



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

FERNANDA CAROLINA DE CAMPOS PORCARI

**PARTICIPAÇÃO DOS HORMÔNIOS OVARIANOS NO  
PERFIL CARDIOVASCULAR, AUTONÔMICO E  
INFLAMATÓRIO EM RATAS OBESAS**

---

Londrina  
2019

FERNANDA CAROLINA DE CAMPOS PORCARI

**PARTICIPAÇÃO DOS HORMÔNIOS OVARIANOS NO  
PERFIL CARDIOVASCULAR, AUTONÔMICO E  
INFLAMATÓRIO EM RATAS OBESAS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, na sua associada Universidade Estadual de Londrina-PR, para obtenção do título de doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marli Cardoso Martins  
Pinge

Londrina  
2019

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

f363	<p>Porcari, Fernanda Carolina de Campos Porcari. Participação dos hormônios ovarianos no perfil cardiovascular, autonômico e inflamatório em ratas obesas / Fernanda Carolina de Campos Porcari Porcari. - Londrina, 2019. 88 f. : il.</p> <p>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, 2019. Inclui bibliografia.</p> <p>1. Investigar os efeitos da ausência hormonal ovariana e do tratamento hormonal com estradiol, sobre parâmetros cardiovasculares, autonômicos e inflamatórios de ratas induzidas a obesidade com glutamato monossódico (MSG). - Tese. I. Martins Pinge, Marli Cardoso. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU 574</p>
------	--

17

FERNANDA CAROLINA DE CAMPOS PORCARI

**PARTICIPAÇÃO DOS HORMÔNIOS OVARIANOS NO PERFIL  
CARDIOVASCULAR, AUTONÔMICO E INFLAMATÓRIO EM RATAS  
OBESAS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, na sua associada Universidade Estadual de Londrina-PR, para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marli Cardoso Martins Pingé  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gislaine Garcia Pelosi Gomes  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sabrina Grassioli  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná –  
UNIOESTE

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Glaura Scantamburlo Alves Fernandes  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof Dr Ernane Torres Uchôa  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 16 de Agosto de 2019.

## ***DEDICATÓRIA***

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25

À minha família, minha base, pessoas que sempre acreditaram em mim e me apoiaram sem medir esforços.

## AGRADECIMENTOS

À Deus por todas as oportunidades, inclusive de realizar o doutorado, por sempre me proteger em tantas viagens de idas e vindas de Londrina e jamais me desamparar diante das dificuldades.

Ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação Ciências Fisiológicas.

Aos professores convidados para banca, obrigada pela presença e contribuições.

Aos professores do departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina – UEL e professores das nucleadoras, que com tanto carinho me receberam e compartilharam seus conhecimentos com tanta sabedoria e ao Prof. Dr. Phileo Pinge Filho pela colaboração de sempre.

À minha orientadora, prof. Dr<sup>a</sup> Marli Cardoso Martins Pinge, que é mais do que uma orientadora, é uma mãe que sempre se preocupou comigo acreditando em mim e me aceitando como sua orientanda, mesmo diante das condições de que eu continuaria a trabalhar durante o doutorado, faço da senhora um exemplo pra mim.

Aos meus pais Paulo e Sônia, pelo apoio e por sempre me acompanharem em todas as minhas jornadas para que eu possa realizar meus sonhos, vocês são meus alicerces, são responsáveis por todo o meu sucesso.

Ao meu irmão, Paulinho que sempre acreditou em mim, mesmo achando que estudo demais e a minha irmã Fabíola que contribuiu muito, me acompanhando nas viagens e me dando suporte nos experimentos.

Ao meu esposo Lucas, que jamais me abandonou e ainda fez deste meu sonho o dele, sempre pronto para me acompanhar nas viagens e me esperar, em cada etapa que precisei passar durante esta jornada de estudos e experimentos.

Aos meus colegas de laboratório, em especial à Lorena, Fernanda, Jaqueline, Blenda, Gabriela, Bruno e Eric, sem vocês eu jamais conseguiria, vocês foram meus braços, minhas pernas, meu tudo dentro do laboratório, sempre cuidaram das ratinhas e sempre colaboraram com todos os experimentos, não tenho palavras para agradecer o que fizeram por mim durante esta jornada do doutorado.

1 À Carolina Panis, que mesmo longe foi essencial para este trabalho, com  
2 experimentos que puderam enriquecer nossos resultados, obrigada Carol por  
3 desde sempre fazer parte da minha formação, por ser minha amiga e por  
4 acreditar em mim e sempre me dar apoio, saiba que você é primordial para a  
5 ciência.

6  
7 Às minhas amigas Maria Isabel Lovo e Vanessa Jacobi, por me apoiarem desde  
8 o começo do mestrado até hoje e inclusive por me darem pouso para que  
9 pudesse ficar em Londrina e realizar disciplinas e experimentos, por me  
10 ajudarem com diversas dúvidas inclusive sobre estatísticas e mais por me  
11 oferecerem a mais linda e sincera amizade que uma pessoa pode ter.

12  
13 Ao Pedro Dionízio e ao Zui, que sempre me ajudaram em todas as etapas desta  
14 fase da minha vida sem medir esforços.

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e  
nunca se arrepende”

24

*LEONARDO DA VINCI*

25

1 **PORCARI, F.C.C. Participação dos hormônios ovarianos no perfil cardiovascular,**  
2 **autônômico e inflamatório em ratas obesas.** 2019. 88 f. Tese (Doutorado em Ciências  
3 Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## 6 **RESUMO**

9 Com o envelhecimento, o risco de doenças cardiovasculares (DCVs) é maior no sexo  
10 feminino, devido principalmente à interrupção na produção dos hormônios ovarianos e é  
11 intensificado quando em conjunto à obesidade. O estradiol é enfatizado como um agente  
12 cardioprotetor e o uso de terapia hormonal tem sido sugerido como estratégia para prevenção  
13 de DCVs em mulheres, mas esta conduta permanece controversa quanto ao papel benéfico ou  
14 maléfico ao organismo feminino. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi de investigar os  
15 efeitos da ausência hormonal ovariana e do tratamento com estradiol, sobre parâmetros  
16 cardiovasculares, autonômicos e inflamatórios de ratas induzidas a obesidade com glutamato  
17 monossódico (MSG). Este trabalho foi realizado em duas partes, no qual foram utilizadas  
18 ratas Wistar adultas e divididas em 4 grupos para cada etapa. Parte 1 Grupos: não obesas não  
19 ovariectomizadas (CTR SHAM); não obesas ovariectomizadas (CTR OVX); obesas não  
20 ovariectomizadas (MSG SHAM); obesas ovariectomizadas (MSG OVX). Parte 2 Grupos:  
21 não obesas ovariectomizadas tratadas com óleo de amêndoas (CTR OL); não obesas  
22 ovariectomizadas tratadas com estradiol (CTR ESTR); obesas ovariectomizadas tratadas com  
23 óleo de amêndoas (MSG OL); obesas ovariectomizadas tratadas com estradiol (MSG ESTR).  
24 A obesidade foi induzida pela administração intradérmica de 4 mg/g de peso corporal de  
25 MSG ou salina equimolar nos 5 primeiros dias de vida de ratas. Em todos os grupos a OVX  
26 ou falsa OVX foram realizadas aos 75 dias de vida das ratas. O tratamento com estradiol  
27 (1mg/kg animal) ou seu veículo (óleo de amêndoas) foram realizados durante 8 semanas após  
28 a OVX. Após as 8 semanas todas as ratas foram submetidas à cateterização da artéria femoral  
29 para a monitorização da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e submetidas  
30 à eutanásia para a coleta do encéfalo, coração, rins, aorta, útero, tibia, tecido adiposo  
31 retroperitoneal e coleta do plasma. Os resultados da parte 1 do estudo mostraram que as ratas  
32 CTR OVX apresentaram maior peso corporal em relação as CTR SHAM. O peso do tecido  
33 adiposo retroperitoneal, foi maior nas ratas MSGs OVX e não OVX comparados aos  
34 respectivos controles. O peso uterino das ratas OVX tanto MSG e CTR foram menores do que  
35 das ratas não OVX. A frequência cardíaca (FC) das ratas MSGs foram maiores comparadas  
36 com as CTRs. A análise espectral do intervalo de pulso (IP) no grupo MSG OVX obteve  
37 elevação do LF, e diminuição do HF. Em relação ao óxido nítrico (NO), houve aumento nos  
38 rins no grupo CTR OVX e diminuição no MSG OVX em relação ao CTR OVX. No entanto,  
39 no coração diminuiu no CTR OVX e MSG OVX comparados ao CTR SHAM e MSG SHAM.  
40 No plasma, a concentração de NO foi maior no grupo MSG OVX quando comparado ao MSG  
41 SHAM. A expressão da enzima iNOS no tecido cardíaco, é elevado no grupo MSG OVX  
42 comparado ao CTR OVX e ao MSG SHAM, nos rins está maior no grupo MSG OVX em  
43 relação ao grupo CTR OVX e no cérebro a expressão da enzima é maior no grupo MSG OVX  
44 comparado ao MSG SHAM. Os resultados das análises da parte 2 do estudo, mostraram que o  
45 ganho de peso corporal do grupo MSG ESTR foi menor do que nos grupos CTR ESTR e  
46 MSG OL, houve aumento do peso da tecido adiposo retroperitoneal nos animais do grupo  
47 MSG OL em relação aos grupos CTR OL e MSG ESTR, sendo que os animais do grupo MSG  
48 ESTR apresentaram valor significativo menor de peso da tecido adiposo retroperitoneal em  
49 comparação com o grupo MSG OL e CTR ESTR. Os animais obesos tanto tratados com óleo  
50 quanto com estradiol apresentaram menor comprimento em relação aos seus grupos controles

1 (CTR OL e CTE ESTR). Houve um aumento no cálculo do índice de Lee nos animais MSGs  
2 (MSG OL e MSG ESTR) em relação aos seus controles (CTR OL e CTR ESTR)  
3 respectivamente e uma diminuição deste cálculo no grupo obeso tratado com estradiol (MSG  
4 ESTR) comparado ao grupo MSG OL. O peso uterino das ratas do grupo CTR ESTR e MSG  
5 ESTR foi maior quando comparados aos grupos controles CTR OL e MSG OL. Os resultados  
6 da FC mostraram-se elevados no grupo MSG OL quando comparado ao grupo CTR OL. Na  
7 análise da modulação autonômica da pressão arterial sistólica (PAS) houve aumento da banda  
8 LF no grupo CTR OL em relação aos grupos CTR ESTR e MSG OL. A efetividade do  
9 barorreflexo (ALL Bei) foi menor no grupo MSG OL em relação ao CTR OL e o ganho *down*  
10 foi menor no grupo MSG ESTR comparado ao CTR ESTR. O grupo obeso tratado com  
11 estradiol diminuiu a concentração plasmática de NO comparado ao grupo controle com  
12 estradiol. No rim o grupo MSG ESTR demonstra maior expressão de iNOS no grupo MSG  
13 ESTR em relação ao grupo MSG OL, já no cérebro esta elevado nos grupos MSG OL e MSG  
14 ESTR, comparados aos seus controles respectivamente e ainda é maior a expressão da enzima  
15 iNOS no grupo MSG ESTR comparado ao grupo MSG OL. Pode se concluir que a ausência  
16 dos hormônios ovarianos em associação com a obesidade MSG, atuam de forma efetiva em  
17 alterações cardiovasculares, autonômica e inflamatória, no entanto, diante da terapia hormonal  
18 com estradiol, conclui-se que o tratamento diminui os fatores de risco para desenvolver  
19 DCVs, inibindo a ação do SNS regulando os parâmetros cardiovasculares e autonômicos,  
20 porém a terapia não reverte o processo inflamatório.

21

22 **Palavras chave:** Obesidade. Ovariectomia. Óxido nítrico. Inflamação. Estradiol. Doenças  
23 cardiovasculares. Alterações autonômicas.

1 **PORCARI, F.C.C. Participation of ovarian hormones in the cardiovascular, autonomic**  
2 **and inflammatory profiles in obese rats.** 2019 88 p. Thesis (Doctorate's degree in  
3 Physiological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

4  
5  
6 **ABSTRACT**  
7  
8

9 With aging, the risk of cardiovascular disease (CVD) is higher in females, mainly due to the  
10 interruption in the production of ovarian hormones and is intensified when combined with  
11 obesity. Oestradiol is emphasized as a cardioprotective agent and the use of hormone therapy  
12 has been suggested as a strategy for preventing CVD in women, but this conduct remains  
13 controversial as to the beneficial or harmful role to the female organism. Thus, the objective  
14 of this study was to investigate the effects of ovarian hormonal absence and oestradiol  
15 treatment on cardiovascular, autonomic and inflammatory parameters of rats induced obesity  
16 with monosodium glutamate (MSG). This work was performed in two parts, in which adult  
17 Wistar rats were divided into 4 groups for each stage. Part 1 Groups: non-obese non-  
18 ovariectomized (CTR SHAM); non-obese ovariectomized (OVX CTR); obese non-  
19 ovariectomized (MSG SHAM); ovariectomized obese women (MSG OVX). Part 2 Groups:  
20 ovariectomized nonobese treated with almond oil (CTR OL); ovariectomized ovariectomized  
21 women treated with estradiol (CTR ESTR); obese ovariectomized treated with almond oil  
22 (MSG OL); ovariectomized obese women treated with estradiol (MSG ESTR). Obesity was  
23 induced by the intradermal administration of 4 mg / g body weight of MSG or equimolar  
24 saline in the first 5 days of rat life. In all groups the OVX or false OVX were performed at the  
25 75 days of rats life. Treatment with estradiol (1mg / kg animal) or your vehicle (almond oil)  
26 was performed for 8 weeks after OVX. After 8 weeks, they underwent femoral artery  
27 catheterization for monitoring of mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR) and submitted  
28 to euthanasia for collection of the brain, heart, kidneys, aorta, uterus, tibia and retroperitoneal  
29 fat, and plasma collection. The results from part 1 of the study showed that CTR OVX rats  
30 had higher body weight than CTR SHAM. The weight of retroperitoneal fat was higher in rats  
31 MSGs OVX and non-OVX compared to the respective controls. The uterine weight of both  
32 MSG and CTR OVX rats were lower than non-OVX rats. HR of MSG rats were higher  
33 compared to CTRs. The spectral analysis of the pulse interval (PI) in the MSG OVX group  
34 obtained elevation of LF, and decrease of HF. In relation to nitric oxide (NO), there was an  
35 increase in the kidneys in the OVX CTR group and a decrease in the OVX MSG in relation to  
36 the OVX CTR. However, the heart decreased in the CTR OVX and MSG OVX compared to  
37 CTR SHAM and MSG SHAM. In plasma, NO concentration was higher in the MSG OVX  
38 group when compared to MSG SHAM. Expression of iNOS enzyme in cardiac tissue is  
39 elevated in MSG OVX group compared to CTR OVX and MSG SHAM, kidney is elevated in  
40 MSG OVX group compared to CTR OVX group and brain expression of enzyme is higher in  
41 MSG group OVX compared to MSG SHAM. The results of the analyzes of part 2 of the study  
42 showed that the body weight gain of the MSG ESTR group was lower than in the CTR ESTR  
43 and MSG OL groups. CTR OL and MSG ESTR, and animals from the MSG ESTR group had  
44 a significantly lower value of retroperitoneal fat weight compared to the MSG OL and CTR  
45 ESTR group. Obese animals treated with both oil and estradiol were shorter in length than  
46 their control groups (CTR OL and CTE ESTR). There was an increase in the Lee index  
47 calculation in the MSGs (MSG OL and MSG ESTR) animals compared to their controls  
48 (CTR OL and CTR ESTR) respectively and a decrease of this calculation in the estradiol-  
49 treated obese group (MSG ESTR) compared to the group. MSG OL. The uterine weight of  
50 CTR ESTR and MSG ESTR group rats was higher when compared to CTR OL and MSG OL

1 control groups. HR results were high in the MSG OL group when compared to the CTR OL  
2 group. In the analysis of autonomic modulation of systolic blood pressure (SBP) there was an  
3 increase in the LF band in the CTR OL group compared to the CTR ESTR and MSG OL  
4 groups. Baroreflex effectiveness (ALL Bei) was lower in the MSG OL group compared to  
5 CTR OL and down gain was lower in the MSG ESTR group compared to CTR ESTR. The  
6 estradiol-treated obese group decreased the NO plasma concentration compared to the  
7 estradiol control group. In the kidney the MSG ESTR group demonstrates higher iNOS  
8 expression in the MSG ESTR group compared to the MSG OL group, in the brain it is higher  
9 in the MSG OL and MSG ESTR groups compared to their controls respectively and the iNOS  
10 enzyme expression is higher in the brain. MSG ESTR group compared to MSG OL group. It  
11 can be concluded that the absence of ovarian hormones in association with obesity MSG, act  
12 effectively in cardiovascular, autonomic and inflammatory changes. develop CVDs, inhibiting  
13 the action of the NHS by regulating cardiovascular and autonomic parameters, but therapy  
14 does not reverse the inflammatory process.

15

16 **Keywords:** Obesity. Ovariectomy. Nitric oxide. Inflammation. Estradiol. Cardiovascular  
17 diseases. Autonomic alterations.

## LISTA DE FIGURAS

1		
2		
3	<b>Figura 1</b> - Caracterização da obesidade. Efeitos da administração subcutânea de	
4	MSG ou solução salina equimolar no período neonatal em fêmeas	
5	adultas. (A) Peso (g), (B) Tecido adiposo retroperitoneal (g), (C)	
6	Comprimento nasoanal (cm) e (D) Índice de lee.....	37
7	<b>Figura 2</b> - Caracterização da ovariectomia. (A) Peso uterino (g), (B) Comprimento	
8	da tíbia (cm) e (C) Relação útero / tíbia (g/cm).....	39
9	<b>Figura 3</b> - Peso corporal semanal. (A) Peso (g) de todos os grupos, (B) Peso (g) dos	
10	grupos CTR SHAM e MSG SHAM, (C) Peso dos grupos MSG OVX e	
11	CTR OVX, (D) Peso (g) dos grupos CTR OVX e CTR SHAM, (E) Peso	
12	(g) dos grupos MSG OVX e MSG SHAM.....	41
13	<b>Figura 4</b> - Parâmetros cardiovasculares. (A) Pressão arterial média (PAM) e (B)	
14	Frequência cardíaca (FC) através da cânula anexada à artéria do animal,	
15	acoplada a um transdutor de pressão (Powerlab, modelo MLT0380).....	43
16	<b>Figura 5</b> - Análise da modulação autonômica da pressão arterial sistólica (PAS). (A)	
17	LF abs, (B) VLF abs e (C) variância .....	45
18	<b>Figura 6</b> - Análise da modulação autonômica do intervalo de pulso (IP). (A) LF	
19	unidade de normalidade (un), (B) HF un, (C) LF/HF e (D) Variância do	
20	intervalo de pulso.....	47
21	<b>Figura 7</b> - Análise de barorreflexo espontâneo. (A) Barorreflexo ALL bei, (B)	
22	Ganho barorreflexo UP, (C) Ganho Barorreflexo DOWN e (D) Ganho	
23	total barorreflexo .....	49
24	<b>Figura 8</b> - Concentração de óxido nítrico (NO) da (A) Aorta, (B) Rins,(C) Coração	
25	e (D) Plasma .....	51
26	<b>Figura 9</b> - Imunohistoquímica (IHC) da expressão de iNOS no tecido cardíaco (A),	
27	nos rins (B) e cérebro (C) .....	53
28	<b>Figura 10</b> -Efeitos da administração subcutânea de MSG ou solução salina	
29	equimolar no período neonatal em fêmeas adultas ovariectomizadas e	
30	tratadas com estradiol. (A) Peso (g), (B) Tecido adiposo retroperitoneal	
31	(g), (C) Comprimento nasoanal (cm) e (D) Índice de lee.....	55
32	<b>Figura 11</b> -Caracterização da ovariectomia e análise do tratamento com estradiol	
33	sobre ratas MSG ovariectomizadas. (A) Peso uterino (g), (B)	
34	Comprimento da tíbia (cm) e (C) Relação útero / tíbia (g/cm) .....	57

1	<b>Figura 12</b> -Peso corporal semanal. (A) Peso (g) de todos os grupos, (B) Peso (g) dos	
2	grupos CTR OL e MSG OL, (C) Peso dos grupos MSG ESTR e CTR	
3	ESTR, (D) Peso (g) dos grupos CTR OL e CTR ESTR, (E) Peso (g) dos	
4	grupos MSG OL e MSG ESTR .....	59
5	<b>Figura 13</b> -Parâmetros cardiovasculares de ratas MSG ovariectomizadas tratadas	
6	com estradiol. (A) Pressão arterial média (PAM) e (B) Frequência	
7	cardíaca (FC) através da cânula anexada à artéria do animal, acoplada a	
8	um transdutor de pressão (Powerlab, modelo MLT0380).....	61
9	<b>Figura 14</b> -Análise da modulação autonômica da pressão arterial sistólica (PAS) de	
10	ratas co obesidade MSG tratadas com estradiol. (A) LF abs, (B) VLF abs	
11	e (C) variância .....	63
12	<b>Figura 15</b> -Análise da modulação autonômica do intervalo de pulso (IP) de ratas	
13	com obesidade MSG tratadas com estradiol. (A) LF unidade de	
14	normalidade (un), (B) HF un, (C) LF/HF e (D) Variância do intervalo de	
15	pulso.....	65
16	<b>Figura 16</b> -Análise de barorreflexo espontâneo de ratas com obesidade MSG tratadas	
17	com estradiol. (A) Barorreflexo ALL bei, (B) Ganho barorreflexo UP,	
18	(C) Ganho Barorreflexo DOWN e (D) Ganho total barorreflexo.....	67
19	<b>Figura 17</b> -Concentração de óxido nítrico (NO) da (A) Aorta, (B) Rins,(C) Coração	
20	e (D) Plasma dos grupos de ratas co obesidade MSG tratadas com	
21	estradiol .....	69
22	<b>Figura 18</b> -Imunohistoquímica (IHC) da expressão de iNOS no tecido cardíaco (A),	
23	nos rins (B) e cérebro (C) de ratas ovariectomizas tratadas com óleo de	
24	amêndoas e ou estradiol.....	71

1  
2

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

COX	Enzima ciclooxigenase
DCC	Doença cardíaca coronariana
DCVs	Doenças cardiovasculares
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ER $\alpha$	Receptor de estrogênio $\alpha$
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ESTR	Estradiol
FC	Frequência cardíaca
FC	Frequência cardíaca
GH	<i>Growth Hormone</i>
HF	Componente de alta frequência
IAP	Inibidor do ativador de plasminogênio
IKK $\beta$	Fator beta quinase da kappa-B
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 $\beta$
IL-6	Interleucina-6
iNOS	Óxido nítrico sintase indutível
IP	Intervalo de pulso
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDL-ox	Oxidação da lipoproteína de baixa densidade
LF	Componente de baixa frequência
LF/HF	Razão LF/HF
MIR	Medula interna renal
mRNA	RNA mensageiro
MSG	Glutamato monossódico
NF-kB	Fator nuclear kappa B

nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
OVX	Ovariectomizadas
PA	Pressão arterial
PAM	Pressão arterial média
PCR	Proteína C-reativa
PVN	Núcleo paraventricular hipotalâmico
RVLM	medula ventrolateral rostral
SBR	Sensibilidade barorreflexa
SM	Síndrome metabólica
SNA	Sistema nervoso autônomo
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso parassimpático
SNS	Sistema nervoso simpático
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
TLR4	Receptor <i>Toll like 4</i>
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral
TRH	Terapia de reposição hormonal
VFC	Variabilidade da frequência cardíaca
VFC	Variabilidade da frequência cardíaca
VLF	Componente de muito baixa frequência

## SUMÁRIO

1			
2			
3	<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	19
4	1.1	DOENÇAS CARDIOVASCULARES E FATORES DE RISCO NO SEXO	
5		FEMININO .....	19
6	1.2	RELAÇÃO ENTRE AS DOENÇAS CARDIOVASCULARES E TERAPIA	
7		DE REPOSIÇÃO HORMONAL (TRH) .....	20
8	1.3	OBESIDADE E HORMÔNIOS OVARIANOS NAS DISFUNÇÕES	
9		AUTÔNOMICAS, CARDIOVASCULARES E INFLAMATÓRIAS .....	22
10	1.4	ÓXIDO NÍTRICO E O ESTROGÊNIO .....	23
11	1.5	OBESIDADE E SÍNDROME METABÓLICA: DISFUNÇÕES	
12		AUTÔNOMICAS CARDÍACAS .....	25
13	1.6	OBESIDADE INDUZIDA POR GLUTAMATO MONOSSÓDICO (MSG).....	26
14			
15	<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	28
16			
17	<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	29
18	3.1	OBJTIVO GERAL.....	29
19	3.2	OBJETIVO ESPECÍFICO .....	29
20			
21	<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	30
22	4.1	APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM ANIMAIS .....	30
23	4.2	ANIMAIS E INDUÇÃO DA OBESIDADE MSG.....	30
24	4.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	30
25	4.4	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO DE OVARIECTOMIA .....	30
26	4.5	COLETA E ARMAZENAMENTO DOS TECIDOS.....	32
27	4.6	CARACTERIZAÇÃO DA OBESIDADE.....	32
28	4.7	CARACTERIZAÇÃO DA OVARIECTOMIA .....	32
29	4.8	PESO SEMANAL.....	32
30	4.9	DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) TECIDUAL .....	32
31	4.10	ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA (IHC) .....	32
32	4.11	CATETERIZAÇÃO DA ARTÉRIA FEMORAL .....	33
33	4.12	MENSURAÇÕES DOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES .....	34
34	4.13	PUNÇÃO CARDÍACA E OBTENÇÃO DO PLASMA .....	34

1	4.14	DOSAGEM DE NO PLASMÁTICO .....	34
2	4.15	ANÁLISE ESPECTRAL DA VARIABILIDADE DA PRESSÃO ARTERIAL	
3		SISTÓLICA E INTERVALO DE PULSO .....	34
4	4.16	BARORREFLEXO ESPONTÂNEO.....	35
5	4.17	DETERMINAÇÃO DO ESTRO FISIOLÓGICO .....	36
6	4.18	TRATAMENTO HORMONAL COM ESTRADIOL.....	36
7	4.19	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	36
8			
9	<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	37
10	5.1	AUSÊNCIA DOS HORMÔNIOS OVARIANOS NO PERFIL	
11		CARDIOVASCULAR E AUTONÔMICO EM RATAS OBESAS:	
12		ENVOLVIMENTO DO ÓXIDO NÍTRICO E INFLAMAÇÃO.....	37
13	5.2	EFEITOS DE OITO SEMANAS DE TRATAMENTO COM ESTRADIOL	
14		NOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES, AUTONÔMICO E	
15		INFLAMATÓRIOS DE RATAS OBESAS MSG.....	55
16	<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	73
17	6.1	Discussão do Estudo 1 .....	73
18	6.2	Discussão do Estudo 2 .....	78
19			
20	<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	81
21			
22	<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	82
23			
24	<b>9</b>	<b>ANEXOS</b> .....	89

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Doenças Cardiovasculares e fatores de risco no sexo feminino

Doenças cardiovasculares (DCVs) é um grupo de patologias do coração e dos vasos sanguíneos como a disfunção coronariana, cerebrovascular e arterial periférica. Zhang et al., (2019) enfatizam que é a principal causa de morte em todo o mundo e segundo a Organização Mundial de Saúde, é a primeira causa de morte no Brasil. Dentre os fatores de risco para o desenvolvimento de DCVs estão o tabagismo, a inatividade física, a hiperlipidemia e a dieta rica em lipídios saturados que conseqüentemente leva ao desenvolvimento da obesidade, a qual está relacionada com vários fatores de risco para DCVs como a resistência à insulina, intolerância à glicose, diabetes e a hipertensão arterial (HSIEH, 2015; RIQUE, SOARES e MEIRELLES, 2002; ISHITANI, et al., 2006; LOPES, 2007).

O risco de DCVs, com o aumento da idade, é maior no sexo feminino comparado ao masculino, presumivelmente em consequência da diminuição da secreção hormonal ovariana, o estrogênio e a progesterona, que ocorre naturalmente na fase da pós-menopausa (HSIEH, 2015). Mais de 50% das mulheres nesta fase possuem disfunção microvascular coronariana, o qual é muitas vezes mal diagnosticada e tratada (ELIAS-SMALE, et al., 2015). A diminuição destes hormônios também está relacionada à ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), ligada à patogênese da disfunção diastólica e a consequência do aumento da pressão arterial (PA) (ZHAO, 2014), mostrando que há uma associação entre a regulação da PA e as alterações das concentrações hormonais ovarianos (MARIC-BILKAN et al., 2014).

Segundo Reckelhoff et al., (2019) há dimorfismo sexual/de gênero na incidência e regulação da PA em humanos e modelos animais experimentais, respectivamente, e portanto os mecanismos responsáveis pela hipertensão em homens e mulheres são diferentes, mas as razões para essas diferenças não são aparentes.

As DCVs mostram muitas diferenças relacionadas ao sexo, devido aos cromossomos sexuais, que são expressos em cada tipo de célula e diferem entre machos e fêmeas, do ponto de vista estritamente biológico, as mulheres e os homens são diferentes em termos de genética, epigenética e endocrinologia e mecanismos moleculares complexos fundamentam uma manifestação patológica diversa, devido à expressão gênica

1 diferenciada e à interação dos hormônios sexuais com seus receptores específicos em  
2 diferentes tecidos (DE BELLIS, 2019). Há diferenças significativas entre os sexos em  
3 muitos aspectos das DCV, tais como fatores de risco, manifestações clínicas e resposta ao  
4 tratamento e prognóstico (ZHANG et al., 2019). Hong et al., (2009) explicam que a  
5 diferença na suscetibilidade a doenças como câncer e DCVs entre machos e fêmeas é  
6 devida em parte às diferenças fisiológicas, incluindo aquelas que influenciam a  
7 vulnerabilidade ao ganho de peso corporal e enfatizam que a compreensão das diferenças  
8 metabólicas existente entre os sexos pode levar à descoberta de melhores tratamentos e  
9 estratégias preventivas específicas para cada um.

10 Lima- Mendoza et al., (2014), demonstraram que a combinação de diminuição  
11 hormonal ovariana e a obesidade originam alterações na função hemodinâmica e o  
12 aparecimento do estresse oxidativo, no organismo feminino, que pode, por sua vez,  
13 aumentar a probabilidade de desenvolver distúrbios cardiovasculares. O risco de DCVs  
14 aumenta drasticamente na fase pós-menopáusicas, período em que ocorre a interrupção na  
15 produção dos hormônios ovarianos, em comparação com as mulheres na pré-menopausa  
16 (CAMPOS et al., 2014), e pode-se relacionar o estrogênio com efeitos protetores na  
17 função cardiometabólica (SIVASINPRASASN et al., 2015), além do mais, com ausência  
18 dos hormônios ovarianos, há um aumento do risco de hipertensão arterial, perfil lipídico  
19 anormal, disfunção diastólica do ventrículo esquerdo (DDVE), insuficiência cardíaca,  
20 arteriosclerose e os deslocamentos de distribuição de tecido adiposo glúteo-femural para  
21 depósitos abdominais, o que favorece outro fator de risco para desenvolvimento de DCVs,  
22 que é a obesidade no organismo feminino (YAMATANI, 2015; LEENERS et al., 2017 e  
23 RASTOVIC et al., 2016; RECKELHOFF et al., 2019).

24

## 25 **1.2 Relação entre as doenças cardiovasculares e terapia de reposição hormonal (TRH)**

26

27 Desde a adolescência, a vida de uma mulher é caracterizada pela menstruação  
28 mensal, que tipicamente cessa, entre a idade de 40 e 60 anos, caracterizando a menopausa.  
29 Neste período o potencial de reprodução diminui, os ovários se esgotam de oócitos e aos  
30 50 anos a atividade cíclica de gonadotrofinas, peptídeos e esteróides é perdida, causando a  
31 redução fisiológica nas concentrações dos hormônios ovarianos. O estrogênio, hormônio  
32 importante para a homeostase de lipídios, glicose e síntese de proteínas, é responsável por  
33 regular a ingestão de alimentos e o gasto de energia por ação do sistema nervoso central

1 (SNC). Já a progesterona, está relacionada à transcrição gênica de proteínas que regulam as  
2 funções do útero, ovário, glândula mamária e cérebro. Esta diminuição dos hormônios  
3 ovarianos provoca então uma série de distúrbios clínicos, como, a quantidade de massa  
4 corporal, tônus vasomotor, alterações do sistemas, endócrino, cardiovascular, esquelético,  
5 do trato urogenital e imunológico (HONOUR, 2018).

6 Com a diminuição dos hormônios ovarianos ocorre alterações adversas, como  
7 aumento nos lipídios e lipoproteínas, alterações na distribuição de tecido adiposo corporal  
8 com acúmulo de tecido adiposo central e visceral, um aumento na incidência de  
9 hipertensão e de diabetes mellitus tipo 2, desenvolvimento da arteriosclerose disfunção do  
10 endotélio vascular e conseqüentemente a um aumento geral no risco de DCVs, em  
11 particular a doença cardíaca coronariana (DCC) (MARIC-BILKAN et al., 2014;  
12 YAMATANI, 2015; STEVENSON, et al., 2018).

13 É bem conhecido que o risco de DCV aumenta significativamente após a  
14 menopausa com alterações fisiológicas, que afetam o sistema cardiovascular, devido á  
15 diminuição dos hormônios. Contudo, o uso de estrogênio em mulheres na pós-menopausa  
16 para reduzir o risco de desenvolver DCV permanece controverso (ZHANG et al., 2019).  
17 Há estudos que sugerem que os estrogênios exercem seus efeitos em órgãos-alvo, como a  
18 vasculatura, os rins, o sistema imunológico e o SRAA, que implica na regulação da pressão  
19 arterial e da função cardiovascular tanto em humanos quanto em modelos experimentais,  
20 sugerindo que o uso da terapia hormonal seria benéfico na prevenção da doença após a  
21 perda natural de hormônios ovarianos (MARIC-BILKAN et al., 2014)

22 No trabalho de Bundalob, (2017), o estradiol foi enfatizado como um agente  
23 cardioprotetor, visto que a administração do mesmo em ratas ovariectomizadas (OVX),  
24 uma cirurgia com a remoção dos ovários, que mimetiza o estado pós-menopausa das  
25 mulheres, expostas ao aumento da ingestão de frutose, foi benéfica para o coração. Os  
26 autores acreditam que esses dados, são úteis para clínicos que lidam com mulheres na pós-  
27 menopausa suscetíveis a doenças metabólicas com a terapia de reposição hormonal  
28 (BUNDALOB, 2017, HONG et al., 2009).

29 Campos et al., (2014) demonstraram que tanto uma dose baixa de reposição com  
30 estrogênio (40% menor que a dose farmacológica de 17-estradiol) quanto a dose  
31 farmacológica em ratas OVX, foram eficazes na redução do estresse oxidativo cardíaco,  
32 devido a diminuição das espécies reativas de oxigênio (EROs) associado ao aumento da  
33 capacidade antioxidante, o que indica redução do risco cardiovascular, visto que estas

1 condições refletiram na melhora da função do ventrículo esquerdo e no controle  
2 autonômico cardíaco.

3 Khalil (2005) enfatiza que o uso de TRH é controverso, mas que na pós-menopausa  
4 pode ser mais eficiente na redução da pressão arterial quando hormônios são usados em  
5 doses que produzam concentrações hormonais semelhantes aos aqueles em mulheres na  
6 pré-menopausa, podendo conferir proteção cardiovascular. No entanto, os autores sugerem  
7 que o tempo de iniciação e a duração da TRH deve ser personalizada, dependendo da idade  
8 e condição cardiovascular pré-existente.

9

### 10 **1.3 Obesidade e hormônios ovarianos nas disfunções autonômicas, cardiovasculares e** 11 **inflamatórias**

12

13 Como o aumento da prevalência da obesidade tem se mostrado crescente no sexo  
14 feminino, principalmente no período da pós-menopausa, essa associação merece devida  
15 atenção, pois ambos intensificam o acúmulo excessivo de tecido adiposo, aumentando os  
16 riscos para o acometimento de processos inflamatórios e dislipidemias (RASIA et al.,  
17 2007). As dislipidemias englobam a hipercolesterolemia, (concentração plasmática de  
18 colesterol elevado), onde a quantidade de lipoproteína de baixa densidade (LDL) é alta e  
19 sua elevada concentração na circulação favorece sua oxidação (LDL-ox) que promove  
20 eventos celulares de recrutamento de leucócitos para a região vascular afetada, os quais  
21 irão produzir substâncias deletérias para as células endoteliais (interleucinas), reduzindo a  
22 produção de óxido nítrico (NO) da via endotelial (eNOS), promovendo a agregação  
23 plaquetária, a hiperplasia e a hipertrofia das células musculares lisas, acarretando  
24 significativa redução da luz dos vasos e, conseqüentemente, a isquemia dos tecidos,  
25 causando deficiência do funcionamento do miocárdio (ZAGO & ZANESCO, 2006).

26 A obesidade, principalmente a visceral, está associada a um estado inflamatório de  
27 baixo grau e o estrogênio, um esteróide ovariano, atua na modulação do metabolismo  
28 através das suas propriedades anti-inflamatórias sendo, portanto, indicado como estratégia  
29 terapêutica para o manejo das disfunções metabólicas inclusive evitando a deposição  
30 visceral (MONTEIRO, 2014). A incidência de DCV aumenta após o início da menopausa,  
31 sugerindo que o estrogênio tem um papel vital na sua prevenção (MINTA et al., 2018).

32 A privação de estrogênio ou a obesidade sozinha podem prejudicar os parâmetros  
33 metabólicos e o equilíbrio autonômico cardíaco (SIVASINPRASASN, et al., 2015). No

1 estudo de Minta (2018) foi demonstrado que a perda de estrogênio endógeno por OVX  
2 em ratas obesas resistentes à insulina agrava a disfunção metabólica e cardíaca. Segundo  
3 El-Mas, et al., (2009) o estrogênio pode conferir benefícios cardiovasculares via  
4 modulação da função autonômica, através do controle da variabilidade da frequência  
5 cardíaca (VFC) e dos reflexos cardiovasculares, que têm sido amplamente utilizados como  
6 medidas indiretas de equilíbrio simpátovagal.

7 O acúmulo de ácidos graxos nos tecidos que ocorre na obesidade e na pós-  
8 menopausa, manifesta-se sistemicamente com baixa intensidade, provocando uma forma  
9 atípica de inflamação. Uma das principais vias de sinalização desencadeadoras da resposta  
10 imune da obesidade é através do receptor toll like 4 (TLR4), que aumenta a expressão de  
11 citocinas pró-inflamatórias, ativando fatores de transcrição, como o fator nuclear kappa B  
12 (NF- $\kappa$ B). Este por sua vez, ao ser translocado para o núcleo ativa a transcrição de muitos  
13 genes de citocinas, incluindo fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ),  
14 interleucina-6 (IL-6), a enzima ciclooxigenase (COX) e a óxido nítrico sintase indutível  
15 (iNOS) (Rogerio et al, 2018). O aumento do tecido adiposo, também aumenta a fonte de  
16 mediadores pró-inflamatórios, como adipocinas, leptina, inibidor do ativador de  
17 plasminogênio (IAP), angiotensinogênio, proteína C-reativa (PCR) e NO (GOMES et al.,  
18 2010).

#### 19 **1.4 Óxido nítrico e o estrogênio**

20 O NO é um radical produzido a partir da L-arginina, por uma reação mediada pela  
21 enzima NO-sintase (NOS). Têm sido identificadas três isoformas da NOS: NOS neuronal  
22 (nNOS ou NOS I) presente no cérebro, medula espinhal, gânglios simpáticos, nervos  
23 periféricos, células epiteliais do estômago, útero, pulmão e músculo esquelético; NOS  
24 endotelial (eNOS ou NOS III) encontrada em células endoteliais, músculo liso vascular e  
25 músculo cardíaco, sendo estas duas isoformas expressas constitutivamente dentro de  
26 condições fisiológicas, e uma terceira isoforma induzível da NOS (iNOS ou NOS II), cujas  
27 fontes podem ser células endoteliais, células epiteliais, macrófagos, neutrófilos, células do  
28 músculo liso vascular e fibroblastos. Esta última isoforma é considerada pró-inflamatória  
29 (MONCADA, 1993; RANDOMSKI et al., 1990; MAYER & ANDREW, 1998;  
30 COLASANTI & SUZUKI, 2000).

1 A literatura apresenta diferentes papéis nas funções biológicas para o NO, sendo às  
2 vezes benéfico, mas outras vezes prejudicial ao organismo. O NO está envolvido no  
3 relaxamento vascular e tem um papel de grande importância na proteção do vaso  
4 sanguíneo (MONCADA & HIGGS,1992) e também constitui um importante mediador  
5 citotóxico de células imunes efectoras ativadas, capaz de destruir patógenos e células  
6 tumorais (MONCADA e HIGGS,1992). A biodisponibilidade do NO é dependente do  
7 balanço entre sua geração e degradação, onde níveis diminuídos de NO podem ser devido a  
8 uma menor expressão da enzima NOS, diminuição de sua atividade, ou reação do NO com  
9 espécies reativas, como o ânion superóxido, produzindo peroxinitrito e causando a morte  
10 celular (SANSBURY & HILL, 2014).

11 O NO produzido em processos inflamatórios pela via induzível, a iNOS, é capaz de  
12 produzir NO por longo tempo, em maiores quantidades e isso caracteriza seu envolvimento  
13 em vários processos patológicos. Assim, as altas concentrações de NO produzido por  
14 macrófagos ou por neutrófilos ou outras células ativadas, como os adipócitos, que deveria  
15 ser tóxico para micróbios, parasitas ou células tumorais, pode também lesar células  
16 saudáveis vizinhas, sendo este mecanismo o responsável pela maioria de processos  
17 inflamatórios, inclusive na obesidade (FILHO & ZILBERSTEIN, 2000).

18 Estudos mostraram que o estrogênio está relacionado com a produção de NO, e que  
19 a longo prazo, reduz a pressão arterial (PA) e melhora o controle autonômico  
20 cardiovascular em ratas ovariectomizadas (EL-MAS, 2014). Estudos *in vitro* evidenciaram  
21 a interação do estrogênio com o NO, uma vez que foi demonstrado a ativação da enzima  
22 eNOS através do receptor de estrogênio  $\alpha$  (ER $\alpha$ ), caracterizando um efeito vasodilatador  
23 importante do estrogênio junto ao NO (Chen et al., 1999). Khalil (2005) enfatiza que o  
24 estrogênio pode influenciar na produção de NO por meio da ativação de vias genômicas e  
25 regulação positiva da eNOS, através do aumento do RNA mensageiro (mRNA) da eNOS  
26 nas células endoteliais.

27

## 28 **1.5 Obesidade e Síndrome Metabólica: Disfunções autonômicas cardíacas**

29

30 A obesidade é um problema de saúde mundial que mostra falha em intervenções  
31 farmacológicas e terapêuticas para melhorar suas complicações metabólicas

1 (MALDONADO-RUIZ et al., 2017). O sobrepeso também resulta de interações diversas  
2 como fatores genéticos, metabólicos, comportamentais e ambientais (ROGERO et al.,  
3 2018), sendo um fator crucial no desenvolvimento de anormalidades metabólicas,  
4 incluindo intolerância à glicose, resistência à insulina, inflamação de baixo grau, estresse  
5 oxidativo e síndrome metabólica (SM) (BAUTISTA, 2019). A SM, descreve um conjunto  
6 de fatores de risco, que se manifestam num indivíduo e aumentam as chances de  
7 desenvolver DCV. Considera-se como componentes da SM, hipercolesterolemia,  
8 hipertrigliciridemia e aumento discreto ou no limite superior da glicemia em jejum e  
9 hipertensão arterial, além da obesidade visceral (DE MARCHI et al., 2016). Assim, todas  
10 as anormalidades relacionadas a SM são fatores de risco bem conhecidos para o  
11 desenvolvimento de DCVs e diabetes do tipo 2. Pacientes com a SM geralmente  
12 desenvolvem hipertensão, devido à ação aumentada do sistema nervoso simpático (SNS)  
13 responsável pela vasoconstrição ( BATTALUT et al., 2017).

14 A obesidade e a SM estão diretamente associadas a disfunções autonômicas e  
15 cardiovasculares (RASTOVIC et al., 2016). Segundo Aubert, et al., (2003), o sistema  
16 nervoso autônomo (SNA) desempenha papel importante na regulação dos processos  
17 fisiológicos do organismo humano, através da atividade das vias do SNS e sistema nervoso  
18 parassimpático (SNP), influenciando de modo tônico o marcapasso cardíaco entre outros.  
19 O SNA integra as atividades fisiológicas involuntárias dos órgãos viscerais vitais para a  
20 sobrevivência, controlando entre outros a FC, a PA, a bronquiodilatação, a contração e a  
21 secreção gastrointestinal e a homeostase dos eletrólitos e dos líquidos, alterações do SNA,  
22 estão diretamente relacionados ao desenvolvimento DCVs, como a hipertensão, onde  
23 ocorre a ativação de neurônios pré-simpáticos no núcleo paraventricular hipotalâmico  
24 (PVN) e na medula ventrolateral rostral (RVLM), contribuindo para a hiperatividade  
25 simpática (CHENG et al., 2019).

26 A literatura tem explorado que entre os possíveis mecanismos envolvidos na  
27 hipertensão na obesidade seria o aumento da atividade simpática (HALL et al., 2019). Em  
28 um estudo anterior do nosso grupo, foi encontrado um aumento no componente simpático  
29 da modulação autonômica cardíaca (DA CUNHA et al., 2014). Foi observado também que  
30 ratos machos obesos apresentam aumento da atividade nervosa simpática renal em  
31 comparação com os controles (DA SILVA MATTOS et al., 2012). O bloqueio da iNOS  
32 promoveu atenuação do componente simpático e aumento do componente parassimpático  
33 na variabilidade do IP. Um aumento na expressão da iNOS também foi observado no

1 coração de ratos obesos, que diminuiu após o tratamento com inibidor da iNOS. Estes  
2 resultados sugerem que a ativação da iNOS está envolvida nas alterações autonômicas  
3 cardíacas encontradas em ratos machos obesos (DA CUNHA et al., 2017). No entanto, não  
4 sabemos se em fêmeas obesas isso também ocorre.

5 Uma análise não invasiva no mecanismo de controle do SNA, e, portanto, de fácil  
6 acesso é a avaliação da VFC e em geral envolve ações recíprocas tanto do SNS e SNP. A  
7 VFC descreve as oscilações no intervalo entre batimentos cardíacos consecutivos  
8 (intervalos R-R), assim como oscilações entre frequências cardíacas instantâneas  
9 consecutivas. Uma alta VFC é sinal de boa adaptação, caracterizando um indivíduo  
10 saudável, com mecanismos autonômicos eficientes, enquanto que, baixa variabilidade é  
11 frequentemente um indicador de adaptação anormal e insuficiente do SNA, portanto um  
12 forte preditor de DCV (VANDERLEI et al., 2009; SÁNCHEZ-BARAJAS et al., 2015).

13

#### 14 **1.6 Obesidade induzida por glutamato monossódico (MSG)**

15

16 Devido aos danos causados pela obesidade muitos estudos têm avaliado suas  
17 consequências, através de modelos experimentais, que desenvolvem a obesidade em  
18 animais. Um dos modelos utilizados é induzido pela administração subcutânea de  
19 glutamato monossódico (MSG) nos cinco primeiros dias de vida dos animais, resultando  
20 em mau funcionamento endócrino adeno-hipofisário severo como resultado de lesão  
21 neurotóxica do hipotálamo levando ao aumento de tecido adiposo, especialmente na região  
22 abdominal (CLOUGH, et al., 1986).

23 A administração de MSG resulta na degeneração dos núcleos ventromedial e  
24 arqueado hipotalâmico, que faz com que ratos como camundongos, desenvolvam a  
25 obesidade, conhecida por obesidade hipotalâmica. A neurotoxicidade hipotalâmica provoca  
26 um retardo de crescimento no animal, devido a baixa concentração de hormônio do  
27 crescimento, (GH). Além disso ocorre disfunção sexual e comportamental, hiperglicemia,  
28 aumento a concentração de triglicérides no músculo esquelético, aumento do glicogênio  
29 hepático, resistência transitória à insulina e alterações metabólicas no sangue, fígado e  
30 músculo esquelético (QUINES, 2018; MAJEWSKI et al., 2018). Estudo recente  
31 demonstrou que a obesidade por MSG aumenta a produção de prostanóides, diminui a  
32 vasodilatação dependente do NO e diminui a participação de mecanismos hiperpolarizantes

1 nas respostas vasodilatadoras, além de favorecer a um ambiente pró-inflamatório  
2 (MAJEWSKI et al., 2018).

3 Os estudos são na maioria realizados em ratos MSG machos, como o de Konrad et  
4 al. (2012) que demonstraram o aumento dos valores médios de pressão arterial, de tecido  
5 adiposo branco, o índice de Lee e resistência à insulina destes animais em comparação com  
6 o grupo controle, enquanto a variabilidade da frequência cardíaca, as respostas  
7 bradicárdicas vagal e efeitos simpáticos foram reduzidos, sugerindo que a obesidade  
8 induzida pelo tratamento neonatal com MSG prejudica a função autonômica cardíaca e  
9 provavelmente contribui para aumento da pressão arterial e resistência à insulina. Nesse  
10 sentido, o modelo MSG pode também ser visto como um modelo de síndrome metabólica,  
11 já que os animais apresentam a maioria das alterações observadas nessa condição.

12 Iwase et al. (1998) demonstraram em seu trabalho que o modelo MSG neonatal  
13 feminino, quando tratado com uma dose de 4 mg/kg induz a obesidade sem hiperfagia, no  
14 entanto, a gravidade da hipertensão arterial é atenuada, e os autores sugerem que a pressão  
15 arterial está inversamente correlacionada com o grau de obesidade.

## 2. JUSTIFICATIVA

A obesidade está relacionada com diversas fisiopatologias, entre elas o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, que por sua vez, aumenta a incidência no organismo feminino no período pós menopausa. Apesar desses dados já estarem bem estabelecidos na literatura, a combinação da obesidade com a interrupção da liberação dos hormônios ovarianos sobre os riscos de desenvolver DCVs não está totalmente esclarecido.

Assim, considerando que a obesidade e a ausência de hormônios ovarianos provocam alterações cardiovasculares autonômicas e inflamatórias, fez-se necessário analisar se em conjunto intensificam as mudanças fisiológicas e, de que maneira temos a participação do NO nessas possíveis alterações. Para isso foi utilizado um modelo de síndrome metabólica induzida por glutamato monossódico (MSG), associado ou não com a ovariectomia (OVX). Além disso, para se averiguar se as possíveis alterações estão associadas à ausência dos hormônios ovarianos, um outro estudo em fêmeas ovariectomizadas obesas ou não foram tratadas com estrógeno.

### 1 **3. OBJETIVOS**

2

#### 3 **3.1 OBJETIVO GERAL**

4

5 Este trabalho tem como objetivo principal investigar os efeitos da ausência  
6 hormonal ovariana e do tratamento hormonal com estradiol, sobre parâmetros  
7 cardiovasculares, autonômicos e inflamatórios de ratas induzidas a obesidade com  
8 glutamato monossódico (MSG).

9

#### 10 **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

11

- 12 1. Caracterizar os parâmetros de obesidade em todos os grupos experimentais;
- 13 2. Investigar as alterações uterinas da ovariectomia junto a obesidade em ratas com e sem  
14 tratamento hormonal com estradiol.
- 15 3. Analisar o efeito da ausência hormonal ovariana com e sem tratamento com estradiol,  
16 sobre parâmetros cardiovasculares e autonômicos basais;
- 17 4. Avaliar o efeito da ausência hormonal ovariana associado à obesidade induzida por  
18 MSG, com e sem tratamento hormonal, com estradiol, sobre parâmetros cardiovasculares e  
19 autonômicos basais;
- 20 5. Determinar a produção de NO em tecidos de ratas obesas, com ausência hormonal  
21 ovariana com e sem tratamento com estradiol dos tecidos, cardíacos, renais, plasmático,  
22 aórtico e da tecido adiposo retroperitoneal;
- 23 6. Avaliar a expressão de iNOS dos tecidos, cardíacos, renais e cerebrais para iNOS em  
24 ratas obesas, ovariectomizadas com e sem tratamento com estradiol.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Aprovação pelo comitê de ética em animais

Este trabalho foi realizado no Departamento de Ciências Fisiológicas (CIF) do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Todos os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta Universidade (Processo número: 14158.2016.97 sob o número de ofício 164/2016).

Inicialmente os animais oriundos do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina – UEL, pesando entre 200-250 gramas, foram submetidos ao acasalamento no CIF e destes foram utilizadas 140 ratas Wistar adultas (18 semanas), mantidas em caixas de polipropileno (45X25X25 cm), em sala com temperatura controlada ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) num ciclo claro/escuro de 12/12 horas com comida e água a vontade.

Este trabalho foi realizado em duas partes, no qual foram utilizadas para cada um, ratas Wistar adultas ( $n > 9$ ) e divididas em 4 grupos experimentais em cada parte.

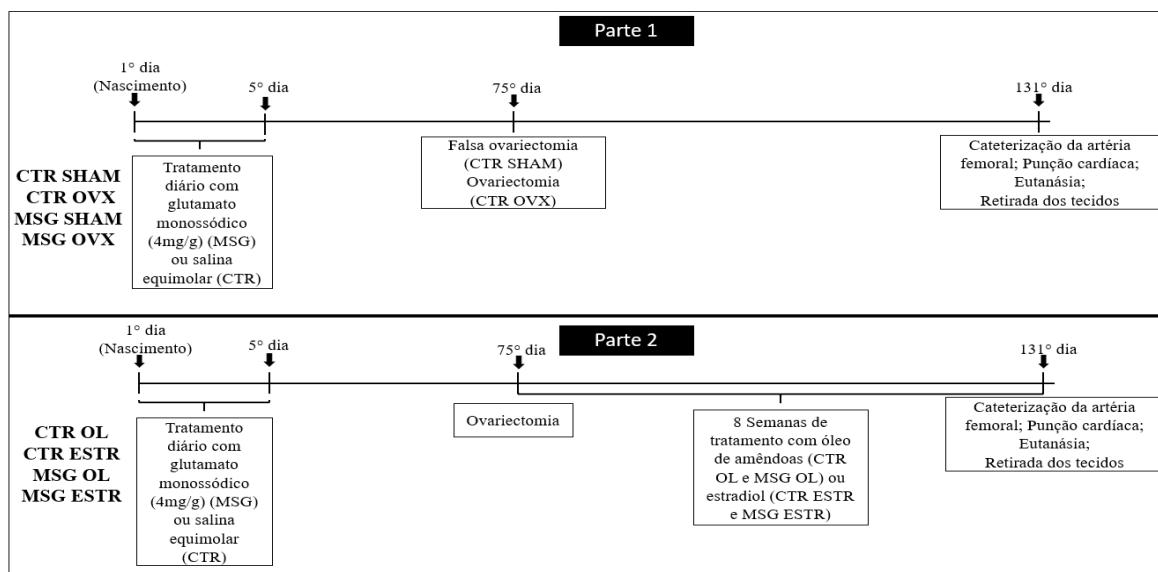
Parte 1 Grupos: não obesas não ovariectomizadas (CTR SHAM); não obesas ovariectomizadas (CTR OVX); obesas não ovariectomizadas (MSG SHAM); obesas ovariectomizadas (MSG OVX).

Parte 2 Grupos: não obesas ovariectomizadas tratadas com óleo de amêndoas (CTR OL); não obesas ovariectomizadas tratadas com estradiol (CTR ESTR); obesas ovariectomizadas tratadas com óleo de amêndoas (MSG OL); obesas ovariectomizadas tratadas com estradiol (MSG ESTR).

### 4.2 Animais e indução da obesidade MSG

Ratas Wistar fêmeas, provenientes dos cruzamentos realizados no biotério setorial do CIF, receberam durante os cinco (5) primeiros dias de vida, injeções intradérmicas de glutamato monossódico (4mg/g) (Sigma Co. MO, USA) e os animais controle receberam salina equimolar (MATHIAS et al., 2007).

### 1 4.3 Delineamento experimental



2

3

### 4 4.4 Procedimento cirúrgico de ovariectomia

5

6 A ovariectomia foi realizada aos 75 dias de vida das ratas controle e obesas. As  
7 ratas foram anestesiadas com quetamina (100 mg/kg, IP) (Dopalen, Ceva) e Hidroclorato  
8 de xilasina (6,67 mg/Kg, IP) (Dopalen, Ceva). Após a anestesia, foram retirados os pêlos  
9 da região dorsal, na altura das cristas ilíacas e duas incisões de aproximadamente dois  
10 centímetros foram realizadas de cada lado. A partir destas incisões, os ovários foram  
11 pinçados e removidos. Após este procedimento, as incisões foram suturadas e higienizadas  
12 com álcool iodado 3%. Os animais controle foram submetidos aos mesmos procedimentos  
13 cirúrgicos, porém não tiveram os ovários removidos (falsa ovariectomia). Após a cirurgia,  
14 foi administrada uma dose de paracetamol (100mg/Kg, VO).

15

### 16 4.5 Coleta e armazenamento dos tecidos

17

18 Após oito semanas da ovariectomia ou falsa ovariectomia, com 131 dias de vida, as  
19 ratas foram eutanasiadas por decaptação para a coleta dos seguintes órgãos: cérebro,  
20 coração, rins, aorta, útero, tibia e tecido adiposo retroperitoneal.

21 Foi realizado o corte sagital mediano do coração e dos rins, a porção esquerda de  
22 ambos os cortes e o cérebro inteiro foram armazenados em formalina tamponada 10% por  
23 24 horas e depois em álcool 70° para as análises imunohistoquímicas. A porção direita dos

1 rins e do coração foi armazenada no freezer -80°C para posterior dosagem de óxido nítrico  
2 (NO). A aorta foi retirada e armazenada imediatamente em nitrogênio líquido e logo após  
3 acondicionada em freezer -80° C para dosagem de NO. O útero e o tecido adiposo  
4 retroperitoneal foram pesados, a tíbia e o comprimento nasoanal foram medidos com  
5 auxílio de uma régua (cm).

6

#### 7 **4.6 Caracterização da obesidade**

8

9 As ratas foram pesadas antes da eutanásia, o tecido adiposo retroperitoneal coletada  
10 foi pesada (g) e foi verificado o comprimento nasoanal (cm) com auxílio de uma régua. A  
11 obesidade foi caracterizada pelo cálculo do Índice de Lee para cada animal aos 131 dias de  
12 vida usando a fórmula:  $\sqrt[3]{\text{peso corporal/comprimento naso-anal} \times 1000}$ , e também através  
13 do peso das tecido adiposos retroperitonial, onde o peso corporal e o comprimento naso-  
14 anal são dados em g e cm, respectivamente (BERNARDIS & PATTERSON, 1968).

15

#### 16 **4.7 Caracterização da ovariectomia**

17

18 O útero removido foi analisado quanto à atrofia (ratas ovariectomizadas) (GORE,  
19 OUNG & WOLLER, 2002), tendo sido pesados e os resultados foram expressos pela  
20 relação entre o peso uterino (g) e tamanho da tíbia (cm).

#### 21 **4.8 Peso semanal**

22

23 Utilizando a Balança Digital Eletrônica De Precisão Sf-400, todas as ratas foram  
24 pesadas no dia da ovariectomia e durante as próximas oito semanas de vida, para o  
25 acompanhamento do peso corporal.

26

#### 27 **4.9 Dosagem de óxido nítrico (NO) tecidual**

28

29 As medidas da concentração do NO foram realizadas na aorta, porção direita do  
30 coração, dos rins e tecido adiposo, os quais foram triturados em PBS na concentração de  
31 100mg/mL para dosagem indireta de NO, por meio da quantificação de nitrito, após

1 tratamento da amostra com cádmio, através da reação colorimétrica de Griess (PANIS et  
2 al., 2012).

#### 4 4.10 Análise imunohistoquímica (IHC)

5  
6 Para a realização da técnica de IHC foram confeccionadas lâminas contendo cortes  
7 de tecido cerebral, cardíaco e renal (3  $\mu$ m) representativos de cada experimento, fixados e  
8 incluídos em blocos de parafina. As lâminas contendo os cortes permaneceram “overnight”  
9 em estufa 65<sup>0</sup>C e foram submetidas ao protocolo de desparafinização (xilol-álcool-água).  
10 Em seguida, os cortes foram delimitados com caneta hidrofóbica Dako Pen<sup>®</sup> e realizado o  
11 bloqueio da peroxidase endógena em solução de peróxido de hidrogênio 10% por 30  
12 minutos. Em seguida, procedeu-se a incubação em soro fetal 1% por 1 hora. Em todas as  
13 lâminas, após a lavagem com PBS, foram aplicados os anticorpos primários sobre cada  
14 corte (diluição: iNOS 1:300), seguido de incubação em câmara úmida por 16 horas a 4°C.  
15 Todos os anticorpos primários foram adquiridos da Santa Cruz Biotechnology (USA).

16 Após a incubação, as lâminas foram submetidas a 2 banhos (5 minutos) em PBS e  
17 em seguida, foi aplicado sobre cada amostra o anticorpo secundário biotilado fornecido  
18 pelo kit (Vector Laboratories), por 30 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente.  
19 Após este tempo, as lâminas foram lavadas em PBS (3 vezes de 5 minutos), seguido da  
20 aplicação de conjugado streptavidina-peroxidase por 15 minutos, em câmara úmida e em  
21 temperatura ambiente. As lamínulas foram em seguida lavadas em PBS por 5 minutos 3  
22 vezes, e submetidas à revelação com o substrato-cromógeno (Red Substrate, Vector  
23 Laboratories) por 5 minutos. Em seguida foram contra-coradas com hematoxilina de  
24 Weigert por 1 minuto, posteriormente lavadas em água corrente por 5 minutos e  
25 desidratados em graduações de álcool (70%, 85% e 100%), clarificadas em xilol e  
26 montadas e cobertas com lamínula utilizando meio de montagem não aquoso (bálsamo do  
27 Canadá). As lâminas montadas foram analisadas para obtenção de score quantitativo de  
28 imunomarcação pelo programa Image J (NIH, USA).

29  
30  
31  
32  
33

#### 1 **4.11 Cateterização da artéria femoral**

2  
3 Oito semanas após a ovariectomia, ou a falsa ovariectomia, sob anestesia com  
4 quetamina (100 mg/kg, IP) (Dopalen, Ceva) e Hidrocloreto de xilasina (6,67 mg/Kg, IP)  
5 (Dopalen, Ceva) os animais passaram pela cateterização, que consiste na inserção de um  
6 catéter de polietileno na artéria femoral e exteriorizado dorsalmente, com o objetivo de  
7 monitorização da PAM e FC não anestesiado, e segundo estudos anteriores (CUNHA et al.,  
8 2014; ARIZA et al., 2015). Após 24 horas da cateterização, os parâmetros cardiovasculares  
9 basais foram obtidos durante pelo menos 30 minutos para o registro da PAM e FC, seguido  
10 do protocolo experimental (MARTINS-PINGE et al., 2005).

#### 11 12 **4.12 Mensurações dos parâmetros cardiovasculares**

13  
14 O registro direto da PAM e FC foram realizados através da cânula arterial  
15 previamente implantada na artéria femoral (cateterização da artéria femoral) e de acordo  
16 com trabalhos prévios do laboratório (MARTINS-PINGE et al., 2005; 2007; MEHANNA  
17 et al., 2007; DE ABREU et al., 2009). O registro foi feito com os animais acordados e com  
18 livre movimentação. A cânula arterial do animal foi acoplada a um transdutor de pressão  
19 (Powerlab, modelo MLT0380) e conectado a um sistema de registro computadorizado  
20 (Powerlab/ADInstruments). Durante o período de registro os animais foram mantidos  
21 dentro de caixas individuais em ambiente silencioso.

#### 22 23 **4.13 Punção cardíaca e obtenção do plasma**

24  
25 O sangue do grupo de animais que fizeram a cateterização, foi retirado através da  
26 punção cardíaca e os animais foram eutanasiados, anestesiados com superdose de  
27 anestésico, através do deslocamento cervical. O plasma foi obtido a partir da centrifugação  
28 do sangue a 3000 rpm, 20 minutos, 4°C e armazenado a - 80°C até a dosagem de NO.

#### 29 30 31 32 33 **4.14 Dosagem de NO Plasmático**

1  
2 O plasma coletado foi utilizado para dosagem indireta de NO por meio da  
3 quantificação de nitrito após tratamento da amostra com cádmio, segundo método descrito  
4 por Panis et al., (2012), através da reação colorimétrica de Griess.

#### 5 6 **4.15 Análise espectral da variabilidade da pressão arterial sistólica e intervalo de** 7 **pulso**

8  
9 A análise da variabilidade do intervalo de pulso (IP) e da pressão arterial sistólica  
10 (PAS) no domínio da frequência foi realizada utilizando-se o software computacional  
11 CardioSeries v2.4. Uma vez que este programa computacional não realiza aquisição de  
12 dados, os registros de pressão arterial pulsátil, foram processados pelo programa  
13 computacional LabChart 7.0 (ADInstruments, Bella Vista, Austrália), o qual é capaz de  
14 detectar pontos de inflexão nos pulsos de pressão e gerar séries, batimento-a-batimento,  
15 com valores de IP e PAS para cada ciclo cardíaco.

16 As séries temporais, batimento-a-batimento, com valores de IP e PAS foram  
17 reamostradas em 10 Hz (1 valor a cada 100 ms) por interpolação cúbica do tipo *spline*,  
18 para regularização do intervalo de tempo entre batimentos. As séries com valores  
19 interpolados de IP e PAS foram divididas em segmentos com 512 valores cada, com  
20 sobreposição de 50% (Protocolo de Welch). A estacionaridade dos valores de IP e PAS de  
21 cada segmento foi examinada visualmente e os segmentos com artefatos ou transientes  
22 foram excluídos.

23 Após a inspeção visual dos segmentos com valores interpolados de IP e PAS e da  
24 inspeção dos espectros, os segmentos considerados adequados foram integrados em bandas  
25 de baixa frequência (LF: 0,20 – 0,75 Hz) e alta frequência (HF: 0,75 – 3,00 Hz), e os  
26 resultados foram expressos em unidades absolutas ( $\text{ms}^2$  ou  $\text{mmHg}^2$ ) e normalizadas (un).  
27 Os valores normalizados foram obtidos por meio de cálculos da potência relativa das  
28 bandas de LF e HF levando em consideração a potência total de espectro menos a potência  
29 de banda de muito baixa frequência (VLF:  $< 0,20$  Hz). Para avaliar o balanço simpato-vagal  
30 cardíaco, calculou-se a razão entre a potência das bandas de LF e HF (LF/HF) do espectro  
31 do IP (DUTRA et al., 2013).

#### 1 **4.16 Barorreflexo Espontâneo**

2  
3 A sensibilidade barorreflexa (SBR) foi avaliada no domínio da frequência por meio  
4 do método da sequência. Utilizando-se o programa computacional CardioSeries v2.4,  
5 séries temporais batimento -a- batimento com valores de IP e PAS foram utilizadas para  
6 análise da SBR. As séries temporais foram analisadas em busca de sequências de quatro ou  
7 mais batimentos nos quais aumentos progressivos da PAS foram acompanhados por  
8 aumentos progressivos do IP (*up gain*) ou reduções progressivas da PAS foram  
9 acompanhadas por reduções progressivas do IP (*down gain*). Para detecção das alterações  
10 da PAS e do IP foram utilizados os limiares de 0 mmHg e 0 ms, respectivamente.

11 Após a detecção de uma rampa de PAS (sequência de quatro ou mais batimentos),  
12 nos quais aumentos ou reduções progressivas da PAS foram acompanhados, ou não de  
13 aumentos ou reduções do IP, o programa computacional buscava por alterações no IP sem  
14 qualquer intervalo, ou seja, delay de zero batimento. Uma sequência barorreflexa só foi  
15 utilizada quando o coeficiente de correlação ( $r$ ) entre os valores de PAS e IP for maior ou  
16 igual a 0,8. A SBR foi determinada a partir da média de inclinação da reta da regressão  
17 linear entre os valores de PAS e IP de cada sequência barorreflexa encontrada.

#### 18 **4.17 Determinação do estro fisiológico**

19  
20 Após os registros para obtenção de PAM e FC foram realizadas as coletas de  
21 material vaginal utilizando uma haste de algodão embebida em solução salina 0,9%. O  
22 material coletado foi transferido em esfregaço para uma lâmina de vidro para observação à  
23 fresco em microscópio de luz. O exame celular desta secreção permite diferenciar as fases  
24 do ciclo estral das ratas. As ratas dos grupos SHAM foram utilizadas em estro fisiológico,  
25 por ser uma fase de fácil determinação e que apresenta os efeitos da presença de estrógeno.

#### 30 **4.18 Tratamento hormonal com estradiol**

31

1 Para o segundo estudo (Parte 2), as ratas Wistar que receberam glutamato  
2 monossódico ou salina equimolar no período neonatal (descrito no item 4.2) foram também  
3 divididas em quatro (4) grupos onde todas aos 75 dias de vida passaram pelo procedimento  
4 de ovariectomia e no dia seguinte deste procedimento receberam 1 mg/kg por dia de  
5 valerato de estradiol (Hangzhou Hetd Industry Co., Zhejiang, China) ou seu veículo o óleo  
6 de amêndoas (1mg/Kg), por gavagem no período de 8 semanas (CASTARDO-DE-  
7 PAULA, et al., 2017), formando os grupos: Fêmeas não obesas ovariectomizadas tratadas  
8 com óleo de amêndoas (CTR OL), Fêmeas não obesas ovariectomizadas tratadas com  
9 valerato de estradiol (CTR ESTR), Fêmeas obesas ovariectomizadas tratadas com óleo de  
10 amêndoas (MSG OL) e Fêmeas obesas ovariectomizadas tratadas com valerato de estradiol  
11 (MSG ESTR).

12

#### 13 **4.19 Análise estatística**

14

15 A análise estatística dos resultados foi utilizado o programa estatístico INSTAT  
16 (GraphPad, 6,0 San Diego, CA). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão  
17 da média (SEM). Foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, quando os dados  
18 apresentaram distribuição normal, foi realizada a análise de variância (ANOVA) para  
19 comparações múltiplas, seguido do Teste Comparativo Múltiplo de Tukey. Quando os  
20 dados não apresentaram normalidade, foi realizado o teste Kruskal Wallis, seguido pelo  
21 teste de comparação múltiplas de Dunn's. Para as análises de peso semanal foram  
22 aplicados Two way ANOVA seguido do teste comparativo múltiplo de Tukey. Foram  
23 consideradas estatisticamente significantes as análises com  $p < 0,05$ .

24

25

26

27

28

29

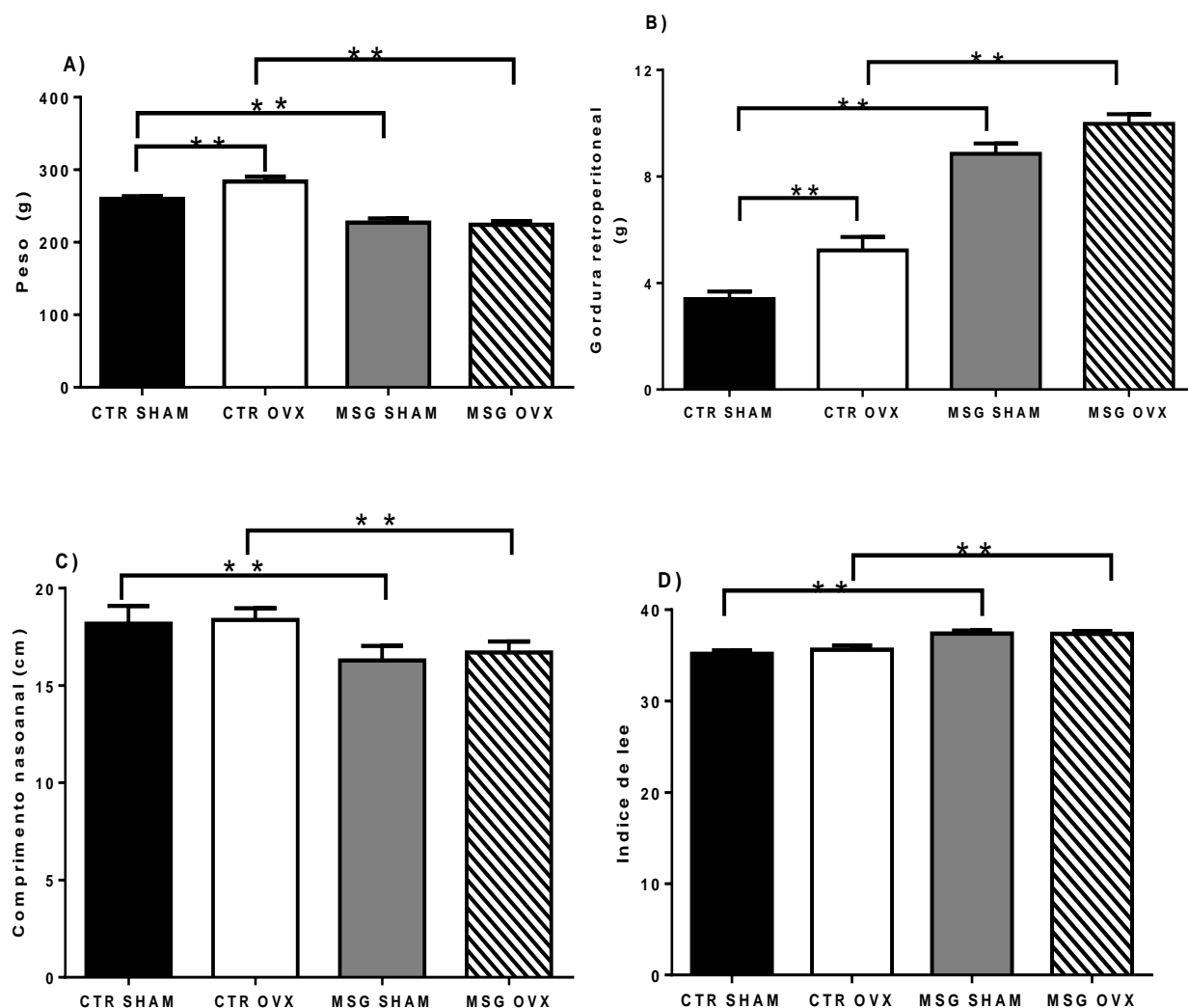
## **5.RESULTADOS**

### **PARTE 1**

## **5.1 Ausência dos hormônios ovarianos no perfil cardiovascular e autonômico e produção de NO em ratas obesas**

### **5.1.1 Caracterização da obesidade MSG**

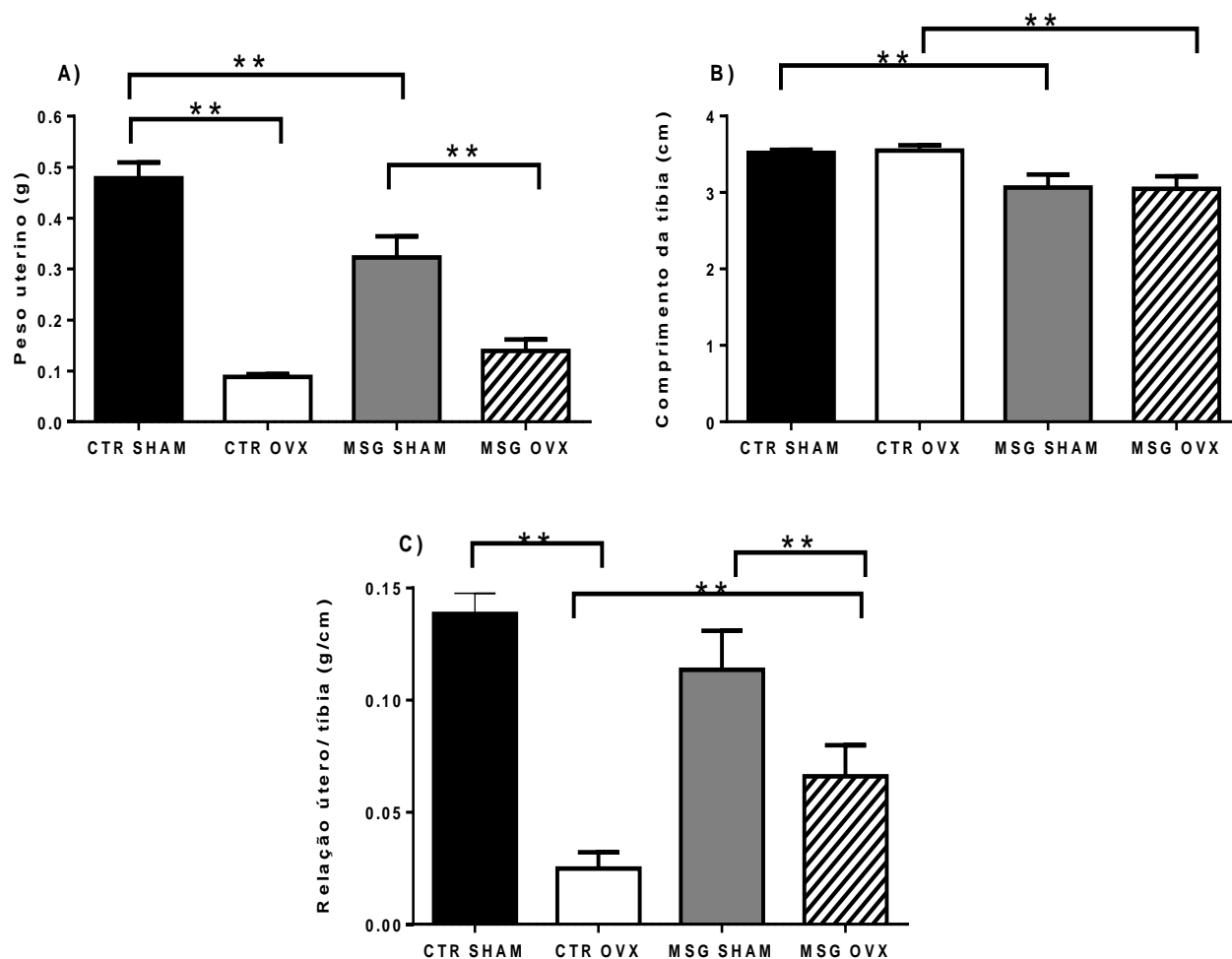
1           Após oito semanas do tratamento neonatal com glutamato monossódico (MSG)  
2 realizado em ratas Wistar fêmeas, o ganho de peso corporal do grupo MSG SHAM e MSG  
3 OVX foi menor do que CTR SHAM e CTR OVX ( $p < 0,0001$ ) e o grupo CTR OVX  
4 aumentou o peso comparado ao grupo CTR SHAM ( $p < 0,0001$ ), (Figura 1A). Contudo  
5 houve um aumento do peso da tecido adiposo retroperitoneal significativo dos grupos  
6 MSG SHAM e MSG OVX comparados aos CTR SHAM e CTR OVX ( $p < 0,0001$ )  
7 respectivamente e o grupo CTR OVX aumentou significativamente o peso da tecido  
8 adiposo retroperitoneal comparado ao grupo CTR SHAM ( $p < 0,0001$ ), representado na  
9 Figura 1B. Os dados do comprimento nasoanal demonstra que os grupos MSG SHAM e  
10 MSG OVX tiveram menor crescimento em relação aos grupos CTR SHAM e CTR OVX  
11 ( $p < 0,0001$ ), (Figura 1C). Houve aumento no cálculo do Índice de Lee nos animais MSG  
12 SHAM e MSG OVX comparados aos CTR SHAM e CTR OVX ( $p < 0,0001$ )  
13 respectivamente (Figura 1D).



**Figura 1.** Caracterização da obesidade. Efeitos da administração subcutânea de MSG ou solução salina equimolar no período neonatal em fêmeas adultas. (A) Peso (g), (B) Tecido adiposo retroperitoneal (g), (C) Comprimento nasoanal (cm) e (D) Índice de lee dos grupos: CTR SHAM (controle não ovariectomizado, n= 17), CTR OVX (controle ovariectomizado, n= 19), MSG SHAM (obeso não ovariectomizado, n = 14) e MSG OVX (obesos ovariectomizados, n= 15). Diferença estatística de \* p < 0,05, \*\*p<0,001. Os valores estão expressos em média  $\pm$  SEM. Para todas as comparações da figura foram aplicados ANOVA One-way, seguido do teste comparativo múltiplo de Tukey.

### 5.1.2 Caracterização da ovariectomia

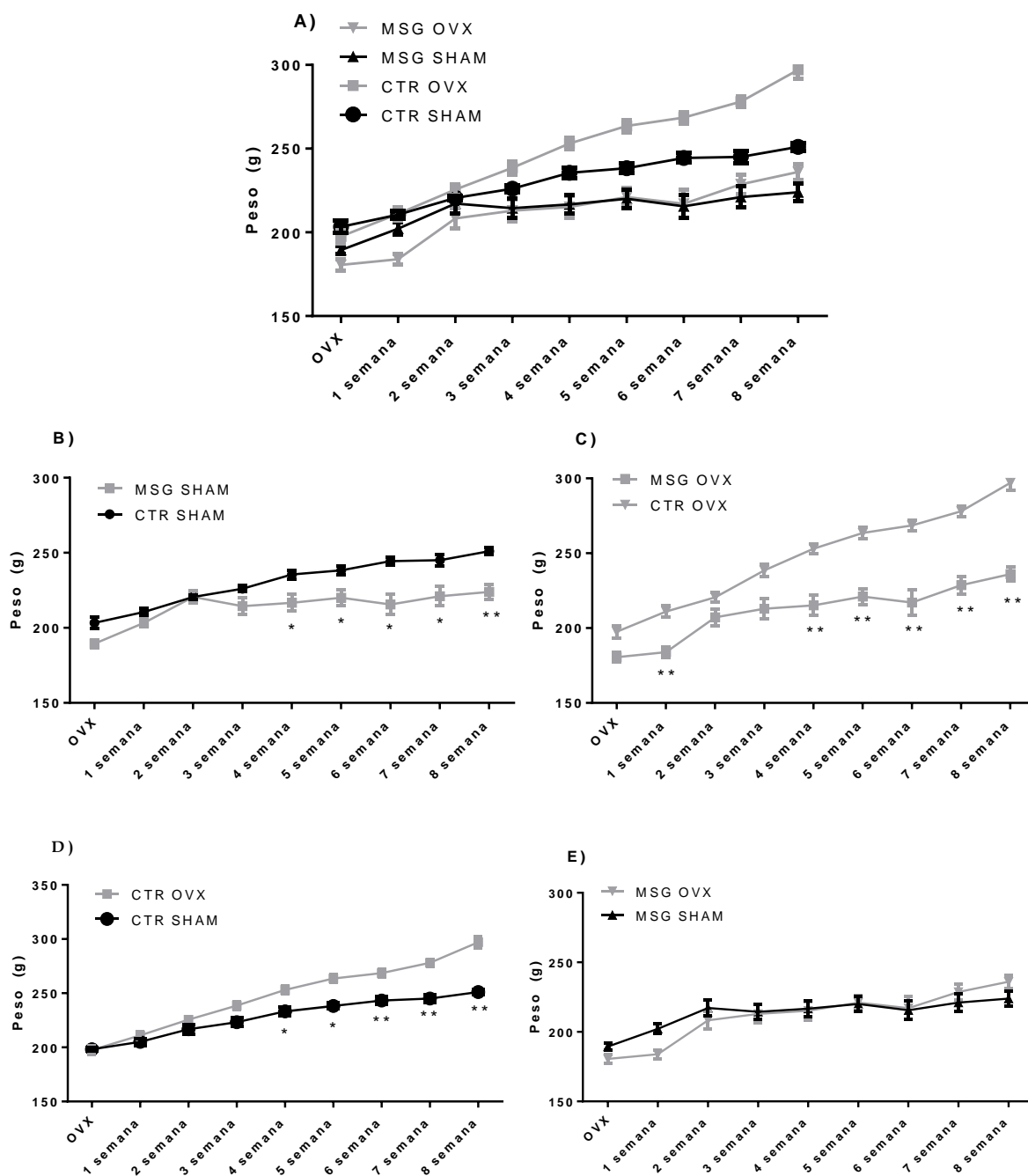
1           A Figura 2A mostra que o peso do útero dos grupos CTR OVX e MSG OVX é  
2 menor comparado aos seus respectivos controles, CTR SHAM e MSG SHAM ( $p < 0,0001$ )  
3 e ainda que as ratas do grupo MSG SHAM apresentaram diminuição do peso uterino  
4 comparado às ratas do grupo CTR SHAM ( $p < 0,0001$ ). A Figura 2B, demonstra que os  
5 grupos MSG SHAM e MSG OVX possuem menor tamanho da tíbia comparado aos grupos  
6 CTR SHAM e CTR OVX ( $p < 0,0001$ ). Os resultados da relação peso útero/tamanho da  
7 tíbia mostram-se menores nos grupos CTR OVX e MSG OVX comparado com CTR  
8 SHAM e MSG SHAM ( $p < 0,0001$ ) respectivamente e maior na relação do grupo MSG  
9 OVX ao grupo CTR OVX ( $p < 0,0001$ ) (Figura 2C).



**Figura 2.** Caracterização da ovariectomia. (A) Peso uterino (g), (B) Comprimento da tibia (cm) e (C) Relação útero / tibia (g/cm) dos grupos: CTR SHAM (controle não ovariectomizado, n= 17), CTR OVX (controle ovariectomizado, n= 19), MSG SHAM (obeso não ovariectomizado, n= 14) e MSG OVX (obesos ovariectomizados, n= 15). Diferença estatística de \*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ . Os valores estão expressos em média  $\pm$  SEM. Para comprimento da tibia e relação útero/tíbia foram aplicados ANOVA One-way, seguido do teste comparativo múltiplo de Tukey. Para o peso uterino foi aplicado Kruskal-Walis, seguido do teste de Dunn's.

### 5.1.3 Acompanhamento do peso corporal semanal

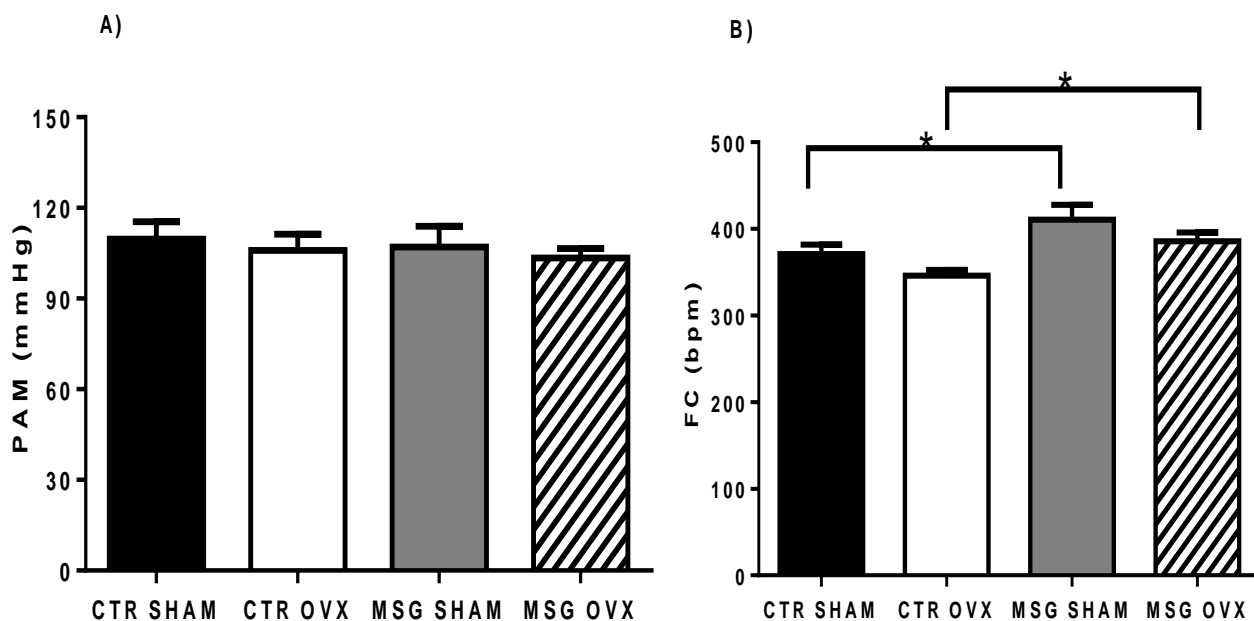
1 Os resultados sobre o acompanhamento do peso das ratas, mostrou que a partir da  
2 quarta semana após a OVX, as ratas do grupo MSG SHAM em relação ao CTR SHAM  
3 tem maior peso ( $p < 0,001$ ) (Figura 3 B). O peso das ratas do grupo MSG OVX é menor  
4 comparado às ratas CTR OVX, na primeira semana após a OVX ( $p < 0,001$ ) e da quarta  
5 semana em diante também é menor ( $p < 0,001$ ) (Figura 3 C). Na Figura 3 D, mostra que o  
6 grupo CTR OVX possui maior peso comparado ao grupo CTR SHAM ( $p < 0,001$ ) a partir  
7 da quarta semana após a OVX. Já a Figura 3 E, demonstra que as ratas MSG com ou sem  
8 os hormônios ovarianos não possuem diferenças diante do peso corporal.



**Figura 3.** Peso corporal semanal. (A) Peso (g) de todos os grupos, (B) Peso (g) dos grupos CTR SHAM e MSG SHAM, (C) Peso dos grupos MSG OVX e CTR OVX, (D) Peso (g) dos grupos CTR OVX e CTR SHAM, (E) Peso (g) dos grupos MSG OVX e MSG SHAM. Grupos: CTR SHAM (controle não ovariectomizado, n=17), CTR OVX (controle ovariectomizado, n= 19), MSG SHAM (obeso não ovariectomizado, n= 14) e MSG OVX (obesos ovariectomizados, n= 15). Diferença estatística de \*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ . Os valores estão expressos em média  $\pm$  SEM. Foram aplicados Two way ANOVA seguido do teste comparativo múltiplo de Tukey.

#### **5.1.4 Parâmetros cardiovasculares: Pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC)**

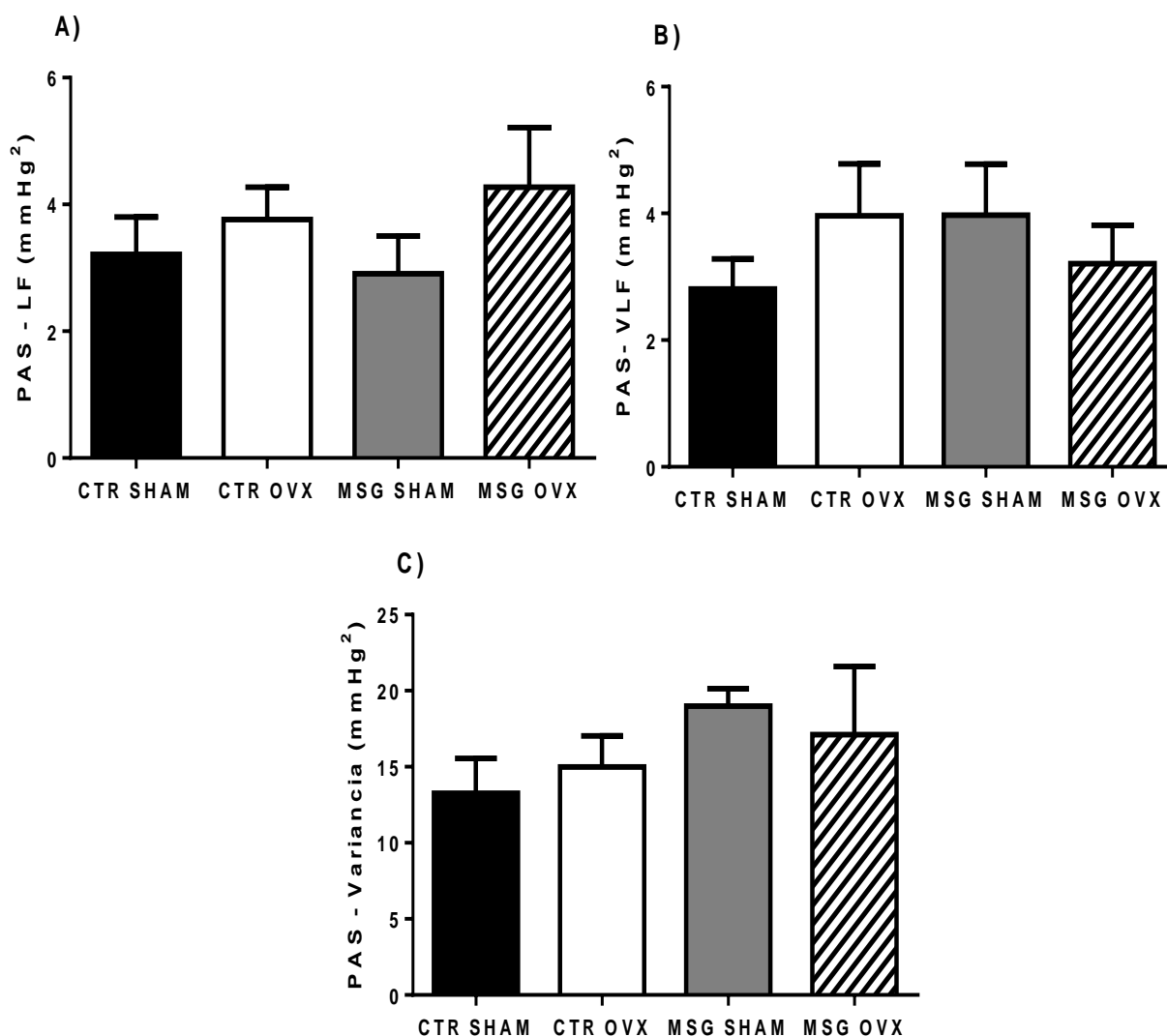
1 Os dados sobre os parâmetros cardiovasculares durante o registro nas ratas  
2 acordadas, realizados no Powerlab, mostram que não houve diferença da PAM entre os  
3 grupos (Figura 4A). Em relação à FC, esta é maior nos grupos MSG SHAM comparado ao  
4 grupo CTR SHAM e MSG OVX em relação ao grupo CTR OVX ( $p < 0,05$ ) (Figura 4B).



**Figura 4.** Parâmetros cardiovasculares. (A) Pressão arterial média (PAM) e (B) Frequência cardíaca (FC) através da cânula anexada à artéria do animal, acoplada a um transdutor de pressão (Powerlab, modelo MLT0380). CTR SHAM (controle não ovariectomizado, n= 8), CTR OVX (controle ovariectomizado, n= 12), MSG SHAM (obeso não ovariectomizado, n= 8) e MSG OVX (obeso ovariectomizado, n= 10). Diferença estatística de \*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ . Os valores estão expressos em média  $\pm$  SEM. Para todas as comparações da figura foram aplicados ANOVA One-way, seguido do teste comparativo múltiplo de Tukey. Para a FC foi aplicado Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn's.

### 5.1.5 Análise da modulação autonômica da pressão arterial sistólica (PAS)

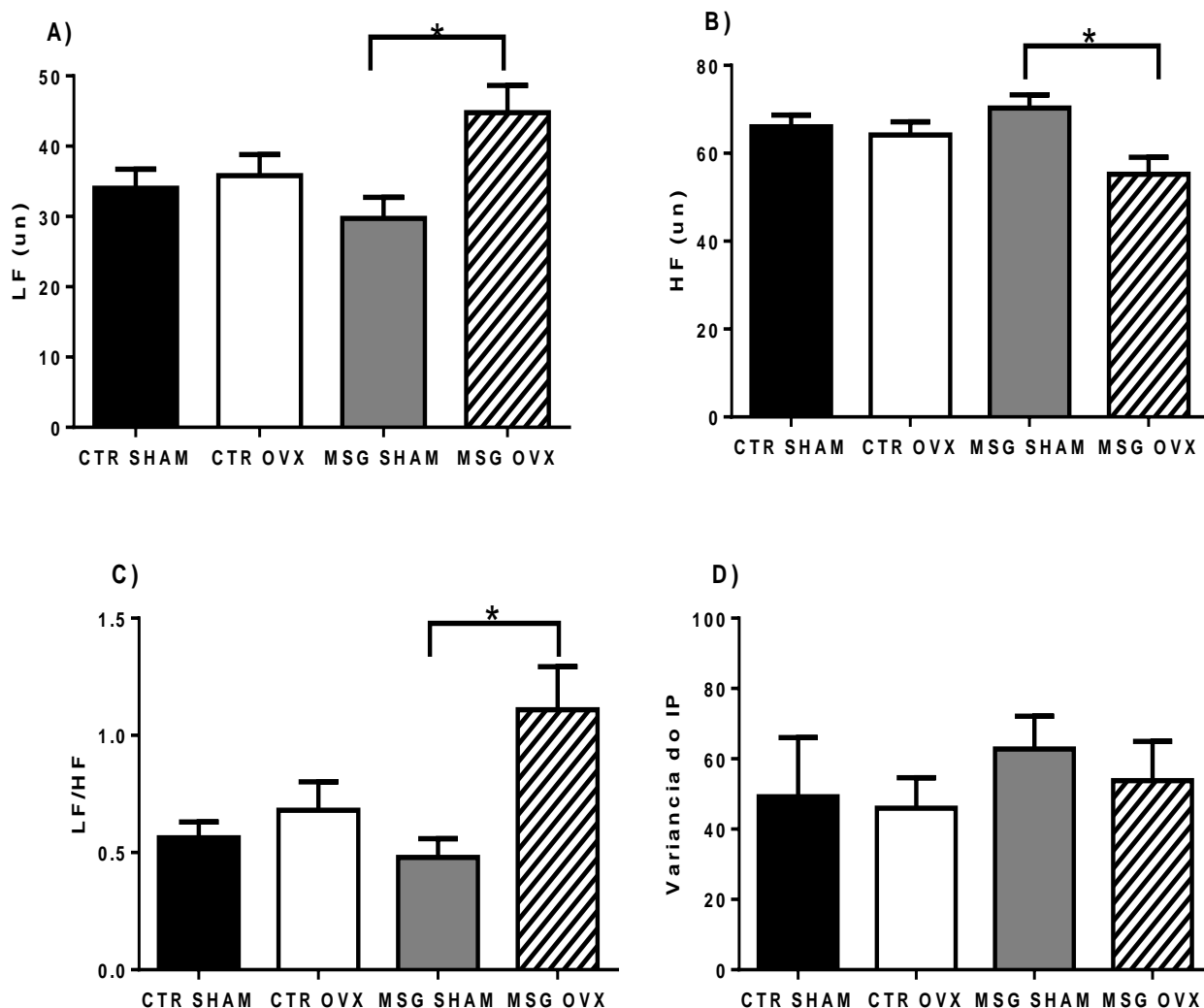
1            Não houve diferença na análise espectral de LFabs e VLFabs da pressão arterial  
2    sistólica (PAS) mostrado na Figura 5A e 5B. A variação na modulação no domínio do  
3    tempo da PAS representado na Figura 5C também não demonstrou diferença estatística  
4    entre os grupos.



**Figura 5.** Análise da modulação autonômica da pressão arterial sistólica (PAS). (A) LF abs, (B) VLF abs e (C) variância. A variabilidade da PAS foi avaliada nos grupos CTR SHAM (controle não ovariectomizado, n= 8), CTR OVX (controle ovariectomizado, n= 12), MSG SHAM (obeso não ovariectomizado, n= 8) e MSG OVX (obeso ovariectomizado, n= 10). Diferença estatística de \*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ . Os valores estão expressos em média  $\pm$  SEM. Para LF foi aplicado o teste ANOVA One-way, seguido do teste comparativo múltiplo de Tukey, para VLF e Variância foi aplicado Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn's.

### 5.1.6 Análise da modulação autonômica do intervalo de pulso (IP)

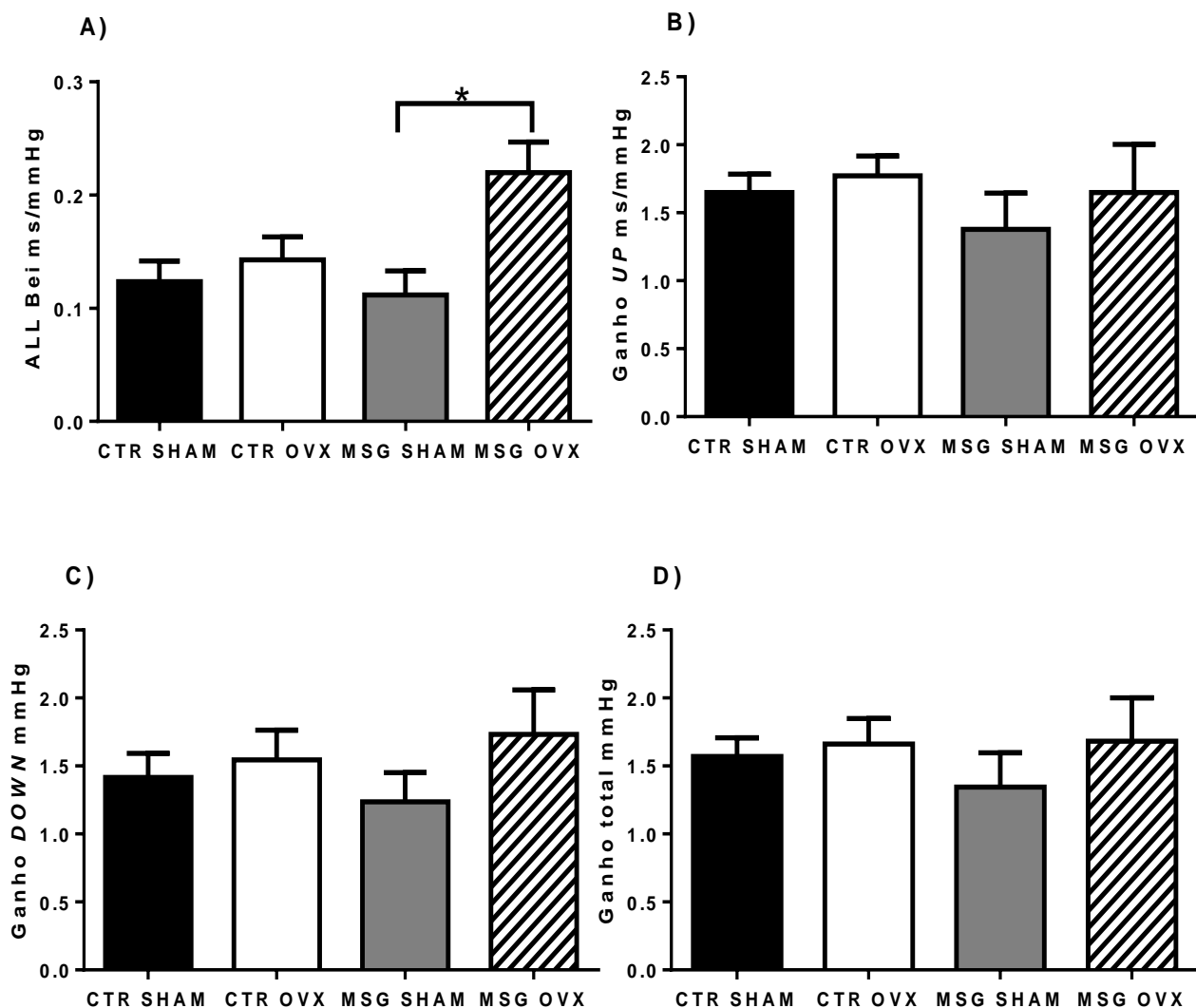
1           No intervalo de pulso no domínio da frequência, houve diferença estatística no  
2   componente LF normalizado entre os grupos MSG OVX comparado com MSG SHAM  
3   ( $p < 0.05$ ) demonstrado na Figura 6A. Já na Figura 6B, é possível verificar que o  
4   componente HF normalizado diminuiu no grupo MSG OVX comparado ao MSG SHAM  
5   ( $p < 0.05$ ). Na Figura 6C está a relação LF/HF, que aumentou no grupo MSG OVX em  
6   relação ao grupo MSG SHAM ( $p < 0.05$ ) e não houve diferença estatística na modulação da  
7   variância no domínio do tempo entre os grupos (Figura 6D).



**Figura 6.** Análise da modulação autonômica do intervalo de pulso (IP). (A) LF unidade de normalidade (un), (B) HF un, (C) LF/HF e (D) Variância do intervalo de pulso. A variabilidade do IP foi avaliada nos grupos CTR SHAM (controle não ovariectomizado, n= 8), CTR OVX (controle ovariectomizado, n= 12), MSG SHAM (obeso não ovariectomizado, n= 8) e MSG OVX (obeso ovariectomizado, n= 10). Diferença estatística de \*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ . Os valores estão expressos em média  $\pm$  SEM. Para todas as comparações da figura foram aplicados o teste ANOVA One-way, seguido do teste comparativo múltiplo de Tukey.

### 5.1.7 Análise do barorreflexo espontâneo

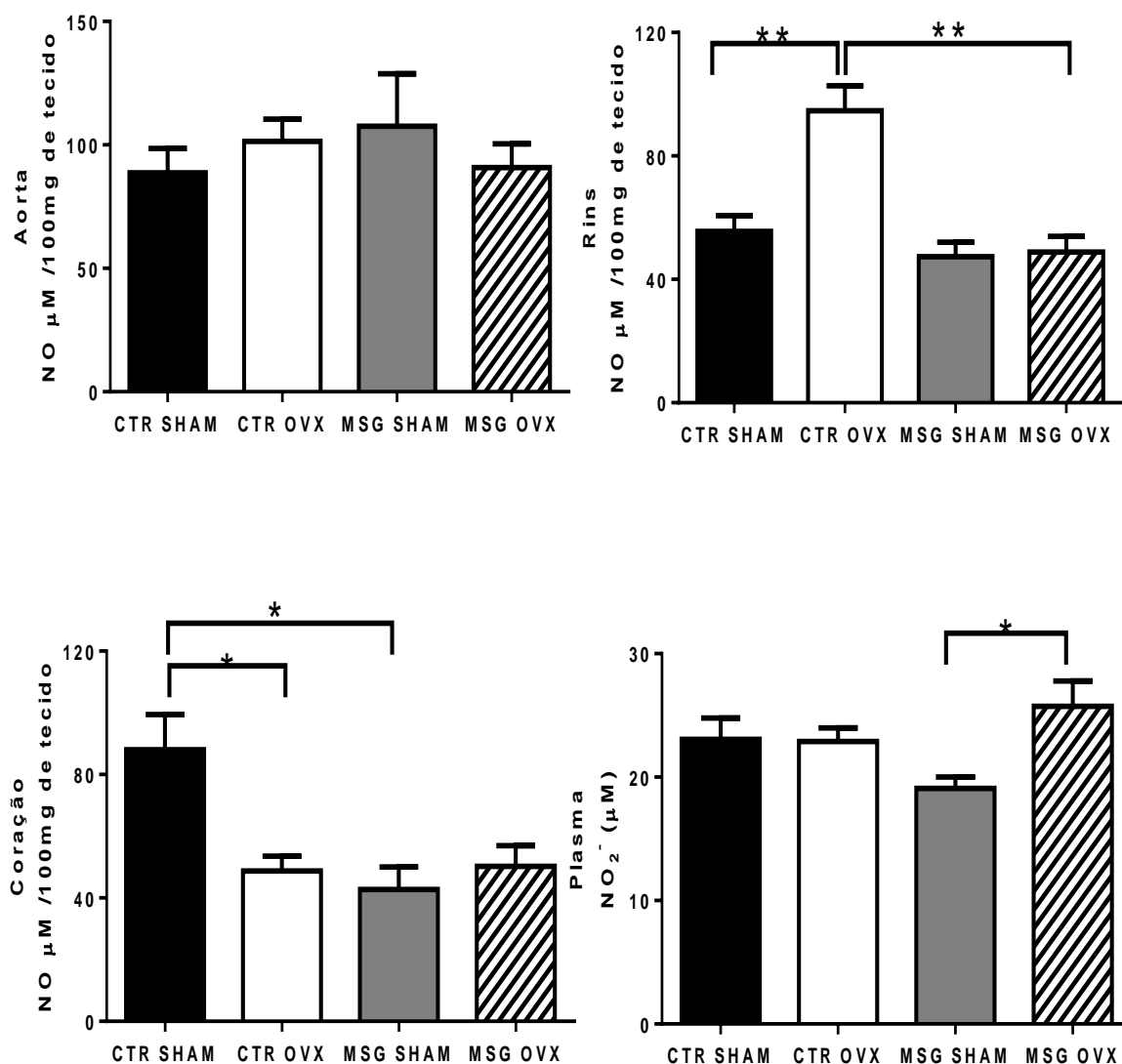
1            Sobre as análises do barorreflexo espontâneo, não houve diferença entre os grupos  
2 nas sequências "up", nas sequências "down" e no ganho total, (Figura 7B,C e D) entre os  
3 grupos, porém no grupo MSG OVX a efetividade do barorreflexo (All Bei) está elevada  
4 comparada com o grupo MSG SHAM ( $p<0.05$ ) (Figura 7A).



**Figura 7.** Análise de barorreflexo espontâneo. (A) Barorreflexo ALL bei, (B) Ganho barorreflexo UP, (C) Ganho Barorreflexo DOWN e (D) Ganho total barorreflexo. Foram analisados nos grupos CTR SHAM (controle não ovariectomizado, n= 8), CTR OVX (controle ovariectomizado, n= 12), MSG SHAM (obeso não ovariectomizado, n= 8) e MSG OVX (obeso ovariectomizado, n= 10). Diferença estatística de \*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ . Os valores estão expressos em média  $\pm$  SEM. Para todas as comparações da figura foram aplicados o teste ANOVA One-way, seguido do teste comparativo múltiplo de Tukey.

### 5.1.8 Concentração de óxido nítrico (NO) da aorta, rins, coração e plasma

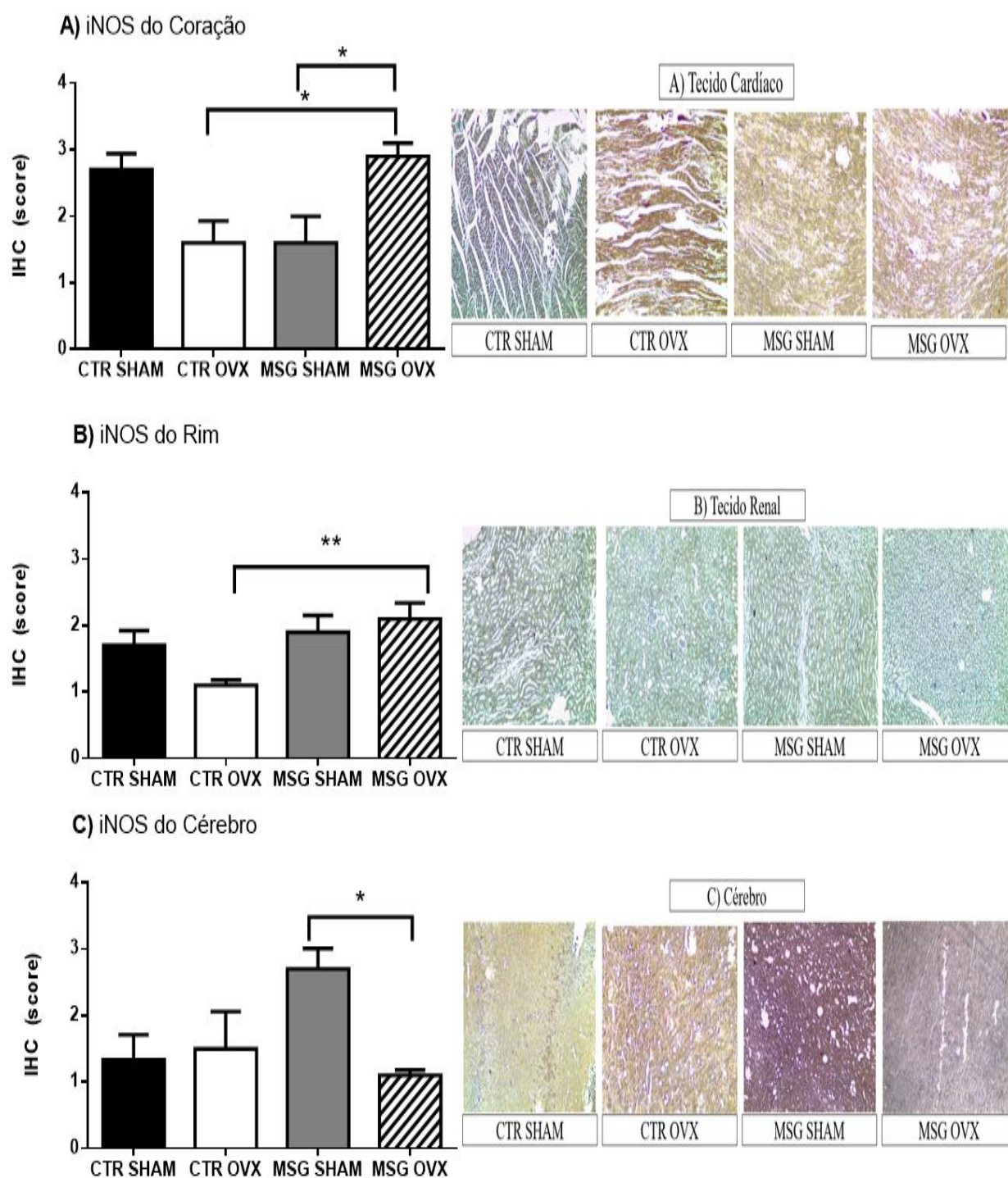
1           As concentrações de óxido nítrico, na aorta, rins, coração e plasma, estão  
2 representados na Figura 8. Na aorta (Figura 8A) não houve diferença estatística na  
3 concentração de nitrito entre os grupos, já nos rins, aumentou no grupo CTR OVX  
4 comparado com seu controle CTR SHAM ( $p < 0,0001$ ) e diminuiu quando a comparação é  
5 entre o grupo MSG OVX e o grupo CTR OVX ( $p < 0,0001$ ) representado na Figura 8B. No  
6 coração diminuiu a concentração de NO no grupo MSG SHAM e CTR OVX comparados  
7 ao grupo CTR SHAM ( $p < 0.05$ ) observado na Figura 8C. No plasma (Figura 8D) observa-  
8 se que está elevado no grupo MSG OVX comparado ao grupo MSG SHAM ( $p < 0.05$ ).



**Figura 8.** Concentração de óxido nítrico (NO) da (A) Aorta, (B) Rins, (C) Coração e (D) Plasma dos grupos. A concentração de NO foi estimada pela medição dos níveis de nitrito ( $\mu\text{M}$ ) corrigido pela concentração do homogenato. As análises foram realizadas nos grupos, CTR SHAM (controle não ovariectomizado,  $n=17$ ), CTR OVX (controle ovariectomizado,  $n=19$ ), MSG SHAM (obeso não ovariectomizado,  $n=14$ ) e MSG OVX (obeso ovariectomizado,  $n=15$ ). Diferença estatística de \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,001$ . Para as comparações entre os grupos para os tecidos, aorta, rins e plasma, foram aplicados o teste ANOVA One-way, seguido do teste comparativo múltiplo de Tukey. Para as comparações entre os grupos do tecido cardíaco foi aplicado Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn's.

### 5.1.9 Imunohistoquímica (IHC) e score da IHC para iNOS nos tecidos cardíaco, rins e cérebro

1           A Figura 9A, mostra que a expressão da enzima iNOS no tecido cardíaco, é elevado  
2 no grupo MSG OVX comparado ao CTR OVX e ao MSG SHAM ( $p < 0,05$ ). Já na Figura  
3 9B, é possível observar que a iNOS está elevado no grupo MSG OVX em relação ao grupo  
4 CTR OVX ( $p < 0,001$ ). No cérebro a expressão da iNOS no grupo MSG OVX comparado  
5 ao MSG SHAM é menor ( $p < 0,05$ ) (Figura 9C).

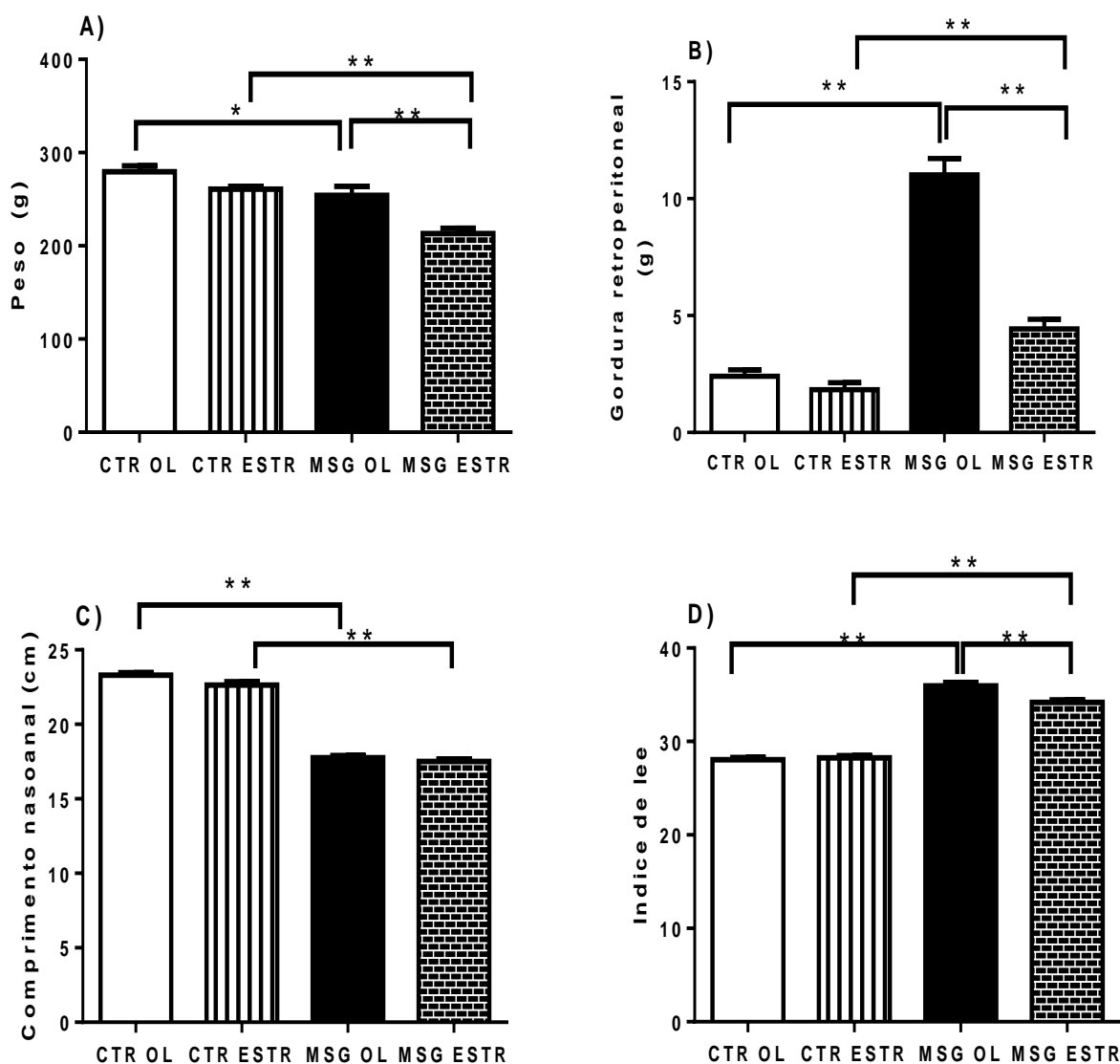


**Figura 9.** Imunohistoquímica (IHC) da expressão de iNOS no tecido cardíaco (A), nos rins (B) e cérebro (C). Os painéis da esquerda mostram os dados quantitativos da expressão de iNOS (score) e os painéis da direita mostram os dados qualitativos (com aumento de 100x) da expressão de iNOS dos grupos: CTR SHAM (controle não ovariectomizado, n = 10), CTR OVX (controle ovariectomizado, n = 10), MSG SHAM (obeso não ovariectomizado, n = 10) e MSG OVX (obesos ovariectomizados, n = 10). Diferença estatística de \*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ . Para todas as comparações da figura foram aplicados o teste ANOVA One-way, seguido do teste comparativo múltiplo de Tukey.

## 5.2 Efeitos de oito semanas de tratamento com estradiol nos parâmetros cardiovasculares, autonômicos e produção de NO em ratas ovariectomizadas obesas

### 5.2.1 Caracterização da obesidade MSG e efeito da administração do estradiol

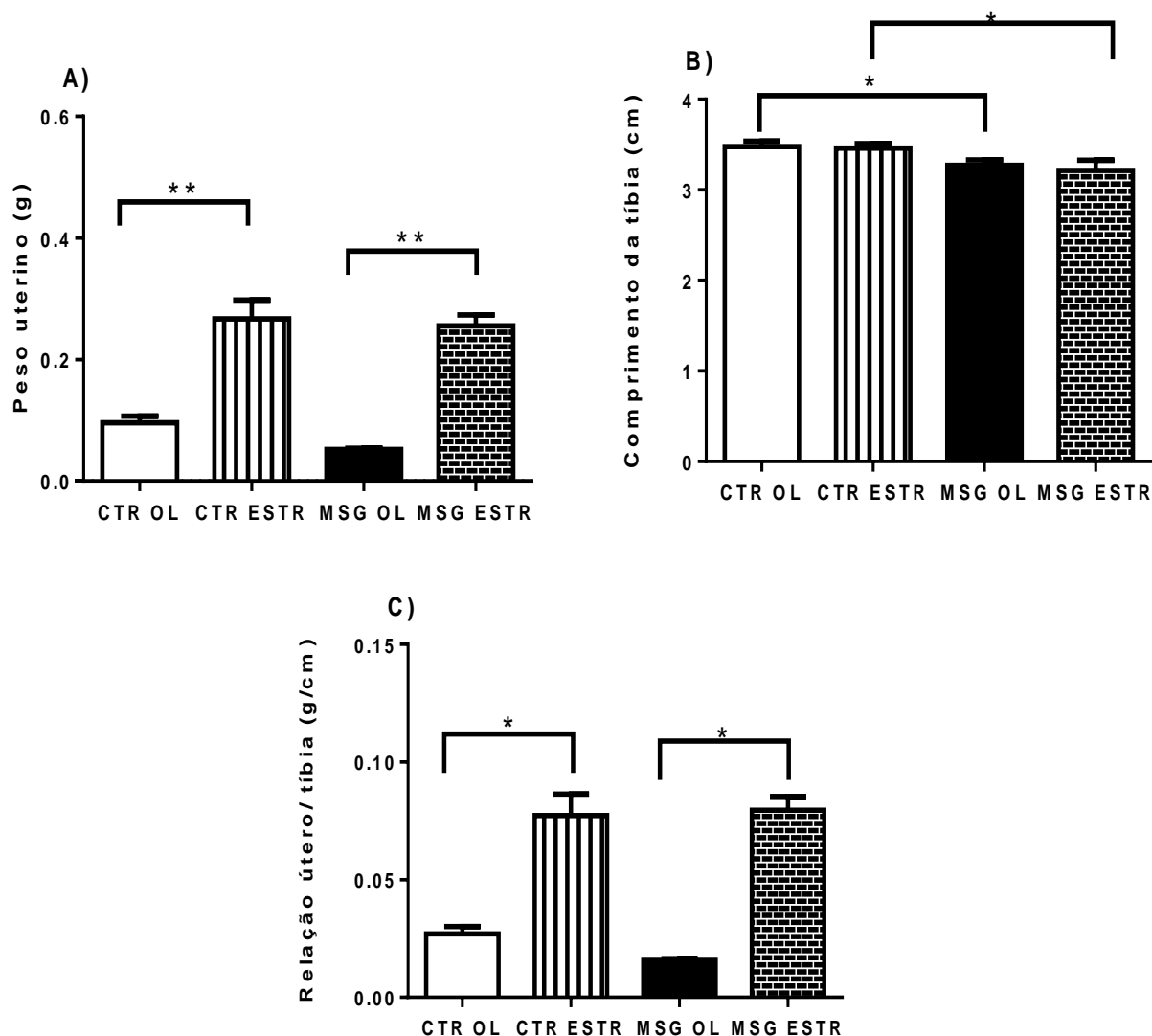
1           Após cento e trinta dias do tratamento neonatal com glutamato monossódico  
2 (MSG) e dentro deste período com oito semanas de tratamento com estradiol e ou óleo de  
3 amêndoas em ratas Wistar fêmeas, o ganho de peso corporal do grupo MSG OL  
4 comparado ao CTR OL foi menor ( $p < 0,05$ ) e no MSG ESTR foi menor do que os grupos  
5 CTR ESTR e MSG OL ( $p < 0,001$ ) (Figura 10A). Contudo houve aumento do peso da  
6 gordura retroperitoneal (Figura 10B), nos animais do grupo MSG OL em relação aos  
7 animais do grupo CTR OL e MSG ESTR ( $p < 0,001$ ) sendo que os animais do grupo MSG  
8 ESTR apresentaram valor significativo menor de peso da tecido adiposo retroperitoneal em  
9 comparação com o grupo MSG OL. Sobre o comprimento nasoanal, representadona Figura  
10 10C, os grupos de animais obesos tanto tratados com óleo quanto com estradiol (MSG OL  
11 e MSG ESTR) apresentaram menor comprimento em relação aos seus grupos controles  
12 (CTR OL e CTR ESTR) respectivamente ( $p < 0,001$ ). Houve um aumento no cálculo do  
13 índice de Lee nos animais MSGs (MSG OL e MSG ESTR) em relação aos seus controles  
14 (CTR OL e CTR ESTR) ( $p < 0,001$ ) respectivamente e uma diminuição deste cálculo no  
15 grupo obeso tratado com estradiol (MSG ESTR) comparado ao grupo MSG OL ( $p < 0,001$ )  
16 (Figura 10D).



**Figura 10.** Efeitos da administração subcutânea de MSG ou solução salina equimolar no período neonatal em fêmeas adultas ovariectomizadas e tratadas com estradiol. (A) Peso (g), (B) Tecido adiposo retroperitoneal (g), (C) Comprimento nasoanal (cm) e (D) Índice de lee dos grupos: CTR OL (controle ovariectomizado tratado com óleo, n= 17), CTR ESTR (controle ovariectomizado tratado com estradiol, n= 13), MSG OL (obeso ovariectomizado tratado com óleo, n = 13) e MSG ESTR (obeso ovariectomizado tratado com estradiol, n= 13). Diferença estatística de \* p < 0,05, \*\*p<0,001. Os valores estão expressos em média  $\pm$  SEM. Para o peso, tecido adiposo e comprimento nasoanal foram aplicados Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn's. Para o índice de Lee foi aplicado ANOVA One-way, seguido do teste comparativo múltiplo de Tukey.

### 5.2.2 Caracterização da ovariectomia e análise do tratamento com estradiol sobre ratas MSG ovariectomizadas

1            Para a caracterização da ovariectomia e análise do tratamento com estradiol foram  
2 realizados o peso uterino, o comprimento da tíbia e a relação do peso do útero com o  
3 comprimento da tíbia demonstrado na Figura 11. O peso uterino das ratas controle tratadas  
4 com estradiol tanto grupo controle (CTR ESTR) quanto obesas (MSG) comparados aos  
5 grupos controles CTR OL e MSG OL foi maior ( $p < 0,001$ ) (Figura 11A). O comprimento  
6 da tíbia das ratas pertencentes aos grupos MSG OL e MSG ESTR comparados com os  
7 grupos CTR OL e CTR ESTR respectivamente foram menores ( $p < 0,05$ ) (Figura 11B). Já a  
8 relação útero/tíbia (g/cm) foi maior nos grupos tratados com estradiol, CTR ESTR e MSG  
9 ESTR em relação aos grupos CTR OL e MSG OL respectivamente ( $p < 0,05$ ), demonstrado  
10 na Figura 11C.

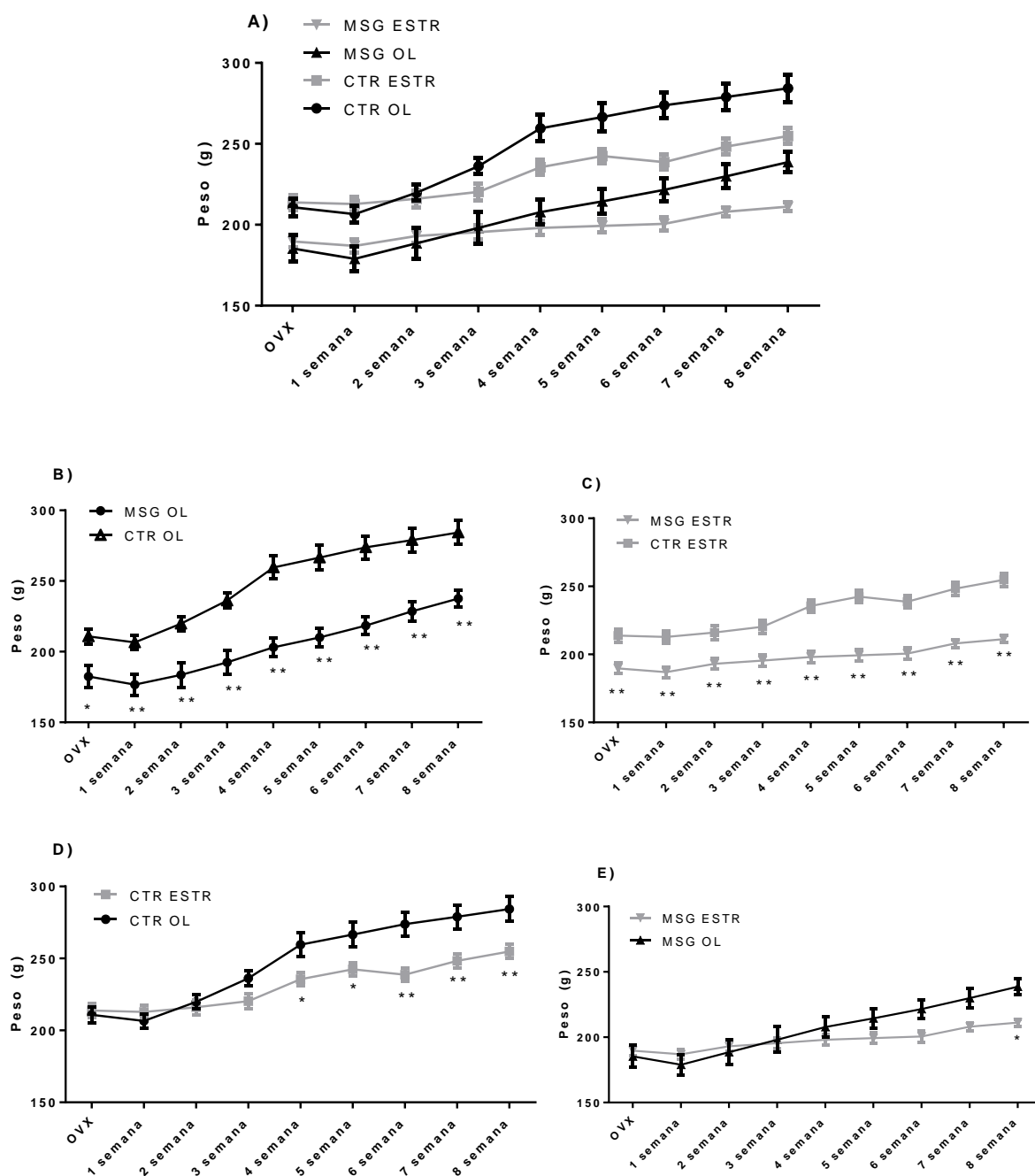


**Figura 11.** Caracterização da ovariectomia e análise do tratamento com estradiol sobre ratas MSG ovariectomizadas. (A) Peso uterino (g), (B) Comprimento da tíbia (cm) e (C) Relação útero / tíbia (g/cm) dos grupos: CTR OL (controle ovariectomizado tratado com óleo, n= 17), CTR ESTR (controle ovariectomizado tratado com estradiol, n= 13), MSG OL (obeso ovariectomizado tratado com óleo, n = 13) e MSG ESTR (obeso ovariectomizado tratado com estradiol, n= 13). Diferença estatística de \* p < 0,05, \*\*p<0,001. Os valores estão expressos em média  $\pm$  SEM. Para todas as comparações foram aplicados Kruskal-Walis, seguido do teste de Dunn's.

### 5.2.3 Acompanhamento do peso corporal semanal

1 Os resultados sobre os pesos dos animais tratados com estradiol e óleo de  
2 amêndoas, representado na Figura 12, mostra que os animais MSG OL e MSG ESTR  
3 possuem menor peso desde a OVX comparados aos animais CTR OL e CTR ESTR (Figura  
4 12 B e C). Na Figura 12 D é possível identificar que os animais CTR ESTR possuem  
5 menor peso significativo ( $p < 0,001$ ), comparado ao grupo CTR OL a partir da quarta  
6 semana após a OVX e a Figura 12 E mostra que apenas na oitava e última semana que o  
7 peso do grupo MSG ESTR em relação ao grupo MSG OL é menor ( $p < 0,05$ ).

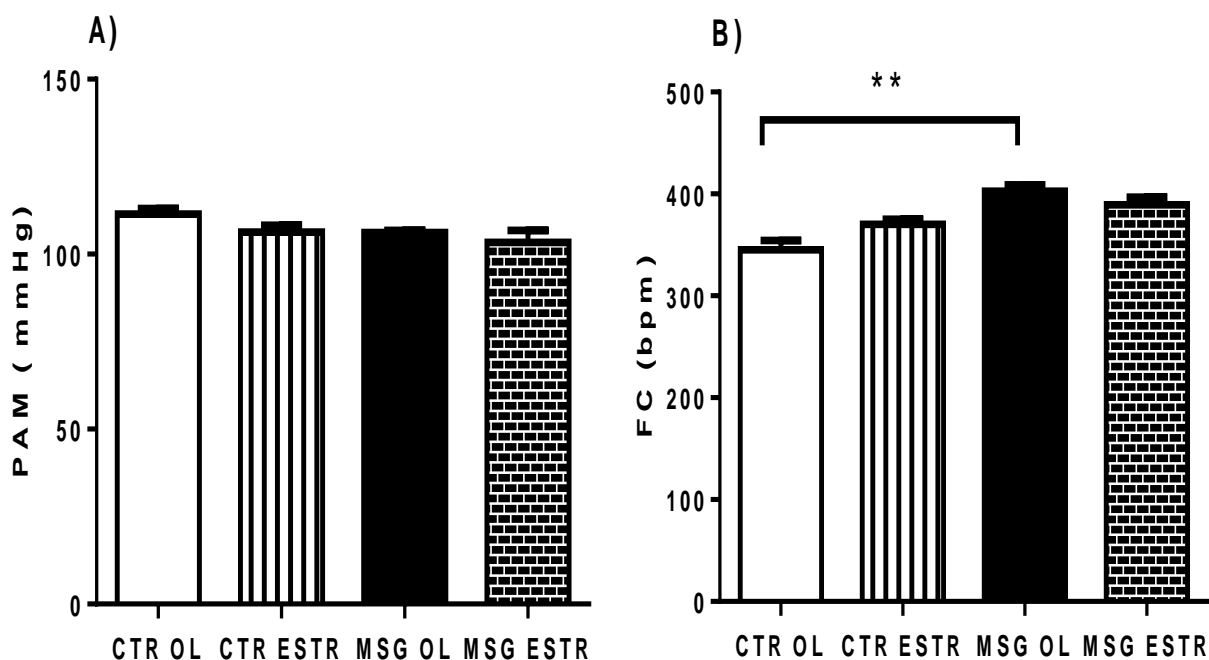
8



**Figura 12.** Peso corporal semanal. (A) Peso (g) de todos os grupos, (B) Peso (g) dos grupos CTR OL e MSG OL, (C) Peso dos grupos MSG ESTR e CTR ESTR, (D) Peso (g) dos grupos CTR OL e CTR ESTR, (E) Peso (g) dos grupos MSG OL e MSG ESTR. Grupos: CTR OL (controle ovariectomizado tratado com óleo, n= 17), CTR ESTR (controle ovariectomizado tratado com estradiol, n= 13), MSG OL (obeso ovariectomizado tratado com óleo, n = 13) e MSG ESTR (obeso ovariectomizado tratado com estradiol, n= 13). Diferença estatística de \* p < 0,05, \*\*p<0,001. Os valores estão expressos em média  $\pm$  SEM. Foram aplicados Two way ANOVA seguido do teste comparativo múltiplo de Tukey.

#### 5.2.4 Parâmetros cardiovasculares

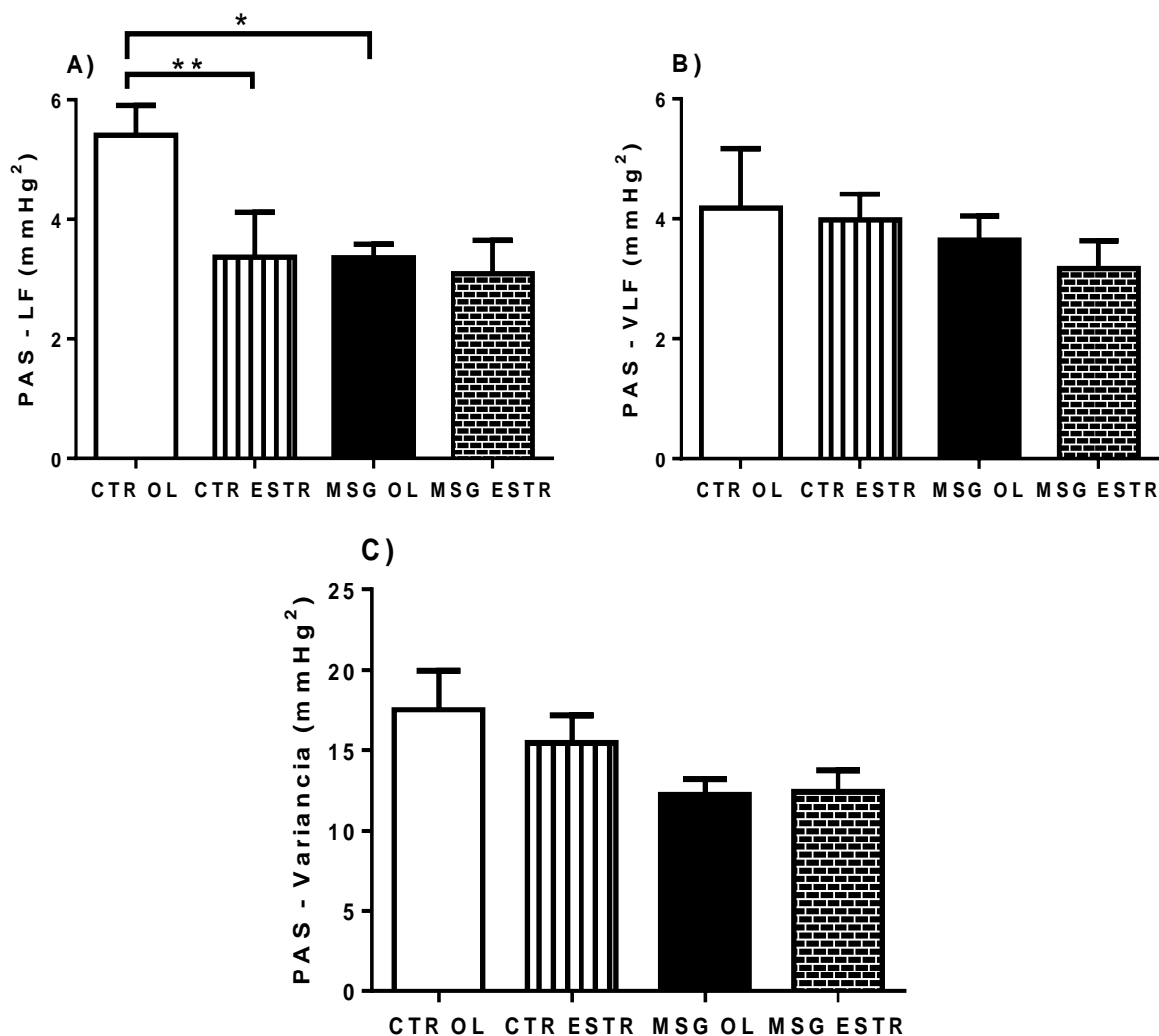
1           A Figura 13 apresenta os resultados dos parâmetros cardiovasculares. Não houve  
2   diferença da pressão arterial média (PAM) entre os grupos, demonstrado na Figura 13A. Já  
3   na frequência cardíaca (FC), houve aumento no grupo MSG OL comparado ao grupo CTR  
4   OL ( $p < 0,001$ ) demonstrado na Figura 13B.



**Figura 13.** Parâmetros cardiovasculares de ratas MSG ovariectomizadas tratadas com estradiol. (A) Pressão arterial média (PAM) e (B) Frequência cardíaca (FC) através da cânula anexada à artéria do animal, acoplada a um transdutor de pressão (Powerlab, modelo MLT0380). CTR OL (controle ovariectomizado tratado com óleo,  $n = 12$ ), CTR ESTR (controle ovariectomizado tratado com estradiol,  $n = 12$ ), MSG OL (obeso ovariectomizado tratado com óleo,  $n = 12$ ) e MSG ESTR (obesos ovariectomizados tratado com estradiol,  $n = 9$ ). Diferença estatística de \*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ . Os valores estão expressos em média  $\pm$  SEM. Para todas as comparações da figura foram aplicados ANOVA One-way, seguido do teste comparativo múltiplo de Tukey. Para a FC foi aplicado Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn's.

### 5.2.5 Análise da modulação autonômica da pressão arterial sistólica (PAS)

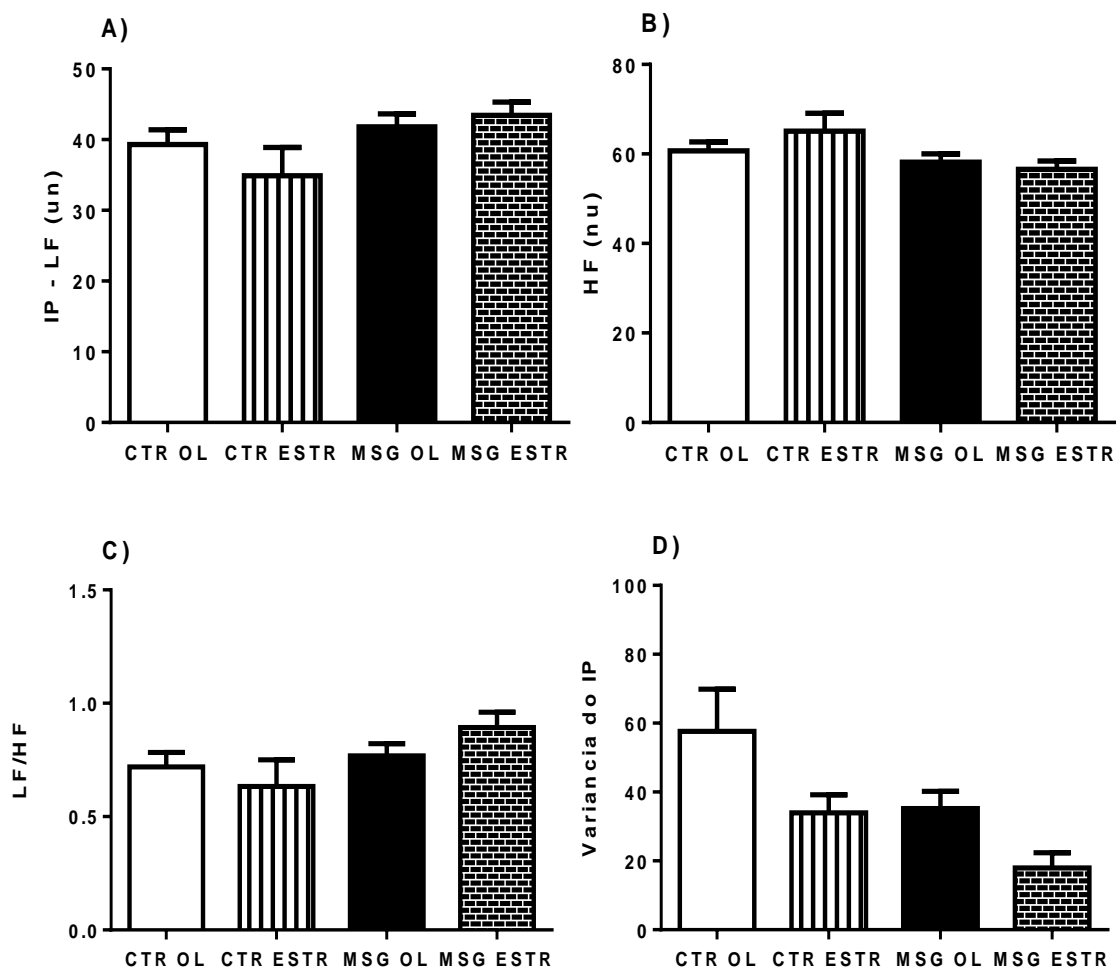
1 Os resultados das análises da modulação autonômica da pressão arterial sistólica  
2 (PAS) está representado na Figura 14. Pode-se observar que há um aumento da banda LF  
3 (Figura 14A) no grupo CTR OL em relação aos grupos CTR ESTR ( $p < 0,001$ ) e MSG OL  
4 ( $p < 0,05$ ). Já nas na banda VLF (Figura 14B) e variância (Figura 14C) não houve diferença  
5 entre os grupos.



**Figura 14.** Análise da modulação autonômica da pressão arterial sistólica (PAS) de ratas com obesidade MSG tratadas com estradiol. (A) LF abs, (B) VLF abs e (C) variância. A variabilidade da PAS foi avaliada nos grupos CTR OL (controle ovariectomizado tratado com óleo, n= 12), CTR ESTR (controle ovariectomizado tratado com estradiol, n= 9), MSG OL (obeso ovariectomizado tratado com óleo, n = 9) e MSG ESTR (obeso ovariectomizado tratado com estradiol, n= 11). Diferença estatística de \* p < 0,05, \*\*p<0,001. Os valores estão expressos em média  $\pm$  SEM. Para todas as comparações da figura foram aplicados Kruskal-Walis, seguido do teste de Dunn's.

### 5.2.6 Análise da modulação autonômica do intervalo de pulso (IP)

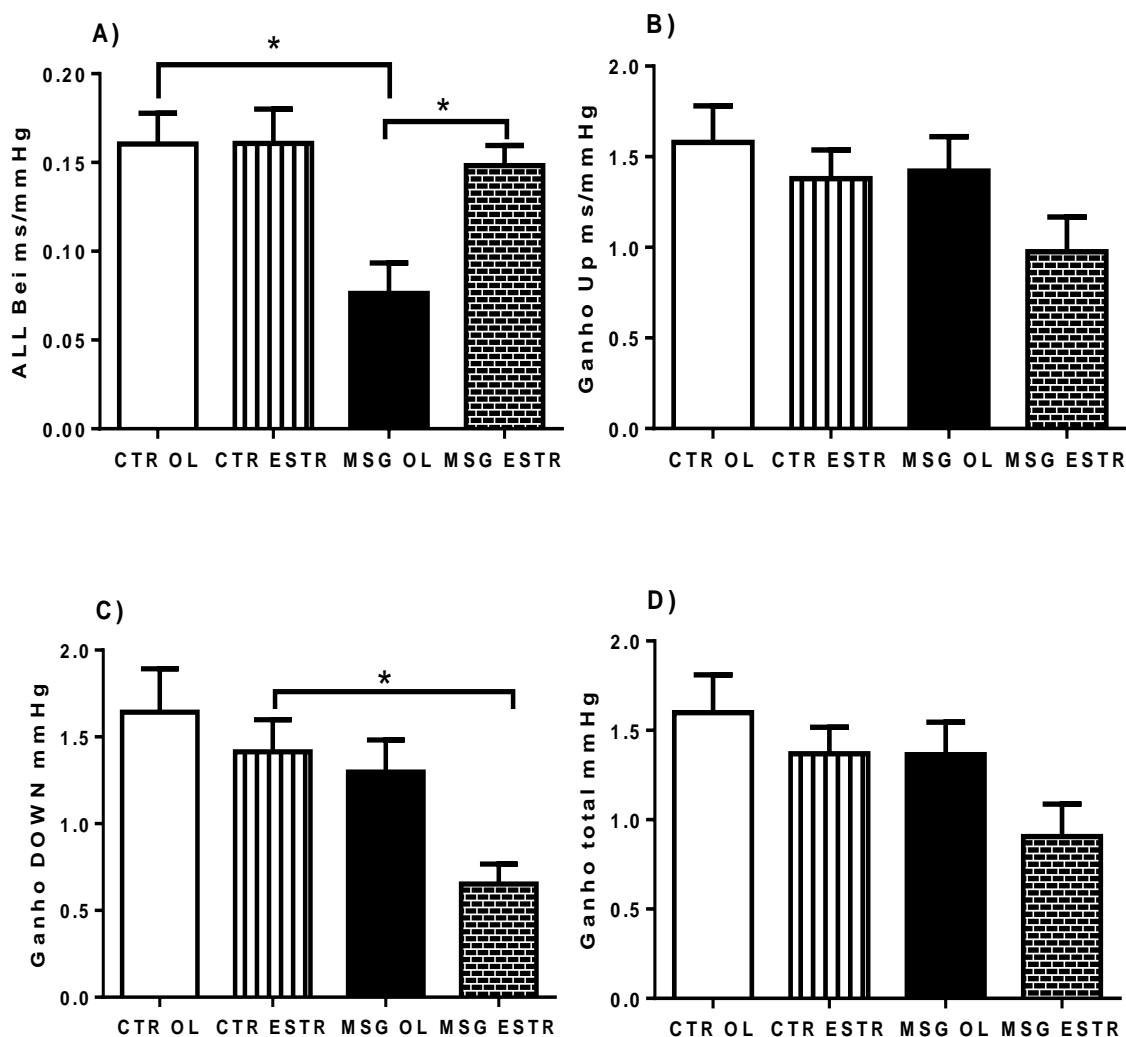
- 1           A Figura 15 mostra que na análise da modulação autonômica do IP, não houve
- 2   diferença entre os grupos analisados, nas bandas, LF, HF, na relação LF/HF e variância do
- 3   IP (Figuras 15A, B, C e D respectivamente).



**Figura 15.** Análise da modulação autonômica do intervalo de pulso (IP) de ratas com obesidade MSG tratadas com estradiol. (A) LF unidade de normalidade (un), (B) HF un, (C) LF/HF e (D) Variância do intervalo de pulso. A variabilidade do IP foi avaliada nos grupos CTR OL (controle ovariectomizado tratado com óleo, n= 12), CTR ESTR (controle ovariectomizado tratado com estradiol, n= 9), MSG OL (obeso ovariectomizado tratado com óleo, n = 9) e MSG ESTR (obesos ovariectomizados tratado com estradiol, n= 11). Diferença estatística de \*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ . Os valores estão expressos em média  $\pm$  SEM. Para todas as comparações da figura foram aplicados Kruskal-Walis, seguido do teste de Dunn's.

### 5.2.7 Análise de barorreflexo espontâneo

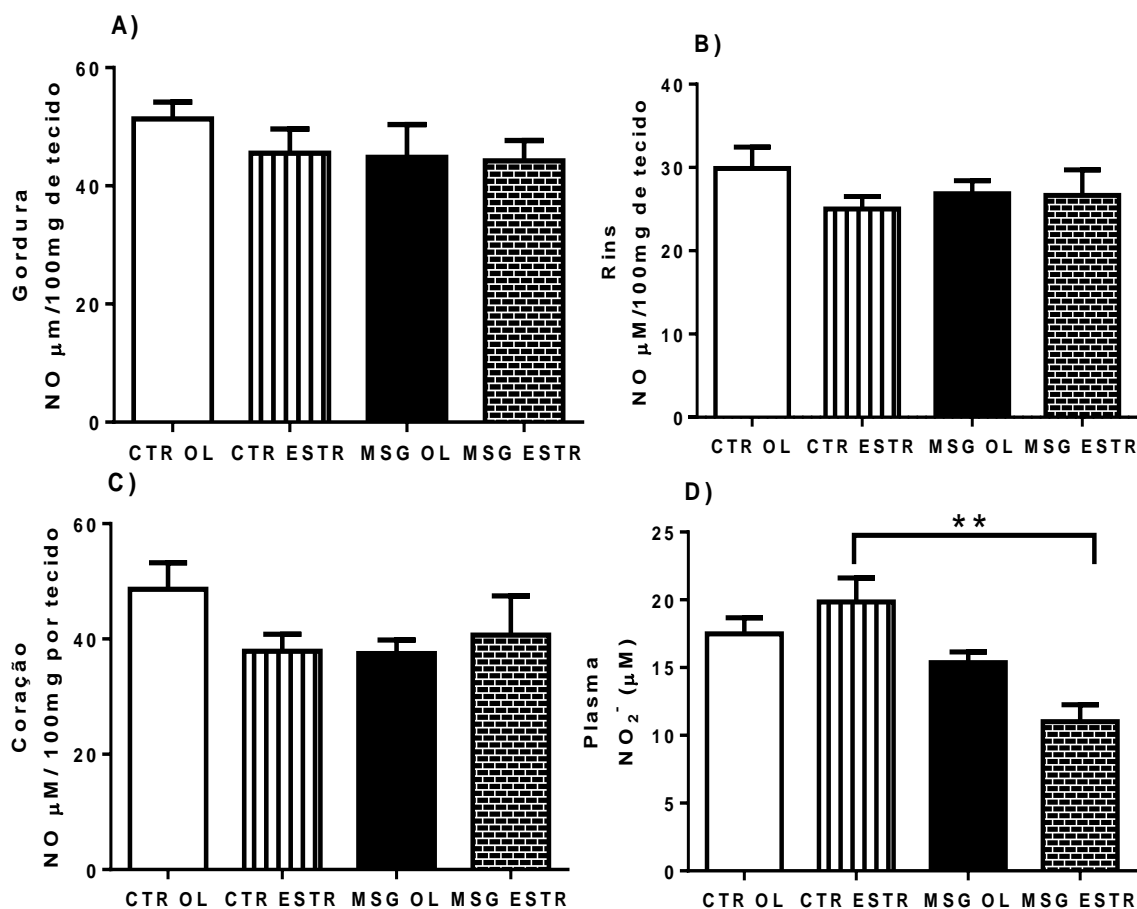
1           Pode-se identificar na Figura 16, que a efetividade do barorreflexo (ALL Bei) foi  
2 menor no grupo MSG OL em relação ao CTR OL ( $p < 0,05$ ) (Figura 16A) e o ganho *down*  
3 (Figura 16C) foi menor no grupo MSG ESTR comparado ao CTR ESTR ( $p < 0,05$ ). No  
4 ganho *UP* e total não houve diferença entre os grupos (Figura 16B e D respectivamente).



**Figura 16.** Análise de barorreflexo espontâneo de ratas com obesidade MSG tratadas com estradiol. (A) Barorreflexo ALL bei, (B) Ganho barorreflexo UP, (C) Ganho Barorreflexo DOWN e (D) Ganho total barorreflexo. Foram analisados nos grupos CTR OL (controle ovariectomizado tratado com óleo, n= 12), CTR ESTR (controle ovariectomizado tratado com estradiol, n= 9), MSG OL (obeso ovariectomizado tratado com óleo, n = 9) e MSG ESTR (obesos ovariectomizados tratado com estradiol, n= 11). Diferença estatística de \* p <0,05, \*\*p<0,001. Os valores estão expressos em média  $\pm$  SEM. Para todas as comparações da figura foram aplicados Kruskal-Walis, seguido do teste de Dunn's.

### 5.2.8 Concentração de nitrito (NO)

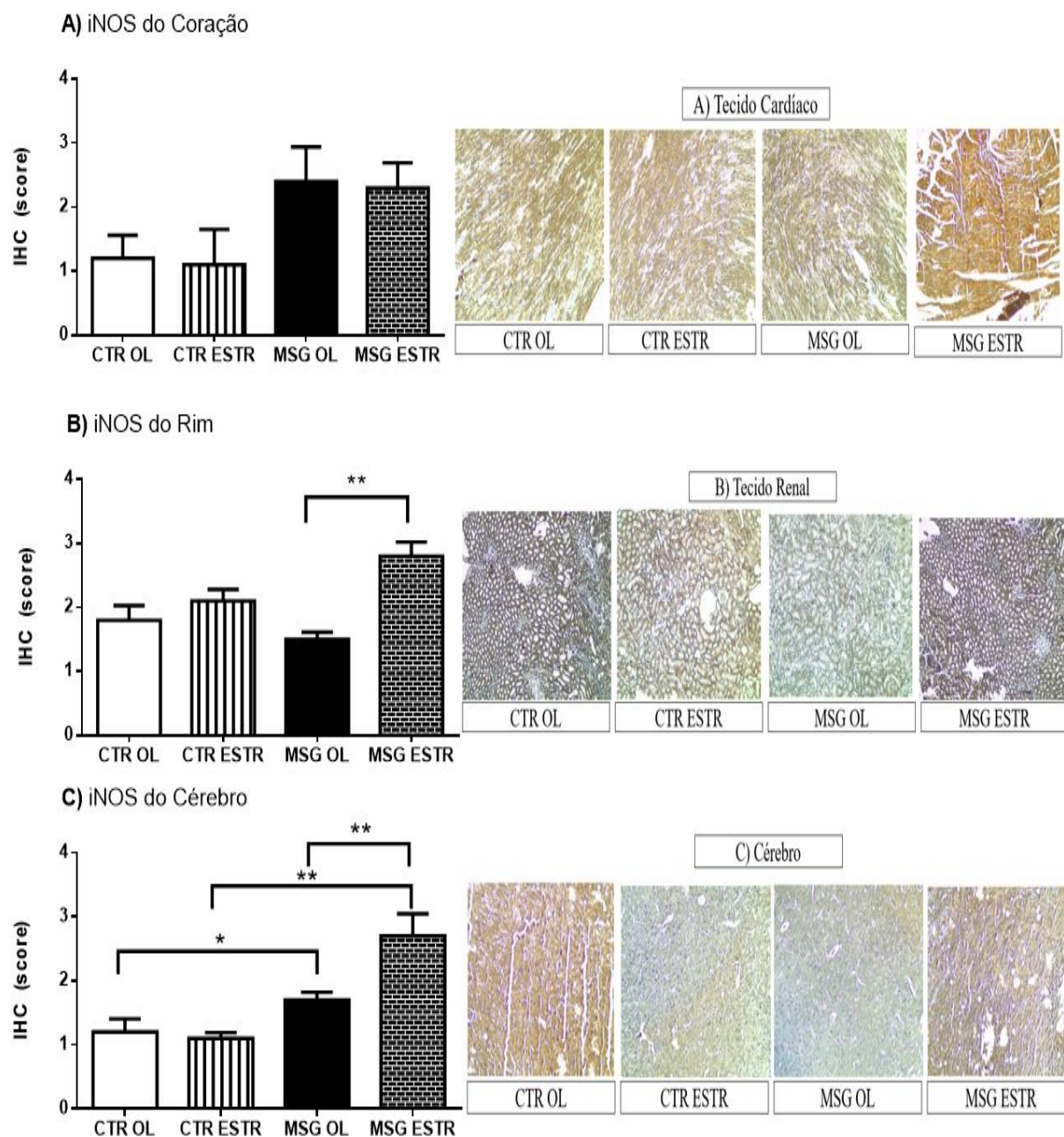
1           A concentração de NO nos tecidos, do tecido adiposo, coração e rins não foi  
2 diferente entre os grupos (Figura 17A, B e C). Já a concentração de NO plasmático,  
3 demonstrado na Figura 17D, no grupo MSG ESTR está maior que o grupo CTR ESTR  
4 (p<0,001).  
5



**Figura 17.** Concentração de óxido nítrico (NO) da (A) Aorta, (B) Rins, (C) Coração e (D) Plasma dos grupos de ratas com obesidade MSG tratadas com estradiol. A concentração de NO foi estimada pela medição dos níveis de nitrito ( $\mu\text{M}$ ) corrigido pela concentração do homogenato. As análises foram realizadas nos grupos: CTR OL (controle ovariectomizado tratado com óleo,  $n = 12$ ), CTR ESTR (controle ovariectomizado tratado com estradiol,  $n = 12$ ), MSG OL (obeso ovariectomizado tratado com óleo,  $n = 12$ ) e MSG ESTR (obesos ovariectomizados tratado com estradiol,  $n = 12$ ). Diferença estatística de \*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ . Os valores estão expressos em média  $\pm$  SEM. Para todas as comparações entre os grupos para os tecidos, tecido adiposo, rins e coração da figura foram aplicados Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn's. Para as comparações entre os grupos para o plasma, foi aplicado o teste ANOVA One-way, seguido do teste comparativo múltiplo de Tukey

### **5.2.9 Imunohistoquímica (IHC) e score da IHC para iNOS nos tecidos cardíaco, rins e cérebro**

1           No coração a expressão de iNOS não tem diferença estatística entre os grupos  
2 (Figura 18A). No rim o grupo MSG ESTR demonstra maior expressão de iNOS no grupo  
3 MSG ESTR em relação ao grupo MSG OL (  $p < 0,001$ ) (Figura 18B). No cérebro a  
4 expressão de iNOS está elevada nos grupos MSG OL e MSG ESTR, comparados aos seus  
5 controles, CTR OL ( $p < 0,05$ ) e MSG OL ( $p < 0,001$ ), respectivamente e ainda é maior a  
6 expressão da enzima iNOS no grupo MSG ESTR comparado ao grupo MSG OL ( $p < 0,001$ )  
7 (Figura 18C).



**Figura 18.** Imunohistoquímica (IHC) da expressão de iNOS no tecido cardíaco (A), nos rins (B) e cérebro (C) de ratas ovariectomizadas tratadas com óleo de amêndoas e ou estradiol. Os painéis da esquerda mostram os dados quantitativos da expressão de iNOS (score) e os painéis da direita mostram os dados qualitativos (aumento de 100x) da expressão de iNOS dos grupos: CTR OL (controle ovariectomizado tratado com óleo, n= 10), CTR ESTR (controle ovariectomizado tratado com estradiol, n= 10), MSG OL (obeso ovariectomizado tratado com óleo, n = 10) e MSG ESTR (obesos ovariectomizados tratado com estradiol, n= 10). Diferença estatística de \*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ . Para todas as comparações da figura foram aplicados o teste ANOVA One-way, seguido do teste comparativo múltiplo de Tukey.

## 6. DISCUSSÃO

## 6.1 Discussão do Estudo 1

1 Neste estudo foi avaliado as alterações morfológicas, cardiovasculares,  
2 autonômicas, concentração de NO (nitrito) tissular e plasmático, além da marcação  
3 imunohistoquímica para a iNOS, em ratas com obesidade, na ausência de hormônios  
4 ovarianos ou ovariectomizadas e tratadas com estradiol. Após cento e trinta e um dias do  
5 tratamento neonatal com glutamato monossódico, o modelo de obesidade MSG foi  
6 comprovado, visto que, as ratas MSG SHAM mostraram maior acúmulo de tecido adiposo  
7 retroperitoneal, índice de Lee mais alto, comprimentos nasoanal mais curtos e peso  
8 corporal menor em comparação com as ratas CTR SHAM, como mostrado nos resultados.  
9 Estas alterações caracterizaram a obesidade MSG, que também foram evidenciadas em  
10 estudos anteriores deste mesmo laboratório, com ratos machos Wistar (DA CUNHA et al.,  
11 2010, DA CUNHA et al., 2011, AMARANTE et al., 2012; DA SILVA MATOS et al.,  
12 2012; DA CUNHA et al., 2014). No estudo de Sagae et al, (2011) foi mostrado que tanto  
13 em ratos machos quanto em fêmeas Wistar, a obesidade MSG apresenta redução da massa  
14 corporal, do comprimento nasoanal, aumento da tecido adiposo perigonadal e  
15 retroperitoneal, apresentando semelhança com dados do nosso grupo.

16 O acompanhamento do peso semanal dos grupos, revelou que foi à partir da quarta  
17 semana após a OVX que houve diferença estatística no aumento de peso das ratas CTR  
18 OVX em relação ao grupo CTR SHAM. No trabalho de Sivasinprasasn et al., (2015) onde  
19 os autores analisaram ratas com dieta normal e obesas por dieta rica em lipídeos, que foram  
20 submetidas à cirurgia OVX e a falsa OVX, identificaram que na quarta semana houve  
21 diferença do peso, apenas entre ratas obesas OVX comparadas com todos os grupos, mas  
22 que na oitava e décima segunda semana, o peso das ratas OVX e não OVX obesas e não  
23 obesas OVX, comparadas ao grupo de dieta normal não OVX foram significativamente  
24 maiores, demonstrando um pior comprometimento metabólico no organismo feminino  
25 apenas na ausência dos hormônios ovarianos e nesta em conjunto com a obesidade. Em  
26 nossos achados apenas a ausência dos hormônios foi responsável por esta alteração.

27 Com relação à ovariectomia foi possível identificar que a mesma não intensifica as  
28 alterações que a obesidade MSG provoca nas ratas, visto que, no peso corporal, a  
29 quantidade de tecido adiposo retroperitoneal, o comprimento nasoanal e o índice de Lee,  
30 não são diferentes quando comparados os grupos MSG OVX e MSG SHAM. No entanto,

1 neste trabalho verificou-se que o peso corporal do grupo CTR OVX foi maior do que o  
2 grupo CTR SHAM e ainda que este aumento de peso aconteceu à partir da quarta semana  
3 após a ovariectomia, afirmando que a ausência dos hormônios ovarianos por si só,  
4 predispõe a obesidade nas ratas. Da mesma maneira, no trabalho de de Souza et al., (2019)  
5 os autores puderam identificar que a OVX em ratas levou ao aumento do ganho de peso  
6 corporal, a maior ingestão de alimento, maior área dos adipócitos e peso de tecido adiposo  
7 retroperitoneal, colesterol plasmático e intolerância à glicose, com redução no peso do  
8 útero. Os dados deste trabalho também corroboram com os achados de Hong et al., (2009),  
9 os quais observaram que camundongos fêmeas OVX ganharam mais peso, especificamente  
10 na forma de tecido adiposo.

11 Neste trabalho a eficácia da ovariectomia foi identificada pela atrofia do útero,  
12 também encontrada no trabalho de de Souza et al., (2019) e menor valor da relação  
13 útero/tíbia na comparação entre os mesmos grupos, corroborando com os achados da  
14 pesquisa de Castardo-de- Paula et al., (2017). Também foi identificado que o modelo de  
15 obesidade MSG em fêmeas provoca atrofia uterina e a ovariectomia nas fêmeas obesas  
16 intensifica a diminuição do peso do útero que a obesidade provocou com consequente  
17 diminuição da relação útero/tíbia. No trabalho de Gaspar e colaboradores (2016),  
18 utilizando fêmeas MSG os autores observaram que embora as ratas tenham apresentado  
19 ciclos estrais irregulares, com baixa ovulação, e assim como no nosso estudo, o peso do  
20 útero era menor, os níveis de estrógeno eram normais.

21 Na literatura está bem evidente que ratos machos Wistar MSG apresentam um  
22 aumento dos valores de pressão arterial média (PAM), sem alterações da frequência  
23 cardíaca (FC) (DA CUNHA et al., 2010, KONRAD et al., 2012; AMARANTE et al.,  
24 2012; DA SILVA MATOS et al., 2012; DA CUNHA et al., 2017). O registro  
25 cardiovascular das fêmeas neste estudo mostra que não há diferença da PAM entre os  
26 grupos analisados, assim como observado em um estudo prévio de nosso laboratório com  
27 fêmeas não obesas (CASTARDO DE PAULA et al., 2017). Já no trabalho de Clough et al.,  
28 (1986) ao estudar ratas e ratos Sprague-Dawley com obesidade MSG, identificaram que as  
29 alterações da PAM são dependentes do sexo, sendo que nas fêmeas com 6, 9 e 12 semanas  
30 de idade foi observado hipotensão sistólica, sem mudanças na FC, contrário aos machos.  
31 Os autores sugeriram que os mecanismos barorreflexos em ratas fêmeas tratadas com MSG  
32 parecem ter trazido os níveis da PAM para um nível mais baixo, e que este reajuste do  
33 mecanismo barorreflexo ocorre independentemente de quaisquer alterações centrais ou

1 periféricas da vasopressina. É possível que fêmeas MSG tenham mecanismos de controle  
2 barorreflexo protegidos para não desenvolver hipertensão, sendo diferentes dos machos.  
3 Nossos resultados de avaliação do baroreflexo espontâneo corroboram essa hipótese já que  
4 a efetividade está aumentada nas ratas obesas OVX.

5 Nos resultados apresentados, foi possível identificar aumento da FC nas ratas  
6 obesas com ou sem a cirurgia da retirada dos ovários. No trabalho de Castardo-de-Paula, et  
7 al., (2017) não foi encontrado diferença da FC nas ratas ovariectomizadas, visto que não  
8 obtinham sobrepeso, como neste trabalho. Dessa forma, esses efeitos sobre a FC podem ser  
9 decorrentes da obesidade apenas.

10 A variabilidade cardiovascular, através da análise espectral, vem ganhando  
11 importância como ferramenta clínica promissora de avaliação do SNA, identificando  
12 comprometimentos na saúde, e sua utilização é considerada um preditor das funções  
13 internas do organismo, tanto em condições normais quanto patológicas (VANDERLEI et  
14 al., 2009). A modulação autonômica na pressão arterial sistólica (PAS) através dos  
15 componentes LF, VLF e variância, não estão alteradas entre os grupos avaliados neste  
16 trabalho. Já a modulação autonômica do intervalo de pulso (IP) mostra que a obesidade  
17 MSG em conjunto com a ovariectomia, aumenta o componente LF normalizado, que tem  
18 sido interpretado como a ação conjunta dos componentes vagal e sistema nervoso  
19 simpático (SNS) sobre o coração, com predominância do simpático. Também ocorre  
20 diminuição do HF normalizado, um indicador da atuação do nervo vago sobre o coração e  
21 aumento na relação LF/HF, sugerindo que a ausência dos hormônios ovarianos junto à  
22 obesidade, altera o SNA intensificando a ação do SNS e diminuindo do parassimpático  
23 (SNP). Em estudos com ratos machos Wistar, apenas a obesidade MSG já provoca essas  
24 mesmas alterações das bandas LF e HF (DA CUNHA et al., 2011; DA CUNHA et al.,  
25 2014). Em estudo recente, Felix e colaboradores (2019) mostraram que em ratas idosas (82  
26 semanas de vida) que tinham sido submetidas à ovariectomia precoce (10 semanas de vida)  
27 apresentavam alterações morfológicas com aumento na contratilidade cardíaca comparada  
28 às ratas não ovariectomizadas. Essas alterações foram associadas a uma maior expressão  
29 dos receptores beta cardíacos, os quais também participam do controle da frequência  
30 cardíaca pelo SNS.

31 O barorreflexo, é um sistema extremamente eficiente em controlar a variação da  
32 PA. As terminações sensoriais barorreceptoras localizadas no seio do arco aórtico,  
33 carotídeo e artéria subclávia direita, permitem um sistema de controle de alto ganho que

1 mantém a PA dentro de limites normais a curto prazo (segundos a minutos), participando  
2 da homeostase hemodinâmica, principalmente por controlar os tônus simpático e  
3 parassimpático para coração e vasos (CAMPAGNOLE-SANTOS & HAIBARA, 2001). Na  
4 análise do barorreflexo espontâneo, a efetividade (all Bei) basal nas ratas obesas e  
5 ovariectomizadas foi maior comparado ao grupo com obesidade apenas, sugerindo que a  
6 união dos dois fatores de risco cardiovascular, provocam um aumento da efetividade  
7 barorreflexa em situação de repouso. No estudo de Battault et al., (2017) para explicarem a  
8 ativação simpática, PAM e tônus vascular normais em alguns pacientes obesos, sugerem  
9 que mecanismos compensatórios contrabalançam a ação simpática e portanto, dissociam a  
10 atividade simpática de seu efeito hipertensivo e também existe o controle do tônus vascular  
11 que pode estar envolvido em tal fenômeno. Esses mecanismos podem justificar nossos  
12 achados com ratas obesas e ovariectomizadas sem alterações na PAM, com maior  
13 atividade simpática e maior efetividade barorreflexa.

14 Neste estudo mostramos que a ovariectomia aumenta as concentrações de NO nos  
15 rins apenas nas ratas controle, o mesmo não acontecendo nas obesas. Neugarten et al,  
16 (1997) identificaram que na medula interna renal (MIR) de ratos Sprague-Dawley de  
17 ambos os gêneros com 10 a 11 semanas de vida, os níveis das enzimas eNOS e iNOS  
18 foram maiores nas fêmeas, comparados aos machos e que a ovariectomia diminuiu esses  
19 níveis que depois foram recuperados com o tratamento com estradiol. Sasser et al., (2001)  
20 compararam a atividade enzimática da NOS também na MIR, tanto de ratos machos quanto  
21 de fêmeas, ambos espontaneamente hipertensos (SHR) de 5 e de 13 semanas de vida e  
22 mostraram que está aumentada em fêmeas SHR com maturação sexual (13 semanas),  
23 comparado a machos com o mesmo tempo de vida. Eles concluem que o efeito da idade  
24 sobre a atividade da NOS na MIR é dependente do sexo, e para determinar a contribuição  
25 relativa da maturação e dos hormônios sexuais femininos no dimorfismo sexual na  
26 atividade da NOS, o NO foi medido em homogenatos renais na MIR de fêmeas SHR de 13  
27 e 18 semanas intactas e ovariectomizadas onde a OVX diminuiu a atividade total da NOS,  
28 independentemente da idade.

29 Foi visto nos resultados que a OVX e a obesidade provocam diminuição da  
30 concentração de NO no tecido cardíaco. Há bastante tempo se sabe que o NO participa da  
31 vasodilatação coronária através da ativação pela acetilcolina (SHEM et al., 1994). Dessa  
32 forma, nossos achados de menor concentração de NO no tecido cardíaco são

1 compreensíveis já que a modulação parassimpática do IP também está diminuída nesses  
2 animais, corroborando com o fato que nesses animais temos também uma maior FC basal.

3 Em contraste ao tecido cardíaco, houve aumento de NO plasmático nas ratas  
4 ovariectomizadas e obesas. Segundo Battault et al., (2017) enfatizaram o papel  
5 fundamental do NO pela eNOS em indivíduos com síndrome metabólica, ao impedir o  
6 desenvolvimento de hipertensão associado com comprometimento do equilíbrio  
7 simpatovagal, relacionando a capacidade do endotélio de modular a vasoconstrição  
8 dependente da inervação adrenérgica, com uma última defesa contra a hipertensão nestes  
9 indivíduos. É possível que de forma semelhante, essa compensação do NO em modular os  
10 efeitos vasoconstritores possam explicar em parte a ausência de hipertensão encontrada nas  
11 fêmeas obesas em nosso estudo. No entanto, não podemos descartar a possibilidade de que  
12 esse aumento do NO plasmático possa ser devido a uma maior atividade da iNOS  
13 endotelial.

14 A iNOS é um importante mediador inflamatório com um papel vital na imunidade  
15 (BOGDAN et al. , 2000). No entanto, supõe-se que a superexpressão da iNOS esteja  
16 envolvida no desenvolvimento de DCV, e pode ser um importante elo entre os distúrbios  
17 metabólicos relacionados à obesidade e a inflamação. A regulação da expressão da iNOS é  
18 multifatorial e dependente de vários fatores de transcrição, incluindo o NFκB (NEGI et al.  
19 2011). O aumento do acúmulo de lipídios no coração leva a ativação de vias pró-  
20 inflamatórias, que é seguido pela ativação do NFκB e supra-regulação da expressão da  
21 iNOS (CAO et al, 2011).

22 O modelo de obesidade utilizado neste trabalho, associado à ovariectomia provocou  
23 uma elevação na expressão de iNOS no tecido cardíaco e renal, em comparação as ratas  
24 controle OVX. Por outro lado, as concentrações de nitrito mostraram-se diminuídas nas  
25 ratas obesas. No trabalho de Jovanovic, et al., (2017) as ratas obesas, alimentadas com  
26 dieta hiperlipídica por 10 semanas, exibiram também aumento significativo no nível de  
27 mRNA da iNOS e da proteína iNOS cardíaca e ao mesmo tempo as concentrações de  
28 nitrito não estavam alteradas. Os autores sugerem que a explicação para esse fato seria que  
29 muito do NO gerado pela aumentada ativação da iNOS reagiria com outras moléculas,  
30 como anion superóxido, gerando peroxinitrito e elevando os níveis de estresse oxidativo.  
31 Em estudos anteriores de nosso grupo foi verificado que esses animais obesos possuem  
32 níveis aumentados de lipoperoxidação lipídica e também aumento da marcação de iNOS  
33 cardíaca (Da Cunha et al., 2010; 2014; 2017).

1 Kaur & Kaur (2017) analisaram a expressão de RNAm para a iNOS na região do  
2 hipotálamo de ratas obesas, com dieta rica em tecido adiposo (30% de tecido adiposo, 50%  
3 carboidratos, 20% de proteínas) e identificaram que houve aumento significativo da iNOS  
4 neste grupo, comparado ao grupo com dieta normal, mostrando que a obesidade por si só  
5 eleva a iNOS nesta região do cérebro. Esse trabalho corrobora com nossos resultados que  
6 também mostrou aumento da enzima iNOS no cérebro de ratas obesas. Porém ao retirar os  
7 hormônios ovarianos destas, através da ovariectomia, a expressão da iNOS diminuiu,  
8 demonstrando uma relação dos hormônios ovarianos com a produção de NO via iNOS  
9 neste tecido.

## 11 **6.2 Discussão do Estudo 2**

13 As ratas induzidas à obesidade através do modelo MSG, que foram submetidas a  
14 oito semanas de tratamento com estradiol ou óleo de amêndoas, mostraram que os fatores  
15 de risco para desenvolver DCVs como o peso corporal, o acúmulo de tecido adiposo  
16 retroperitoneal e o cálculo de índice de Lee diminuíram nas ratas obesas tratadas com  
17 estrógeno. De forma semelhante, Hong et al., (2009) em seu estudo com o objetivo de  
18 determinar os efeitos do sexo e hormônios ovarianos na suscetibilidade à obesidade,  
19 descreveu que hormônios ovarianos de fato fornecem proteção contra o ganho de peso.

20 De Souza et al., (2019) realizaram um estudo com ratas OVX tratadas com  
21 glicocorticoides, no qual, esses animais aumentaram o peso, o índice de Lee, a ingestão de  
22 alimentos, o peso de tecido adiposo retroperitoneal, área de adipócitos de depósitos de  
23 tecido adiposo retroperitoneal e perigonadal, triglicérides plasmáticos e o tratamento com  
24 estradiol além de reverter esses efeitos induzidos pelos glicocorticóides e diminuir a  
25 intolerância à glicose, aumentou o peso do útero das ratas OVX, assim como nos  
26 resultados deste trabalho onde as ratas OVX tanto controles como as MSG tratadas com  
27 estradiol tiveram o peso uterino maior em relação as ratas tratadas com óleo de amêndoas.

28 Foram observados nos resultados do presente estudo que a ausência de hormônios  
29 ovarianos associado a obesidade MSG elevaram a FC das ratas e o tratamento com  
30 estradiol não reverteu esta alteração cardiovascular. Já o estudo de El-Mas et al., (2009)  
31 mostrou que a reposição de estrogênio em ratas OVX causou reduções significativas na  
32 pressão arterial média (PAM), na frequência cardíaca (FC) e reverteu as alterações na  
33 atividade autonômica, através da redução do tônus simpático vascular. O autor destacou a

1 importância da terapia com estrogênio a longo prazo na retificação das alterações  
2 cardiovasculares e barorreflexas prejudiciais causadas pelo esgotamento do hormônio  
3 ovariano. A diferença entre o estudo El Mas e o nosso é que as nossas ratas eram obesas,  
4 assim, de alguma forma, a obesidade pode ter impedido que o tratamento com estrógeno  
5 diminuísse os valores de FC. Esse fato chama nossa atenção para os agravos da obesidade  
6 para as DCV.

7       Em relação a modulação autonômica da PAS, pôde-se observar que o tratamento de  
8 oito semanas com estradiol, diminui a atividade simpática, via banda LF, em ratas não  
9 obesas. El-Mas et al., (2009) mostrou em seu estudo que as oscilações LF da PAS foram  
10 reduzidas em ratas OVX tratados com estrogênio, com consequente diminuição da PA, por  
11 meio da inibição da atividade simpática vasomotora e do aumento da sensibilidade  
12 espontânea do barorreflexo, alterando o equilíbrio simpato-vagal cardíaco em direção à  
13 dominância parassimpática e colaborando para menores valores de PA. Bundalob et al.,  
14 (2017) em seu estudo concluíram que o modelo de obesidade através de dieta rica em  
15 frutose, altera os marcadores no coração de ratas OVX, provocando distúrbios na  
16 sinalização de insulina, metabolismo energético, produção de NO, transporte iônico e  
17 sinalização dos mecanismos do sistema renina-angiotensina, causando resistência à  
18 insulina. Ele demonstra que o tratamento com estradiol foi eficaz em suprir os efeitos desta  
19 dieta via sinalização AKT e reverte alterações na expressão do sistema renina-  
20 angiotensina, explicando a diminuição da atividade simpática neste trabalho. Embora, no  
21 nosso estudo as ratas obesas não tiveram alterações no LF após o tratamento com  
22 estrógeno, na efetividade do barorreflexo elas melhoraram, possivelmente contribuindo para  
23 um melhor controle cardiovascular. Na análise da modulação autonômica do IP, não  
24 observamos diferenças entre os grupos.

25       No estudo de De Bellis et al (2019) os resultados mostraram que os hormônios  
26 femininos estão envolvidos na regulação do relaxamento ventricular, influenciando a  
27 atividade da NO-sintase, levando a uma maior biodisponibilidade do NO e consequente  
28 maior vasodilatação mediada pelo endotélio. Nos resultados deste estudo não observamos  
29 alterações nas concentrações de nitrito nos tecidos cardíaco, tecido adiposo e rins. No  
30 entanto, pôde-se observar que as ratas obesas que receberam estradiol, tiveram diminuição  
31 das concentrações plasmáticas de NO, o que não corrobora com os dados de De Bellis.  
32 Contudo, as dosagens de nitrito plasmático não são resultado apenas do NO endotelial e,  
33 portanto, podem receber influências do organismo como um todo, por ser uma análise

1 sistêmica. Dados de Castardo-de-Paula et al., 2017 mostraram que os níveis de nitrito não  
2 se alteraram após ovariectomia, porém foram diminuídos após tratamento com estrógeno  
3 somente nas ratas que receberam S-metil-isothiourea (SMT), um inibidor da iNOS. No  
4 entanto, não é possível saber quais tecidos inibidos por SMT contribuíram para diminuir a  
5 concentração de nitrito plasmática nesses animais.

6 Neste estudo, a expressão da iNOS nos rins aumentou em ratas obesas OVX  
7 tratadas com estradiol e no cérebro, tanto a obesidade quanto o tratamento com estradiol  
8 provocou aumento da iNOS. Jovanovic, et al., (2017) deixam claro que o uso da terapia de  
9 reposição hormonal tornou-se um dos tópicos mais controversos relacionados à saúde das  
10 mulheres. Os autores descrevem que o estradiol é conhecido por exercer efeitos  
11 cardioprotetores em mulheres na pré-menopausa, mas enfatizam que suas ações parecem  
12 estar comprometidas na obesidade.

## 13 **7. CONCLUSÃO**

14 Pode se concluir, que a ausência dos hormônios ovarianos em associação com a  
15 obesidade MSG, atuam de forma efetiva em alterações cardiovasculares, autonômica e  
16 inflamatória, visto que provocam modificações na modulação autonômica do IP através da  
17 ativação do SNS, diminuição da atividade do SNP e aumento das concentrações de  
18 marcadores inflamatórios teciduais, a iNOS.

19 No entanto, diante da terapia hormonal com estradiol, conclui-se que o tratamento  
20 diminui alguns fatores de risco para desenvolver DCVs, inibindo a ação do SNS regulando  
21 os parâmetros cardiovasculares e autonômicos, porém a terapia não é capaz de reverter o

- 1 processo inflamatório, instalado diante da ausência dos hormônios ovarianos em conjunto
- 2 com a obesidade MSG .
- 3

## **8. Referências**

Ariza, D., Sisdeli, L., Crestani, C.C., Fazan, R., Martins-Pinge, M.C. (2015). 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.* 308(3), H250-7.

- Aubert, A.E., Seps, B., Beckers, F. (2003). Heart rate variability in athletes. *Metabolism*. 61(10):1435-42. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2012.03.005>.
- Battault, S.1., Meziat, C.1., Nascimento, A.1., Braud, L., Gayrard, S., Legros, C., Reboul C. (2017). Vascular endothelial function masks increased sympathetic vasopressor activity in rats with metabolic syndrome. *American Journal of Physiological Heart Circulatory Physiology*. 314(3):H497-H507. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00217.2017>.
- Bautistaa, R.J.H., Mahmoud, A.M., Königsberga, M., Guerrer, N.E.L.D. (2019). Obesity: Pathophysiology, monosodium glutamate-induced model and antiobesity medicinal plants. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 111: 503–516.
- Bernardis, L.L., Patterson, B.D. (1968). Correlation between “Lee index” and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *Journal of Endocrinology*. 40: 527–528.
- Bogdan C, Rollinghoff M, Diefenbach A. (2000). Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol*. 12: 64-76.
- Bundalob, M., Romica, S., Tepavcevic, S., Stojiljkovic, M., Stankovic, A., Zivkovic, M., Koricanaca, G. Fructose-rich diet and insulin action in female rat heart: Estradiol friend or foe?. *European Journal of Pharmacology*. 811: 141–147.
- Campagnole-Santos, M.J, Haibara, A.S. (2001). Reflexos cardiovasculares e hipertensão arterial. *Revista Brasileira de Hipertensão*. 8(1): 30-40.
- Campos, C., Casali, K.R., Baraldi, D., Conzatti, A., Araújo, A.S.R., Khaper, N., Llesuy, S., Rigatto, K., Belló-Klein, A. (2014). Efficacy of a Low Dose of Estrogen on Antioxidant Defenses and Heart Rate Variability. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/218749>.
- Cao J, Sodhi K, Puri N, Monu SR, Rezzani R, Abraham NG. (2011). High fat diet enhances cardiac abnormalities in SHR rats: Protective role of heme oxygenase-adiponectin axis. *Diabetol Metab Syndr*. 3: 37.
- Castardo-de-Paula, J.C., de Campos, B.H., Amorim, E.D.T, da Silva, R.V., de Farias C.C., Higachi, L., Martins-Pinge, M.C. (2017). Cardiovascular risk and the effect of nitric oxide synthase inhibition in female rats: The role of estrogen. *Experimental Gerontology*.15(97):38-48. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2017.07.016>.
- Cheng, Z.J., Wang, R., Chen, Q.H. (2019). Autonomic Regulation of the Cardiovascular System: Diseases, Treatments, and Novel Approaches. *Neurosci Bull*. 35(1):1-3.
- Clough, R.W., Aravich, P.F., Sladek, C.D. (1986). Monosodium Glutamate Neurotoxicity: A Sex-Specific Impairment of Blood Pressure but not Vasopressin in Developing Rats. *Brain Research Bulletin*. 17(1):51-8. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(86\)90160-7](https://doi.org/10.1016/0361-9230(86)90160-7).
- Colasanti, M., Suzuki, H. (2000). The dual personality of NO. *Trends Pharmacol Sci*. 21(7):249-52.

DA Cunha, N.V., Pinge-Filho, P., Panis, C., Silva, B.R., Pernomian, L., Grando, M.D., Cecchini, R., Bendhack, L.M., Martins-Pinge, M.C. (2014). Decreased endothelial nitric oxide, systemic oxidative stress, and increased sympathetic modulation contribute to hypertension in obese rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 15;306(10):H1472-80.

DA Cunha, N.V., de Abreu, S.B., Panis, C., Grassioli, S., Guarnier, F.A., Cecchini, R., Mazzuco, T.L., Pinge-Filho, P., Martins-Pinge, M.C. (2010). Cox-2 inhibition attenuates cardiovascular and inflammatory aspects in monosodium glutamate-induced obese rats. *Life Sciences.* 11;87(11-12):375-81. [https://doi: 10.1016/j.lfs.2010.07.014](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2010.07.014).

DA Cunha, N.V., Lopes, F.N., Panis, C., Cecchini, R., Pinge-Filho, P., Martins-Pinge, M.C. (2017). iNOS inhibition improves autonomic dysfunction and oxidative status in hypertensive obese rats. *Clinical and Experimental Hypertension.* 39(1):50-57. [https://doi: 10.1080/10641963.2016.1210628](https://doi.org/10.1080/10641963.2016.1210628).

DA Silva Mattos, A.M., Xavier, C.H., Karlen-Amarante, M., da Cunha, N.V., Fontes, M.A., Martins-Pinge, M.C. (2012). Renal sympathetic nerve activity is increased in monosodium glutamate induced hyperadipose rats. *Neuroscience Letters.* 1;522(2):118-22. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.06.021>.

DA Cunha, N.V., Pinge-Filho, P., Barbosa Neto, O., Grassioli, S., Martins-Pinge, M.C. (2011). COX-2 inhibition does not reverse the increased sympathetic modulation in MSG obese rats. *Autonomic Neuroscience.* 7;165(2): 201-4. [https://doi:10.1016/j.autneu.2011.07.006](https://doi.org/10.1016/j.autneu.2011.07.006).

DE Abreu, S. B., Lenhard, A., Mehanna, A., de Souza, H. C. D., de Aguiar Correa, F. M., Hasser, E. M., Martins-Pinge, M. C. (2009). Role of paraventricular nucleus in exercise training-induced autonomic modulation in conscious rats. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 148(1–2), 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.02.007>.

DE Bellis, A., De Angelis, G., Fabris, E., Cannatà, A., Merlo, M., Sinagra, G. (2019). Gender-related differences in heart failure: beyond the “one-size-fits-all” paradigm. *Heart Failure Reviews.* <https://doi.org/10.1007/s10741-019-09824-y>.

DE Marchi, P.N., Guimarães-Okamoto, P.T.C., Melchert, A. Ribeiro, J.F.A., dos Santos, T.H.Y., Machado, L.H.A. (2016). Síndrome metabólica: relação entre obesidade, resistência insulínica e hipertensão arterial sistêmica nos pequenos animais. *Veterinária e Zootecnia.* 23(2): 184-191.

DE Souza, C.F., Stopa, L.R.S., Santos, G.F., Takasumi, L.C.N., Martins, A.B., Garnica-Siqueira, M.C., Ferreira, R.N., de Andrade, F.G., Leite, C.M., Zaia, D.A.M., Zaia, C.T.B.V., Uchoa, E.T. (2019). Estradiol protects against ovariectomy-induced susceptibility to the anabolic effects of glucocorticoids in rats. *Life Sci.* 1 (218):185-196. doi: 10.1016/j.lfs.2018.12.037.

Dutra, S.G., Pereira, A.P., Tezini, G.C., Mazon, J.H., Martins-Pinge, M.C., Souza, H.C. (2013). Cardiac Autonomic Modulation Is Determined by Gender and Is Independent of Aerobic Physical Capacity in Healthy Subjects. *Plos One.* 3;8(10):1-9.

Elias-Smale, S.E., Günal, A., Maas, A.H. (2015). Gynecardiology: Distinct patterns of ischemic heart disease in middle-aged women. *Maturitas. The European Menopause Journal*. 81(3):348-52. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2015.04.012>.

El-Mas, M., Abdel-Rahman, A.A. (2014). Endothelial and neuronal nitric oxide synthases variably modulate the estrogen-mediated control of blood pressure and cardiovascular autonomic control. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 41(3): 246-254.

El-Mas, M.M., Abdel-Rahman, A.A. (2009). Longitudinal assessment of the effects of estrogen on blood pressure and cardiovascular autonomic activity in female rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 36(10): 1002–1009.

Felix, A.C.S., Gastaldi, A.C., Dutra, S.G.V., de Freitas, A.C.S., Philbois, S.V., de Paula Facioli, T., Da Silva, V.J.D., Fares, T.H., de Souza, H.C.D. (2019) Early ovarian hormone deprivation increases cardiac contractility in old female rats- Role of physical training. *Auton Neurosci*. 218:1-9.

Filho, R.F., Zilberstein, B. (2000) Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. *Metabolismo, síntese e funções. Rev Ass Med Brasil*. 46(3): 265-71.

Gaspar, R.S., Benevides, R.O., Fontelles, J.L., Vale, C.C., França, L.M., Barros P.T., Paes, A.M. (2016). Reproductive alterations in hyperinsulinemic but normoandrogenic MSG obese female rats. *J Endocrinol*. 229(2):61-72.

Gomes, F., Telo, D.F., Souza, H.P., Nicolau, J.C., Halpern, A., Serrano, C.V. Jr. (2010). [Obesity and coronary artery disease: role of vascular inflammation]. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 94(2):255-61, 273-9, 260-6.

Gore, A.C., Wu, T.J., Oung, T., Lee, J.B., Woller, M.J. (2002). A Novel Mechanism for Endocrine-Disrupting Effects of Polychlorinated Biphenyls: Direct Effects on Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons. *J Neuroendocrinol*. 14(10):814-23.

Hong, J., Stubbins, R.E., Smith, R.R., Harvey, A.E., Núñez, N.P. (2009). Differential susceptibility to obesity between male, female and ovariectomized female mice. *Nutrition Journal*. 8 (11):2-5.

Honour, J.W. (2018). Biochemistry of the menopause. *Annals of Clinical Biochemistry*. 55(1):18-33. DOI: 10.1177/0004563217739930.

Hsieh, D.J.Y., Kuo, W.W., Lai, Y.P., Shibu, M.A., Shen, C.Y., Pai, P... Huang, C.Y. (2015). 17 $\beta$ -Estradiol and/or Estrogen Receptor  $\beta$  Attenuate the Autophagic and Apoptotic Effects Induced by Prolonged Hypoxia Through HIF-1 $\alpha$ -Mediated BNIP3 and IGFBP-3 Signaling Blockage. *Cellular Physiology and Biochemistry*.(36):274-284.

Ishitani, L.H., Franco, G.C., Perpétuo, I.H.O., França, E. (2006). Desigualdade social e mortalidade precoce por doenças cardiovasculares no Brasil. *Rev Saúde Pública*. 40(4):684-91.

Iwase, M., Yamamoto, M., Iino, K., Ichikawa, K., Shinohara, N., Yoshinari, M., Fujishima, M. (1998). Obesity Induced Treatment in An Animal by Neonatal Monosodium Glutamate Spontaneously Hypertensive Rats: Model of Multiple Risk Factors. *Hypertens.* 21(1):1-6.

Jovanovic, A., Sudar-Milovanovic, E., Obradovic, M., Pitt, S.J., Stewart, A.J., Zafirovic, S., Stanimirovic, J., Radak, D., Isenovic, E.R. (2017). Influence of a High-Fat Diet on Cardiac iNOS in Female Rats. *Curr Vasc Pharmacol.* 15(5):491-500.

Karlen-Amarante, M., da Cunha, N.V., de Andrade, O., de Souza, H.C., Martins-Pinge, M.C. (2012). Altered baroreflex and autonomic modulation in monosodium glutamate-induced hyperadipose rats. *Metabolism Clinical and Experimental.* 61(10):1435-42. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2012.03.005>.

Kaur, T., Kaur, G. (2017). Withania somnifera as a potential candidate to ameliorate high fat diet-induced anxiety and neuroinflammation. *J Neuroinflammation.* 12;14(1):201.

Khalil, R. A. (2005). Sex Hormones as Potential Modulators of Vascular Function in Hypertension. *Hypertension Highlights.* 46:249-254.

Konrad S.P., Farah, V., Rodrigues, B., Wichi, R.B., Machado, U.F., Lopes, H.F., D'Agord Schaan, B., De Angelis, K., Irigoyen, M.C. (2012). Monosodium glutamate neonatal treatment induces cardiovascular autonomic function changes in rodents. *Clinics.* 67(10):1209-14.

Leeners, B., Geary, N., Tobler, P.N., Asarian, L. (2017). Ovarian hormones and obesity. *Hum Reprod Update.* 1;23(3):300-321. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmw045>.

Lima-Mendoza, L.A., Colado-Velázquez, J., Mailloux-Salinas, P., Espinosa-Juárez, J.V., Gómez-Viquez, N.L., Molina-Muñoz, T., HuangM, F., Bravo, G. (2014). Vascular damage in obese female rats with hypoestrogenism. *J Physiol Biochem.* 70: 81–91.

Lopes, H.F. (2007). Hipertensão e inflamação: papel da obesidade. *Rev Bras Hipertens* 14(4): 239-244.

Majewska, M., Jurgońskib, A., Fotschkib, B., Juśkiewicz, J. (2018). The toxic effects of monosodium glutamate (MSG) – The involvement of nitric oxide, prostanoids and potassium channels in the reactivity of thoracic arteries in MSG-obese rats. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 359: 62–69.

Maldonado-Ruiz, R., Fuentes-Mera, L., Camacho, A. (2017). Central Modulation of Neuroinflammation by Neuropeptides and Energy-Sensing Hormones during Obesity. *Biomed Res Int.* 2017:1-12. <https://doi.org/10.1155/2017/7949582>.

Maric-Bilkan, C., Gilbert, E.L., Ryan, M.J. (2014). Impact of ovarian function on cardiovascular health in women: focus on hypertension. *International Journal of Women's Health.* (6) 131–139.

Martins-Pinge, M. C., Becker, L. K., Luccizano Garcia, M. R., Zoccal, D. B., Neto, R. V., Basso, L. S., ... Lopes, O. U. (2005). Attenuated pressor responses to amino acids in the

rostral ventrolateral medulla after swimming training in conscious rats. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 122(1–2), 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2005.07.007>

Mathias, P.C., Grassioli, S., Rocha, D.N., Scomparin, D.X., Gravena, C. (2007). Transplantation of pancreatic islets from hypothalamic obese rats corrects hyperglycemia of diabetic rats. *Transplantation Proceedings*. 39:193–195.

Mayer, B., Andrew, P. (1998). Nitric oxide synthases: catalytic function and progress towards selective inhibition. *Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 358: 127–133.

Mehanna, A., Vitorino, D.C., Panis, C., Blanco, E.E.A., Pinge Filho, P., Martins-Pinge, M.C. (2007). Cardiovascular e pulmonary effects of NOS inhibition in endotoxemic conscious rats subjected to swimming training. *Life Science*. 8: 1301-1308.

Mintaa, W., Paleea, S., Mantora, D., Suthama, W., Jaiwongkama, T., Kerdphooa, S., Pratchayasakula, W., Kumfua, S., Chattipakorna, S.C., Chattipakorna, N. (2018). Estrogen deprivation aggravates cardiometabolic dysfunction in obese insulin resistant rats through the impairment of cardiac mitochondrial dynamics. *Experimental Gerontology*. 103: 107–114.

Moncada S., Higgs, E.A. (1992). The L-arginine-nitric oxide pathway. *New England Journal of Medicine*. 329: 2002-2012.

Moncada S., Higgs, E.A. (1993). The L-arginine-nitric oxide pathway. *New England Journal of Medicine*. 329: 2002-2012.. Doi 10.1056/NEJM199312303292706.

Monteiro, R., Teixeira, D., Calhau, C. (2014). Estrogen Signaling in Metabolic Inflammation. *Mediators of Inflammation*. DOI:10.1155/2014/615917.

Negi S, Kharshiing EV, Sharma R. (2011). NO way: Is nitric oxide level in tomato regulated by a mammalian IKK/NFkB-like signaling pathway? *Plant Signal Behav*; 6: 1049-52.

Neugarten, J., Ding, Q., Friedman, A., Lei, J., Silbiger, S. (1997). Sex hormones and renal nitric oxide synthases. *J Am Soc Nephrol*. 8(8):1240-6.

Panis, C., Herrera, A.C., Victorino, V.J., Campos, F.C., Freitas, L.F., De Rossi, T., Colado Simão, A.N., Cecchini, A.L., Cecchini R (2012). Oxidative stress and hematological profiles of advanced breast cancer patients subjected to paclitaxel or doxorubicin chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat*. 133(1), 89-97.

Quines, C.B., Rosa, S.G., Velasquez, D., Prado, V.C., Neto, J.S.S, Nogueira, C.W. (2018). (p-CIPhSe)<sub>2</sub> stabilizes metabolic function in a rat model of neuroendocrine obesity induced by monosodium glutamate. *Food and Chemical Toxicology*. 118:168-180.

Radomski, M.W., Palmer, R.M., Moncada, S. (1990). Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular

endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 87:10043-10047.

Rasia, J., Berlezi, E.M., Bigolin, S.E., Schneider, R.H. (2007). A relação do sobrepeso e obesidade com desconfortos musculoesqueléticos de mulheres pós-menopausa. *Revista Brasileira de Ciências do Envelhecimento Humano*. 4: (1), 28-38. <http://dx.doi.org/10.5335/rbceh.2012.114>.

Rastović, M., Srdić-Galić, B., Barak, O., Stokić, E. (2016). Association between anthropometric measures of regional fat and heart variability in obese women. *Nutr Diet*. Feb;74(1):51-60. doi: 10.1111/1747-0080.12280.

Reckelhoff, J.F., Romero, D.G., Cardozo, L.L.Y. (2019). Sex, Oxidative Stress, and Hypertension: Insights From Animal Models. *Physiology* 34: 178–188.

Rique A.B.R., Soares E.A., Meirelles C.M. (2002). Nutrição e exercício na prevenção e controle das doenças cardiovasculares. *Rev Bras Med Esporte*. 8 (6), 244-254.

Rogero, M.M., Calder, P.C. (2018). Obesity, Inflammation, Toll-Like Receptor 4 and Fatty Acids. *Nutrients*. 10(4), 432; doi:10.3390/nu10040432.

Sagae, S.C., Grassioli, S., Raineke, C., Balbo, S.L., Marques da Silva, A.C. (2011). Sex differences in brain cholinergic activity in MSG-obese rats submitted to exercise. *Can J Physiol Pharmacol*. 89(11):845-53.

Sánchez-Barajas, M., Figueroa-Vega, N., Ibarra-Reynoso, L.del R., Moreno-Frías, C., Malacara, J.M. (2015). Influence of heart rate variability and psychosocial factors on carotid stiffness, elasticity and impedance at menopause. *Arch Med Res*. 46(2):118-26. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2015.02.006>.

Sansbury, B.E., Hill, B.G. (2014). Regulation of obesity and insulin resistance by nitric oxide. *Free Radic Biol Med*. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.05.016.

Shen W, Ochoa M, Xu X, Wang J, Hintze TH. (1994). Role of EDRF/NO in parasympathetic coronary vasodilation following carotid chemoreflex activation in conscious dogs. *Am J Physiol*. 267(2 Pt 2):H605-13.

Sivasinprasasn, S., Sa-nguanmoo, P., Pratchayasakul, W., Kumfu, S., Chattipakorn, S.C., Chattipakorn, N. (2015). Obese-insulin resistance accelerates and aggravates cardiometabolic disorders and cardiac mitochondrial dysfunction in estrogen-deprived female rats. *American Aging Association*. 37 (28): 1-11.

Stevenson, J.C., Tsigiannis, S. Panay, N. (2018). Cardiovascular risk in perimenopausal women. *Curr Vasc Pharmacol*. DOI: 10.2174/1570161116666181002145340.

Vanderlei, L.C.M., Pastre, C.M., Hoshi, R.A., de Carvalho, T.D., de Godoy, M.F. (2009). Noções básicas de variabilidade da frequência cardíaca e sua aplicabilidade clínica. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 24 (2). 205-217 <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-76382009000200018>.

Xing, D., Oparil, S. Yu, H., Gong, K., Feng, W., Black, J., Chen, Y-F, Nozell, S. (2012). Estrogen Modulates NF $\kappa$ B Signaling by Enhancing I $\kappa$ B $\alpha$  Levels and Blocking p65 Binding at the Promoters of Inflammatory Genes via Estrogen Receptor- $\beta$ . *Plos one*. 7(6): 1-10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036890>.

Yamatani, H., Takahashi, K., Nagase, S. (2015). [Sex hormones and physiological function]. *Nihon Rinsho*. 73(4):565-70.

Zago A.S e Zanesco A. (2006). Óxido Nítrico, Doenças Cardiovasculares e Exercício Físico. *Arq Bras Cardiol*. 87(6) : e264-e270.

Zhang, Y., Liu, B., Zhao, B., Zhang, S., Yu, X., Li, Y.(2019). The Influence of Sex on Cardiac Physiology and Cardiovascular Diseases. *Journal of Cardiovascular Translational Research*. <https://doi.org/10.1007/s12265-019-09898-x>.

Zhao, Z., Wang, H., Jessup, J.A., Lindsey, S.H., Chappell, M.C., Groban, L. (2014). Role of estrogen in diastolic dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1;306(5):H628-40. doi: 10.1152/ajpheart.00859.2013.

#### **ANEXO – Comitê de Ética**

## COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA N° 164/2016

Londrina, 01 de Agosto de 2016.

Prezada Pesquisadora,

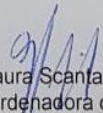
Certificamos que o projeto intitulado "**Efeitos do tratamento com inibidor da iNOS ou com antioxidante sobre parâmetros cardiovasculares, autonômicos, inflamatórios e oxidativos em ratas obesas e ovariectomizadas**", protocolo CEUA n° **14158.2016.97**, sob a responsabilidade de **Marli Cardoso Pinge**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n° 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), em reunião realizada em **26/07/2016**.

O objetivo do projeto é investigar participação do óxido nítrico da iNOS e terapia antioxidante em parâmetros cardiovasculares, autonômicos inflamatórios e oxidativos em ratas ovariectomizadas não anestesiadas e obesas. Será realizada cirurgia de ovariectomia ou falsa ovariectomia sob anestesia de Tribromoetanol (250 mg/kg, i.p.). Ao final da ovariectomia será administrado uma dose única (30.000 UI) de pentabiotico veterinário e dose única de Paracetamol 1,5 mg/100g de rata. Após 4 semanas da ovariectomia os animais receberão tratamento com inibidor da iNOS o S-methyl-isothiourea (SMT) 50 mg/kg i.p. ou salina fisiológica (veículo) por 4 semanas. Após 4 semanas da ovariectomia e da falsa ovariectomia, todos os grupos de animais, receberão o tratamento com vitamina C 50mg/kg ou veículo (água destilada) administrados oralmente por gavagem durante 21 dias. Após o registro cardiovascular nos animais acordados, estes serão submetidos à coleta de sangue pelo cateter arterial e heparinizado. Após a retirada do sangue os animais serão sedados com uma dose tiopental sódico, 50 mg/kg seguido de deslocamento cervical. GI 3.

Vigência do Projeto	01/10/2015 a 28/02/2019
Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
N° de animais	240 fêmeas provenientes do cruzamento de 30 machos, 90 fêmeas
Peso/Idade	200-250 g / 3 meses
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Biotério Central / UEL
Amostras a serem coletadas	Coração, rins, cérebro e vasos sanguíneos

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.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessária. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente,

  
 Profa. Dra. Glaura Scantamburlo Alves Fernandes  
 Coordenadora da CEUA/UEL

Ilma. Sra.

**Profa. Dra. Marli Cardoso Pinge**

Coordenadora do Projeto

Departamento de Ciências Fisiológicas / Centro de Ciências Biológicas

Com cópia para Coordenação do Biotério Central/Uel; Chefe do Departamento de Ciências Fisiológicas e Diretor(a) do Centro de Ciências Biológicas