamento com salina. Os dados de inibição das vias constitutiva e induzível da NOS na endotoxemia sugerem que as cNOS seriam responsáveis pela proteção contra a hipotensão, enquanto a iNOS, seria responsável pela inibição simpática e pelo consumo das reservas antioxidantes das fêmeas na endotoxemia, independente dos hormônios ovarianos. Mais estudos mostram-se necessários ao entendimento das relações entre a atividade da PON1, as NOS e os níveis de estradiol, em estados fisiológicos e patológicos.

Palavras-chave: Lipopolissacarídeo. Óxido nítrico sintase. Pressão arterial média. Endotoxemia. Fêmeas.

CASTARDO-DE PAULA, Jaqueline Costa. **Estrogen effects on cardiovascular and oxidative aspects of female rats under Ips endotoxemia**: no participation. 2016. 131 p. Thesis (Docoral in Physiological Sciences) – State University of Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

Cardiovascular function displays sex-related differences. Cardiac autonomic modulation responds to ovarian hormone levels, and estrogen increases nitric oxide (NO) bioavailability. Considering gender differences in pathological processes, females have a minor susceptibility to sepsis and a higher survival rate. However, few studies have evaluated the importance of estrogen in females in cardiovascular, autonomic and oxidative parameters before and at the beginning of endotoxemia. Thus, this study aimed to investigate those parameters in young adult rats not anesthetized under endotoxemia induced by lipopolysaccharide (LPS). In parallel, the constitutive and inducible pathways of nitric oxide synthase were also evaluated, cNOS and iNOS, respectively. The cardiovascular responses were evaluated in females in estrus (SHAM), compared to ovariectomized (OVX) or OVX treated with estradiol (OVX + E). The spectral analysis of the variability of systolic pressure (VPS) and heart rate variability (HRV), as well as the analysis of the spontaneous baroreflex were performed. Nitric oxide (NO) levels, total antioxidant capacity (TRAP), lipid hydroperoxides (LOOH) and paraoxonase 1 (PON1) activity were measured and compared, from the plasma of the experimental animals pretreated with L-NG-Nitroarginine methyl ester (L-NAME), S-Methylisothiourea (SMT) or saline. For this, Wistar rats (220 to 270g), 8 weeks after ovariectomy, with or without treatment with estradiol 1 mg / kg / day, or false OVX (SHAM) were submitted to the catheterization of the femoral artery and vein and, after 24 hours, their cardiovascular parameters were evaluated before and after the injection of LPS (5 mg / kg, IV) preceded by an injection of saline (0.9%), or L-NAME (10mg / kg), or SMT (3 mg / kg). 2 hours after LPS, plasma samples were collected for measurement of nitrite levels LOOH, TRAP and PON1 activity. At baseline, the OVX caused reduction of baroreflex sensitivity (BRS), along with increases in VPS and in low-frequency component in the spectral analysis (LF). Treatment with estradiol did not prevent the effects of OVX on the VPS, promoted little improvement on BRS, and caused greater heart rate (HR) in OVX + E animals. After 2 hours of pressure record, the rats that received saline had a decrease on BRS. Both constitutive and inducible pathways have shown to be important in blood pressure control of females from the three groups, after 2 hours. The L-NAME promoted an increase in mean arterial pressure (MAP) and reduction of LF of VPS, being the increased smaller in OVX, which also showed a reduction of PON1 activity. The decreased activity of PON1 by L-NAME was prevented in OVX + E. The SMT promoted increased PAM and LF of VPS in the three experimental groups and the OVX + E had lower levels of NO when compared with OVX. From a physiological point of view, estradiol appears to be important for cardiovascular maintenance of female rats, though did not prevent the increase of sympathetic modulation. The NOS seem to have opposite functions on the autonomic nervous system and, biochemically, while cNOS contribute to maintaining the activity of PON1 in OVX rats, iNOS maintains levels of NO in rats OVX + E. The rats responded after 2 hours of LPS with maintenance of MAP, tachycardia, increased VPS and reduced

SBR. Pretreatment with L-NAME caused the rats of the three groups to present a fall in MAP after two hours of LPS administration, reducing the LF of VPS and tachycardia. OVX + E show increased PON1 after L-NAME-LPS compared to the OVX. In general, the SMT made females of the three groups to respond equally to 2 hours of endotoxemia, with greater LF of VPS, tachycardia, increased LFnu of HRV, the LF / HF ratio, and reduction of BRS. The three groups also showed increased TRAP to LPS when pretreated with SMT while OVX + E showed reduction in LOOH. The SHAM showed lower levels of NO after LPS when pretreated with L-NAME or SMT, when compared to pretreatment with saline. The data of inhibition of constitutive and inducible pathways of NOS in endotoxemia suggest that cNOS would be responsible for protection against hypotension, whereas iNOS, would be responsible for sympathetic inhibition and consumption of antioxidant reserves of females in endotoxemia, independent of the ovarian hormones. More studies are necessary for the understanding of the relationship between the activity of PON1, NOS and estradiol levels, at physiological and pathological states. As well as it is necessary to clarify the factor, regardless of the ovarian hormones, that predominates in cardiovascular protection of females in endotoxemia.

Keywords: Lipopolysaccharide. Nitric oxide synthase. Mean arterial pressure. Endotoxemia. Females.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** –Efeitos de 8 semanas de tratamento diário com estradiol (1 mg/Kg) sobre o peso do útero (a), o ganho de peso corporal (b), o comprimento da tíbia (c) e a relação útero/tíbia (d).....40
- Figura 2** –PAM de ratas adultas após a injeção (IV) de inibidores da NOS ou salina: (a) injeção de salina 0,9%; (b) injeção de L-NAME (10 mg/Kg); (c) injeção de SMT (3 mg/Kg).44
- Figura 3** –FC de ratas adultas após a injeção (IV) de inibidores da NOS ou salina: (a) injeção de salina 0,9%; (b) injeção de L-NAME (10 mg/Kg); (c) injeção de SMT (3 mg/Kg).45
- Figura 4** – Parâmetros pressóricos de ratas adultas antes e após a injeção de salina 0,9%: (a) valores absolutos de PAM (mmHg); variabilidade da pressão sistólica: (b) variância, (c) componente de baixa frequência (LF).46
- Figura 5** –Parâmetros pressóricos de ratas adultas antes e após a injeção de L-NAME (10mg/Kg): (a) valores absolutos de PAM (mmHg); variabilidade da pressão sistólica: (b) variância, (c) componente de baixa frequência (LF)48
- Figura 6** –Parâmetros pressóricos de ratas adultas antes e após a injeção de SMT (3mg/Kg): (a) valores absolutos de PAM (mmHg); variabilidade da pressão sistólica: (b) variância, (c) componente de baixa frequência (LF)50
- Figura 7** –Parâmetros cardíacos de ratas adultas antes e após a injeção de salina 0,9%: (a) valores absolutos de FC (bpm); variabilidade da frequência cardíaca: (b) Log da variância, (c) componente de baixa frequência normalizado (LFnu), (d) componente de alta frequência normalizado (HFnu) e (e) razão LF/HF51
- Figura 8** –Parâmetros cardíacos de ratas adultas antes e após a injeção de L-NAME (10mg/Kg): (a) valores absolutos de FC (bpm); variabilidade da frequência cardíaca: (b) Log da variância, (c) componente de baixa frequência normalizado (LFnu), (d) componente de alta frequência normalizado (HFnu) e (e) razão LF/HF54

- Figura 9** – Parâmetros cardíacos de ratas adultas antes e após a injeção de SMT (3mg/Kg): (a) valores absolutos de FC (bpm); variabilidade da frequência cardíaca: (b) Log da variância, (c) componente de baixa frequência normalizado (LFnu), (d) componente de alta frequência normalizado (HFnu) e (e) razão LF/HF57
- Figura 10** – Efeitos do tratamento hormonal diário (estradiol 1 mg/kg) sobre parâmetros bioquímicos 2 horas após a administração salina 0,9%: (a) níveis de nitrito, (b) capacidade antioxidante total plasmática (TRAP), (c) atividade da enzima paraoxonase 1 (PON1), (d) níveis de hidroperóxidos no plasma (LOOH)58
- Figura 11** – Efeitos do tratamento hormonal diário (estradiol 1 mg/kg) sobre parâmetros bioquímicos 2 horas após a administração de L-NAME (10 mg/Kg): (a) níveis de nitrito, (b) capacidade antioxidante total plasmática (TRAP), (c) atividade da enzima paraoxonase 1 (PON1), (d) níveis de hidroperóxidos no plasma (LOOH).....59
- Figura 12** – Efeitos do tratamento hormonal diário (estradiol 1 mg/kg) sobre parâmetros bioquímicos 2 horas após a administração de SMT (3 mg/Kg): (a) níveis de nitrito, (b) capacidade antioxidante total plasmática (TRAP), (c) atividade da enzima paraoxonase 1 (PON1), (d) níveis de hidroperóxidos no plasma (LOOH)60
- Figura 13** – Efeitos do LPS (5 mg/Kg), após 2 horas, sobre os parâmetros pressóricos de ratas adultas: (a) valores absolutos de PAM (mmHg); diferenças nos parâmetros de variabilidade da pressão sistólica em % do tempo zero (efeito da salina e administração de LPS): (b) variância e (c) componente de baixa frequência (LF)64
- Figura 14** – Efeitos do LPS (5 mg/Kg), após 2 horas, sobre os parâmetros cardíacos de ratas adultas: (a) valores absolutos de FC (bpm); diferenças nos parâmetros de variabilidade da FC em % do tempo zero (efeito da salina e administração de LPS): (b) log da variância, (c) componente de baixa frequência normalizado (LFnu), (d) componente de alta frequência normalizado (HFnu) e (e) razão LF/HF66
- Figura 15** – Efeitos do LPS (5 mg/Kg), após 2 horas, sobre os parâmetros

pressóricos de ratas adultas pré-tratadas com L-NAME (10 mg/Kg): (a) valores absolutos de PAM (mmHg); diferenças nos parâmetros de variabilidade da pressão sistólica em % do tempo zero (efeito do L-NAME e administração de LPS): (b) variância e (c) componente de baixa frequência (LF).....67

Figura 16 – Efeitos do LPS (5 mg/Kg), após 2 horas, sobre os parâmetros cardíacos de ratas adultas pré-tratadas com L-NAME (10 mg/Kg): (a) valores absolutos de FC (bpm); diferenças nos parâmetros de variabilidade da FC em % do tempo zero (efeito do L-NAME e administração de LPS): (b) log da variância, (c) componente de baixa frequência normalizado (LFnu), (d) componente de alta frequência normalizado (HFnu) e (e) razão LF/HF68

Figura 17 – Efeito do LPS (5 mg/Kg), após 2 horas, sobre a sensibilidade barorreflexa de ratas adultas pré-tratadas com L-NAME (10mg/Kg) ou solução fisiológica de NaCl (0,9%): (a) ganho total salina+LPS, (b) índice de efetividade barorreflexa (IEB) total salina+LPS, (c) ganho total L-NAME+LPS, (d) índice de efetividade barorreflexa (IEB) total L-NAME+LPS.....70

Figura 18 – Efeitos do tratamento hormonal diário (estradiol 1 mg/kg) sobre parâmetros bioquímicos 2 horas após a administração de LPS (5 mg/Kg): (a) níveis de nitrito, (b) capacidade antioxidante total plasmática (TRAP), (c) atividade da enzima paraoxonase 1 (PON1), (d) níveis de hidroperóxidos no plasma (LOOH)73

Figura 19 – Efeitos do LPS (5 mg/Kg), após 2 horas, sobre os parâmetros pressóricos de ratas adultas: (a) valores absolutos de PAM (mmHg); diferenças nos parâmetros de variabilidade da pressão sistólica em % do tempo zero (efeito da salina e administração de LPS): (b) variância e (c) componente de baixa frequência (LF)77

Figura 20 – Efeitos do LPS (5 mg/Kg), após 2 horas, sobre os parâmetros cardíacos de ratas adultas: (a) valores absolutos de FC (bpm); diferenças nos parâmetros de variabilidade da FC em % do tempo zero (efeito da salina e administração de LPS): (b) variância, (c) componente de baixa frequência normalizado

(LFnu), (d) componente de alta frequência normalizado (HFnu) e (e) razão LF/HF	79
Figura 21 – Efeitos do LPS (5 mg/Kg), após 2 horas, sobre os parâmetros pressóricos de ratas adultas pré-tratadas com SMT (3 mg/Kg): (a) valores absolutos de PAM (mmHg); diferenças nos parâmetros de variabilidade da pressão sistólica em % do tempo zero (efeito do SMT e administração de LPS): (b) variância e (c) componente de baixa frequência (LF).....	81
Figura 22 – Efeitos do LPS (5 mg/Kg), após 2 horas, sobre os parâmetros cardíacos de ratas adultas pré-tratadas com SMT (3 mg/Kg): (a) valores absolutos de FC (bpm); diferenças nos parâmetros de variabilidade da FC em % do tempo zero (efeito do SMT e administração de LPS): (b) variância, (c) componente de baixa frequência normalizado (LFnu), (d) componente de alta frequência normalizado (HFnu) e (e) razão LF/HF	83
Figura 23 – Efeito do LPS (5 mg/Kg), após 2 horas, sobre a sensibilidade barorreflexa de ratas adultas pré-tratadas com SMT (3mg/Kg) ou solução fisiológica de NaCl (0,9%): (a) ganho total salina-LPS, (b) índice de efetividade barorreflexa (IEB) total salina-LPS, (c) ganho total SMT-LPS, (d) índice de efetividade barorreflexa (IEB) total SMT-LPS	84
Figura 24 – Efeitos do tratamento hormonal diário (estradiol 1 mg/kg) sobre parâmetros bioquímicos 2 horas após a administração de LPS (5 mg/Kg): (a) níveis de nitrito, (b) capacidade antioxidante total plasmática (TRAP), (c) atividade da enzima paraoxonase 1 (PON1), (d) níveis de hidroperóxidos no plasma (LOOH)	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros cardiovasculares basais: variáveis hemodinâmicas, variabilidade da frequência cardíaca, variabilidade da pressão sistólica e sensibilidade barorreflexa	42
Tabela 2 – Variabilidade da frequência cardíaca 2 horas após a administração de inibidores da NOS ou salina 0,9%.....	53
Tabela 3 – Barorreflexo espontâneo 2 horas após a administração de NaCl 0,9%	53
Tabela 4 –Barorreflexo espontâneo 2 horas após a administração de SMT.....	55
Tabela 5 – Variáveis hemodinâmicas, variabilidade da frequência cardíaca, variabilidade da pressão sistólica e sensibilidade barorreflexa antes da injeção de LPS: Resposta ao L-NAME	63
Tabela 6 – Porcentagem da variabilidade da frequência cardíaca 2 horas após a administração de LPS (5 mg/kg)	71
Tabela 7 – Variáveis hemodinâmicas, variabilidade da frequência cardíaca, variabilidade da pressão sistólica e sensibilidade barorreflexa antes da injeção de LPS: Resposta ao SMT	75
Tabela 8 – Porcentagem da variabilidade da frequência cardíaca 2 horas após a administração de LPS (5 mg/kg)	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSV	balanço simpátovagal
CEUA	comissão de ética no uso de animais
cNOS	enzimas NOS constitutivas ou cálcio-dependentes (eNOS e nNOS)
ECA	enzima conversora da angiotensina
eNOS	enzima óxido nítrico sintase endotelial
EROx	espécie reativa de oxigênio
ER α	receptor nuclear de estrógeno tipo alfa
ER β	receptor nuclear de estrógeno tipo beta
FC	frequência cardíaca
GPER ou GPR30	receptor de estrógeno acoplado à proteína G
HF	componente de alta frequência na análise espectral
IEB	índice de efetividade barorreflexa
IL-6	interleucina-6
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
IP	intervalo de pulso
IP	via intraperitoneal
IV	via intravenosa
LF	componente de baixa frequência na análise espectral
L-NAME	L-nitro-arginina-metil-éster
LOOH	hidroperóxidos de lipídios
LPS	lipopolissacarídeo
MLV	músculo liso vascular
nNOS	óxido nítrico sintase neuronal

NO	óxido nítrico
NO ₂ ⁻	nitrito
NOS	enzimas óxido nítrico sintase
OVX	ovariectomizadas e ovariectomia
PA	pressão arterial
PAM	pressão arterial média
PAS	pressão arterial sistólica
PON1	enzima paraoxonase 1
RVLM	bulbo ventrolateral rostral
SBR	sensibilidade barorreflexa
SCV	sistema cardiovascular
SHAM	animais controle do procedimento cirúrgico, sem retirada dos ovários
SHR	ratos espontaneamente hipertensos
SMT	S-Metilisotiuréia
SNA	sistema nervoso autônomo
SRA	sistema renina-angiotensina
TNF	fator de necrose tumoral
TRAP	capacidade antioxidante total no plasma
UEL	universidade estadual de Londrina
VFC	variabilidade da frequência cardíaca
VO	via oral
VPS	variabilidade da pressão sistólica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	SISTEMA CARDIOVASCULAR E ESTRADIOL	21
1.2	MODULAÇÃO AUTÔNOMICA CARDIOVASCULAR E ESTRADIOL	23
1.3	ÓXIDO NÍTRICO E ESTRADIOL.....	25
1.4	ESTRESSE OXIDATIVO E ESTRADIOL.....	26
1.5	INFLAMAÇÃO, SEPSE E ESTRADIOL.....	27
2	JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	29
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3	MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1	ANIMAIS	30
3.2	PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS E GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	30
3.2.1	Cirurgia de Ovariectomia e Grupos Experimentais	30
3.2.2	Cateterização de Artéria e Veia Femorais.....	31
3.3	REGISTRO DA PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA.....	31
3.4	DETERMINAÇÃO DA EFICÁCIA DA OVARIECTOMIA E DO TRATAMENTO HORMONAL	32
3.5	ANÁLISE ESPECTRAL DA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA E DA PRESSÃO SISTÓLICA	32
3.6	ANÁLISE DA SENSIBILIDADE BARORREFLEXA.....	33
3.7	ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	33
3.7.1	Dosagem de Nitrito (NO ₂ -).....	34
3.7.2	Determinação de Hidroperóxidos por Quimioluminescência (CL- LOOH).....	34
3.7.3	Determinação da Atividade da Paraoxonase 1 (PON1)	34
3.7.4	Capacidade Antioxidante Total Plasmática (TRAP)	35
3.8	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	35
3.8.1	Efeitos do Estrógeno Sobre Parâmetros Cardiovasculares, Autonômicos e Oxidativos de Ratas Submetidas à Inibição Aguda das Vias Constitutiva e Induzível da NOS.....	36
3.8.2	Participação do Estrógeno nos Efeitos do L-NAME Sobre Parâmetros	

Cardiovasculares, Autonômicos e Oxidativos de Ratas Submetidas à Endotoxemia por LPS	36
3.8.3 Participação do Estrógeno nos Efeitos da SMT Sobre Parâmetros Cardiovasculares, Autonômicos e Oxidativos de Ratas Submetidas à Endotoxemia por LPS	37
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
4 RESULTADOS	39
4.1 DETERMINAÇÃO DA EFICÁCIA DA OVARECTOMIA E DO TRATAMENTO HORMONAL.....	39
4.2 PARÂMETROS CARDIOVASCULARES E AUTONÔMICOS BASAIS	41
4.3 ESTUDO 1: EFEITOS DO ESTRÓGENO SOBRE PARÂMETROS CARDIOVASCULARES, AUTONÔMICOS E OXIDATIVOS DE RATAS SUBMETIDAS À INIBIÇÃO AGUDA DAS VIAS CONSTITUTIVA E INDUZÍVEL DA NOS	43
4.4 ESTUDO 2: PARTICIPAÇÃO DO ESTRÓGENO NOS EFEITOS DO L-NAME SOBRE PARÂMETROS CARDIOVASCULARES, AUTONÔMICOS E OXIDATIVOS DE RATAS SUBMETIDAS À ENDOTOXEMIA POR LPS.....	61
4.5 ESTUDO 3: PARTICIPAÇÃO DO ESTRÓGENO NOS EFEITOS DA SMT SOBRE PARÂMETROS CARDIOVASCULARES, AUTONÔMICOS E OXIDATIVOS DE RATAS SUBMETIDAS À ENDOTOXEMIA POR LPS	74
5 DISCUSSÃO	87
5.1 DETERMINAÇÃO DA EFICÁCIA DA OVARECTOMIA E DO TRATAMENTO HORMONAL	87
5.2 PARÂMETROS CARDIOVASCULARES E AUTONÔMICOS BASAIS.....	88
5.3 ESTUDO 1: EFEITOS DO ESTRÓGENO SOBRE PARÂMETROS CARDIOVASCULARES, AUTONÔMICOS E OXIDATIVOS DE RATAS SUBMETIDAS À INIBIÇÃO AGUDA DAS VIAS CONSTITUTIVA E INDUZÍVEL DA NOS	92
5.4 ESTUDO 2: PARTICIPAÇÃO DO ESTRÓGENO NOS EFEITOS DO L-NAME SOBRE PARÂMETROS CARDIOVASCULARES, AUTONÔMICOS E OXIDATIVOS DE RATAS SUBMETIDAS À ENDOTOXEMIA POR LPS.....	99
5.5 ESTUDO 3: PARTICIPAÇÃO DO ESTRÓGENO NOS EFEITOS DA SMT SOBRE PARÂMETROS CARDIOVASCULARES, AUTONÔMICOS E OXIDATIVOS DE RATAS SUBMETIDAS À ENDOTOXEMIA POR LPS	105

CONCLUSÕES GERAIS	112
REFERÊNCIAS.....	114
ANEXO	128
ANEXO A – Ofício de aprovação do projeto de tese pelo CEUA	129

1 INTRODUÇÃO

Muitos compostos, tanto esteroidais quanto não esteroidais, possuem atividade estrogênica. O 17 β -estradiol consiste no mais potente estrógeno de ocorrência natural em humanos, seguido pela estrona e pelo estriol. Fisiologicamente, os estrógenos são produzidos por aromatização dos androgênios, ou seja, a enzima aromatase é responsável pela síntese de estradiol a partir da testosterona, e estrona a partir da androstenediona (Loose e Stancel, 2006).

As ações estrogênicas são desencadeadas pela ativação de três tipos de receptores. Dois destes tipos interagem diretamente com o material nuclear das células em que se encontram: os receptores nucleares designados ER-alfa (ER α) e ER-beta (ER β) (Loose e Stancel, 2006). O terceiro tipo de receptor desencadeia as respostas mais rápidas do estrógeno através da ativação de uma proteína G e possui localização transmembrana, sendo denominado GPR30 (Revankar *et al.*, 2005) ou GPER, designação da International Union of Basic and Clinical Pharmacology (IUPHAR).

Os retículos endoplasmáticos das células ovarianas, do tecido adiposo, dos ossos, de várias regiões cerebrais e de muitos outros tecidos, são capazes de sintetizar estrógenos, mas em mulheres na pré-menopausa, os ovários são a principal fonte desse hormônio, tendo como produto secretado predominante, o estradiol (Loose e Stancel, 2006).

1.1 SISTEMA CARDIOVASCULAR E ESTRADIOL

É sabido que os sexos masculino e feminino apresentam diferenças na função cardiovascular, tanto do ponto de vista fisiológico quanto patológico (Hayward *et al.*, 2000; Reckelhoff, 2001). Mendelsohn e Karas (2005), revisando as bases celulares e moleculares das diferenças cardiovasculares entre os sexos, mostram que mulheres desenvolvem doenças cardíacas mais tardiamente que homens, e atribuem esta diferença à perda dos esteróides sexuais na menopausa.

Com efeito, em geral, homens apresentam maior risco para doenças renais e cardiovasculares quando comparados a mulheres na pré-menopausa em idades equivalentes e, fisiologicamente, a pressão sanguínea daqueles tende a ser maior (Reckelhoff, 2001). Mulheres na pré-menopausa também apresentam maior

vasodilatação dependente de endotélio, diferença que desaparece com a chegada da menopausa (Sarabi *et al.*, 1999). Experimentos *in vitro* revelaram um efeito vasodilatador do estrógeno, diretamente relacionado à ativação da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), pelo receptor ER α (Chen *et al.*, 1999).

Relacionando essas diferenças na fisiologia e patologia cardiovasculares com os efeitos do estrógeno e de seus receptores, sabe-se que além dos cardiomiócitos, tanto as células endoteliais quanto o músculo liso vascular (MLV) expressam receptores para os esteróides sexuais e a enzima aromatase (Mendelsohn e Karas, 2005).

Dean *et al.* (2005) levantaram a hipótese de que os efeitos do estradiol no sistema cardiovascular (SCV) poderiam ser mediados, ao menos em parte, por uma ação moduladora deste sobre o Sistema Renina-Angiotensina (SRA) local. O SRA é o principal regulador endócrino, parácrino e autócrino dentro do SCV. Seu principal peptídeo efetor, a angiotensina II, age no seu receptor AT1 para regular muitos processos cardiovasculares. Além de converter a angiotensina I em angiotensina II, a enzima conversora da angiotensina (ECA) também está envolvida no catabolismo do composto vasodilatador bradicinina, exercendo, dessa forma, função dupla na regulação das concentrações dos peptídios vasoativos. Somado ao seu papel regulador sobre processos homeostáticos, o SRA está implicado no início e/ou progressão de várias doenças do SCV (Brewster *et al.*, 2003).

Observa-se que os ovários e o estradiol são importantes para a atividade do SRA sobre os componentes do SCV; a ovariectomia de ratas Wistar, após 5 semanas, aumentou a expressão do AT1 e da ECA e a atividade desta no coração, rins, pulmões, aorta abdominal, adrenal, e em vários núcleos cerebrais de regulação cardiovascular. Estes efeitos foram prevenidos, em sua maioria, por doses fisiológicas de estradiol e foram revertidos em decréscimos dos níveis de ECA e AT1 pelo tratamento com altas doses de estradiol (implante subcutâneo com liberação de 250ug por dia, equivalente a uma dose de 1,11 mg/Kg/dia) (Dean *et al.*, 2005). E o aumento da PA, observado 4 meses após a OVX em ratas Sprague-Dawley, foi prevenido pelo tratamento com estradiol ou com losartana, um antagonista dos receptores AT1; enquanto a atividade plasmática da ECA não sofreu alterações em nenhum grupo (Ramos-Filho *et al.*, 2013).

1.2 MODULAÇÃO AUTONÔMICA CARDIOVASCULAR E ESTRADIOL

A modulação autonômica cardíaca responde aos níveis de hormônios ovarianos. Mulheres na pós-menopausa apresentam redução do componente vagal e maior do simpático, em comparação com mulheres antes da menopausa (Liu *et al.*, 2003), e a retirada dos ovários é capaz de alterar as funções autonômicas em mulheres nesta fase (Mercurio *et al.*, 2000). Corroborando a participação do estrógeno nessas alterações, Liu *et al.* (2003) observaram que o tratamento de mulheres na pós-menopausa com este hormônio restaura a modulação autonômica, facilitando a modulação vagal cardíaca e atenuando a simpática.

Um método que permite a análise do balanço simpatovagal (BSV) de forma não-invasiva é a análise espectral da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) (Petrofsky *et al.*, 2009) que também pode ser feita com a pressão arterial (PA) (Malliani *et al.*, 1991). Alterações nos parâmetros da VFC refletem principalmente o tônus autonômico e podem ter importantes implicações clínicas (Campos *et al.*, 2014).

Nessas análises, o BSV pode ser explorado pelo estudo da frequência cardíaca (FC) e da PA no domínio do tempo (em função do tempo) e no domínio da frequência, onde são descritos pela soma dos componentes oscilatórios elementares, definidos pela sua frequência e amplitude (Malliani *et al.*, 1991). No domínio do tempo, valores de variância correspondem ao poder total da análise espectral (Task_Force, 1996).

Malliani *et al.* (1991) revisaram dados que permitem afirmar que o ritmo respiratório da VFC, que corresponde ao componente espectral de alta frequência (HF), é um marcador da modulação vagal; o ritmo de baixa frequência (LF), correspondente às ondas vasomotoras e presente tanto na VFC como na variabilidade da PA é um marcador da modulação simpática; e existe uma relação recíproca entre estes dois ritmos que é semelhante à que caracteriza o BSV.

Um mecanismo fundamental de controle da PA é o barorreflexo, e um índice funcional importante deste mecanismo é a sensibilidade barorreflexa (SBR), usualmente expressa em termos das mudanças observadas na FC ou no intervalo R-R, divididos pela mudança correspondente na PA. Devido à relação

recíproca entre a FC e o intervalo R-R, tanto um como o outro podem ser usados nessa avaliação (Zamir *et al.*, 2014).

Kikuya *et al.* (2000) relatam que há uma correlação positiva entre a VFC e a SBR, e uma relação inversa entre a VFC e a variabilidade da PA que também reflete a função barorreflexa. A VFC é mediada reflexamente pela variabilidade da PA e faz um tamponamento desta, de modo que uma alta variabilidade da PA é mediada, ao menos em parte, por uma função barorreflexa cardíaca reduzida. Contudo, os autores afirmam que uma alta variabilidade da PA pode ser um fator de risco independente para a mortalidade cardiovascular (Kikuya *et al.*, 2000).

O gênero e, conseqüentemente, os hormônios femininos, têm mostrado importantes influências sobre a modulação autonômica cardiovascular, detectadas pela análise espectral. No que diz respeito à modulação cardíaca, observou-se que mulheres apresentam menores valores de LF e maiores valores de HF do que homens de grupos equivalentes (idade média de 27 anos) (Dutra *et al.*, 2013). Kuo *et al.* (2010) descreveram que ratas Wistar kyoto durante a fase estro do ciclo estral, comparadas às ratas ovariectomizadas (OVX) e na fase diestro, apresentam predominância do componente HF na análise espectral da VFC, que representa a modulação parassimpática. Também se observou que as variações no HF relacionadas ao ciclo, bem como o próprio ciclo estral desapareceram com a OVX (Kuo *et al.*, 2010), corroborando a participação do estradiol na modulação autonômica. Semelhantemente, Campos *et al.* (2014) demonstraram maiores valores de HF absoluto e de VFC em ratas Wistar tratadas com estradiol, tanto em dose alta quanto em dose baixa, quando comparadas com ratas OVX.

A SBR de ratas Wistar kyoto à fenilefrina é menor após 10 semanas de ovariectomia (Losurdo *et al.*, 2015). O declínio na função barorreflexa após a menopausa cirúrgica representa um risco de regulação neural anormal do coração e vasos, que leva ao aumento da variabilidade da PA, associado a uma maior incidência de eventos cardiovasculares (Kikuya *et al.*, 2000). Dias da Silva *et al.* (2009) ao trabalharem com ratas espontaneamente hipertensas (SHR) e Wistar kyoto concluíram que, embora o estrógeno não pareça exercer papel importante na manutenção em longo prazo da FC basal, este parece ser muito importante para a manutenção do balanço autonômico normal no coração de ratas SHR, uma vez que a OVX gerou uma predominância simpática no BSV, observada pelo aumento da

razão LF/HF, enquanto reduziu a SBR, atenuando o controle vagal cardíaco, sugerindo que os hormônios ovarianos, nesses animais, atuam sobre o controle autonômico cardíaco, reduzindo a atividade simpática e/ou aumentando a parassimpática (Dias Da Silva *et al.*, 2009).

EI-Mas e Abdel-Rahman (2009), trabalhando com ratas Sprague-Dawley, observaram que 13 semanas de OVX gerou reduções de curta duração na FC sem alterar a PA, reduziu o componente HF e aumentou o LF da VFC, aumentando, conseqüentemente a razão LF/HF, além de reduzir a SBR. Neste mesmo estudo, o tratamento com estradiol em período equivalente preveniu todas as alterações induzidas pela OVX na PA e atividade autonômica cardíaca, além de reduzir a PA, a FC, e as oscilações LF da pressão arterial sistólica (PAS), sugerindo uma redução no tônus vascular simpático pelo estrógeno (EI-Mas e Abdel-Rahman, 2009).

1.3 ÓXIDO NÍTRICO E ESTRADIOL

O estrógeno está entre os hormônios que aumentam a produção de óxido nítrico (NO) (Duckles e Miller, 2010). Os receptores ER α , ER β e GPER possuem mecanismos ligados ao NO, identificados em animais adultos. ER α co-localiza-se com a eNOS em células endoteliais (Knowlton e Lee, 2012) e a produção de NO a partir do endotélio também é o mecanismo da ação vasodilatadora do GPER. Isto pode ser observado com a menopausa, que leva à regulação negativa do receptor GPER em ratas, associada à redução da vasodilatação ao estradiol ou a agonistas ER (Prossnitz e Barton, 2014).

Além de estimular a expressão da eNOS e aumentar o NO no endotélio de artérias coronárias humanas (Duckles e Miller, 2010), o 17 β -estradiol também tem esses efeitos sobre a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) em cardiomiócitos (Nuedling *et al.*, 1999). E em artérias sem endotélio de camundongos selvagens, o estrógeno atenuou a vasoconstrição induzida por fenilefrina por uma via dependente de iNOS, uma vez que camundongos knockout para esta enzima não apresentaram este efeito (Zhu *et al.*, 2002). Estes mesmos autores relatam que, células de MLV humanas transfectadas com ER β , ativam o gene para a iNOS quando tratadas com estradiol, enquanto as células transfectadas com ER α inibem a expressão da iNOS, e células com os dois receptores apresentam uma ativação intermediária após o tratamento com estradiol.

Ainda, no músculo liso coronariano, White *et al.* (2010), que observaram a indução de relaxamento por ação do NO proveniente da óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), sobre canais de potássio ativados por voltagem e cálcio, verificaram que a principal fonte de NO estimulada por estrógeno nestas células, é a nNOS. Os dados do presente tópico demonstram que o estrógeno é capaz de estimular a síntese de NO a partir de todas as isoformas de NOS, promovendo vasodilatação tanto dependente como de forma independente de endotélio.

1.4 ESTRESSE OXIDATIVO E ESTRADIOL

De acordo com os dados apresentados, o estrógeno é um hormônio com ações importantes sobre o SCV, as quais tornam-se evidentes com a menopausa. Neste contexto é que ocorre a queda nos níveis de estrógeno, da mesma forma em que ocorrem algumas alterações inflamatórias no organismo (Knowlton e Lee, 2012); tais como o aumento nos níveis de fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina-6 (IL-6) (Donato *et al.*, 2008; Chung *et al.*, 2009), e aumento do estresse oxidativo (Jackson e Mcardle, 2011; Stice *et al.*, 2011); fatores estes que aumentam o risco de uma disfunção cardiovascular.

Segundo revisão feita por Knowlton e Lee (2012) o estrógeno promove estímulo indireto da expressão de genes antioxidantes e aumenta a atividade da eNOS, enquanto diminui a produção do ânion superóxido (Knowlton e Lee, 2012).

Dentro desta relação entre o estrógeno e os sistemas antioxidantes do organismo encontra-se a enzima paraoxonase-1 (PON1). Sintetizada pelo fígado, esta hidrolase existe associada à lipoproteína de alta densidade e funciona como um “bioscavenger”, um “limpador biológico” (Li *et al.*, 2013; Bojic *et al.*, 2014), e é considerada um marcador de risco cardiovascular. Já foi observado em humanos, que a menopausa cirúrgica reduz a atividade da enzima PON1 (Kumru *et al.*, 2005), enquanto o estradiol estimula a atividade da mesma (Ahmad e Scott, 2010).

Esses efeitos estrogênicos são promissores no que concerne ao tratamento das disfunções relacionadas ao estresse oxidativo.

1.5 INFLAMAÇÃO, SEPSE E ESTRADIOL

Fêmeas de todas as idades apresentam menores taxas de infecção e consequente mortalidade do que machos. Esta diferença significativa na resposta inflamatória entre os gêneros tem sido notada há tempos e evidências epidemiológicas e imunológicas apontam os hormônios femininos como protagonistas dessas diferenças na etiologia e curso dos processos inflamatórios (Straub, 2007).

Dentro desta área de estudos, Straub (2007) afirma que os estrógenos exercem um papel imunomodulador paradoxal e pouco definido. De um lado promovem inibição da reabsorção óssea e supressão da inflamação em vários modelos animais de doenças inflamatórias crônicas. Por outro lado, percebe-se o papel de suporte imunológico dos estrógenos no trauma / sepse e os efeitos pró-inflamatórios em algumas doenças autoimunes crônicas em seres humanos (Straub, 2007). Ademais, trabalhos como os citados por Sárvári *et al.* (2011), relacionam a presença dos estrogênios e/ou a atividade de seus receptores com efeitos neuroprotetores e moduladores da inflamação.

Um exemplo da interação entre estradiol e inflamação são as diferenças entre sexos que podem ser observadas na sepse (Angele *et al.*, 2014). A sepse e o choque endotóxico são importantes complicações médicas, com uma alta taxa de mortalidade, causadas pelo lipopolissacarídeo (LPS), um componente das bactérias gram-negativas (Bone, 1992), uma endotoxina utilizada como ferramenta experimental para mimetização da sepse *in vivo* e *in vitro* através da indução da endotoxemia.

Choque pode ser definido como a falência da circulação em prover sangue e oxigênio suficientes para os órgãos periféricos, sendo seus sintomas-chave hipotensão grave e vasoplegia, resultando na disfunção de um ou mais órgãos vitais (Cauwels, 2007). Martelli *et al.* (2014) afirmam que o organismo se defende do LPS, para evitar o choque, com um reflexo simpático poderoso que leva à supressão da resposta inflamatória sistêmica aguda, indicada pela redução dos níveis de TNF- α .

A literatura a respeito desse tema (Angele *et al.*, 2014) identifica o sexo feminino, tanto em humanos como em animais experimentais, com uma menor susceptibilidade à sepse e com uma maior taxa de sobrevivência. Losonczy *et al.*

(2000) observaram que fêmeas são resistentes ao desenvolvimento de choque por endotoxina (LPS), confirmando o dimorfismo sexual na endotoxemia.

Uma das principais causas de morte na sepse, é a hipotensão refratária que se desenvolve nas primeiras semanas durante o choque, onde o NO é um importante mediador. Segundo Cauwels (2007) o NO atua de modo ambíguo durante o choque séptico: a inibição da sua síntese restaura a PA, porém a inibição da NOS não melhora a evolução do quadro. Esta discrepância estaria relacionada às isoformas, com a eNOS provendo o NO essencial e protetor e a iNOS causando vasodilatação excessiva.

A iNOS é uma enzima cálcio independente cujo controle da produção de NO se faz durante a transcrição e a tradução pois, uma vez ativa, a iNOS produz NO até a completa depleção do substrato. O próprio LPS, dentre vários mediadores pró-inflamatórios, é um estímulo à atividade da iNOS (Lirk *et al.*, 2002).

A relação fisiológica entre estradiol e NO foi apresentada anteriormente, e esta relação com hormônios ovarianos também parece existir em processos patológicos. Animais OVX submetidas a diferentes modelos de inflamação mostraram, quando comparadas ao grupo com ovários, aumentos significativos na expressão de iNOS no fígado (Hassouna *et al.*, 2014), em células miocárdicas (Sakanashi *et al.*, 2013), e nos pulmões (Crisafulli *et al.*, 2009) por exemplo.

Nas primeiras horas da endotoxemia por LPS, Losonczy *et al.* (2000) observaram indução da expressão de iNOS na aorta e baço de ratos, enquanto as fêmeas não tiveram iNOS detectável na aorta. Contudo, mesmo resistentes ao desenvolvimento do choque endotoxêmico, as fêmeas apresentaram maiores níveis de NO após o LPS, e a OVX não alterou este parâmetro.

Esses dados sugerem a necessidade de maiores investigações sobre a relação entre as isoformas da NOS, os hormônios ovarianos e a proteção das fêmeas contra a hipotensão ao LPS.

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Poucos estudos avaliaram a importância do estrógeno em fêmeas nas respostas cardiovasculares e parâmetros oxidativos no início da endotoxemia. Ademais, até o momento em que este trabalho foi escrito, não havia estudos desses parâmetros em fêmeas ovariectomizadas não anestesiadas, tratadas ou não com estrógeno.

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo geral investigar o papel do estrógeno sobre parâmetros cardiovasculares, autonômicos e oxidativos de ratas adultas jovens não anestesiadas, antes e após a endotoxemia induzida por LPS. Em paralelo, as vias constitutiva e induzível da enzima óxido nítrico sintase também foram avaliadas.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos da ovariectomia e do tratamento com estrógeno sobre a pressão arterial e frequência cardíaca em animais não anestesiados;
- Realizar a análise espectral da variabilidade da frequência cardíaca e pressão arterial nas ratas ovariectomizadas, tratadas ou não com estrógeno, e comparar com fêmeas na fase estro do ciclo estral;
- Realizar a análise do barorreflexo espontâneo em ratas ovariectomizadas, tratadas ou não com estrógeno, e comparar com fêmeas na fase estro do ciclo estral;
- Estudar as variações hemodinâmicas após o bloqueio das vias constitutiva e induzível da enzima óxido nítrico sintase (NOS) nos modelos animais com L-NAME (L-nitro-arginina-metil-éster) e SMT (S-Metilisotiuréia);
- Estudar as variações hemodinâmicas após o desafio imunológico por LPS em ratas ovariectomizadas, tratadas ou não com estrógeno, e comparar fêmeas na fase estro do ciclo estral;
- Estudar as variações hemodinâmicas após o desafio imunológico por LPS, de ratas submetidas ao bloqueio prévio das vias constitutiva e induzível da enzima NOS nos modelos animais com L-NAME e SMT;
- Quantificar os níveis plasmáticos de nitrito, hidroperóxidos de lipídios, capacidade antioxidante total (TRAP), atividade da enzima paraoxonase 1 (PON1) nos animais submetidos ou não ao desafio imunológico.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Ratas Wistar adultas (12-13 semanas, n=4 a 11 animais por grupo), provenientes do biotério central da Universidade Estadual de Londrina (UEL), pesando entre 220-270 gramas no início do experimento foram mantidas em caixas de polipropileno (45X25X25 cm), em sala com temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) e ciclo claro/escuro de 12/12 horas com ração (Nuvilab CR-1; Nuvital[®], Colombo, Paraná, Brasil) e água a vontade.

Cada animal foi utilizado uma única vez e passou por período de aclimação na sala do experimento antes do início do mesmo, que foi conduzido durante a fase clara do ciclo claro/escuro. Ao término do experimento as ratas foram eutanasiadas com uma overdose de tiopental (Thiopentax[®], Cristália, São Paulo, Brasil).

Todos os procedimentos foram realizados em acordo com as diretrizes éticas da UEL e aprovados pela comissão de ética no uso de animais (CEUA), processo de número: 276.2013.81 (ANEXO).

3.2 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

3.2.1 Cirurgia de Ovariectomia e Grupos Experimentais

A cirurgia de ovariectomia foi realizada após indução de anestesia com xilazina e quetamina (100 e 20 mg/Kg, respectivamente, IP; Ceva Santé Animale[®], São Paulo, Brasil): os pelos da região dorsal, na altura das cristas ilíacas, foram removidos e duas incisões de aproximadamente dois centímetros foram realizadas de cada lado. A partir destas incisões, os ovários foram pinçados e removidos. Após este procedimento, as incisões foram suturadas e higienizadas com álcool 70%. Animais controle foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos, porém não tiveram os ovários removidos. Todos os animais receberam analgesia pós-cirúrgica com paracetamol (100 mg/Kg, VO).

24 horas após a cirurgia os animais foram divididos nos grupos experimentais com duração de tratamento de 8 semanas: OVX, OVX+E e SHAM.

- OVX (OVX controle): ratas ovariectomizadas que receberam o veículo de diluição do estradiol (óleo de amêndoas, Generophlora medicamentos LTDA, Londrina, Paraná, Brazil, 0,5 mL/Kg, VO, por dia);

- OVX+E (OVX tratados com estradiol): ratas ovariectomizadas que receberam valerato de estradiol (Hangzhou Hetd Industry Co., Zhejiang, China, 1mg/Kg, VO, por dia) (Ceylan-Isik *et al.*, 2009);

- SHAM: ratas controle do procedimento de ovariectomia, sem a retirada dos ovários e sem tratamento subsequente. Estas ratas tiveram seu ciclo estral monitorado através do lavado vaginal com solução fisiológica de cloreto de sódio (0,9%). O material coletado através de micropipeta foi transferido para uma lâmina de vidro para observação a fresco em microscópio óptico. O exame celular desta secreção permite diferenciar as fases do ciclo estral das ratas; as ratas do grupo SHAM foram utilizadas em estro-fisiológico (Kauser *et al.*, 1997).

As ratas dos grupos OVX e OVX+E receberam seus tratamentos diariamente entre 11:00 e 14:00 horas. O último tratamento ocorreu no dia anterior à cirurgia de cateterização.

3.2.2 Cateterização de Artéria e Veia Femorais

Oito semanas após a cirurgia de ovariectomia e 24 horas antes dos experimentos, sob anestesia com xilazina e quetamina, catéteres de polietileno foram inseridos na artéria e veia femorais e externalizados dorsalmente para posterior monitorização da PA e administração de drogas, respectivamente. 24 horas após a cateterização, quando completamente recuperados da anestesia e conscientes, os animais foram submetidos ao registro da pressão pulsátil de acordo com estudos prévios (Da Cunha *et al.*, 2014; Ariza *et al.*, 2015).

3.3 REGISTRO DA PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA

Os registros diretos da PA e FC foram realizados 24 horas após a cateterização, com os animais acordados e com livre movimentação, através da conexão de um cateter previamente implantado na artéria femoral a um sistema de transdução computadorizado (Powerlab[®], modelo MLT0380) conectado a um sistema de registro computadorizado (Powerlab/ADInstruments[®]), de acordo com trabalhos prévios do laboratório (Martins-Pinge *et al.*, 2005; 2007; Mehanna *et al.*,

2007; De Abreu *et al.*, 2009). Durante o período de registro os animais foram mantidos dentro de caixas individuais em ambiente silencioso, onde ocorreram os protocolos experimentais de 2 horas de duração.

3.4 DETERMINAÇÃO DA EFICÁCIA DA OVARIETOMIA E DO TRATAMENTO HORMONAL

Ao término dos protocolos de 2 horas de registro pressórico, as ratas dos 3 grupos experimentais (OVX, OVX+E e SHAM), previamente pesadas em balança digital, foram eutanasiadas e submetidas à laparotomia. A cavidade abdominal de cada animal foi examinada para confirmar a completa remoção dos ovários, no caso dos grupos OVX e OVX+E, ou a existências desses, no caso do grupo SHAM. Os úteros foram removidos e pesados para análise quanto à atrofia (ratas OVX) ou hipertrofia (ratas OVX+E) e validação da ovariectomia e do tratamento hormonal, respectivamente (Gore *et al.*, 2002).

A tibia esquerda foi dissecada e seu comprimento medido para correção dos valores dos pesos em relação ao tamanho dos animais (Voltera *et al.*, 2008).

3.5 ANÁLISE ESPECTRAL DA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA E DA PRESSÃO SISTÓLICA

As análises da variabilidade do intervalo de pulso (IP), que corresponde à VFC, e da variabilidade PAS, que corresponde à VPS, foram realizadas no domínio do tempo e da frequência através do software CardioSeries® v2.4 (<http://www.danielpenteado.com>) conforme descrito por Ariza *et al.* (2015).

Trechos definidos dos registros de pressão foram processados por um programa computacional específico (LabChart 7 Pro®, ADInstruments, Bella Vista, Austrália), capaz de detectar pontos de inflexão na pressão de pulso gerando séries batimento-a-batimento do IP e da PAS para cada ciclo cardíaco.

Para a análise espectral da variabilidade do IP e da PAS no CardioSeries®, as séries batimento-a-batimento destes parâmetros foram reamostradas em 10 Hz (1 valor a cada 100 ms) por interpolação cúbica do tipo spline; em seguida, as séries de IP e PAS interpoladas foram divididas em 50% pela sobreposição dos segmentos. Todos os segmentos foram inspecionados visualmente e aqueles com artefatos ou dados não-estacionários foram excluídos da

análise. Em seguida, o espectro foi calculado para os segmentos utilizando um algoritmo de transformada rápida de Fourier para séries temporais discretas.

Finalmente o espectro foi integrado em bandas de baixa frequência (LF, 0.2-0.75 Hz) e alta frequência (HF, 0.75-3.0 Hz). Os resultados foram expressos em unidades absolutas (ms^2 ou mmHg^2) e o cálculo da potência relativa de LF e HF, levando em consideração a potência total de espectro menos a potência da banda de muito baixa frequência (VLF: < 0,20 Hz), permitiu a expressão dos dados também em unidades normalizadas (nu). O cálculo da razão entre as potências das bandas de LF e HF (LF/HF) do espectro do IP permite avaliar o BSV cardíaco (Ariza *et al.*, 2015).

A análise espectral foi realizada com os seguintes trechos dos registros de PA: últimos 10 minutos, no mínimo, do registro basal; últimos 5 minutos anteriores à administração de LPS; últimos 3 minutos das 2 horas de registro dos protocolos de L-NAME, SMT e de endotoxemia.

3.6 ANÁLISE DA SENSIBILIDADE BARORREFLEXA

A SBR dos mesmos trechos de PA submetidos à análise de variabilidade foi obtida pelo método da sequência, executado no programa CardioSeries[®] v2.4 (<http://www.danielpenteado.com>), onde as séries temporais batimento-a-batimento do IP e da PAS foram utilizadas.

As series temporais analisadas apresentaram quatro ou mais batimentos em que aumentos progressivos na PAS eram acompanhados de aumentos progressivos no IP, ou reduções progressivas na PAS eram acompanhadas por reduções progressivas no IP. Os limites de detecção para as mudanças na PAS e IP foram 0 mmHg e 0 ms, respectivamente. Após a detecção de uma rampa de PAS (sequência de 4 ou mais batimentos em que aumentos ou reduções progressivas na PAS foram seguidas ou não por aumentos ou reduções no IP) o programa busca a mudança imediata no IP, sem intervalos. Uma sequência barorreflexa foi usada apenas quando o coeficiente de correlação (r) entre a PAS e o IP foi ≥ 0.8 , e a SBR foi determinada a partir da regressão linear entre a PAS e o IP de cada sequência barorreflexa (Ariza *et al.*, 2015).

3.7 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Ao término dos protocolos de 2 horas de registro pressórico e antes da eutanásia dos animais, amostras de sangue foram colhidas com heparina para posterior dosagem dos níveis de nitrito (NO_2^-), níveis de hidroperóxidos no plasma (LOOH), atividade da PON1 e capacidade antioxidante total (TRAP) no plasma.

3.7.1 Dosagem De Nitrito (NO_2^-)

Os níveis de NO_2^- plasmático foram medidos como uma estimativa dos níveis de NO e determinados conforme descrito anteriormente por Panis *et al.* (2012). A concentração de NO no plasma foi estimada pela medida de NO_2^- através do método de Griess com algumas modificações: grânulos de Cádmio são utilizados para converter todo o nitrato em nitrito, permitindo uma estimativa mais fiel da quantidade total de NO nas amostras. Para determinar a concentração de NO_2^- nas amostras uma curva de calibração foi preparada pela diluição de NaNO_2^- em água destilada estéril na escala de 0 a 125 μM ; 100 μL de reagente de Griess foram adicionados em triplicata aos poços das primeiras três colunas de cada microplaca. A absorbância foi lida a 505 nm usando um leitor de microplacas padronizado (Multiskan EX, LabSystems[®], Minnesota USA); os resultados estão expressos em μM de nitrito.

3.7.2 Determinação de hidroperóxidos por quimioluminescência (CL-LOOH)

A avaliação da formação de hidroperóxidos no plasma por quimioluminescência foi adaptada da técnica descrita por Gonzalez Flecha, Llesuy e Boveris (1991) e Panis *et al.* (2012). A quimioluminescência estimulada por tert-butil foi empregada para analisar os níveis de hidroperóxidos presentes no plasma. Este teste baseia-se no consumo das defesas antioxidantes e a formação de hidroperóxidos resultando em um aumento da emissão de fótons, ou seja, em um aumento de quimioluminescência que está relacionado com o estresse oxidativo. Este experimento é realizado ao abrigo da luz para evitar a fosforescência, a 30°C, durante 60 minutos. A reação foi iniciada pela adição de tert-butil (8 μl) a uma concentração final de 3 mM, e a leitura foi feita em um luminômetro GloMax (TD 20/20 Turner Designers[®]). Os resultados foram expressos em unidades relativas de luz (URL) e a curva obtida foi utilizada como um indicador qualitativo da

lipoperoxidação. Os resultados quantitativos foram obtidos após a integração da área sob a curva utilizando o software OriginLab® 7.5.

3.7.3 Determinação da Atividade da Paraoxonase 1 (PON1)

A atividade total da enzima PON1 foi determinada de acordo com o método descrito por Richter *et al.* (2008). A taxa de hidrólise do fenil-acetato (fenol) foi determinada no comprimento de onda de 270 nm, medidos durante 4 minutos (16 leituras com intervalo de 15 segundos entre as leituras), a 25 °C, em um leitor de microplacas (EnSpire, Perkin Elmer®, USA). A atividade é expressa em U/mL com base no coeficiente de extinção molar do fenil-acetato que equivale a $1,31 \text{mMol/Lcm}^{-1}$.

3.7.4 Capacidade Antioxidante Total Plasmática (TRAP)

A TRAP foi avaliada por quimioluminescência, de acordo com a metodologia descrita por Panis *et al.* (2012), em um leitor de microplacas (Victor X-3, Perkin Elmer®, USA), nas condições experimentais: modo de contagem não coincidente por 25 minutos, faixa de resposta entre 300 a 620 nm, temperatura de 30 °C. Este método detecta a presença de antioxidantes hidro e/ou lipossolúveis no plasma; a metodologia é baseada na geração de radicais peroxila (RO_2^{\cdot}) por decomposição térmica, a uma velocidade controlada, do azoiniciador dicloridrato de 2,2'-azobis-(2-metilpropanoamidina) (ABAP). Os resultados são expressos em μM Trolox.

3.8 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Efetou-se o registro dos parâmetros cardiovasculares basais durante, no mínimo, 20 minutos antes do início de qualquer protocolo hemodinâmico. O desenvolvimento da presente tese consistiu na realização de três estudos:

1. Efeitos do estrógeno sobre parâmetros cardiovasculares e autonômicos de ratas submetidas à inibição aguda das vias constitutiva e induzível da NOS.
2. Participação do estrógeno nos efeitos do L-nitro-arginina-metil-éster (L-NAME) sobre parâmetros cardiovasculares e autonômicos de ratas

submetidas à endotoxemia por lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* (sorotipo 026:B6).

3. Participação do estrógeno nos efeitos da SMT (S-Metilisotiouréia) sobre parâmetros cardiovasculares e autonômicos de ratas submetidas à endotoxemia por LPS.

3.8.1 Efeitos do Estrógeno Sobre Parâmetros Cardiovasculares, Autonômicos e Oxidativos de Ratas Submetidas à Inibição Aguda das Vias Constitutiva e Induzível da NOS.

Ao término do período de registro pressórico dos valores basais dos animais dos grupos SHAM, OVX e OVX+E, fez-se a administração *in bolus*, pela cânula venosa, de uma das seguintes substâncias, de acordo com a via da NOS a ser investigada:

- L-NAME (Santa Cruz Biotechnology[®], Texas, USA) 10 mg/Kg (Gardiner *et al.*, 1990; Chen e Hu, 1997), um inibidor seletivo das NOS cálcio-dependentes ou constitutivas (cNOS) (Vitecek *et al.*, 2012).
- SMT (Santa Cruz Biotechnology[®], Texas, USA) 3 mg/Kg, potente inibidor seletivo da iNOS (Szabo *et al.*, 1994; Su *et al.*, 2007).
- Solução fisiológica de NaCl 0,9% 1 mg/Kg, veículo diluente dos inibidores para controle das respostas cardiovasculares fisiológicas, na ausência de inibição das NOS.

Os parâmetros cardiovasculares foram registrados durante 2 horas, de acordo com protocolo pré-estabelecido pelo laboratório (Mehanna *et al.*, 2007). Ao término do registro, amostras de sangue heparinizado foram colhidas para posteriores dosagens bioquímicas e os animais eutanaziados para realização das análises biométricas.

3.8.2 Participação do Estrógeno nos Efeitos do L-NAME Sobre Parâmetros Cardiovasculares, Autonômicos e Oxidativos de Ratas Submetidas à Endotoxemia por LPS.

Ao término do período de registro pressórico dos valores basais dos animais dos grupos SHAM, OVX e OVX+E, fez-se a administração *in bolus*, pela

cânula venosa, de L-NAME (Santa Cruz Biotechnology®, Texas, USA) 10 mg/Kg (Gardiner *et al.*, 1990; Chen e Hu, 1997), ou do seu veículo NaCl 0,9%, 1 mg/Kg. Manteve-se o registro por mais 10 minutos, para completa manifestação do efeito pressórico do L-NAME e fez-se a administração intravenosa (IV) *in bolus* de 5 mg/Kg de LPS de *Escherichia coli* (sorotipo 026:B6, Sigma CO, St. Louis, MO, USA) (Mehanna *et al.*, 2007).

Os efeitos hemodinâmicos da endotoxemia foram registrados durante 2 horas, conforme descrito por Mehanna *et al.* (2007). Ao término do registro, amostras de sangue heparinizado foram colhidas para posteriores dosagens bioquímicas e os animais eutanaziados para realização das análises biométricas.

3.8.3 Participação do Estrógeno nos Efeitos da SMT Sobre Parâmetros Cardiovasculares, Autonômicos e Oxidativos de Ratas Submetidas à Endotoxemia por LPS.

Ao término do período de registro pressórico dos valores basais dos animais dos grupos SHAM, OVX e OVX+E, fez-se a administração *in bolus*, pela cânula venosa, de SMT (Santa Cruz Biotechnology®, Texas, USA) 3 mg/Kg (Szabo *et al.*, 1994; Su *et al.*, 2007), ou do seu veículo NaCl 0,9%, 1 mg/Kg. Manteve-se o registro por mais 10 minutos, para completa manifestação do efeito pressórico da SMT e fez-se a administração IV *in bolus* de 5 mg/Kg de LPS de *Escherichia coli* (sorotipo 026:B6, Sigma CO, St. Louis, MO, USA) (Mehanna *et al.*, 2007).

Os efeitos hemodinâmicos da endotoxemia foram registrados durante 2 horas, conforme descrito por Mehanna *et al.* (2007). Ao término do registro, amostras de sangue heparinizado foram colhidas para posteriores dosagens bioquímicas e os animais eutanaziados para realização das análises biométricas.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente, uma análise exploratória de cada variável foi conduzida a fim de avaliar a existência de distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variâncias (teste de Levene), para essas análises utilizou-se o

programa IBM® SPSS® Statistics, versão 22, para Windows.

As análises subsequentes foram realizadas utilizando-se o programa estatístico Prisma® versão 6 (GraphPad®, San Diego, CA). Variáveis que apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variâncias foram analisadas por testes paramétricos:

- Análise de variância de uma via (ANOVA-1V) com pós-teste de Bonferroni para variáveis independentes;

- Análise de variância de duas vias para medidas repetidas (ANOVA-2V MR), com pós-teste de Bonferroni, para os gráficos de comparação entre tempos. Os fatores analisados foram: tratamento hormonal (OVX, OVX+E, SHAM) e tempo pós-injeção (LPS ou inibidores da NOS).

Os dados que não apresentaram normalidade ou homogeneidade foram submetidos a análise não-paramétrica e o teste de comparações múltiplas empregado foi o teste de Kruskal–Wallis, complementado pelo pós-teste de Dunn.

Em todos os casos o nível de significância adotado foi de 95% ($P \leq 0.05$).

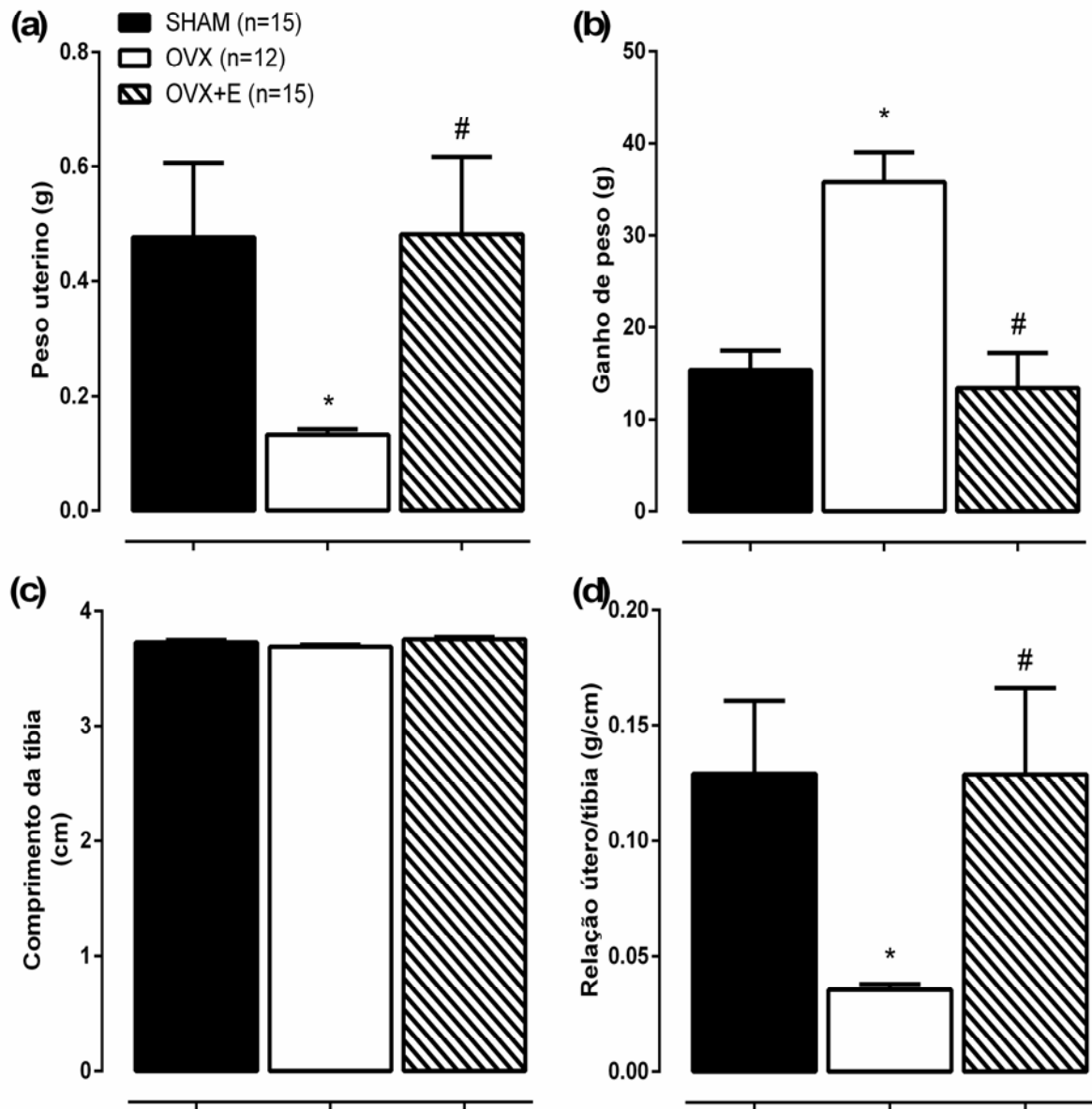
4 RESULTADOS

4.1 DETERMINAÇÃO DA EFICÁCIA DA OVARIECTOMIA E DO TRATAMENTO HORMONAL

Após a eutanásia, com 8 semanas das cirurgias e tratamento hormonal, a eficácia da ovariectomia (grupo OVX) foi determinada pela ausência de tecido ovariano e atrofia marcante do útero, em comparação com o grupo SHAM (Fig.1a, d), ao mesmo tempo em que a hipertrofia uterina foi evidente no grupo ovariectomizado tratado com estradiol (OVX+E). Diferenças confirmadas pela significância estatística obtida pela ANOVA-1V seguida pelo pós-teste de Bonferroni ($P < 0.01$).

Os animais OVX apresentaram maior ganho de peso que os demais, demonstrado pela ANOVA-1V seguida pelo pós-teste de Bonferroni ($P < 0.01$), sem diferenças entre seus tamanhos, evidenciadas pelo comprimento da tíbia (Fig. 1b, c), indicando a correção dessa diferença pelo tratamento com estradiol (ANOVA-1V seguida pelo pós-teste de Bonferroni, $P < 0.01$). Dados estão de acordo com a literatura (Mendonça Lde *et al.*, 2007; Paigel *et al.*, 2011; Campos *et al.*, 2014), confirmando a eficácia da ovariectomia e do tratamento hormonal.

Figura 1 – Efeitos de 8 semanas de tratamento diário com estradiol (1 mg/Kg) sobre o peso do útero (a), o ganho de peso corporal (b), o comprimento da tibia (c) e a relação útero/tibia (d). Barras (a, d) representam medianas \pm intervalos interquartis analisados pelo teste de Kruskal–Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn; Barras (b, c) representam média \pm EPM analisadas pela ANOVA-1V seguida pelo pós-teste de Bonferroni, $n = 12-15$ ratas por grupo. Ganho de peso = peso corporal imediatamente antes da eutanásia – peso corporal no dia da cirurgia. * $P < 0.01$ versus SHAM; # $P < 0.01$ versus OVX.



4.2 PARÂMETROS CARDIOVASCULARES E AUTÔNOMICOS BASAIS

Valores basais de PAM e FC, antes de qualquer injeção, estão apresentados na tabela 1. Após 8 semanas de ovariectomia, as variáveis hemodinâmicas não sofreram alterações, contudo, o tratamento com estradiol durante período equivalente aumentou a frequência cardíaca das ratas, quando comparadas aos grupos SHAM e OVX. A análise espectral das variáveis hemodinâmicas foi realizada a fim de investigar as influências autonômicas sobre estes parâmetros.

A modulação autonômica do tônus vascular, avaliada pela análise espectral da PAS, estava aumentada nos grupos OVX e OVX+E, como demonstrado pelo aumento da variância e do componente LF (marcador simpático periférico) (Tabela 1).

A modulação autonômica cardíaca, investigada pela análise espectral do IP, não sofreu alterações pela OVX, nem pelo tratamento hormonal. Mas, a OVX reduziu o ganho barorreflexo total, quando comparado com o grupo SHAM.

Tabela 1 – Parâmetros cardiovasculares basais: variáveis hemodinâmicas, variabilidade da frequência cardíaca, variabilidade da pressão sistólica e sensibilidade barorreflexa

	SHAM (n=46)	OVX (n=46)	OVX+E (n=43)
Variáveis hemodinâmicas			
PAM (mmHg)	108 ± 0.8	107 ± 0.6	109 ± 0.8
FC (bpm)	361 ± 3.1	364 ± 2.9	386 ± 4.3 [#]
PAS			
Variância (mmHg ²)	14.5 (10.8-21.3)	19.8 (13.0-31.5)*	22.2 (14.0-30.0)**
LF (mmHg ²)	3.9 ± 0.3	5.4 ± 0.3**	5.3 ± 0.4*
IP			
Variância (ms ²)	37.8 ± 2.8	46.8 ± 4.4	40.7 ± 3.7
LF (ms ²)	2.9 (4.2-1.6)	3.2 (2.0-4.5)	2.7 ± 0.5
LFnu	34.3 ± 1.4	39.5 ± 1.5	38.3 ± 1.8
HF (ms ²)	5.3 (3.0-8.1)	4.4 (2.6-6.7)	4.4 (2.2-6.7)
HFnu	65.7 ± 1.4	60.5 ± 1.5	61.7 ± 1.8
Razão LF/HF	0.6 ± 0.04	0.8 ± 0.05	0.7 ± 0.06
SBR			
Ganho total	1.4 ± 0.08	1.1 ± 0.06*	1.1 ± 0.07
Ganho up	1.4 ± 0.07	1.2 ± 0.07	1.2 ± 0.08
Ganho down	1.2 ± 0.07	1.0 ± 0.06	1.1 ± 0.07
IEB total	0.17 (0.1-0.2)	0.18 (0.1-0.2)	0.2 (0.1-0.2)
IEB up	0.19 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.22 ± 0.01
IEB down	0.11 (0.1-0.2)	0.16 (0.1-0.2)	0.18 (0.1-0.2)

PAM, pressão arterial média; FC, frequência cardíaca; PAS, pressão arterial sistólica; LF, baixa frequência; IP, intervalo de pulso; HF, alta frequência; SBR, sensibilidade barorreflexa; IEB, índice de efetividade barorreflexa; Unidade métrica dos ganhos da SBR: ms/mmHg.

Variância da PAS, LF e HF absolutos do IP, e IEB total e down foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e estão representados como mediana (25% e 75% interquartis). Demais dados foram analisados por ANOVA de 1 via e estão representados como média ± EPM.

*Diferença significativa de SHAM. #Diferença significativa de OVX. P ≤ 0.05.

4.3 ESTUDO 1: EFEITOS DO ESTRÓGENO SOBRE PARÂMETROS CARDIOVASCULARES, AUTONÔMICOS E OXIDATIVOS DE RATAS SUBMETIDAS À INIBIÇÃO AGUDA DAS VIAS CONSTITUTIVA E INDUZÍVEL DA NOS

Os valores médios de PAM e FC durante os 120 minutos de registro após a injeção estão representados nas figuras 2 e 3. Realizou-se a análise estatística das áreas sob as curvas e esta não apontou diferenças entre as curvas pressóricas ou de FC obtidas após a injeção de salina, L-NAME ou SMT.

Considerando que as amostras de sangue para dosagens bioquímicas foram colhidas somente ao término do protocolo, as análises e comparações com o tempo zero foram feitas somente no tempo de 2 horas pós-injeção. O tempo zero corresponde ao período imediatamente anterior à injeção e, no caso deste estudo, o término do período de registro dos parâmetros basais.

O resultado da análise dos parâmetros pressóricos, antes e após a injeção de salina 0,9%, estão apresentados na figura 4. A análise de variância (ANOVA-2V MR) da PAM indicou interação entre os fatores tempo e tratamento (Fig. 4a), porém, o desmembramento da análise pelo teste de Bonferroni não revelou diferenças significativas entre os grupos, dentro de cada tempo, nem entre os tempos, dentro de cada grupo (SHAM T0: 108 ± 2.1 mmHg, T2: 108 ± 1.9 ; OVX T0: 108 ± 2.1 , T2: 111 ± 2.4 ; OVX+E T0: 110 ± 2.8 , T2: 108 ± 2.5 . Média \pm EPM, $P \leq 0.05$). Efetuou-se a análise espectral da PAS a fim de investigar as influências autonômicas sobre os tempos analisados e não foram identificadas interações ou efeito de quaisquer fatores sobre os parâmetros de variância e LF (Fig. 4b e 4c, respectivamente).

Figura 2 – PAM de ratas adultas após a injeção (IV) de inibidores da NOS ou salina: (a) injeção de salina 0,9%; (b) injeção de L-NAME (10 mg/Kg); (c) injeção de SMT (3 mg/Kg). Injeção na cânula venosa no tempo zero. Valores estão expressos como média \pm EPM, n = 4-8 ratas por grupo.

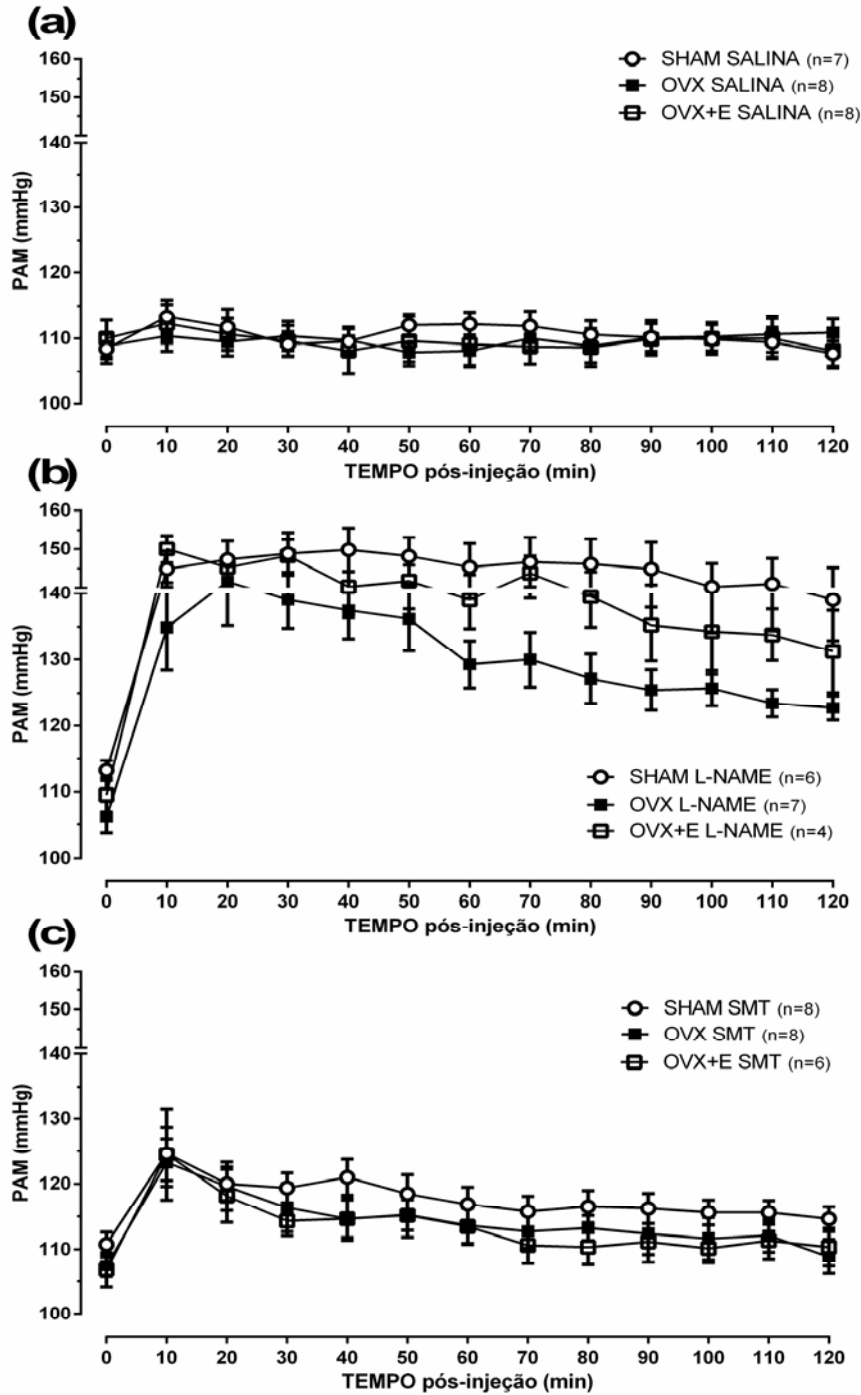


Figura 3 – FC de ratas adultas após a injeção (IV) de inibidores da NOS ou salina: (a) injeção de salina 0,9%; (b) injeção de L-NAME (10 mg/Kg); (c) injeção de SMT (3 mg/Kg). Injeção na cânula venosa no tempo zero. Valores estão expressos como média \pm EPM, n = 4-8 ratas por grupo.

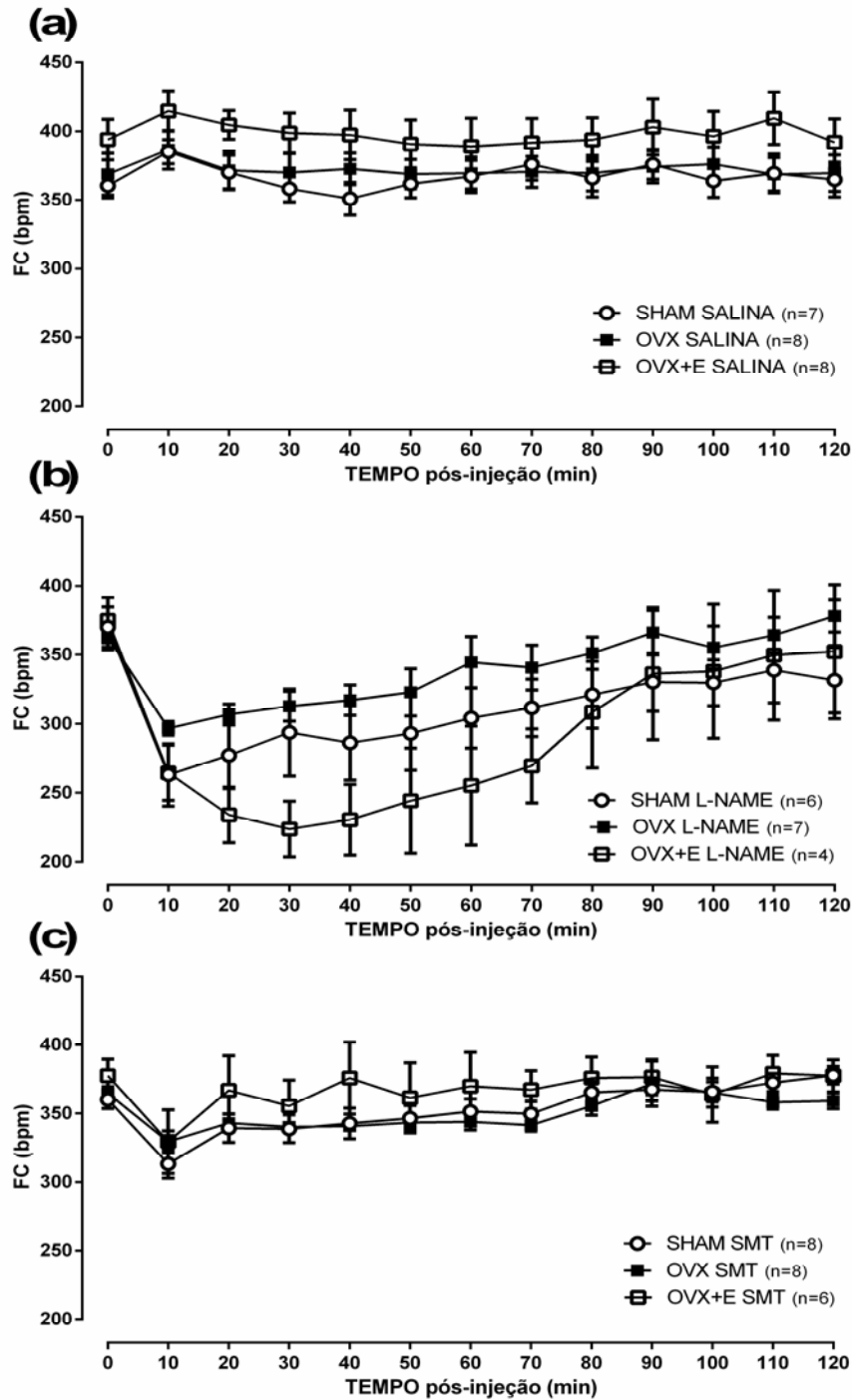
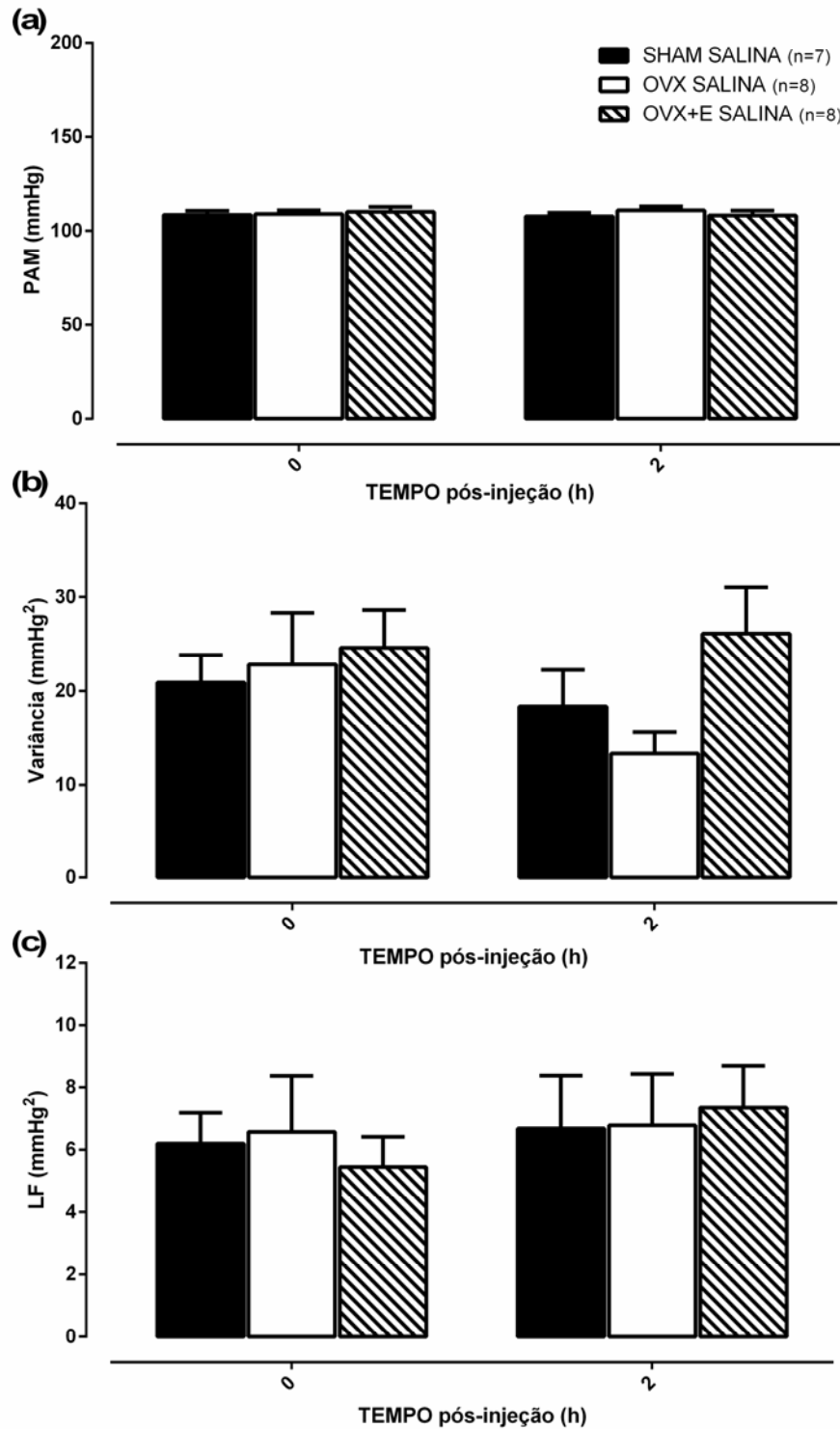
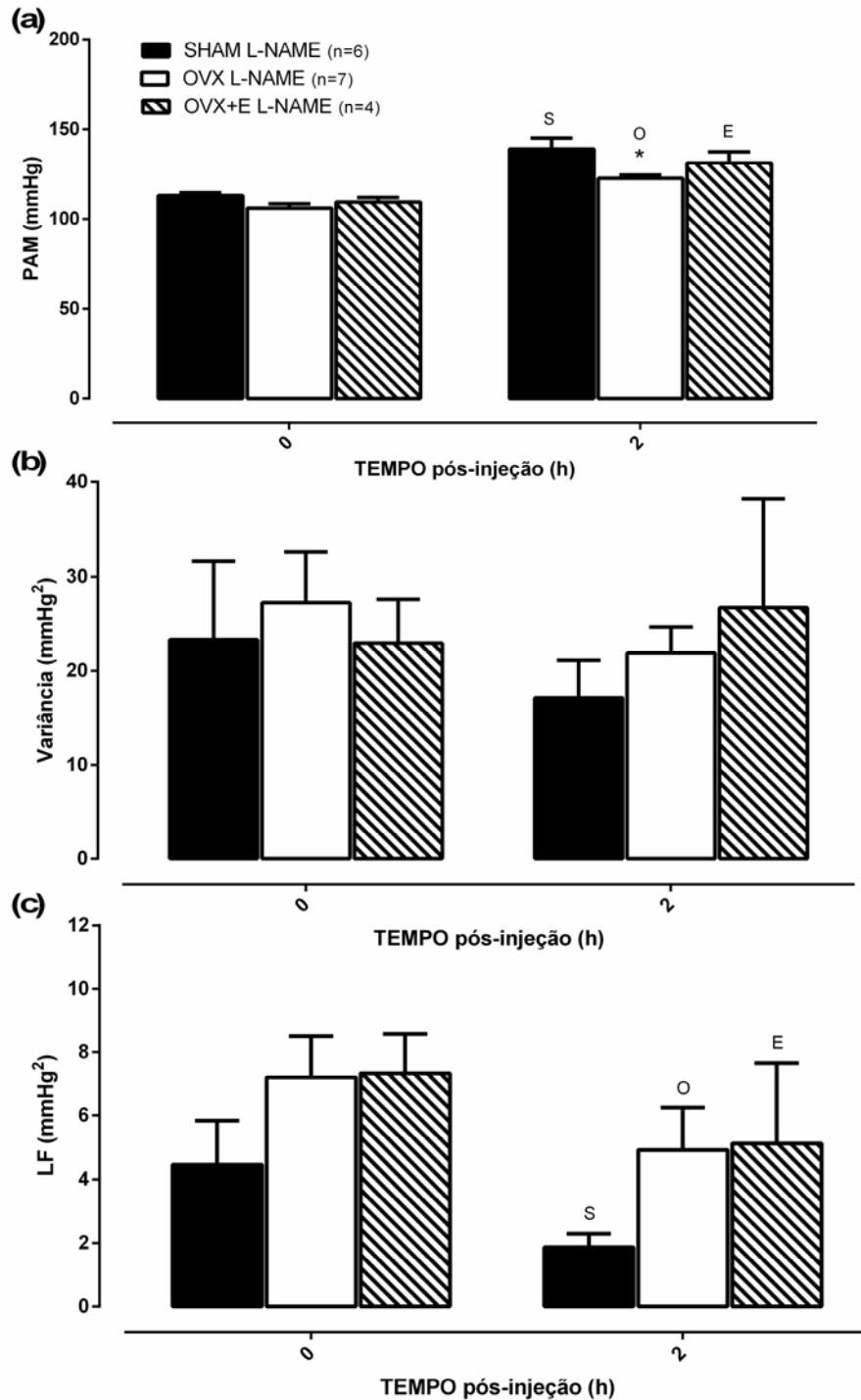


Figura 4 – Parâmetros pressóricos de ratas adultas antes e após a injeção de salina 0,9%: (a) valores absolutos de PAM (mmHg); variabilidade da pressão sistólica: (b) variância, (c) componente de baixa frequência (LF). Valores estão expressos como média \pm EPM, n = 7-8 ratas por grupo, ANOVA-2V MR com pós-teste de Bonferroni, P > 0.05.



As respostas da PAM e da variabilidade da pressão sistólica (VPS) ao L-NAME estão representadas na figura 5. A ANOVA-2V MR da PAM (Fig. 5a) indicou efeitos dos fatores tempo e tratamento, a análise entre os tempos mostrou que o L-NAME promove aumento da PAM após 2h em todos os grupos, quando comparado com o tempo zero (SHAM T0: 113 ± 1.5 mmHg, T2: 139 ± 6.1 ; OVX T0: 106 ± 2.4 , T2: 123 ± 1.8 ; OVX+E T0: 110 ± 2.5 , T2: 131 ± 6.2 ; Média \pm EPM. Fig. 5a); a análise entre os grupos (fator tratamento) dentro de cada tempo revelou que, 2h após o L-NAME, o aumento da PAM das ratas OVX é menor do que o observado nas ratas SHAM. Uma vez que OVX+E não é diferente de SHAM, o tratamento com estradiol pode ter prevenido esta diferença. A análise da VPS em resposta ao L-NAME não revelou alterações na variância (ANOVA-2V MR sem interação ou efeitos, Fig. 5b), enquanto o LF apresentou influência do fator tempo, ou seja, após 2h o L-NAME reduz equivalentemente a modulação simpática vascular de todos os grupos (%LFabs, em relação ao T0: SHAM $67\% \pm 30$, OVX $70\% \pm 14$, OVX+E $68\% \pm 36$; Média \pm EPM. Fig. 5c).

Figura 5 – Parâmetros pressóricos de ratas adultas antes e após a injeção de L-NAME (10mg/Kg): (a) valores absolutos de PAM (mmHg); variabilidade da pressão sistólica: (b) variância, (c) componente de baixa frequência (LF). Diferenças dentro de cada grupo em relação ao tempo zero identificadas pelas iniciais do grupo a que se refere: SHAM (S), OVX (O) e OVX+E (E). Diferenças entre os grupos dentro das 2 horas identificadas pelos sinais: SHAM (*). Valores estão expressos como média \pm EPM, $n = 4-7$ ratas por grupo, ANOVA-2V MR com pós-teste de Bonferroni, $P < 0.05$.



A análise dos efeitos do SMT sobre os parâmetros pressóricos das ratas (ANOVA-2V MR, Fig. 6) indicou influência do tempo pós-injeção sobre a PAM (Fig. 6a) ou seja, após 2h há um leve aumento presente em todos os grupos (SHAM T0: 111 ± 1.9 mmHg, T2: 115 ± 1.9 ; OVX T0: 108 ± 1.7 , T2: 109 ± 2.6 ; OVX+E T0: 107 ± 2.7 , T2: 110 ± 2.9 . Média \pm EPM). A ANOVA-2V MR para a variância da VPS não revelou interação nem efeito de algum fator (Fig. 6b), enquanto que o LF da VPS apresentou influência do tempo pós-injeção, indicando um aumento equivalente em todos os grupos tratados com SMT (%LFabs, em relação ao T0: SHAM $207\% \pm 57$, OVX $152\% \pm 27$, OVX+E $198\% \pm 60$; Média \pm EPM. Fig. 6c).

Também foi realizado o estudo dos efeitos dos inibidores da NOS sobre os parâmetros cardíacos. As respostas cardíacas dos grupos controle, antes e 2 h após a injeção de salina, estão apresentadas na figura 7 e tabela 2. Conforme esperado, a injeção de salina não promoveu alterações importantes em nenhum dos parâmetros analisados: ANOVA-2V MR não identificou interação nem efeito de algum dos fatores sobre a FC (Fig. 7a), sobre os parâmetros normalizados LF e HF do IP (Fig. 7c e 7d, respectivamente), nem sobre a relação LF/HF (Fig. 7e); enquanto a variância do IP (Fig. 7b), apresentada na forma logarítmica (Log) para comparação com os parâmetros de variância dos animais tratados com L-NAME (Fig. 8b), convertidos para alcançar homogeneidade e distribuição normal, apresentou influência do fator tempo pós-injeção, sugerindo redução da variância em todos os animais ao término do protocolo (Fig. 7b).

Figura 6 – Parâmetros pressóricos de ratas adultas antes e após a injeção de SMT (3mg/Kg): (a) valores absolutos de PAM (mmHg); variabilidade da pressão sistólica: (b) variância, (c) componente de baixa frequência (LF) Diferenças dentro de cada grupo em relação ao tempo zero identificadas pelas iniciais do grupo a que se refere: SHAM (S), OVX (O) e OVX+E (E). Valores estão expressos como média \pm EPM, n = 6-8 ratas por grupo, ANOVA-2V MR com pós-teste de Bonferroni, $P < 0.05$.

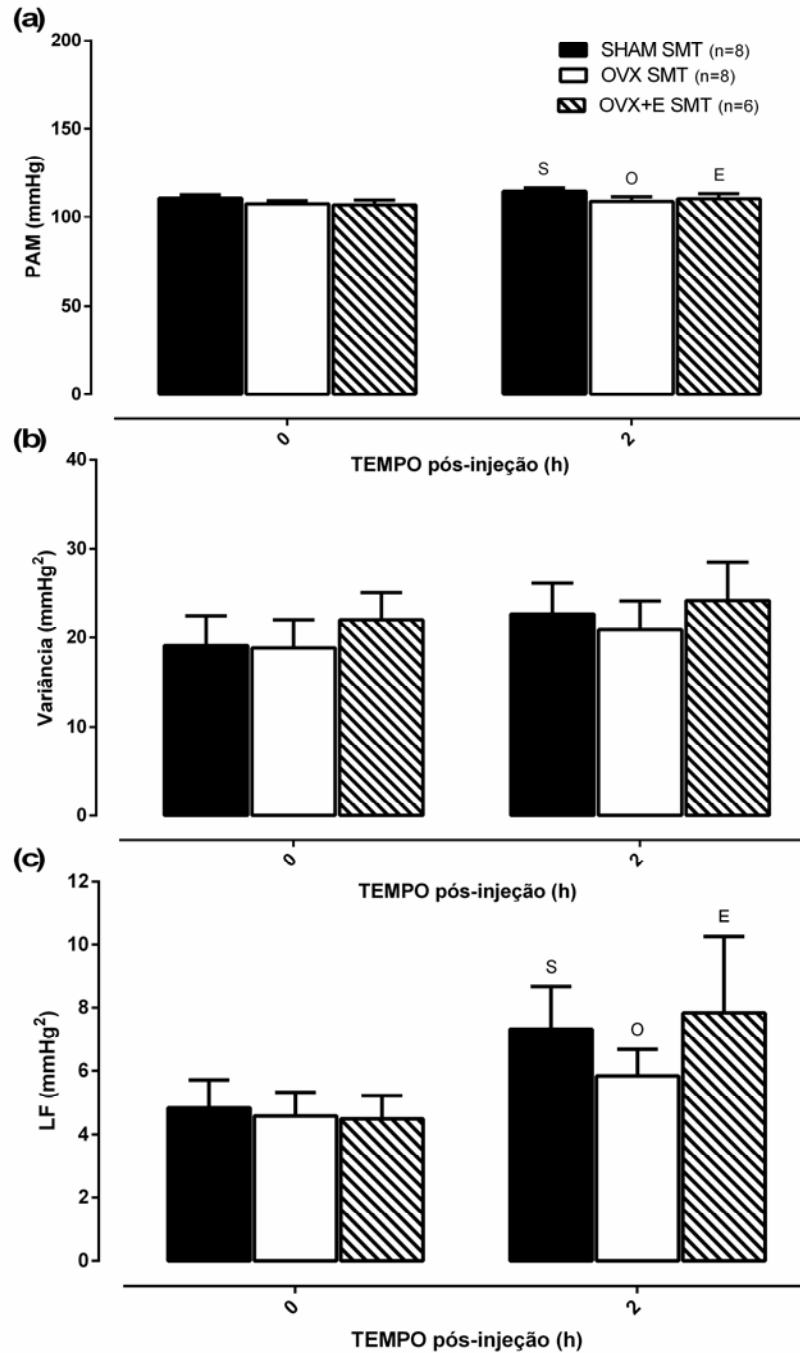
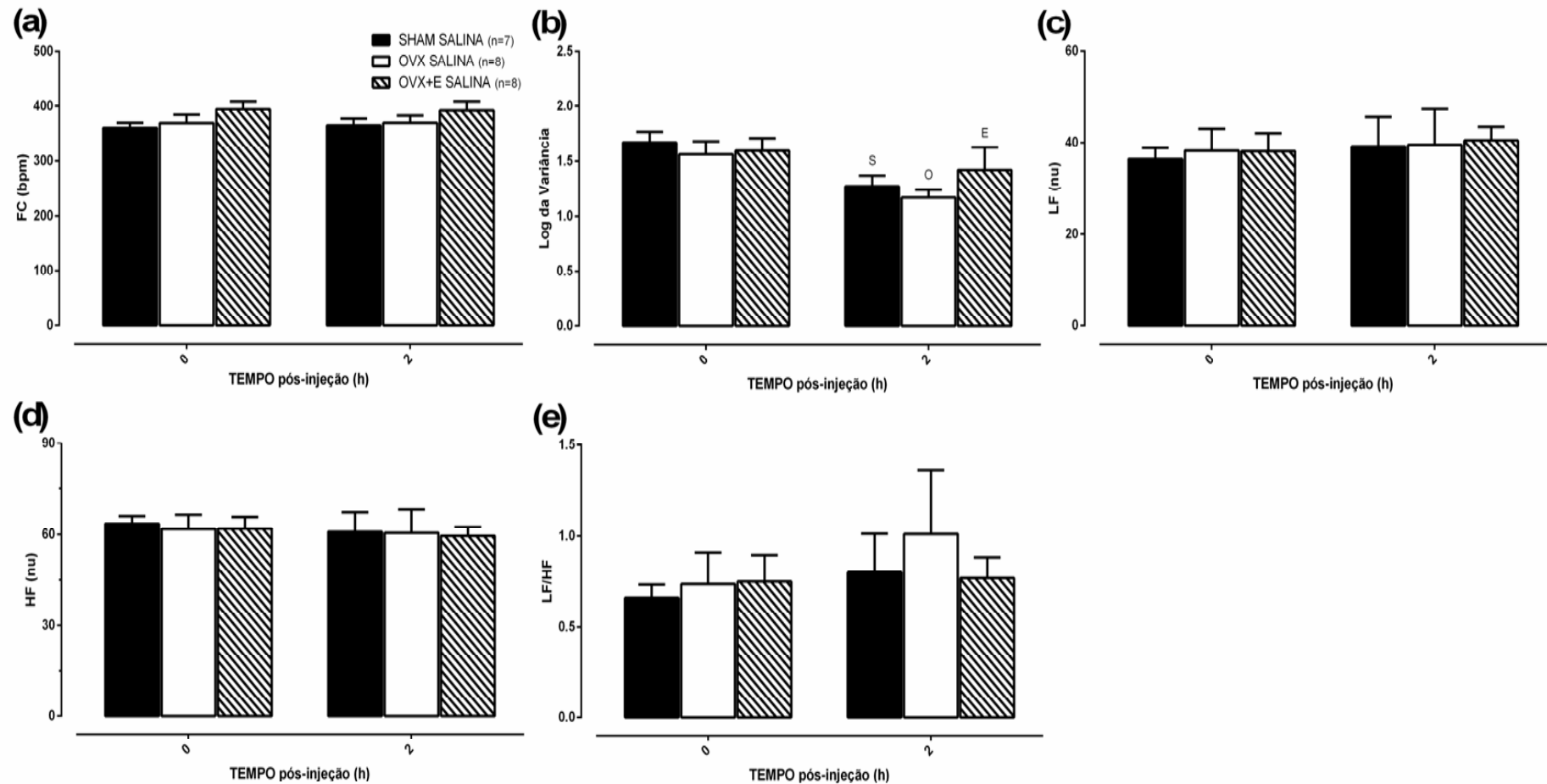


Figura 7 – Parâmetros cardíacos de ratas adultas antes e após a injeção de salina 0,9%: (a) valores absolutos de FC (bpm); variabilidade da frequência cardíaca: (b) Log da variância, (c) componente de baixa frequência normalizado (LFnu), (d) componente de alta frequência normalizado (HFnu) e (e) razão LF/HF. Diferenças dentro de cada grupo em relação ao tempo zero identificadas pelas iniciais do grupo a que se refere: SHAM (S), OVX (O) e OVX+E (E). Valores estão expressos como média \pm EPM, n = 7-8 ratas por grupo, ANOVA-2V MR com pós-teste de Bonferroni, P < 0.05.



Através da análise do barorreflexo espontâneo foram obtidos os valores de ganho total, indicador de sensibilidade, e o índice de efetividade barorreflexa (IEB) antes (T0) e 2 horas após a administração de salina (T2, Tabela 3). A ANOVA-2V MR do ganho total dos animais tratados com salina revelou efeito do fator tempo, indicando que, após 2 horas, todos os grupos apresentaram redução equivalente deste parâmetro. Enquanto o IEB não apresentou alterações entre os grupos, nem entre os tempos (Tabela 3).

Semelhantemente aos controles que receberam salina, os parâmetros cardíacos dos animais tratados com L-NAME não apresentaram alterações (Fig. 8 e tabela 2), ou seja, a análise de variância (ANOVA-2V MR) não identificou interação ou efeito de algum dos fatores sobre nenhuma das variáveis estudadas: FC, log da variância, LFnu, HFnu e LF/HF (figura 8a, b, c, d, e, respectivamente), ou LFabs e HFabs (tabela 2). O que sugere que fêmeas, de forma geral e independente de estrógeno, não apresentam alterações cardíacas após 2 horas de exposição ao L-NAME. Observação: a variância do IP (Fig. 8b) foi transformada em Log para alcançar homogeneidade e distribuição normal, permitindo a realização da análise paramétrica.

Tabela 2 – Variabilidade da frequência cardíaca 2 horas após a administração de inibidores da NOS ou salina 0,9%

	Salina			L-NAME			SMT		
	SHAM (n=7)	OVX (n=8)	OVX+E (n=8)	SHAM (n=6)	OVX (n=7)	OVX+E (n=4)	SHAM (n=8)	OVX (n=8)	OVX+E (n=6)
LFabs T0	4.8 ±1.3	1.8 ±0.4	2.9 ±0.6	2.7 ±0.7	6.1 ±1.4	3.9 ±1.7	3.4 ±0.8	3.2 ±0.8	3.4 ±0.6
LFabs T2	3.8 ±1.3	1.8 ±0.5	3.7 ±0.9	3.1 ±0.6	2.7 ±0.6	10.1 ±8.8	4.7 ±1.7	6.0 ±1.4	2.7 ±0.6
HFabs T0	6.3 ±2.0	2.6 ±0.6	4.8 ±0.8	7.5 ±2.0	7.3 ±2.0	4.9 ±2.4	5.9 ±1.6	4.6 ±0.6	6.7 ±1.5
HFabs T2	3.1 ±0.7	2.5 ±0.8	4.7 ±0.9	6.0 ±1.8	2.9 ±0.3	88.7 ±86.5	4.1 ±1.1 ^S	4.4 ±0.9 ^O	2.7 ±0.4 ^E

LF, baixa frequência; HF, alta frequência. T0, tempo zero, determinado como o momento da administração do inibidor da NOS: L-NAME (10 mg/Kg) ou SMT (3 mg/Kg), ou de salina 0,9%. T2, 2 horas após a administração do inibidor da NOS ou de salina. Valores estão expressos como média ± EPM e foram analisados por ANOVA-2V MR (fatores: tempo pós-injeção e tratamento hormonal), $P > 0.05$.

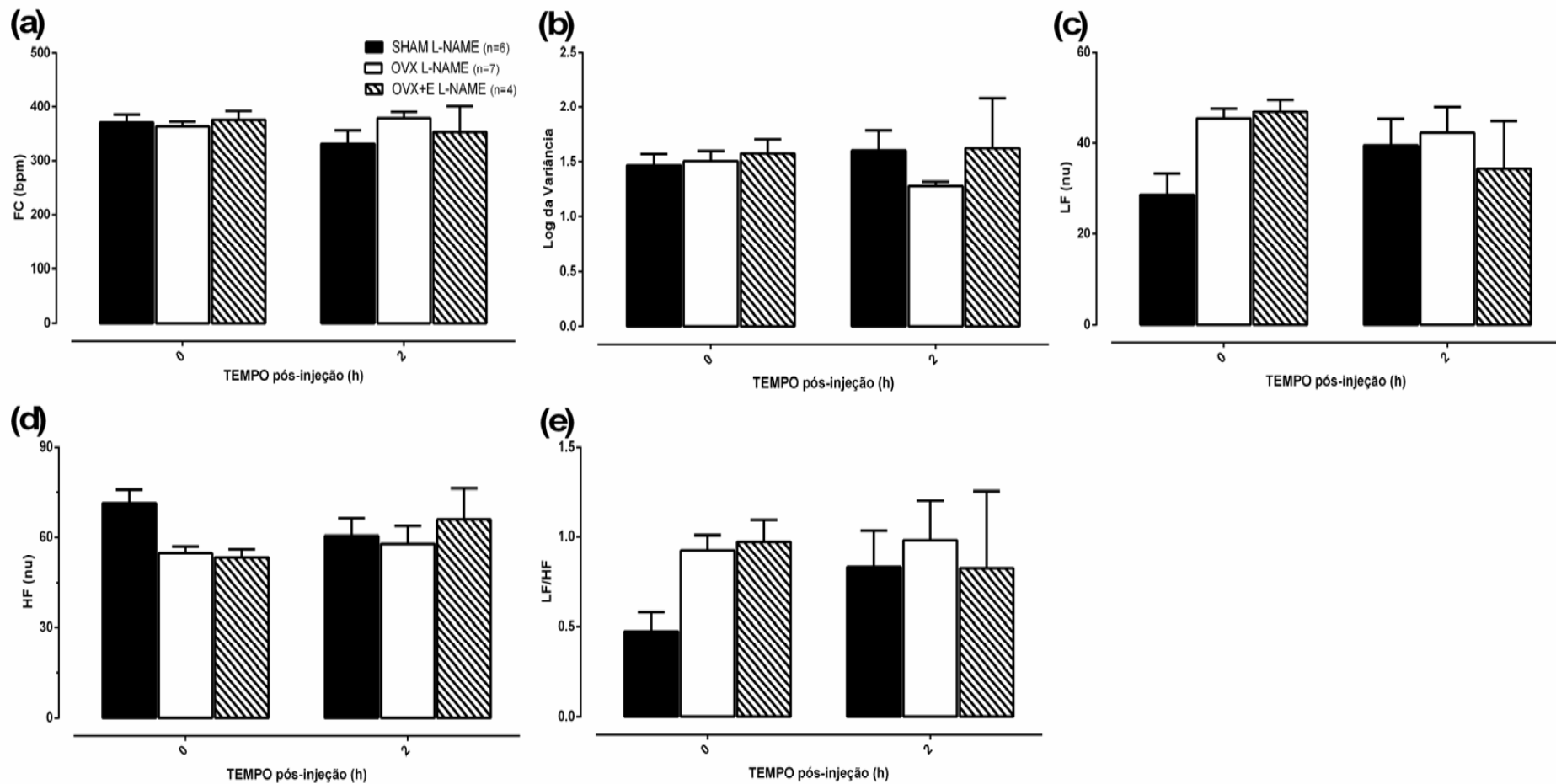
Tabela 3 – Barorreflexo espontâneo 2 horas após a administração de NaCl 0,9%

	SHAM (n=8)	OVX (n=8)	OVX+E (n=6)
Ganho total (ms/mmHg) T0	1,31 ±0,14	0,75 ±0,07	1,09 ±0,18
Ganho total (ms/mmHg) T2	0,77 ±0,09 ^S	0,70 ±0,08 ^O	0,83 ±0,16 ^E
IEB T0	0,18 ±0,02	0,16 ±0,01	0,19 ±0,04
IEB T2	0,20 ±0,03	0,16 ±0,03	0,15 ±0,02

IEB, índice de efetividade barorreflexa.

Valores estão expressos como média ± EPM e foram analisados por ANOVA-2V MR (fatores: tempo pós-injeção e tratamento hormonal). Diferenças dentro de cada grupo em relação ao tempo zero identificadas pelas iniciais do grupo a que se refere: SHAM (S), OVX (O) e OVX+E (E), $P \leq 0.05$.

Figura 8 – Parâmetros cardíacos de ratas adultas antes e após a injeção de L-NAME (10mg/Kg): (a) valores absolutos de FC (bpm); variabilidade da frequência cardíaca: (b) Log da variância, (c) componente de baixa frequência normalizado (LFnu), (d) componente de alta frequência normalizado (HFnu) e (e) razão LF/HF. Valores estão expressos como média \pm EPM, n = 4-7 ratas por grupo, ANOVA-2V MR com pós-teste de Bonferroni, P > 0.05.



A administração de SMT também não alterou significativamente os parâmetros cardíacos dos grupos estudados (Fig. 9). 2 h após a injeção de SMT a FC estava inalterada (ANOVA-2V MR: sem interação ou efeitos, Fig. 9a), bem como os parâmetros de LFnu, HFnu, relação LF/HF e LFabsoluto do IP (Fig. 9c, 9d, 9e, tabela 2, respectivamente) não apresentaram interação nem influência dos fatores “tempo pós-injeção” e “tratamento hormonal”. A variância do IP foi apresentada na forma de Log (Fig. 9b) para comparação com os parâmetros de variância dos animais tratados com L-NAME (Fig. 8b). A ANOVA-2V MR do log da variância do IP e do HFabsoluto (Fig. 9b e tabela 2, respectivamente) revelou efeito do fator tempo, indicando que o SMT promove redução semelhante nestes fatores, nos 3 grupos experimentais, após 2 h.

A análise do barorreflexo espontâneo, antes e após a injeção de SMT (Tabela 4, ANOVA-2V MR), não revelou alterações no ganho total, ou seja, não houve interação nem efeitos dos fatores. A ANOVA-2V MR do IEB indicou efeito do tratamento hormonal, sem efeito do tempo ou interação entre os fatores. O pós-teste de Bonferroni revelou esse efeito nas ratas OVX+E, que apresentavam maior efetividade barorreflexa do que as demais no momento da injeção.

Tabela 4 – Barorreflexo espontâneo 2 horas após a administração de SMT

	SHAM (n=8)	OVX (n=8)	OVX+E (n=6)
Ganho total T0 (ms/mmHg)	0,15 ±0,02	0,14 ±0,02	0,25 ±0,04
Ganho total T2 (ms/mmHg)	0,15 ±0,02	0,19 ±0,02	0,21 ±0,04
IEB T0	1,29 ±0,18	1,22 ±0,21	1,58 ±0,43 ^{*#}
IEB T2	0,95 ±0,15	1,39 ±0,23	0,79 ±0,16

IEB, índice de efetividade barorreflexa.

Valores estão expressos como média ± EPM e foram analisados por ANOVA-2V MR com pós-teste de Bonferroni (fatores: tempo pós-injeção e tratamento hormonal). Diferenças significativas dentro do mesmo tempo: *P ≤ 0.05 versus SHAM, #P ≤ 0.05 versus OVX.

Neste mesmo período de exposição aos diferentes inibidores da NOS, dosagens bioquímicas foram efetuadas com o plasma dos animais. Os níveis dos mesmos nos animais controle (injeção de salina 0,9%) estão representados na figura 10, onde pode-se observar que os níveis de NO, representados pela dosagem de NO₂, não variaram entre os grupos (Fig. 10a), assim como a atividade da PON1 e

os níveis de hidroperóxidos no plasma (Fig. 10c, 10d, respectivamente); no que diz respeito à atividade antioxidante total (Fig. 10b), embora a ANOVA-1V tenha indicado diferenças e o pós-teste de Bonferroni não as identifique, supõe-se que o grupo OVX tenha apresentado uma redução em relação ao SHAM.

Figura 9 – Parâmetros cardíacos de ratas adultas antes e após a injeção de SMT (3mg/Kg): (a) valores absolutos de FC (bpm); variabilidade da frequência cardíaca: (b) Log da variância, (c) componente de baixa frequência normalizado (LFnu), (d) componente de alta frequência normalizado (HFnu) e (e) razão LF/HF. Diferenças dentro de cada grupo em relação ao tempo zero identificadas pelas iniciais do grupo a que se refere: SHAM (S), OVX (O) e OVX+E (E). Valores estão expressos como média \pm EPM, n = 6-8 ratas por grupo, ANOVA-2V MR com pós-teste de Bonferroni, P < 0.05.

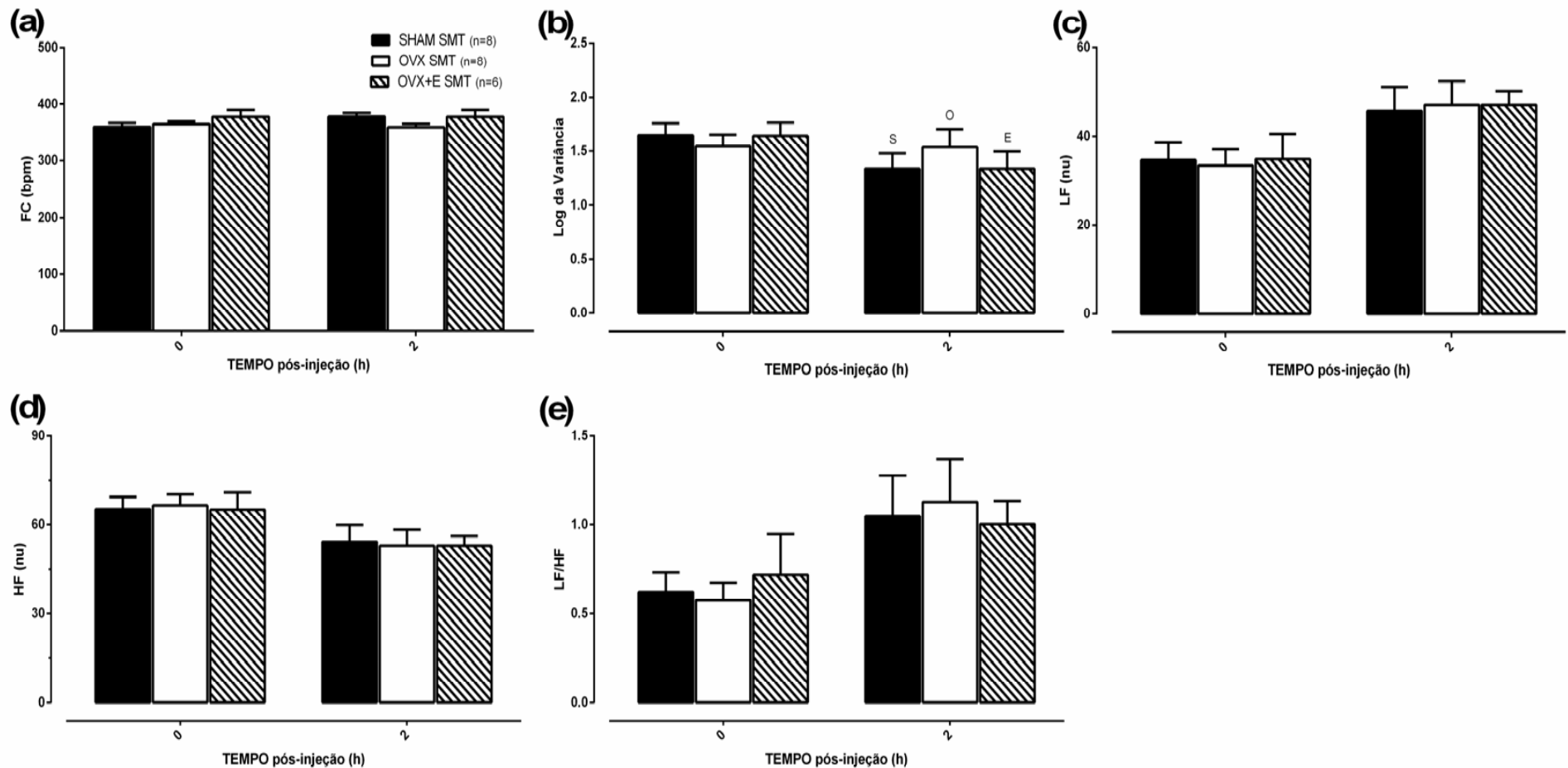
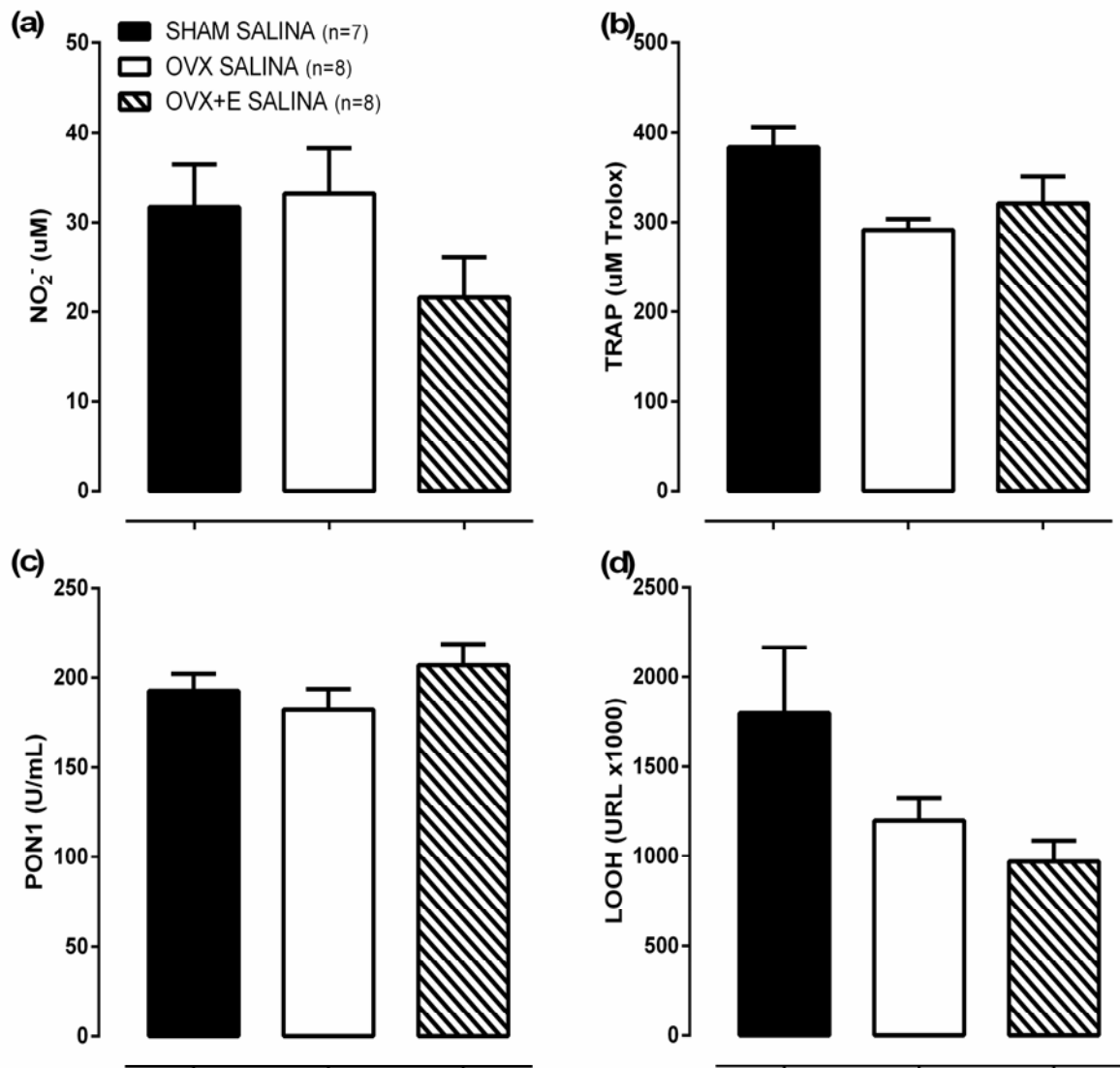


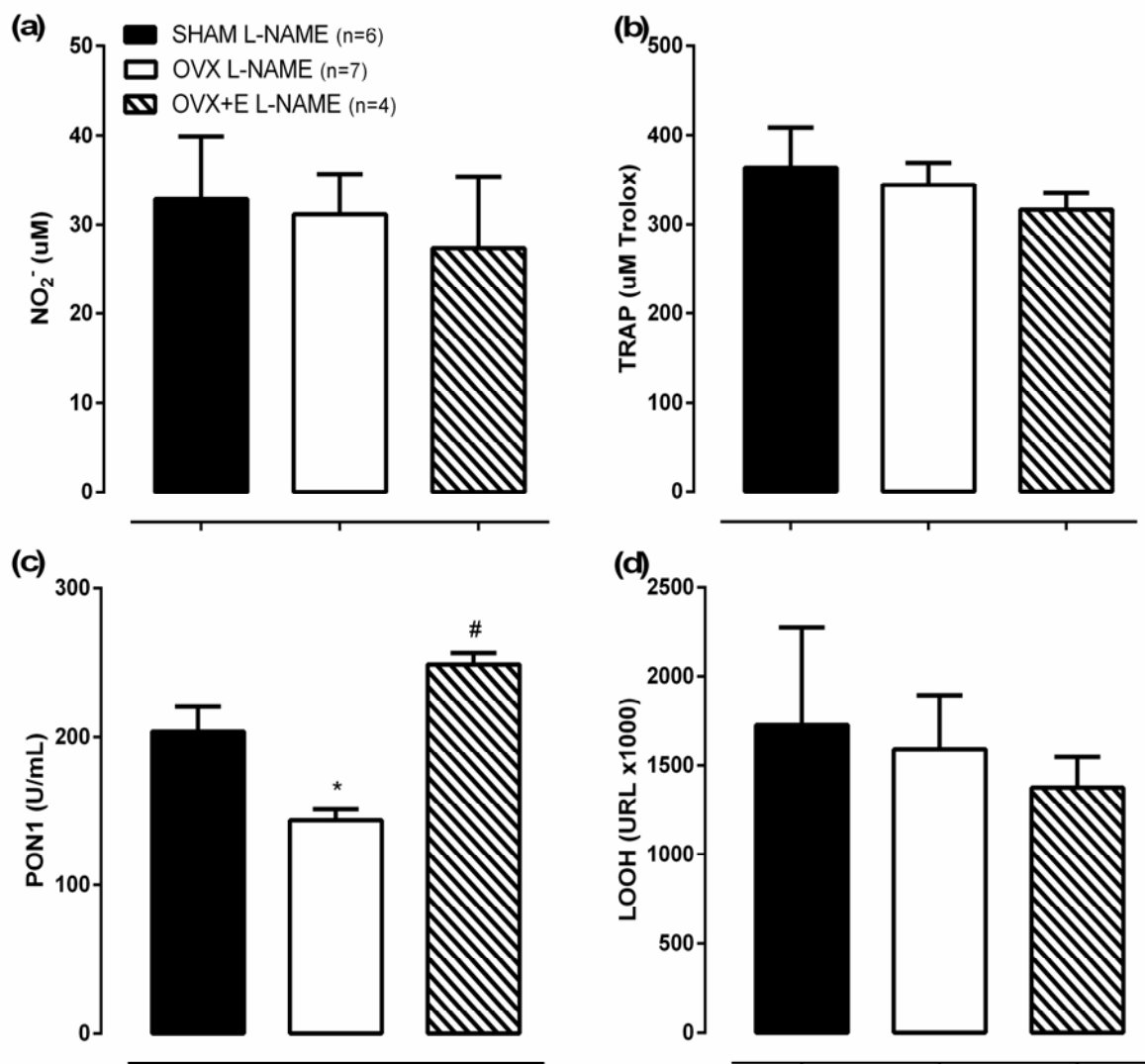
Figura 10 – Efeitos do tratamento hormonal diário (estradiol 1 mg/kg) sobre parâmetros bioquímicos 2 horas após a administração salina 0,9%: (a) níveis de nitrito, (b) capacidade antioxidante total plasmática (TRAP), (c) atividade da enzima paraoxonase 1 (PON1), (d) níveis de hidroperóxidos no plasma (LOOH). Barras representam média \pm EPM. Dados foram analisados por ANOVA-1V seguida por pós-teste de Bonferroni, $n = 7-8$ ratas por grupo, $P < 0.05$.



O estudo da resposta de alguns parâmetros bioquímicos à inibição das vias constitutivas da NOS foi feito pela injeção de L-NAME (10mg/Kg, Fig. 11). Observa-se que não houve diferenças entre os grupos nos níveis de NO (Fig. 11a), bem como na atividade antioxidante total e nos níveis de hidroperóxidos no plasma (Fig. 11b e 11d, respectivamente). A atividade da PON1, por sua vez, foi reduzida

pela inibição das cNOS nas ratas OVX, e o tratamento com estradiol preveniu esta alteração (Fig. 11c).

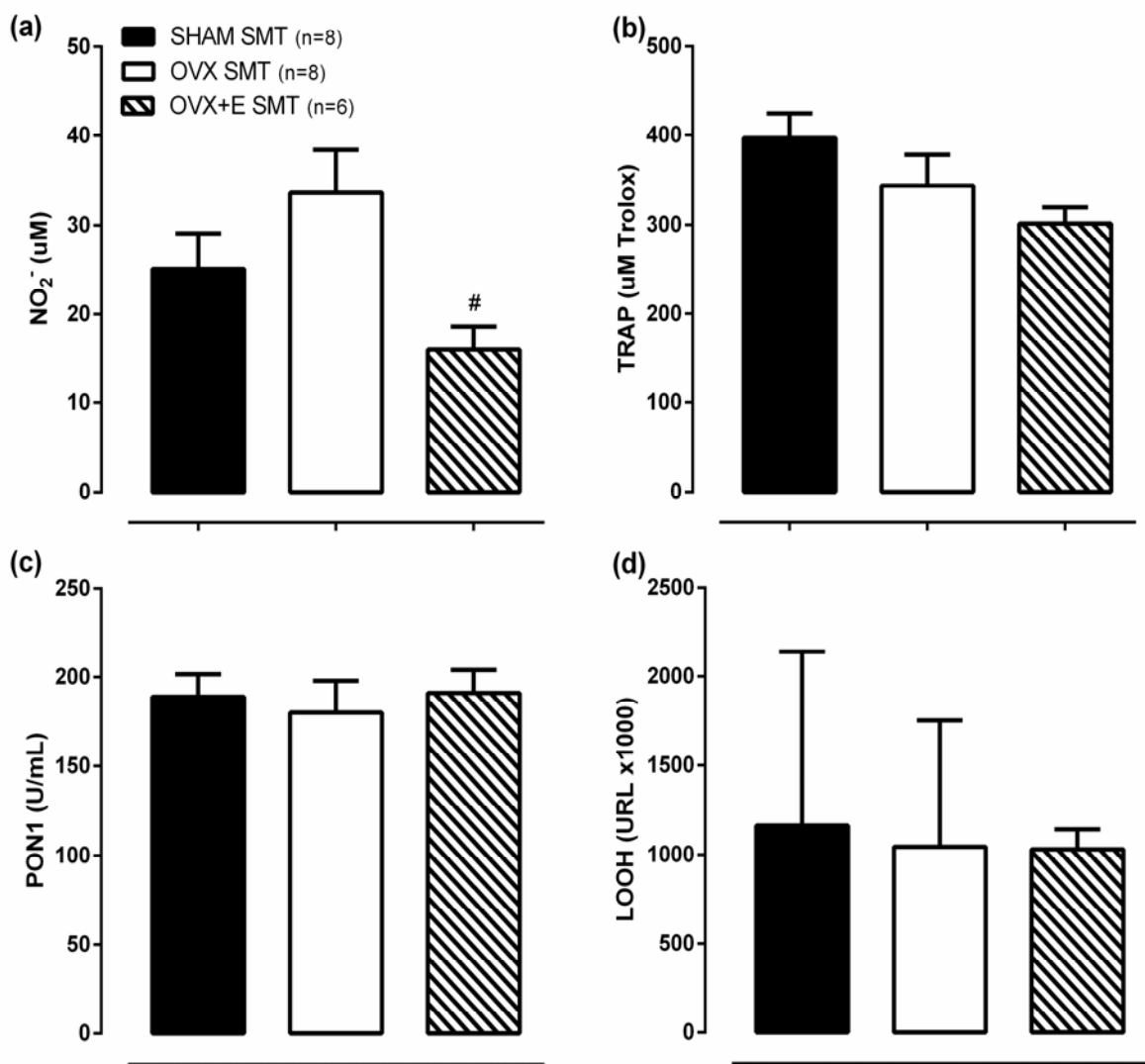
Figura 11 – Efeitos do tratamento hormonal diário (estradiol 1 mg/kg) sobre parâmetros bioquímicos 2 horas após a administração de L-NAME (10 mg/Kg): (a) níveis de nitrito, (b) capacidade antioxidante total plasmática (TRAP), (c) atividade da enzima paraoxonase 1 (PON1), (d) níveis de hidroperóxidos no plasma (LOOH). Barras representam média \pm EPM. Dados foram analisados por ANOVA-1V seguida por pós-teste de Bonferroni. *P < 0.01 versus SHAM; #P < 0.001 versus OVX, n = 4-7 ratas por grupo.



A figura 12 mostra a resposta de alguns parâmetros bioquímicos após 2h de inibição da via induzível da NOS através da injeção de SMT (3mg/Kg). Os níveis de NO responderam ao SMT de forma diferente entre os grupos estudados

(Fig. 12a): o tratamento com estradiol fez as ratas apresentarem menores níveis de NO_2^- quando comparadas às ratas OVX (SHAM= 25 ± 4 ; OVX= 34 ± 5 ; OVX+E= 16 ± 3 μM). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos nos níveis de TRAP, atividade da PON1 e LOOH (Fig. 12b, 12c e 12d, respectivamente), sendo esta analisada pelo teste de Kruskal-Wallis devido à ausência de homogeneidade entre as variâncias.

Figura 12 – Efeitos do tratamento hormonal diário (estradiol 1 mg/kg) sobre parâmetros bioquímicos 2 horas após a administração de SMT (3 mg/Kg): (a) níveis de nitrito, (b) capacidade antioxidante total plasmática (TRAP), (c) atividade da enzima paraoxonase 1 (PON1), (d) níveis de hidroperóxidos no plasma (LOOH). Barras representam média \pm EPM. Dados foram analisados por ANOVA-1V seguida por pós-teste de Bonferroni, exceto (d), onde as barras representam mediana (25% e 75% interquartis) analisadas por Kruskal-Wallis. #P < 0.05 versus OVX, n = 6-8 ratas por grupo.



4.4 ESTUDO 2: PARTICIPAÇÃO DO ESTRÓGENO NOS EFEITOS DO L-NAME SOBRE PARÂMETROS CARDIOVASCULARES, AUTÔNOMICOS E OXIDATIVOS DE RATAS SUBMETIDAS À ENDOTOXEMIA POR LPS

Neste estudo, a indução de endotoxemia ocorreu 10 minutos após a administração de salina ou L-NAME. Neste momento, denominado “tempo zero”, os parâmetros cardiovasculares e autonômicos estavam como demonstra a tabela 5. A injeção de L-NAME promoveu aumento na PA acompanhado por bradicardia em todos os animais, sem diferenças entre os grupos.

Os parâmetros de VPS não foram diferentes entre os grupos, mas a variabilidade da frequência cardíaca (VFC) apresentou diferenças, particularmente no grupo OVX (tabela 5). O L-NAME promoveu um aumento da variância do IP e das unidades absolutas de LF e HF nos animais OVX, quando comparados àqueles que receberam salina, sem interferir com a relação LF/HF. Quando submetidos à normalização, que representa o valor relativo de cada componente em proporção ao poder total (menos o componente de frequência muito baixa) (Task_Force, 1996), o grupo OVX L-NAME-LPS manteve aumentado o HFnu, mas o LFnu apresentou-se reduzido quando comparado ao grupo OVX salina-LPS. O tratamento com estradiol preveniu todas as alterações observadas nos animais OVX tratados com L-NAME, exceto no caso do LF absoluto do IP, que permaneceu aumentado nos animais OVX+E L-NAME-LPS quando comparado aos animais OVX+E salina-LPS (tabela 5).

Ainda, a inibição das cNOS reduziu IEB dos grupos SHAM e OVX quando comparados com seus controles salina-LPS, e aumentou o ganho do barorreflexo dos animais OVX. O tratamento com estradiol protegeu os animais das alterações promovidas pelo L-NAME sobre a SBR.

Para a análise dos efeitos do tratamento com estradiol sobre a endotoxemia estabeleceu-se, para os parâmetros autonômicos, a porcentagem das alterações em relação ao tempo zero (momento da administração do LPS), quando os grupos estavam sob efeito da injeção de salina (Fig. 13, 14 e 17a, b) ou L-NAME (Fig. 15, 16 e 17c, d).

A figura 13a mostra que, após 2 horas de endotoxemia por LPS, as ratas dos 3 grupos não apresentaram alterações significativas da PAM. A ANOVA-2V MR indicou efeito do tratamento hormonal, mas o pós-teste de Bonferroni não

identificou diferença entre os grupos (variações na PAM: 0.22 ± 3.5 mmHg SHAM; -0.17 ± 2.2 mmHg OVX; -0.38 ± 1.6 mmHg OVX+E, Fig.13a).

As porcentagens de VPS 2 horas após o LPS podem ser observadas nas figuras 13b e 13c. O tempo após-LPS teve efeito sobre a variância (Fig. 13b), promovendo seu aumento, enquanto o tratamento hormonal não exerceu influência sobre este parâmetro. Nenhum efeito foi detectado pela ANOVA-2V MR no LF da PAS (Fig. 13c).

A FC estava mais alta 2 horas após o LPS (Fig. 14a). ANOVA-2V MR indicou efeito dos fatores tempo pós-LPS e tratamento hormonal, refletindo as oscilações que ocorrem durante a endotoxemia com maior influência do tratamento com estradiol (variações na FC: 51.3 ± 8.6 bpm SHAM; 62.0 ± 9.1 bpm OVX; $**58.8 \pm 9.4$ bpm OVX+E, $**P < 0.01$ versus SHAM, Fig.14a).

Figuras 14b e 14e mostram a porcentagem das respostas de VFC 2 horas após o LPS. Houve uma redução da variância do IP pela endotoxemia, sem efeitos do tratamento hormonal (Fig. 14b). As potências normalizadas de LF e HF mostraram interação significativa entre os fatores: tratamento hormonal e tempo pós-LPS, resultando em diminuição do LF (Fig. 14c) e aumento do HF (Fig. 14d) no grupo OVX, 2 horas após a administração de LPS, quando comparados aos grupos SHAM e OVX+E, indicando que o tratamento com estradiol preveniu esta mudança da modulação simpática cardíaca para a vagal. Não houveram diferenças significativas entre os grupos na análise da relação LF/HF após 2 horas de endotoxemia por LPS, sugerindo que as mudanças nos fatores, individualmente, não foram suficientes para alterar o BSV (Fig. 14e).

Tabela 5 – Variáveis hemodinâmicas, variabilidade da frequência cardíaca, variabilidade da pressão sistólica e sensibilidade barorreflexa antes da injeção de LPS: Resposta ao L-NAME

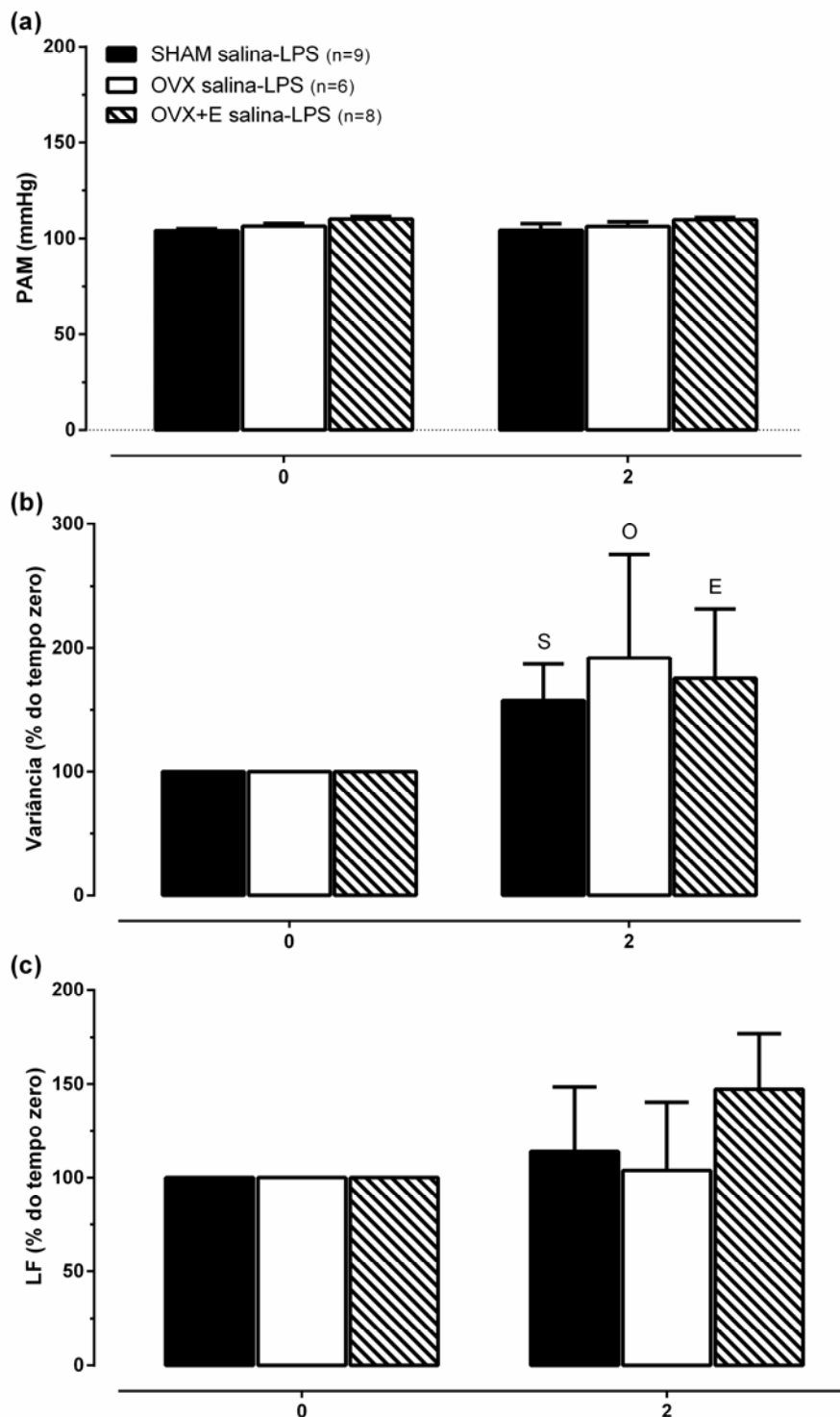
	SHAM Salina (n=9)	SHAM L-NAME (n=6)	OVX Salina (n=6)	OVX L-NAME (n=6)	OVX+E Salina (n=8)	OVX+E L-NAME (n=6)
Variáveis hemodinâmicas						
PAM (mmHg)	104 ±1.1	145 ±3.1***	106 ±1.6	150±3.0***	110 ±1.3	150 ±5.8***
FC (bpm)	348 ±5.9	244 ±21***	363 ±7.5	247 ±10***	381 ±6.9	270 ±16***
PAS						
Variância (mmHg ²)	11.2 ±1.0	13.7 ±2.9	15.7±2.3	15.1 ±4.5	16.7 ±2.2	26.2 ±5.6
LF (mmHg ²)	3.8 ±0.5	2.0 ±0.6	6.0 ±1.0	2.5 ±0.9	6.1 ±1.3	4.2 ±1.4
IP						
Variância (ms ²)	32.4 (15-48)	307 (221-1039)	15.4 (8.9-37)	564 (369-1322)**	24.9 (16-37)	634 (34-160)
LF (ms ²)	5.2 (2.2-7.6)	54.7 (43-163)	2.3 (1.9-3.5)	43.9 (32-102)*	2.1 (1.7-2.6)	58.7 (5.7-104)*
LFnu	37.9 ±3.3	24.7 ±3.8	41.5±2.0	12.8 ±0.7**	40.1 ±4.3	28.3 ±7.9
HF (ms ²)	6.9 (4.5-13.7)	161 (73.3-753)	2.7 (2.4-5.1)	428 (242-873)**	3.5 (3.1-5.1)	107 (5.4-646)
HFnu	62.1 ±3.3	75.3 ±3.8	58.5±2.0	87.2 ±0.7**	59.9 ±4.3	71.7 ±7.9
Razão LF/HF	0.7 ±0.1	0.4 ±0.1	0.8 ±0.1	0.2 ±0.0	0.8 ±0.1	0.6 ±0.2
SBR						
Ganho total (ms/mmHg)	1.5 (1.2-2.1)	3.9 (0.0-5.7)	0.8 (0.7-1.1)	7.9 (3.9-11.6)*	1.2 (0.9-1.4)	2.3 (0.7-22.1)
IEB	0.19±0.03	0.06±0.02*	0.2±0.01	0.07±0.02*	0.15±0.03	0.11±0.05

PAM, pressão arterial média; FC, frequência cardíaca; PAS, pressão arterial sistólica; LF, baixa frequência; IP, intervalo de pulso; HF, alta frequência; SBR, sensibilidade barorreflexa; IEB, índice de efetividade barorreflexa.

Variância, LF e HF do IP e ganho total da SBR foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e estão apresentados como mediana (25% e 75% interquartis). Demais dados foram analisados por ANOVA de 1 via e estão representados como média ± EPM.

*Diferença significativa do respectivo grupo salina: *P ≤ 0.05; **P ≤ 0.01; ***P ≤ 0.001.

Figura 13 – Efeitos do LPS (5 mg/Kg), após 2 horas, sobre os parâmetros pressóricos de ratas adultas: (a) valores absolutos de PAM (mmHg); diferenças nos parâmetros de variabilidade da pressão sistólica em % do tempo zero (efeito da salina e administração de LPS): (b) variância e (c) componente de baixa frequência (LF). Diferenças dentro de cada grupo em relação ao tempo zero identificadas pelas iniciais do grupo a que se refere: SHAM (S), OVX (O) e OVX+E (E). Valores estão expressos como média \pm EPM, $n = 6-9$ amostras por grupo, ANOVA-2V MR com pós-teste de Bonferroni, $P < 0.05$.



Figuras 15 e 16 representam os efeitos do tratamento com estradiol sobre o término de 2 horas da endotoxemia sob efeito do L-NAME (10mg/Kg). Após a administração de LPS, diferentemente dos animais pré-tratados com salina, grupos que receberam L-NAME apresentaram efeito do fator tempo pós-LPS sobre a PAM, sem efeito do tratamento hormonal ou interação entre os fatores detectada pela ANOVA-2V MR (variações sobre a PAM: -13.5 ± 4.1 mmHg SHAM; -12 ± 5.2 mmHg OVX; -23.6 ± 6.9 mmHg OVX+E, Fig. 15a). L-NAME aboliu o efeito do tempo pós-LPS sobre a variância da PAS (Fig. 15b), enquanto a ANOVA-2V MR identificou efeito do tempo pós-LPS sobre o componente LF da VPS (Fig. 15c), que apresentou redução.

A resposta da FC 2 horas após o LPS nos grupos que receberam L-NAME (Fig. 16a), mostrou uma interação entre os fatores indicada pela ANOVA-2V MR, onde os valores ainda estavam altos, como os observados com os grupos salina-LPS, mas sem diferenças entre os grupos SHAM e OVX+E (variações na FC: 102.5 ± 10.8 bpm SHAM; 131.0 ± 13.7 bpm OVX; 74.4 ± 17.7 bpm OVX+E, Fig. 16a).

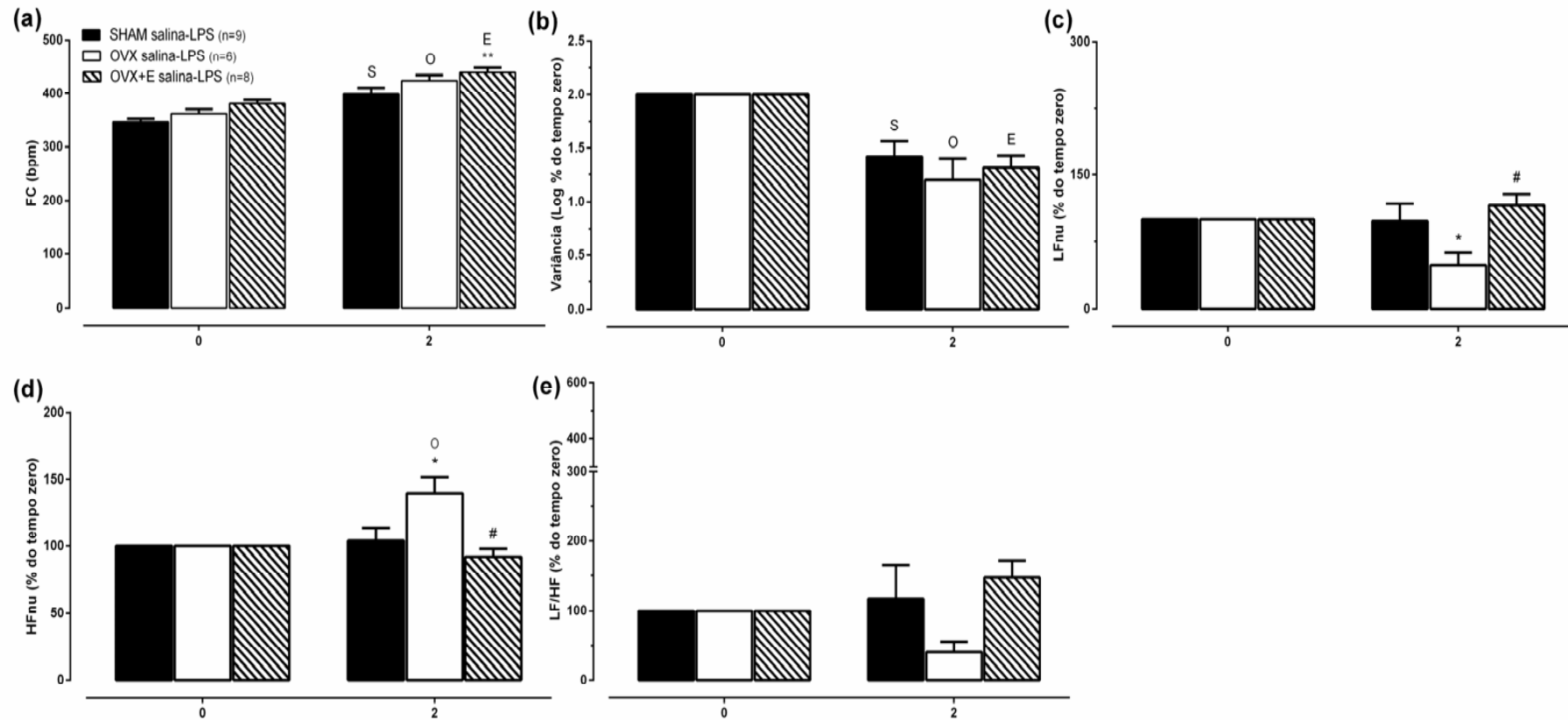


Figura 14. Efeitos do LPS (5 mg/Kg), após 2 horas, sobre os parâmetros cardíacos de ratas adultas: (a) valores absolutos de FC (bpm); diferenças nos parâmetros de variabilidade da FC em % do tempo zero (efeito da salina e administração de LPS): (b) log da variância, (c) componente de baixa frequência normalizado (LFnu), (d) componente de alta frequência normalizado (HFnu) e (e) razão LF/HF. Diferenças dentro de cada grupo em relação ao tempo zero identificadas pelas iniciais do grupo a que se refere: SHAM (S), OVX (O) e OVX+E (E). Diferenças entre os grupos dentro das 2 horas identificadas pelos sinais: SHAM (*) e OVX (#). Valores estão expressos como média \pm EPM, n = 6-9 amostras por grupo, ANOVA-2V MR com pós-teste de Bonferroni, $P > 0.05$.

Figura 15 – Efeitos do LPS (5 mg/Kg), após 2 horas, sobre os parâmetros pressóricos de ratas adultas pré-tratadas com L-NAME (10 mg/Kg): (a) valores absolutos de PAM (mmHg); diferenças nos parâmetros de variabilidade da pressão sistólica em % do tempo zero (efeito do L-NAME e administração de LPS): (b) variância e (c) componente de baixa frequência (LF). Diferenças dentro de cada grupo em relação ao tempo zero identificadas pelas iniciais do grupo a que se refere: SHAM (S), OVX (O) e OVX+E (E). Valores estão expressos como média \pm EPM, $n = 6-7$ amostras por grupo, ANOVA-2V MR com pós-teste de Bonferroni, $P < 0.05$.

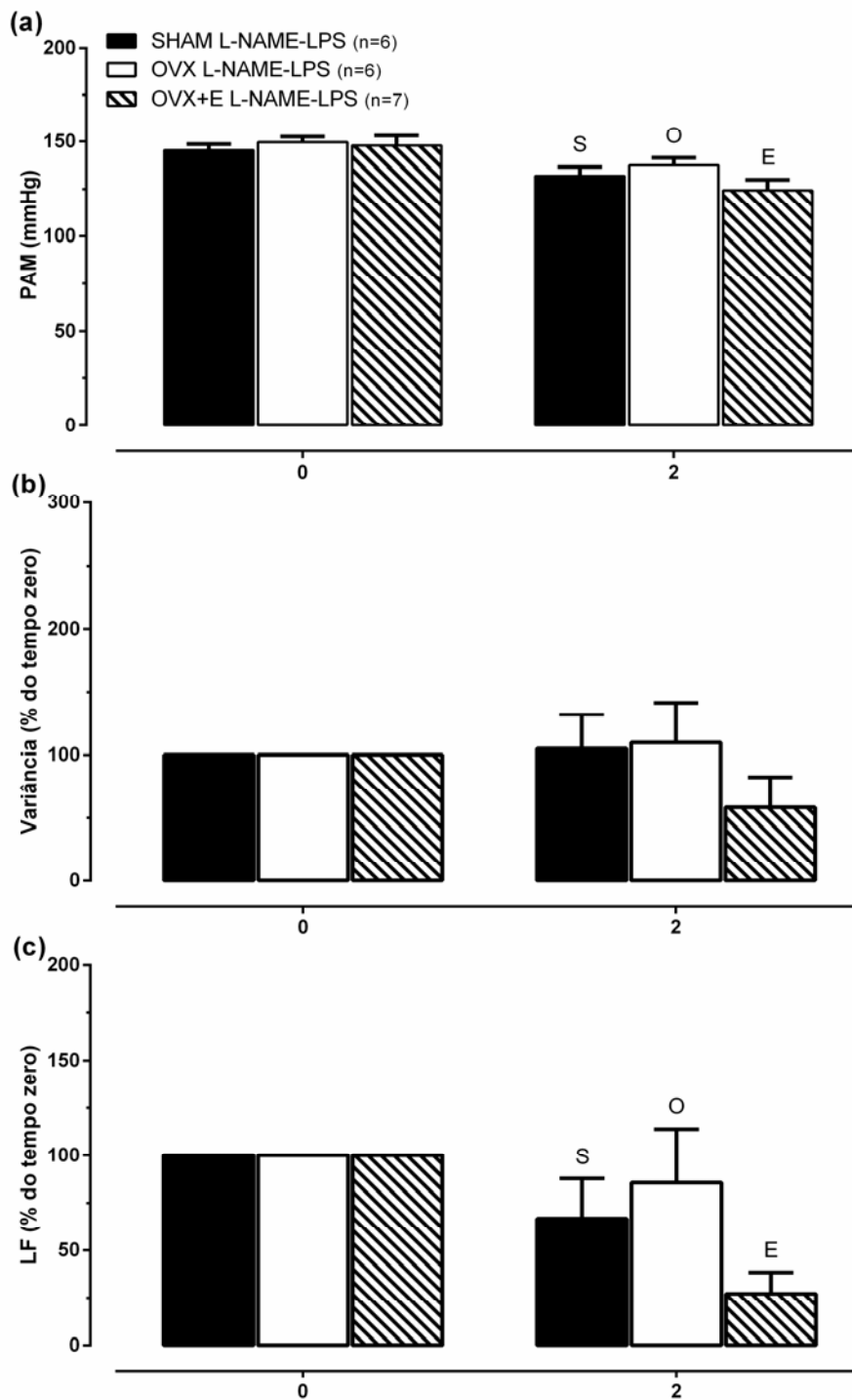
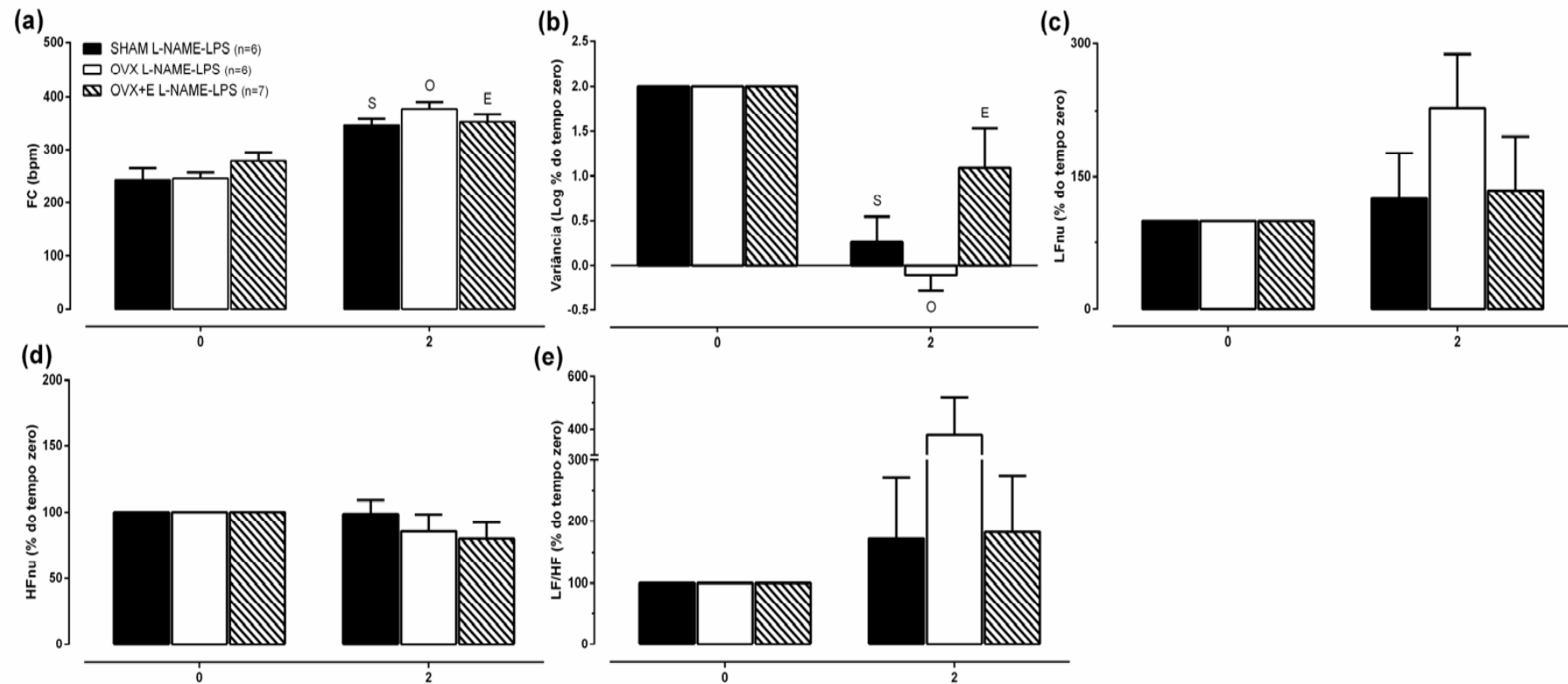


Figura 16 – Efeitos do LPS (5 mg/Kg), após 2 horas, sobre os parâmetros cardíacos de ratas adultas pré-tratadas com L-NAME (10 mg/Kg): (a) valores absolutos de FC (bpm); diferenças nos parâmetros de variabilidade da FC em % do tempo zero (efeito do L-NAME e administração de LPS): (b) log da variância, (c) componente de baixa frequência normalizado (LFnu), (d) componente de alta frequência normalizado (HFnu) e (e) razão LF/HF. Diferenças dentro de cada grupo em relação ao tempo zero identificadas pelas iniciais do grupo a que se refere: SHAM (S), OVX (O) e OVX+E (E). Valores estão expressos como média \pm EPM, n = 6-9 ratas por grupo, ANOVA-2V MR com pós-teste de Bonferroni, $P < 0.05$.



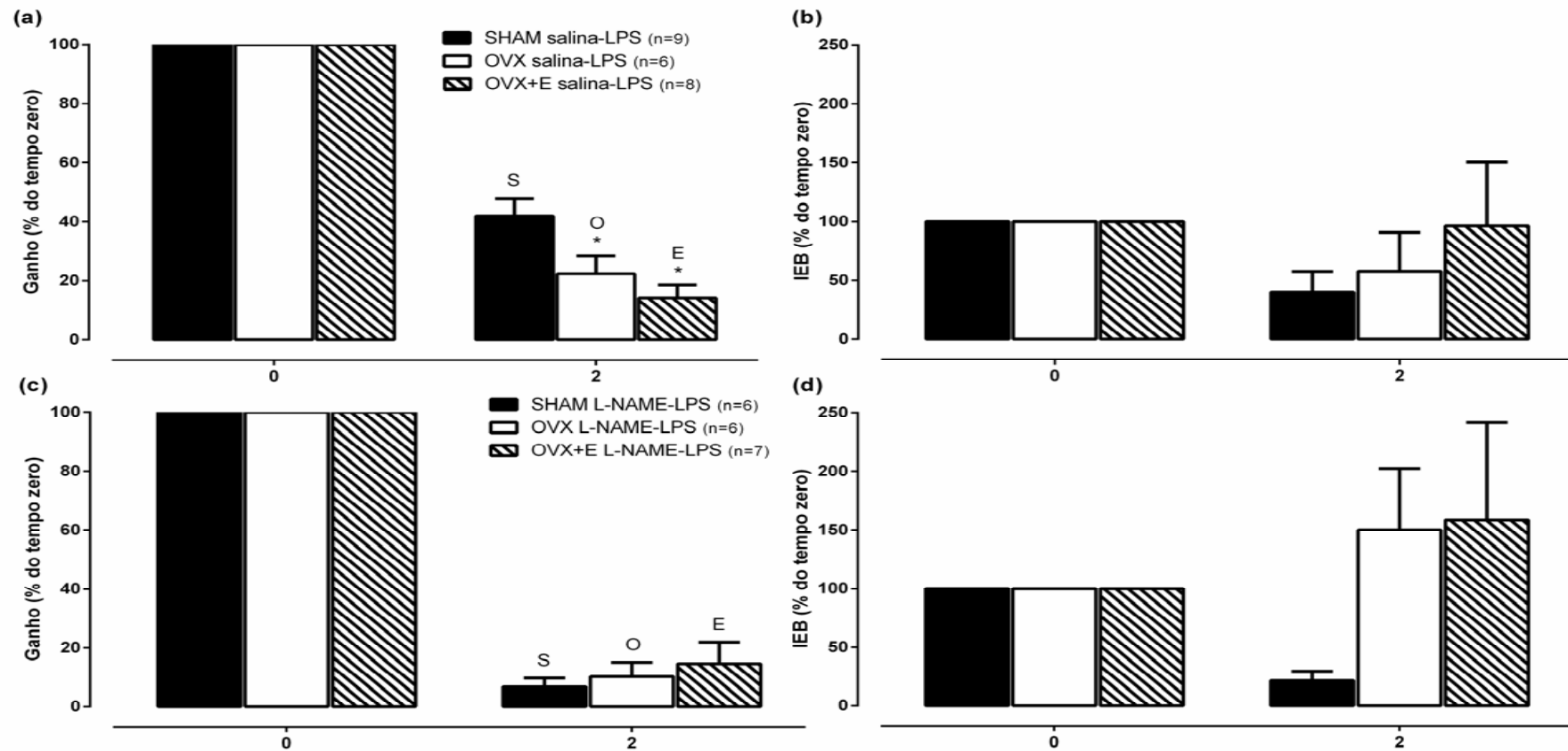
Os efeitos da inibição das cNOS sobre a VFC durante a endotoxemia estão demonstrados nas figuras 16b a 16e. Após o L-NAME, a ANOVA-2V MR ainda indicou efeito do tempo pós-LPS sobre a variância do IP (Fig. 16b) que se manteve reduzida. O pré-tratamento com L-NAME aboliu as interações e diferenças observadas no LF (Fig. 16c) e HF (Fig. 16d), enquanto a razão LF/HF mostrou-se similar em todos os grupos 2 horas após a indução de endotoxemia com LPS, com nenhum efeito dos fatores existentes (Fig. 16e).

A análise da resposta da SBR ao LPS (Fig. 17) revelou para o ganho do barorreflexo interação significativa entre os fatores tratamento hormonal e tempo pós-LPS (Fig. 17a); após 2 horas o LPS reduziu o ganho total em todos os grupos, mas a ovariectomia promoveu uma queda mais intensa e o tratamento com estradiol não a preveniu. Quanto ao IEB, este não apresentou influências dos fatores ou interação entre os mesmos (Fig. 17b).

Na presença do L-NAME, a ANOVA-2V MR da resposta da SBR ao LPS identificou efeito do tempo pós-LPS sobre o ganho total (Fig. 17c) e a inibição das cNOS fez as diferenças observadas entre SHAM e os grupos OVX e OVX+E desaparecerem, pois a redução foi equivalente entre os 3 grupos. O L-NAME não mudou a resposta do IEB ao LPS, de modo que também não houve influências dos fatores nesse parâmetro da SBR (Fig. 17d).

Os valores absolutos da VFC após a injeção de LPS (5 mg/Kg) podem ser observados na tabela 6. Estes estão expressos como porcentagem de variação em relação ao tempo zero, quando sob efeito do L-NAME ou da solução fisiológica.

Figura 17 – Efeito do LPS (5 mg/Kg), após 2 horas, sobre a sensibilidade barorreflexa de ratas adultas pré-tratadas com L-NAME (10mg/Kg) ou solução fisiológica de NaCl (0,9%): (a) ganho total salina+LPS, (b) índice de efetividade barorreflexa (IEB) total salina+LPS, (c) ganho total L-NAME+LPS, (d) índice de efetividade barorreflexa (IEB) total L-NAME+LPS. Diferenças dentro de cada grupo em relação ao tempo zero identificadas pelas iniciais do grupo a que se refere: SHAM (S), OVX (O) e OVX+E (E). (*) Diferente do grupo SHAM dentro das 2 horas. Valores estão expressos como média \pm EPM, n = 6-9 amostras por grupo salina+LPS e n = 6-7 ratas por grupo L-NAME+LPS, ANOVA-2V MR com pós-teste de Bonferroni, $P < 0.05$.



A %LF absoluto do IP apresentou apenas efeito do fator tempo pós-LPS após a ANOVA-2V MR ($P \leq 0.05$), indicando que o LPS reduziu esse parâmetro em todos os grupos, sem diferenças entre si, pois não houve efeito do fator tratamento (tabela 6).

A análise da %HF absoluto apresentou efeito do fator tempo entre os grupos salina+LPS, sem interação, indicando que todos os grupos responderam ao LPS, também com redução desse parâmetro. Por outro lado, a análise dos grupos L-NAME+LPS revelou interação entre os fatores tempo e tratamento hormonal (ANOVA-2V MR, pós-teste de Bonferroni, $P \leq 0.05$); o grupo SHAM apresentou queda na %HF absoluto e a ovariectomia não alterou essa resposta (0.73 ± 0.3 versus -0.13 ± 0.2 , tabela 6), mas quando o grupo SHAM foi comparado com o grupo OVX+E, observou-se que o tratamento com estradiol atenuou essa queda (0.73 ± 0.3 versus -0.42 ± 0.2 , tabela 6).

Tabela 6 – Porcentagem da variabilidade da frequência cardíaca 2 horas após a administração de LPS (5 mg/kg)

	Salina-LPS			L-NAME-LPS		
	SHAM (n=9)	OVX (n=6)	OVX+E (n=8)	SHAM (n=6)	OVX (n=6)	OVX+E (n=7)
LF (Log %T0)	1.4 ± 0.2^S	0.9 ± 0.4^O	1.6 ± 0.1^E	-0.2 ± 0.4^S	-0.1 ± 0.3^O	0.5 ± 0.4^E
HF (Log %T0)	1.4 ± 0.1^S	1.5 ± 0.2^O	1.5 ± 0.1^E	-0.1 ± 0.2^S	-0.4 ± 0.2^O	$0.7 \pm 0.3^{E*#}$

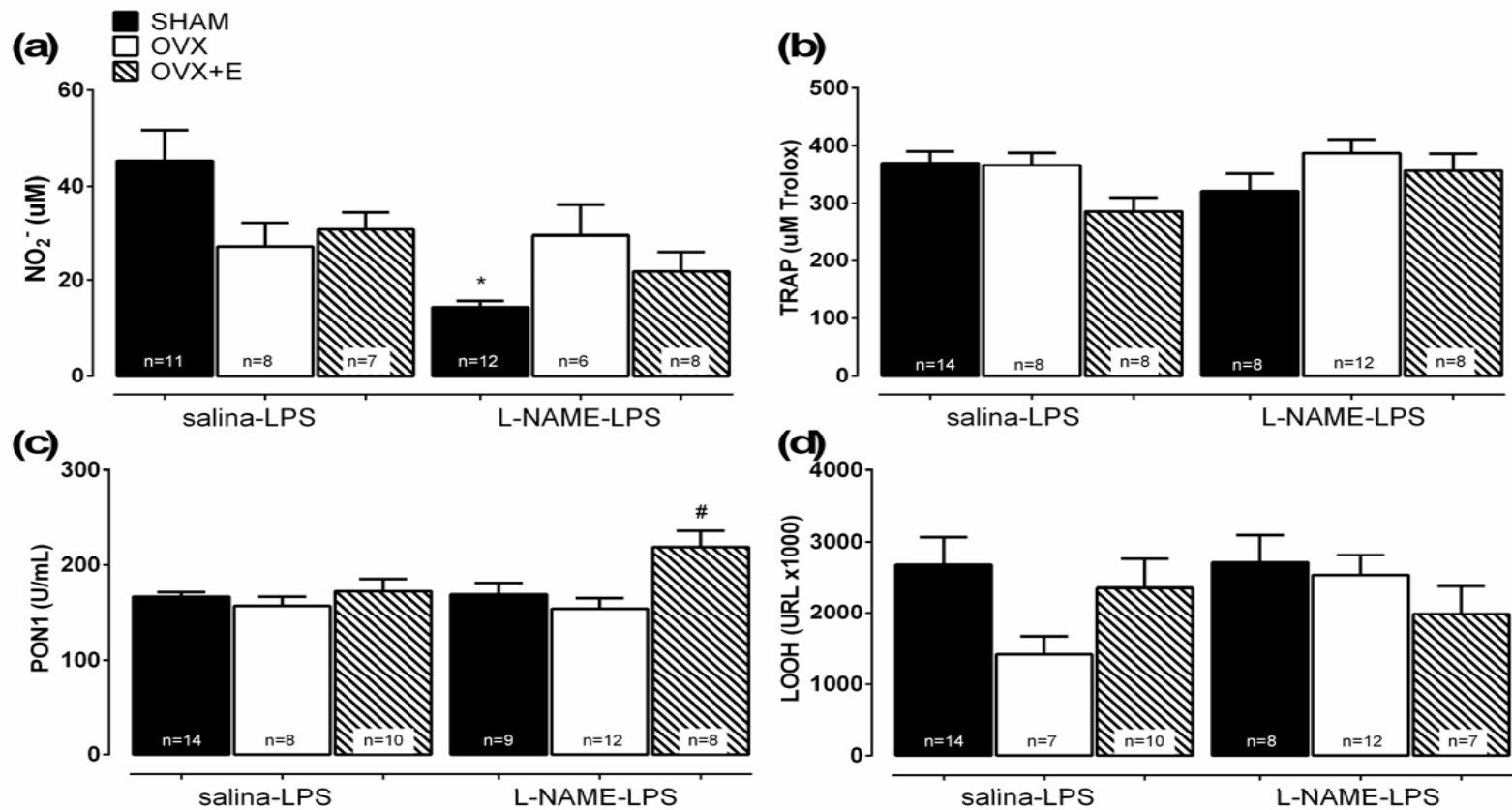
LF, baixa frequência; HF, alta frequência. T0, tempo zero, determinado como o momento da administração de LPS, 100% (valores em Log = Log de 100% = 2). Valores estão expressos como média \pm EPM e foram analisados por ANOVA-2V MR com pós-teste de Bonferroni (fatores: tempo e tratamento hormonal). Diferenças dentro de cada grupo em relação ao T0: SHAM (S), OVX (O) e OVX+E (E). Diferenças entre os grupos: SHAM (*), OVX (#), $P \leq 0.05$.

Os efeitos do estrógeno sobre parâmetros bioquímicos de ratas submetidas a 2 horas de endotoxemia por LPS, após administração de L-NAME ou solução de NaCl (0,9%, salina) estão expostos na figura 18. Os níveis de nitrito mostraram-se similares entre os animais endotoxêmicos pré-tratados com salina; quando tratados com L-NAME os animais endotoxêmicos do grupo SHAM, mas não dos grupos OVX e OVX+E, apresentaram menores níveis de nitrito (Fig. 18a).

A TRAP não foi diferente entre os grupos endotoxêmicos salina e L-NAME (Fig. 18b), assim como não houve diferenças nos níveis de hidroperóxidos no

plasma (Fig. 18d). No que diz respeito à PON1, sua atividade não foi diferente entre os grupos pré-tratados com salina, mas elevou-se nos animais tratados com estradiol que receberam L-NAME antes do LPS, quando em comparação com o grupo OVX+L-NAME.

Figura 18 – Efeitos do tratamento hormonal diário (estradiol 1 mg/kg) sobre parâmetros bioquímicos 2 horas após a administração de LPS (5 mg/Kg): (a) níveis de nitrito, (b) capacidade antioxidante total plasmática (TRAP), (c) atividade da enzima paraoxonase 1 (PON1), (d) níveis de hidroperóxidos no plasma (LOOH). Barras representam média \pm EPM. Dados foram analisados por ANOVA-1V seguida por pós-teste de Bonferroni. *P < 0.001 versus SHAM salina-LPS; #P < 0.01 versus OVX L-NAME-LPS.



4.5 ESTUDO 3: PARTICIPAÇÃO DO ESTRÓGENO NOS EFEITOS DA SMT SOBRE PARÂMETROS CARDIOVASCULARES, AUTONÔMICOS E OXIDATIVOS DE RATAS SUBMETIDAS À ENDOTOXEMIA POR LPS

Neste estudo, a indução de endotoxemia ocorreu 10 minutos após a administração de salina ou SMT. Nesse momento, denominado “tempo zero”, os parâmetros cardiovasculares e autonômicos estavam como demonstra a tabela 7. A variação entre os parâmetros dentro de um mesmo grupo foi grande o suficiente para muitos não apresentarem distribuição normal e serem representados na forma de medianas com intervalos interquartis, por isso, embora aparentemente se observe alterações em vários parâmetros, nem todos apresentaram diferença estatisticamente significativa.

A administração de SMT aumentou a pressão arterial em todos os grupos, quando comparados aos seus controles que receberam salina, mas este aumento só foi significativo estatisticamente nos grupos SHAM e OVX+E (aumento aproximado de ± 15 e 24 mmHg, respectivamente); enquanto a queda na FC foi significativa nos grupos OVX e OVX+E (redução aproximada de ± 45 e 78 bpm, respectivamente, tabela 7).

A inibição da iNOS com SMT reduziu significativamente o LF da PAS nas ratas OVX, quando comparadas às ratas OVX que receberam salina, e esta redução da modulação simpática vascular se manteve nos animais tratados com estradiol, quando comparados aos seus controles OVX+E salina.

Aumentos na VFC foram observados minutos após a injeção de SMT, nos animais OVX e OVX+E, quando comparados aos grupos que receberam salina. Os animais tratados com estradiol, que receberam SMT, também apresentaram aumento do HFabsoluto; este desapareceu com a normalização.

Tabela 7 – Variáveis hemodinâmicas, variabilidade da frequência cardíaca, variabilidade da pressão sistólica e sensibilidade barorreflexa antes da injeção de LPS: Resposta ao SMT

	SHAM Salina (n=9)	SHAM SMT (n=8)	OVX Salina (n=8)	OVX SMT (n=9)	OVX+E Salina (n=9)	OVX+E SMT (n=8)
Variáveis hemodinâmicas						
PAM (mmHg)	104 (101-106)	119 (116-128)**	107 (104-113)	124 (116-130)	111 (107-113)	135 (126-143)**
FC (bpm)	348 ± 5.9	327 ± 15.0	362 ± 5.6	317 ± 6.0*	382 ± 6.2	304 ± 12.6***
PAS						
Variância (mmHg ²)	11.4 ± 1.2	24.0 ± 5.1	18.0 ± 3.9	28.7 ± 5.7	19.3 ± 2.1	31.5 ± 6.2
LF (mmHg ²)	3.8 ± 0.5	2.2 ± 0.4	5.7 ± 0.8	2.5 ± 0.7*	6.0 ± 1.2	1.9 ± 0.4**
IP						
Variância (ms ²)	48 (21-53)	46 (34-88)	26 (12-43)	86 (60-198)*	28 (19-36)	184 (61-521)**
LF (ms ²)	5.2 (2.2-7.6)	1.9 (1.4-15)	2.5 (2.1-3.1)	5.3 (3.2-9.8)	2.1 (1.6-2.7)	9.2 (3.1-16)
LFnu	37.9 ± 3.3	27.0 ± 4.8	38.4 ± 2.5	31.4 ± 3.2	38.7 ± 4.1	25.9 ± 3.7
HF (ms ²)	6.9 (4.5-13.7)	5.6 (2.5-6.4)	3.7 (2.5-6.4)	9.6 (6.2-18.7)	3.3 (3.1-4.8)	34.3 (7.1-86)*
HFnu	62.1 ± 3.3	73.0 ± 4.8	61.6 ± 2.5	68.6 ± 3.2	61.3 ± 4.1	74.1 ± 3.7
Razão LF/HF	0.7 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.4 ± 0.1
SBR						
Ganho total (ms/mmHg)	1.5 (1.2-2.1)	1.2 (0.9-1.5)	0.9 (0.7-1.3)	2.3 (1.6-2.8)*	1.3 (1.0-1.4)	3.8 (1.1-5.6)
IEB total	0.19 ± 0.03	0.11 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.17 ± 0.02	0.14 ± 0.03	0.12 ± 0.02

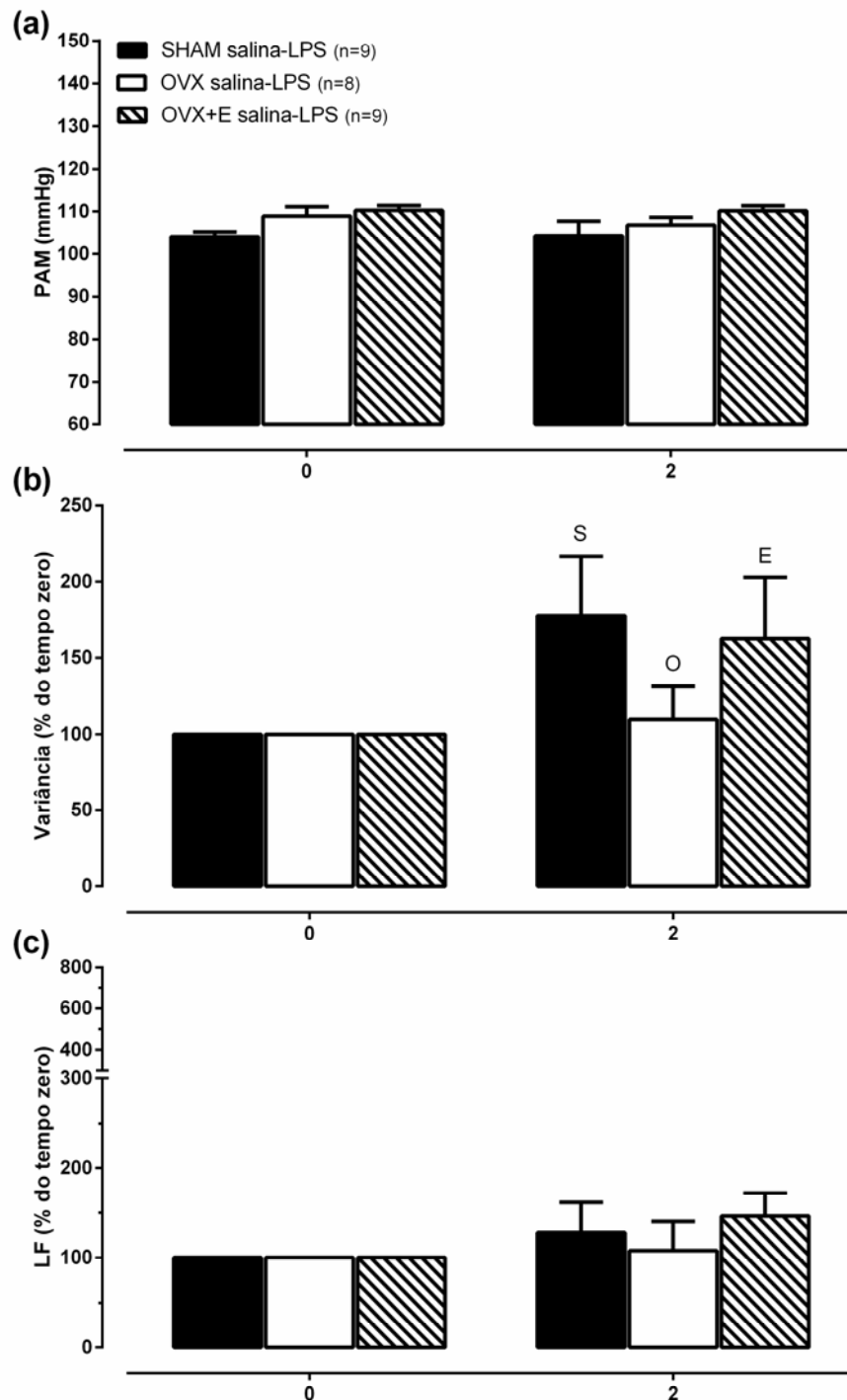
PAM, pressão arterial média; FC, frequência cardíaca; PAS, pressão arterial sistólica; LF, baixa frequência; IP, intervalo de pulso; HF, alta frequência; SBR, sensibilidade barorreflexa; IEB, índice de efetividade barorreflexa. PAM, Variância do IP, LF absoluto LF do IP, HF absoluto do IP e o ganho barorreflexo total foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e estão representados como mediana (25% e 75% interquartis). Demais dados foram analisados por ANOVA de 1 via e estão representados como média ± EPM. * Diferença significativa quando comparado ao respectivo grupo salina: *P ≤ 0.05; **P ≤ 0.01; ***P ≤ 0.001.

A tabela 7 permite ainda observar que o SMT aumentou a SBR das ratas OVX. As ratas OVX+E também parecem apresentar aumento da SBR em resposta ao SMT, mas não houve significância estatística. De fato, os grupos OVX e OVX+E apresentaram maiores respostas de FC em resposta ao SMT, corroborando essas informações.

Para a análise dos efeitos do tratamento com estradiol sobre a endotoxemia estabeleceu-se, para os parâmetros autonômicos, a porcentagem das alterações em relação ao tempo zero (0, momento da administração do LPS), quando os grupos estavam sob efeito da injeção de salina (Fig. 19, 20, 23a, b, tabela 8) ou SMT (Fig. 21, 22, 23c, d, tabela 8).

A figura 19 mostra os parâmetros de PAM e VPS dos grupos experimentais que serviram de controle para o estudo dos efeitos da administração prévia de SMT sobre a endotoxemia por LPS. Esses grupos receberam o veículo do SMT, salina 0,9%, antes do LPS. A ANOVA-2V MR da PAM (Fig. 19a) indicou efeito do tratamento hormonal sobre a resposta ao LPS, independentemente do tempo, ou seja, 2 horas após a injeção de salina a resposta pressórica dos grupos foi a mesma do que no tempo zero. Analisando a VPS, ANOVA-2V MR da % da variância (Fig. 19b) indicou efeito do fator tempo, ou seja, há um aumento da VPS 2h após o LPS, independentemente do tratamento hormonal. A % do LFabs não apresentou alterações estatisticamente significantes (Fig. 19c).

Figura 19 – Efeitos do LPS (5 mg/Kg), após 2 horas, sobre os parâmetros pressóricos de ratas adultas: (a) valores absolutos de PAM (mmHg); diferenças nos parâmetros de variabilidade da pressão sistólica em % do tempo zero (efeito da salina e administração de LPS): (b) variância e (c) componente de baixa frequência (LF). Diferenças dentro de cada grupo em relação ao tempo zero identificadas pelas iniciais do grupo a que se refere: SHAM (S), OVX (O) e OVX+E (E). Valores estão expressos como média \pm EPM, n = 8-9 amostras por grupo, ANOVA-2V MR com pós-teste de Bonferroni, $P < 0.05$.



Os parâmetros cardíacos dos grupos tratados com salina antes do LPS encontram-se na figura 20 e tabela 8. A ANOVA-2V MR da FC indicou efeito dos dois fatores: tempo pós-LPS e tratamento hormonal, sem interação entre os mesmos (Fig. 20a); o pós-teste de Bonferroni indicou que a FC no grupo OVX+E, no tempo zero, estava maior quando comparado ao SHAM (348 ± 5.9 e 382 ± 6.2 bpm, respectivamente, $P < 0.01$); e todos apresentaram maiores valores de FC em 2h quando comparados aos seus valores no tempo zero, com aumentos de 51 ± 9 , 53 ± 9 e 54 ± 10 bpm para SHAM, OVX e OVX+E, respectivamente.

A análise da VFC, na forma de % em relação ao tempo zero, realizada para verificar a influência do sistema nervoso autônomo (SNA) sobre a FC, revelou efeito do tempo sobre a % de variância do IP (ANOVA-2V MR, Fig. 20b), com o LPS reduzindo igualmente a VFC de todos os grupos. Ao observar a VFC no domínio da frequência, os componentes LF e HF em unidades normalizadas (Fig. 20c e 20d) não apresentaram alterações significativas em relação ao tempo zero; enquanto sobre as unidades absolutas, representadas na tabela 8, o LPS promoveu redução equivalente em todos os grupos após 2h, em ambos %LFabs e %HFabs (ANOVA-2V MR, efeito do fator tempo, $P < 0.05$). Como estes dois fatores diminuíram, a % da relação LF/HF não apresentou alterações (Fig. 20e).

O LPS, após 2h, reduziu a SBR de todos os grupos de forma equivalente, indicada pelo efeito do fator tempo na ANOVA-2V MR do ganho total (Fig. 23a), sem afetar a efetividade do barorreflexo, analisada pelo IEB (Fig. 23b).

Figura 20 – Efeitos do LPS (5 mg/Kg), após 2 horas, sobre os parâmetros cardíacos de ratas adultas: (a) valores absolutos de FC (bpm); diferenças nos parâmetros de variabilidade da FC em % do tempo zero (efeito da salina e administração de LPS): (b) variância, (c) componente de baixa frequência normalizado (LFnu), (d) componente de alta frequência normalizado (HFnu) e (e) razão LF/HF. Valores estão expressos como média \pm EPM, $n = 8-9$ amostras por grupo, ANOVA-2V MR com pós-teste de Bonferroni. Diferenças dentro de cada grupo em relação ao tempo zero identificadas pelas iniciais do grupo a que se refere: SHAM (S), OVX (O) e OVX+E (E). Diferenças entre os grupos dentro de cada tempo: SHAM (*), * $P < 0.01$.

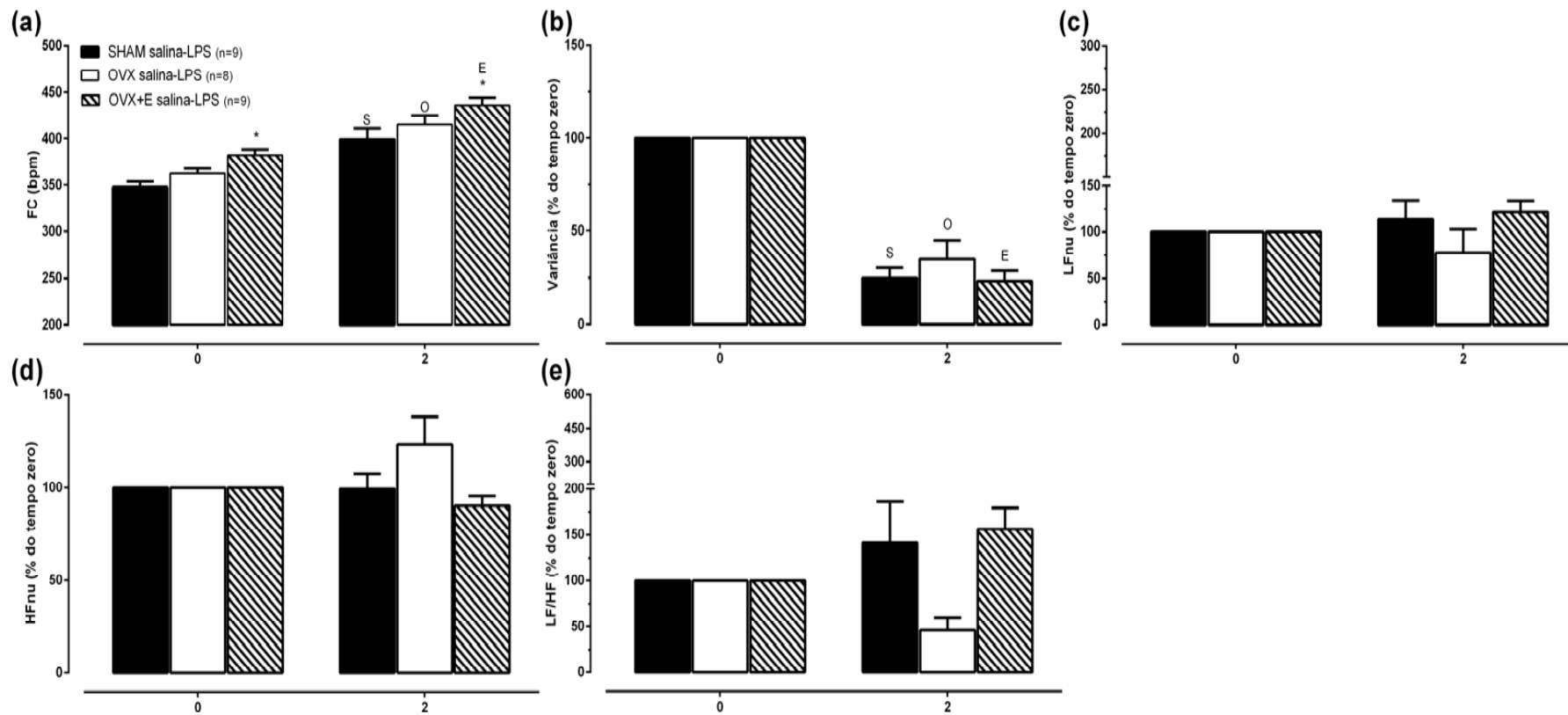


Tabela 8 – Porcentagem da variabilidade da frequência cardíaca 2 horas após a administração de LPS (5 mg/kg)

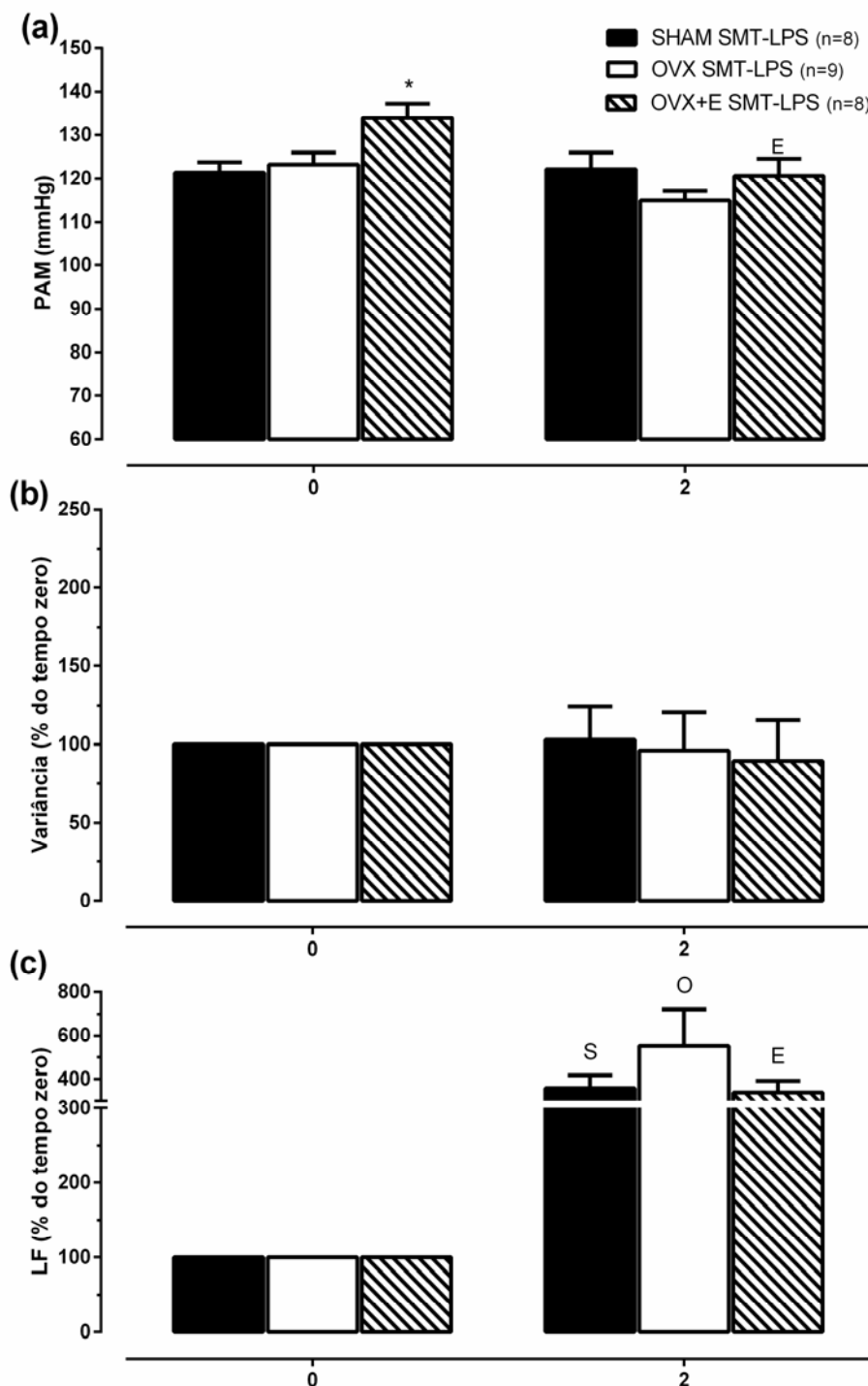
	Salina-LPS			SMT-LPS		
	SHAM (n=9)	OVX (n=8)	OVX+E (n=9)	SHAM (n=8)	OVX (n=9)	OVX+E (n=8)
LF (%T0)	63±25 ^S	49±16 ^O	48±11 ^E	92±42 ^S	68±16 ^O	22±10 ^E
HF (Log%T0)	1.4±0.1 ^S	1.6±0.2 ^O	1.5±0.1 ^E	0.9±0.4 ^S	1.2±0.1 ^O	0.5±0.3 ^E

LF, baixa frequência; HF, alta frequência. T0, tempo zero, determinado como o momento da administração de LPS, igual a 100%. HF representado em log para alcançar homogeneidade e normalidade na amostra (Log de 100% = 2, T0).

Diferenças dentro de cada grupo em relação ao tempo zero (100%): SHAM (S), OVX (O) e OVX+E (E). Valores estão expressos como média ± EPM e foram analisados por ANOVA-2V MR (fatores: tempo e tratamento hormonal).

Figuras 21, 22 e tabela 8 apresentam os efeitos do tratamento com estradiol sobre parâmetros pressóricos e cardíacos ao término de 2 horas de endotoxemia sob efeito do SMT (3mg/Kg). A ANOVA-2V MR da PAM (Fig. 21a) indicou interação entre os fatores tempo pós-LPS e tratamento hormonal, o desmembramento da análise com o pós-teste de Bonferroni revelou, no tempo zero, que o tratamento com estradiol promoveu maior resposta hipertensora à SMT, quando comparado ao grupo SHAM (134 ±3.3 e 121 ±2.3 mmHg, respectivamente, P < 0.05). Quando analisadas as diferenças dentro de cada grupo, entre os tempos zero e 2 h, o grupo OVX+E foi o único a apresentar redução significativa da PAM em resposta ao LPS (variações de PAM em relação ao tempo zero: SHAM 1 ±3, OVX -8 ±3 e OVX+E -13 ±4 mmHg, P < 0.05; Fig. 21a).

Figura 21 – Efeitos do LPS (5 mg/Kg), após 2 horas, sobre os parâmetros pressóricos de ratas adultas pré-tratadas com SMT (3 mg/Kg): (a) valores absolutos de PAM (mmHg); diferenças nos parâmetros de variabilidade da pressão sistólica em % do tempo zero (efeito do SMT e administração de LPS): (b) variância e (c) componente de baixa frequência (LF). Valores estão expressos como média \pm EPM, n = 8-9 ratas por grupo, ANOVA-2V MR com pós-teste de Bonferroni. Diferenças dentro de cada grupo em relação ao tempo zero identificadas pelas iniciais do grupo a que se refere: SHAM (S), OVX (O) e OVX+E (E). Diferenças entre os grupos dentro do tempo zero: SHAM (*), P < 0.05.



A análise da VPS foi efetuada para investigar as influências autonômicas sobre essas respostas ao LPS, sob efeito do SMT e os dados estão apresentados em % de variação do tempo zero. A ANOVA-2V MR não identificou alterações na % da variância da PAS (Fig. 21b), enquanto a modulação simpática vascular, medida pelo LF (Fig. 21c), aumentou de forma equivalente nos 3 grupos, conforme indicado pelo efeito significativo do fator tempo na ANOVA-2V MR.

A análise dos parâmetros cardíacos antes e 2 horas após o LPS, dos animais tratados com SMT está na figura 22. A FC aumentou de forma equivalente em todos os grupos após o LPS, conforme indicado pelo efeito do fator tempo na ANOVA-2V MR (Fig. 22a, $P < 0.05$), com aumentos de 55 ± 22 para SHAM, 72 ± 14 para OVX e 94 ± 19 bpm para OVX+E. Estabeleceu-se a % dos valores de VFC em relação ao tempo zero e a ANOVA-2V MR revelou efeito do fator tempo para todos os parâmetros analisados, ou seja, de modo equivalente para os 3 grupos, a variância do IP (Fig. 22b) e o HFnu (Fig. 22d) reduziram 2 horas após o LPS, enquanto o LFnu e a razão LF/HF aumentaram após o LPS (Fig. 22c e 22e, respectivamente).

O tempo pós-LPS também reduziu de forma igual para os 3 grupos a %LF absoluto do IP, e o log da %HF absoluto dos grupos tratados com SMT (tabela 8), conforme indicado pela ANOVA-2V MR (efeito do fator tempo, $P < 0.05$).

A análise da SBR (Fig. 23) revelou que o tratamento prévio com SMT não alterou a resposta dos grupos ao LPS, pois estes apresentaram os mesmos resultados observados com os animais tratados previamente com salina (Fig. 23a e 23b), com redução do ganho (Fig. 23c), indicada pelo efeito do fator tempo na ANOVA-2V MR, sem alterações na efetividade (Fig. 23d).

Figura 22 – Efeitos do LPS (5 mg/Kg), após 2 horas, sobre os parâmetros cardíacos de ratas adultas pré-tratadas com SMT (3 mg/Kg): (a) valores absolutos de FC (bpm); diferenças nos parâmetros de variabilidade da FC em % do tempo zero (efeito do SMT e administração de LPS): (b) variância, (c) componente de baixa frequência normalizado (LFnu), (d) componente de alta frequência normalizado (HFnu) e (e) razão LF/HF. Diferenças dentro de cada grupo em relação ao tempo zero identificadas pelas iniciais do grupo a que se refere: SHAM (S), OVX (O) e OVX+E (E). Valores estão expressos como média \pm EPM, n = 8-9 ratas por grupo, P < 0.05.

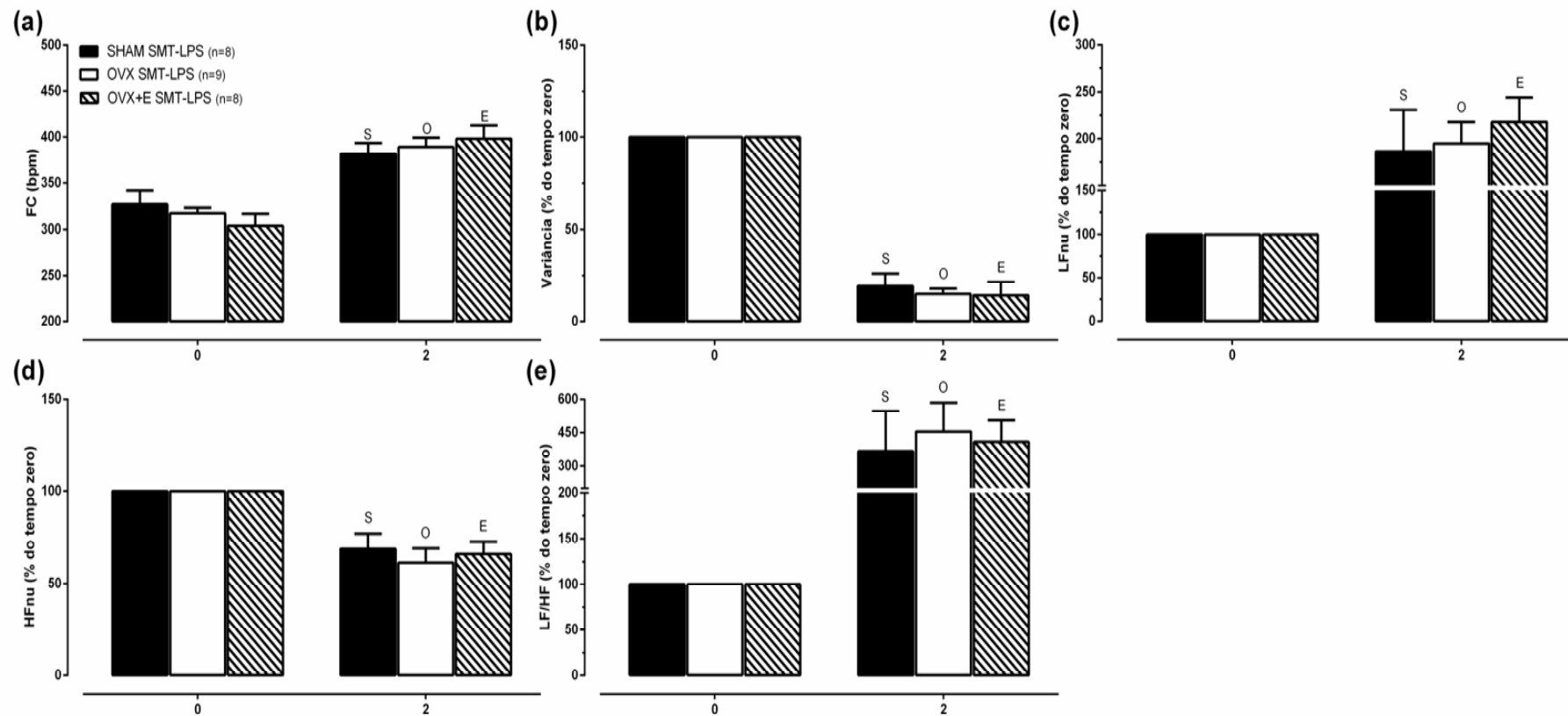
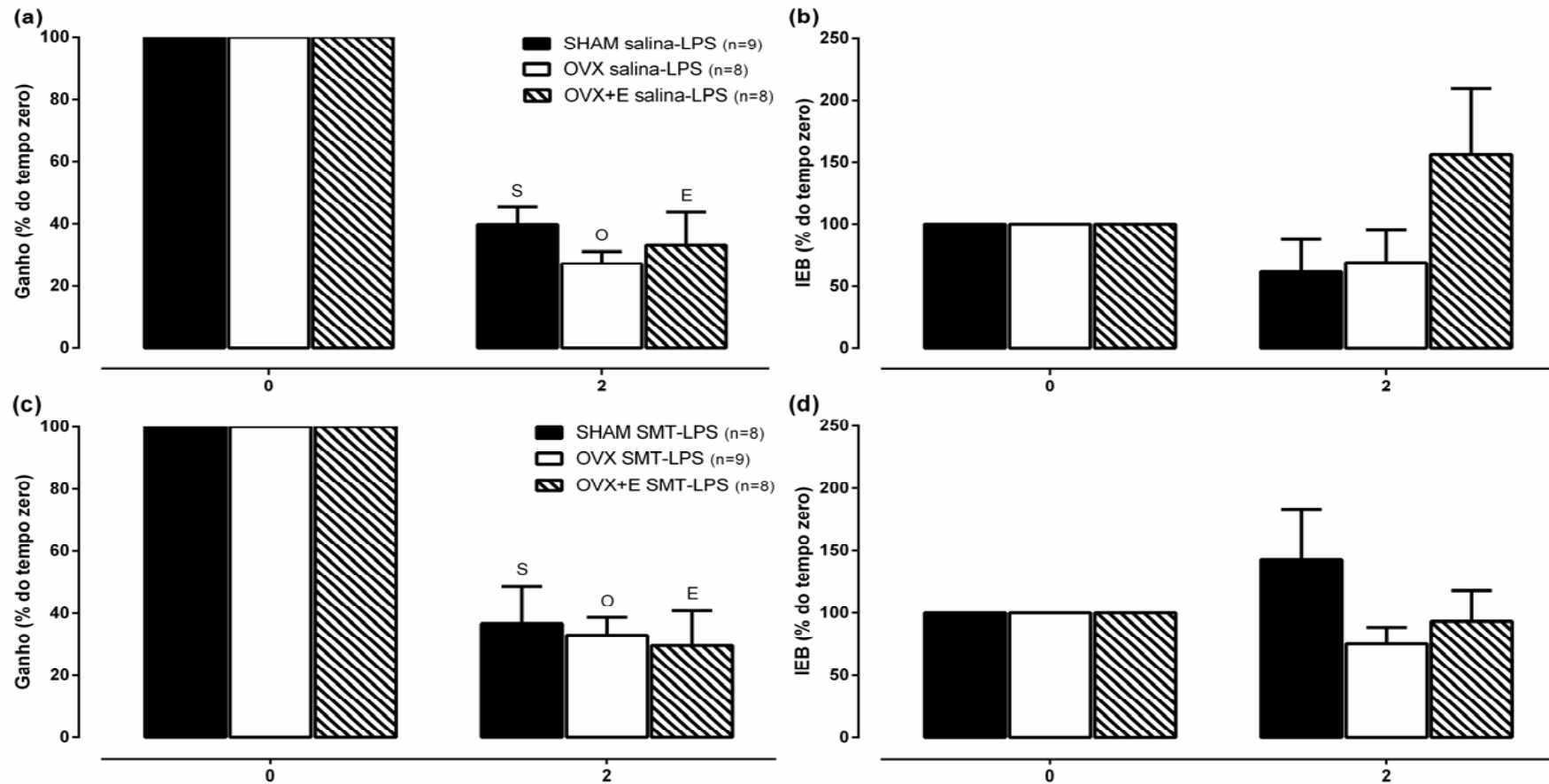


Figura 23 – Efeito do LPS (5 mg/Kg), após 2 horas, sobre a sensibilidade barorreflexa de ratas adultas pré-tratadas com SMT (3mg/Kg) ou solução fisiológica de NaCl (0,9%): (a) ganho total salina-LPS, (b) índice de efetividade barorreflexa (IEB) total salina-LPS, (c) ganho total SMT-LPS, (d) índice de efetividade barorreflexa (IEB) total SMT-LPS. ANOVA-2V MR com pós-teste de Bonferroni, diferenças dentro de cada grupo em relação ao tempo zero: SHAM (S), OVX (O) e OVX+E (E). Valores estão expressos como média \pm EPM, n = 8-9 ratas por grupo, P < 0.05.



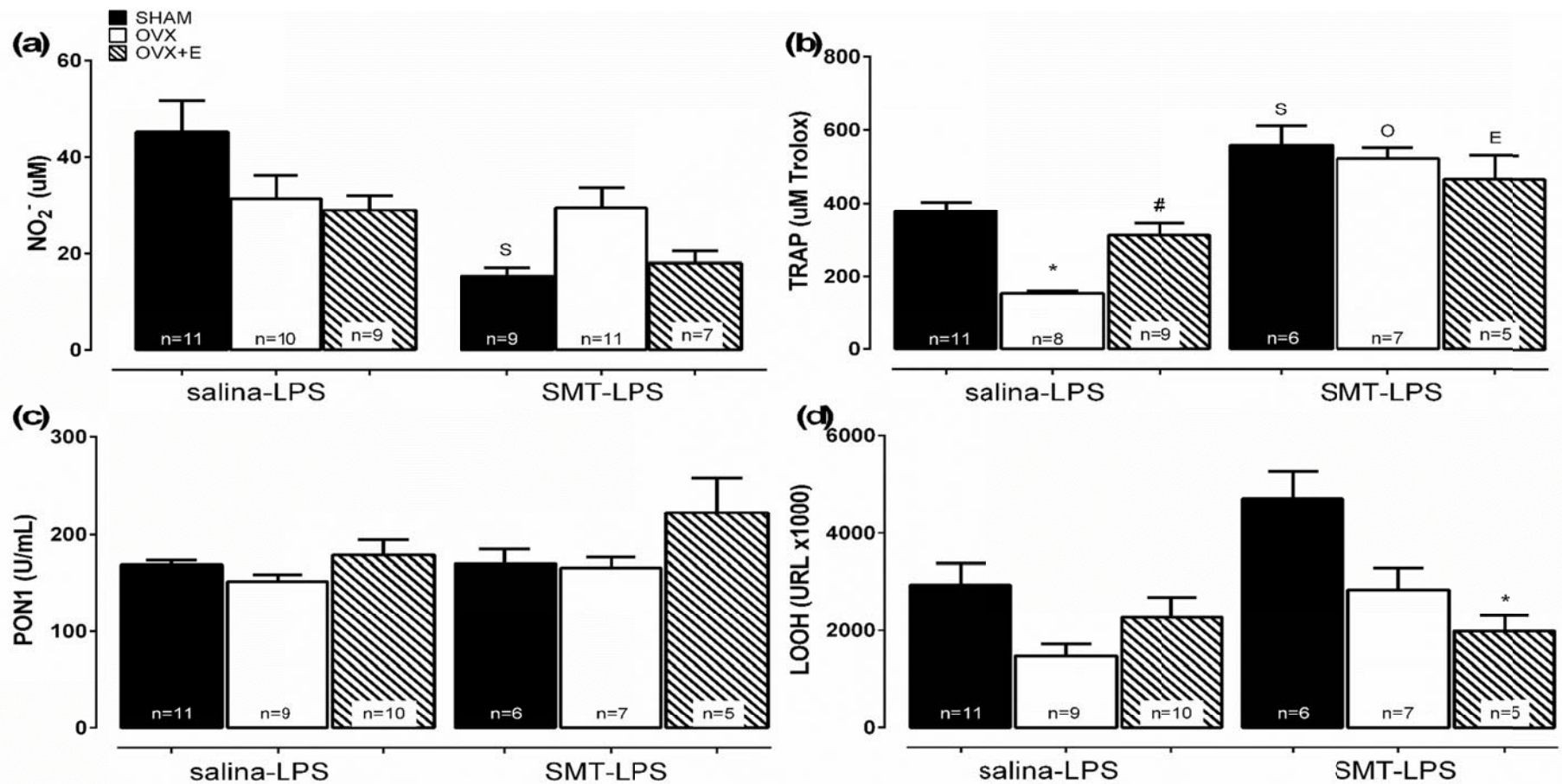
2 horas após a indução da endotoxemia, efetuou-se ainda a dosagem dos níveis de nitrito, a medida da TRAP, a medida da atividade da PON1 e a capacidade de formar peróxidos de lipídeos, nos animais previamente tratados com salina e com SMT (salina-LPS e SMT-LPS, respectivamente, Fig. 24).

Analisando os animais salina-LPS, a única alteração significativa entre os 3 grupos desse tratamento, foi a redução na TRAP do grupo OVX, quando comparado aos grupos SHAM e OVX+E (ANOVA-1V, pós-teste de Bonferroni, $P < 0.05$, Fig. 24b).

A ANOVA-1V não indicou diferenças estatisticamente significantes entre os 3 grupos que receberam SMT previamente, nos níveis de nitrito (Fig. 24a), na TRAP (Fig. 24b), ou na atividade da PON1 (Fig. 24c), porém níveis de hidroperóxidos plasmáticos foram menores no grupo OVX+E, quando comparados ao SHAM (pós-teste de Bonferroni, $P < 0.05$, Fig. 24d).

A análise de variância também comparou os grupos salina-LPS com os respectivos SMT-LPS, a fim de verificar o que a inibição da iNOS poderia fazer com a resposta desses parâmetros ao LPS. Observou-se que o SMT fez as ratas SHAM produzirem menos nitrito em resposta ao LPS, quando comparadas às SHAM salina-LPS (Fig. 24a), assim como aumentou a TRAP dos 3 grupos experimentais, quando comparados aos seus respectivos salina-LPS (Fig. 24b).

Figura 24 – Efeitos do tratamento hormonal diário (estradiol 1 mg/kg) sobre parâmetros bioquímicos 2 horas após a administração de LPS (5 mg/Kg): (a) níveis de nitrito, (b) capacidade antioxidante total plasmática (TRAP), (c) atividade da enzima paraoxonase 1 (PON1), (d) níveis de hidroperóxidos no plasma (LOOH). Barras representam média \pm EPM. ANOVA-1V seguida por pós-teste de Bonferroni. Diferenças dentro do salina-LPS ou do SMT-LPS: SHAM (*) e OVX (#). Diferenças entre salina-LPS e SMT-LPS: SHAM (S), OVX (O) e OVX+E (E). *P < 0.01 versus SHAM; #P < 0.05 versus OVX.



5 DISCUSSÃO

5.1 DETERMINAÇÃO DA EFICÁCIA DA OVARIECTOMIA E DO TRATAMENTO HORMONAL

A eficácia da privação hormonal, gerada pela OVX, e do tratamento com estradiol foram confirmados pelos resultados observados sobre os pesos uterino e corporal. Conforme esperado, a retirada dos ovários promoveu, após 8 semanas, maior ganho de peso do que o observado nos demais grupos, além de apresentar atrofia uterina marcante, evidenciada pelo peso do órgão. O tratamento de ratas OVX com estradiol durante o mesmo período preveniu essas alterações.

Esses resultados estão de acordo com os dados apresentados por Paigel *et al.* (2011) e Ceylan-Isik *et al.* (2009), onde o mesmo tempo de avaliação da OVX e, no caso de Ceylan-Isik, o mesmo regime de tratamento hormonal com estradiol preveniram as diferenças entre grupos nos pesos corporal e uterino.

5.2 PARÂMETROS CARDIOVASCULARES E AUTÔNOMICOS BASAIS

Observou-se no presente estudo que a OVX não alterou as variáveis hemodinâmicas basais de ratas Wistar, enquanto o tratamento com estradiol (valerato de estradiol 1mg/Kg/dia, VO) promoveu um aumento da FC, quando comparado aos grupos SHAM e OVX. El-Mas e Abdel-Rahman (2009) observaram que tanto a PAM como a FC permaneceram inalteradas em ratas Sprague-Dawley OVX (16 semanas após a OVX), comparadas com ratas SHAM, mas o tratamento com estradiol durante 13 semanas (implante SC de benzoato de estradiol, dose aproximada de 1,2mg/Kg/dia, iniciado 3 semanas após a OVX) promoveu diminuição da PAM sem alterar a FC (El-Mas e Abdel-Rahman, 2009; 2014).

Outros resultados foram observados por Ceylan-Isik *et al.* (2009), onde o uso de estradiol (1mg/Kg/dia, VO), após 8 semanas, promoveu redução da FC. Por outro lado, Subramanian *et al.* (2011; 2015) relataram aumento da PAM e FC com estradiol (pellets com liberação de 20 ng/dia) em ratas Sprague-Dawley, evidenciando a falta de consenso em relação aos efeitos do tratamento com estradiol sobre as variáveis hemodinâmicas de ratas.

A análise espectral da VPS e VFC não justificam os parâmetros hemodinâmicos, pois a variância e o LF da PAS, usado como índice vascular simpático (El-Mas e Abdel-Rahman, 2014), aumentou no grupo OVX, sem que isso refletisse em aumento da PAM, enquanto o tratamento com estradiol não preveniu esta alteração, apresentando igualmente modulação simpática aumentada na PAS sem aumento da PAM. Ainda, a OVX reduziu o ganho da SBR e o tratamento com estradiol alterou pouco esta ação da ovariectomia.

A literatura a respeito da análise espectral cardiovascular em ratas é variada. El-Mas e Abdel-Rahman (2009; 2014) relataram que o tratamento com estradiol restaurou as densidades do espectro do IP de ratas Sprague-Dawley OVX ao nível dos controles SHAM, com predominância parassimpática cardíaca (razão LF/HF reduzida). Adicionalmente, o estradiol reduziu as oscilações LF da VPS, sugerindo uma redução do tônus vasomotor simpático. Indo em oposição a essas observações, Dias *et al.* (2010) reportaram aumento do LF e redução do HF na VFC de ratas Wistar tratadas com estradiol (benzoato de estradiol, 0,001mg/Kg/dia, 21 dias), concluindo que este desloca o equilíbrio autonômico da FC em direção a uma predominância simpática.

Os resultados acima apresentados referem-se a diferentes doses e períodos de tratamento com estradiol do que os do presente estudo, e até mesmo as linhagens são variadas, o que ajudaria a explicar em parte, as discrepâncias entre as informações disponíveis. Importante observar que, mesmo em pesquisas com a mesma duração, diferentes resultados podem ser encontrados (Dias *et al.*, 2010; Campos *et al.*, 2014), sugerindo cautela ao afirmar que o estrógeno seria bom ou ruim para o SCV.

Mulheres na pós-menopausa apresentam menor SBR e variância da VFC que homens e estas aumentam com o tratamento com estradiol (Huikuri *et al.*, 1996). A redução na SBR em ratas OVX foi anteriormente observada (Losurdo *et al.*, 2015) e representa uma complicação para o SCV. Kikuiya *et al.* (2000) observaram que uma função barorreflexa alterada (reduzida) relaciona-se a uma resposta pressórica exagerada a estímulos, tanto físicos como mentais, e resulta em uma VPS e modulação simpática aumentadas, ou seja, estes autores afirmaram que a VPS alta, seria mediada, ao menos em parte, por um barorreflexo cardíaco alterado (Kikuya *et al.*, 2000), ambos observados no grupo OVX e prevenidos parcialmente pelo tratamento com estradiol.

Outra hipótese para o aumento da VPS (variância e LF) é levantada com base nos dados de Blanc *et al.* (2000), e Yung *et al.* (2011), os primeiros afirmam que a ação da angiotensina II sobre seus receptores AT1 aumenta a VPS em seu componente LF sem o envolvimento do SNA simpático e sem alterar a pressão arterial ou a FC; enquanto os últimos pontuam que a OVX, através de um conjunto de eventos celulares interligados na parede vascular, leva a uma redução da biodisponibilidade de NO (Yung *et al.*, 2011). Tais eventos seriam: aumento da expressão da Enzima Conversora da Angiotensina (ECA), maior produção de angiotensina II e consequente superexpressão do AT1, aumento dos níveis de EROx (peroxinitrito, O_2^-) via aumentos de NAD(P)H oxidase e nitrotirosina na aorta das ratas. Dessa forma, o aumento do LF da PAS observado em nosso estudo seria reflexo da ativação do SRA e da redução da SBR promovidas pela ausência de ovários.

“O estrógeno não é bom nem ruim, mas simplesmente estimula a atividade NOS, e é o ambiente bioquímico ao seu redor que determina se o hormônio leva à produção de produtos benéficos (NO) ou deletérios (superóxido)” (White *et al.*, 2010). White *et al.* (2005) estabeleceram uma ligação entre a nNOS e o

relaxamento e a vasoconstrição coronariana, induzidos pelo estrógeno. A geração de NO pode causar aumento do estresse oxidativo pelo desacoplamento das enzimas NOS, resultando na geração de ânion superóxido e, conseqüentemente, formação de peroxinitrito (Torok, 2008; White *et al.*, 2010). Confirmando esta hipótese, Subramanian *et al.* (2011) reverteram, com o uso de um antioxidante, os níveis aumentados de superóxido induzidos pelo estradiol, em áreas cerebrais importantes para o controle pressórico e a atividade autonômica simpática e, conseqüentemente, controlaram a hipertensão associada.

A literatura relata a ação normalizadora do estradiol sobre os níveis de atividade do SRA nos componentes do SCV de ratas OVX (Dean *et al.*, 2005), mesmo sem alterar a atividade plasmática da mesma (Ramos-Filho *et al.*, 2013). Estes dados levam a especular que o estradiol poderia exercer seus efeitos sobre a VPS e a FC através de mecanismos envolvendo a NOS e o estresse oxidativo, além da resposta à redução da SBR.

Ainda, Kobrin (2002) afirma que o sulfato de 17 β -estradiol promove vasoconstrição coronariana distinta que resulta na redução da força de contração e dos demais índices de contratilidade cardíaca. Essa ação do estradiol poderia levar a um aumento da FC como reflexo para manutenção do débito cardíaco em níveis adequados.

As diferenças entre os grupos OVX+E e SHAM podem ser atribuídas também a diferenças no ambiente hormonal. Certamente, a privação hormonal gerada pela OVX envolve dois hormônios: estrógeno e progesterona; quando comparadas a ratas intactas, ratas OVX tratadas com estrógeno não exibem características hormonais idênticas (estrógeno e progesterona versus somente estrógeno) (El-Mas e Abdel-Rahman, 2009).

Muitas das diferenças na fisiologia do SCV entre os gêneros têm sido atribuídas à presença do estradiol nas fêmeas, mas falta consenso na literatura sobre os efeitos do tratamento com este hormônio sobre a função vascular e cardíaca. Dado o exposto, esta etapa do estudo objetivou traçar o perfil dos efeitos da ovariectomia e do tratamento crônico com estrógeno sobre esses parâmetros em ratas Wistar acordadas. Podemos observar que a OVX causa redução da SBR, corroborando dados da literatura a respeito da privação hormonal. Esta redução, somada à hipótese da ativação do SRA promovida pela OVX justificam os aumentos da VPS e do componente LF. Ademais, conclui-se que o ambiente gerado pela

ausência dos hormônios ovarianos, pode fazer com que o tratamento exclusivo com estradiol, transforme as NOS em geradoras de estresse oxidativo, o que contribui para a falta de prevenção dos efeitos da OVX sobre a VPS, além da pouca melhora sobre a SBR, e da maior FC nos animais tratados.

O envolvimento das NOS nas respostas cardiovasculares foi investigado pela administração aguda dos inibidores competitivos das vias constitutiva e induzível, L-NAME e SMT respectivamente.

5.3 ESTUDO 1: EFEITOS DO ESTRÓGENO SOBRE PARÂMETROS CARDIOVASCULARES, AUTONÔMICOS E OXIDATIVOS DE RATAS SUBMETIDAS À INIBIÇÃO AGUDA DAS VIAS CONSTITUTIVA E INDUZÍVEL DA NOS

Este estudo demonstrou que a resposta hemodinâmica de ratas Wistar, após 2 horas de inibição da NOS, varia conforme a via inibida, e é independente do estrógeno em sua maior parte. O L-NAME reduziu o LF da PAS, enquanto o SMT o aumentou; o SMT também reduziu a variância e o HF do IP. Por outro lado, o estradiol influencia a formação de NO plasmático e a atividade de uma importante enzima cardioprotetora, a PON1. O NO proveniente da via constitutiva é mais importante na manutenção da atividade da PON1 de ratas ovariectomizadas, enquanto o NO da via induzível é mais importante para os níveis plasmáticos totais deste gás nas ratas tratadas com estradiol.

O perfil fisiológico de resposta cardiovascular durante o registro pressórico pode ser observado nos grupos que receberam salina. A ANOVA-2V MR não revelou diferenças nos parâmetros cardiovasculares, entre 2 horas de registro pós-salina e o tempo zero, exceto por uma leve redução no log da variância do IP e no ganho total da SBR nos 3 grupos.

A análise do barorreflexo espontâneo permite a avaliação do ganho e da efetividade barorreflexas através de uma técnica simples em que flutuações espontâneas da PA geram mudanças no intervalo R-R (Schwartz *et al.*, 2013). Esta redução da SBR das ratas em função do tempo, juntamente com a variância da VFC, pode ser reflexo da adaptação dos parâmetros cardíacos dos animais devido ao tempo de permanência no sistema de registro, ou reflexo de oscilações espontâneas dos parâmetros, uma vez que as ratas estavam acordadas e com livre movimentação. De fato, Zamir *et al.* (2014) afirmam que, em condições basais, o barorreflexo existe num estado flutuante com um ganho altamente variável.

Em 2 horas, a ovariectomia parece ter promovido uma diminuição na capacidade antioxidante plasmática das ratas (não confirmada pelo pós-teste de Bonferroni). A redução da capacidade antioxidante plasmática pela retirada dos ovários e seu restabelecimento, ou prevenção, pelo tratamento com estradiol já foi observada anteriormente (Hernandez *et al.*, 2000), onde essa queda no perfil antioxidante foi associada ao aumento de lipoperóxidos, e os autores argumentaram

que tais resultados seriam reflexo de um desequilíbrio no estado redox com predominância de processos oxidativos que poderiam estar associados a uma redução na atividade do NO. Os dados de parâmetros oxidativos do presente trabalho não permitem a mesma inferência. Pode ser que estas alterações propostas, no caso das ratas Wistar do presente estudo, estejam localizadas em tecidos de importância ao SCV, como os vasos de resistência, e as medidas plasmáticas, pela influência dos parâmetros de outros tecidos, seriam incapazes de detectar alterações mais sutis, porém não menos importantes.

Fisiologicamente, existe um tônus vasodilatador dependente de NO que é essencial para a regulação do fluxo sanguíneo e pressão. Este tônus, segundo revisão de Lirk *et al.* (2002), é mantido pelas ações físicas do fluxo pulsante e da tensão de cisalhamento, e pelas ações químicas dos mediadores vasoativos sobre as células endoteliais. Muitas das ações biológicas do NO são mediadas pelo sistema guanilato ciclase-GMPc (Katsuki *et al.*, 1977), enquanto outras são independentes desta via. O NO já demonstrou ativar a enzima ciclooxigenase (COX), e este processo pode gerar prostaglandinas vasodilatadoras e/ou vasoconstritoras (Lirk *et al.*, 2002).

A inibição das NOS, tanto com L-NAME como com SMT, promoveu aumento da PAM das ratas dos 3 grupos experimentais, confirmando que a menor disponibilidade de NO é um importante fator de risco para a hipertensão (Torok, 2008) e demonstrando que a participação do NO no controle cardiovascular é importante para as fêmeas como um todo.

A farmacodinâmica do L-NAME prevê, uma vez dentro de um sistema biológico, sua pronta hidrólise em L-N^ω-Nitroarginine (L-NNA), o L-NNA interage não-covalentemente com todas as isoformas da NOS, mas seu acoplamento à iNOS é rapidamente revertido, enquanto a ligação às cNOS é um processo relativamente mais lento, dependente do tempo [revisado por Vitecek *et al.* (2012)]. Chen e Hu (1997) observaram, em um estudo de curva dose-resposta ao L-NAME, respostas máximas de aumento da PA e redução da FC para a dose de 10 mg/Kg, dose selecionada para o presente estudo.

Os resultados de PAM e FC observados após 2h de exposição ao L-NAME estão de acordo com Gardiner *et al.* (1990), que observaram hipertensão sem alterações significativas de FC com a mesma dose e período, argumentando que a desaceleração reflexa do coração, por si só, não seria um fator importante de

oposição às mudanças de pressão geradas pelo L-NAME. Esses autores também observaram que o L-NAME (10 mg/Kg), após 2 horas, promove vasoconstrição dos leitos vasculares renal, mesentérico e dos membros inferiores de ratos Long Evans. Hu *et al.* (1997), ao estudarem os efeitos do bloqueio da NOS com L-NAME sobre a hemodinâmica arterial, concluíram que o bloqueio agudo do NO afeta predominantemente a resistência vascular periférica, com ações relativamente fracas sobre a impedância arterial e o trabalho ventricular.

No presente estudo, o L-NAME reduziu o LF da PAS das fêmeas, sem diferenças entre os grupos. Estas flutuações de LF na PAS podem ocorrer por redução na atividade simpática vasomotora, redução na resposta vascular periférica ao neurotransmissor do simpático, ou saturação nas descargas do nervo simpático periférico com perda de ação modulatória (Silva e Januário, 2005).

A literatura diverge sobre os mecanismos da hipertensão aguda por L-NAME. O tratamento feito por Chaswal *et al.* (2011) em ratos Wistar, além do aumento da PA, promoveu aumento da SBR, do estresse oxidativo (malondialdeído sérico) e da relação LF/HF. Estes resultados foram abolidos ou atenuados pela simpatectomia, o que levou os autores a concluírem que a inervação simpática exerce importante papel na hipertensão aguda por L-NAME. Por outro lado, Rapoport (2014) afirma que a endotelina-1 é quem medeia uma parte significativa da elevação da PA à exposição aguda a inibidores da NOS. E Banting *et al.* (1996) observaram que o aumento da PAM pelo uso agudo do L-NAME está associado a um aumento na ativação dos receptores de endotelina-1 (ETA), um antagonista fisiológico das ações vasodilatadoras do NO, mais do que a aumentos na ativação dos receptores alfa-1 adrenérgicos, AT1 da angiotensina ou vasopressinérgicos. De fato, o uso de um antagonista dos receptores da endotelina promoveu aumento do LF da PAS (Souza *et al.*, 2008), o que sugere que sua ativação pode levar à redução do LF na hipertensão ao L-NAME. Dessa forma, mecanismos alternativos ao SNA simpático podem ser mais importantes para a resposta pressora ao L-NAME, como a inibição da ação vasodilatadora direta do NO pela droga, o SRA, ou mesmo a endotelina-1.

A hipertensão gerada pela administração de L-NAME foi menos intensa no grupo OVX que no SHAM, o que sugere que a geração de NO pelas cNOS é menor nas ratas sem estradiol circulante. De fato, Pávó *et al.* (2000) observaram que ratas OVX apresentam redução da atividade das cNOS na aorta,

enquanto o tratamento diário com estradiol ou raloxifeno, um modulador seletivo do receptor de estrógeno, previne esta alteração. Hernandez *et al.* (2000) também relataram menor redução da condutância vascular, um índice de vasodilatação, em ratas OVX, argumentando sobre uma menor dependência vascular do NO nestes animais. De forma semelhante, Lamas *et al.* (2015) observaram no leito mesentérico de ratas OVX, menor ação do L-NAME em comparação com ratas SHAM ou tratadas com estradiol, sendo que aqueles animais apresentaram redução da expressão de eNOS e aumento de iNOS quando comparados com estes.

No grupo OVX, a inibição das cNOS também mostrou menor atividade plasmática da PON1 em comparação com o grupo SHAM, e o estradiol preveniu esta alteração. Conforme apresentado na introdução, a enzima PON1 é um “bioscavenger” responsável por hidrolisar peróxidos de lipídios, possui papel fundamental no sistema antioxidante (Li *et al.*, 2013; Bojic *et al.*, 2014), e tem sido considerada como um marcador de risco cardiovascular. A menopausa cirúrgica foi demonstrada como um fator redutor da atividade da enzima PON1 (Kumru *et al.*, 2005), enquanto o estradiol comprovadamente estimula a atividade da mesma (Ahmad e Scott, 2010), restaurando seus níveis nos animais tratados. Contudo, até o presente momento, não há dados correlacionando a atividade da PON1 em fêmeas com o uso agudo de L-NAME, sendo este o primeiro trabalho a apresentar essa medida.

A relação entre atividade reduzida da PON1 e L-NAME foi estabelecida na hipertensão crônica induzida pelo mesmo, em machos (Gocmen *et al.*, 2014), onde argumenta-se que o aumento de produtos de peroxidação lipídica poderiam inativar a PON1 ou o próprio aumento da PAM levaria à redução da capacidade de hidrólise da enzima. Esta relação entre aumento do estresse oxidativo e redução da atividade oxidante, diante do aumento progressivo da PAM, pode ter ocorrido nas ratas OVX, uma vez que já foi demonstrado que estes animais apresentam perfil pró-oxidante, inclusive em tecidos importantes para a função cardiovascular (Ceravolo *et al.*, 2013; Claudio *et al.*, 2014).

A literatura mostra uma relação entre a presença de iNOS, em estados fisiológicos em fêmeas e os níveis de estradiol. Upmacis *et al.* (2011) detectaram a iNOS no coração de camundongos e camundongas, sendo os corações das fêmeas nocaute para esta enzima mais pesados. Nuedling *et al.* (1999) observaram que o estradiol estimula a expressão de eNOS e iNOS em

cardiomiócitos de ratos e ratas Wistar-Kyoto, e que a ovariectomia reduz os níveis de ambas as isoformas; enquanto Zhu *et al.* (2002) observaram que o estrógeno induz a expressão de iNOS em anéis de aorta sem endotélio, garantindo ação vasodilatadora direta no músculo liso vascular. Entretanto, uma atividade constitutiva da iNOS está presente em machos também, sugerindo uma ação independente de hormônios ovarianos, e importante para o SCV. Dados da literatura descrevem uma atividade tônica da iNOS no SNC de machos, inibindo o efluxo simpático do bulbo ventrolateral rostral (RVLM) (Chan *et al.*, 2001).

Para estudar a importância fisiológica desta isoforma da NOS nos grupos experimentais, utilizou-se a SMT na dose de 3mg/Kg. Esta droga é considerada um inibidor seletivo da iNOS quando comparado aos análogos da L-arginina N-substituídos (Southan *et al.*, 1995), como o L-NAME. Southan *et al.* (1995) observaram uma redução da ação inibitória da SMT sobre iNOS pelo excesso de L-arginina, demonstrando a natureza competitiva da inibição e sugerindo que a droga deve agir pela ocupação do sítio de ligação da L-arginina na NOS.

A resposta pressórica à administração de SMT está de acordo com dados estabelecidos para machos anestesiados, em que doses entre 1 e 10 mg/Kg promoveram respostas máximas em 5 minutos (Southan *et al.*, 1995). Na dose de 3 mg/kg, a mesma utilizada no presente estudo, a ação inibitória sobre a iNOS se mantém por 6h (Su *et al.*, 2007).

Na avaliação da modulação autonômica pressórica e cardíaca 2 horas após a injeção de SMT, esta promoveu aumento do componente LF da PAS e redução da VFC e do seu componente HF absoluto. A redução da variância da VFC também foi observada nos animais tratados com salina, o que leva à hipótese de que essa alteração possa ser um artefato do tempo de registro, sem ligação com a inibição da iNOS. Ainda, sobre a VFC, a Task Force das sociedades europeia e norte-americana de cardiologia (1996) afirma que, na análise espectral de curtos períodos, como deste dado, a experiência e grau de conhecimento são maiores na interpretação das medidas do domínio da frequência, em comparação com as medidas do domínio do tempo provenientes de um mesmo trecho.

No que diz respeito aos dados de HF absolutos, a Task Force (1996) recomenda que as unidades absolutas da VFC no domínio da frequência devem vir sempre acompanhadas das unidades normalizadas, uma vez que o cálculo destas minimiza o efeito das mudanças no poder total sobre os valores de LF e HF e

desconta os valores das ondas de muito baixa frequência, que não têm significado para registros de curta duração. Devido a essas interferências que não permitem maiores discussões, dado o tamanho do período analisado (3 minutos), apenas as unidades normalizadas foram consideradas, e estas não se alteraram 2 h após a injeção de SMT.

A inibição da iNOS em estados basais ou fisiológicos, segundo informações disponíveis até o momento, não promove alterações hemodinâmicas ou cardiovasculares autonômicas em fêmeas (El-Mas *et al.*, 2006; El-Mas e Abdel-Rahman, 2014). No entanto esses estudos foram realizados em fêmeas Sprague-Dawley e utilizando outros inibidores. A relação entre inibição da iNOS e aumento da PAM com ativação do SNA simpático observada no presente trabalho foi demonstrada em machos, no trabalho de Chan *et al.* (2001) com ratos, e na análise da VFC em camundongos nocaute para a iNOS (Mani *et al.*, 2006). Embora não tenhamos observado alterações na VFC, houve um aumento da modulação simpática vascular e essa, até o momento, é a primeira observação de alterações na VPS após inibição aguda da iNOS em ratas Wistar.

Está bem estabelecida a ação estimuladora do estrógeno sobre o NO e sua importância no SCV (Knowlton e Lee, 2012). O tratamento com SMT, após 2 horas, reduziu os níveis de nitrito no plasma das ratas tratadas com estradiol. Upmacis *et al.* (2011) observaram maiores níveis de nitrito e nitrato na urina de fêmeas, quando comparados com machos, e esses foram menores nos animais nocaute para a iNOS. Estudos tem demonstrado a capacidade que o estradiol tem de aumentar fisiologicamente a expressão e a atividade da iNOS (Nuedling *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 2002). A inibição da iNOS levou a uma redução significativa nos níveis de NO_2^- das ratas OVX+E, quando comparadas às OVX, confirmando a ação do estradiol como estimulador da atividade das NOS.

Este estudo foi realizado para verificar variações cardiovasculares, autonômicas e de parâmetros oxidativos, após o bloqueio das vias constitutiva e induzível da enzima NOS em ratas OVX e tratadas com estradiol. Tendo em vista os aspectos observados, tanto a via constitutiva quanto a induzível são importantes no controle pressórico das fêmeas, sendo que o aumento da PAM pela inibição das cNOS parece depender de agentes vasoconstritores periféricos, tendo como hipótese o SRA e a endotelina, enquanto a inibição da iNOS pode ser mediadora de uma desinibição simpática central. O menor aumento de PAM pelo L-NAME

observado nas ratas OVX, leva a supor que a ovariectomia promove redução da quantidade ou atividade das cNOS e a um estado pró-oxidante que, diante da inibição das poucas enzimas restantes, contribuiu para a redução da atividade da PON1. Este estado de maior risco cardiovascular, revelado pela inibição das cNOS nas ratas OVX, é prevenido pelo tratamento com estradiol. É possível que o organismo, na ausência de estímulo ovariano, mantenha os níveis plasmáticos de NO através da maior expressão ou atividade da iNOS, e este mecanismo seja reforçado pelo tratamento com estradiol, uma vez que a sua inibição reduziu os níveis de nitrito nas ratas OVX+E.

A importância de cada via da NOS nas respostas cardiovasculares, autonômicas e de parâmetros oxidativos de fêmeas, na endotoxemia por LPS, foi investigada nos estudos 2 e 3.

5.4 ESTUDO 2: PARTICIPAÇÃO DO ESTRÓGENO NOS EFEITOS DO L-NAME SOBRE PARÂMETROS CARDIOVASCULARES, AUTONÔMICOS E OXIDATIVOS DE RATAS SUBMETIDAS À ENDOTOXEMIA POR LPS

A administração de L-NAME, após 5 minutos, aboliu as diferenças nos parâmetros hemodinâmicos e de VPS observadas entre os grupos. Todos se tornaram igualmente hipertensos e bradicárdicos, confirmando que a menor disponibilidade de NO é um importante fator de risco para a hipertensão (Torok, 2008) e que a participação do NO no controle cardiovascular é importante para as fêmeas como um todo.

Os resultados mais imediatos da exposição aguda ao L-NAME evidenciaram uma tendência geral de aumento da variância e do HFnu da VFC, e de redução do LFnu. Contudo, diferenças significativas somente foram observadas no grupo OVX, comparado ao seu controle OVX-salina. A análise da SBR revelou menor IEB dos animais SHAM e OVX com L-NAME, e maior ganho no grupo OVX, quando comparados aos seus controles salina.

Estes resultados diferem de alguns dados obtidos com machos, como no trabalho de Chaswal *et al.* (2011), que relataram redução na potência HF e aumento da razão LF/HF após injeção de L-NAME. Contudo, conferem com outros resultados, como Souza *et al.* (2001) que observaram uma redução da banda LF no espectro da FC. Ainda, a hipertensão induzida por L-NAME já foi relacionada com uma maior influência vagal sobre a FC (Scrogin *et al.*, 1998), sugerindo uma ligação entre o controle simpático cardíaco e a atividade da cNOS, independente do estrógeno.

A hipertensão aguda por L-NAME também foi associada à atividade da endotelina (Rapoport, 2014). E a atividade dos seus receptores foi relacionada a redução da modulação simpática cardíaca e aumento da SBR (Souza *et al.*, 2008). Assim, conforme discutido no estudo 1, mecanismos alternativos ao SNA simpático podem ser mais importantes para a resposta pressora ao L-NAME, como a inibição da ação vasodilatadora direta do NO pela droga, ou mesmo a endotelina-1.

No que diz respeito à SBR, os dados da literatura também mostram que o tipo de uso, agudo ou crônico, do L-NAME influencia a resposta. Souza *et al.* (2001) e Scrogin *et al.* (1998) relataram a atenuação do ganho barorreflexo pela

administração crônica de L-NAME em ratos, enquanto um aumento da SBR após hipertensão aguda por L-NAME foi observado por Chaswal *et al.* (2011), o que está de acordo com os dados observados nas ratas OVX do nosso trabalho, onde o uso agudo do L-NAME foi empregado. Estes autores defendem que a administração crônica de L-NAME induz alterações morfológicas nos vasos que resultam em aumento da rigidez, o que impede a ativação dos reflexos dos barorreceptores e diminui a complacência arterial; o que não aconteceria com a administração aguda de L-NAME (Chaswal *et al.*, 2011), onde a resposta observada vem da inibição imediata das NOS cálcio-dependentes.

Dados com ratas OVX mostram que o SCV destas responde de forma diferente à inibição das NOS. Acredita-se que a ativação da nNOS no SNC cause hipertensão e simpatoexcitação renal (Guo *et al.*, 2009), enquanto sua inibição na RVLM reduz a PAM e a FC em machos (Martins-Pinge *et al.*, 2007). El-Mas e Abdel-Rahman (2014) mostraram que a inibição sistêmica da eNOS em ratas evoca uma resposta hipertensiva em OVX, juntamente com um aumento na SBR. Assim, as respostas apresentadas aqui, ao L-NAME, poderiam refletir tanto a inibição das respostas excitatórias da NOS no RVLM, quanto a inibição de suas ações sistêmicas.

A administração de LPS levou a uma manifestação fásica na pressão arterial das fêmeas. Dados do nosso laboratório, obtidos com machos, demonstram que estes respondem com uma queda inicial, seguida de uma breve recuperação, e uma nova queda da qual os animais não se recuperam em 2 horas de registro (Mehanna *et al.*, 2007). Diferentemente do observado por Mehanna *et al.* (2007), as fêmeas foram capazes de se recuperar da redução da PAM, apresentando valores pressóricos equivalentes aos normais ao término das 2 horas de registro da endotoxemia. De fato, Losonczy *et al.* (2000) já observaram que fêmeas são resistentes ao desenvolvimento de choque por endotoxina, confirmando o dimorfismo sexual nas primeiras horas de endotoxemia.

Annane *et al.* (1999) observaram que, em humanos, o choque séptico é caracterizado por reduções na VFC, LF e razão LF:HF, além de reduzir a VPS e LFabs. Diferentemente, Huang *et al.* (2010) observaram em ratos Sprague-Dawley de ambos os sexos, um aumento nos HFnu, LFnu e razão LF:HF 2 horas após a injeção de LPS. Nenhum dos autores identificou diferenças significativas entre os sexos.

Os dados do presente estudo revelam que, 2 horas após a administração de LPS em fêmeas, somente as ratas OVX apresentaram alterações nos parâmetros de VFC no domínio da frequência. A OVX promoveu redução da modulação simpática da FC (LFnu) e aumento da modulação vagal cardíaca (HFnu) quando comparada aos grupos SHAM e OVX+E. Estes resultados de comprometimento da modulação simpática do coração estão entre os indicadores de choque séptico e sugerem a importância dos hormônios ovarianos para a preservação da função cardíaca diante de um desafio inflamatório.

Neste estudo, após 2 horas de endotoxemia, observou-se que o tratamento com estradiol promoveu um aumento do BSV (razão LH/HF), quando comparado ao grupo OVX. Este aumento da razão LH/HF foi descrito por Huang *et al.* (2010) e pode ser reflexo da recuperação da resposta simpática cardíaca promovida pelo estradiol. Vayssettes-Courchay *et al.* (2005) observaram que o bloqueio da taquicardia com um antagonista dos receptores β adrenérgicos acelerou a morte de ratos endotoxêmicos, o que demonstra o papel protetor do SNA simpático na sepse. Reforçando esta informação, Martelli *et al.* (2014) afirmam que o corpo responde ao LPS com um reflexo simpático poderoso que leva à supressão da resposta inflamatória sistêmica aguda, medida pelos níveis de TNF- α . Desta forma, mais uma vez, os resultados cardíacos do grupo OVX podem indicar um mau prognóstico, ao mesmo tempo em que o tratamento com estradiol cria um perfil cardioprotetor envolvendo a ativação simpática, que é importante ao aumentar o débito cardíaco e proteger contra a hipotensão, assim como pela ação anti-inflamatória.

A participação da via constitutiva da NOS na resposta aguda ao LPS foi investigada pela injeção de L-NAME antes da endotoxina. Este pré-tratamento aboliu as diferenças entre os grupos observadas no decorrer das 2 horas de endotoxemia. Afirma-se que o NO pode ter uma função dúbia no choque séptico, relacionada às suas isoformas, com a eNOS provendo o NO essencial e protetor e a iNOS causando vasodilatação excessiva (Cauwels, 2007).

Considerando a inibição de longa duração das isoformas cálcio-dependentes da NOS pelo L-NAME (Vitecek *et al.*, 2012), os menores valores de PAM apresentados por todos os grupos 2 horas após o LPS, podem refletir a ação vasodilatadora do NO proveniente da iNOS. Os dados de aumento da PAM após administração de SMT do estudo 1 indicam uma atividade basal da iNOS nos 3

grupos experimentais. Além disso, Inaba *et al.* (2005) observaram, 1 hora após a administração de LPS, aumento da expressão de iNOS no fígado e baço de ratos e ratas. Isto nos permite sugerir que a produção de NO a partir desta fonte já existe e pode estar ainda maior 2 horas após o LPS.

Dentro dos parâmetros bioquímicos dosados 2 horas após o LPS, observou-se que as ratas OVX e OVX+E não apresentaram redução nos níveis de nitrito quando tratadas previamente com L-NAME, sugerindo outras fontes de NO além das cNOS, como a iNOS. Conforme discutido anteriormente, expressão aumentada da iNOS pode ser detectada no fígado e baço 1 hora após a exposição ao LPS (Inaba *et al.*, 2005), porém experimentos com dosagens de metabólitos do NO no plasma, 1 e 3 horas após o LPS, demonstraram níveis de nitrito maiores a partir da 3ª hora e esta foi maior em machos e em ratas OVX (Aono *et al.*, 1997; Inaba *et al.*, 2005). Estes dados não descartam aumentos nos níveis de nitrito provenientes da iNOS já na 2ª hora após o LPS, uma vez que a expressão dessa enzima já estaria aumentada, de acordo com a literatura.

A ovariectomia, assim como o tratamento com estradiol, também pode ter estimulado o aumento da expressão / atividade da iNOS. Ratas OVX, diante de desafios inflamatórios, expressam mais iNOS que ratas SHAM (Crisafulli *et al.*, 2009; Ma e Bai, 2012; Sakanashi *et al.*, 2013; Hassouna *et al.*, 2014), e o estradiol é um conhecido estimulador da síntese de NO, aumentando, inclusive a expressão e a atividade da iNOS (Nuedling *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 2002). Dessa forma, as ratas endotoxêmicas OVX e OVX+E, diante da inibição prévia com L-NAME, ainda produziram NO, em comparação com as ratas SHAM.

O fato de a PAM ter apresentado redução após a inibição das cNOS sugere que estas enzimas podem estar protegendo as fêmeas contra hipotensão ao LPS. Ainda, os dados de LF da VPS, que estavam normais nos animais salina-LPS e mostraram-se reduzidos quando as ratas receberam L-NAME, indicam que as cNOS estariam mantendo a atividade simpática vascular. A literatura discute a relação entre as NOS e o SNA simpático no controle cardiovascular central, onde a iNOS exerceria função inibitória sobre o efluxo simpático (Chan *et al.*, 2001), enquanto a nNOS exerceria função excitatória sobre o mesmo (Guo *et al.*, 2009). Desta forma, poderíamos supor que as ações do L-NAME sobre a PAM e o LF da VPS das ratas endotoxêmicas, reflete a inibição da atividade simpática pela isoforma da NOS menos inibida pelo L-NAME, a iNOS.

Uma vez que o SNA simpático possui função protetora contra a sepse, pela sua ação sobre a FC (Vitecek *et al.*, 2012) e na resposta inflamatória (Martelli *et al.*, 2014), pode-se dizer que a VFC ao fim de 2 horas de endotoxemia, assumiu um perfil positivo nos animais OVX tratados com L-NAME, em comparação com as ratas OVX endotoxêmicas sem L-NAME. Os valores de LFnu, HFnu e razão LF/HF tornaram-se semelhantes ou maiores do que os valores observados no momento da administração do LPS, sugerindo que as cNOS participam desta menor modulação simpática cardíaca de ratas OVX endotoxêmicas. Contudo, os demais grupos não apresentaram diferenças nesses parâmetros durante a endotoxemia, indicando que esta resposta ao L-NAME seria uma particularidade das ratas OVX, assim como a alteração nos componentes normalizados da VFC.

A enzima PON1 é responsável por hidrolisar peróxidos de lipídios, e possui papel fundamental no sistema antioxidante (Li *et al.*, 2013; Bojic *et al.*, 2014). Nestes estudos, Li *et al.* (2013) e Bojic *et al.* (2014) observaram uma correlação direta entre baixa atividade da PON em pacientes com sepse e menor sobrevivência. No presente estudo observou-se que, durante a endotoxemia induzida por LPS, a atividade plasmática da PON1 estava aumentada nas ratas tratadas com estradiol, que receberam tratamento com L-NAME antes do LPS.

O fato de a atividade da PON1 estar aumentada em um grupo tratado com estradiol encontra embasamento na literatura: uma maior atividade dessa enzima em fêmeas do que em machos já foi demonstrada (Thomas-Moya *et al.*, 2006; Thomas-Moya *et al.*, 2008), e também o estradiol comprovadamente estimula a atividade da PON1 por um mecanismo mediado pelo receptor de estrogênio (Ahmad e Scott, 2010), enquanto a menopausa cirúrgica reduz a atividade da enzima (Kumru *et al.*, 2005). Contudo, não há dados que correlacionem a atividade da PON1 com o uso agudo de L-NAME em fêmeas, sendo este o primeiro trabalho a apresentar esta relação entre a inibição das NOS e a atividade da enzima. Em nosso estudo, a atividade da enzima PON1 não se alterou em fêmeas após 2 horas de endotoxemia por LPS, mas na presença de L-NAME, essa atividade aumentou em fêmeas endotoxêmicas cronicamente tratadas com estradiol. Então o estradiol, na presença de L-NAME, poderia criar um perfil antioxidante e, uma vez que a PON1 possui atividade anti-inflamatória (Aharoni *et al.*, 2013), protetor contra a sepse.

Pouco se sabe sobre as variações hemodinâmicas e autonômicas no início do desafio imunológico por LPS em ratas OVX, tratadas ou não com estrógeno. Tendo em vista os aspectos observados, as fêmeas de uma forma geral são mais resistentes à hipotensão das primeiras horas de endotoxemia e o estradiol parece ser importante na manutenção de um BSV positivo. Os dados da inibição das cNOS levam à hipótese de que estas exercem papel protetor contra a hipotensão, em parte devido a manutenção da atividade simpática sobre o SCV. Paradoxalmente, embora com PAM reduzida em comparação com as ratas salina-LPS, as ratas endotoxêmicas com L-NAME tratadas com estradiol, apresentam aumento da PON1 após inibição das cNOS, em comparação com as OVX. Mais estudos são necessários para investigar esta relação entre a PON1 e as cNOS em fêmeas endotoxêmicas.

5.5 ESTUDO 3: PARTICIPAÇÃO DO ESTRÓGENO NOS EFEITOS DA SMT SOBRE PARÂMETROS CARDIOVASCULARES, AUTONÔMICOS E OXIDATIVOS DE RATAS SUBMETIDAS À ENDOTOXEMIA POR LPS

O presente estudo demonstrou que os primeiros minutos de exposição ao SMT promovem aumento da PAM que depende, ao menos em parte, do estradiol, enquanto a resposta cardíaca e a SBR são mantidas pelo conjunto de hormônios ovarianos, pois as ratas OVX apresentaram redução significativa da FC e aumento da SBR que não foram completamente prevenidos pelo tratamento com estradiol. Demonstrou ainda que a iNOS parece mediar a resposta cardíaca de fêmeas ao LPS de maneira independente dos hormônios ovarianos, através da inibição simpática, uma vez que a SMT aumentou este componente no BSV durante a endotoxemia.

A administração de SMT promoveu, após 5 minutos, aumento da PAM que não foi estatisticamente significativa apenas nas ratas OVX, o que sugere que, inicialmente, o NO proveniente da via induzível, em estados não-patológicos, possui menor participação no controle pressórico de ratas desprovidas de ovários. Uma vez que o grupo OVX+E apresentou aumento estatisticamente significativo da PAM, o estradiol seria importante neste controle da PAM de fêmeas pela iNOS.

Conforme discutido no estudo 1, a literatura mostra uma relação positiva entre a presença constitutiva de iNOS em fêmeas e os níveis de estradiol (Nuedling *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 2002; Upmacis *et al.*, 2011), onde a iNOS participa no funcionamento cardíaco e com a ação vasodilatadora do NO, justificando maiores aumentos de PAM à sua inibição em ratas com estradiol circulante (SHAM e OVX+E). Importante observar que, embora estas respostas pressóricas pareçam ser inicialmente independentes do SNA simpático (o LF da PAS não se alterou ou ficou menor), os dados de 2 horas do estudo 1 indicam que, fisiologicamente, há uma evolução para o aumento da atividade simpática vascular, sugerindo inibição desta pela iNOS.

A resposta da FC nas ratas OVX, e aparentemente nas OVX+E, pode ser reflexo do aumento da SBR observado nestes grupos. A SBR, conforme discutido anteriormente, foi analisada pelo barorreflexo espontâneo, em que o aumento do ganho reflete mudanças maiores na FC diante das flutuações

espontâneas da PA (Schwartz *et al.*, 2013). Neste caso, o aumento transitório da sensibilidade pode ter contribuído para as respostas de bradicardia aos aumentos da PA.

A resposta cardíaca e a SBR parecem ser mantidas pelo conjunto de hormônios ovarianos e não apenas pelo estradiol, pois as ratas OVX apresentaram redução significativa da FC e aumento da SBR que não foram prevenidos pelo tratamento com estradiol. Contudo, os dados de 2 horas observados no estudo 1 permitem afirmar que esta diferença na SBR é transitória, manifestando-se apenas no início da resposta à SMT.

No presente estudo observou-se que as ações do LPS no grupo salina, sobre parâmetros cardiovasculares das fêmeas, após 2 horas, ocorrem independentemente do perfil de hormônios ovarianos, pois não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais SHAM, OVX e OVX+E.

As fêmeas que receberam salina apresentaram, ao final das 2 horas de endotoxemia (janela de 3 minutos), aumento da VPS, sem alteração do LF ou da PAM, além de maiores valores de FC e menor SBR em relação ao momento da administração do LPS. A FC sabidamente aumenta sob efeito do LPS (Annane *et al.*, 1999; Mani *et al.*, 2006) e, segundo estes autores, isto reflete o balanço entre a atividade autonômica cardíaca e hormônios circulantes como adrenalina e outros fatores vasoativos. A ativação simpática inapropriada no início da endotoxemia exerce papel patofisiológico na progressão e resultados diante do choque séptico (Mani *et al.*, 2006).

Conforme apresentado no estudo 2, Annane *et al.* (1999) observaram que o choque séptico é caracterizado por reduções na VPS e LFabs, sem diferenças entre os sexos. No presente estudo, as ratas apresentaram aumento da VPS e redução da SBR 2 horas após o LPS. A VPS reflete o controle dos grandes vasos sobre a PA (Piepoli *et al.*, 1995) e seu aumento indica a resposta vascular à atividade simpática aumentada, o que seria parte da proteção das fêmeas contra a progressão do choque séptico. Irigoyen *et al.* (2001) sugerem que a redução da SBR pode desencadear, por menor inibição dos centros vasomotores, aumento da atividade simpática e, por sua vez, da variabilidade da PA.

Mesmo que a análise da VFC total e de seus valores absolutos, em trechos de curta duração, não seja recomendada pela Task Force (1996), não se

pode deixar de observar que estes dados, no presente estudo, estão de acordo com os dados de sepse apresentados por Piepoli *et al.* (1995), em que a presença de taquicardia com valores reduzidos de VFC total e HF foram indicados como depressão do tônus parassimpático. Contudo, tais análises foram feitas sobre registros de, no mínimo, 40 minutos de duração.

As fêmeas do presente trabalho foram capazes de se recuperar da queda na PAM provocada pelo LPS, apresentando valores pressóricos equivalentes aos normais ao término das 2 horas de endotoxemia. Tais dados diferem do observado por Mehanna *et al.* (2007), onde machos apresentaram hipotensão e taquicardia após 2h de LPS. De fato, Losonczy *et al.* (2000) observaram que fêmeas são resistentes ao desenvolvimento de choque por endotoxina, confirmando o dimorfismo sexual nas primeiras horas de endotoxemia.

Angele *et al.* (2014) discutem as diferenças entre gênero que são observadas na sepse e apresentam o sexo masculino como um fator de risco independente para a morbidade e mortalidade. Contudo, estes autores argumentam que os hormônios sexuais, mais do que o sexo em si, seriam os responsáveis pelos achados relacionados aos gêneros, apontando vários trabalhos que evidenciam a ausência de diferenças entre homens e mulheres após 50 anos, e defendem o estradiol como responsável pela resistência à sepse ou ao estímulo endotoxêmico com LPS (Angele *et al.*, 2014). Tais diferenças relacionadas ao estradiol não foram observadas nos parâmetros cardiovasculares do presente estudo, assim como não foi observado por Losonczy *et al.* (2000), onde a OVX não alterou os parâmetros hemodinâmicos, nem os níveis de nitrito e nitrato após o LPS. Estes autores argumentam que a ovariectomia pode não alterar significativamente a resposta imune, mas por outro lado, os efeitos do tratamento com estradiol sobre a resposta ao LPS podem ser dependentes do tempo, pois 12 horas após a endotoxemia a produção de NO mostrou-se menor nas fêmeas intactas e tratadas com estrogênio (Losonczy *et al.*, 2000). O mesmo pode ter ocorrido com os dados do presente estudo.

Após 2 horas de endotoxemia, a ovariectomia reduziu a TRAP das ratas e o tratamento com estradiol preveniu esta alteração. A redução da capacidade antioxidante plasmática pela retirada dos ovários e seu restabelecimento, ou prevenção, pelo tratamento com estradiol já foi observada anteriormente (Hernandez

et al., 2000), onde argumenta-se que a redução dessa capacidade seria reflexo de um desequilíbrio no estado redox com predominância de processos oxidativos. De fato, já foi demonstrado que ratas OVX apresentam perfil pró-oxidante, inclusive em tecidos importantes para a função cardiovascular (Ceravolo *et al.*, 2013; Claudio *et al.*, 2014). As ratas OVX controle, sem LPS, apresentaram uma tendência para essa redução na TRAP (estudo 1) e o estado endotoxêmico parece ter intensificado tal característica, provavelmente por consumo das reservas antioxidantes ao gerar mais espécies reativas. Tal argumento encontra base na hipótese de White *et al.* (2010), que pressupõe que doenças, no caso destes o diabetes, levam à redução de cofatores essenciais à atividade geradora de NO pelas NOS e, na falta destes, as NOS tornam-se desacopladas da capacidade de gerar NO e passam a gerar ânion superóxido, uma EROx altamente reativa.

Dados sugerem que a iNOS possui função fisiológica independente de hormônios ovarianos e importante para o SCV. Chan *et al.* (2001) descrevem uma atividade tônica da iNOS no SNC de machos, inibindo o efluxo simpático pelo RVLM. No presente estudo o papel da iNOS na resposta de fêmeas a 2 horas de endotoxemia por LPS, foi investigado pela administração prévia de SMT (3 mg/Kg). Southan *et al.* (1995) afirmam que a SMT é um inibidor seletivo da iNOS que pode ser utilizado no estudo do papel desta em vários estados patofisiológicos.

A administração da SMT fez, de modo geral, as fêmeas dos 3 grupos responderem igualmente a 2 horas de endotoxemia, com aumento do LF da VPS, taquicardia, aumento do LFnu da VFC e do BSV, e redução da SBR. A exceção foi a resposta da PAM que se mostrou reduzida apenas no grupo OVX+E, quando comparado ao momento da indução da endotoxemia, mas não foi diferente dos demais grupos nas 2 horas. Nesse caso é provável que tal dado represente apenas a diferença entre a resposta pressora ao SMT do grupo OVX+E e a resposta dos demais grupos, pois o grupo tratado com estradiol respondeu com maior aumento de PAM à administração de SMT no tempo zero e respondeu da mesma forma que os demais grupos ao término das 2 horas de endotoxemia.

Considerar que a inibição da iNOS levou à redução da PAM nas ratas OVX+E nas primeiras horas do desafio com LPS, se contrapõe às ações da iNOS, tanto em estados fisiológicos, onde esta auxiliaria na vasodilatação dependente de estrógeno (Zhu *et al.*, 2002), além de promover inibição simpática

central (Chan *et al.*, 2001), sem relação estabelecida com o hormônio; como em estados patológicos, como no choque séptico, em que Cauwels (2007) afirma que o NO pode ter uma função dúbia, relacionada às suas isoformas, com a eNOS provendo o NO essencial e protetor e a iNOS causando vasodilatação excessiva.

A inibição da iNOS com SMT promoveu ativação simpática vascular e cardíaca, e aumento da TRAP nas fêmeas endotoxêmicas. Dentre vários mediadores pró-inflamatórios, o próprio LPS é um estímulo à atividade da iNOS (Lirk *et al.*, 2002) e, conforme discutido em outros momentos, o SNA simpático possui função protetora contra a sepse, favorecendo a manutenção do débito cardíaco (Vitecek *et al.*, 2012) e contendo a resposta imune (Martelli *et al.*, 2014).

Mani *et al.* (2006) observaram que camundongos nocaute para a iNOS apresentam maior atividade simpática cardíaca, sugerindo um papel inibitório tônico para a iNOS no coração. Contudo, diferentemente dos resultados observados por nós em fêmeas, os autores observaram que a modulação simpática cardíaca diminui durante a endotoxemia por LPS, independentemente da presença de iNOS. Esses dados sugerem que o sexo feminino seria um fator determinante desta atividade simpática após a SMT na endotoxemia.

Conforme citado anteriormente, Lozonczy *et al.* (2000), observaram ausência de choque 2 a 4 horas após o LPS em ratas Sprague-Dawley quando comparadas com machos, sem influência de castração prévia. Investigando esse papel protetor do sexo feminino contra a hipotensão e o choque na sepse, Wang *et al.* (2000) observaram, em tecidos de ratas daquela mesma linhagem, redução dos níveis de noradrenalina e aumento da atividade da NOS após o LPS, sendo que a inibição seletiva da iNOS preveniu a redução de noradrenalina. Desta forma, a iNOS parece favorecer o agravamento do quadro de sepse ao reduzir a atividade simpática dos animais.

Pacher *et al.* (2007) discutem evidências da relação entre o NO proveniente da iNOS e o aumento da produção de superóxido, na geração de peroxinitrito, um importante mediador de lesão miocárdica em vários estados patológicos. Apontam também, estudos sobre proteção obtida com a inibição seletiva da iNOS, assemelhando-a ao uso de antioxidantes. Tais observações sugerem uma ação pró-oxidante da iNOS em estados patológicos. Esta é reforçada

pelos resultados do presente estudo, que demonstraram aumento da TRAP em todos os animais após a inibição da iNOS com SMT.

A literatura disponível sobre a relação entre iNOS e SNA simpático em fêmeas na sepse é escassa, sendo este o primeiro trabalho a verificar tais fatores em ratas Wistar, nas primeiras horas de endotoxemia por LPS. Podemos afirmar que a inibição prévia da iNOS gerou um perfil cardiovascular e bioquímico favorável em fêmeas, em 2 horas de endotoxemia, que envolve a ativação do SNA simpático.

A SMT não reduziu os níveis de nitrito no plasma dos grupos OVX e OVX+E, quando comparados aos animais salina-LPS. Este achado sugere que os níveis plasmáticos de NO nas ratas com ovários íntegros, nas primeiras horas de endotoxemia, são mais suscetíveis à inibição da iNOS. A capacidade de ratas OVX e de ratas tratadas com estradiol, expressarem mais iNOS que ratas SHAM foi anteriormente discutida (Crisafulli *et al.*, 2009; Ma e Bai, 2012; Sakanashi *et al.*, 2013; Hassouna *et al.*, 2014) (Nuedling *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 2002; Upmacis *et al.*, 2011). Além disso, Menzies *et al.* (2011) e Su *et al.* (2009) observaram que a progesterona é capaz de reduzir a atividade da iNOS em células estimuladas com LPS, o que nos leva a supor que os menores níveis plasmáticos de nitrito observados no grupo SHAM possam ser resultado de um sinergismo entre a inibição da iNOS pela SMT e a redução da atividade desta enzima pela progesterona circulante nesses animais. Contudo, é importante ressaltar que as diferenças nos níveis plasmáticos de nitrito não necessariamente refletem os níveis de NO nos tecidos, uma vez que pode ser observada a redução em um desses parâmetros ao mesmo tempo em que ocorre aumento do outro, conforme observado por Panis (2011) nos níveis de nitrito do plasma e tecido cardíaco.

Os níveis de peroxidação lipídica após o LPS, indicados pela dosagem de hidroperóxidos nas ratas OVX+E pré-tratadas com SMT, foram menores do que nas ratas SHAM, o que sugere que o tratamento com estradiol, na ausência da atividade da iNOS, crie um ambiente mais favorável à resposta do organismo em 2 horas de endotoxemia, do que o conjunto de hormônios ovarianos.

Panis *et al.* (2012) comentam que o método de quimioluminescência aqui empregado permite uma visão da capacidade de defesa antioxidante não-enzimática do indivíduo, uma vez que o estresse oxidativo *in vivo* leva ao consumo

das defesas antioxidantes e formação de hidroperóxidos, componentes da reação de peroxidação lipídica. Sharma *et al.* (2008) apontam que a lipoperoxidação pode aumentar por: baixos níveis de antioxidantes, aumento de substratos para oxidação, e presença de substâncias pró-oxidantes no plasma. Poderíamos sugerir que a redução dos níveis de LOOH ocorreu por aumento dos níveis de antioxidantes, redução dos substratos para oxidação, ou redução dos níveis de agentes pró-oxidantes. De fato, todas as fêmeas endotoxêmicas, pré-tratadas com inibidor da iNOS, apresentaram aumento da capacidade antioxidante total, e a semelhança entre a proteção obtida com a inibição da iNOS e com o uso de antioxidantes foi anteriormente citada (Pacher *et al.*, 2007).

Uma vez que o próprio estradiol é discutido como um agente antioxidante (Hernandez *et al.*, 2000), esta característica pode ter contribuído para a redução da LOOH em relação ao grupo SHAM. O presente trabalho é o primeiro estudo a discutir esses aspectos em ratas endotoxêmicas, envolvendo ou não a presença de estrógeno.

Dados da literatura apontam o sexo masculino como um fator de risco independente para a morbidade e mortalidade na sepse. O presente estudo demonstra que fêmeas respondem às primeiras horas de endotoxemia com manutenção da PAM, taquicardia e ativação simpática vascular que deve ser mediada pela menor inibição dos centros vasomotores, uma vez que a SBR está reduzida nas fêmeas endotoxêmicas. Em virtude dos fatos mencionados para a inibição da iNOS, além de indicarem que a progesterona pode ter ação inibitória sobre a isoforma, é possível concluir que a iNOS é responsável pela inibição simpática e pelo consumo das reservas antioxidantes que podem levar ao agravamento da endotoxemia e ao colapso cardiovascular em fêmeas.

CONCLUSÕES GERAIS

Este trabalho evidenciou que a privação prolongada (8 semanas) dos hormônios ovarianos causa, comparativamente com fêmeas em estro, redução da SBR que por sua vez, leva ao aumento da modulação simpática vascular. O tratamento com estradiol iniciado imediatamente após a remoção dos ovários não foi suficiente para prevenir a redução da SBR, e estes animais além de apresentarem maior modulação simpática vascular, também mostraram maior FC.

Ao investigar a participação das vias constitutiva e induzível da NOS sobre esses parâmetros cardiovasculares e autonômicos, observou-se que ambas são importantes no controle pressórico das fêmeas. A redução da modulação simpática vascular pela inibição da via constitutiva, levanta a hipótese de que o aumento da PAM, neste caso, dependa da ação de vasoconstritores periféricos, como a angiotensina II e a endotelina. O menor aumento de PAM pelo L-NAME observado nas ratas OVX, leva a supor que a ovariectomia crie um estado pró-oxidante juntamente com redução da quantidade ou atividade das cNOS que, quando inibidas, contribuem para a redução da atividade da PON1. Este estado que indica maior risco cardiovascular, revelado pela inibição das cNOS nas ratas OVX, é prevenido pelo tratamento com estradiol. É a primeira vez, na literatura, que se observa a atividade da PON1 após inibição das cNOS em fêmeas.

O mecanismo de controle pressórico pela iNOS parece ser mediado pela inibição simpática e independentemente dos hormônios ovarianos, uma vez que sua inibição aumentou a PAM e a modulação simpática vascular em todos os grupos. Como a inibição da iNOS reduziu os níveis de nitrito nas ratas OVX+E, quando comparadas às OVX, é possível que o organismo, na ausência de estímulo ovariano, mantenha os níveis plasmáticos de NO através da maior expressão ou atividade da iNOS, e este mecanismo seja reforçado pelo tratamento com estradiol.

O estradiol, portanto, mostra-se importante para a manutenção do *status quo* cardiovascular e autonômico das fêmeas, porém não é suficiente, pois não preveniu o aumento da modulação simpática vascular, e seu uso isolado pode gerar outras alterações como o aumento da FC. As NOS parecem exercer funções opostas sobre o SNA vascular e, bioquimicamente, enquanto as cNOS contribuem à

manutenção da atividade da PON1 em ratas OVX, a iNOS mantém os níveis de NO nas ratas OVX+E.

Os dados de inibição das vias constitutiva e induzível da NOS na endotoxemia levam à hipótese de que as cNOS são responsáveis pela proteção contra a hipotensão, provavelmente ao manter a atividade do SNA simpático em todos os grupos, independentemente da presença de ovários ou tratamento com estradiol. A iNOS, seria responsável pela inibição simpática e pelo consumo das reservas antioxidantes das fêmeas na endotoxemia.

Mais estudos mostram-se necessários ao entendimento das relações entre a atividade da PON1, as NOS e os níveis de estradiol, em estados fisiológicos e patológicos. Assim como necessita-se esclarecer o fator, independente de hormônios ovarianos, que predomina na proteção cardiovascular de fêmeas à endotoxemia.

REFERÊNCIAS

- AHARONI, S.; AVIRAM, M.; FUHRMAN, B. Paraoxonase 1 (PON1) reduces macrophage inflammatory responses. **Atherosclerosis**, v. 228, n. 2, p. 353-61, Jun 2013. ISSN 1879-1484 (Electronic) 0021-9150 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23582715> >.
- AHMAD, S.; SCOTT, J. E. Estradiol enhances cell-associated paraoxonase 1 (PON1) activity in vitro without altering PON1 expression. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 397, n. 3, p. 441-6, Jul 2 2010. ISSN 0006-291x.
- ANGELE, M. K. et al. Gender differences in sepsis: cardiovascular and immunological aspects. **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 12-9, Jan 1 2014. ISSN 2150-5608 (Electronic) 2150-5594 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24193307> >.
- ANNANE, D. et al. Inappropriate sympathetic activation at onset of septic shock: a spectral analysis approach. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 160, n. 2, p. 458-65, Aug 1999. ISSN 1073-449X (Print) 1073-449x.
- AONO, K. et al. In vitro and in vivo expression of inducible nitric oxide synthase during experimental endotoxemia: involvement of other cytokines. **J Cell Biochem**, v. 65, n. 3, p. 349-58, Jun 1 1997. ISSN 0730-2312 (Print) 0730-2312 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9138091> >.
- ARIZA, D. et al. Dysautonomias in Parkinson's disease: cardiovascular changes and autonomic modulation in conscious rats after infusion of bilateral 6-OHDA in substantia nigra. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 308, n. 3, p. H250-7, Feb 1 2015. ISSN 1522-1539 (Electronic) 0363-6135 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25416189> >.
- BANTING, J. D.; FRIBERG, P.; ADAMS, M. A. Acute hypertension after nitric oxide synthase inhibition is mediated primarily by increased endothelin vasoconstriction. **Journal of hypertension**, v. 14, n. 8, p. 975-982, 1996. ISSN 0263-6352.
- BLANC, J.; LAMBERT, G.; ELGHOZI, J. L. [Activation of the renin-angiotensin system and blood pressure variability in rats]. **Arch Mal Coeur Vaiss**, v. 93, n. 8, p. 1019-22, Aug 2000. ISSN 0003-9683 (Print) 0003-9683 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10989749> >.
- BOJIC, S. et al. Low paraoxonase 1 activity predicts mortality in surgical patients with sepsis. **Dis Markers**, v. 2014, p. 427378, 2014. ISSN 1875-8630 (Electronic)

0278-0240 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24665146> >.

BONE, R. C. Toward an epidemiology and natural history of SIRS (systemic inflammatory response syndrome). **JAMA**, v. 268, n. 24, p. 3452-5, Dec 23-30 1992. ISSN 0098-7484 (Print)
0098-7484 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1460735> >.

BREWSTER, U. C.; SETARO, J. F.; PERAZELLA, M. A. The renin-angiotensin-aldosterone system: cardiorenal effects and implications for renal and cardiovascular disease states. **Am J Med Sci**, v. 326, n. 1, p. 15-24, Jul 2003. ISSN 0002-9629 (Print)
0002-9629 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12861121> >.

CAMPOS, C. et al. Efficacy of a low dose of estrogen on antioxidant defenses and heart rate variability. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2014, p. 218749, 2014. ISSN 1942-0994 (Electronic)
1942-0994 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24738017> >.

CAUWELS, A. Nitric oxide in shock. **Kidney Int**, v. 72, n. 5, p. 557-65, Sep 2007. ISSN 0085-2538 (Print)
0085-2538.

CERAVOLO, G. S. et al. Conjugated equine estrogen treatment corrected the exacerbated aorta oxidative stress in ovariectomized spontaneously hypertensive rats. **Steroids**, v. 78, n. 3, p. 341-6, Mar 2013. ISSN 1878-5867 (Electronic)
0039-128X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23261957> >.

CEYLAN-ISIK, A. F. et al. Effect of 17beta-oestradiol replacement on vascular responsiveness in ovariectomized diabetic rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 36, n. 11, p. e65-71, Nov 2009. ISSN 1440-1681 (Electronic)
0305-1870 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19566816> >.

CHAN, S. H. et al. Differential cardiovascular responses to blockade of nNOS or iNOS in rostral ventrolateral medulla of the rat. **Br J Pharmacol**, v. 133, n. 4, p. 606-14, Jun 2001. ISSN 0007-1188 (Print)
0007-1188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11399678> >.

CHASWAL, M. et al. Cardiac autonomic function in acutely nitric oxide deficient hypertensive rats: role of the sympathetic nervous system and oxidative stress. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 89, n. 12, p. 865-74, Dec 2011. ISSN 1205-7541 (Electronic)

0008-4212 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22115075> >.

CHEN, H. I.; HU, C. T. Endogenous nitric oxide on arterial hemodynamics: a comparison between normotensive and hypertensive rats. **Am J Physiol**, v. 273, n. 4 Pt 2, p. H1816-23, Oct 1997. ISSN 0002-9513 (Print) 0002-9513.

CHEN, Z. et al. Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. **J Clin Invest**, v. 103, n. 3, p. 401-6, Feb 1999. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738.

CHUNG, H. Y. et al. Molecular inflammation: underpinnings of aging and age-related diseases. **Ageing Res Rev**, v. 8, n. 1, p. 18-30, Jan 2009. ISSN 1872-9649 (Electronic) 1568-1637 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18692159> >.

CLAUDIO, E. R. et al. Effects of chronic swimming training and oestrogen therapy on coronary vascular reactivity and expression of antioxidant enzymes in ovariectomized rats. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e64806, 2014. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23755145> >.

CRISAFULLI, C. et al. PPAR-alpha contributes to the anti-inflammatory activity of 17beta-estradiol. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 331, n. 3, p. 796-807, Dec 2009. ISSN 1521-0103 (Electronic) 0022-3565 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19755663> >.

DA CUNHA, N. V. et al. Decreased endothelial nitric oxide, systemic oxidative stress, and increased sympathetic modulation contribute to hypertension in obese rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 306, n. 10, p. H1472-80, May 15 2014. ISSN 1522-1539 (Electronic) 0363-6135 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24633548> >.

DE ABREU, S. B. et al. Role of paraventricular nucleus in exercise training-induced autonomic modulation in conscious rats. **Auton Neurosci**, v. 148, n. 1-2, p. 28-35, Jun 15 2009. ISSN 1872-7484 (Electronic) 1566-0702 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19297253> >.

DEAN, S. A. et al. 17beta-estradiol downregulates tissue angiotensin-converting enzyme and ANG II type 1 receptor in female rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 288, n. 3, p. R759-66, Mar 2005. ISSN 0363-6119 (Print)

0363-6119 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15550614> >.

DIAS DA SILVA, V. J. et al. Heart rate and arterial pressure variability and baroreflex sensitivity in ovariectomized spontaneously hypertensive rats. **Life Sci**, v. 84, n. 21-22, p. 719-24, May 22 2009. ISSN 1879-0631 (Electronic) 0024-3205 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19249314> >.

DIAS, D. P. et al. Ovariectomy does not affect the cardiac sympathovagal balance of female SHR but estradiol does. **Braz J Med Biol Res**, v. 43, n. 10, p. 969-75, Oct 2010. ISSN 0100-879x.

DONATO, A. J. et al. Aging is associated with greater nuclear NF kappa B, reduced I kappa B alpha, and increased expression of proinflammatory cytokines in vascular endothelial cells of healthy humans. **Aging Cell**, v. 7, n. 6, p. 805-12, Dec 2008. ISSN 1474-9718.

DUCKLES, S. P.; MILLER, V. M. Hormonal modulation of endothelial NO production. **Pflugers Arch**, v. 459, n. 6, p. 841-51, May 2010. ISSN 0031-6768.

DUTRA, S. G. et al. Cardiac autonomic modulation is determined by gender and is independent of aerobic physical capacity in healthy subjects. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e77092, 2013. ISSN 1932-6203.

EL-MAS, M. M.; ABDEL-RAHMAN, A. A. Longitudinal assessment of the effects of oestrogen on blood pressure and cardiovascular autonomic activity in female rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 36, n. 10, p. 1002-9, Oct 2009. ISSN 0305-1870.

_____. Endothelial and neuronal nitric oxide synthases variably modulate the oestrogen-mediated control of blood pressure and cardiovascular autonomic control. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 41, n. 3, p. 246-54, Mar 2014. ISSN 0305-1870.

EL-MAS, M. M.; ZHANG, J.; ABDEL-RAHMAN, A. A. Upregulation of vascular inducible nitric oxide synthase mediates the hypotensive effect of ethanol in conscious female rats. **J Appl Physiol (1985)**, v. 100, n. 3, p. 1011-8, Mar 2006. ISSN 8750-7587 (Print) 0161-7567 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16293701> >.

GARDINER, S. M. et al. Regional and cardiac haemodynamic effects of NG-nitro-L-arginine methyl ester in conscious, Long Evans rats. **Br J Pharmacol**, v. 101, n. 3, p. 625-31, Nov 1990. ISSN 0007-1188 (Print) 0007-1188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2076481> >.

GOCMEN, A. Y. et al. The relationship between oxidative stress markers and visual evoked potentials in different hypertension models. **Anadolu Kardiyol Derg**, v. 14, n. 6, p. 498-504, Sep 2014. ISSN 1302-8723.

GONZALEZ FLECHA, B.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. **Free Radic Biol Med**, v. 10, n. 2, p. 93-100, 1991. ISSN 0891-5849 (Print) 0891-5849 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1849867> >.

GORE, A. C.; OUNG, T.; WOLLER, M. J. Age-related changes in hypothalamic gonadotropin-releasing hormone and N-methyl-D-aspartate receptor gene expression, and their regulation by oestrogen, in the female rat. **J Neuroendocrinol**, v. 14, n. 4, p. 300-9, Apr 2002. ISSN 0953-8194 (Print) 0953-8194.

GUO, Z. L. et al. Nitric oxide in rostral ventrolateral medulla regulates cardiac-sympathetic reflexes: role of synthase isoforms. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 297, n. 4, p. H1478-86, Oct 2009. ISSN 1522-1539 (Electronic) 0363-6135 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19684188> >.

HASSOUNA, A. et al. The role of sex hormones in induced-systemic inflammation in female albino rats. **Acta Physiol Hung**, v. 101, n. 1, p. 112-27, Mar 2014. ISSN 0231-424X (Print) 0231-424X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24631798> >.

HAYWARD, C. S.; KELLY, R. P.; COLLINS, P. The roles of gender, the menopause and hormone replacement on cardiovascular function. **Cardiovasc Res**, v. 46, n. 1, p. 28-49, Apr 2000. ISSN 0008-6363 (Print) 0008-6363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10727651> >.

HERNANDEZ, I. et al. 17beta-estradiol prevents oxidative stress and decreases blood pressure in ovariectomized rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 279, n. 5, p. R1599-605, Nov 2000. ISSN 0363-6119 (Print) 0363-6119.

HU, C. T. et al. Acute effects of nitric oxide blockade with L-NAME on arterial haemodynamics in the rat. **Br J Pharmacol**, v. 122, n. 6, p. 1237-43, Nov 1997. ISSN 0007-1188 (Print) 0007-1188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9401792> >.

HUANG, J. et al. The sympathetic-vagal balance against endotoxemia. **J Neural Transm (Vienna)**, v. 117, n. 6, p. 729-35, Jun 2010. ISSN 1435-1463 (Electronic) 0300-9564 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20458507> >.

HUIKURI, H. V. et al. Sex-related differences in autonomic modulation of heart rate in middle-aged subjects. **Circulation**, v. 94, n. 2, p. 122-5, Jul 15 1996. ISSN 0009-7322 (Print)

0009-7322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8674168> >.

INABA, K. et al. Sexual dimorphism in endotoxin susceptibility after partial hepatectomy in rats. **J Hepatol**, v. 42, n. 5, p. 719-27, May 2005. ISSN 0168-8278 (Print)

0168-8278 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15826722> >.

IRIGOYEN, M. C.; CONSOLIM-COLOMBO, F. M.; KRIEGER, E. M. Controle cardiovascular: regulação reflexa e papel do sistema nervoso simpático. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, n. 1, p. 55-62, 2001.

JACKSON, M. J.; MCARDLE, A. Age-related changes in skeletal muscle reactive oxygen species generation and adaptive responses to reactive oxygen species. **J Physiol**, v. 589, n. Pt 9, p. 2139-45, May 1 2011. ISSN 1469-7793 (Electronic)

0022-3751 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21320885> >.

KATSUKI, S.; ARNOLD, W. P.; MURAD, F. Effects of sodium nitroprusside, nitroglycerin, and sodium azide on levels of cyclic nucleotides and mechanical activity of various tissues. **J Cyclic Nucleotide Res**, v. 3, n. 4, p. 239-47, Aug 1977. ISSN 0095-1544 (Print)

KAUSER, K. et al. 17 beta-Estradiol attenuates endotoxin-induced excessive nitric oxide production in ovariectomized rats in vivo. **Am J Physiol**, v. 273, n. 1 Pt 2, p. H506-9, Jul 1997. ISSN 0002-9513 (Print)

0002-9513 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9249525> >.

KIKUYA, M. et al. Prognostic significance of blood pressure and heart rate variabilities: the Ohasama study. **Hypertension**, v. 36, n. 5, p. 901-6, Nov 2000. ISSN 1524-4563 (Electronic)

0194-911X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11082164> >.

KNOWLTON, A. A.; LEE, A. R. Estrogen and the cardiovascular system. **Pharmacol Ther**, v. 135, n. 1, p. 54-70, Jul 2012. ISSN 1879-016X (Electronic)

0163-7258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22484805> >.

KOBRIN, V. I. [Effect of estrogens on the coronary circulation, cardiac contractile function, and development of reperfusion arrhythmia]. **Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova**, v. 88, n. 4, p. 460-2, Apr 2002. ISSN 0869-8139 (Print)

0869-8139 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12058533> >.

KUMRU, S. et al. Effects of surgical menopause and estrogen replacement therapy on serum paraoxonase activity and plasma malondialdehyde concentration. **Gynecol Obstet Invest**, v. 59, n. 2, p. 108-12, 2005. ISSN 0378-7346 (Print) 0378-7346 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15591805> >.

KUO, T. B. et al. Cardiac neural regulation oscillates with the estrous cycle in freely moving female rats: the role of endogenous estrogens. **Endocrinology**, v. 151, n. 6, p. 2613-21, Jun 2010. ISSN 1945-7170 (Electronic) 0013-7227 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20392827> >.

LAMAS, A. Z. et al. Comparative effects of estrogen, raloxifene and tamoxifen on endothelial dysfunction, inflammatory markers and oxidative stress in ovariectomized rats. **Life Sci**, v. 124, p. 101-9, Mar 1 2015. ISSN 1879-0631 (Electronic) 0024-3205 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25623855> >.

LI, Y. et al. Prognostic value of serum paraoxonase and arylesterase activity in patients with sepsis. **J Int Med Res**, v. 41, n. 3, p. 681-7, Jun 2013. ISSN 1473-2300 (Electronic) 0300-0605 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23637274> >.

LIRK, P.; HOFFMANN, G.; RIEDER, J. Inducible nitric oxide synthase--time for reappraisal. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, v. 1, n. 1, p. 89-108, Mar 2002. ISSN 1568-010X (Print) 1568-010X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14561209> >.

LIU, C. C.; KUO, T. B.; YANG, C. C. Effects of estrogen on gender-related autonomic differences in humans. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 285, n. 5, p. H2188-93, Nov 2003. ISSN 0363-6135 (Print) 0363-6135 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12881217> >.

LOOSE, D. S.; STANCEL, G. M. ESTROGENS AND PROGESTINS. In: BRUNTON, L. L. (Ed.). **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 11: McGraw-Hill, MEDICAL PUBLISHING DIVISION v.1, 2006. cap. 57, ISBN 0-07-142280-3.

LOSONCZY, G. et al. Male gender predisposes to development of endotoxic shock in the rat. **Cardiovasc Res**, v. 47, n. 1, p. 183-91, Jul 2000. ISSN 0008-6363 (Print) 0008-6363 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10869545> >.

LOSURDO, P. et al. Baroreflex sensitivity and central hemodynamics after omega-3 polyunsaturated fatty acids supplementation in an animal model of menopause. **Vascul Pharmacol**, v. 71, p. 65-9, Aug 2015. ISSN 1879-3649 (Electronic) 1537-1891 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25863292> >.

MA, Z.; BAI, L. The anti-inflammatory effect of Z-Ligustilide in experimental ovariectomized osteopenic rats. **Inflammation**, v. 35, n. 6, p. 1793-7, Dec 2012. ISSN 1573-2576 (Electronic) 0360-3997 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22760256> >.

MALLIANI, A. et al. Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. **Circulation**, v. 84, n. 2, p. 482-92, Aug 1991. ISSN 0009-7322 (Print) 0009-7322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1860193> >.

MANI, A. R. et al. Heart rate dynamics in iNOS knockout mice. **Life Sci**, v. 79, n. 17, p. 1593-9, Sep 20 2006. ISSN 0024-3205 (Print) 0024-3205 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16790251> >.

MARTELLI, D. et al. Reflex control of inflammation by sympathetic nerves, not the vagus. **J Physiol**, v. 592, n. 7, p. 1677-86, Apr 1 2014. ISSN 0022-3751.

MARTINS-PINGE, M. C. et al. Attenuated pressor responses to amino acids in the rostral ventrolateral medulla after swimming training in conscious rats. **Auton Neurosci**, v. 122, n. 1-2, p. 21-8, Oct 30 2005. ISSN 1566-0702 (Print) 1566-0702 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16139573> >.

MARTINS-PINGE, M. C. et al. Differential influence of iNOS and nNOS inhibitors on rostral ventrolateral medullary mediated cardiovascular control in conscious rats. **Auton Neurosci**, v. 131, n. 1-2, p. 65-9, Jan 30 2007. ISSN 1566-0702 (Print) 1566-0702 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16905370> >.

MEHANNA, A. et al. Cardiovascular and pulmonary effects of NOS inhibition in endotoxemic conscious rats subjected to swimming training. **Life Sci**, v. 81, n. 16, p. 1301-8, Sep 29 2007. ISSN 0024-3205 (Print) 0024-3205 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17916368> >.

MENDELSON, M. E.; KARAS, R. H. Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences. **Science**, v. 308, n. 5728, p. 1583-7, Jun 10 2005. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15947175> >.

MENDONCA LDE, S.; FERNANDES-SANTOS, C.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Cardiac and aortic structural alterations due to surgically-induced menopause associated with renovascular hypertension in rats. **Int J Exp Pathol**, v. 88, n. 4, p. 301-9, Aug 2007. ISSN 0959-9673 (Print) 0959-9673.

MENZIES, F. M. et al. Selective inhibition and augmentation of alternative macrophage activation by progesterone. **Immunology**, v. 134, n. 3, p. 281-91, Nov 2011. ISSN 1365-2567 (Electronic) 0019-2805 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21977998> >.

MERCURO, G. et al. Evidence of a role of endogenous estrogen in the modulation of autonomic nervous system. **Am J Cardiol**, v. 85, n. 6, p. 787-9, A9, Mar 15 2000. ISSN 0002-9149 (Print) 0002-9149 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12000064> >.

NUEDLING, S. et al. 17 Beta-estradiol stimulates expression of endothelial and inducible NO synthase in rat myocardium in-vitro and in-vivo. **Cardiovasc Res**, v. 43, n. 3, p. 666-74, Aug 15 1999. ISSN 0008-6363 (Print) 0008-6363.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiol Rev**, v. 87, n. 1, p. 315-424, Jan 2007. ISSN 0031-9333 (Print) 0031-9333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17237348> >.

PAIGEL, A. S. et al. Myocardial contractility is preserved early but reduced late after ovariectomy in young female rats. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 9, p. 54, 2011. ISSN 1477-7827.

PANIS, C. et al. Oxidative stress and hematological profiles of advanced breast cancer patients subjected to paclitaxel or doxorubicin chemotherapy. **Breast Cancer Res Treat**, v. 133, n. 1, p. 89-97, May 2012. ISSN 1573-7217 (Electronic) 0167-6806 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21811816> >.

PANIS, C. et al. Trypanosoma cruzi: effect of the absence of 5-lipoxygenase (5-LO)-derived leukotrienes on levels of cytokines, nitric oxide and iNOS expression in cardiac tissue in the acute phase of infection in mice. **Exp Parasitol**, v. 127, n. 1, p. 58-65, Jan 2011. ISSN 1090-2449 (Electronic) 0014-4894 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20599987> >.

PAVO, I. et al. Raloxifene, an oestrogen-receptor modulator, prevents decreased constitutive nitric oxide and vasoconstriction in ovariectomized rats. **Eur J Pharmacol**, v. 410, n. 1, p. 101-4, Dec 20 2000. ISSN 0014-2999 (Print)

0014-2999 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11134661> >.

PETROFSKY, J. S.; LOHMAN, E.; LOHMAN, T. A device to evaluate motor and autonomic impairment. **Med Eng Phys**, v. 31, n. 6, p. 705-12, Jul 2009. ISSN 1873-4030 (Electronic) 1350-4533 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19251462> >.

PIEPOLI, M. et al. Autonomic control of the heart and peripheral vessels in human septic shock. **Intensive Care Med**, v. 21, n. 2, p. 112-9, Feb 1995. ISSN 0342-4642 (Print) 0342-4642 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7775691> >.

PROSSNITZ, E. R.; BARTON, M. Estrogen biology: new insights into GPER function and clinical opportunities. **Mol Cell Endocrinol**, v. 389, n. 1-2, p. 71-83, May 25 2014. ISSN 0303-7207.

RAMOS-FILHO, A. C. et al. The renin-angiotensin system plays a major role in voiding dysfunction of ovariectomized rats. **Life Sci**, v. 93, n. 22, p. 820-9, Nov 19 2013. ISSN 1879-0631 (Electronic) 0024-3205 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24050930> >.

RAPOPORT, R. M. Acute nitric oxide synthase inhibition and endothelin-1-dependent arterial pressure elevation. **Front Pharmacol**, v. 5, p. 57, 2014. ISSN 1663-9812 (Electronic) 1663-9812 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24744731> >.

RECKELHOFF, J. F. Gender differences in the regulation of blood pressure. **Hypertension**, v. 37, n. 5, p. 1199-208, May 2001. ISSN 1524-4563 (Electronic) 0194-911X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11358929> >.

REVANKAR, C. M. et al. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. **Science**, v. 307, n. 5715, p. 1625-30, Mar 11 2005. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15705806> >.

RICHTER, R. J.; JARVIK, G. P.; FURLONG, C. E. Determination of paraoxonase 1 status without the use of toxic organophosphate substrates. **Circ Cardiovasc Genet**, v. 1, n. 2, p. 147-52, Dec 2008. ISSN 1942-3268.

SAKANASHI, M. et al. Long-term treatment with san'o-shashin-to, a kampo medicine, markedly ameliorates cardiac ischemia-reperfusion injury in

ovariectomized rats via the redox-dependent mechanism. **Circ J**, v. 77, n. 7, p. 1827-37, 2013. ISSN 1347-4820 (Electronic) 1346-9843 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23615023> >.

SARABI, M.; MILLGARD, J.; LIND, L. Effects of age, gender and metabolic factors on endothelium-dependent vasodilation: a population-based study. **J Intern Med**, v. 246, n. 3, p. 265-74, Sep 1999. ISSN 0954-6820 (Print) 0954-6820 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10475994> >.

SARVARI, M. et al. Estrogens regulate neuroinflammatory genes via estrogen receptors alpha and beta in the frontal cortex of middle-aged female rats. **J Neuroinflammation**, v. 8, p. 82, 2011. ISSN 1742-2094.

SCHWARTZ, C. E. et al. Spontaneous fluctuation indices of the cardiovagal baroreflex accurately measure the baroreflex sensitivity at the operating point during upright tilt. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 304, n. 12, p. R1107-13, Jun 15 2013. ISSN 0363-6119.

SCROGIN, K. E. et al. Chronic nitric oxide inhibition with L-NAME: effects on autonomic control of the cardiovascular system. **Am J Physiol**, v. 274, n. 2 Pt 2, p. R367-74, Feb 1998. ISSN 0002-9513 (Print) 0002-9513 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9486293> >.

SHARMA, A. et al. Plasma lipid peroxidation and antioxidant status of Parkinson's disease patients in the Indian population. **Parkinsonism Relat Disord**, v. 14, n. 1, p. 52-7, 2008. ISSN 1353-8020 (Print) 1353-8020 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18032086> >.

SILVA, V. J. D. D.; JANUÁRIO, E. N. Variabilidade da frequência cardíaca e da pressão arterial na insuficiência cardíaca congestiva. **Rev. bras. hipertens**, v. 12, n. 1, p. 21-26, 2005. ISSN 1519-7522.

SOUTHAN, G. J.; SZABO, C.; THIEMERMANN, C. Isothioureas: potent inhibitors of nitric oxide synthases with variable isoform selectivity. **Br J Pharmacol**, v. 114, n. 2, p. 510-6, Jan 1995. ISSN 0007-1188 (Print) 0007-1188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7533622> >.

SOUZA, H. C. et al. Cardiac sympathetic overactivity and decreased baroreflex sensitivity in L-NAME hypertensive rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 280, n. 2, p. H844-50, Feb 2001. ISSN 0363-6135 (Print) 0363-6135 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11158985> >.

SOUZA, H. C. et al. Increased cardiac sympathetic drive and reduced vagal modulation following endothelin receptor antagonism in healthy conscious rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 35, n. 7, p. 751-6, Jul 2008. ISSN 1440-1681 (Electronic) 0305-1870 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18346180> >.

STICE, J. P. et al. 17beta-Estradiol, aging, inflammation, and the stress response in the female heart. **Endocrinology**, v. 152, n. 4, p. 1589-98, Apr 2011. ISSN 0013-7227.

STRAUB, R. H. The complex role of estrogens in inflammation. **Endocr Rev**, v. 28, n. 5, p. 521-74, Aug 2007. ISSN 0163-769X (Print) 0163-769X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17640948> >.

SU, C. F.; YANG, F. L.; CHEN, H. I. Inhibition of inducible nitric oxide synthase attenuates acute endotoxin-induced lung injury in rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 34, n. 4, p. 339-46, Apr 2007. ISSN 0305-1870 (Print) 0305-1870 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17324147> >.

SU, L. et al. Progesterone inhibits Toll-like receptor 4-mediated innate immune response in macrophages by suppressing NF-kappaB activation and enhancing SOCS1 expression. **Immunol Lett**, v. 125, n. 2, p. 151-5, Aug 15 2009. ISSN 1879-0542 (Electronic) 0165-2478 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19607861> >.

SUBRAMANIAN, M. et al. Chronic estradiol-17beta exposure increases superoxide production in the rostral ventrolateral medulla and causes hypertension: reversal by resveratrol. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 300, n. 6, p. R1560-8, Jun 2011. ISSN 0363-6119.

SUBRAMANIAN, M. et al. Chronic estrogen exposure affects gene expression in the rostral ventrolateral medulla of young and aging rats: Possible role in hypertension. **Brain Res**, v. 1627, p. 134-42, Nov 19 2015. ISSN 1872-6240 (Electronic) 0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26375620> >.

SZABO, C.; SOUTHAN, G. J.; THIEMERMANN, C. Beneficial effects and improved survival in rodent models of septic shock with S-methylisothiourea sulfate, a potent and selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 26, p. 12472-6, Dec 20 1994. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7528923> >.

TASK_FORCE. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and

the North American Society of Pacing and Electrophysiology. **Circulation**, v. 93, n. 5, p. 1043-65, Mar 1 1996. ISSN 0009-7322 (Print) 0009-7322.

THOMAS-MOYA, E. et al. Effects of caloric restriction and gender on rat serum paraoxonase 1 activity. **J Nutr Biochem**, v. 17, n. 3, p. 197-203, Mar 2006. ISSN 0955-2863 (Print) 0955-2863 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16214326> >.

THOMAS-MOYA, E. et al. Gender related differences in paraoxonase 1 response to high-fat diet-induced oxidative stress. **Obesity (Silver Spring)**, v. 16, n. 10, p. 2232-8, Oct 2008. ISSN 1930-7381 (Print) 1930-7381 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18719679> >.

TOROK, J. Participation of nitric oxide in different models of experimental hypertension. **Physiol Res**, v. 57, n. 6, p. 813-25, 2008. ISSN 0862-8408 (Print) 0862-8408 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19154086> >.

UPMACIS, R. K. et al. Inducible nitric oxide synthase provides protection against injury-induced thrombosis in female mice. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 301, n. 2, p. H617-24, Aug 2011. ISSN 1522-1539 (Electronic) 0363-6135 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21602468> >.

VAYSSETTES-COURCHAY, C.; BOUYSSSET, F.; VERBEUREN, T. J. Sympathetic activation and tachycardia in lipopolysaccharide treated rats are temporally correlated and unrelated to the baroreflex. **Auton Neurosci**, v. 120, n. 1-2, p. 35-45, Jun 15 2005. ISSN 1566-0702 (Print) 1566-0702 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15996623> >.

VITECEK, J. et al. Arginine-based inhibitors of nitric oxide synthase: therapeutic potential and challenges. **Médiators Inflamm**, v. 2012, p. 318087, 2012. ISSN 1466-1861 (Electronic) 0962-9351 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22988346> >.

VOLTERA, A. F. et al. [Effects of neuroendocrine obesity induction on systemic hemodynamics and left ventricular function of normotensive rats]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 52, n. 1, p. 47-54, Feb 2008. ISSN 0004-2730 (Print) 0004-2730.

WANG, Y.; STEINSLAND, O. S.; NELSON, S. H. A role for nitric oxide in endotoxin-induced depletion of the peripheral catecholamine stores. **Shock**, v. 13, n. 2, p. 145-51, Feb 2000. ISSN 1073-2322 (Print)

1073-2322 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10670845> >.

WHITE, R. E. et al. Estrogen and oxidative stress: A novel mechanism that may increase the risk for cardiovascular disease in women. **Steroids**, v. 75, n. 11, p. 788-93, Nov 2010. ISSN 0039-128x.

WHITE, R. E. et al. Estrogen-induced contraction of coronary arteries is mediated by superoxide generated in vascular smooth muscle. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 289, n. 4, p. H1468-75, Oct 2005. ISSN 0363-6135 (Print) 0363-6135.

YUNG, L. M. et al. Inhibition of renin-angiotensin system reverses endothelial dysfunction and oxidative stress in estrogen deficient rats. **PLoS One**, v. 6, n. 3, p. e17437, 2011. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21479266> >.

ZAMIR, M. et al. Baroreflex variability and "resetting": a new perspective. **J Biomech**, v. 47, n. 1, p. 237-44, Jan 3 2014. ISSN 1873-2380 (Electronic) 0021-9290 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24182696> >.

ZHU, Y. et al. Abnormal vascular function and hypertension in mice deficient in estrogen receptor beta. **Science**, v. 295, n. 5554, p. 505-8, Jan 18 2002. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11799247> >.

ANEXO

ANEXO A – Ofício de aprovação do projeto de tese pelo CEUA



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 064/2013

Londrina, 02 de Abril de 2013.

Prezada Pesquisadora,

A CEUA/UEL reunida em 12 de Março de 2013 avaliou o projeto de pesquisa intitulado “Efeitos periféricos e centrais do estrógeno em parâmetro cardiovasculares, autonômicos e inflamatórios em ratas ovariectomizadas” processo CEUA nº 276.2013.81, pesquisa do Centro de Ciências Biológicas desenvolvido sob sua responsabilidade. Esclarecidos os aspectos metodológicos solicitados o projeto está **aprovado** para execução entendendo-se que os princípios éticos postulados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal estão respeitados.

Serão utilizados 495 ratos Wistar, fêmeas, com 3 meses de idade e peso de 220 a 270g, provenientes do Biotério Central da UEL. O projeto tem o objetivo de investigar os efeitos do estrógeno sobre parâmetros inflamatórios, cardiovasculares e autonômicos de ratas ovariectomizadas não anestesiadas, com e sem a reposição estrogênica, e comparar com fêmeas na fase estro do ciclo estral. Para isto, as ratas serão divididas em 3 grupos experimentais: G1) fêmeas ovariectomizadas, G2) fêmeas ovariectomizadas tratadas com estrógeno, e G3) fêmeas controle em estro. A ovariectomia bilateral será realizada por cirurgia após anestesia por aplicação intraperitoneal de tribromoetanol, e será administrada dose única de pentabiótico veterinário após a cirurgia. Em um segundo momento os animais serão anestesiados com pentobarbital sódico, por via intraperitoneal, e submetidos a cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas no PVN. Após a cirurgia, as ratas receberão paracetamol para analgesia. Cinco dias após a recuperação da cirurgia, as ratas serão anestesiados novamente com tribromoetanol, via intraperitoneal e submetidos a cirurgia para canulação crônica da artéria e veia femorais, para monitoramento da pressão arterial e administração de drogas. A determinação do estro fisiológico será realizada por coleta do material vaginal utilizando hastes de algodão embebida em solução salina. O projeto está previsto para ser desenvolvido em 46 meses.

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações. Sem mais para o momento, subscrevo-me. Cordialmente,

Waldiceu Ap. Verrini Junior
Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verrini Junior
Coordenador da CEUA/UEL

Ilma. Sra.

Profa. Dra. Marli Cardoso Martins Pinge

Coordenadora do Projeto
Departamento de Ciências Fisiológicas
Centro de Ciências Biológicas

Com cópia para Sra Égle Maria de Sousa (Chefe da DCA/PROPPG), Prof. Luiz Carlos Juliani (Diretor do Biotério Central da UEL) e para Diretora do Centro de Ciências Biológicas.