



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

BLENDY HYEDRA DE CAMPOS

**ESTUDO DA FISIOPATOLOGIA CARDIOVASCULAR DE
RATAS INDUZIDAS AO PARKINSONISMO POR 6-
HIDROXIDOPAMINA, OVARECTOMIZADAS E TRATADAS
COM ESTRÓGENO**

BLENDA HYEDRA DE CAMPOS

Estudo da fisiopatologia cardiovascular de ratas induzidas ao parkinsonismo por 6-hidroxidopamina, ovariectomizadas e tratadas com estrógeno

LONDRINA

2024

BLENDA HYEDRA DE CAMPOS

Estudo da fisiopatologia cardiovascular de ratas induzidas ao parkinsonismo por 6-hidroxidopamina, ovariectomizadas e tratadas com estrógeno

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de doutora.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marli Cardoso Martins-Pinge.

Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Henrique Borges

LONDRINA

2024

BLENDA HYEDRA DE CAMPOS

Estudo da fisiopatologia cardiovascular de ratas induzidas ao parkinsonismo por 6-hidroxidopamina, ovariectomizadas e tratadas com estrógeno

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de doutora.

Comissão Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Marli Cardoso Martins-Pinge
Membro Titular
Universidade Estadual de Londrina

Prof.^a Dr.^a Gislaine Garcia Pelosi Gomes
Membro Titular
Universidade Estadual de Londrina

Prof.^a Dr.^a Giovana Gomes de Carvalho Ishiuchi
Membro Titular
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Fábio Nelson Gava
Membro Titular
Universidade Estadual de Londrina

Prof.^a Dr.^a Maria Andréia Delbin
Membro Titular
Universidade Estadual de Campinas

Londrina, 24 de junho de 2024.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha gratidão a todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Primeiramente, agradeço à Deus, por todas as bençãos e oportunidades a mim concedidas, e pela força para superar todos os obstáculos no caminho.

À minha orientadora, Dr.^a Marli Cardoso Martins-Pinge, pelo apoio, incentivo e ensinamentos ao longo dos mais de 10 anos em que fiz parte de seu grupo de trabalho.

À minha família, que sempre foi muito incentivadora em todos os meus objetivos. Em especial, meus pais, que nunca mediram esforços para que eu tivesse uma boa educação. Meu esposo, que acompanhou cada passo da minha caminhada na vida acadêmica, e que foi suporte essencial, principalmente depois do nascimento da nossa filha, Luiza. Agradeço também à Luiza, que desde que chegou ao mundo transformou minha vida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, pela oportunidade de realização deste trabalho. A todos os professores, colegas e funcionários do departamento, que sempre estão dispostos a ajudar.

Aos colegas de laboratório, pela parceria e colaboração durante todo o tempo que passamos juntos. Principalmente, Lorena e Gabriela, que tornaram a rotina de trabalho muito mais agradável e se tornaram amigas que vou levar no coração. Também, a todos os professores e colaboradores deste trabalho que tornaram possível a sua realização.

À Capes, pelo apoio financeiro.

DE CAMPOS, Blenda Hyedra. **Estudo da fisiopatologia cardiovascular de ratas induzidas ao parkinsonismo por 6-hidroxidopamina, ovariectomizadas e tratadas com estrógeno.** Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Centro de Ciências Biológicas. Departamento de Ciências Fisiológicas. Universidade Estadual de Londrina. 2024. 98p.

Resumo: A doença de Parkinson é uma doença neurológica idiopática caracterizada pela perda de neurônios dopaminérgicos na substância negra *pars compacta* (SNpc), levando a uma diminuição da dopamina no corpo estriado. Além dos sintomas motores clássicos, a DP apresenta vários sintomas não motores, incluindo alterações cardiovasculares, como hipotensão ortostática e pós-prandial e instabilidade da pressão arterial. A menor prevalência de DP em mulheres pode estar relacionada ao possível efeito neuroprotetor do estrogênio. Estudos apontam para o envolvimento do estresse oxidativo na neurodegeneração da DP, porém, ainda não há evidências sobre isso em órgãos periféricos. Não há estudos que elucidem participação do estrogênio nas alterações cardiovasculares em mulheres induzidas parkinsonismo, bem como seus efeitos no equilíbrio redox nos órgãos do sistema cardiovascular. Este estudo tem como objetivo avaliar o papel do estrogênio nos parâmetros cardiovasculares, autonômicos, oxidativos e morfológicos de ratas ovariectomizadas induzido ao parkinsonismo e tratado com estrogênio. Ratas Wistar foram submetidas à ovariectomia (OVX). As ratas foram tratadas com estradiol (1mg/Kg) ou óleo de amêndoas (veículo). Após 7 dias, foi realizada a infusão bilateral de 6-OHDA na SNpc para induzir parkinsonismo ou infusão de solução salina para o grupo de controle. No 14º dia experimental, os animais utilizados para análise de parâmetros cardiovasculares foram submetidos ao cateterismo ou avaliação de ECG. Após 24 horas, os animais cateterizados foram submetidos ao registro de PA e FC. Os animais usados para análise do equilíbrio redox e análises histológicas foram eutanasiados, também no 15º dia, e foram coletados ventrículo direito, esquerdo e aorta torácica para análise de danos oxidativos e antioxidantes, análises morfológicas, de apoptose e quantificação de colágeno e elastina. Não houve diferenças significativas na PAM e FC entre os grupos; contudo, o eletrocardiograma revelou alterações que resultaram no aumento do segmento ST, causado tanto pelo parkinsonismo quanto pelo tratamento com estradiol, indicando uma extensão do potencial de ação nos ventrículos. Os resultados de dano oxidativo e das barreiras antioxidantes variaram entre os órgãos analisados, com diferentes alterações decorrentes da lesão por 6-OHDA ou do tratamento com estradiol, dependendo do tecido examinado. A indução do parkinsonismo promoveu apoptose no coração, que foi parcialmente reduzida pelo tratamento hormonal. Houve uma diminuição do colágeno nos ventrículos e na aorta torácica devido ao

parkinsonismo, e o estradiol não conseguiu reverter essa alteração. No coração, o tratamento com estradiol aumentou a quantidade de elastina, enquanto na aorta, esse aumento foi provocado pelo parkinsonismo. Devido à variabilidade nos resultados entre os órgãos avaliados, é difícil determinar a relevância fisiopatológica das alterações causadas pelo parkinsonismo e o papel do estrógeno nessas mudanças. Portanto, estudos adicionais são necessários para elucidar os mecanismos de ação envolvidos.

Palavras-chave: pressão arterial; autonômico; estresse oxidativo; Parkinson; estrógeno.

DE CAMPOS, Blenda Hyedra. **Study of the cardiovascular pathophysiology of female rats induced with parkinsonism by 6-hydroxydopamine, ovariectomized, and treated with estrogen.** Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Centro de Ciências Biológicas. Departamento de Ciências Fisiológicas. Universidade Estadual de Londrina. 2024. 98p.

Abstract: Parkinson's disease is an idiopathic neurological disease characterized by the loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra *pars compacta* (SNpc), leading to a decrease in dopamine in the striatum. In addition to classic motor symptoms, PD presents several non-motor symptoms, including cardiovascular alterations such as orthostatic and postprandial hypotension and blood pressure instability. The lower prevalence of PD in women may be related to the possible neuroprotective effect of estrogen. Studies indicate the involvement of oxidative stress in PD neurodegeneration; however, there is still no evidence of this in peripheral organs. There are no studies elucidating the participation of estrogen in cardiovascular alterations in women with induced parkinsonism, as well as its effects on redox balance in cardiovascular organs. This study aims to evaluate the role of estrogen in cardiovascular, autonomic, oxidative, and morphologic parameters of ovariectomized rats induced with parkinsonism and treated with estrogen. Wistar rats underwent ovariectomy (OVX). The rats were treated with estradiol (1mg/Kg) or almond oil (vehicle). After 7 days, bilateral infusion of 6-OHDA into the SNpc was performed to induce parkinsonism or saline infusion for the control group. On the 14th experimental day, the animals used for cardiovascular parameter analysis underwent catheterization or ECG evaluation. After 24 hours, the catheterized animals underwent recording of blood pressure and heart rate. The animals used for redox balance analysis and histological analyses were euthanized, also on the 15th day, and right and left ventricles and thoracic aorta were collected for oxidative and antioxidant damage analysis, morphological, apoptotic, collagen, and elastin quantification. There were no significant differences in MAP and HR between the groups; however, the electrocardiogram revealed alterations that resulted in an increased ST segment, caused by both parkinsonism and estradiol treatment, indicating an extension of the ventricular action potential. The results of oxidative damage and antioxidant barriers varied among the organs analyzed, showing different alterations due to 6-OHDA lesion or estradiol treatment, depending on the tissue examined. Parkinsonism induction promoted apoptosis in the heart, which was partially reduced by hormonal treatment. There was a decrease in collagen in the ventricles and thoracic aorta due to parkinsonism, and estradiol could not reverse this change. In the heart, estradiol treatment increased the amount of elastin, whereas in the aorta, this increase was caused by parkinsonism.

Due to the variability in results among the organs evaluated, it is difficult to determine the pathophysiological relevance of the alterations caused by parkinsonism and the role of estrogen in these changes. Therefore, further studies are necessary to elucidate the mechanisms of action involved.

Keywords: blood pressure; autonomic; oxidative stress; Parkinson; estrogen.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Representação esquemática da metodologia utilizada no estudo 1, de acordo com o dia experimental e o procedimento realizado. 34
- Figura 2. Representação esquemática da metodologia utilizada no estudo 2, de acordo com o dia experimental e o procedimento realizado. 38
- Figura 3. Representação esquemática da metodologia utilizada no estudo 3, de acordo com o dia experimental e o procedimento realizado. 40
- Figura 4. Efeito do tratamento com estradiol e indução de parkinsonismo no peso uterino (A), comprimento da tíbia (B) e razão útero/tíbia (C) de ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol ou veículo (óleo de amêndoas) e submetidas à lesão por 6-OHDA ou SHAM (veículo). O peso uterino e a razão útero/tíbia foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey e os resultados estão expressos como média $\pm$ DP. O comprimento da tíbia foi analisado por Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn e o resultado expresso como mediana $\pm$ intervalo interquartil. Nível de significância: $p < 0,05$. OVX+V-SHAM $n=16$; OVX+E-SHAM $n=15$; OVX+V-6-OHDA $n=16$; OVX+E-6-OHDA $n=17$. **** $p < 0,0001$ 43
- Figura 5. Concentração de dopamina (DA) no estriado após 7 dias de infusão bilateral de veículo (SHAM) ou 6-OHDA em ratas ovariectomizadas tratadas com veículo (óleo de amêndoas) ou estradiol, utilizadas para a avaliação dos parâmetros cardiovasculares. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey. Os resultados são expressos como média $\pm$ DP. Nível de significância: $p < 0,05$. OVX+V-SHAM $n=18$; OVX+E-SHAM $n=18$; OVX+V-6-OHDA $n=19$; OVX+E-6-OHDA $n=19$. **** $p < 0,0001$ 43
- Figura 6. Parâmetros cardiovasculares de ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol ou veículo (óleo de amêndoas) e submetidas à lesão por 6-OHDA ou SHAM (veículo). Os dados foram analisados por Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn. Os resultados são expressos como mediana $\pm$ intervalo interquartil. Nível de significância: $p < 0,05$. OVX+V-SHAM $n=16$; OVX+E-SHAM $n=18$; OVX+V-6-OHDA $n=16$; OVX+E-6-OHDA $n=18$ 44
- Figura 7. Análise espectral de PAS e IP e sensibilidade barorreflexa de ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol ou veículo (óleo de amêndoas) e submetidas à lesão por 6-OHDA ou SHAM (veículo). LFnu, HFnu, Ganho Barorreflexo Down e índice de efetividade barorreflexa (IEB) foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey e os resultados são expressos como média $\pm$ DP. Os outros dados foram analisados por Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn e os resultados são expressos como mediana $\pm$ intervalo interquartil. Nível de significância: $p < 0,05$. OVX+V-SHAM $n=16$; OVX+E-SHAM $n=18$; OVX+V-6-OHDA $n=16$; OVX+E-6-OHDA $n=18$ 45

Tabela 1. Dados de batimentos cardíacos por minuto. Durante o exame de eletrocardiografia, os batimentos cardíacos dos animais em questão foram registrados sob a influência de anestesia. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste de Tukey. Nível de significância: $p < 0,05$. A letra (a) representa a diferença entre OVX+V-6-OHDA e OVX+V-SHAM. 46

Figura 8. Representação esquemática das ondas de eletrocardiograma. O gráfico ilustra os traçados do eletrocardiograma em ratas fêmeas, com e sem indução de parkinsonismo, e submetidas a tratamento com estradiol ou veículo (óleo de amêndoas). Os registros dos eletrocardiogramas foram realizados a uma velocidade de 25mm/s. No entanto, ao aumentar a velocidade para 50mm/s, torna-se mais evidente a visualização do traçado da onda U. As setas indicam anormalidades nos exames quando comparados ao grupo controle correspondente. 48

Figura 9. Resultados das ondas apresentadas no exame de eletrocardiograma em fêmeas induzidas ou não ao parkinsonismo e tratadas ou não com estradiol. Os gráficos A, B, C, D e E, representam a amplitude (AMP) e o comprimento (COMP) das ondas individuais. A análise foi realizada separadamente para cada onda, utilizando ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey. Nível de significância: $p < 0,05$ 49

Figura 10. Resultados dos segmentos apresentados no exame de eletrocardiograma em fêmeas induzidas ou não ao parkinsonismo e tratadas ou não com estradiol. Os gráficos A, B, C, D e E, representam os diferentes segmentos utilizados. A análise foi realizada cada segmento utilizando ANOVA de duas vias, seguido pelo pós-teste de Tukey. Nível de significância: $p < 0,05$ 50

Figura 11. Efeito do tratamento com estradiol e indução de parkinsonismo no peso uterino (A), comprimento da tíbia (B) e relação útero/tíbia (C) de ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol ou veículo (óleo de amêndoas) e submetidas a lesão por 6-OHDA ou SHAM (veículo). O peso uterino foi analisado por ANOVA de 2 vias seguida pelo pós-teste de Tukey e seus resultados são expressos como média $\pm$ DP. O comprimento da tíbia e a relação útero/tíbia foram analisados por Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn e os resultados são expressos como mediana $\pm$ intervalo interquartil. OVX+V-SHAM $n=10$; OVX+E-SHAM $n=11$; OVX+V-6-OHDA $n=11$; OVX+E-6-OHDA $n=11$. ** $p < 0,01$ **** $p < 0,0001$ 58

Figura 12. Concentração de dopamina (DA) no estriado após 7 dias de infusão bilateral de veículo (SHAM) ou 6-OHDA em ratas ovariectomizadas tratadas com veículo (óleo de amêndoas) ou estradiol, utilizadas para a avaliação do balanço redox. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey. Os resultados são expressos como média $\pm$ DP. Nível de significância: $p < 0,05$. OVX+V-SHAM $n=9$; OVX+E-SHAM $n=11$; OVX+V-6-OHDA $n=8$; OVX+E-6-OHDA $n=11$. **** $p < 0,0001$ 59

Figura 13. Quantificação de TBARS, MDA, PC, NO₂⁻, SOD, CAT e GST no ventrículo direito de ratas ovariectomizadas tratadas com veículo (óleo de amêndoas) ou estradiol e induzidas ao parkinsonismo com 6-OHDA ou controle SHAM (salina). Os dados foram analisados por ANOVA de 2 vias seguidas pelo pós-teste de Tukey. Os resultados são expressos como média ± DP. OVX+V-SHAM n=9; OVX+E-SHAM n=11; OVX+V-6-OHDA n=8; OVX+E-6-OHDA n=11. *p<0,05 ****p<0,0001. 61

Figura 14. Quantificação de TBARS, MDA, PC, NO₂⁻, SOD, CAT e GST no ventrículo esquerdo de ratas ovariectomizadas tratadas com veículo (óleo de amêndoas) ou estradiol e induzidas ao parkinsonismo com 6-OHDA ou controle SHAM (salina). Os dados foram analisados por ANOVA de 2 vias seguidas pelo pós-teste de Tukey. Os resultados são expressos como média ± DP. OVX+V-SHAM n=9; OVX+E-SHAM n=11; OVX+V-6-OHDA n=8; OVX+E-6-OHDA n=11. *p<0,05 **p<0,01 ****p<0,0001. 63

Figura 15. Quantificação de TBARS, MDA, PC, NO₂⁻, SOD, CAT e GST na aorta torácica de ratas ovariectomizadas tratadas com veículo (óleo de amêndoas) ou estradiol e induzidas ao parkinsonismo com 6-OHDA ou controle SHAM (salina). Os dados foram analisados por ANOVA de 2 vias seguidas pelo pós-teste de Tukey. Os resultados são expressos como média ± DP. OVX+V-SHAM n=9; OVX+E-SHAM n=11; OVX+V-6-OHDA n=8; OVX+E-6-OHDA n=11. *p<0,05 **p<0,01 ****p<0,0001. 65

Figura 16. Efeito do tratamento com estradiol e indução de parkinsonismo no peso uterino (A), comprimento da tíbia (B) e razão útero/tíbia (C) de ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol ou veículo (óleo de amêndoas) e submetidas à lesão por 6-OHDA ou SHAM (veículo). O peso uterino e a razão útero/tíbia foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey e os resultados estão expressos como média ± DP. O comprimento da tíbia foi analisado por Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn e o resultado expresso como mediana ± intervalo interquartil. Nível de significância: p<0,05. OVX+V-SHAM n=7; OVX+E-SHAM n=8; OVX+V-6-OHDA n=6; OVX+E-6-OHDA n=6. ***p<0,001 ****p<0,0001. 71

Figura 17. Concentração de dopamina (DA) no estriado após 7 dias de infusão bilateral de veículo (SHAM) ou 6-OHDA em ratas ovariectomizadas tratadas com veículo (óleo de amêndoas) ou estradiol, utilizadas para a avaliação do balanço redox. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey. Os resultados são expressos como média ± DP. Nível de significância: p<0,05. OVX+V-SHAM n=8; OVX+E-SHAM n=8; OVX+V-6-OHDA n=7; OVX+E-6-OHDA n=8. ****p<0,0001. 72

Figura 18. Avaliação morfológica com coloração de HE. Corte histológico de ventrículo direito e esquerdo de ratas ovariectomizadas tratadas com veículo (óleo de amêndoas) ou estradiol e induzidas ao parkinsonismo com 6-OHDA ou controle SHAM (salina). As imagens foram utilizadas para avaliação da

espessura do ventrículo direito (A) e ventrículo esquerdo (B), no aumento de 50x. Os dados foram analisados por ANOVA de 2 vias seguidas pelo pós-teste de Tukey. Os resultados são expressos como média $\pm$ DP. OVX+V-SHAM n=13; OVX+E-SHAM n=11; OVX+V-6-OHDA n=9; OVX+E-6-OHDA n=18. *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001. 74

Figura 19. Avaliação de morte celular por ensaio de túnel. Corte histológico de coração de ratas ovariectomizadas tratadas com veículo (óleo de amêndoas) ou estradiol e induzidas ao parkinsonismo com 6-OHDA ou controle SHAM (salina). As imagens foram utilizadas para avaliação do número de apoptoses nos tecidos, em aumento de 400x. Os dados foram analisados por ANOVA de 2 vias seguidas pelo pós-teste de Tukey. Os resultados são expressos como média $\pm$ DP. OVX+V-SHAM n=8; OVX+E-SHAM n=8; OVX+V-6-OHDA n=9; OVX+E-6-OHDA n=9. **p<0,01 ****p<0,0001..... 75

Figura 20. Avaliação de colágeno no tecido com coloração de Sirius Red. Corte histológico de ventrículo direito e esquerdo de ratas ovariectomizadas tratadas com veículo (óleo de amêndoas) ou estradiol e induzidas ao parkinsonismo com 6-OHDA ou controle SHAM (salina), em aumento de 50x. Os dados foram analisados por ANOVA de 2 vias seguidas pelo pós-teste de Tukey. Os resultados são expressos como média $\pm$ DP. OVX+V-SHAM n=8; OVX+E-SHAM n=8; OVX+V-6-OHDA n=9; OVX+E-6-OHDA n=9. ****p<0,0001..... 76

Figura 21. Avaliação de quantidade de elastina no tecido com coloração de Weigert. Corte histológico de ventrículo direito e esquerdo de ratas ovariectomizadas tratadas com veículo (óleo de amêndoas) ou estradiol e induzidas ao parkinsonismo com 6-OHDA ou controle SHAM (salina), em aumento de 50x. Os dados foram analisados por ANOVA de 2 vias seguidas pelo pós-teste de Tukey. Os resultados são expressos como média $\pm$ DP. OVX+V-SHAM n=8; OVX+E-SHAM n=8; OVX+V-6-OHDA n=9; OVX+E-6-OHDA n=9. *p<0,05 ****p<0,0001. 77

Figura 22. Avaliação morfológica com coloração de HE. Corte histológico de aorta torácica de ratas ovariectomizadas tratadas com veículo (óleo de amêndoas) ou estradiol e induzidas ao parkinsonismo com 6-OHDA ou controle SHAM (salina). As imagens foram utilizadas para avaliação da espessura da aorta torácica (A), camada muscular (B) e túnica externa (C), em aumento de 100x. Os dados foram analisados por ANOVA de 2 vias seguidas pelo pós-teste de Tukey. Os resultados são expressos como média $\pm$ DP. OVX+V-SHAM n=13; OVX+E-SHAM n=11; OVX+V-6-OHDA n=9; OVX+E-6-OHDA n=18. 78

Figura 23. Avaliação de morte celular por ensaio de túnel. Corte histológico de aorta torácica de ratas ovariectomizadas tratadas com veículo (óleo de amêndoas) ou estradiol e induzidas ao parkinsonismo com 6-OHDA ou controle SHAM (salina). As imagens foram utilizadas para avaliação do número de apoptoses no tecido, em aumento de 400x. Devido à ausência de pontos de

apoptose, não há dados quantitativos. OVX+V-SHAM n=8; OVX+E-SHAM n=8; OVX+V-6-OHDA n=9; OVX+E-6-OHDA n=9. 79

Figura 24. Avaliação de quantidade de colágeno no tecido com coloração de Sirius Red. Corte histológico de aorta torácica de ratas ovariectomizadas tratadas com veículo (óleo de amêndoas) ou estradiol e induzidas ao parkinsonismo com 6-OHDA ou controle SHAM (salina), em aumento de 100x. Os dados foram analisados por ANOVA de 2 vias seguidas pelo pós-teste de Tukey. Os resultados são expressos como média $\pm$ DP. OVX+V-SHAM n=8; OVX+E-SHAM n=8; OVX+V-6-OHDA n=9; OVX+E-6-OHDA n=9. ****p<0,0001. 80

Figura 25. Avaliação de quantidade de elastina no tecido com coloração de Weigert. Corte histológico de aorta torácica de ratas ovariectomizadas tratadas com veículo (óleo de amêndoas) ou estradiol e induzidas ao parkinsonismo com 6-OHDA ou controle SHAM (salina), em aumento de 100x. Os dados foram analisados por ANOVA de 2 vias seguidas pelo pós-teste de Tukey. Os resultados são expressos como média $\pm$ DP. OVX+V-SHAM n=8; OVX+E-SHAM n=8; OVX+V-6-OHDA n=9; OVX+E-6-OHDA n=9. *p<0,05 ***p<0,001. 81

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

6-OHDA: 6-hidroxidopamina
AMP: amplitude
BRS: sensibilidade do barorreflexo
CAT: catalase
COMP: comprimento
DA: dopamina
DAT: transportadores de dopamine
DDCI: inibidores de dopa-descarboxilase
DM1: diabetes mellitus tipo 1
DP: doença de Parkinson
ECG: eletrocardiograma
ERO: espécies reativas de oxigênio
FC: frequência cardíaca
GSH: glutathiona reduzida
GSH-Px: glutathiona peroxidase
GSSH: glutathiona oxidada
GST: glutathiona S-transferase
HE: hematoxilina e eosina
HF: *high frequency*
ICD: insuficiência cardíaca diastólica
ICS: insuficiência cardíaca sistólica
IEB: índice de efetividade barorreflexa
IM: intramuscular
IP: intervalo de pulso
LF: *low frequency*
LPS: lipopolissacarídeo
MDA: malondialdeído
MMP: metaloproteinases de matriz

MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina

NO: óxido nítrico

NO₂⁻: nitrito

OVX: ovariectomia

PA: pressão arterial

PAM: pressão arterial média

PAS: pressão arterial sistólica

PBS: salina tamponada com fosfato

PC: proteína Carbonilada

SEG: segmento

SNA: sistema nervoso autônomo

SNP: sistema nervoso parassimpático

SNpc: Substância negra *pars compacta*

SNS: sistema nervoso simpático

SOD: superóxido dismutase

TBARS: Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

TH: tirosina hidroxilase

TIMP: inibidor de metaloproteinases de matriz

VD: ventrículo direito

VE: ventrículo esquerdo

VFC: variabilidade da frequência cardíaca

VLF: *very low frequency*

VO: via oral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. JUSTIFICATIVA	26
3. OBJETIVOS	27
3.1. Objetivo geral	27
3.2. Objetivos específicos	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
Estudo 1 – Análise dos parâmetros cardiovasculares	31
Estudo 2 – Análise do Balanço Redox	35
Estudo 3 – Análises Histológicas	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	42
5.1. Resultados Estudo 1 – Análise dos parâmetros cardiovasculares	42
5.2. Discussão Estudo 1 – Análise dos parâmetros cardiovasculares	51
5.3. Resultados Estudo 2 – Análise do balanço redox	57
5.4. Discussão Estudo 2 – Análise do balanço redox	66
5.5. Resultados Estudo 3 – Análises histológicas	71
5.6. Discussão Estudo 3 – Análises histológicas	82
6. CONCLUSÃO	86
7. REFERÊNCIAS	88

1. INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson (DP) é uma desordem neurodegenerativa que afeta aproximadamente 0,3% da população geral e 1% das pessoas com mais de 60 anos, sendo a segunda doença neurodegenerativa mais comum. A incidência anual varia entre 5 e 35 casos por 100.000 habitantes, aumentando significativamente de 5 a 10 vezes da sexta para a nona década de vida. A prevalência da DP também cresce com a idade: uma metanálise em quatro populações norte-americanas revelou que a prevalência, inferior a 1% entre homens e mulheres de 45 a 54 anos, sobe para 4% entre homens e 2% entre mulheres com 85 anos ou mais (MARRAS et al., 2018; TWELVES; PERKINS; COUNSELL, 2003). A DP tem apresentado um aumento notável em prevalência, incapacidade e mortalidade, com o número de pessoas afetadas dobrando globalmente entre 1990 e 2015 e possivelmente dobrando novamente até 2040 devido ao aumento da expectativa de vida (DE LAU; BRETELER, 2006; DORSEY et al., 2018; FEIGIN et al., 2017).

Com o aumento na prevalência, os encargos sociais e econômicos também aumentam. A deterioração da qualidade de vida dos pacientes e cuidadores resulta em impacto econômico significativo e eleva os custos financeiros para as famílias e para a sociedade, em termos de assistência social e cuidados de saúde (GUMBER; RAMASWAMY; THONGCHUNDEE, 2019). Dessa forma, o impacto da doença envolve além da saúde, a economia e aspectos sociais e familiares da sociedade.

A DP é descrita como uma doença progressiva de início lento, que pode começar anos antes de ser diagnosticada. Sua etiologia é multifatorial, envolvendo a interação entre fatores genéticos e ambientais, como exposição a

193 pesticidas, uso de drogas e envelhecimento, além de envolver diversos
194 mecanismos biológicos e afetar múltiplas áreas do sistema nervoso. Evidências
195 sugerem que a disfunção mitocondrial desempenha um papel importante no
196 desenvolvimento da DP (BEITZ, 2014; BORSCHE et al., 2021; KALIA; LANG,
197 2015; SCHAPIRA; GEGG, 2011; TRINH et al., 2021; TRIST; HARE; DOUBLE,
198 2019).

199 A via dopaminérgica nigroestriatal, composta por neurônios
200 dopaminérgicos cujos corpos celulares estão localizados na substância negra
201 pars compacta (SNpc) do mesencéfalo e projetam seus axônios para o corpo
202 estriado, é crucial na DP. A fisiopatologia da DP envolve a morte progressiva
203 desses neurônios, reduzindo as fibras dopaminérgicas que se projetam para o
204 estriado dorsal e dessa forma diminuindo as concentrações de dopamina (DA).
205 Além disso, há uma diminuição na atividade das enzimas responsáveis pela
206 síntese de DA, como a tirosina hidroxilase (TH) e DOPA-descarboxilase (SIAN
207 et al., 1994). A formação de corpos de Lewy, agregados insolúveis de α -
208 sinucleína em inclusões intracitoplasmáticas, também é uma característica
209 marcante da DP (BALESTRINO; SCHAPIRA, 2020; KALIA; LANG, 2015; LANG;
210 LOZANO, 1998; SIMON; TANNER; BRUNDIN, 2020).

211 O diagnóstico da DP é majoritariamente clínico, baseado na presença de
212 sintomas cardinais, e na melhora desses sintomas após o uso do tratamento com
213 levodopa. Os principais sintomas cardinais são o tremor em repouso,
214 instabilidade postural, rigidez e bradicinesia ou acinesia, geralmente
215 manifestados de forma unilateral ou assimétrica. No entanto, a precisão
216 diagnóstica durante a vida é limitada, com a confirmação em 75 a 95% dos casos
217 ocorrendo apenas na autópsia. A exatidão do diagnóstico varia conforme a

duração da doença, idade do paciente, habilidade médica e avanços no conhecimento sobre a DP (POSTUMA et al., 2015). Os sintomas motores surgem após uma perda significativa (cerca de 50 a 60%) dos neurônios dopaminérgicos, indicando que a neurodegeneração já se espalhou para outras áreas do sistema nervoso (BALESTRINO; SCHAPIRA, 2020; SCHAPIRA; CHAUDHURI; JENNER, 2017; SCHAPIRA; GEGG, 2011; SCHAPIRA; TOLOSA, 2010).

A DP também apresenta sintomas não-motores, que incluem disfunções autonômicas, anormalidades cognitivas, sensoriais, gastrointestinais e distúrbios do sono. Estes sintomas têm prevalência e influência variáveis entre diferentes países e culturas (JANKOVIC, 2008; SHALASH et al., 2018). Alguns sintomas não motores podem preceder a disfunção motora em vários anos, podendo variar de acordo com cada paciente. Estes podem diminuir a qualidade de vida dos portadores da doença e podem ter impacto até maior do que os sintomas motores, com isso, se dá a relevância em estudar essas disfunções. (SCHAPIRA; CHAUDHURI; JENNER, 2017; SIMON; TANNER; BRUNDIN, 2020).

Disautonomias, ou disfunções do sistema nervoso autônomo (SNA), constituem um subconjunto significativo dos sintomas não motores da DP. Essas disfunções podem ser causadas por alterações no SNA, pela medicação utilizada para tratar a DP ou por uma combinação de ambos (NICARETTA; PEREIRA; PIMENTEL, 1998). O SNA regula funções vitais como a FC e a PA por meio do sistema nervoso simpático (SNS) e parassimpático (SNP). Embora inicialmente se acreditasse que as disautonomias ocorriam apenas em estágios avançados da DP, estudos mostram que elas podem estar presentes em qualquer fase da doença, independentemente do tratamento medicamentoso

(ASAHINA et al., 2013; SCHREMPF et al., 2014). Atualmente, os tratamentos para disautonomias são limitados ao alívio sintomático, devido ao desconhecimento sobre a etiologia específica dessas disfunções e da DP em geral.

Cerca de 80% dos pacientes com DP podem apresentar disfunções autonômicas cardíacas. A variabilidade da frequência cardíaca (VFC) tende a diminuir na DP, e uma frequência cardíaca mais baixa pode ser observada já no diagnóstico (PALMA et al., 2013). A hipotensão ortostática, caracterizada pela incapacidade de regular a PA durante mudanças de posição corporal, afeta cerca de 40% dos pacientes com DP, causando tonturas, síncope e, aumentando o risco de quedas e lesões. Outros problemas associados incluem hipotensão pós-prandial, labilidade da PA, hipertensão supina, fadiga e intolerância ao exercício (JAIN; GOLDSTEIN, 2012; PFEIFFER, 2016; SCHAPIRA; CHAUDHURI; JENNER, 2017). As disfunções cardíacas parecem ser resultado de respostas parassimpáticas inadequadas, enquanto a regulação deficiente da PA está relacionada à perda da regulação simpática (JAIN; GOLDSTEIN, 2012).

Pesquisas indicam que a hipotensão ortostática na DP está ligada tanto à perda da inervação simpática pós-ganglionar do coração quanto à insuficiência do barorreflexo (JAIN; GOLDSTEIN, 2012; METZGER; EMBORG, 2019). Aproximadamente 60% dos pacientes com DP apresentam perda da inervação simpática cardíaca no momento do diagnóstico (KASHIHARA; IMAMURA; SHINYA, 2010).

As diferenças entre os sexos na DP são complexas e desafiadoras. A incidência da DP é maior em homens, especialmente entre 60 e 69 anos, enquanto em mulheres está entre 70 e 79 anos (HIRSCH et al., 2016). A

prevalência da DP e da demência também é maior em homens (SAVICA et al., 2018). O impacto psicológico do diagnóstico de demência é mais significativo em mulheres (LARSSON; TORISSON; LONDOS, 2018). Estudos mostram que os cérebros dos homens exibem mais alterações em várias regiões cerebrais, sugerindo maior neurodegeneração em homens ou um possível efeito neuroprotetor em mulheres, relacionado a fatores como expressão gênica desregulada, hormônios sexuais, à vulnerabilidade no sistema dopaminérgico, células neuroinflamatórias e estresse oxidativo (CERRI; MUS; BLANDINI, 2019; TREMBLAY et al., 2020; VAIDYA et al., 2021).

Ao considerar a expressão de várias doenças cardiovasculares, é importante lembrar que: os receptores para esteroides sexuais estão presentes na maioria dos tecidos corporais, embora tenha variação na sua expressão relativa. O estrogênio é um produto metabólico da testosterona, ambos presentes em homens e mulheres, mas em proporções diferentes. As concentrações de esteroides sexuais variam ao longo da vida, aumentando na puberdade, durante a gravidez, e diminuindo nas mulheres durante a transição para a menopausa (SHUFELT et al., 2018). As diferenças sexuais no desenvolvimento de cardiopatias na DP ainda são pouco compreendidas, e mais estudos são necessários para investigar essa área.

Após a descoberta da via de síntese da DA e sua relação com a DP, estudos sobre o fármaco levodopa foram iniciados. A levodopa é um precursor de dopamina e é amplamente reconhecida como o tratamento farmacológico mais eficaz para a DP, promovendo alívio nos sintomas motores e na qualidade de vida dos pacientes. É frequentemente administrada em combinação com inibidores da dopa-descarboxilase (DDCI) para aumentar a disponibilidade de

293 levodopa no cérebro e reduzir os efeitos colaterais periféricos (AZEVEDO;
294 CARDOSO, 2009; FAHN, 2008; SALAT; TOLOSA, 2013). A administração
295 contínua de levodopa pode levar ao desenvolvimento de complicações motoras,
296 como flutuações nas respostas e discinesias. Estas complicações estão
297 relacionadas à entrega intermitente de levodopa ao cérebro, o que provoca
298 estimulação pulsátil dos receptores de dopamina (DAMIER et al., 2008;
299 SCHAPIRA et al., 2009).

300 Modelos experimentais em animais são ferramentas essenciais para
301 estudar as diferentes fases e condições de doenças humanas. Um modelo
302 animal deve replicar características patológicas, histológicas e bioquímicas da
303 doença humana, além de reproduzir os distúrbios funcionais associados (BLESA
304 et al., 2012; DUTY; JENNER, 2011). No caso da DP, existem diversos modelos
305 capazes de induzir parkinsonismo ou imitar alguns sintomas da DP, incluindo
306 modelos farmacológicos como a Reserpina e o Haloperidol, modelos genéticos
307 e modelos induzidos por neurotoxinas (BLESA et al., 2012; DUTY; JENNER,
308 2011). Entre as neurotoxinas utilizadas para induzir parkinsonismo, destacam-se
309 a 6-hidroxidopamina (6-OHDA), Rotenona, Paraquat, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-
310 tetraidropiridina (MPTP), lipopolissacarídeo (LPS) e metanfetamina. Estas toxinas
311 visam lesionar a via nigroestriatal (BLESA et al., 2012; DUTY; JENNER, 2011).

312 Até o momento, nenhum modelo animal é capaz de reproduzir todas as
313 características da DP humana (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; DUTY;
314 JENNER, 2011). No entanto, cada modelo possui características
315 complementares que ajudam a esclarecer a fisiopatologia da doença e a explorar
316 novas abordagens de estudo (FRANCARDO, 2018).

317 Um dos modelos mais utilizados para a indução de parkinsonismo é a
318 lesão com a toxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA) na substância negra pars
319 compacta (SNpc). A 6-OHDA, que não atravessa a barreira hematoencefálica,
320 deve ser administrada diretamente na área a ser lesionada, como a SNpc, o
321 estriado ou o feixe prosencefálico medial. Após a infusão, a 6-OHDA é captada
322 pelos transportadores de dopamina (DAT) e concentrada nos terminais nervosos
323 de dopamina, inibindo o complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, levando
324 à produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e à morte dos neurônios
325 dopaminérgicos (ZIGMOND; SMEYNE, 2014). A lesão com 6-OHDA não induz a
326 formação de corpos de Lewy (BLESA et al., 2012).

327 A 6-OHDA também pode ser administrada diretamente no estriado,
328 induzindo a degeneração das células dopaminérgicas da substância negra e
329 resultando em alterações semelhantes à DP, como disfunção mitocondrial,
330 estresse oxidativo, inflamação e degeneração da via nigroestriatal (DUTY;
331 JENNER, 2011; FRANCARDO, 2018). No modelo bilateral de 6-OHDA, observa-
332 se uma redução de dopamina após sete dias de lesão, com alterações
333 comportamentais, como redução na locomoção, diminuição da frequência de
334 apoio nas patas traseiras e aumento do tempo de imobilidade (ARIZA et al.,
335 2010). Portanto, o modelo de parkinsonismo induzido por 6-OHDA é
336 frequentemente utilizado para replicar a depleção dopaminérgica característica
337 da DP.

338 A infusão bilateral da 6-OHDA na SNpc é utilizada como um modelo
339 eficiente para avaliar os parâmetros cardiovasculares envolvidos no
340 parkinsonismo. Ratos Wistar machos submetidos à infusão bilateral de 6-OHDA
341 na SNpc apresentaram redução na pressão arterial média (PAM) e na FC basais,

342 diminuição da modulação simpática da pressão arterial sistólica e aumento da
343 sensibilidade do quimiorreflexo e do barorreflexo (ARIZA et al., 2015a, 2015b;
344 DE CAMPOS et al., 2020; DE JAGER et al., 2018; TUROSSI AMORIM et al.,
345 2019). Em ratas Wistar fêmeas, não foram observadas alterações nos
346 parâmetros cardiovasculares. No entanto, quando submetidas à ovariectomia,
347 houve uma diminuição na PAM semelhante à observada nos machos, sugerindo
348 a participação de hormônios ovarianos (DE CAMPOS et al., 2020).

349 Diversos estudos indicam que o estrogênio possui um papel protetor em
350 diferentes modelos de DP. Makav e colaboradores demonstraram que o
351 estrogênio teve efeito significativo nas atividades motores e efeito protetor nos
352 neurônios dopaminérgicos da SNpc (MAKAV; EROĞLU, 2021). Murray e
353 colaboradores observaram que a ovariectomia aumentou em 30% a depleção de
354 dopamina (DA) em comparação com ratas submetidas à cirurgia SHAM, no
355 modelo de infusão unilateral de 6-OHDA no feixe prosencefálico medial,
356 sugerindo a atuação neuroprotetora dos hormônios gonadais (MURRAY et al.,
357 2003). Adicionalmente, foi demonstrado que a reposição de estrogênio em ratas
358 ovariectomizadas reduziu a depleção de DA causada pela lesão unilateral com
359 6-OHDA no estriado (LIU; DLUZEN, 2007). Além disso, Datla e colaboradores
360 (2003) examinaram os efeitos da lesão por 6-OHDA em ratas nas fases de
361 diestro (baixo estrogênio) e pró-estro (alto estrogênio) do ciclo estral, revelando
362 diferenças na perda de neurônios dopaminérgicos, concentração de dopamina
363 no estriado e densidade dos transportadores entre as duas fases. Esses achados
364 sugerem que os hormônios femininos têm um efeito benéfico contra o
365 desenvolvimento e progressão da DP (DATLA et al., 2003).

Estudos conduzidos utilizando diferentes modelos genéticos e de toxinas têm contribuído para a melhor compreensão da patogênese da DP. Conforme a revisão de Subramaniam e Chesselet (2013), muitos desses estudos indicam que a disfunção mitocondrial é comum na DP, sugerindo seu papel crucial na fisiopatologia da doença. A exposição a fatores ambientais, como pesticidas, pode causar a disfunção mitocondrial que resulta em DP tanto em humanos quanto em modelos experimentais. As anormalidades bioquímicas gerais encontradas nas mitocôndrias incluem deficiência do complexo I, redução na síntese de ATP, aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), mutações no DNA mitocondrial e vias de reparo mitocondrial defeituosas. No entanto, a sequência de eventos que leva ao comprometimento mitocondrial e à degeneração de neurônios permanecem incertos. Os dados também indicam que os neurônios dopaminérgicos da SNpc são especialmente vulneráveis ao estresse oxidativo em comparação a outros tipos neuronais, devido à alta carga oxidativa durante o metabolismo da dopamina, excitotoxicidade, alto teor de ferro, baixa massa mitocondrial e altas concentrações de Ca^{2+} (SUBRAMANIAM; CHESSELET, 2013).

O estresse oxidativo surge de uma desregulação do equilíbrio redox celular, em que as ERO excedem a capacidade antioxidante endógena, seja por um aumento nas ERO ou por uma diminuição na disponibilidade de enzimas antioxidantes (PERCÁRIO et al., 2020; SCHIEBER; CHANDEL, 2014). Durante a patogênese da DP, o acúmulo de ERO degrada a SNpc por meio da peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e oxidação do DNA (GANDHI; ABRAMOV, 2012; HEMMATI-DINARVAND et al., 2019; ONYANGO, 2017; TRIST; HARE; DOUBLE, 2019).

391

392 **2. JUSTIFICATIVA**

393 Há uma lacuna no conhecimento sobre as alterações cardiovasculares em
394 fêmeas com parkinsonismo, incluindo a influência do estrogênio nessas
395 mudanças. Além disso, não está claro se o estresse oxidativo observado no
396 sistema nervoso central se estende aos órgãos periféricos do sistema
397 cardiovascular. Desta forma, se faz necessário investigar as possíveis alterações
398 funcionais, morfológicas e metabólicas decorrentes do parkinsonismo nos
399 órgãos do sistema cardiovascular, bem como o potencial papel do estrógeno em
400 mitigar esses efeitos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar o papel do estrógeno nos parâmetros cardiovasculares, autonômicos, oxidativos e morfológicos de ratas ovariectomizadas e submetidas a lesão por 6-OHDA na SNpc ou cirurgia SHAM (infusão de salina) e tratadas com estrógeno ou veículo (óleo de amêndoas).

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar os parâmetros cardiovasculares, autonômicos e o eletrocardiograma de ratas ovariectomizadas, induzidas ao parkinsonismo e tratadas com estrógeno ou veículo;

- Avaliar o dano oxidativo (lipoperoxidação e oxidação de proteínas), assim como as enzimas antioxidantes no ventrículo direito, ventrículo esquerdo e aorta torácica de ratas ovariectomizadas, induzidas ao parkinsonismo e tratadas com estrógeno ou veículo;

- Avaliar a morfologia, a presença de apoptose e a quantidade de colágeno e elastina no ventrículo direito, ventrículo esquerdo e aorta torácica de ratas ovariectomizadas, induzidas ao parkinsonismo e tratadas com estrógeno ou veículo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Este trabalho foi realizado no Departamento de Ciências Fisiológicas (CIF) do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Foram utilizadas ratas Wistar adultas pesando entre 250 e 290 gramas, provenientes do biotério central da UEL. Os animais foram mantidos no biotério setorial do CIF em gaiolas coletivas (45 x 25 x 25 cm) com um número máximo de 5 animais por caixa, em ambientes controlados (22 ± 1 °C e ciclo claro/escuro de 12/12 horas), com ração e água à vontade. Os animais passaram por um período de adaptação de pelo menos 15 dias no biotério setorial. Após atingir o peso corporal ideal, foram escolhidos aleatoriamente para conduzir o experimento. Todos os procedimentos foram realizados com aprovação da Comissão de Ética do Uso de Animais (processo número 022/2021), seguindo todas as recomendações do Código Brasileiro para Utilização de Animais em Laboratório (Deliberação CONCEA nº 12 de 20 de setembro de 2013).

As ratas foram submetidas à ovariectomia e posteriormente distribuídas de acordo com o tratamento realizado (estradiol ou veículo - óleo de amêndoas) e a indução do parkinsonismo (6-OHDA ou Sham). Assim, os animais foram divididos em quatro grupos experimentais:

OVX+V-SHAM: ratas ovariectomizadas tratadas com veículo (óleo de amêndoas) sem indução de parkinsonismo.

OVX+E-SHAM: ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol sem indução de parkinsonismo.

OVX+V-6-OHDA: ratas ovariectomizadas tratadas com veículo (óleo de amêndoas) com indução de parkinsonismo.

444 OVX+E-6-OHDA: ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol com
445 indução de parkinsonismo.

446 ***Cirurgia de ovariectomia***

447 Os animais com o peso ideal foram inicialmente submetidos à
448 ovariectomia. A anestesia foi induzida com uma mistura de cetamina (100 mg/Kg
449 IP) (Dopalen, Ceva) e xilazina (6,67 mg/Kg) (Anasedan, Ceva). Após a anestesia,
450 os pelos da região dorsal (entre as costelas e a crista ilíaca) foram removidos e
451 foi feita uma incisão de aproximadamente 1,5 cm na pele e no músculo. O ovário
452 foi pinçado e removido, e o músculo e a pele foram suturados. Este procedimento
453 foi realizado para a remoção de ambos os ovários. Após a cirurgia, o animal foi
454 colocado em um ambiente aquecido para recuperação. Em seguida, receberam
455 dose única de paracetamol (200 mg/Kg VO) e 30.000 UI de Pentabiótico
456 Veterinário (Fontoura-Wyeth, Brasil) diluídos em solução salina tamponada com
457 fosfato (PBS) em 0,2 mL (IM).

458 ***Tratamento hormonal***

459 Um dia após a ovariectomia, o tratamento hormonal foi iniciado por
460 gavagem (via oral) com duração de 13 dias consecutivos. Os animais nos grupos
461 OVX+E foram tratados com estradiol diluído em óleo de amêndoas (1 mg/mL)
462 na dose de 1 mg/Kg de peso corporal. Os animais nos grupos OVX+V foram
463 tratados apenas com o veículo de diluição (óleo de amêndoas), também em um
464 volume de 1 mL/Kg de peso corporal.

465 ***Cirurgia estereotóxica***

466 Sete dias após a ovariectomia, os animais foram anestesiados com
467 cetamina (100 mg/Kg IP) (Dopalen, Ceva) e xilazina (6,67 mg/Kg) (Anasedan,
468 Ceva) para a cirurgia estereotóxica. Para isso, o animal foi posicionado no

469 aparato estereotáxico (David Kopf) e perfurações no crânio foram feitas com uma
470 broca de baixa velocidade, permitindo o acesso ao cérebro para realizar a
471 microinfusão. As microinfusões foram realizadas bilateralmente e de acordo com
472 as coordenadas estereotáxicas: -5,0 mm (eixo anteroposterior a partir do
473 bregma), $\pm 2,1$ mm (eixo médio-lateral a partir da sutura sagital) e -8,0 mm (eixo
474 dorsoventral a partir do crânio), com o objetivo de acessar a região da substância
475 negra no mesencéfalo. A microinfusão foi realizada com o auxílio de uma agulha
476 (30 gauge) conectada a um tubo de polietileno adaptado a uma microseringa de
477 10 μ L (Hamilton, EUA) acoplada a uma bomba de infusão. A indução do
478 parkinsonismo foi realizada através da microinfusão de 0,1 μ L da solução da
479 neurotoxina 6-OHDA (6 mg/mL em ácido ascórbico a 0,2% em solução salina
480 estéril) por um período de 3 minutos. No grupo SHAM, os animais passaram
481 pelos mesmos procedimentos, no entanto, foi injetado apenas veículo de diluição
482 (0,1 μ L de solução de ácido ascórbico a 0,2% em solução salina estéril). Após a
483 infusão, a agulha permaneceu no local por mais 2 minutos para evitar refluxo da
484 substância. Em seguida, a pele da cabeça foi suturada, e o animal foi removido
485 do estereotáxico e levado a um ambiente aquecido para se recuperar da
486 anestesia. Após a recuperação, o animal recebeu uma dose única de
487 paracetamol (200 mg/Kg) e 30.000 UI de Pentabiótico Veterinário (Fontoura-
488 Wyeth, Brasil) diluídos em solução salina tamponada com fosfato (PBS) em 0,2
489 mL (IM).

490 Após os procedimentos acima citados, os grupos experimentais foram
491 subdivididos para a condução de diferentes protocolos: Estudo 1 – Análise dos
492 parâmetros cardiovasculares e eletrocardiograma; Estudo 2 – Análise do balanço
493 redox; Estudo 3 – Análises histológicas e apoptose.

Estudo 1 – Análise dos parâmetros cardiovasculares

Cateterização da artéria femoral

Seis dias após a cirurgia estereotáxica, os animais utilizados para o estudo 1 foram pesados e anestesiados com cetamina (100 mg/Kg IP) (Dopalen, Ceva) e xilazina (6,67 mg/Kg) (Anasedan, Ceva) para a cirurgia de cateterização da artéria femoral, que tem como objetivo monitorar os parâmetros cardiovasculares, conforme estudos anteriores (ARIZA et al., 2015a, 2015b; DE CAMPOS et al., 2020; DE JAGER et al., 2018; TUROSSI AMORIM et al., 2019)

Registro dos parâmetros cardiovasculares

Aproximadamente 24 horas após a cateterização, foi realizado o registro direto da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) por meio da cânula previamente implantada. A cânula arterial do animal foi acoplada a um transdutor de pressão (Powerlab®, modelo MLT0380) que está conectado a um sistema de registro computadorizado (Powerlab®, ADInstruments) que, por meio da pressão arterial pulsátil (PAP), fornece dados apresentados no programa computacional LabChart 7.0 (ADInstruments). Este procedimento foi realizado com animais não anestesiados e em livre movimentação. Os registros duraram aproximadamente 1 hora, e os primeiros 10 minutos são desconsiderados nas análises (período de adaptação). Com estes registros da PAP, foram coletados dados de PAM, FC e dados para análise espectral.

Eletrocardiograma

Para realizar o eletrocardiograma, os animais foram anestesiados e colocados em uma superfície de poliestireno emborrachado para evitar contato com fontes de condução elétrica. Em seguida, foram aplicados eletrodos nas regiões inguinal e subaxilar utilizando gel de carbopol livre de eletrólitos. As pinças, modelo jacaré, foram então conectadas aos eletrodos. Um eletrodo

520 adicional foi aplicado no tórax, para que a última pinça pudesse ser conectada,
521 completando o circuito. Após a estabilização dos sinais, as ondas foram
522 registradas por 120 segundos. Foram avaliados na derivação DII, a amplitude
523 (AMP) e o comprimento (COMP) de cada onda e os segmentos (SEG).

524 ***Eutanásia e coleta de tecidos***

525 Ao final dos protocolos experimentais, os animais foram eutanasiados
526 por decapitação para a remoção do tecido cerebral. O corpo estriado de cada
527 animal foi dissecado e pesado, e armazenado em temperatura -80°C para
528 posterior dosagem de dopamina. O útero foi pesado, e a tíbia foi medida para
529 confirmar a eficácia da ovariectomia e dos tratamentos, e ambos foram
530 descartados.

531 ***Determinação da eficácia da indução do parkinsonismo pela*** 532 ***dosagem de dopamina (DA) no estriado***

533 A confirmação do modelo de indução do parkinsonismo foi obtida pela
534 análise da concentração de dopamina presente no estriado, realizada por
535 cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Para isso, as amostras de
536 estriado foram suspensas em ácido perclórico 0,1 M com metabissulfito de sódio
537 0,02% como antioxidante, em uma concentração de 5 µL/mg de material
538 cerebral. Após sonicação, os homogeneizados foram centrifugados a 13.000 rpm
539 por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi injetado em uma estação de HPLC
540 equipada com um detector eletroquímico.

Análise espectral da variabilidade da pressão arterial sistólica (PAS) e do intervalo de pulso (IP)

A partir do registro de PAP, foram detectados pontos de inflexão nos pulsos de pressão e foram geradas séries, batimento a batimento, com valores de intervalo de pulso (IP) e pressão arterial sistólica (PAS) para cada ciclo cardíaco. Os dados de PAS e IP no domínio da frequência foram convertidos para o programa computacional Cardioseries v2.4 (<http://www.danielpenteado.com>) e foi realizada a análise de variabilidade. Séries temporais batimento a batimento com valores de IP e PAS foram reamostradas em 10Hz (1 valor a cada 100 ms) por interpolação de linha de spline cúbica, para regularizar o intervalo de tempo entre os batimentos. As séries com valores interpolados de IP e PAS foram divididas em segmentos com 512 valores cada, com uma sobreposição de 50% (protocolo de Welch). A estacionariedade dos valores de IP e PAS de cada segmento foi examinada visualmente e segmentos com artefatos ou transientes foram excluídos. Os segmentos foram integrados nas bandas de baixa frequência (LF: 0,20 – 0,75 Hz), alta frequência (HF: 0,75 – 3,00 Hz) e muito baixa frequência (VLF: < 20 Hz) e os resultados foram expressos em unidades absolutas (ms^2 ou mmHg^2) e normalizadas (nu). Os valores normalizados foram obtidos calculando-se a potência relativa das bandas LF e HF considerando a potência total do espectro subtraindo a potência da banda VLF. Para avaliar o equilíbrio simpatovagal cardíaco, foi calculada a razão entre a potência das bandas LF e HF (LF/HF) do espectro de IP.

Análise espontânea do barorreflexo

A sensibilidade do barorreflexo (BRS) foi avaliada no domínio da frequência usando o Método de Sequência. Usando o programa computacional

567 CardioSeries v2.4 (<http://www.danielpenteado.com>), séries temporais batimento
 568 a batimento com valores de IP e PAS foram usadas para análise de BRS. As
 569 séries temporais foram analisadas quanto a sequências de quatro ou mais
 570 batimentos em que aumentos progressivos na PAS foram acompanhados por
 571 aumentos progressivos no IP, ou diminuições progressivas na PAS foram
 572 acompanhadas por diminuições progressivas no IP. Para detectar alterações na
 573 PAS e IP, foram utilizados limiares de 0 mmHg e 0 ms, respectivamente. Após
 574 detectar uma rampa de PAS (sequência de quatro ou mais batimentos), na qual
 575 aumentos progressivos ou diminuições na PAS foram acompanhados, ou não,
 576 por aumentos ou diminuições no IP, o programa de computador procurou por
 577 alterações no IP sem intervalo algum, ou seja, atraso de zero batimento. Uma
 578 sequência de barorreflexo foi utilizada somente quando o coeficiente de
 579 correlação (r) entre os valores de PAS e IP foi maior ou igual a 0,8. O BRS foi
 580 determinado a partir da inclinação média da linha de regressão linear entre os
 581 valores de PAS e IP de cada sequência de barorreflexo encontrada. O ganho Up
 582 (BRR Up) indica rampas de aumento de PAS seguidas por aumento de IP e o
 583 ganho Down (BRR Down) indica rampas de diminuição de PAS seguidas por
 584 diminuição de IP. O índice de efetividade do barorreflexo (IEB) avalia quantas
 585 rampas tiveram respostas barorreflexas, em relação ao número total de rampas
 586 de aumento ou diminuição da PAS.

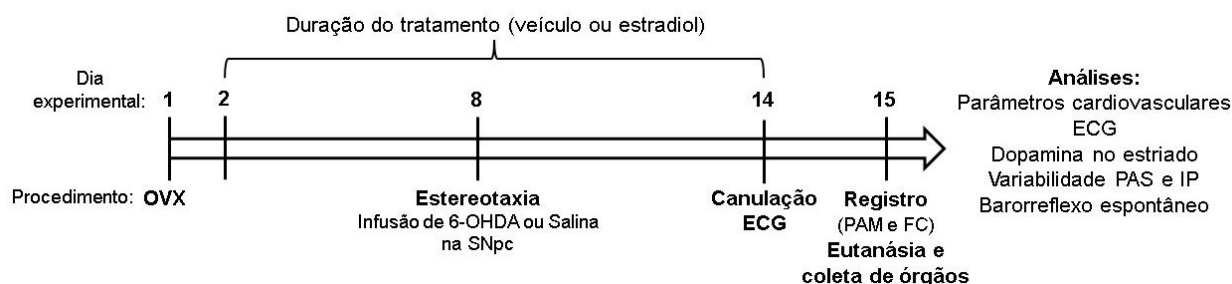


Figura 1. Representação esquemática da metodologia utilizada no estudo 1, de acordo com o dia experimental e o procedimento realizado.

Estudo 2 – Análise do Balanço Redox

Eutanásia e coleta de tecidos

Sete dias após a estereotaxia, os animais foram submetidos a eutanásia. O corpo do estriado foi coletado para posterior dosagem de dopamina (por HPLC) para a confirmação do modelo de parkinsonismo. O útero e tibia foram utilizados para análises morfométricas e determinação da eficácia da ovariectomia e tratamentos. Além disso, foram coletados artéria torácica e coração, separado em ventrículo direito e esquerdo, que foram armazenados em freezer -80°C para posteriores análises de balanço redox. Para a realização das técnicas, os órgãos foram triturados e homogeneizados em PBS.

Dano Oxidativo

Proteína Carbonílica: são proteínas que passaram por modificações pela adição de grupos carbonil, tornando-as mais hidrofóbicas e resistentes à proteólise. A homogeneização dos tecidos é realizada em tampão fosfato 50mM. Em seguida, 150µL dessa homogeneização são divididos em dois tubos, sendo que um deles contém dinitrofenilhidrazina e o outro ácido clorídrico a 2M. Após 1 hora, 500µL de ácido tricloroacético a 28% são adicionados. O precipitado resultante é então lavado com álcool absoluto e diluído em guanidina 6M. A leitura dos dois tubos é feita em 385nm, e o cálculo é realizado pela fórmula $\{[(\text{Abs}_{\text{Tubo2}} - \text{Abs}_{\text{Tubo1}}) / 0,011\mu\text{M}^{-1}] \times (350\mu\text{L}/150\mu\text{L})\}$, em que 0,011µM⁻¹ representa o coeficiente de partição da placa, e a relação 350/150 é a proporção entre o volume final e o volume inicial pipetado para a placa. Os valores resultantes são expressos em nmol/mg de proteínas.

Lipoperoxidação: Os lipídeos das membranas são facilmente oxidados. Assim podemos observar a lipoperoxidação de membranas biológicas através da detecção de produtos da lipoperoxidação, que reagem com o ácido

613 tiobarbitúrico (TBARS). Na microplaca, são adicionados 50µL de ácido
614 tricloacético a 2,8%, 50µL de ácido tiobarbitúrico a 1%, 5µL de cloreto férrico a
615 1M e ácido ascórbico a 0,5M em 50µL do homogenato. Rapidamente a
616 microplaca é levada a estufa por 45°C por 30min. Logo em seguida, a microplaca
617 é retirada e resfriada em banho de gelo e lida em 535nm e 572nm. O cálculo é
618 realizado por $(Abs_{535} - Abs_{572})/0,05$ e os valores expressos em nmol de
619 TBARS/mg de proteína.

620 *Malondialdeído:* Ao término da lipoperoxidação, podem-se encontrar
621 produtos mais prejudiciais, como o malondialdeído, capaz de se ligar a bases
622 nitrogenadas e causar danos ao DNA. Nesse sentido, 300µL do homogenato são
623 adicionados a 40µL de ácido tricloroacético a 28%, e aguarda-se por 15 minutos
624 antes de adicionar 150µL de ácido tiobarbitúrico a 1%. Os tubos são então
625 levados à estufa a 45°C por 30 minutos. A leitura é realizada a 532nm. O cálculo
626 é feito em relação ao padrão de MDA e expresso em mM/mg de proteínas.

627 **Antioxidantes**

628 *Superóxido Dismutase:* Esta enzima é caracterizada como a mais crucial
629 na defesa dos organismos, sendo capaz de catalisar a conversão de superóxidos
630 e hidrogênios em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular. Assim, para cada
631 10µL de homogenato, são adicionados 120µL de tampão de carbonato de sódio
632 50mM, 50µL de solução de EDTA 0,1mM contendo 96mM de NBT e 10µL de
633 Triton X-100 0,6%. As amostras são incubadas por 2 minutos em temperatura
634 ambiente. Posteriormente, são adicionados 10µL de hidroxilamina a 20mM, e a
635 leitura é realizada a 560nm. O cálculo é feito pela porcentagem de inibição
636 $(Abs_{560} - Abs_{branco})/(Abs_{branco})$, este valor dividido por 50, que corresponde à
637 porcentagem de inibição do NBT por unidade de SOD. Dessa forma, a atividade

638 específica pode ser calculada pela fórmula (% de inibição x 20) / (unidade de
639 SOD x proteínas) e os valores são expressos em % de inibição/U SOD/mg de
640 proteínas.

641 *Catalase*: É uma enzima capaz de decompor o peróxido de hidrogênio em
642 água e gás oxigênio. Para conduzir o experimento, 10µL do homogenato são
643 adicionados a 296µL de solução reagente (9mL de tampão Tris-HCl com 720µL
644 de peróxido de hidrogênio P.A.). Após 2 minutos, a leitura é feita a 240nm, e o
645 cálculo é realizado por meio da fórmula $\{[(\text{Abs}_{240}/2)/2,8]/0,01\}$, onde 2,8 é o
646 coeficiente de extinção do peróxido de hidrogênio e 0,01 é o volume da amostra.
647 Os valores obtidos são expressos em $\mu\text{mol.H}_2\text{O}_2.\text{min}^{-1}/\text{mg}$ de proteína.

648 *Glutathione S-transferase*: Este tripeptídeo, presente nas células,
649 desempenha uma função essencial em diversas atividades celulares, estando
650 envolvido no metabolismo de xenobióticos e contribuindo para a proteção contra
651 a lipoperoxidação. Na preparação do reagente, são adicionados 0,0093g de
652 GSH e 0,0122g de CDNB a 19mL de tampão difosfato 0,1M. Posteriormente,
653 20µL do homogenato são adicionados a 180µL desse reagente. Antes da leitura
654 a 340nm, aguarda-se por 3 minutos em temperatura ambiente. O cálculo é
655 realizado pela seguinte fórmula: $\{[(\text{Abs}_{340}/3)/9,6] \times 200/(\text{proteína} \times 20)\} \times 20$, onde
656 9,6 é o coeficiente de partição GST/GSH, 200 é o volume final, e 20 é o volume
657 da amostra. Os valores são expressos em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.

658 **Concentração de Proteínas**

659 *Proteínas*: Realizada através da técnica de Bradford, que utiliza o corante
660 de Coomassie, cuja absorbância pode ser medida a 495nm devido à sua
661 coloração marrom. No entanto, ao interagir com as proteínas da amostra, sua
662 coloração varia para tons de azul, possibilitando a leitura a 595nm.

Dosagem de óxido nítrico (nitrito)

Os órgãos e plasma coletados foram utilizados para a dosagem de nitrito (NO^{2-}). Para isso, estes foram homogeneizados em PBS até uma concentração final de 100 mg de tecido úmido por 1mL de PBS (100mg/mL).

Foi realizada uma dosagem indireta por meio da quantificação de NO^{2-} , após tratamento da amostra com cádmio, através de uma adaptação da reação colorimétrica de Griess. O tratamento de cádmio foi utilizado para converter todo o nitrato em nitrito nas amostras biológicas, proporcionando assim uma estimativa mais precisa do número total de NO nas amostras originais. Para determinar a concentração de NO^{2-} de exemplo e curva de calibração foi preparada uma diluição de NaNO_2 (Merck) em água destilada estéril para criar concentrações variando de 250 até 0 μM . Após isso, 100 μL de reagente de Griess foram adicionados em duplicata aos poços das duas primeiras colunas de cada placa de microtitulação. A absorbância foi lida a 550 nm utilizando um leitor de microplacas. Os resultados foram expressos em μM de NO^{2-} . (NAVARRO-GONZÁLVEZ; GARCÍA-BENAYAS; ARENAS, 1998)

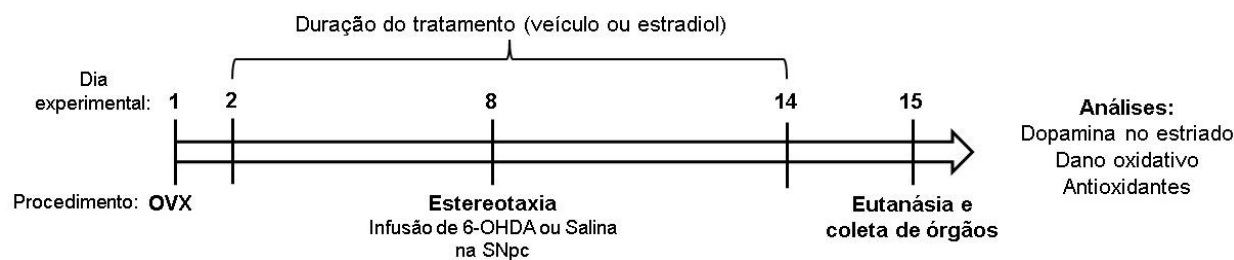


Figura 2. Representação esquemática da metodologia utilizada no estudo 2, de acordo com o dia experimental e o procedimento realizado.

Estudo 3 – Análises Histológicas e Apoptose

Cortes histológicos

Os cortes foram realizados utilizando o micrótomo RM2125 RT, da Leica Microsystems (Nussloch, Alemanha), com uma espessura de 5µm para as artérias e 6µm para os corações. Após a conclusão dos cortes, as tiras de parafina foram removidas e imersas em uma solução alcoólica de 15%, seguida por um banho a 50°C por 30 segundos. Os cortes foram posteriormente fixados em lâminas tratadas com silano e deixados para repousar por 2 horas em uma placa aquecida à 40°C, sendo utilizados apenas após um período de 48 horas para os procedimentos de coloração.

Coloração com Hematoxilina e Eosina (HE)

Após a desparafinação e hidratação do tecido, tanto os corações quanto as artérias foram submetidos à coloração com hematoxilina e eosina, visando a avaliação morfológica do tecido.

Coloração Sirius Red

Após o processo de desparafinação e hidratação do tecido, tanto os corações quanto as artérias foram sujeitos à coloração com Sirius Red por 1h em solução de picro sirus Red seguido por mergulho em solução de ácido acético 1%, com o objetivo de quantificar o colágeno para avaliação da fibrose induzida por processo inflamatório.

Coloração de Weigert

Foi utilizado o kit Elastic Stain da Sigma-Aldrich® (Ref: HT25A-1KT). Após o processo de desparafinação e hidratação do tecido, tanto os corações quanto as artérias foram sujeitos à coloração de Weigert, com o objetivo de quantificação de fibras elásticas.

Avaliação de morte celular por ensaio de TUNEL

Para o procedimento foi conduzido seguindo a técnica estabelecida pelo kit, *In situ* Cell Death Detection Kit da Roche® (Ref: 11684809910). Após o processo de desparafinação e hidratação do tecido, tanto os corações quanto as artérias foram sujeitos ao teste de fluorescência TUNEL e observados em microscópio Axio Imager A1, Carl Zeiss (Göttingen, Alemanha) em comprimento de detecção entre 515 e 565nm e excitação entre 450-500nm.

Análise das colorações

Após a execução dos procedimentos de coloração, as imagens foram capturadas utilizando o microscópio Axio Imager A1 da Carl Zeiss (Göttingen, Alemanha), com uma objetiva de 2,5x, 10x e 40x a variar da amostra. Posteriormente, as fotografias foram submetidas à análise no software Fiji ImageJ2, versão 2.14.0/1.54f.

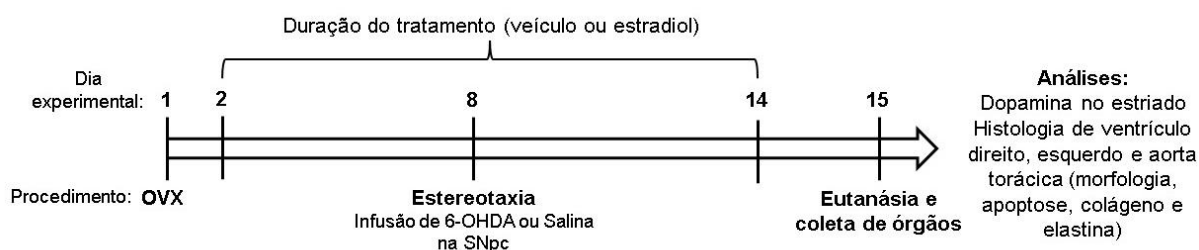


Figura 3. Representação esquemática da metodologia utilizada no estudo 3, de acordo com o dia experimental e o procedimento realizado.

Análise Estatística

Os dados dos 3 estudos foram analisados pelos mesmos testes estatísticos. Primeiramente, os dados foram avaliados quanto à normalidade das amostras (teste de Shapiro-Wilk), para definir o tipo de teste a ser realizado. Os dados com distribuição normal foram submetidos a análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido pelo pós-teste de Tukey, e seus resultados expressos

724 como média $\pm$ desvio padrão. Os grupos que não apresentaram distribuição
725 normal foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido
726 pelo pós-teste de Dunn, e os resultados expressos como mediana $\pm$ intervalo
727 interquartil. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Resultados Estudo 1 – Análise dos parâmetros cardiovasculares

Determinação da efetividade do tratamento com estradiol

Para determinar a eficácia do tratamento hormonal com estradiol, foi avaliado o peso do útero dos animais. A redução no peso uterino confirma a eficácia da cirurgia de ovariectomia, e o tratamento com veículo (óleo de amêndoas) não influenciou esse parâmetro. Por outro lado, o tratamento com estradiol resultou em um aumento significativo no peso uterino em comparação com os grupos controle correspondentes (OVX+V-SHAM: $0,218\text{g} \pm 0,047$ vs OVX+E-SHAM: $0,451\text{g} \pm 0,065$, $p < 0,0001$; OVX+V-6-OHDA: $0,203\text{g} \pm 0,037$ vs OVX+E-6-OHDA: $0,451\text{g} \pm 0,098$, $p < 0,0001$), revertendo a atrofia uterina e confirmando a eficácia do tratamento (Fig. 4A).

Não foram observadas diferenças significativas no comprimento da tíbia dos animais (Fig. 4B), e a razão útero/tíbia (Fig. 4C) apresenta resultados semelhantes ao peso uterino (OVX+V-SHAM: $0,060 \pm 0,013$ vs OVX+E-SHAM: $0,123 \pm 0,018$; OVX+V-6-OHDA = $0,055 \pm 0,010$ vs OVX+E-6-OHDA = $0,124 \pm 0,026$). Isso confirma que o tamanho dos animais é uniforme e não interfere no parâmetro de peso uterino.

Determinação da efetividade da indução do parkinsonismo por 6-OHDA

A análise dos níveis de dopamina indicou que a concentração de dopamina no estriado dos grupos 6-OHDA foi reduzida quando comparada aos seus controles SHAM (OVX+V-SHAM: $10,806 \pm 2,004$ vs OVX+V-6-OHDA: $4,816 \pm 2,192$, $p < 0,0001$; OVX+E-SHAM: $10,494 \pm 1,348$ vs OVX+E-6-OHDA: $3,653 \pm 2,148$, $p < 0,0001$). Os resultados indicam que a lesão por 6-OHDA promoveu uma redução superior a 50% nos níveis de dopamina no estriado, confirmando a

754 indução de parkinsonismo (Fig. 5). A ANOVA de duas vias mostrou um efeito da
 755 lesão por 6-OHDA na concentração de dopamina ($p<0,0001$), e não houve efeito
 756 do tratamento hormonal nem interação entre esses fatores.

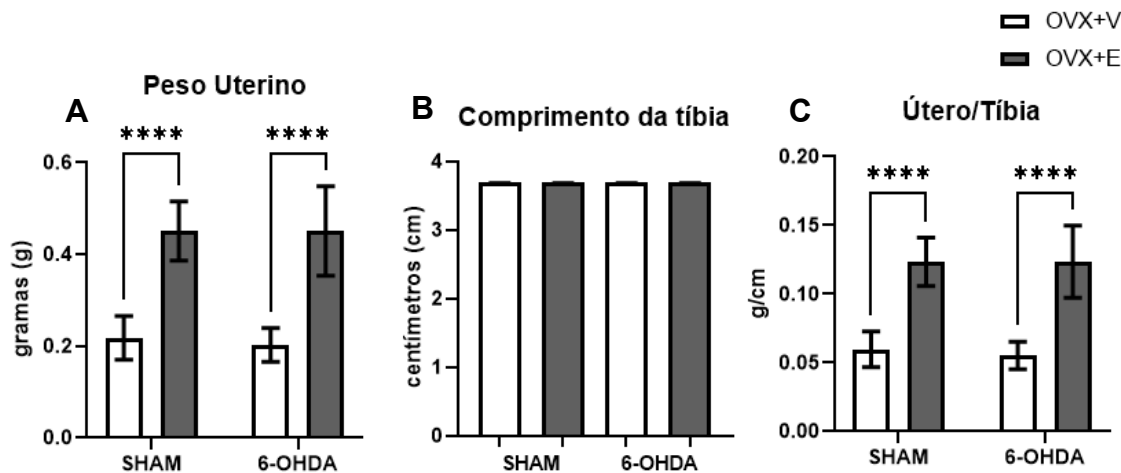


Figura 4. Efeito do tratamento com estradiol e indução de parkinsonismo no peso uterino (A), comprimento da tíbia (B) e razão útero/tíbia (C) de ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol ou veículo (óleo de amêndoas) e submetidas à lesão por 6-OHDA ou SHAM (veículo). O peso uterino e a razão útero/tíbia foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey e os resultados estão expressos como média $\pm$ DP. O comprimento da tíbia foi analisado por Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn e o resultado expresso como mediana $\pm$ intervalo interquartil. Nível de significância: $p<0,05$. OVX+V-SHAM $n=16$; OVX+E-SHAM $n=15$; OVX+V-6-OHDA $n=16$; OVX+E-6-OHDA $n=17$. **** $p<0,0001$.

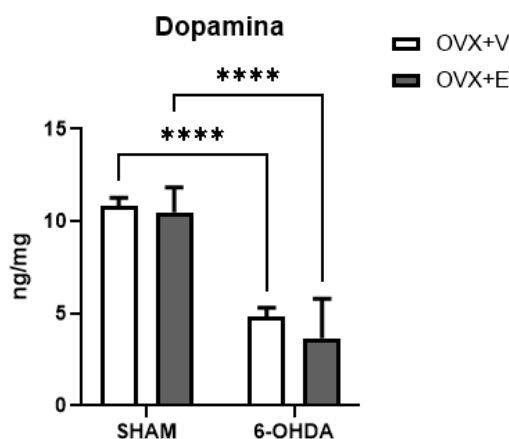


Figura 5. Concentração de dopamina (DA) no estriado após 7 dias de infusão bilateral de veículo (SHAM) ou 6-OHDA em ratas ovariectomizadas tratadas com veículo (óleo de amêndoas) ou estradiol, utilizadas para a avaliação dos parâmetros cardiovasculares. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey. Os resultados são expressos como média $\pm$ DP. Nível de significância: $p<0,05$. OVX+V-SHAM $n=18$; OVX+E-SHAM $n=18$; OVX+V-6-OHDA $n=19$; OVX+E-6-OHDA $n=19$. **** $p<0,0001$.

757 Para a análise dos parâmetros cardiovasculares basais, foram coletados
758 dados de PAM e FC. Não foram observadas diferenças estatisticamente
759 significativas entre os parâmetros avaliados (Fig. 6).

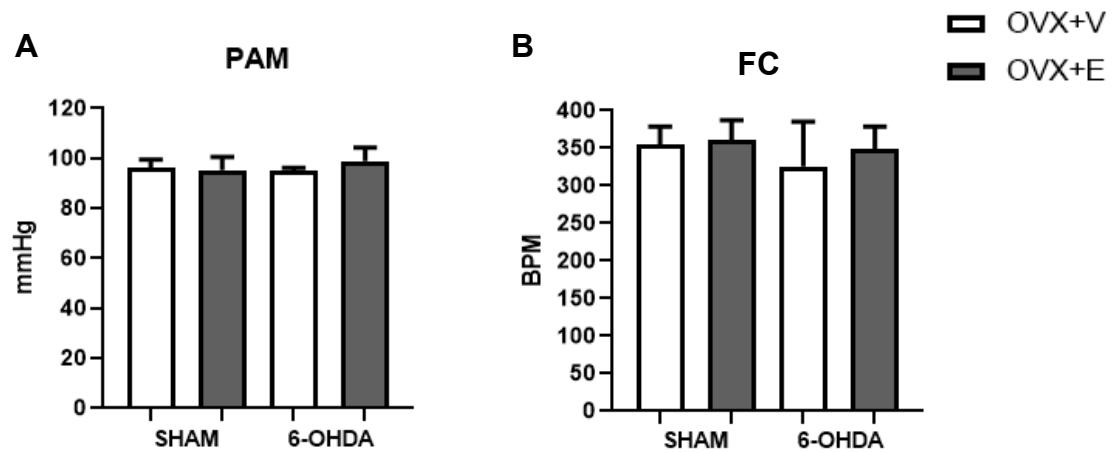


Figura 6. Parâmetros cardiovasculares de ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol ou veículo (óleo de amêndoas) e submetidas à lesão por 6-OHDA ou SHAM (veículo). Os dados foram analisados por Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn. Os resultados são expressos como mediana $\pm$ intervalo interquartil. Nível de significância: $p < 0,05$. OVX+V-SHAM $n=16$; OVX+E-SHAM $n=18$; OVX+V-6-OHDA $n=16$; OVX+E-6-OHDA $n=18$.

760 Também não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos
 761 nas análises espectrais de PAS e IP e na análise da sensibilidade barorreflexa
 762 (Fig. 7).

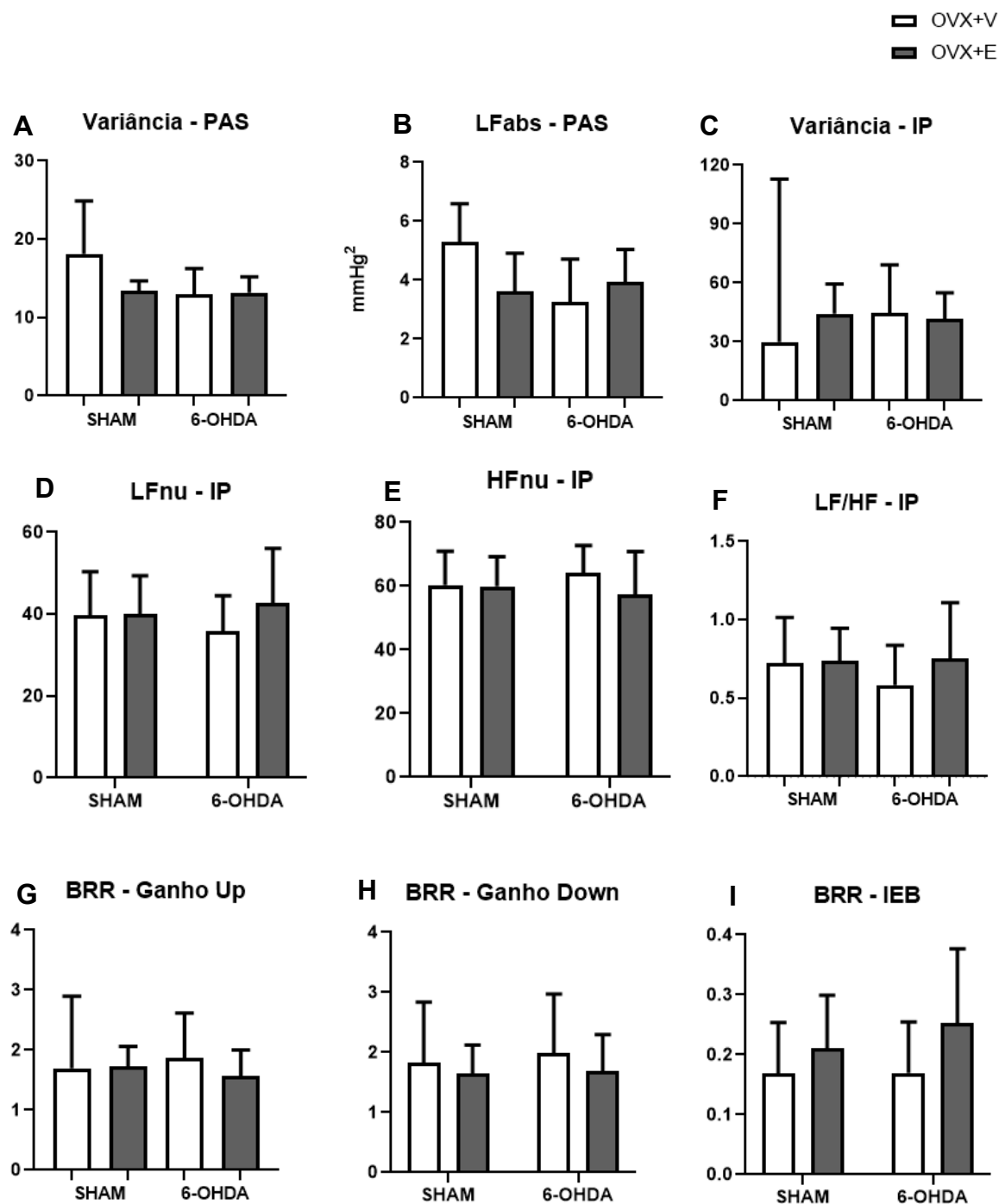


Figura 7. Análise espectral de PAS e IP e sensibilidade barorreflexa de ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol ou veículo (óleo de amêndoas) e submetidas à lesão por 6-OHDA ou SHAM (veículo). LFnu, HFnu, Ganho Barorreflexo Down e índice de efetividade barorreflexa (IEB) foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey e os resultados são expressos como média $\pm$ DP. Os outros dados foram analisados por Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn e os resultados são expressos como mediana $\pm$ intervalo interquartil. Nível de significância: $p < 0,05$. OVX+V-SHAM $n=16$; OVX+E-SHAM $n=18$; OVX+V-6-OHDA $n=16$; OVX+E-6-OHDA $n=18$.

Eletrocardiograma

No eletrocardiograma, realizado com os animais anestesiados, observou-se uma diminuição na frequência cardíaca no grupo OVX+V-6-OHDA (226,37 bpm $\pm$ 25,88), em comparação com o grupo OVX+V-SHAM (254 bpm $\pm$ 19,28) (Tabela 1). Não houve alterações nos grupos OVX+E-SHAM (234,11 bpm $\pm$ 18,42) e OVX+E-6-OHDA (218,33 bpm $\pm$ 30,10).

Tabela 1. Dados de batimentos cardíacos por minuto. Durante o exame de eletrocardiografia, os batimentos cardíacos dos animais em questão foram registrados sob a influência de anestesia. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste de Tukey Nível de significância: $p < 0,05$. A letra (a) representa a diferença entre OVX+V-6-OHDA e OVX+V-SHAM.

	OVX+V-SHAM	OVX+V-6-OHDA	OVX+E-SHAM	OVX+E-6-OHDA
FC (bpm)	254 $\pm$ 19.28	226.37 $\pm$ 25.88 (a)	234.11 $\pm$ 18.42	218.33 $\pm$ 30.10

Ao examinar o gráfico fornecido pelo eletrocardiograma (Figura 8), observam-se irregularidades nas linhas que constituem o exame. Há uma aparente oscilação, que poderia ser confundida com artefatos, exceto pela presença da onda U. Para esclarecimento, procederemos à análise das ondas e intervalos de forma separada (Figura 9).

Os gráficos da Figura 9 correspondem às amplitudes (AMP) e comprimento (COMP) das ondas do eletrocardiograma, analisadas de forma isolada. No gráfico A, está a representação da onda P, destacando um aumento na AMP (Fig. 9 A1) no grupo OVX+V-6-OHDA (0,053mV $\pm$ 0,012) em comparação com o grupo OVX+V-SHAM (0,038mV $\pm$ 0,002). Nos gráficos da onda Q (Fig. 9 B1 e B2), sem identificação de diferenças estatísticas significativas. Os gráficos C exibem a onda R, evidenciando um aumento na AMP (Fig. 9 C1) (0,246mV $\pm$ 0,04) e na COMP (Fig. 9 C2) (27,77ms $\pm$ 2,91) do grupo OVX+E-SHAM em relação ao grupo OVX+V-SHAM (AMP: 0,166mV $\pm$ 0,01; COMP:

788 23,25ms±2,56), além de uma maior AMP (0,207mV±0,02) no grupo OVX+V-6-
789 OHDA em comparação com o grupo OVX+V-SHAM (0,166mV±0,01). As
790 variações mais notáveis são observadas nas ondas S e T. A onda S revela o
791 maior número de alterações, incluindo a redução da AMP (Fig. 9 D1) nos grupos
792 com parkinsonismo (OVX+V-6-OHDA: 0,228mV±0,018; OVX+V-SHAM:
793 0,24mV±0,04) e nos tratados com estradiol (OVX+E-6-OHDA: 0,182mV±0,03;
794 OVX+E-SHAM: 0,124mV±0,014), bem como o aumento da AMP entre os grupos
795 OVX+E-6-OHDA (0,182mV±0,03) em comparação com o OVX+V-6-OHDA
796 (0,228mV±0,018). Também são observados aumentos no COMP (Fig. 9 D2) nos
797 grupos OVX+V-6-OHDA (16ms±1 vs OVX+V-SHAM: 12,25ms±0,93), OVX+E-6-
798 OHDA (18,44ms±2,27 vs OVX+E-SHAM: 13,55ms±1,38) e OVX+E-6-OHDA
799 (18,44ms±2,27 vs OVX+V-6-OHDA: 16ms±1). Quanto à onda T, a AMP (Fig. 9E1)
800 apresenta alteração apenas no grupo OVX+E-6-OHDA (0,053mV±0,008 vs
801 OVX+V-6-OHDA: 0,063mV±0,008). No entanto, na COMP (Fig. 9 E2), todos os
802 grupos demonstram modificações, incluindo OVX+E-SHAM (15,77ms±2,02 vs
803 OVX+V-SHAM: 12,25ms±1,37), OVX+V-6-OHDA (17ms±2,25 vs OVX+V-SHAM:
804 12,25ms±1,37), OVX+E-6-OHDA (21,11ms±2,95 vs OVX+V-6-OHDA:
805 17ms±2,25) e OVX+E-6-OHDA (21,11ms±2,95 vs OVX+E-SHAM:
806 15,77ms±2,02), evidenciando um aumento.

807 Na Figura 10, é possível observar os segmentos entre as ondas. Destaca-
808 se a presença de diferenças significativas no segmento PQ (Fig. 10 A) entre os
809 grupos com parkinsonismo (OVX+E-6-OHDA: 14,88ms±1,87; OVX+V-6-OHDA:
810 14,75ms±1,25). Entretanto, o segmento ST (Fig. 10 E) foi o que mais evidenciou
811 divergências, abrangendo OVX+E-SHAM (24,44ms±1,92 vs OVX+V-SHAM:
812 17,25ms±3,25), OVX+V-6-OHDA (21,5ms±3,5 vs OVX+V-SHAM:

813 17,25ms±3,25), OVX+E-6-OHDA (30,22ms±2,02 vs OVX+V-6-OHDA:
814 21,5ms±3,5), e OVX+E-6-OHDA (30,22ms±2,02 vs OVX+E-SHAM:
815 24,44ms±1,92), indicando um aumento.

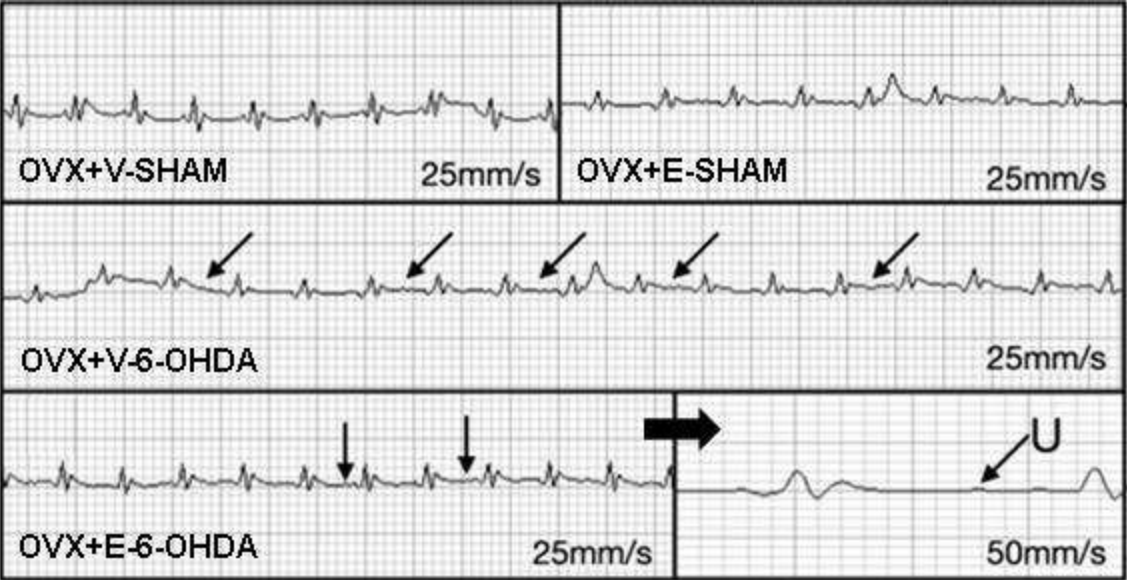


Figura 8. Representação esquemática das ondas de eletrocardiograma. O gráfico ilustra os traçados do eletrocardiograma em ratas fêmeas, com e sem indução de parkinsonismo, e submetidas a tratamento com estradiol ou veículo (óleo de amêndoas). Os registros dos eletrocardiogramas foram realizados a uma velocidade de 25mm/s, na derivação DII. No entanto, ao aumentar a velocidade para 50mm/s, torna-se mais evidente a visualização do traçado da onda U. As setas indicam anormalidades nos exames quando comparados ao grupo controle correspondente.

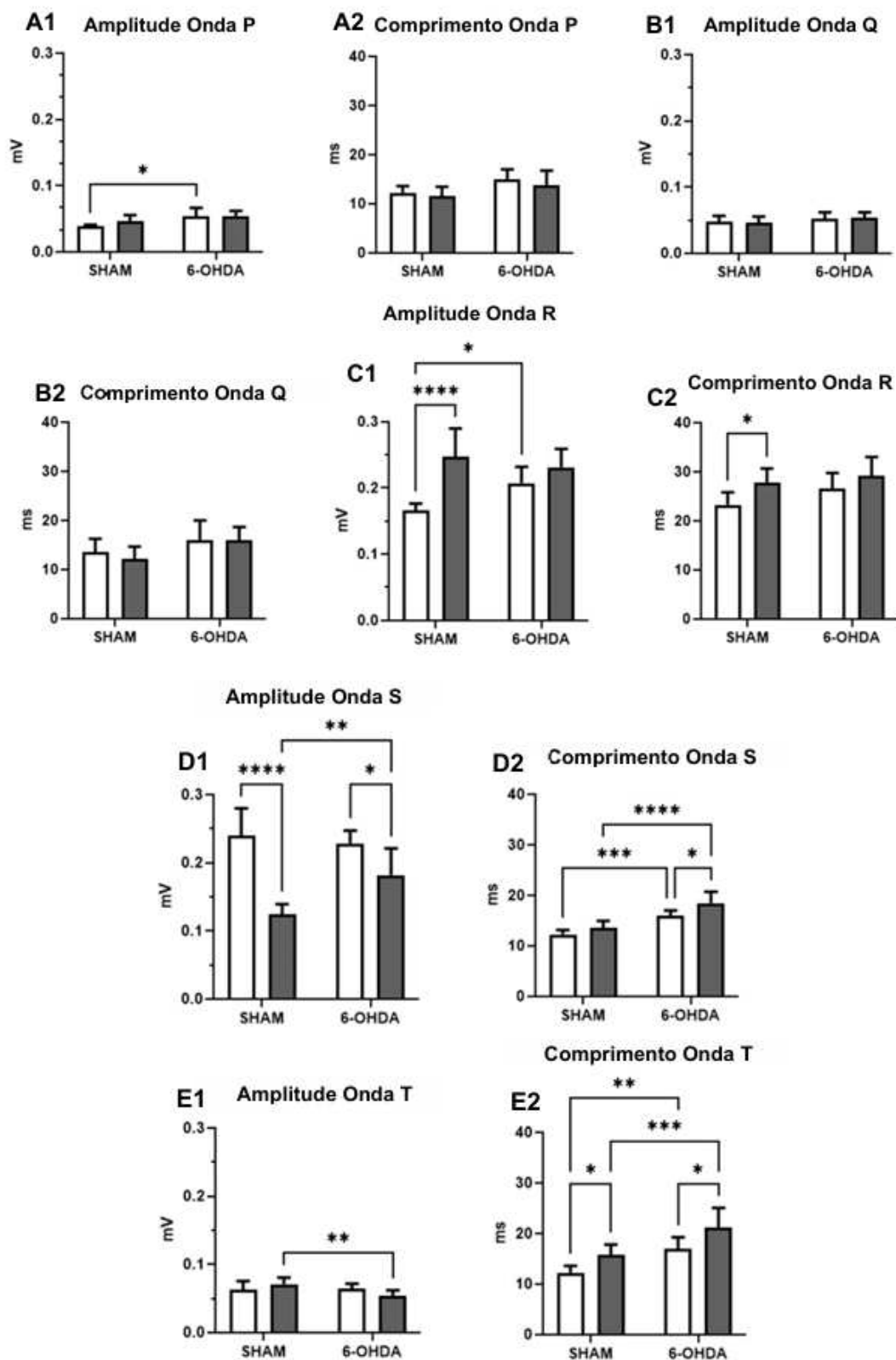
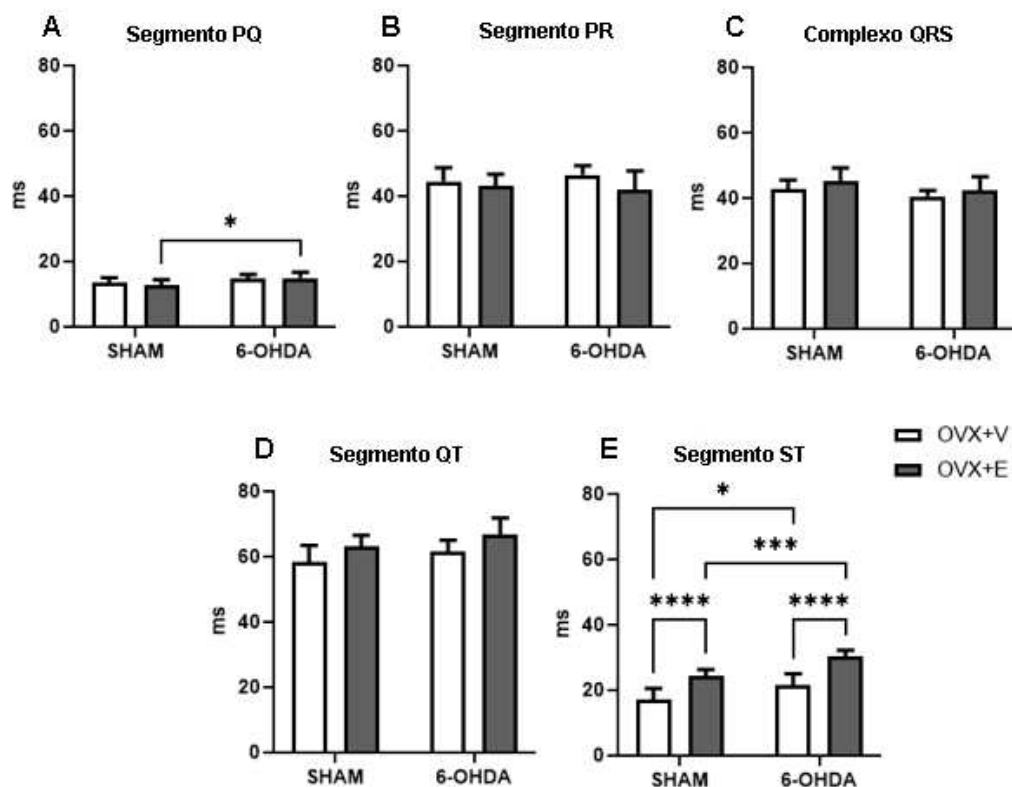


Figura 9. Resultados das ondas apresentadas no exame de eletrocardiograma em fêmeas induzidas ou não ao parkinsonismo e tratadas ou não com estradiol. Os gráficos A, B, C, D e E, representam a amplitude (AMP) e o comprimento (COMP) das ondas individuais. A análise foi realizada separadamente para cada onda, utilizando ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey. Nível de significância: $p < 0.05$.



816

817 **Figura 10.** Resultados dos segmentos apresentados no exame de eletrocardiograma
818 em fêmeas induzidas ou não ao parkinsonismo e tratadas ou não com estradiol. Os
819 gráficos A, B, C, D e E, representam os diferentes segmentos utilizados. A análise foi
820 realizada cada segmento utilizando ANOVA de duas vias, seguido pelo pós-teste de
821 Tukey. Nível de significância: $p < 0.05$.

5.2. Discussão Estudo 1 – Análise dos parâmetros cardiovasculares

O modelo experimental de infusão de 6-OHDA é amplamente utilizado para avaliar disfunções motoras e bioquímicas na DP. A infusão dessa toxina diretamente no SNpc produz a degeneração dos neurônios dopaminérgicos, assemelhando-se ao que ocorre na DP em humanos (SIMOLA; MORELLI; CARTA, 2007). Neste estudo, a infusão bilateral de 6-OHDA no SNpc promoveu uma redução de mais de 50% da dopamina estriatal, corroborando com estudos que avaliaram disfunção cardiovascular usando esse mesmo modelo (ARIZA et al., 2015a, 2015b; DE CAMPOS et al., 2020; DE JAGER et al., 2018, 2023; TUROSSI AMORIM et al., 2019). O tratamento com estrógeno não preveniu a depleção de dopamina no estriado, o que pode estar relacionado ao modelo experimental utilizando, já que a infusão bilateral de 6-OHDA diretamente na SNpc provoca lesão com efeitos rápidos e severos.

Parâmetros cardiovasculares em ratas ovariectomizadas induzidas ao parkinsonismo e tratadas com estradiol

A relação entre hormônios ovarianos e doenças cardiovasculares ainda não está bem estabelecida, assim como sua participação na patogênese da DP. Poucos estudos avaliaram a função cardiovascular em fêmeas submetidas à indução de parkinsonismo e ainda não há informações sobre os mecanismos envolvidos.

Ratas ovariectomizadas submetidas à lesão bilateral por 6-OHDA mostraram uma redução na PAM, enquanto ratas não ovariectomizadas não apresentaram a mesma alteração, sugerindo a participação de hormônios ovarianos (DE CAMPOS et al., 2020). No entanto, no presente estudo, os grupos OVX+V-SHAM e OVX+V-6-OHDA não mostraram diferenças nos parâmetros

847 cardiovasculares, diferindo de dados anteriores (DE CAMPOS et al., 2020). Além
848 disso, o tratamento com estradiol também não resultou em alterações.

849 Considerando que o tratamento com estradiol não modificou os valores
850 de pressão arterial em fêmeas normais e lesionadas, seria possível entender que
851 houve normalização dos parâmetros de pressão arterial pelo tratamento com
852 estrogênio, indicando que este seria responsável pela proteção que as fêmeas
853 tiveram em relação a alterações de pressão, e que diferiu dos machos. No
854 entanto, o veículo de diluição utilizado para o tratamento, o óleo de amêndoas,
855 é apontado em alguns estudos com potencial para aumentar a atividade
856 antioxidante (AL-ATTAR, 2020; KORIEM; EL-ATTAR, 2022; OUZIR et al., 2021).
857 Assim, é difícil apontar o estrogênio como único responsável pela reversão dessa
858 disfunção.

859 A ausência de alterações cardiovasculares entre os grupos pode ser
860 influenciada pelo uso do óleo de amêndoas como veículo de diluição, uma vez
861 que, o óleo de amêndoas pode reduzir o risco de doenças cardiovasculares
862 melhorando o perfil lipídico (OUZIR, 2021). Em pacientes com hiperlipidemia, a
863 ingestão de 10 mL de óleo de amêndoas duas vezes ao dia durante 30 dias
864 diminuiu os níveis de colesterol total e LDL, que, quando elevados, são fatores
865 de risco para doenças cardiovasculares. Em ratos, o óleo de amêndoas
866 administrado na dose de 800 mg/kg por 6 semanas foi capaz de reverter as
867 alterações bioquímicas causadas pela intoxicação por chumbo em uma dose
868 subletal (AL-ATTAR, 2020). Na dose de 1 mL/100g, administrada uma vez ao dia
869 por 1 mês, foi capaz de restaurar os parâmetros sanguíneos, hepáticos e
870 antioxidantes, alterados pela favismo (KORIEM; EL-ATTAR, 2022; OUZIR et al.,
871 2021).

872 Outra hipótese para explicar a proteção da disfunção cardiovascular em
873 ratas é a maior concentração de dopamina no estriado das fêmeas em
874 comparação com estudos usando machos submetidos ao mesmo modelo
875 experimental. A concentração de dopamina no estriado de fêmeas submetidas
876 ao parkinsonismo foi semelhante à de um rato macho normal. Apesar da redução
877 significativa nos níveis de dopamina no estriado e da confirmação da lesão na
878 SNpc, é possível que os níveis restantes de dopamina sejam suficientes para
879 manter os parâmetros basais e prevenir as alterações cardiovasculares,
880 autonômicas e barorreflexas que foram observadas em ratos machos (ARIZA et
881 al., 2015a, 2015b; TUROSSI AMORIM et al., 2019).

882 Apesar de os registros cardiovasculares não apresentarem diferenças
883 significativas entre os grupos, a análise do eletrocardiograma revelou algumas
884 alterações. O ECG se estabeleceu como uma ferramenta valiosa para detectar
885 modificações na intensidade ou no tempo das atividades elétricas do coração.
886 Sua eficácia é notável na identificação de mudanças funcionais, as quais
887 refletem alterações nas leituras das ondas cardíacas capturadas pelo aparelho
888 (DAMY et al., 2010; PEZOLATO et al., 2017).

889 Inicialmente, no grupo com parkinsonismo (OVX+V-6-OHDA), houve uma
890 transformação significativa na forma da onda P. Essas mudanças podem indicar
891 desde o alargamento das câmeras atriais, ocasionando sobrecarga atrial, até
892 bloqueios de condução, e servem como indícios de possíveis condições como
893 fibrilação atrial (BACHAROVA; WAGNER, 2015; BAYÉS DE LUNA et al., 1988;
894 ENRIQUEZ et al., 2015; MASSÓ-VAN ROESSEL et al., 2017; O'NEAL et al.,
895 2016).

Apesar de termos poucas informações sobre os aspectos do ECG em ratos, especialmente em relação ao parkinsonismo, é crucial investigar as possíveis variações que podem ocorrer.

É importante destacar que a fibrilação atrial está associada ao risco de morte súbita e uma de suas características distintivas é o aumento da frequência cardíaca (CHEN et al., 2013; KOENE et al., 2017). Contrariamente, os animais apresentaram uma redução na frequência cardíaca. Isso estabelece um ciclo, pois mudanças cardíacas podem causar hipoperfusão cerebral devido à formação de microêmbolos, impactando a atividade cerebral (ALONSO et al., 2009; GORELICK, 2004; GORELICK et al., 2011; LAUNER et al., [s.d.]; SIDHU; MARINE, 2020). Assim, o ECG exibiu sinais de bradicardia entre as ondas T e P, além de uma variação irregular na amplitude da onda R.

O que se destacou foi o aumento observado no segmento ST no eletrocardiograma, causado tanto pela indução do parkinsonismo, quanto pelo tratamento com estradiol, sendo ainda maior no grupo OVX+E-6-OHDA. Esse prolongamento está associado à extensão do potencial de ação dos ventrículos, servindo como um marcador indicativo de isquemia e possível ocorrência de eventos cardíacos graves. Essa disfunção parece estar ligada ao funcionamento do sistema nervoso autônomo, podendo resultar em arritmias cardíacas e, consequentemente, em desfechos fatais (LEEPER, 2003; SURAWICZ; KNOEBEL, 1984). Entretanto, neste caso, essas alterações não parecem estar associadas a anormalidades funcionais, pois uma análise abrangente do complexo QRS não revela diferenças significativas. O complexo QRS, que reflete a despolarização ventricular, está associado à contração da musculatura ventricular (BAGLIANI et al., 2017). Consequentemente, as modificações

921 individuais não parecem afetar a funcionalidade ventricular, sugerindo a
922 possibilidade de um mecanismo de compensação em ação (DENKER et al.,
923 1983).

924 Houve redução da amplitude da onda T no grupo OVX+E-6-OHDA, e, de
925 acordo com Woodrow (2009), uma onda T baixa pode estar relacionada à
926 hipopotassemia, o que dificulta a repolarização das células miocárdicas. Este
927 grupo experimental também apresentou uma onda U, que pode estar associada
928 à hipocalemia, diminuindo a força de contração cardíaca (HAMLIN, 2005;
929 KIHLENGREN et al., 2023). Para confirmar essa situação, são necessários mais
930 testes para complementar os dados obtidos.

931 A onda U está intimamente relacionada à fase diastólica do ciclo mecânico
932 do coração. Ela surge imediatamente antes da segunda bulha, marcando o início
933 do relaxamento ventricular, e é mais visível durante a fase diastólica após essa
934 segunda bulha (MANNING et al., 2014; SCHIMPF et al., 2008). Essa onda
935 parece estar associada às células miocárdicas profundas, que apresentam um
936 potencial de ação mais prolongado. A presença da onda U pode refletir variações
937 no processo de repolarização ao longo da parede ventricular, devido a diferenças
938 de voltagem entre as regiões mais profundas, o endocárdio e o epicárdio
939 (CHHABRA; SPODICK, 2013; LOCATI; BAGLIANI; PADELETTI, 2017; YAN;
940 ANTZELEVITCH, 1998).

941 Embora raramente utilizada para fins de diagnóstico, a onda U pode
942 influenciar a interpretação de um ECG, especialmente quando associada ao
943 intervalo QT. Quando um prolongamento do intervalo QT é acompanhado pelo
944 aparecimento de uma onda U positiva, pode indicar uma redução na

945 probabilidade de infarto do miocárdio (SPARROW et al., 1983), embora não
946 exclua a possibilidade de doença coronariana.

5.3. Resultados Estudo 2 – Análise do balanço redox

Determinação da efetividade do tratamento com estradiol

Como no protocolo 1, a análise estatística mostrou o efeito do tratamento com estradiol nos valores de peso uterino ($p < 0,0001$). Houve um aumento no peso uterino em animais tratados com estradiol, em comparação com seus grupos controle tratados com veículo (OVX+V-SHAM: $0,222 \pm 0,044$ vs OVX+E-SHAM: $0,393 \pm 0,086$ $p < 0,0001$; OVX+V-6-OHDA: $0,184 \pm 0,032$ vs OVX+E-6-OHDA: $0,438 \pm 0,085$ $p < 0,0001$), confirmando a eficácia do tratamento (Fig. 11A). O comprimento da tíbia (Fig. 11B) e a relação útero/tíbia (Fig. 11C) indicam que não há diferenças estatísticas entre o tamanho dos animais e que isso não interfere no peso uterino.

Determinação da efetividade da indução do parkinsonismo por 6-OHDA

As ratas utilizadas para análise do equilíbrio redox também foram avaliadas quanto à concentração de dopamina no estriado para determinar a eficácia da lesão (Fig. 12). A ANOVA de 2 vias mostrou efeito da indução do parkinsonismo ($p < 0,0001$). Como esperado, os grupos OVX+V-6-OHDA ($3,063 \pm 1,784$) e OVX+E-6-OHDA ($2,736 \pm 1,996$) apresentaram redução na concentração de dopamina estriatal em comparação com os grupos OVX+V-SHAM ($11,022 \pm 1,529$) e OVX+E-SHAM ($11,391 \pm 1,923$), respectivamente. A análise estatística não mostrou efeito do tratamento e interação entre os fatores.

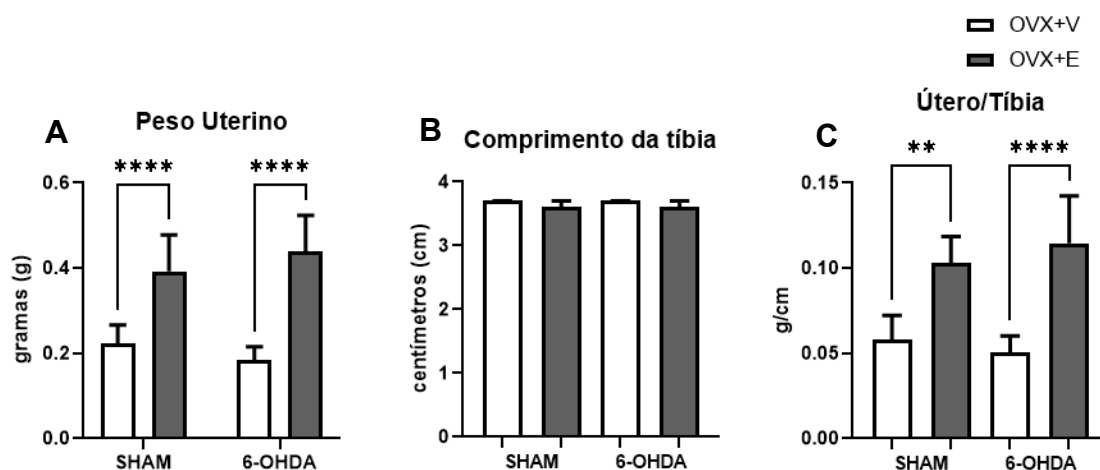


Figura 11. Efeito do tratamento com estradiol e indução de parkinsonismo no peso uterino (A), comprimento da tíbia (B) e relação útero/tíbia (C) de ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol ou veículo (óleo de amêndoas) e submetidas a lesão por 6-OHDA ou SHAM (veículo). O peso uterino foi analisado por ANOVA de 2 vias seguida pelo pós-teste de Tukey e seus resultados são expressos como média $\pm$ DP. O comprimento da tíbia e a relação útero/tíbia foram analisados por Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn e os resultados são expressos como mediana $\pm$ intervalo interquartil. OVX+V-SHAM n=10; OVX+E-SHAM n=11; OVX+V-6-OHDA n=11; OVX+E-6-OHDA n=11. **p<0,01 ****p<0,0001.

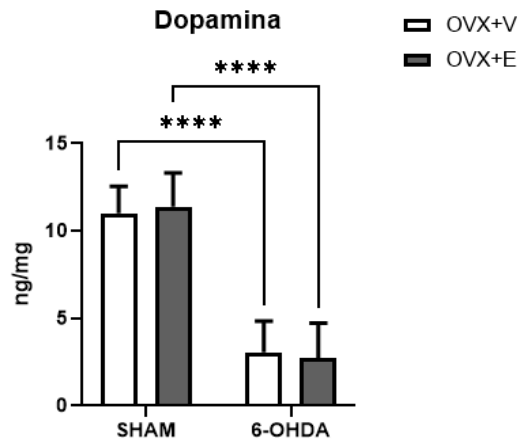


Figura 12. Concentração de dopamina (DA) no estriado após 7 dias de infusão bilateral de veículo (SHAM) ou 6-OHDA em ratas ovariectomizadas tratadas com veículo (óleo de amêndoas) ou estradiol, utilizadas para a avaliação do balanço redox. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey. Os resultados são expressos como média $\pm$ DP. Nível de significância: $p < 0,05$. OVX+V-SHAM $n=9$; OVX+E-SHAM $n=11$; OVX+V-6-OHDA $n=8$; OVX+E-6-OHDA $n=11$. **** $p < 0,0001$.

No ventrículo direito, a análise estatística dos dados de lipoperoxidação (Fig. 13A) apontou efeito da indução do parkinsonismo ($p < 0,0001$). Houve redução da oxidação de lipídeos no grupo OVX+V-6-OHDA ($0,121 \pm 0,01$) e comparados ao seu controle OVX+V-SHAM ($0,209 \pm 0,061$). A indução do parkinsonismo também levou à diminuição da formação de MDA (Fig. 13B) ($p < 0,0001$), independente do tratamento hormonal (OVX+V-SHAM: $0,100 \pm 0,03$ vs OVX+V-6-OHDA: $0,049 \pm 0,006$; OVX+E-SHAM: $0,120 \pm 0,026$ vs OVX+E-6-OHDA: $0,048 \pm 0,003$). Ainda, o grupo OVX+V-6-OHDA apresentou redução na carbonilação de proteínas (Fig. 13C) ($2,061 \pm 0,669$) comparado ao grupo OVX+V-SHAM ($3,910 \pm 0,841$), e o tratamento com estradiol impediu que essa alteração ocorresse (OVX+E-6-OHDA: $3,647 \pm 0,546$). Não houve diferenças significativas entre os grupos nas análises de NO_2^- (Fig. 13D) e dos antioxidantes SOD (Fig. 13E), CAT (Fig. 13F) e GST (Fig. 13G).

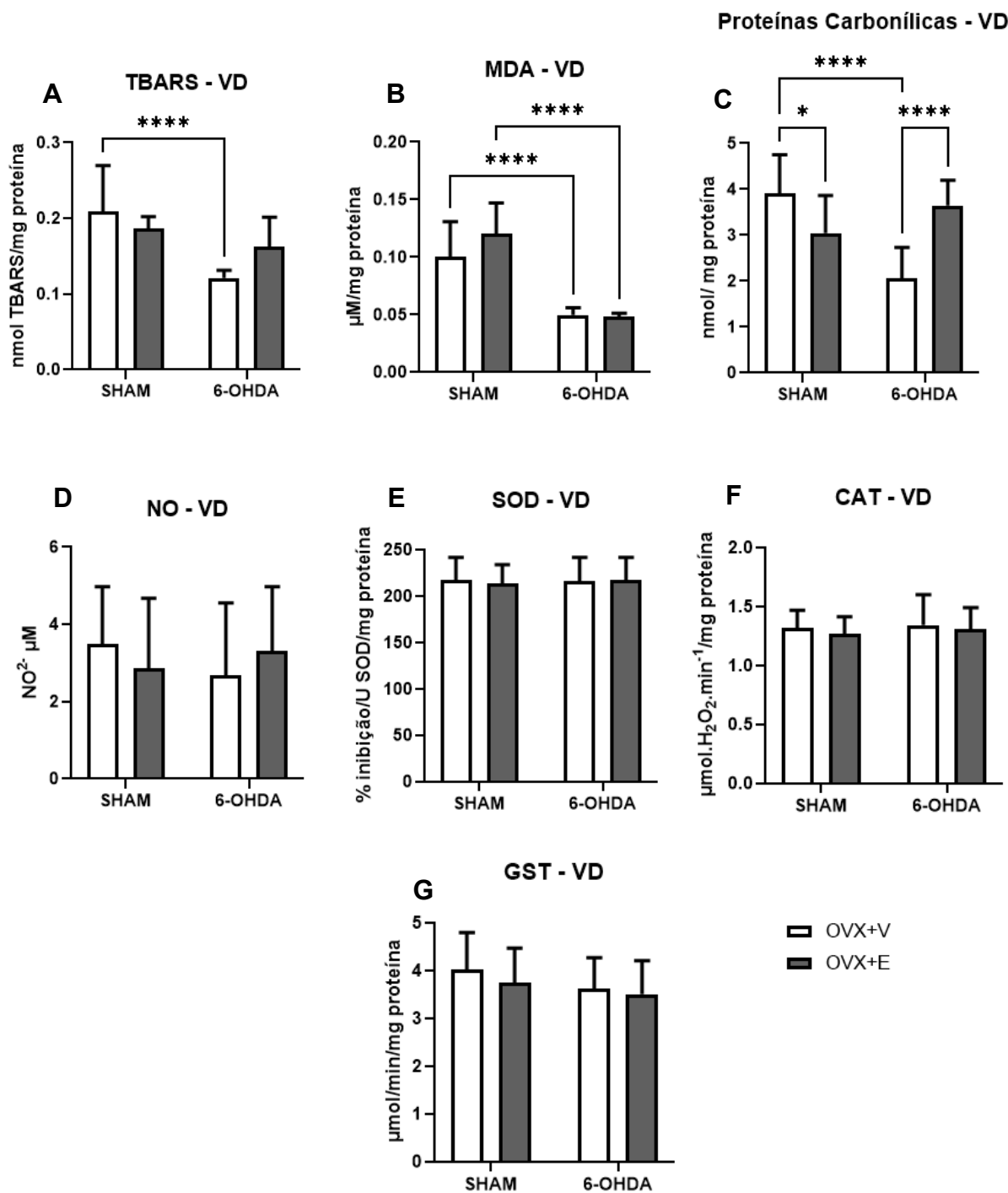


Figura 13. Quantificação de TBARS, MDA, PC, NO₂⁻, SOD, CAT e GST no ventrículo direito de ratas ovariectomizadas tratadas com veículo (óleo de amêndoas) ou estradiol e induzidas ao parkinsonismo com 6-OHDA ou controle SHAM (salina). Os dados foram analisados por ANOVA de 2 vias seguidas pelo pós-teste de Tukey. Os resultados são expressos como média $\pm$ DP. OVX+V-SHAM n=9; OVX+E-SHAM n=11; OVX+V-6-OHDA n=8; OVX+E-6-OHDA n=11. *p<0,05 ****p<0,0001.

Balanço redox no ventrículo esquerdo

No ventrículo esquerdo, a indução do parkinsonismo por 6-OHDA também provocou a redução de lipoperoxidação (Fig. 14A) (OVX+V-SHAM: $3.222 \pm 0,475$ vs OVX+V-6-OHDA: $2,076 \pm 0,438$; OVX+E-SHAM: $3,024 \pm 0,427$ vs OVX+E-6-OHDA: $2,421 \pm 0,405$) e MDA (Fig. 14B) (OVX+V-SHAM: $0,069 \pm 0,009$ vs OVX+V-6-OHDA: $0,049 \pm 0,004$; OVX+E-SHAM: $0,082 \pm 0,018$ vs OVX+E-6-OHDA: $0,055 \pm 0,008$), independente do tratamento com estradiol. O grupo OVX+V-6-OHDA apresentou aumento da carbonilação de proteínas (Fig. 14C) ($4,177 \pm 0,795$) comparado ao seu controle SHAM ($2,987 \pm 0,490$) e o tratamento hormonal impediu este aumento (OVX+E-6-OHDA: $2,147 \pm 0,754$). A análise da quantificação do NO_2^- não apresentou diferença entre os grupos.

O tratamento com estradiol promoveu o aumento das barreiras antioxidantes, como a CAT (Fig. 14F) ($2,349 \pm 0,254$) e GST (Fig, 14G) ($1,345 \pm 0,183$), no grupo com parkinsonismo (OVX+E-6-OHDA). Não houve alteração da SOD (Fig.14E).

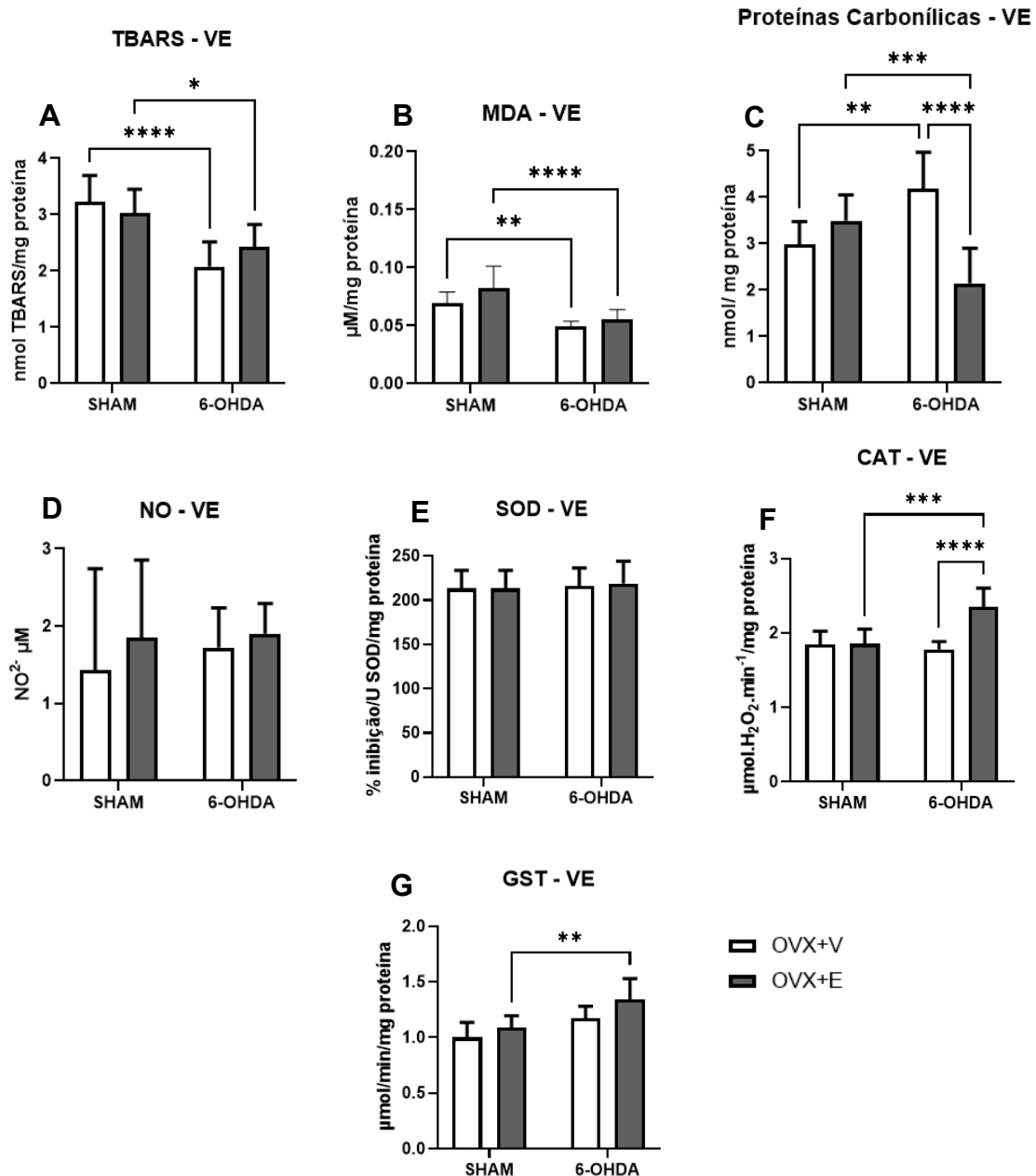


Figura 14. Quantificação de TBARS, MDA, PC, NO₂⁻, SOD, CAT e GST no ventrículo esquerdo de ratas ovariectomizadas tratadas com veículo (óleo de amêndoas) ou estradiol e induzidas ao parkinsonismo com 6-OHDA ou controle SHAM (salina). Os dados foram analisados por ANOVA de 2 vias seguidas pelo pós-teste de Tukey. Os resultados são expressos como média ± DP. OVX+V-SHAM n=9; OVX+E-SHAM n=11; OVX+V-6-OHDA n=8; OVX+E-6-OHDA n=11. *p<0,05 **p<0,01 ****p<0,0001.

984 ***Balanço redox na aorta torácica***

985 Na aorta torácica, o tratamento com estradiol promoveu o aumento da
986 carbonilação proteica (Fig. 15C) no grupo 6-OHDA (OVX+E-6-OHDA: $46,845 \pm$
987 $6,208$), comparado aos grupos OVX+E-SHAM ($26,047 \pm 3,623$) e OVX+V-6-
988 OHDA ($36,471 \pm 5,788$). Esta análise apontou efeito do parkinsonismo
989 ($p < 0,0001$) e interação entre os fatores parkinsonismo e tratamento hormonal
990 ($p = 0,0056$).

991 As demais análises de balanço redox na aorta torácica não apresentaram
992 resultados estatisticamente significativos.

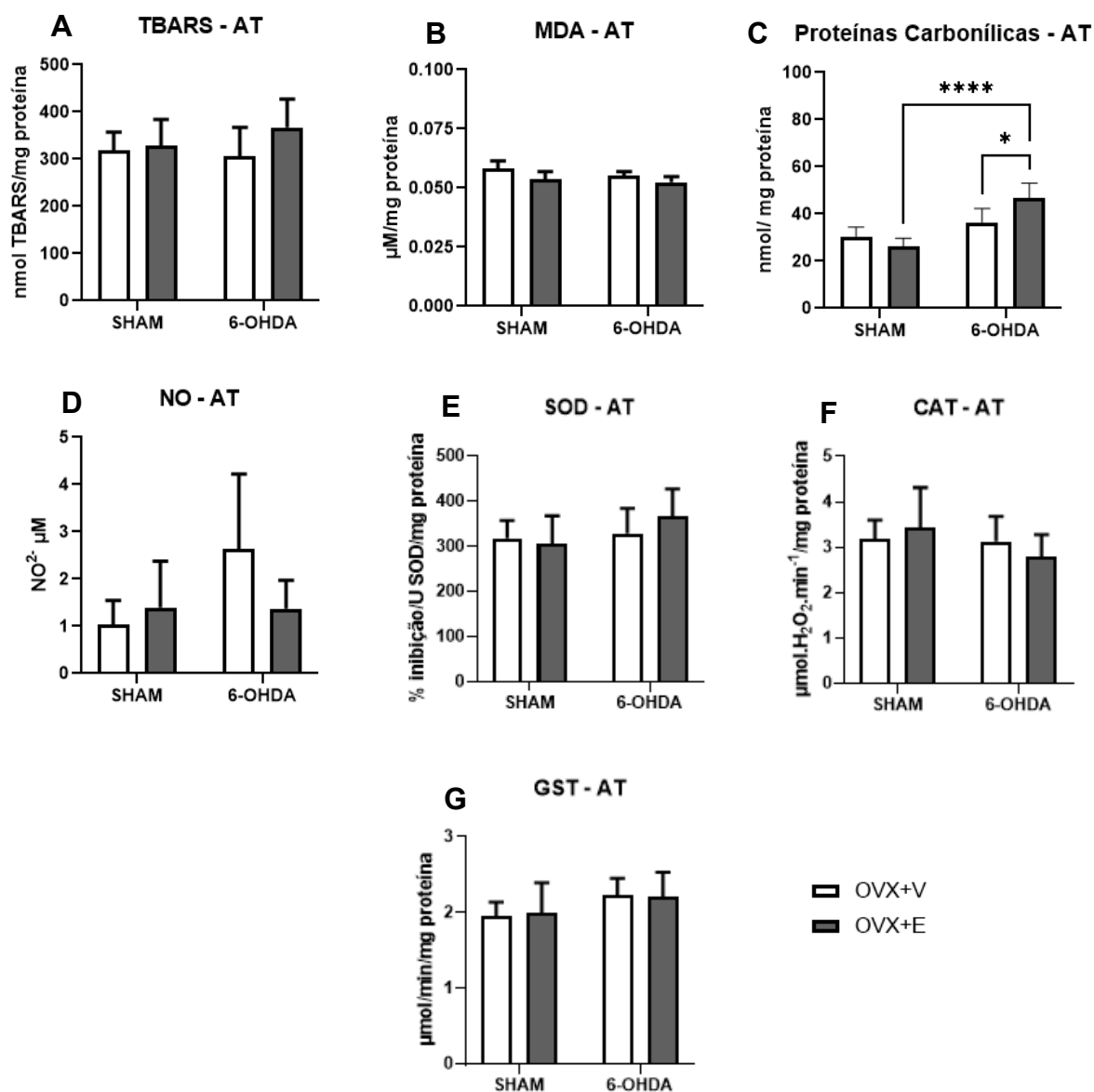


Figura 15. Quantificação de TBARS, MDA, PC, NO₂⁻, SOD, CAT e GST na aorta torácica de ratas ovariectomizadas tratadas com veículo (óleo de amêndoas) ou estradiol e induzidas ao parkinsonismo com 6-OHDA ou controle SHAM (salina). Os dados foram analisados por ANOVA de 2 vias seguidas pelo pós-teste de Tukey. Os resultados são expressos como média $\pm$ DP. OVX+V-SHAM n=9; OVX+E-SHAM n=11; OVX+V-6-OHDA n=8; OVX+E-6-OHDA n=11. *p<0,05 **p<0,01 ****p<0,0001.

5.4. Discussão Estudo 2 – Análise do balanço redox

A confirmação da eficácia da lesão por 6-OHDA foi realizada a partir da concentração de dopamina no estriado, que reduziu mais de 50% nos grupos 6-OHDA comparados aos seus respectivos controles SHAM.

Efeito do estrógeno no balanço redox de ratas ovariectomizadas

A comparação entre os grupos OVX+V-SHAM e OVX+E-SHAM destaca as alterações causadas pelo tratamento hormonal com estradiol em ratas ovariectomizadas.

Estudos relataram a associação entre hormônios gonadais e estresse oxidativo, que tem sido relacionado ao início de doenças cardiovasculares após a menopausa, bem como ao desenvolvimento da doença de Parkinson. Um estudo conduzido por EVSEN et al. (2013) mostrou que ratas ovariectomizadas apresentaram um aumento no estado oxidante total (TOS) e no índice de estresse oxidativo (OSI), bem como uma diminuição do estado antioxidante total no cérebro (TAS). Neste estudo, o tratamento com estrógeno, uma combinação com estrógeno e progesterona, e genisteína resultou em uma diminuição no TOS e um aumento de TAS, após 8 semanas, revertendo efetivamente o estresse oxidativo causado pela ovariectomia (EVSEN et al., 2013). No entanto, AGACAYAK et al. (2015) demonstraram que a ovariectomia não induziu nenhuma mudança nos níveis de TOS, OSI e TAS. Além disso, o tratamento com estradiol ou genisteína resultou em um aumento nos níveis de TOS e OSI (AGACAYAK et al., 2015).

Um estudo de revisão apontou que os hormônios sexuais femininos, especialmente os estrogênios, conferem uma variedade de efeitos protetores sobre o sistema cardiovascular, pois inibem o estresse oxidativo no sistema

1018 vascular e no miocárdio por meio de uma dupla ação que inclui a diminuição da
1019 geração local de ERO e o aumento de sua eliminação (ARIAS-LOZA;
1020 MUEHLFELDER; PELZER, 2013).

1021 Em nosso estudo, o tratamento com estradiol foi capaz de diminuir a
1022 carbonilação de proteínas em comparação às ratas ovariectomizadas e tratadas
1023 apenas com veículo. Entretanto, como não houve alteração das barreiras
1024 antioxidantes avaliadas, não é possível concluir qual o mecanismo envolvido
1025 nesta alteração. Os outros parâmetros avaliados não sofreram efeito deste
1026 tratamento hormonal. Possivelmente, a ovariectomia por si só, sem outras
1027 condições patológicas envolvidas, não alterou o balanço redox neste espaço de
1028 tempo do experimento (15 dias).

1029 ***Efeito da indução do parkinsonismo no balanço redox de ratas*** 1030 ***ovariectomizadas***

1031 A comparação entre os grupos OVX+V-SHAM e OVX+V-6-OHDA mostra
1032 o efeito da indução do parkinsonismo em ratas ovariectomizadas.

1033 A 6-OHDA é uma neurotoxina catecolaminérgica seletiva frequentemente
1034 empregada na investigação da patogênese e progressão da doença de
1035 Parkinson (DP). Esta substância inibe diretamente a cadeia respiratória
1036 mitocondrial no nível do complexo I, gerando estresse oxidativo, um mecanismo
1037 molecular crucial para a degeneração da dopamina. Semelhante à
1038 neurodegeneração observada na DP, a perda neuronal catecolaminérgica
1039 induzida pela 6-OHDA está associada ao aumento do estresse oxidativo e
1040 inflamação (RODRIGUEZ-PALLARES et al., 2007).

1041 Após a injeção unilateral de 6-OHDA em ratos Wistar, Haddadi et al.
1042 (2020) observaram uma redução na atividade das enzimas antioxidantes, nos

1043 níveis de GSH e na razão GSH/GSSG, além de um aumento na peroxidação
1044 lipídica no mesencéfalo central após 15 dias. Lopez-Real et al. (2005) relataram
1045 um aumento da peroxidação lipídica no estriado e no mesencéfalo ventral sete
1046 dias após a lesão unilateral por 6-OHDA em ratos Sprague-Dawley. Esses
1047 achados corroboram com dados na literatura que indicam que o modelo de 6-
1048 OHDA provoca neurotoxicidade devido aos danos induzidos por ERO, depleção
1049 rápida de GSH e insuficiência de enzimas antioxidantes (HADDADI et al., 2020).

1050 Em pacientes com DP, há diversas evidências de estresse oxidativo no
1051 sistema nervoso, envolvendo peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e de
1052 DNA, acúmulo de ferro, além da redução das defesas antioxidantes como SOD,
1053 CAT e GSH-Px (GANDHI; ABRAMOV, 2012; HEMMATI-DINARVAND et al.,
1054 2019; PERCÁRIO et al., 2020; SANDERS; GREENAMYREN, 2013).

1055 Em relação aos marcadores de estresse oxidativo periféricos, ainda não
1056 há consenso. Por meio de uma metanálise, WEI et al. (2018) investigaram
1057 alteração dos marcadores de estresse oxidativo circulantes em pacientes com
1058 DP, comparados com pacientes saudáveis. Os dados apontaram que estes
1059 pacientes tinham concentrações elevadas de 8-OHdG, MDA, NO₂⁻ e ferritina,
1060 juntamente com níveis séricos reduzidos de catalase, ácido úrico, glutathione e
1061 colesterol total (WEI et al., 2018).

1062 Em modelos experimentais, há uma carência de estudos que investiguem
1063 o estresse oxidativo em órgãos do sistema cardiovascular. Essa falta de
1064 evidências é ainda mais acentuada em estudos envolvendo fêmeas.

1065 A indução do parkinsonismo reduziu o dano oxidativo de proteínas e
1066 lipídeos no VD. No VE, houve diminuição na peroxidação lipídica, mas ocorreu
1067 um aumento no dano oxidativo a proteínas. Em ambos os ventrículos, as

mudanças foram independentes da atividade das enzimas antioxidantes avaliadas. Possivelmente, barreiras antioxidantes não enzimáticas estariam envolvidas na melhora deste perfil oxidativo. Outros estudos são necessários para investigar essa hipótese.

Efeito do tratamento com estradiol no balanço redox de ratas ovariectomizadas e induzidas ao parkinsonismo

O efeito do tratamento com estradiol em ratas induzidas ao parkinsonismo é evidenciado pela comparação dos grupos OVX+V-6-OHDA e OVX+E-6-OHDA.

Este tratamento hormonal promoveu diferentes efeitos nos tecidos avaliados: enquanto no VD acontece o aumento de carbonilação proteica, no VE ocorre a redução neste parâmetro, além do aumento de CAT e GST.

De Jager e colaboradores identificaram um aumento de NO₂⁻ e hiporreatividade vascular na aorta torácica de ratos machos com parkinsonismo induzido por 6-OHDA (DE JAGER et al., 2018, 2023). No entanto, estudos anteriores com fêmeas (DE CAMPOS et al., 2020) e o presente estudo não encontraram diferenças na quantificação de NO₂⁻ na aorta torácica dos animais tratados com 6-OHDA, contrastando com os dados observados em machos. A ovariectomia (OVX+V-6-OHDA) e o tratamento hormonal com estradiol (OVX+E-6-OHDA) não resultaram em diferenças significativas na análise de NO₂⁻, sugerindo que os hormônios ovarianos não influenciam essa medida. Por outro lado, o tratamento com estradiol em fêmeas com parkinsonismo resultou em um aumento da carbonilação de proteínas, indicando um efeito pró-oxidante.

Segundo FERRAZ et al. (2008), o estrógeno tem se mostrado como um protetor da dopamina estriatal contra lesões induzidas por 6-OHDA em neurônios da via nigroestriatal. No entanto, a extensão da neuroproteção proporcionada

1093 pelo estrógeno parece depender da gravidade da lesão provocada. Quando a
1094 neurotoxina é infundida diretamente na SNpc, resulta em morte celular mais
1095 rápida, levando a uma maior depleção de dopamina comparado aos modelos
1096 onde a neurotoxina é injetada no feixe prosencefálico medial ou diretamente no
1097 estriado. A escolha dos modelos experimentais pode desempenhar um papel
1098 significativo nos benefícios do estrógeno observados nos estudos, assim, pode
1099 ser que este não tenha mostrado maiores benefícios devido ao modelo
1100 experimental utilizado (FERRAZ et al., 2008).

1101 É difícil dizer se o estrogênio tem um perfil pró-oxidante ou antioxidante,
1102 além do fato de que não há semelhança entre os órgãos em relação ao dano
1103 oxidativo causado pela indução do parkinsonismo. Acreditamos que muitos dos
1104 achados tenham explicação nas funções exercidas pelos órgãos avaliados,
1105 sendo diferentes entre o ventrículo direito e esquerdo, onde é sabido que o
1106 ventrículo direito opera em baixas pressões e o esquerdo em altas pressões.

1107 Sabe-se que as ERO estão envolvidas no envelhecimento do sistema
1108 cardiovascular e na patogênese de insuficiência cardíaca, bem como em suas
1109 condições predisponentes, como crescimento e remodelamento hipertrófico,
1110 além da aterosclerose, apoptoses e infarto do miocárdio. Em excesso, as ERO
1111 também alteram os sinais de contratilidade intracelular em cardiomiócitos,
1112 comprometendo a função ventricular e promovendo fibrose cardíaca (KWON et
1113 al., 2003; OBAS; VASAN, 2018; SEDDON; LOOI; SHAH, 2007). No entanto, a
1114 falta de estudos sobre o estresse oxidativo no coração em modelos de
1115 parkinsonismo dificulta a obtenção de conclusões mais assertivas com
1116 embasamento científico, ressaltando a necessidade de mais pesquisas nessa
1117 área.

Resultados Estudo 3 – Análises histológicas

Determinação da efetividade do tratamento com estradiol

A análise estatística dos parâmetros morfométricos (Fig. 16) de peso uterino, comprimento da tíbia e relação útero/tíbia mostrou o efeito do tratamento com estradiol nos valores de peso uterino ($p < 0,0001$). Como esperado, o tratamento com estradiol promoveu hipertrofia uterina (OVX+E-SHAM: $0,429 \pm 0,089$ vs OVX+V-SHAM: $0,241 \pm 0,036$; OVX+E-6-OHDA: $0,401 \pm 0,081$ vs OVX+V-6-OHDA: $0,190 \pm 0,042$), e estes dados não tiveram influência do tamanho do animal, observado pelo comprimento da tíbia.

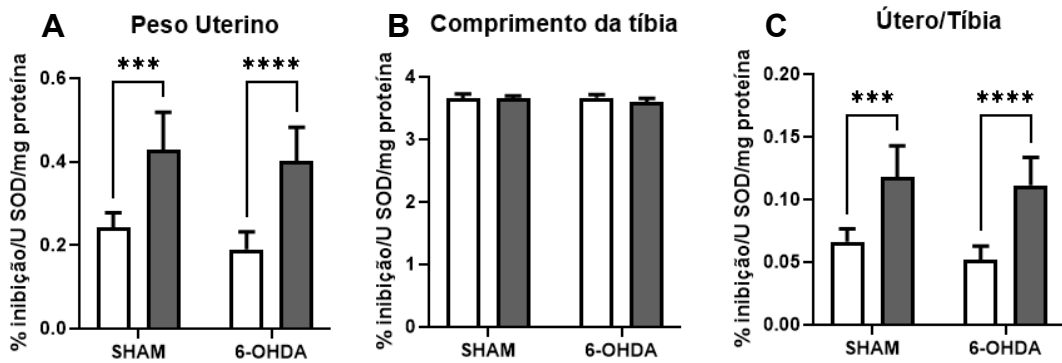


Figura 16. Efeito do tratamento com estradiol e indução de parkinsonismo no peso uterino (A), comprimento da tíbia (B) e razão útero/tíbia (C) de ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol ou veículo (óleo de amêndoas) e submetidas à lesão por 6-OHDA ou SHAM (veículo). O peso uterino e a razão útero/tíbia foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey e os resultados estão expressos como média $\pm$ DP. O comprimento da tíbia foi analisado por Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn e o resultado expresso como mediana $\pm$ intervalo interquartil. Nível de significância: $p < 0,05$. OVX+V-SHAM $n=7$; OVX+E-SHAM $n=8$; OVX+V-6-OHDA $n=6$; OVX+E-6-OHDA $n=6$. *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$.

Determinação da efetividade da indução do parkinsonismo por 6-OHDA

A concentração de dopamina no estriado foi avaliada nos animais utilizados para as análises do estudo 3 (Fig. 17). A ANOVA de 2 vias confirmou o efeito da indução do parkinsonismo ($p < 0,0001$). Como esperado, os grupos OVX+V-6-OHDA ($2,371 \pm 2,048$) e OVX+E-6-OHDA ($3,838 \pm 2,265$) apresentaram redução na concentração de dopamina estriatal em comparação com os grupos OVX+V-SHAM ($9,663 \pm 0,993$) e OVX+E-SHAM ($10,163 \pm 2,046$), respectivamente. Não houve efeito do tratamento e interação entre os fatores.

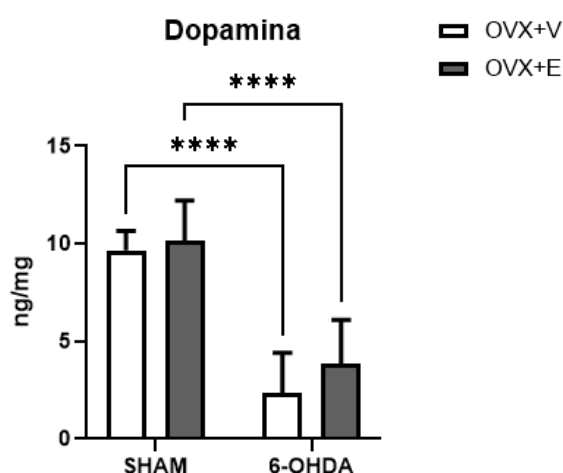


Figura 17. Concentração de dopamina (DA) no estriado após 7 dias de infusão bilateral de veículo (SHAM) ou 6-OHDA em ratas ovariectomizadas tratadas com veículo (óleo de amêndoas) ou estradiol, utilizadas para a avaliação do balanço redox. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey. Os resultados são expressos como média $\pm$ DP. Nível de significância: $p < 0,05$. OVX+V-SHAM $n=8$; OVX+E-SHAM $n=8$; OVX+V-6-OHDA $n=7$; OVX+E-6-OHDA $n=8$. **** $p < 0,0001$.

Análises histológicas do coração

A análise morfológica do ventrículo direito (Fig. 18A) apontou que houve redução da espessura do tecido cardíaco no grupo OVX+E-6-OHDA ($243,095 \mu\text{m} \pm 46,939$) comparado ao grupo OVX+E-SHAM ($292,422 \mu\text{m} \pm 25,958$). A ANOVA de duas vias apontou efeito do parkinsonismo ($p=0,0024$) e do tratamento hormonal ($p=0,0074$), mas não houve interação entre estes fatores. No ventrículo esquerdo (Fig. 18B), a indução do parkinsonismo causou a redução da espessura do órgão (OVX+V-6-OHDA: $450,304 \mu\text{m} \pm 40,818$ vs OVX+V-SHAM: $520,629 \mu\text{m} \pm 34,106$), e o tratamento com estradiol promoveu o espessamento da parede, independente a indução do parkinsonismo (OVX+E-SHAM: $585,355 \mu\text{m} \pm 41,066$; OVX+E-6-OHDA: $532,903 \mu\text{m} \pm 44,552$). Desta forma, a análise estatística mostrou efeito de ambos os fatores ($p \leq 0,0001$).

A avaliação de apoptoses nos tecidos (Fig. 19) indicou que, em ambos os ventrículos, a indução do parkinsonismo resultou em um aumento da morte celular, independentemente do tratamento hormonal administrado. No entanto, observou-se que o tratamento com estradiol foi capaz de reduzir parcialmente a apoptose causada pela indução do parkinsonismo (Fig. 19A: VD: OVX+V-SHAM: $0,372 \pm 0,051$; OVX+V-6-OHDA: $0,925 \pm 0,068$; OVX+E-SHAM: $0,420 \pm 0,031$; OVX+E-6-OHDA: $0,795 \pm 0,096$; Fig. 19B: VE: OVX+V-SHAM: $0,373 \pm 0,035$; OVX+V-6-OHDA: $1,035 \pm 0,070$; OVX+E-SHAM: $0,404 \pm 0,021$; OVX+E-6-OHDA: $0,846 \pm 0,067$).

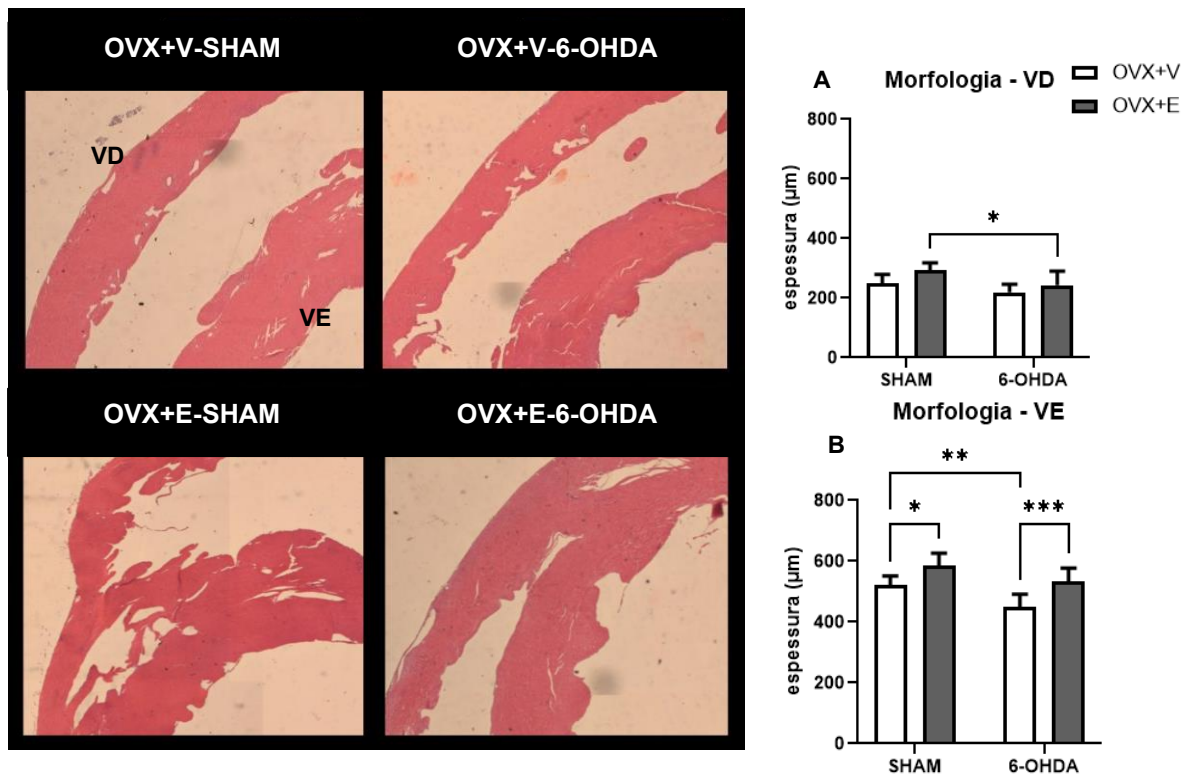


Figura 18. Avaliação morfológica com coloração de HE. Corte histológico de ventrículo direito e esquerdo de ratas ovariectomizadas tratadas com veículo (óleo de amêndoas) ou estradiol e induzidas ao parkinsonismo com 6-OHDA ou controle SHAM (salina). As imagens foram utilizadas para avaliação da espessura do ventrículo direito (A) e ventrículo esquerdo (B), no aumento de 50x. Os dados foram analisados por ANOVA de 2 vias seguidas pelo pós-teste de Tukey. Os resultados são expressos como média $\pm$ DP. OVX+V-SHAM n=13; OVX+E-SHAM n=11; OVX+V-6-OHDA n=9; OVX+E-6-OHDA n=18. *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001.

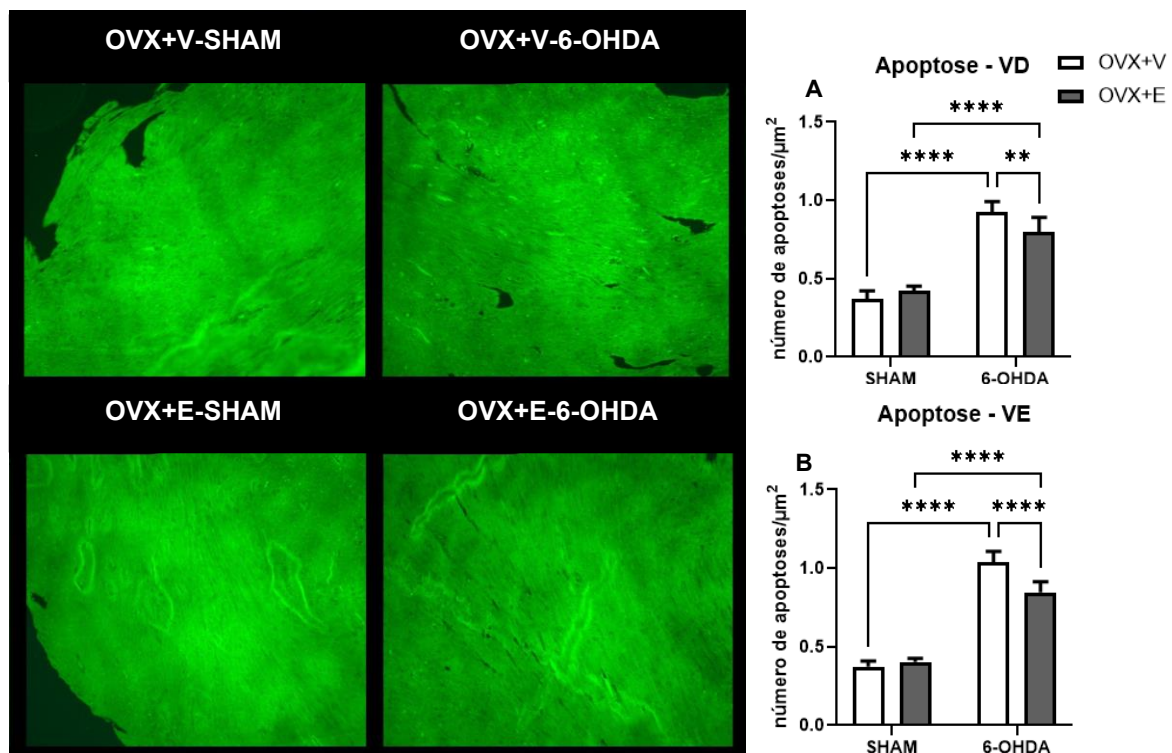


Figura 19. Avaliação de morte celular por ensaio de túnel. Corte histológico de coração de ratas ovariectomizadas tratadas com veículo (óleo de amêndoas) ou estradiol e induzidas ao parkinsonismo com 6-OHDA ou controle SHAM (salina). As imagens foram utilizadas para avaliação do número de apoptoses nos tecidos, em aumento de 400x. Os dados foram analisados por ANOVA de 2 vias seguidas pelo pós-teste de Tukey. Os resultados são expressos como média $\pm$ DP. OVX+V-SHAM n=8; OVX+E-SHAM n=8; OVX+V-6-OHDA n=9; OVX+E-6-OHDA n=9. **p<0,01 ****p<0,0001.

1158 Os grupos 6-OHDA apresentaram redução da quantidade de colágeno
 1159 presente no coração (Fig. 20), comparados aos seus respectivos controles
 1160 (OVX+V-SHAM: $1,599 \pm 0,231$ vs OVX+V-6-OHDA: $0,564 \pm 0,155$; OVX+E-
 1161 SHAM: $1,454 \pm 0,333$ vs OVX+E-6-OHDA: $0,433 \pm 0,031$).

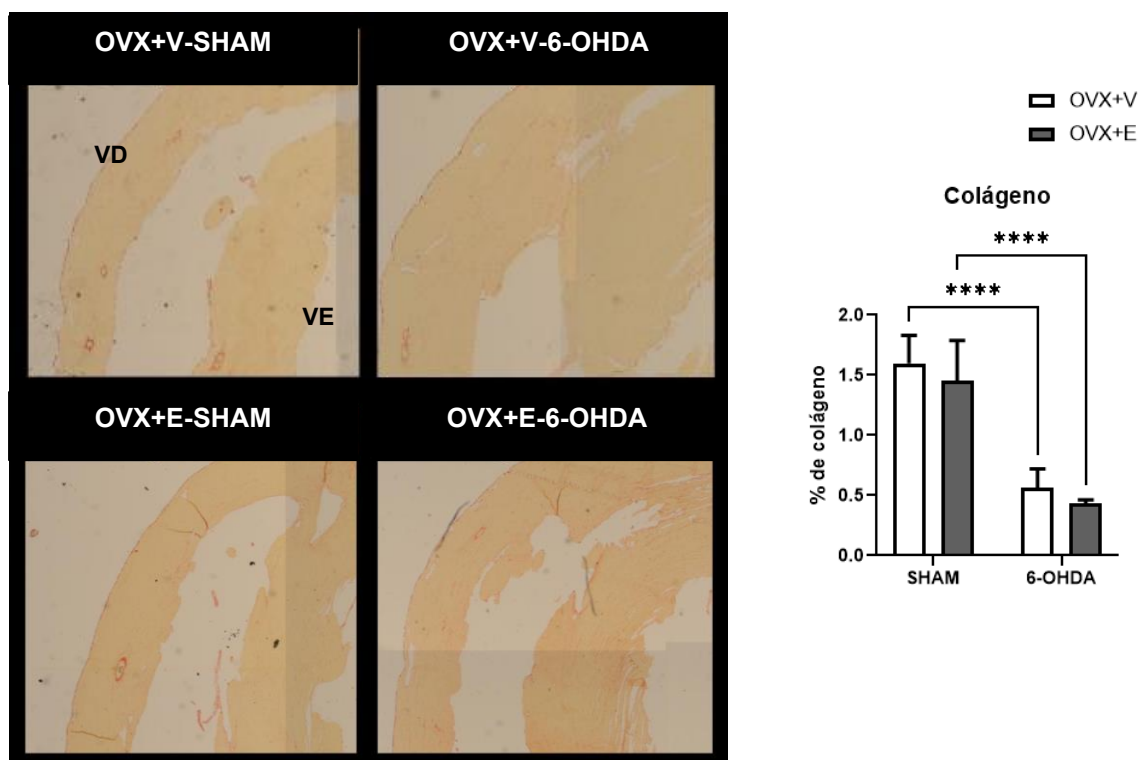


Figura 20. Avaliação de colágeno no tecido com coloração de Sirius Red. Corte histológico de ventrículo direito e esquerdo de ratas ovariectomizadas tratadas com veículo (óleo de amêndoas) ou estradiol e induzidas ao parkinsonismo com 6-OHDA ou controle SHAM (salina), em aumento de 50x. Os dados foram analisados por ANOVA de 2 vias seguidas pelo pós-teste de Tukey. Os resultados são expressos como média $\pm$ DP. OVX+V-SHAM n=8; OVX+E-SHAM n=8; OVX+V-6-OHDA n=9; OVX+E-6-OHDA n=9. ****p<0,0001.

1162 O tratamento com estradiol resultou em um aumento da elastina em
 1163 ambos os grupos. (Fig. 21) No entanto, no grupo OVX+E-6-OHDA, esse
 1164 aumento foi menos acentuado (OVX+V-SHAM: $2,637 \pm 0,307$ vs OVX+E-SHAM:
 1165 $4,437 \pm 0,980$; OVX+V-6-OHDA $1,796 \pm 0,399$ vs OVX+E-6-OHDA: $2,794 \pm$
 1166 $0,701$).

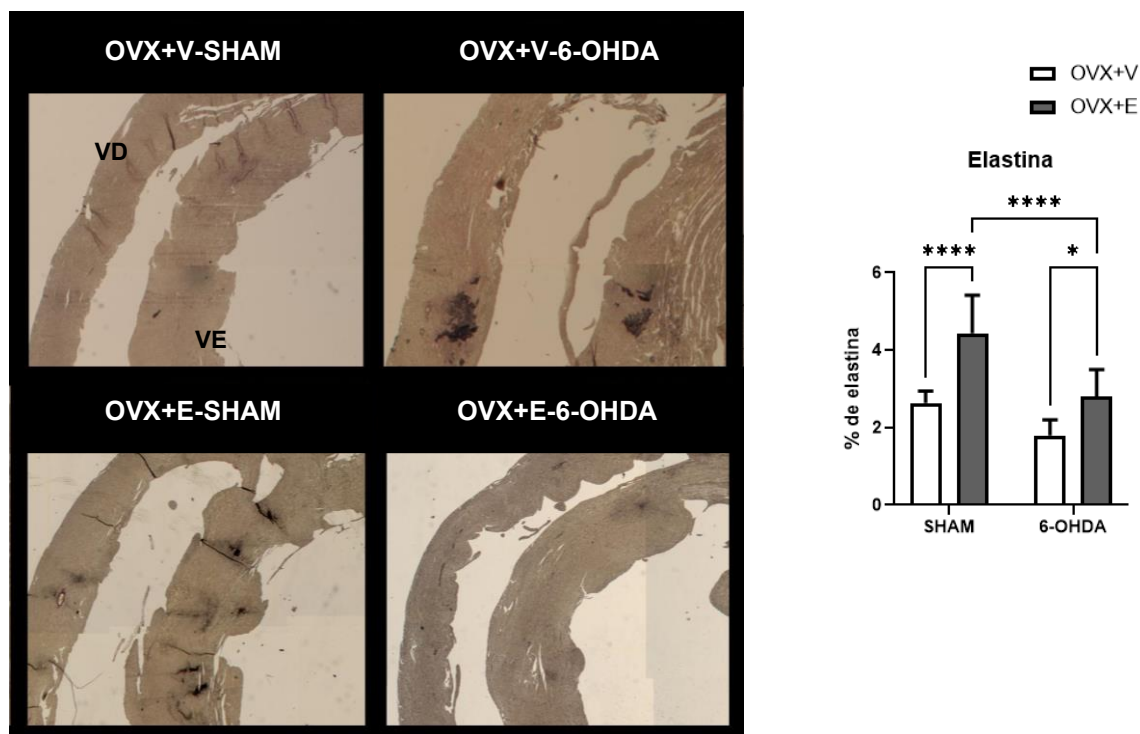


Figura 21. Avaliação de quantidade de elastina no tecido com coloração de Weigert. Corte histológico de ventrículo direito e esquerdo de ratas ovariectomizadas tratadas com veículo (óleo de amêndoas) ou estradiol e induzidas ao parkinsonismo com 6-OHDA ou controle SHAM (salina), em aumento de 50x. Os dados foram analisados por ANOVA de 2 vias seguidas pelo pós-teste de Tukey. Os resultados são expressos como média $\pm$ DP. OVX+V-SHAM n=8; OVX+E-SHAM n=8; OVX+V-6-OHDA n=9; OVX+E-6-OHDA n=9. * $p < 0,05$ **** $p < 0,0001$.

1167 **Análises histológicas da aorta torácica**

1168 As análises morfológicas (Fig. 22) e de apoptose (Fig. 23) da aorta
1169 torácica não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os
1170 grupos.

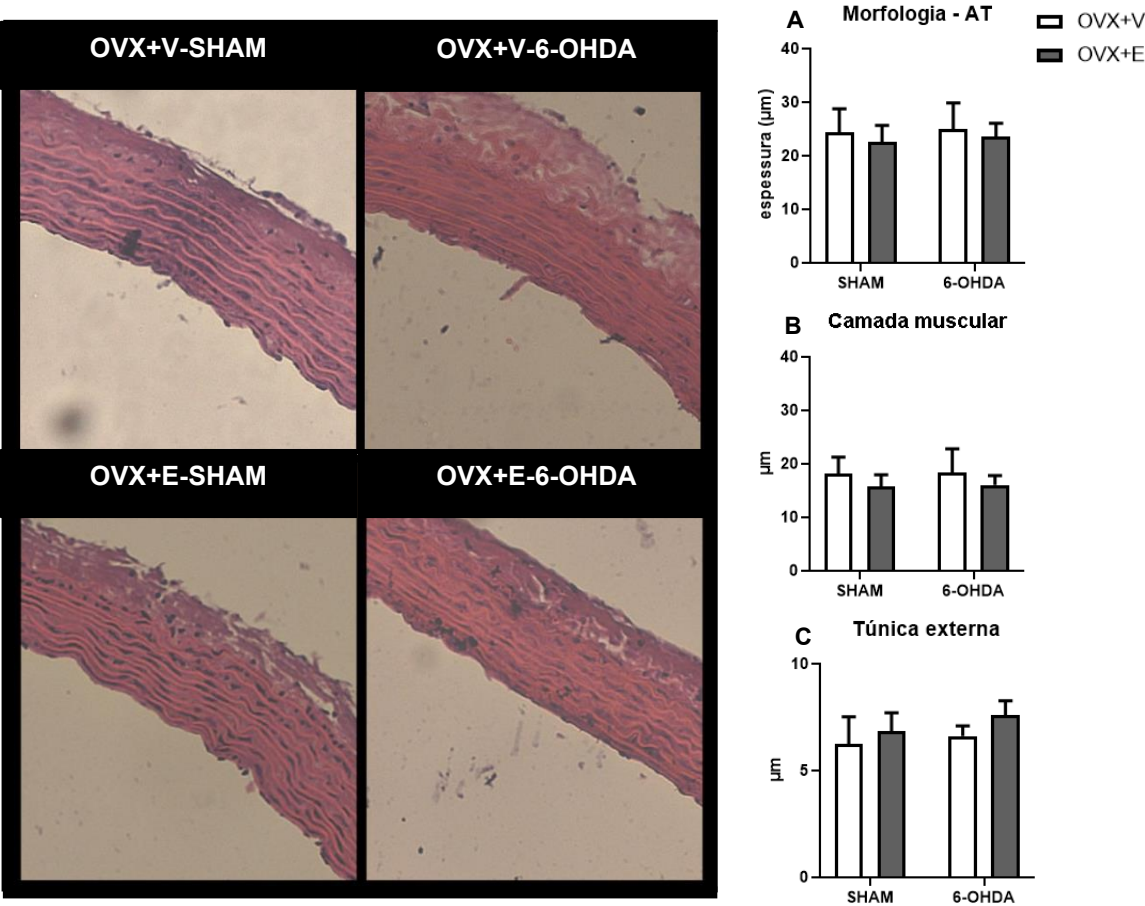


Figura 22. Avaliação morfológica com coloração de HE. Corte histológico de aorta torácica de ratas ovariectomizadas tratadas com veículo (óleo de amêndoas) ou estradiol e induzidas ao parkinsonismo com 6-OHDA ou controle SHAM (salina). As imagens foram utilizadas para avaliação da espessura da aorta torácica (A), camada muscular (B) e túnica externa (C), em aumento de 100x. Os dados foram analisados por ANOVA de 2 vias seguidas pelo pós-teste de Tukey. Os resultados são expressos como média $\pm$ DP. OVX+V-SHAM n=13; OVX+E-SHAM n=11; OVX+V-6-OHDA n=9; OVX+E-6-OHDA n=18.

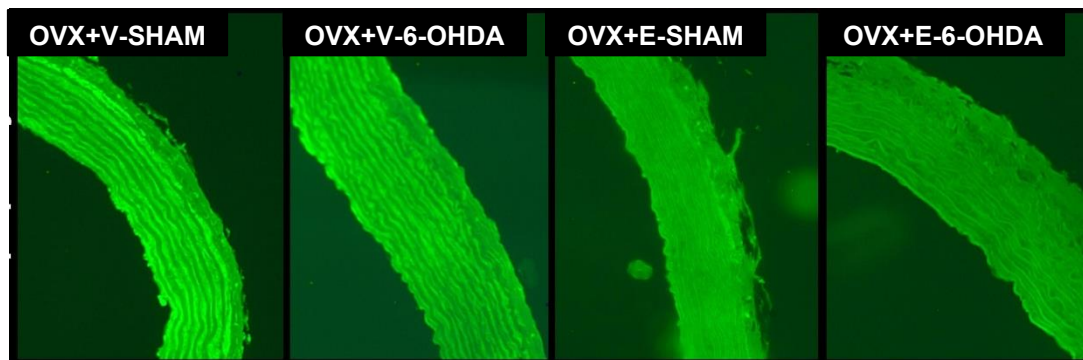


Figura 23. Avaliação de morte celular por ensaio de túnel. Corte histológico de aorta torácica de ratas ovariectomizadas tratadas com veículo (óleo de amêndoas) ou estradiol e induzidas ao parkinsonismo com 6-OHDA ou controle SHAM (salina). As imagens foram utilizadas para avaliação do número de apoptoses no tecido, em aumento de 400x. Devido à ausência de pontos de apoptose, não há dados quantitativos. OVX+V-SHAM n=8; OVX+E-SHAM n=8; OVX+V-6-OHDA n=9; OVX+E-6-OHDA n=9.

1171 A análise estatística apontou efeito da indução do parkinsonismo na
 1172 quantificação de colágeno na aorta (Fig. 24) ($p < 0,0001$). Os grupos 6-OHDA
 1173 tiveram redução na quantidade de colágeno, comparados aos seus grupos
 1174 controle SHAM, independente do tratamento realizado (OVX+V-SHAM: $4,958 \pm$
 1175 $0,544$ vs OVX+V-6-OHDA: $2,619 \pm 0,233$; OVX+E-SHAM: $4,856 \pm 0,782$ vs
 1176 OVX+E-6-OHDA: $2,193 \pm 0,413$).

1177 Na quantificação de elastina (Fig. 25), a análise apontou efeito do
 1178 tratamento hormonal ($p = 0,025$) e interação entre os fatores ($p = 0,0007$). O grupo
 1179 OVX+V-6-OHDA ($7,276 \pm 1,083$) teve aumento de elastina, comparado ao grupo
 1180 OVX+V-SHAM ($5,831 \pm 0,538$), e o tratamento com estradiol inibiu esta alteração
 1181 (OVX+E-6-OHDA: $5,358 \pm 1,156$).

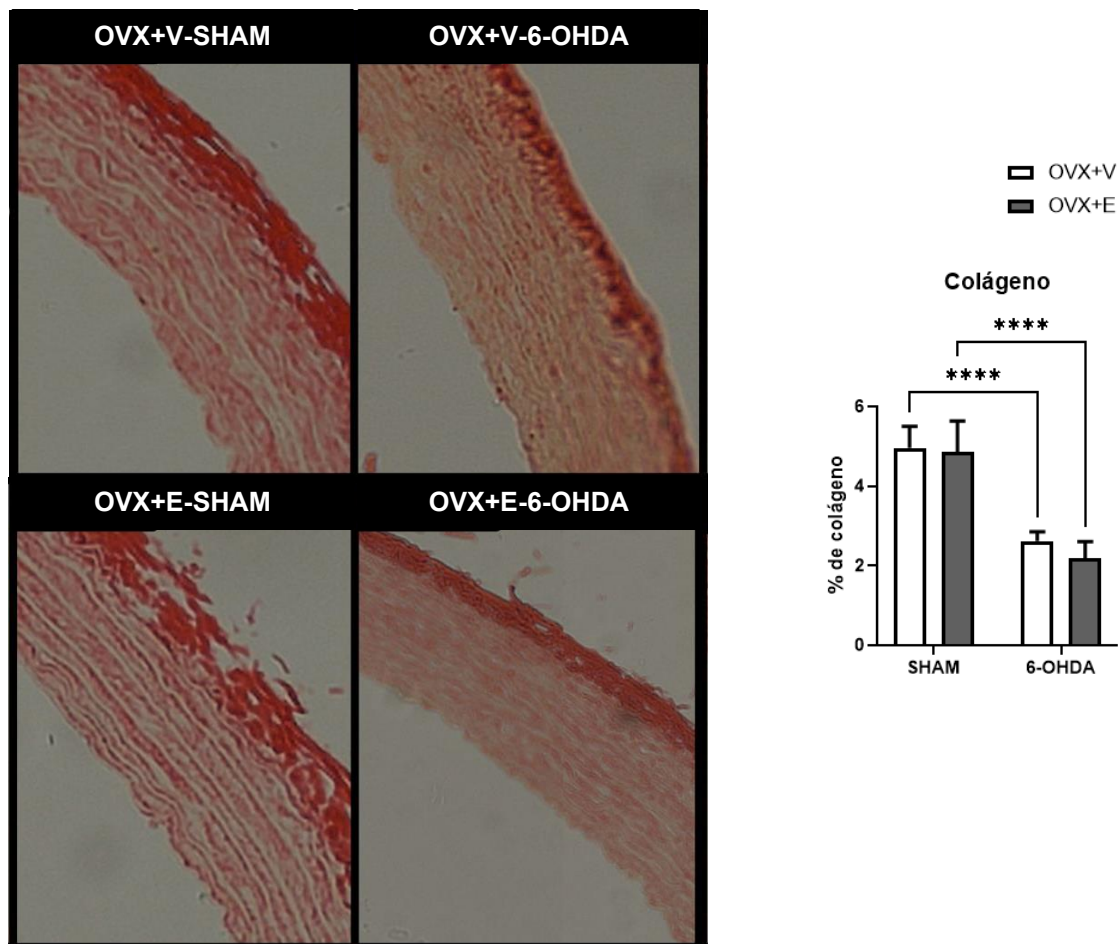


Figura 24. Avaliação de quantidade de colágeno no tecido com coloração de Sirius Red. Corte histológico de aorta torácica de ratas ovariectomizadas tratadas com veículo (óleo de amêndoas) ou estradiol e induzidas ao parkinsonismo com 6-OHDA ou controle SHAM (salina), em aumento de 100x. Os dados foram analisados por ANOVA de 2 vias seguidas pelo pós-teste de Tukey. Os resultados são expressos como média $\pm$ DP. OVX+V-SHAM n=8; OVX+E-SHAM n=8; OVX+V-6-OHDA n=9; OVX+E-6-OHDA n=9. ****p<0,0001.

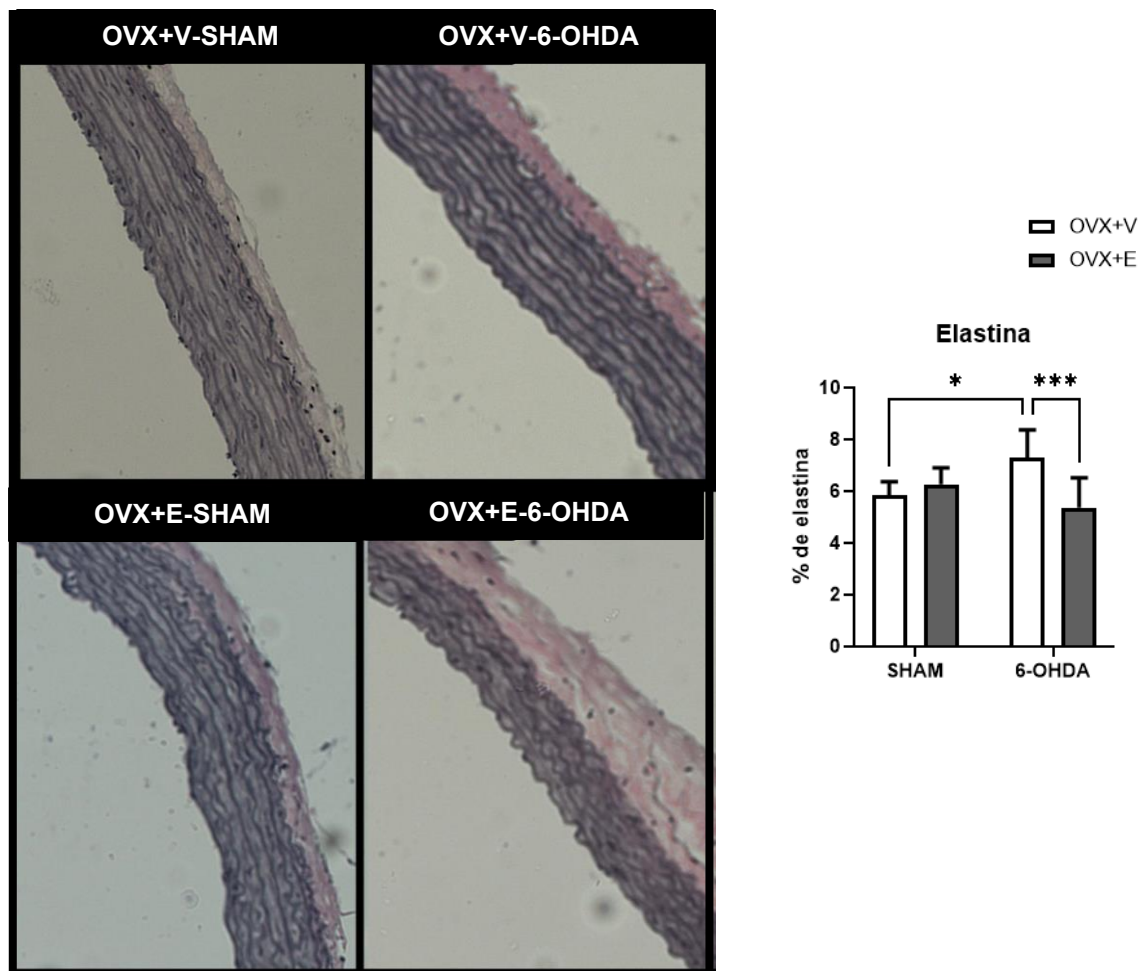


Figura 25. Avaliação de quantidade de elastina no tecido com coloração de Weigert. Corte histológico de aorta torácica de ratas ovariectomizadas tratadas com veículo (óleo de amêndoas) ou estradiol e induzidas ao parkinsonismo com 6-OHDA ou controle SHAM (salina), em aumento de 100x. Os dados foram analisados por ANOVA de 2 vias seguidas pelo pós-teste de Tukey. Os resultados são expressos como média $\pm$ DP. OVX+V-SHAM n=8; OVX+E-SHAM n=8; OVX+V-6-OHDA n=9; OVX+E-6-OHDA n=9. * $p < 0,05$ *** $p < 0,001$.

5.5. Discussão Estudo 3 – Análises histológicas

Neste último estudo, a confirmação da eficácia da lesão por 6-OHDA foi realizada também a partir da concentração de dopamina no estriado, que reduziu mais de 50% nos grupos 6-OHDA comparados aos seus respectivos controles SHAM.

Neste estudo, observamos o aumento de espessura da parede muscular causada pelo tratamento com estrógeno, enquanto a indução do parkinsonismo diminuiu esta espessura.

O crescimento hipertrófico do coração é uma adaptação ao estresse hemodinâmico que melhora o desempenho cardíaco e reduz a tensão na parede ventricular. A hipertrofia fisiológica é leve e reversível, ocorrendo devido ao exercício ou gravidez. Já a hipertrofia patológica, resultante de estresse crônico como hipertensão, leva ao aumento ventricular, disfunção miocárdica e fibrose, indicativos de insuficiência cardíaca e remodelação patológica. A hipertrofia patológica pode estar relacionada ao aumento excessivo de ERO ou à inflamação (SAMAK et al., 2016; SEDDON; LOOI; SHAH, 2007). O aumento da espessura cardíaca promovida pelo estrógeno poderia ser interpretada como uma tentativa compensatória do coração de melhorar seu desempenho; no entanto, poderia aumentar o risco de insuficiência cardíaca ou mesmo morte súbita.

Em ambos os ventrículos, o parkinsonismo provocou a morte celular por dano de DNA, induzindo a apoptose. A apoptose é um processo de morte celular programada caracterizada por diminuição de volume, formação de bolhas na superfície celular, condensação da cromatina, clivagem do DNA e formação de

1207 corpos apoptóticos, mediada por caspases (TURKMEN, 2017). Este resultado
1208 parece não estar relacionado às nossas avaliações de dano oxidativo. Desta
1209 forma, acreditamos que a apoptose nos ventrículos pode estar associada a
1210 outras fontes de ERO ou citocinas pró-inflamatórias. Estudos apontam que a
1211 inflamação participa da degeneração dos neurônios dopaminérgicos (XU et al.,
1212 2017; ZHOU et al., 2019) e que as citocinas pró-inflamatórias podem induzir
1213 apoptose celular e necrose na nefropatia diabética (LUIS-RODRÍGUEZ, 2012;
1214 TURKMEN, 2017), e apoptose de células β pancreáticas na DM1 (EIZIRIK;
1215 MANDRUP-POULSEN, 2001; GRUNNET et al., 2009).

1216 A quantidade e a qualidade do colágeno extracelular são determinadas
1217 pelo equilíbrio entre sua síntese e degradação. A produção de colágeno
1218 apropriada é benéfica para preservar a integridade do coração, protegendo-o
1219 contra uma ruptura e mantendo sua sustentação, para que trabalhe como uma
1220 bomba muscular de forma eficiente (COWLING et al., 2019; KUROSE, 2021). O
1221 envelhecimento promove aumento significativo do colágeno no coração,
1222 caracterizando fibrose, tanto em humanos como em modelos experimentais.
1223 Este aumento pode estar relacionado com a perda dos miócitos, que não são
1224 substituídos a medida em que morrem, ou então, diminuição de sua degradação
1225 (DE SOUZA, 2002).

1226 SIWIK et al. (2001) demonstraram que as ERO podem causar diminuição
1227 na síntese de colágeno e aumento da atividade da MMP (metaloproteinases da
1228 matriz), sugerindo um papel importante na fisiopatologia da remodelação
1229 miocárdica (SIWIK et al., 2001). Ainda, um estudo apontou o padrão de
1230 deposição de colágeno e o equilíbrio do sistema MMP-1/TIMP-1 são diferentes
1231 no miocárdio de pacientes hipertensos com ICS e ICD e que a degradação

1232 excessiva de colágeno pode estar relacionada ao comprometimento da função
1233 sistólica (LÓPEZ et al., 2006).

1234 O colágeno e a elastina são os principais componentes da parede arterial
1235 e desempenham um papel fundamental na sua estrutura mecânica. A elastina
1236 compõe 90% da fibra elástica e possui uma taxa muito lenta de renovação, o que
1237 significa que a sua fragmentação devido ao envelhecimento ou a doenças tem
1238 efeitos crônicos nos tecidos afetados. Os diferentes tipos de colágeno têm
1239 estruturas distintas, o que resulta em funções biológicas variadas. Na parede
1240 arterial, os colágenos mais comuns são do tipo I, III e IV. A reticulação adequada
1241 do colágeno é crucial para as propriedades mecânicas do tecido, e qualquer
1242 comprometimento nessas fibras pode afetar significativamente a resposta
1243 arterial a doenças e ao envelhecimento (GIUDICI; WILKINSON; KHIR, 2021).

1244 A relação entre colágeno e elastina na parede dos vasos é de suma
1245 importância para a sua capacidade de deformação frente a variações de
1246 pressão. A alteração da quantidade e/ou arquitetura das fibras leva a alterações
1247 mecânicas e, portanto, funcionais (TSAMIS; KRAWIEC; VORP, 2013). Quando
1248 há aumento da deposição de fibras de colágeno na parede do vaso (fibrose),
1249 e/ou redução do número e do diâmetro das fenestras da lâmina elástica interna,
1250 em artérias de resistência, ocorre o aumento da rigidez, contribuindo para o
1251 aumento da resistência vascular periférica e hipertensão arterial. O contrário é
1252 verdadeiro: com a diminuição do colágeno e/ou aumento da elastina, a
1253 resistência vascular periférica é menor (MARGARIDA DE MELLO AIRES, 2019).
1254 Isto ocorreu na aorta torácica dos animais com indução do parkinsonismo, em
1255 que houve diminuição do colágeno e o aumento da elastina. O tratamento com
1256 estradiol reverteu apenas a alteração de elastina, e não de colágeno. Com o

1257 envelhecimento fisiológico, a quantidade de elastina na aorta torácica
1258 permanece a mesma, entretanto, sua concentração diminui, devido ao
1259 aparecimento de outras fibras, como por exemplo, o colágeno, que aumenta em
1260 quantidade (TSAMIS; KRAWIEC; VORP, 2013).

6. CONCLUSÃO

Nossos estudos sugerem que as fêmeas parecem ter certa proteção contra a lesão por 6-OHDA, prevenindo o surgimento de alterações cardiovasculares nos parâmetros basais. No entanto, a indução do parkinsonismo promoveu alterações no segmento PQ e segmento ST, que estariam relacionados a anormalidades do funcionamento atrial e ventricular, respectivamente, além de indicativos de hipopotassemia e hipocalemia. Nestas análises, o tratamento com estrógeno não promoveu melhora, ou até mesmo exacerbou as alterações.

Diferentemente do esperado, os grupos com indução do parkinsonismo apresentaram menos dano oxidativo do que os grupos controle, sem promover aumento das barreiras antioxidantes avaliadas. Apenas no ventrículo esquerdo, o parkinsonismo promoveu aumento de danos às proteínas, e, coincidentemente, este foi o único local em que o estrógeno reverteu o estresse oxidativo por meio da ativação dos antioxidantes.

Apesar dos dados de balanço redox não evidenciarem grandes alterações, vimos que o parkinsonismo provocou a apoptose de células cardíacas em ambos os ventrículos, e o tratamento com estradiol promoveu melhora neste quadro. Além disso, o estrógeno promoveu o espessamento das paredes dos ventrículos, o que acreditamos ser um mecanismo para melhorar o desempenho cardíaco.

Em resumo, a indução do parkinsonismo em fêmeas promoveu diversas alterações, mas estas não causaram problemas cardíacos funcionais observados neste estudo e, a relevância fisiopatológica dessas alterações ainda é desconhecida. O tratamento com estrógeno não pôde ser claramente definido

1286 como benéfico ou prejudicial em vários aspectos, mas parece ter promovido
1287 adaptações no coração para manter sua funcionalidade. Nossos dados
1288 levantaram novas hipóteses, e, portanto, mais estudos são necessários para
1289 avaliar os mecanismos envolvidos nas alterações observadas.

1290 7. REFERÊNCIAS

- 1291 AGACAYAK, E. et al. Oxidant/antioxidant status, paraoxonase activity, and lipid
1292 profile in plasma of ovariectomized rats under the influence of estrogen, estrogen
1293 combined with progesterone, and genistein. **Drug Design, Development and**
1294 **Therapy**, p. 2975, jun. 2015.
- 1295 AL-ATTAR, A. M. Therapeutic influences of almond oil on male rats exposed to a
1296 sublethal concentration of lead. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 27, n.
1297 2, p. 581–587, fev. 2020.
- 1298 ALONSO, A. et al. Risk of dementia hospitalisation associated with
1299 cardiovascular risk factors in midlife and older age: the Atherosclerosis Risk in
1300 Communities (ARIC) study. **Journal of Neurology, Neurosurgery &**
1301 **Psychiatry**, v. 80, n. 11, p. 1194–1201, 1 nov. 2009.
- 1302 ARIAS-LOZA, P. A.; MUEHLFELDER, M.; PELZER, T. **Estrogen and estrogen**
1303 **receptors in cardiovascular oxidative stress. Pflugers Archiv European**
1304 **Journal of Physiology**, maio 2013.
- 1305 ARIZA, D. et al. Intranigral LPS Administration Produces Dopamine, Glutathione
1306 but not Behavioral Impairment in Comparison to MPTP and 6-OHDA Neurotoxin
1307 Models of Parkinson's Disease. **Neurochemical Research**, v. 35, n. 10, p. 1620–
1308 1627, 26 out. 2010.
- 1309 ARIZA, D. et al. Dysautonomias in parkinson's disease: Cardiovascular changes
1310 and autonomic modulation in conscious rats after infusion of bilateral 6-OHDA in
1311 substantia nigra. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory**
1312 **Physiology**, v. 308, n. 3, p. H250–H257, 2015a.
- 1313 ARIZA, D. et al. Chemoreflex and baroreflex alterations in Parkinsonism induced
1314 by 6-OHDA in unanesthetized rats. **Neuroscience Letters**, v. 607, p. 77–82, 21
1315 out. 2015b.
- 1316 ASAHINA, M. et al. Autonomic dysfunction in parkinsonian disorders:
1317 assessment and pathophysiology. **Journal of Neurology, Neurosurgery &**
1318 **Psychiatry**, v. 84, n. 6, p. 674–680, 1 jun. 2013.
- 1319 AZEVEDO, L. L. DE; CARDOSO, F. Ação da levodopa e sua influência na voz e
1320 na fala de indivíduos com doença de Parkinson. **Revista da Sociedade**
1321 **Brasileira de Fonoaudiologia**, v. 14, n. 1, p. 136–141, 2009.
- 1322 BACHAROVA, L.; WAGNER, G. S. The time for naming the Interatrial Block
1323 Syndrome: Bayes Syndrome. **Journal of Electrocardiology**, v. 48, n. 2, p. 133–
1324 134, mar. 2015.
- 1325 BAGLIANI, G. et al. **The QRS Complex: Normal Activation of the Ventricles.**
1326 **Cardiac Electrophysiology Clinics** W.B. Saunders, , 1 set. 2017.

- 1327 BALESTRINO, R.; SCHAPIRA, A. H. V. **Parkinson disease. European Journal**
1328 **of Neurology** Blackwell Publishing Ltd, , 1 jan. 2020.
- 1329 BAYÉS DE LUNA, A. et al. Interatrial conduction block and retrograde activation
1330 of the left atrium and paroxysmal supraventricular tachyarrhythmia. **European**
1331 **Heart Journal**, v. 9, n. 10, p. 1112–1118, out. 1988.
- 1332 BEITZ, J. M. Parkinson s disease a review. **Frontiers in Bioscience**, v. S6, n. 1,
1333 p. S415, 2014.
- 1334 BLESÁ, J. et al. Classic and New Animal Models of Parkinson's Disease. **Journal**
1335 **of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1–10, 2012.
- 1336 BORSCHE, M. et al. Mitochondria and Parkinson's Disease: Clinical, Molecular,
1337 and Translational Aspects. **Journal of Parkinson's Disease**, v. 11, n. 1, p. 45–
1338 60, 2 fev. 2021.
- 1339 CERRI, S.; MUS, L.; BLANDINI, F. Parkinson's Disease in Women and Men:
1340 What's the Difference? **Journal of Parkinson's Disease**, v. 9, n. 3, p. 501–515,
1341 30 jul. 2019.
- 1342 CHEN, L. Y. et al. **Atrial fibrillation and the risk of sudden cardiac death: The**
1343 **atherosclerosis risk in communities study and cardiovascular health study.**
1344 **JAMA Internal Medicine. Anais...**American Medical Association, 14 jan. 2013.
- 1345 CHHABRA, L.; SPODICK, D. H. Discordant U waves in the setting of
1346 hyperkalaemia. 2013.
- 1347 COWLING, R. T. et al. **Mechanisms of cardiac collagen deposition in**
1348 **experimental models and human disease. Translational Research**Mosby
1349 Inc., , 1 jul. 2019.
- 1350 DAMIER, P. et al. **Levodopa/DDCI and entacapone is the preferred treatment**
1351 **for Parkinson's disease patients with motor fluctuations in routine practice:**
1352 **A retrospective, observational analysis of a large French cohort. European**
1353 **Journal of Neurology**, jul. 2008.
- 1354 DAMY, S. B. et al. Aspectos fundamentais da experimentação animal -
1355 aplicações em cirurgia experimental. **Revista da Associação Médica**
1356 **Brasileira**, v. 56, n. 1, p. 103–111, 2010.
- 1357 DATLA, K. P. et al. Differences in dopaminergic neuroprotective effects of
1358 estrogen during estrous cycle. **NeuroReport**, v. 14, n. 1, p. 47–50, jan. 2003.
- 1359 DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's Disease. **Neuron**, v. 39, n. 6, p.
1360 889–909, set. 2003.
- 1361 DE CAMPOS, B. H. et al. Cardiovascular evaluation of female rats with 6-OHDA-
1362 induced parkinsonism: Possible protection by ovarian hormones and participation
1363 of nitric oxide. **Life Sciences**, v. 259, 15 out. 2020.

- 1364 DE JAGER, L. et al. Nitric oxide alterations in cardiovascular system of rats with
1365 Parkinsonism induced by 6-OHDA and submitted to previous exercise. **Life**
1366 **Sciences**, v. 204, p. 78–86, jul. 2018a.
- 1367 DE JAGER, L. et al. Nitric oxide alterations in cardiovascular system of rats with
1368 Parkinsonism induced by 6-OHDA and submitted to previous exercise. **Life**
1369 **Sciences**, v. 204, p. 78–86, 1 jul. 2018b.
- 1370 DE JAGER, L. et al. Role of the iNOS isoform in the cardiovascular dysfunctions
1371 of male rats with 6-OHDA-induced Parkinsonism. **Nitric Oxide - Biology and**
1372 **Chemistry**, v. 134–135, p. 49–60, 1 maio 2023.
- 1373 DE LAU, L. M.; BRETELER, M. M. Epidemiology of Parkinson's disease. **The**
1374 **Lancet Neurology**, v. 5, n. 6, p. 525–535, jun. 2006.
- 1375 DE SOUZA, R. R. **Aging of myocardial collagen****Biogerontology**. [s.l: s.n.].
- 1376 DENKER, S. et al. Effects of abrupt changes in cycle length on refractoriness of
1377 the His-Purkinje system in man. **Circulation**, v. 67, n. 1, p. 60–68, jan. 1983.
- 1378 DORSEY, E. R. et al. The Emerging Evidence of the Parkinson Pandemic.
1379 **Journal of Parkinson's Disease**, v. 8, n. s1, p. S3–S8, 18 dez. 2018.
- 1380 DUTY, S.; JENNER, P. Animal models of Parkinson's disease: a source of novel
1381 treatments and clues to the cause of the disease. **British Journal of**
1382 **Pharmacology**, v. 164, n. 4, p. 1357–1391, 9 out. 2011.
- 1383 EIZIRIK, D. L.; MANDRUP-POULSEN, T. A choice of death - the signal-
1384 transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. **Diabetologia**, v. 44, n. 12,
1385 p. 2115–2133, 1 dez. 2001.
- 1386 ENRIQUEZ, A. et al. New-onset atrial fibrillation after cavotricuspid isthmus
1387 ablation: identification of advanced interatrial block is key. **Europace**, v. 17, n. 8,
1388 p. 1289–1293, ago. 2015.
- 1389 EVSEN, M. S. et al. Effects of estrogen, estrogen/progesteron combination and
1390 genistein treatments on oxidant/antioxidant status in the brain of ovariectomized
1391 rats. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 17, n.
1392 14, p. 1869–73, jul. 2013.
- 1393 FAHN, S. **The history of dopamine and levodopa in the treatment of**
1394 **Parkinson's disease. Movement Disorders**, 2008.
- 1395 FEIGIN, V. L. et al. Global, regional, and national burden of neurological disorders
1396 during 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study
1397 2015. **The Lancet Neurology**, v. 16, n. 11, p. 877–897, 1 nov. 2017.
- 1398 FERRAZ, A. C. et al. Evaluation of Estrogen Neuroprotective Effect on
1399 Nigrostriatal Dopaminergic Neurons Following 6-Hydroxydopamine Injection into

1400 the Substantia Nigra Pars Compacta or the Medial Forebrain Bundle.
 1401 **Neurochemical Research**, v. 33, n. 7, p. 1238–1246, 9 jul. 2008.

1402 FRANCARDO, V. Modeling Parkinson's disease and treatment complications in
 1403 rodents: Potentials and pitfalls of the current options. **Behavioural Brain**
 1404 **Research**, v. 352, p. 142–150, out. 2018.

1405 GANDHI, S.; ABRAMOV, A. Y. **Mechanism of oxidative stress in**
 1406 **neurodegeneration. Oxidative Medicine and Cellular Longevity**Hindawi
 1407 Limited, , 2012.

1408 GIUDICI, A.; WILKINSON, I. B.; KHIR, A. W. **Review of the Techniques Used**
 1409 **for Investigating the Role Elastin and Collagen Play in Arterial Wall**
 1410 **Mechanics. IEEE Reviews in Biomedical Engineering**Institute of Electrical and
 1411 Electronics Engineers Inc., , 2021.

1412 GORELICK, P. B. **Risk factors for vascular dementia and Alzheimer disease.**
 1413 **Stroke. Anais...**nov. 2004.

1414 GORELICK, P. B. et al. **Vascular contributions to cognitive impairment and**
 1415 **dementia: A statement for healthcare professionals from the American**
 1416 **Heart Association/American Stroke Association. Stroke**, set. 2011.

1417 GRUNNET, L. G. et al. Proinflammatory Cytokines Activate the Intrinsic Apoptotic
 1418 Pathway in β -Cells. **Diabetes**, v. 58, n. 8, p. 1807–1815, 1 ago. 2009.

1419 GUMBER, A.; RAMASWAMY, B.; THONGCHUNDEE, O. <p>Effects of
 1420 Parkinson's on employment, cost of care, and quality of life of people with
 1421 condition and family caregivers in the UK: a systematic literature review</p>.
 1422 **Patient Related Outcome Measures**, v. Volume 10, p. 321–333, out. 2019.

1423 HADDADI, R. et al. **Neuronal degeneration and oxidative stress in the SNc**
 1424 **of 6-OHDA intoxicated rats; improving role of silymarin long-term**
 1425 **treatment. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**Springer
 1426 Science and Business Media Deutschland GmbH, , 1 dez. 2020.

1427 HAMLIN, R. L. Non-drug-related electrocardiographic features in animal models
 1428 in safety pharmacology. **Journal of Pharmacological and Toxicological**
 1429 **Methods**, v. 52, n. 1, p. 60–76, jul. 2005.

1430 HEMMATI-DINARVAND, M. et al. Oxidative stress and Parkinson's disease:
 1431 conflict of oxidant-antioxidant systems. **Neuroscience Letters**, v. 709, 14 set.
 1432 2019.

1433 HIRSCH, L. et al. The Incidence of Parkinson's Disease: A Systematic Review
 1434 and Meta-Analysis. **Neuroepidemiology**, v. 46, n. 4, p. 292–300, 2016.

1435 JAIN, S.; GOLDSTEIN, D. S. Cardiovascular dysautonomia in Parkinson disease:
 1436 From pathophysiology to pathogenesis. **Neurobiology of Disease**, v. 46, n. 3, p.
 1437 572–580, jun. 2012.

1438 JANKOVIC, J. **Parkinson's disease: Clinical features and diagnosis**. **Journal**
 1439 **of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**BMJ Publishing Group, , 2008.

1440 KALIA, L. V.; LANG, A. E. **Parkinson's disease**. **The Lancet**Lancet Publishing
 1441 Group, , 29 ago. 2015.

1442 KASHIHARA, K.; IMAMURA, T.; SHINYA, T. Cardiac 123I-MIBG uptake is
 1443 reduced more markedly in patients with REM sleep behavior disorder than in
 1444 those with early stage Parkinson's disease. **Parkinsonism & Related Disorders**,
 1445 v. 16, n. 4, p. 252–255, maio 2010.

1446 KIHLGREN, M. et al. The U-wave: A remaining enigma of the electrocardiogram.
 1447 **Journal of Electrocardiology**, v. 79, p. 13–20, jul. 2023.

1448 KOENE, R. J. et al. Predictors of sudden cardiac death in atrial fibrillation: The
 1449 Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. **PLoS ONE**, v. 12, n. 11, 1
 1450 nov. 2017.

1451 KORIEEM, K. M. M.; EL-ATTAR, M. A. Almond oil restores blood parameters, liver
 1452 function, blood and liver antioxidants and DNA, and liver histology more efficiently
 1453 than olive oil in favism. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**,
 1454 v. 19, n. 3, p. 599–606, 30 set. 2022.

1455 KUROSE, H. **Cardiac fibrosis and fibroblasts**. **Cells**MDPI, , 1 jul. 2021.

1456 KWON, S. H. et al. H2O2 regulates cardiac myocyte phenotype via
 1457 concentration-dependent activation of distinct kinase pathways. **Journal of**
 1458 **Molecular and Cellular Cardiology**, v. 35, n. 6, p. 615–621, 1 jun. 2003.

1459 LANG, A. E.; LOZANO, A. M. Parkinson's Disease. **New England Journal of**
 1460 **Medicine**, v. 339, n. 15, p. 1044–1053, 8 out. 1998.

1461 LARSSON, V.; TORISSON, G.; LONDOS, E. Relative survival in patients with
 1462 dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease dementia. **PLOS ONE**, v.
 1463 13, n. 8, p. e0202044, 10 ago. 2018.

1464 LAUNER, L. J. et al. **The Association Between Midlife Blood Pressure Levels**
 1465 **and Late-Life Cognitive Function The Honolulu-Asia Aging Study**. [s.l.: s.n.].
 1466 Disponível em: <<http://jama.jamanetwork.com/>>.

1467 LEEPER, B. Continuous ST-Segment Monitoring. **AACN Clinical Issues:**
 1468 **Advanced Practice in Acute and Critical Care**, v. 14, n. 2, p. 145–154, maio
 1469 2003.

1470 LIU, B.; DLUZEN, D. E. Oestrogen and nigrostriatal dopaminergic
 1471 neurodegeneration: animal models and clinical reports of parkinson's disease.

1472 **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 34, n. 7, p. 555–
1473 565, 18 jul. 2007.

1474 LOCATI, E. T.; BAGLIANI, G.; PADELETTI, L. **Normal Ventricular**
1475 **Repolarization and QT Interval: Ionic Background, Modifiers, and**
1476 **Measurements. Cardiac Electrophysiology Clinics** W.B. Saunders, , 1 set.
1477 2017.

1478 LÓPEZ, B. et al. Alterations in the Pattern of Collagen Deposition May Contribute
1479 to the Deterioration of Systolic Function in Hypertensive Patients With Heart
1480 Failure. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 48, n. 1, p. 89–96,
1481 4 jul. 2006.

1482 LUIS-RODRÍGUEZ, D. Pathophysiological role and therapeutic implications of
1483 inflammation in diabetic nephropathy. **World Journal of Diabetes**, v. 3, n. 1, p.
1484 7, 2012.

1485 MAKAV, M.; EROĞLU, H. A. Recuperative effect of estrogen on rotenone-induced
1486 experimental model of Parkinson's disease in rats. **Environmental Science and**
1487 **Pollution Research**, v. 28, n. 17, p. 21266–21275, 7 maio 2021.

1488 MANNING, J. et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial of
1489 a two-day regimen of dihydroartemisinin-piperaquine for malaria prevention
1490 halted for concern over prolonged corrected QT interval. **Antimicrobial Agents**
1491 **and Chemotherapy**, v. 58, n. 10, p. 6056–6067, 1 out. 2014.

1492 MARGARIDA DE MELLO AIRES. **Fisiologia**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara
1493 Koogan, 2019.

1494 MARRAS, C. et al. Prevalence of Parkinson's disease across North America. **npj**
1495 **Parkinson's Disease**, v. 4, n. 1, p. 21, 10 jul. 2018.

1496 MASSÓ-VAN ROESSEL, A. et al. Analysis of the Association Between
1497 Electrocardiographic P-wave Characteristics and Atrial Fibrillation in the
1498 REGICOR Study. **Revista Española de Cardiología (English Edition)**, v. 70, n.
1499 10, p. 841–847, out. 2017.

1500 METZGER, J. M.; EMBORG, M. E. Autonomic dysfunction in Parkinson disease
1501 and animal models. **Clinical Autonomic Research**, v. 29, n. 4, p. 397–414, 2
1502 ago. 2019.

1503 MURRAY, H. E. et al. Dose- and sex-dependent effects of the neurotoxin 6-
1504 hydroxydopamine on the nigrostriatal dopaminergic pathway of adult rats:
1505 differential actions of estrogen in males and females. **Neuroscience**, v. 116, n. 1,
1506 p. 213–222, jan. 2003.

1507 NAVARRO-GONZÁLEZ, J. A.; GARCÍA-BENAYAS, C.; ARENAS, J.
1508 Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. **Clinical chemistry**,
1509 v. 44, n. 3, p. 679–81, mar. 1998.

1510 NICARETTA, D. H.; PEREIRA, J. S.; PIMENTEL, M. L. V. Distúrbios autonômicos
 1511 na doença de Parkinson. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 44, n. 2,
 1512 p. 120–122, jun. 1998.

1513 NIELSEN, J. B. et al. P-wave duration and the risk of atrial fibrillation: Results
 1514 from the Copenhagen ECG Study. **Heart Rhythm**, v. 12, n. 9, p. 1887–1895, 1
 1515 set. 2015.

1516 OBAS, V.; VASAN, R. S. **The aging heart. Clinical Science**Portland Press Ltd,
 1517 , 1 jul. 2018.

1518 O'NEAL, W. T. et al. Advanced interatrial block and ischemic stroke. **Neurology**,
 1519 v. 87, n. 4, p. 352–356, 26 jul. 2016.

1520 ONYANGO, I. G. Mitochondria in the pathophysiology of Alzheimer s and
 1521 Parkinson s diseases. **Frontiers in Bioscience**, v. 22, n. 5, p. 4521, 2017.

1522 OUZIR, M. et al. Almond oil: A comprehensive review of chemical composition,
 1523 extraction methods, preservation conditions, potential health benefits, and safety.
 1524 **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, n. 4, p.
 1525 3344–3387, 30 jul. 2021.

1526 PALMA, J. et al. Is cardiac function impaired in premotor Parkinson's disease? A
 1527 retrospective cohort study. **Movement Disorders**, v. 28, n. 5, p. 591–596, 11
 1528 maio 2013.

1529 PERCÁRIO, S. et al. **Oxidative Stress in Parkinson's Disease: Potential**
 1530 **Benefits of Antioxidant Supplementation. Oxidative Medicine and Cellular**
 1531 **Longevity**Hindawi Limited, , 2020.

1532 PEZOLATO, V. A. et al. Acompanhamento eletrocardiográfico no
 1533 desenvolvimento de ratos Wistar. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária**
 1534 **e Zootecnia**, v. 69, n. 1, p. 39–48, fev. 2017.

1535 PFEIFFER, R. F. Non-motor symptoms in Parkinson's disease. **Parkinsonism**
 1536 **and Related Disorders**, v. 22, p. S119–S122, 1 jan. 2016.

1537 POSTUMA, R. B. et al. **MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's**
 1538 **disease. Movement Disorders**John Wiley and Sons Inc, , 1 out. 2015.

1539 RELANDER, A. et al. Advanced interatrial block predicts ineffective cardioversion
 1540 of atrial fibrillation: a FinCV2 cohort study. **Annals of Medicine**, v. 53, n. 1, p.
 1541 722–729, 2021.

1542 RODRIGUEZ-PALLARES, J. et al. Mechanism of 6-hydroxydopamine
 1543 neurotoxicity: The role of NADPH oxidase and microglial activation in 6-
 1544 hydroxydopamine-induced degeneration of dopaminergic neurons. **Journal of**
 1545 **Neurochemistry**, v. 103, n. 1, p. 145–156, out. 2007.

1546 SALAT, D.; TOLOSA, E. **Levodopa in the treatment of Parkinson's disease:**
 1547 **Current status and new developments.** *Journal of Parkinson's Disease*,
 1548 2013.

1549 SAMAK, M. et al. **Cardiac Hypertrophy: An Introduction to Molecular and**
 1550 **Cellular Basis.** *Medical science monitor basic research*, 23 jul. 2016.

1551 SANDERS, L. H.; GREENAMYREN, J. T. **Oxidative damage to**
 1552 **macromolecules in human Parkinson disease and the rotenone model.** *Free*
 1553 **Radical Biology and Medicine** Elsevier Inc., , 2013.

1554 SAVICA, R. et al. Parkinson disease with and without Dementia: A prevalence
 1555 study and future projections. **Movement Disorders**, v. 33, n. 4, p. 537–543, 22
 1556 abr. 2018.

1557 SCHAPIRA, A. H. V. et al. **Levodopa in the treatment of Parkinson's disease.**
 1558 **European Journal of Neurology**, set. 2009.

1559 SCHAPIRA, A. H. V.; CHAUDHURI, K. R.; JENNER, P. **Non-motor features of**
 1560 **Parkinson disease.** *Nature Reviews Neuroscience* Nature Publishing Group, ,
 1561 1 jul. 2017.

1562 SCHAPIRA, A. H. V.; GEGG, M. **Mitochondrial contribution to parkinson's**
 1563 **disease pathogenesis.** *Parkinson's Disease*, 2011.

1564 SCHAPIRA, A. H. V.; TOLOSA, E. **Molecular and clinical prodrome of**
 1565 **Parkinson disease: Implications for treatment.** *Nature Reviews Neurology*,
 1566 jun. 2010.

1567 SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. S. **ROS function in redox signaling and**
 1568 **oxidative stress.** *Current Biology* Cell Press, , 19 maio 2014.

1569 SCHIMPF, R. et al. Electromechanical coupling in patients with the short QT
 1570 syndrome: Further insights into the mechanoelectrical hypothesis of the U wave.
 1571 **Heart Rhythm**, v. 5, n. 2, p. 241–245, fev. 2008.

1572 SCHREMPF, W. et al. Sleep Disorders in Parkinson's Disease. **Journal of**
 1573 **Parkinson's Disease**, v. 4, n. 2, p. 211–221, 2014.

1574 SEDDON, M.; LOOI, Y. H.; SHAH, A. M. **Oxidative stress and redox signalling**
 1575 **in cardiac hypertrophy and heart failure.** *Heart*, ago. 2007.

1576 SHALASH, A. S. et al. Non-motor symptoms as predictors of quality of life in
 1577 Egyptian patients with Parkinson's disease: A cross-sectional study using a
 1578 culturally adapted 39-item Parkinson's disease questionnaire. **Frontiers in**
 1579 **Neurology**, v. 9, n. MAY, 24 maio 2018.

1580 SIAN, J. et al. Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other
 1581 neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. **Annals of Neurology**, v.
 1582 36, n. 3, p. 348–355, set. 1994.

1583 SIDHU, S.; MARINE, J. E. Evaluating and managing bradycardia. **Trends in**
1584 **Cardiovascular Medicine**, v. 30, n. 5, p. 265–272, jul. 2020.

1585 SIMOLA, N.; MORELLI, M.; CARTA, A. R. The 6-Hydroxydopamine model of
1586 parkinson's disease. **Neurotoxicity Research**, v. 11, n. 3–4, p. 151–167, set.
1587 2007.

1588 SIMON, D. K.; TANNER, C. M.; BRUNDIN, P. **Parkinson Disease**
1589 **Epidemiology, Pathology, Genetics, and Pathophysiology. Clinics in**
1590 **Geriatric Medicine**W.B. Saunders, , 1 fev. 2020.

1591 SIWIK, D. A. et al. **Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix**
1592 **metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts****Am J Physiol Cell Physiol.**
1593 [s.l: s.n.]. Disponível em:
1594 <<http://www.ajpcell.org>C53Downloadedfromwww.physiology.org/journal/ajpcellb
1595 y\${individualUser.givenNames}\${individualUser.surname}>.

1596 SKOV, M. W. et al. Risk prediction of atrial fibrillation based on
1597 electrocardiographic interatrial block. **Journal of the American Heart**
1598 **Association**, v. 7, n. 11, 1 jun. 2018.

1599 SPARROW, D. et al. **AMERICAN JOURNAL OF EPIDEMIOLOGY THE**
1600 **RELATIONSHIP OF THE U WAVE TO THE 10-YEAR INCIDENCE OF**
1601 **MYOCARDIAL INFARCTION.** [s.l: s.n.].

1602 SUBRAMANIAM, S. R.; CHESSELET, M. F. **Mitochondrial dysfunction and**
1603 **oxidative stress in Parkinson's disease. Progress in Neurobiology**, jul. 2013.

1604 SURAWICZ, B.; KNOEBEL, S. B. **Long QT: Good, bad or indifferent? Journal**
1605 **of the American College of Cardiology**, 1984.

1606 TREMBLAY, C. et al. Sex effects on brain structure in de novo Parkinson's
1607 disease: a multimodal neuroimaging study. **Brain**, v. 143, n. 10, p. 3052–3066, 1
1608 out. 2020.

1609 TRINH, D. et al. **The multi-faceted role of mitochondria in the pathology of**
1610 **Parkinson's disease. Journal of Neurochemistry**Blackwell Publishing Ltd, , 1
1611 mar. 2021.

1612 TRIST, B. G.; HARE, D. J.; DOUBLE, K. L. **Oxidative stress in the aging**
1613 **substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease. Aging**
1614 **Cell**Blackwell Publishing Ltd, , 1 dez. 2019.

1615 TSAMIS, A.; KRAWIEC, J. T.; VORP, D. A. **Elastin and collagen fibre**
1616 **microstructure of the human aorta in ageing and disease: A review. Journal**
1617 **of the Royal Society Interface**Royal Society, , 6 jun. 2013.

1618 TURKMEN, K. **Inflammation, oxidative stress, apoptosis, and autophagy in**
1619 **diabetes mellitus and diabetic kidney disease: the Four Horsemen of the**

1620 **Apocalypse. International Urology and Nephrology** Springer Netherlands, , 1
 1621 maio 2017.

1622 TUROSSI AMORIM, E. D. et al. Glutamate and GABA neurotransmission are
 1623 increased in paraventricular nucleus of hypothalamus in rats induced to 6-OHDA
 1624 parkinsonism: Involvement of nNOS. **Acta Physiologica**, v. 226, n. 3, 1 jul. 2019.

1625 TWELVES, D.; PERKINS, K. S. M.; COUNSELL, C. Systematic review of
 1626 incidence studies of Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 18, n. 1, p.
 1627 19–31, 17 jan. 2003.

1628 VAIDYA, B. et al. Parkinson's disease in women: Mechanisms underlying sex
 1629 differences. **European Journal of Pharmacology**, v. 895, 15 mar. 2021.

1630 WEI, Z. et al. Oxidative Stress in Parkinson's Disease: A Systematic Review and
 1631 Meta-Analysis. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 11, 5 jul. 2018.

1632 XU, J. et al. Resolvin D1 attenuates Mpp+-induced parkinson disease via
 1633 inhibiting inflammation in PC12 cells. **Medical Science Monitor**, v. 23, p. 2684–
 1634 2691, 2 jun. 2017.

1635 YAN, G.-X.; ANTZELEVITCH, C. Cellular Basis for the Normal T Wave and the
 1636 Electrocardiographic Manifestations of the Long-QT Syndrome. **Circulation**, v.
 1637 98, n. 18, p. 1928–1936, 3 nov. 1998.

1638 ZHOU, F. et al. Salidroside protected against MPP + -induced Parkinson's
 1639 disease in PC12 cells by inhibiting inflammation, oxidative stress and cell
 1640 apoptosis. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 66, n. 2, p. 247–253,
 1641 1 mar. 2019.

1642 ZIGMOND, M. J.; SMEYNE, R. J. Exercise: Is it a neuroprotective and if so, how
 1643 does it work? **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 20, p. S123–S127, jan.
 1644 2014.

1645

1646

8. ANEXO 1 – CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO (CEUA)



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF, CIRC. CEUA N° 022/2021

Londrina, 23 de março de 2021.

Prezado (a) professor (a),

Certificamos que o projeto intitulado: **“Avaliação da possível proteção pelo estrógeno e sua interação com as isoformas da NO-sintase em parâmetros cardiovasculares, autonômicos e oxidativos em ratas com parkinsonismo induzido por 6-OHDA”** protocolo CEUA n° **001.2021** sob a responsabilidade de **Marli Cardoso Martins 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), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL) no dia 23/03/2021.

Este projeto tem por objetivo avaliar o possível papel protetor do estrógeno nos parâmetros cardiovasculares, na modulação autonômica e os parâmetros oxidativos de ratas ovariectomizadas tratadas com estrógeno ou veículo, e submetidas à lesão da substância negra *pars compacta* por 6-hidroxidopamina (6-OHDA) ou cirurgia Sham. Também será avaliado o papel das isoformas da óxido nítrico sintase nos parâmetros observados, bem como a influência do estrógeno sobre sua expressão e efeitos fisiológicos. **Grau de invasividade: 3.**

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	02/05/2021 a 02/05/2025
Espécie/ linhagem/ raça	Rato heterogêneo/ Wistar
N° de animais	460
Peso/ Idade	250-280 g
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central da UEL
Amostras a serem coletadas	Cérebro, coração, aorta torácica, aorta abdominal, rins, adrenais, plasma, útero e tibia.

Cumpra-se 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.

Em cumprimento às exigências do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), em até 30 dias da finalização do projeto de pesquisa ou extensão envolvendo o uso de animais (verificar período de vigência expresso neste ofício), é necessário encaminhar relatório da descrição de uso de animais para ceua@uel.br, conforme modelo disponível no site da CEUA: <http://www.uel.br/comites/ceua/pages/relatorio-de-projetos.php>.

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

Profª. Drª Maria Fernanda Rodrigues Graciano
Coordenadora da CEUA/UEL

Ilmo.(a) Sr.(a)
Prof. (a) Dr. (a) Marli Cardoso Martins Pinge
Responsável pelo projeto
C/C para a Chefia do Departamento de Ciências Fisiológicas /CCB
C/C para a Direção do Centro de Ciências Biológicas/ CCB
C/C para o Biotério Central do CCB