

Flaviano Lorenzon

**EFEITOS DA SENSIBILIZAÇÃO CRUZADA ENTRE FALHA  
OVARIANA E ESTRESSE SOBRE A REGULAÇÃO  
AUTONÔMICA CARDIOVASCULAR**

Dissertação submetida ao Programa de  
Pós Graduação Multicêntrico em  
Ciências Fisiológicas da Universidade  
Federal de Santa Catarina para a  
obtenção do Grau de Mestre em  
Ciências Fisiológicas

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda  
Barbosa Lima Christian

Co-orientadora: Profa. Dra. Domitila  
Augusta Huber

Florianópolis  
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Lorenzon, Flaviano

Efeitos da sensibilização cruzada entre falha ovariana e estresse sobre a regulação autonômica cardiovascular / Flaviano Lorenzon ; orientadora, Fernanda Barbosa Christian Lima ; coorientadora, Domitila Augusta Huber. - Florianópolis, SC, 2016.

115 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas.

Inclui referências

1. Ciências Fisiológicas. 2. Fisiologia. 3. Fisiologia neuroendócrina. 4. 4-vinilciclohexano diepóxido. 5. Controle autonômico cardiovascular. I. Barbosa Christian Lima, Fernanda. II. Augusta Huber, Domitila. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas. IV. Título.

Flaviano Lorenzon

**EFEITOS DA SENSIBILIZAÇÃO CRUZADA ENTRE FALHA  
OVARIANA E ESTRESSE SOBRE A REGULAÇÃO  
AUTÔNOMICA CARDIOVASCULAR**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas.

Florianópolis, 12 de fevereiro de 2016.

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fernanda Barbosa Lima Christian  
Coordenadora do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Dr. Alex Rafacho  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cilene Lino de Oliveira  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Josiane de Campos cruz (Videoconferência)  
Universidade Federal da Paraíba



Dedico este trabalho aos meus pais, irmão e avó: Alice Matzembacher Lorenzon, Olmir Antonio Lorenzon, Olmir Antonio Lorenzon Junior e Eli Matzembacher



## **AGRADECIMENTOS**

A minha família por ter me dado todas as bases para seguir adiante mesmo que todas as forças me empurrassem para trás.

Aos meus amigos/amores Amanda Michele Aime, Hélia Anita Pedro, Kélen Sherer da Costa, Letícia Hoehne e João Gabriel Rosa, que não me permitiram surtar diante de tantos desafios.

A Deus por não me abandonar sequer um dia.

As minhas orientadoras, Professora Fernanda Barbosa Lima Christian e Domitila Augusta Huber, que com carinho me ensinaram a andar no mundo científico. Sem vocês estaria apenas engatinhando.

A minha amada e doce avó, que mesmo sem saber, me incentivou a ser curioso e questionar sempre. Tenho certeza que me olhas de onde estiver.

As minhas colegas de laboratório Bruna Barcelos, Tamires Gregorio e Jordana De Rocco pela ajuda durante o decorrer de todo o protocolo experimental e pelas longas gargalhadas que impediram o tédio durante o percurso.

A Ana Paula Taschetto, Karolina Domingues, Pamela Ramborger e Jordana De Rocco por terem proporcionado um dos momentos mais incríveis de sabedoria e diversão durante o curso.

Aos colegas da Fisiologia por terem compartilhado toda sabedoria, experiência e amizade, principalmente a Paola Sulis, Ana Paula Taschetto, Larissa Kochenborger e Karolina Domingues.

A professora Cilene Lino de Oliveira por permitir a utilização do biotério onde foram realizados os experimentos;

Ao professor José Marino Neto por disponibilizar o seu laboratório para que fosse realizada parte fundamental do presente trabalho.

A UFSC pelas instalações físicas que possibilitaram a execução deste trabalho.

As agências de fomento CNPq e CAPES pelo suporte financeiro.



*Depois de algum tempo você aprende que há mais de seus pais em você do que você supunha... E aprende que realmente você pode suportar, que realmente é forte e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. Aprende que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida!*

*(“O menestrel”-  
William Shakespeare,  
1564-1616).*



## RESUMO

Os problemas cardiovasculares constituem a principal causa de morbidade em mulheres após a menopausa, sendo a hipertensão arterial o principal fator de risco. Além disso, mulheres são mais suscetíveis ao estresse do tipo psicossocial e após a menopausa a responsividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal aumenta. Os esteroides ovarianos apresentam efeito cardioprotetor e com seu declínio ou mesmo com as flutuações hormonais características do climatério, o sistema cardiovascular pode ficar suscetível a danos. Um novo modelo de menopausa química, utilizando um composto denominado 4-vinilciclohexano diepóxido (VCD), promove a depleção gradual dos folículos ovarianos, com consequente alteração no perfil hormonal, mimetizando assim o que ocorre na menopausa humana. Além disso, este modelo possibilita o estudo da falha ovariana separadamente do envelhecimento, visto que utiliza ratas adultas jovens e de meia idade. A fim de verificar se a falha ovariana e o estresse promovem desregulações no sistema autonômico cardiovascular, ratas foram submetidas ao tratamento, por 15 dias consecutivos, com VCD ou óleo (controle) e expostas a um protocolo de estresse crônico imprevisível (ECI) por 10 dias consecutivos. Foram estudadas em dois períodos distintos: oitenta dias após a administração do VCD (mimetizando a perimenopausa) e 180 dias após a administração do VCD (mimetizando a menopausa). As ratas receberam implante de cânulas nos vasos femorais para administração de fármacos e registro dos parâmetros cardiovasculares. Além dos parâmetros basais, também foram avaliados: a sensibilidade barorreflexa (SBR), o controle autonômico para o coração e vasos e a responsividade  $\alpha$ -1 adrenérgica vascular ( $R\alpha$ -1A). Durante a perimenopausa, as ratas expostas ao ECI apresentaram aumento na pressão arterial média (PAM) e pressão arterial sistólica. Aquelas expostas ao ECI e tratadas previamente com VCD apresentaram aumento na atividade nervosa simpática e redução na atividade parassimpática, sem alteração na frequência cardíaca (FC). A SBR, a atividade simpática vascular bem como a  $R\alpha$ -1A não foram diferentes entre os grupos. Ao serem estudadas durante a menopausa a PAM e a pressão arterial diastólica aumentaram quando os animais foram submetidos ao ECI. A função autonômica não apresentou alteração, porém a SBR esteve reduzida nos grupos tratados com VCD. Além disso, a atividade simpática vascular esteve aumentada nesses mesmos grupos, sem alteração na  $R\alpha$ -1A. Os dados do presente estudo corroboram a literatura, mostrando que o estresse crônico promove

aumento na pressão arterial média, e demonstra pela primeira vez que a falha ovariana, por 80 ou 180 dias, não intensifica esta resposta. Entretanto, durante a perimenopausa, a função autonômica cardíaca apresentou aumento simpático e redução parassimpática nos animais estressados, o que pode ter sido ocasionado pelas flutuações hormonais características do período. Durante a menopausa houve redução na SBR, sem alterações autonômicas. A atividade simpática para os vasos aumentou nos animais tratados com VCD, mas parece não ter sido influenciada pela  $R\alpha$ -1A. Os danos observados podem ter sido ocasionados pela falha ovariana prolongada, que causa desregulação em diferentes níveis do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas. Além disso, o déficit cardiovascular observado nestes animais ocorreu independentemente de haver ou não um estímulo estressor, ou seja, a falha ovariana per si teve papel significativo nas alterações cardiovasculares estudadas no presente trabalho.

**Palavras-chave:** Menopausa, perimenopausa, alteração autonômica, 4-vinilcilo-hexano diepóxido, barorreflexo, estresse crônico imprevisível, hipertensão.

## ABSTRACT

Cardiovascular problems are the major cause of morbidity in women after menopause and hypertension is the main risk factor. In addition, women are susceptible to psychosocial stress, and after menopause, the responsiveness of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis is increased. Ovarian steroids have cardioprotective effects and their decline or even fluctuations during the climacteric period can lead to a higher susceptibility to cardiovascular damage. A new chemical menopausal model uses a compound called 4-vinylcyclohexane diepoxide (VCD) and promotes a gradual depletion of ovarian follicles with consequent changes in the hormonal profile, thus mimicking human menopause. Furthermore, this model allowed us to study ovarian failure separately from aging by using young and middle aged rats. In order to verify whether the ovarian failure and stress promote deregulation of the cardiovascular autonomic system, rats were submitted to VCD or oil (control) treatment for 15 consecutive days, and exposed to a chronic unpredictable stress protocol (ECI) for 10 consecutive days. Animals were studied in two distinct periods: eighty days after VCD administration (simulating perimenopause) and 180 days after VCD administration (simulating menopause). Vascular cannulas were implanted in the femoral vessels for drugs infusion and registration of cardiovascular parameters. In addition to the baseline parameters, we also evaluated: baroreflex sensitivity (BRS), autonomic control of the heart and vessels and  $\alpha$ -1 adrenergic vascular responsiveness ( $R\alpha$ -1A). During perimenopause, rats exposed to ECI showed an increased mean arterial pressure (MAP) and systolic blood pressure. Those rats previously treated with VCD and exposed to the ECI showed increased sympathetic nerve activity and reduced parasympathetic activity, but no changes in heart rate (HR). The SBR, vascular sympathetic activity and the  $R\alpha$ -1A were not different among groups. Throughout menopause, MAP and diastolic blood pressure were increased in animals exposed to the ECI. The autonomic function did not change, but SBR was impaired in groups treated with VCD. In addition, vascular sympathetic activity was increased in the same groups, with no changes in the  $R\alpha$ -1A. The present study corroborates data showing that chronic stress promotes an increased mean arterial pressure, but we have demonstrated for the first time that the ovarian failure, for 80 or 180 days, does not enhance this response. During perimenopause, cardiac autonomic function showed increased

sympathetic and decreased parasympathetic activities in stressed animals, which could be caused by the hormonal fluctuations found during this period. In menopause, SBR decreased without autonomic changes. The sympathetic activity to the vessels increased in animals treated with VCD, but did not seem to be influenced by the R $\alpha$ -1A. The observed damage may have been caused by the prolonged ovarian failure, which causes disruption in different levels of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. In addition, the cardiovascular deficits observed in these animals occurred regardless a stressor stimulus was present or not, thus, the ovarian failure per se had a significant effect on the cardiovascular disorders found in this work.

**Keywords: menopause, perimenopause, autonomic changes, 4-vinilciloheptano diepoxido, baroreflex, unpredictable chronic stress, hypertension.**

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01.</b> Divisão dos grupos experimentais.....	17
<b>Figura 02.</b> . Sinal de PAP, pelo qual foram obtidas as derivações da PAM, PAS, PAD E FC.....	22
<b>Figura 03.</b> Esquema de avaliação da sensibilidade barorreflexa por meio da administração dos fárcamos fenilefrina e nitroprussiato de sódio.....	23
<b>Figura 04.</b> Exemplo gráfico de bradicardia reflexa induzida por fenilefrina.....	24
<b>Figura 05.</b> Exemplo gráfico de taquicardia reflexa induzida por nitroprussiato de sódio.....	25
<b>Figura 06.</b> Esquema de avaliação da avaliação da atividade simpática vascular com a administração de hexametônio e o protocolo de avaliação da responsividade dos receptores $\alpha$ -1 adrenérgicos vasculares pela administração de doses crescents de fenilefrina.....	26
<b>Figura 07.</b> Sinal gráfico da alteração na PAM após administração de hexametônio .....	27
<b>Figura 08.</b> Exemplo gráfico da avaliação da responsividade $\alpha$ -1 adrenérgica vascular com fenilefrina.....	27
<b>Figura 09.</b> Peso dos animais durante a perimenopausa.....	31
<b>Figura 10.</b> Peso relativo dos animais durante a perimenopausa.....	32
<b>Figura 11.</b> Potência espectral em bandas de alta e baixa frequência do intervalo de pulso durante a perimenopausa.....	34
<b>Figura 12.</b> Balanço simpato-vagal durante a perimenopausa.....	35
<b>Figura 13.</b> Potência espectral em banda de baixa frequência da pressão arterial sistólica durante a perimenopausa.....	36
<b>Figura 14.</b> Mudança na PAM após administração de hexametônio durante a perimenopausa.....	37
<b>Figura 15.</b> Índice de sensibilidade barorreflexa para bradicardia reflexa durante a perimenopausa.....	38
<b>Figura 16.</b> Índice de sensibilidade barorreflexa para taquicardia reflexa durante a perimenopausa.....	39
<b>Figura 17.</b> Ganho e efetividade barorreflexa avaliados pelo método da sequência durante a perimenopausa.....	40
<b>Figura 18.</b> Resposta pressora frente à estimulação dos receptores $\alpha$ -1 adrenérgico vasculares durante a perimenopausa.....	41
<b>Figura 19.</b> Peso dos animais durante a menopausa.....	42
<b>Figura 20.</b> Massa relativo dos animais durante a menopausa.....	43
<b>Figura 21.</b> Potência espectral em bandas de alta e baixa frequência do intervalo de pulso durante a menopausa.....	45

<b>Figura 22.</b> Balanço simpato-vagal durante a menopausa.....	<b>46</b>
<b>Figura 23.</b> Potência espectral em banda de baixa frequência da pressão arterial sistólica durante a menopausa.....	<b>47</b>
<b>Figura 24.</b> Mudança na PAM após administração de hexametônio durante a menopausa.....	<b>48</b>
<b>Figura 25.</b> Índice de sensibilidade barorreflexa para bradicardia reflexa durante a menopausa.....	<b>49</b>
<b>Figura 26.</b> Índice de sensibilidade barorreflexa para taquicardia reflexa durante a menopausa.....	<b>50</b>
<b>Figura 27.</b> Ganho e efetividade barorreflexa avaliados pelo método da sequência durante a menopausa.....	<b>51</b>
<b>Figura 28.</b> Resposta pressora frente à estimulação dos receptores $\alpha$ -1 adrenérgico vasculares durante a menopausa.....	<b>52</b>



## LISTA DE TABELAS E QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Protocolo de ordem de aplicação e tipos de estímulos estressores utilizados.....	<b>19</b>
<b>Tabela 1.</b> Parâmetros cardiovasculares basais dos animais estudados 80 dias após início do tratamento com VCD ou veículo..	<b>33</b>
<b>Tabela 2.</b> Valores de F e P da ANOVA para taquicardia e bradicardia reflexa dos animais estudados aos 80 dias após início da administração do VCD ou óleo.....	<b>39</b>
<b>Tabela 3.</b> Valores de F e P da ANOVA para responsividade $\alpha$ -1 adrenérgica vascular dos animais estudados aos 80 dias após início da administração do VCD ou óleo.....	<b>41</b>
<b>Tabela 4.</b> Parâmetros cardiovasculares basais dos animais estudados 180 dias após início do tratamento com VCD ou veículo.....	<b>44</b>
<b>Tabela 5.</b> Valores de F e P da ANOVA para taquicardia e bradicardia reflexa dos animais estudados aos 180 dias após início da administração do VCD ou óleo.....	<b>50</b>
<b>Tabela 6.</b> Valores de F e P da ANOVA para responsividade $\alpha$ -1 adrenérgica vascular dos animais estudados aos 180 dias após início da administração do VCD ou óleo.....	<b>52</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACTH**- Hormônio adrenocorticotrófico  
**ANOVA**- Análise de variância  
**ANS**- Atividade nervosa simpática  
**CIL**- Coluna intermédio lateral  
**CRH**- Hormônio liberador de corticotrofina  
**CVLM**- Bulbo ventrolateral caudal  
**DHT**- Diidrotestosterona  
**ECI**- Estresse crônico imprevisível  
**ER**- Receptor de estrogênio  
**FC**- Frequência cardíaca  
**FSH**- Hormônio folículo estimulante  
**HF**- *High frequency* (Banda de alta frequência)  
**HHA**- Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal  
**IP**- Intervalo de pulso  
**LF**- *Low frequency* (Banda de baixa frequência)  
**LH**- Hormônio luteinizante  
**NPS**- Nitroprussiato de sódio  
**NTS**- Núcleo do trato solitário  
**OMS**- Organização mundial da saúde  
**PA**- Pressão arterial  
**PAD**- Pressão arterial diastólica  
**PAM**- Pressão arterial média  
**PAP**- Pressão arterial pulsátil  
**PAS**- Pressão arterial sistólica  
**PE**- Fenilefrina  
**POMC**- Pro-ópiomelanocortina  
**PVN**- Núcleo paraventricular do hipotálamo  
**RVLM**- Bulbo ventrolateral rostral  
**SRAA**- Sistema renina-angiotensina-aldosterona  
**VCD**- 4-vinilciclohexano diepóxido  
**VFC**- Variabilidade da frequência cardíaca



## **LISTA DE ANEXOS**

**ANEXO 1.** Protocolo de aprovação do comitê de ética no uso de animais (1)

**ANEXO 2.** Protocolo de aprovação do comitê de ética no uso de animais (2)



# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1	Estresse, gênero e menopausa.....	1
1.2	Hipertensão arterial e doenças cardiovasculares na menopausa.....	3
1.3	Variabilidade da pressão arterial sistólica e da frequência cardíaca como ferramenta para avaliação do sistema nervoso autônomo.....	5
1.4	VCD: Modelo experimental de menopausa.....	6
1.5	Estresse e atividade simpática.....	9
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
2.1	Objetivo geral.....	13
2.2	Objetivos específicos.....	13
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>15</b>
3.1	Animais.....	15
3.2	Fármacos utilizados, concentrações e vias de administração.....	15
3.3	Indução da falha ovariana.....	16
3.4	Grupos experimentais.....	17
3.5	Estresse crônico imprevisível.....	17
3.6	Implante das cânulas vasculares.....	19
3.7	Parâmetros cardiovasculares e autonômicos.....	20
3.7.1	Registros da pressão arterial e frequência cardíaca.....	20
3.7.2	Análise da variabilidade da pressão arterial sistólica e frequência cardíaca.....	21
3.7.3	Análise do barorreflexo espontâneo.....	22
3.7.4	Análise do controle barorreflexo da frequência cardíaca.....	23
3.7.5	Avaliação da atividade simpática vascular e responsividade dos receptores $\alpha$ -1 adrenérgicos.....	25
3.8	Perfusão e extração de órgãos.....	28
3.9	Análise estatística.....	29
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
4.1	Resultados avaliados aos 80 dias após a administração de VCD ou óleo (perimenopausa) .....	31
4.1.1	Peso corporal e massa ovariana.....	31
4.1.2	Parâmetros cardiovasculares basais.....	32
4.1.3	Análise da variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência.....	33
4.1.4	Análise da variabilidade da pressão arterial sistólica.....	35
4.1.5	Contribuição simpática para vasos.....	36
4.1.6	Avaliação da bradicardia e taquicardia reflexa.....	37
4.1.7	Análise do barorreflexo espontâneo.....	40

4.1.8	Responsividade dos receptores $\alpha$ -1 adrenérgicos vasculares.	40
4.2	Resultados avaliados aos 180 dias após a administração de VCD ou óleo (menopausa)	42
4.2.1	Peso corporal e massa ovariana	42
4.2.2	Parâmetros cardiovasculares basais	43
4.2.3	Análise da variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência	44
4.2.4	Análise da variabilidade da pressão arterial sistólica	46
4.2.5	Contribuição simpática para vasos	47
4.2.6	Avaliação da bradicardia e taquicardia reflexa	48
4.2.7	Análise do barorreflexo espontâneo	51
4.2.8	Responsividade dos receptores $\alpha$ -1 adrenérgicos vasculares.	51
5	<b>DISCUSSÃO</b>	53
5.1	Animais estudados 80 dias após tratamento com VCD	53
5.2	Animais estudados 180 dias após tratamento com VCD	60
6	<b>CONCLUSÃO</b>	67
7	<b>REFERÊNCIAS</b>	69



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Estresse, gênero e menopausa

Embora a resposta ao estresse possa ser disparada por estímulos físicos/fisiológicos, psicossociais ou a combinação de ambos, a grande maioria dos indivíduos encontra-se exposta mais frequentemente ao do tipo psicossocial (Lundberg, 2005). Respostas distintas ao estresse, relacionadas ao sexo, são vistas em todas as fases da vida e se relacionam tanto aos efeitos organizacionais quanto aos ativacionais dos hormônios e genes encontrados nos cromossomos sexuais (Bale e Epperson, 2015).

O estresse está presente na vida cotidiana de ambos os gêneros, entretanto, estudos demonstram que a ocorrência de estresse psicossocial em mulheres é maior do que em homens (Thurston e Kubzansky, 2007). Os autores sugerem que alguns fatores psicossociais co-ocorrem com maior frequência em mulheres, como por exemplo menor nível educacional, cuidado da família sem a presença do pai e menor renda mensal.

Em roedores, fêmeas apresentam uma resposta ao estresse maior quando comparadas a machos, a qual pode ser notada pelos altos níveis de corticosterona (Critchlow *et al.*, 1963; Handa *et al.*, 1994). Além disso, há diferenças na resposta ao ACTH e à corticosterona ao longo do ciclo estral de roedores, sendo essa resposta elevada durante o proestro, fase em que os níveis de estradiol são elevados, comparado ao estro e diestro (Viau and Meaney, 1991; Walker *et al.*, 2001). A progesterona parece ter efeito oposto ao do estradiol no eixo HHA, reduzindo a expressão de mRNA para CRH nos neurônios do PVN de macacas (Roy *et al.*, 1999) e inibindo a liberação de ACTH em ovelhas fêmeas (Keller-Wood, 1998).

Os esteroides androgênicos também modulam a função do eixo HHA. A testosterona e a di-hidrotestosterona (DHT) possuem papel inibitório na atividade do eixo HHA, sendo que em roedores castrados, a liberação de corticosterona e ACTH após indução por estresse, é aumentada e a reposição com testosterona ou DHT reverte este efeito (Handa *et al.*, 1994; Viau and Meaney, 2004). Sabe-se que a incidência de doenças cardiovasculares é maior quando associada ao estresse

psicossocial, e novamente, as mulheres encontram-se em desvantagem em relação aos homens, sofrendo maiores riscos de desenvolver estes problemas (Thurston *et al.*, 2005).

No momento em que as mulheres atingem a menopausa, definida por Pimenta *et al.*, (2007) como o período em que as menstruações cessam como consequência da redução gradual do funcionamento ovariano, a situação não se atenua. De acordo com Bale e Epperson, 2015, as variações hormonais que ocorrem em mulheres na transição para a menopausa podem promover uma desregulação nos processos celulares envolvidos na ativação e controle do eixo HHA. Além disso, tem sido demonstrado que a perimenopausa e a chegada da “meia-idade” estão associadas com aumento significativo de eventos estressantes na vida de mulheres em comparação com outros estágios (Schmidt *et al.*, 2000). Após a menopausa ocorre um aumento da responsividade simpato-adrenal, a qual pode ser atenuada com o uso de terapia de reposição hormonal [para revisão ver (Kajantie e Phillips, 2006)].

Corroborando estes dados, estudos sobre a resposta ao estresse em mulheres pré e pós-menopausa mostram que tanto a pressão sanguínea quanto a liberação de ACTH e cortisol tornam-se maiores em mulheres pós-menopausa (Lindheim *et al.*, 1992; Kudielka, 1999). Em 2010 foi demonstrado que mulheres na menopausa, além de apresentar aumento da atividade simpática, também apresentam aumento sustentado na carga hemodinâmica, o que pode contribuir para o surgimento de patologias cardiovasculares (Sherwood *et al.*, 2010). Estes dados sugerem que os esteroides ovarianos são importantes na modulação da pressão sanguínea homeostática. A terapia de reposição com estrógenos pode atenuar a exacerbação da resposta a estressores psicossociais após a menopausa (Ceresini *et al.*, 2000). Além da resposta ao estresse ser mais acentuada em mulheres, estas apresentam maiores riscos de desenvolver déficits cognitivos em decorrência do estresse (Almela *et al.*, 2011). Estes autores mostraram um impacto agudo do estresse no desempenho de mulheres em testes de memória, com uma correlação significativa com altos níveis de cortisol, o que corrobora a importância dos hormônios sexuais como fatores críticos na relação entre estresse e cognição.

## 1.2 Hipertensão arterial e doenças cardiovasculares na menopausa

A mortalidade por doenças cardiovasculares cresce progressivamente com aumentos da PA. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2013 estimaram que 17 milhões de pessoas morressem, por ano, devido a complicações cardiovasculares e a PA elevada (sistólica  $\geq 140$  mmHg e/ou diastólica  $\geq 90$  mmHg). Além disso, a hipertensão está relacionada com 45% dos infartos do miocárdio e 51% dos acidentes vasculares cerebrais, constituindo assim, um grave quadro para a saúde pública. Em adição, pesquisa realizada pelo Centro Nacional de Saúde e Estatística em Saúde nos Estados Unidos em 2010, mostra que cerca de 40% das mulheres que entram na menopausa tornam-se hipertensas, o que aumenta suas chances de apresentarem problemas cardiovasculares. Embora o tratamento da hipertensão seja similar para homens e mulheres, a hipertensão feminina parece ser mais resistente aos tratamentos (Kim *et al.*, 2006), sugerindo que os mecanismos de controle da PA possam ser diferentes entre homens e mulheres.

Segundo Hart e Charkoudian (2014), já é reconhecido que as mulheres jovens tendem a ter menor PA e menor risco de hipertensão, em comparação com homens da mesma idade, contudo, com o envelhecimento, a PA e o risco de hipertensão tendem a aumentar e esta tendência é particularmente pronunciada em mulheres durante o período de menopausa.

O aumento na PA durante a menopausa sugere um papel importante dos esteroides ovarianos na sua regulação (Ong *et al.*, 2008). Comparadas às mulheres na fase pré-menopausa, aquelas na menopausa apresentam o dobro de risco de desenvolverem doenças cardiovasculares (Atsma *et al.*, 2006). Assim, com a menopausa as mulheres perdem a ação protetora dos esteroides ovarianos contra as doenças cardiovasculares (Kallen e Pal, 2011), o que contribui para o risco de desenvolvimento destas doenças e torna-se, portanto, uma importante questão de saúde pública.

Com relação às disordens cardiovasculares, os trabalhos que já existem na literatura objetivam, em sua maioria, estudos de mecanismos hormonais de controle em longo prazo, como o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) (Chappell *et al.*, 2008; Pendergrass *et al.*, 2008). Mulheres após a menopausa exibem aumento na atividade da renina plasmática (Schunkert *et al.*, 1997), mas o uso de bloqueadores do SRAA, inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) ou

bloqueadores de receptores AT1 não são frequentemente usados para tratar a hipertensão pós-menopausa (Wassertheil-Smoller *et al.*, 2000). O *Joint National Committee VI and VII Guidelines* recomenda o uso de diuréticos e  $\beta$ -bloqueadores em pacientes com hipertensão essencial. Um dos mecanismos pelos quais o estradiol ( $E_2$ ) age como protetor cardiovascular é diminuindo a expressão dos receptores AT1, bem como a expressão da ECA (Nickenig *et al.*, 1998; Gallagher *et al.*, 1999). Por outro lado, dados experimentais mostram que a administração de losartan, um antagonista AT1, reduz, mas não normaliza a PA de ratas hipertensas na menopausa. Assim, conclui-se que o SRAA pode contribuir para a hipertensão na menopausa, mas não é o único mediador neste processo (Yanes *et al.*, 2010). Um possível candidato nessa mediação é o barorreflexo, um mecanismo de controle rápido da PA, que ainda não foi estudado neste contexto da menopausa, bem como na associação entre menopausa e estresse.

O barorreflexo opera por meio de sensores (mecanorreceptores denominados barorreceptores) localizados nas artérias carótidas e arco aórtico e que são estimulados pelo estiramento da parede desses vasos em condições de aumento da pressão arterial (Chapleau *et al.*, 1995). As informações geradas por esses receptores são conduzidas pelos nervos depressor aórtico e sinusal até uma importante região da superfície dorsal do bulbo denominada núcleo do trato solitário (NTS) (Bailey *et al.*, 2006; Guyenet, 2006). Essa região é de fundamental importância para o processamento e transmissão das informações periféricas para outras áreas do tronco cerebral envolvidas com o controle da PA. Neste sentido, as informações provenientes dos barorreceptores são processadas no NTS e então enviadas ao núcleo ambíguo e núcleo dorsal do vago, por meio de uma projeção excitatória, controlando o tônus vagal (sistema nervoso parassimpático) sobre o coração (Dampney, 1994).

Além disso, do NTS partem projeções excitatórias para os neurônios gabaérgicos da região caudal ventrolateral do bulbo (*caudal ventrolateral medulla*, CVLM) (Guyenet, 2006; Schreihofe e Guyenet, 2003), os quais exercem ação inibitória tônica sobre os neurônios pré-motores simpáticos da região rostral ventrolateral do bulbo (*rostral ventrolateral medulla*, RVLM) (Schreihofe e Guyenet, 2003; Huber e Schreihofe, 2011). Assim, o comprometimento da função do barorreflexo poderia atuar como elemento permissivo ao estabelecimento de alterações primárias de outros mecanismos de controle da função cardiovascular, por não modular a atividade simpática e parassimpática de modo adequado. A redução da

sensibilidade barorreflexa pode produzir aumento da labilidade (variabilidade da PA a curto-prazo) diante de diferentes atividades diárias interferindo na função cardiovascular normal e podendo até mesmo comprometer o funcionamento de diversos órgãos em situações especiais. Os achados de Eto e colaboradores, 2003 sugerem que uma labilidade elevada da pressão sanguínea, independente do nível de pressão sanguínea média, prejudica a função endotelial pela inibição da produção de óxido nítrico, o que pode contribuir para o surgimento de hipertensão devido ao aumento do tônus vascular.

Diversos modelos experimentais que desenvolvem hipertensão possuem redução do controle barorreflexo, sendo que este pode contribuir para o surgimento e/ou comprometimento do quadro hipertensivo. Portanto, torna-se importante o estudo de alterações do controle barorreflexo na progressão da menopausa, para entendermos os mecanismos que levam a possíveis aumentos da PA em mulheres nesta fase.

A hipertensão na menopausa tem múltiplas etiologias e o fato de mulheres na menopausa apresentarem hipertensão mais resistente ao tratamento indica a necessidade de estratégias terapêuticas diferentes. Dessa forma, entender os mecanismos pelos quais a hipertensão se instala na menopausa é essencial para a abertura de novas perspectivas de tratamentos alternativos. Sabemos que a longevidade dessa população de mulheres na menopausa é alta e, portanto, é necessário que se busque melhorias nas terapias para hipertensão, e consequentemente na prevenção do surgimento de doenças cardiovasculares associadas.

### **1.3 Variabilidade da pressão arterial sistólica e da frequência cardíaca como ferramenta para avaliação do sistema nervoso autônomo**

A manutenção do controle cardiovascular tem a participação do sistema nervoso autônomo, o qual provê aferências nervosas para o coração, na forma de terminações simpáticas em todo o coração, e parassimpáticas para o nodo sinusal, nodo atrioventricular e miocárdio atrial (Aubert *et al.*, 2003). O coração não pulsa com a regularidade de um relógio, portanto, alterações na FC, definidas como variabilidade da frequência cardíaca (VFC), são fisiológicas e apontam a capacidade do coração em se adaptar aos vários estímulos fisiológicos e ambientais, como a respiração e diversas formas de estímulos estressores, como distúrbios produzidos por doenças (Caruana-Montaldo *et al.*, 2000; Rajendra Acharya *et al.*, 2006). Embora o organismo seja capaz de

corrigir variações abruptas de parâmetros fisiológicos, sabe-se da existência de certa variabilidade da PA em torno de níveis médios (Baselli *et al.*, 1986; Cerutti *et al.*, 1991). Para um observador inexperiente, o padrão de variação de uma sequência temporal de PA, ou FC, batimento a batimento, pode parecer, essencialmente, com um ruído branco. Entretanto, estudos de variabilidade da PA e da FC no domínio da frequência (análise do espectro de variação) revelam a existência de componentes oscilatórios na variabilidade, tanto da PA quanto da FC, não apenas em seres humanos mas também em diversos modelos experimentais (Akselrod *et al.*, 1981; Cerutti *et al.*, 1994; Task Force, 1996; Persson, 1997).

Pelo menos dois componentes oscilatórios, em frequências distintas, podem ser claramente identificados nos espectros das séries temporais de PA e FC (Pagani *et al.*, 1986), recebendo a denominação de variabilidade de baixa frequência LF (low frequency) e de alta frequência HF (high frequency). O componente HF corresponde à frequência respiratória e é impulsionada pelo nervo vago, como é indicado pelo forte padrão respiratório dos motoneurônios vagais cardíacos no núcleo ambíguo (Rentero *et al.*, 2002), indicando uma modulação parassimpática para a FC (Japundzic *et al.* 1990; Cerutti *et al.* 1991; Malliani *et al.* 1991). O componente LF tem sido associado com a modulação simpática da atividade marca-passo cardíaca, pois diversos estudos apontam que intervenções agudas que aumentam a atividade nervosa simpática, como perturbações ortostáticas (Floras *et al.*, 2001; Fu *et al.*, 2001) e estresse mental (Middlekauff *et al.*, 2001) também aumentam o componente LF da potência espectral da FC (Malpas, 2002). Dessa forma, o estudo da variabilidade da PA e da FC representa uma ferramenta extremamente útil para a avaliação da atividade autonômica simpática e parassimpática em humanos (Lefrandt *et al.*, 2000; Watkins *et al.*, 2000) e em modelos experimentais (Van Vliet *et al.*, 2002; Fazan, Jr. *et al.*, 2005) e foi utilizada neste projeto para determinação da modulação autonômica da PA e FC em ratas com falha ovariana submetidas ou não ao ECI.

#### **1.4 VCD: Modelo experimental de menopausa**

O envelhecimento reprodutivo em fêmeas de mamíferos é caracterizado pelo declínio progressivo na fertilidade, que é atribuído à perda dos folículos ovarianos e diminuição da qualidade dos mesmos, defeitos uterinos relacionados ao envelhecimento e alterações no eixo neuroendócrino (Danilovich e Sairam, 2006).

O estudo da menopausa requer modelos experimentais viáveis, que tenham similaridades nos aspectos endócrinos e neuroendócrinos da biologia ovariana humana e possam mimetizar os processos que ocorrem nessa fase. Wise e colaboradores (2002) apontam evidências que sustentam o modelo de menopausa em roedores: 1) o evento que antecede a menopausa, o aumento dos níveis plasmáticos de FSH, ocorre tanto em mulheres quanto em ratas; 2) o padrão de secreção do hormônio luteinizante (LH) é alterado em ambas assim que elas entram no período de aciclicidade; 3) a duração do ciclo menstrual (mulheres) e estral (ratas) se torna variável na perimenopausa, podendo ser mais longos ou mais curtos nas mulheres, enquanto nas ratas ocorrem fases de estro ou diestro mais prolongadas; 4) assim como ocorre nas mulheres, as ratas na perimenopausa não apresentam queda precoce dos níveis de estradiol, eles permanecem constantes ou até mesmo aumentados; e 5) ocorre uma atenuação da habilidade do estradiol em estimular os picos de LH, tanto em mulheres na perimenopausa quanto em ratas de “meia-idade”. Por todas essas razões, os roedores vêm sendo considerados modelos experimentais para o estudo da menopausa, possibilitando extrapolações para o entendimento do envelhecimento reprodutivo humano.

Clinicamente, a menopausa é definida como a cessação da ciclicidade menstrual espontânea por pelo menos um ano (Wu *et al.*, 2005). Atualmente, o modelo mais usado para estudo da menopausa é o da ovariectomia, o qual é uma retirada brusca dos ovários e não mimetiza a progressão natural da perimenopausa para a menopausa, um processo gradual pelo qual a maioria das mulheres passa e que se inicia entre as idades de 40 a 45 anos. Como alternativa, outro modelo experimental para menopausa em ratas tem sido utilizado.

A exposição de animais ao composto químico 4-vinilciclohexano diepóxido (VCD) leva à falha gradual da função ovariana, resultando em depleção de folículos, mas que retém tecido ovariano residual, assim como ocorre na mulher durante a menopausa (Springer *et al.*, 1996; Kao *et al.*, 1999; Mayer *et al.*, 2004). Esse composto destrói seletivamente os folículos primordiais e primários por meio da aceleração do processo natural de atresia folicular (apoptose), levando, ao longo do tempo, ao aumento nos níveis de FSH, exatamente como ocorrem em mulheres na perimenopausa (Lukefahr *et al.*, 2012). Portanto, a falha ovariana prematura ocorre pela depleção dos folículos ovarianos e consequentemente leva à queda dos níveis de estradiol e progesterona, já que os folículos são os principais produtores dos hormônios ovarianos.

De acordo com as constatações de Reis e colaboradores (2014), os níveis de FSH em ratas começam a aumentar aos 90 dias após o início da administração do VCD (dado não publicado). Outro estudo, utilizando camundongas, mostra que aos 120 dias após o início da administração do VCD, os níveis de FSH estão aumentados, coincidindo com a redução significativa no número de folículos antrais (Mayer *et al.*, 2002). Considerando que os níveis de FSH aumentam no final da perimenopausa em mulheres (Burger *et al.*, 1998), a idade escolhida, 80 dias, para estudo da perimenopausa em ratas, está de acordo, visto que esse parece ser o final do período de transição da perimenopausa para menopausa em ratas (Reis *et al.*, 2014). O segundo período escolhido para o estudo nos animais foi 180 dias após o início do tratamento com VCD, fase caracterizada como menopausa. Mayer e colaboradores (2002) mostraram que o número de folículos primordiais e primários já está reduzido no trigésimo dia após o início da administração de VCD, enquanto que os folículos secundários e os de Graaf estão reduzidos no sexagésimo dia, mantendo-se reduzidos até o tricentésimo sexagésimo dia, período no qual o estudo foi finalizado.

As concentrações séricas de progesterona, testosterona e dihidrotestosterona nas ratas submetidos ao tratamento com VCD estão reduzidas no dia 80 após o início do tratamento, enquanto que o estradiol e o FSH não estão alterados (Reis *et al.*, 2014). A concentração de estradiol não apresenta redução, porém um estudo mostra que a variabilidade deste está aumentada entre os animais estudados no dia 360 (Mayer *et al.*, 2002). Portanto, o entendimento do centésimo octagésimo dia como período definido como menopausa, é baseada no aumento do FSH e na depleção folicular avançada demonstrada na literatura.

A menopausa ocorre durante o envelhecimento e há, portanto, um desafio metodológico para se separar as influências da idade e aquelas provenientes da chegada da menopausa. Esta é outra vantagem do modelo VCD, pois além de ser similar à menopausa fisiológica no que diz respeito aos eventos ovarianos, a falha ovariana não é acompanhada do processo de envelhecimento, já que o processo se instala com apenas três meses após a administração do VCD (Mayer *et al.*, 2004). Assim, este é um modelo interessante para se fazer inferências sobre a dinâmica da perda folicular e seus efeitos nas mulheres em menopausa. Nosso principal objetivo é caracterizar a função cardiovascular neste modelo de menopausa química associado ao estresse. Caso estes animais apresentem hipertensão ou alterações dos mecanismos de controle da PA que possam levar à hipertensão, este



modelo poderá ser uma excelente ferramenta para o estudo futuro dos mecanismos de ação dos esteroides ovarianos na regulação da função cardiovascular associada ao estresse.

### **1.5 Estresse e atividade simpática**

A integridade dos sistemas fisiológicos de um organismo depende da sua capacidade de responder a estímulos estressores, que podem ser definidos em dois tipos: interoceptivos ou físicos e exteroceptivos ou psicológicos (Dayas *et al.*, 2001). Os estressores caracterizados como físicos, são aqueles que podem causar, diretamente, a ruptura da homeostase, como por exemplo, a hipóxia, hemorragia, infecções, traumas, entre outros, enquanto que os estímulos psicológicos são aqueles que representam uma ameaça, como por exemplo, a visualização de um predador [para revisão (Dampney, 2015)].

Sendo assim, o estresse pode ser definido como qualquer alteração fisiológica ou psicológica que altera a homeostase do organismo (Selye, 1936). Diferentes estímulos estressores (psicológico ou físico/fisiológico) produzem importantes mudanças comportamentais e fisiológicas. Dentre elas, pode-se destacar o desenvolvimento de transtornos mentais como depressão, ansiedade ou esquizofrenia (Steenbergen *et al.*, 1991; Ottenweller *et al.*, 1992; Rodgers e Cole, 1993), bem como hipoatividade e anorexia ou perda de peso (Dess *et al.*, 1989; Blanchard *et al.*, 1990; Woodmansee *et al.*, 1993). A manutenção homeostática do organismo necessita de contínuas adaptações comportamentais, autonômicas e endócrinas que controlam os distúrbios decorrentes de estímulos estressores internos ou externos (Aguilera, 1998).

Vários sinais indicativos de estresse são integrados no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA). Esses sinais convergem para uma via comum, representada pelos neurônios da divisão parvocelular do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) (Ulrich-Lai e Herman, 2009). Os neurônios do PVN sintetizam o hormônio liberador de corticotrofina (CRH), que é então liberado na eminência mediana e liga-se aos seus receptores de membrana nos corticotrofos da hipófise anterior. Como resultado ocorre o aumento da liberação da proopiomelanocortina (POMC), o peptídeo precursor da molécula do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). O ACTH liberado na circulação, atua sobre seus receptores localizados na zona fasciculada, no córtex da adrenal resultando na síntese e secreção dos glicocorticóides, predominantemente, corticosterona nos roedores e cortisol nos primatas (Badiani *et al.*, 1995). Além disso, estímulos

estressores induzem, rapidamente, aumento na atividade autonômica, com coativação simpática e parassimpática (Baudrie, 1997), promovendo alterações rápidas nos estados fisiológicos, por meio da inervação de órgãos alvo e liberação de epinefrina pelas adrenais (Ulrich-Lai e Herman, 2009).

O PVN é um importante núcleo integrador que participa da regulação da atividade de nervos simpáticos (ANS) e da pressão arterial (PA). Seus neurônios parvocelulares enviam projeções para os neurônios pré-motores simpáticos da região rostral ventrolateral do bulbo (*rostral ventrolateral medulla*, RVLN) (Porter e Brody, 1986; Coote et al., 1998; Pyner e Coote, 1999; Tagawa e Dampney, 1999) e para a coluna intermédia lateral (CIL) (Saper et al., 1976; Swanson e Kuypers, 1980; Shafton et al., 1998; Badoer, 2001). Os neurônios pré-autonômicos do PVN expressam todos os subtipos de receptores de aminoácidos ionotrópicos excitatórios (Herman et al., 2000). A microinjeção de glutamato no PVN promove aumento da ANS, PA e frequência cardíaca (FC) em ratos não anestesiados (Kannan e Yamashita, 1989; Martin e Haywood, 1992) e anestesiados (Katafuchi et al., 1988, Li et al., 2006). Em contraste, o ácido gama-aminobutírico (GABA) é um importante regulador tônico, inibitório da atividade neuronal do PVN (Decavel e Van den Pol, 1990). Microinjeção de bicuculina, um antagonista do receptor GABA-A, no PVN evoca aumentos consideráveis na PA e FC em ratos anestesiados (Zhang e Patel, 1998; Li et al., 2001; Li e Patel, 2003) e em ratos não anestesiados (Martin e Haywood, 1992; Schlenker et al., 2001; Cruz e Machado, 2009), sugerindo que o PVN está tonicamente sob influência inibitória.

Estudos demonstram que o PVN apresenta uma maior contribuição para os níveis de repouso da ANS e PA em vários modelos de hipertensão. Em ratos submetidos à privação crônica de água, o que eleva a ANS e PA, o aumento da ANS depende da integridade dos neurônios do PVN, uma vez que a inibição aguda da PVN pela microinjeção bilateral de muscimol, um agonista GABA-A, produz uma maior redução da ANS renal e PA, em relação aos ratos controles (Stocker et al., 2004). Adicionalmente, a privação de água aumenta a expressão de Fos, um indicador da ativação neuronal, em neurônios do PVN com projeções identificadas para o RVLN e para a medula espinhal (Stocker et al., 2004b). Dessa forma, um aumento da atividade neuronal do PVN induzido por exposição crônica e aguda a fatores estressores pode ocasionar um aumento da atividade simpática para

vasos sanguíneos e coração, elevando o risco de desenvolvimento de hipertensão e doenças cardiovasculares.

Interessantemente, as alterações do eixo HHA e da regulação autônômica evocadas pela exposição crônica ao estresse dependem de fatores como a previsibilidade, a intensidade e a natureza do estímulo estressor. Em concordância, Dal-Zotto e colaboradores (2000), demonstraram que animais expostos ao nado forçado por 20 minutos durante 14 dias apresentam recuperação mais rápida das concentrações de corticosterona no último dia de exposição, quando comparados a animais submetidos ao mesmo estresse uma única vez. Portanto, quando animais são submetidos repetidamente ao mesmo estressor, pode ocorrer habituação. Uma alternativa para que isso não ocorra é a utilização de um protocolo de estresse crônico imprevisível (ECI). Este é um modelo já validado na literatura, utilizado para mimetizar estados de depressão (Zhang *et al.*, 2012), mas que também pode contribuir no esclarecimento de mecanismos relacionados às respostas ao estresse e suas relações com doenças cardiovasculares. No ECI, os animais são sujeitos a um período crônico, durante 2 semanas ou mais, a estressores imprevisíveis tais como restrição de movimento, privação de alimento e exposição à luz contínua (Willner *et al.*, 1987). Este tipo de estresse resulta em anedonia (diminuição da resposta a estímulos prazerosos), redução da atividade locomotora, aumento da frequência cardíaca e do tônus simpático cardíaco (Grippe *et al.*, 2003).

Além das consequências supracitadas, Bayramgurle e colaboradores (2015) relataram que ratos submetidos ao ECI apresentam alterações cardiovasculares, como aumento da sensibilidade endotelial aos efeitos vasoconstritores da fenilefrina em associação com hipertrofia das camadas íntima e média da aorta e diminuição da expressão da enzima óxido nítrico sintase endotelial. Além disso, apresentam hiperlipidemia (Neves *et al.*, 2009), elevação da frequência cardíaca de repouso e redução na variabilidade da FC (Golbidi *et al.*, 2015).



## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar se a falha ovariana precoce, causada pelo tratamento com VCD altera o controle autonômico do sistema cardiovascular após exposição ao estresse crônico imprevisível.

### **2.2 Objetivos específicos**

- determinar os níveis basais da PA sistólica, diastólica, média e da frequência cardíaca;
- analisar a variabilidade da PA e FC no domínio da frequência;
- determinar a sensibilidade ou ganho do barorreflexo espontâneo;
- avaliar a sensibilidade barorreflexa;
- avaliar a contribuição do sistema nervoso simpático na manutenção da PA;
- determinar a responsividade dos receptores alfa-1 vasculares.



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Cento e vinte e nove ratas Wistar com vinte e um dias de idade, provenientes do biotério da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) foram recebidas em 5 lotes e alojadas no biotério do Laboratório de Neurobiologia do Comportamento (LABNEC, CFS, CCB, UFSC, BIO066). Os animais foram randomicamente distribuídos em caixas de polipropileno branco (50 x 30 x 10 cm), com cobertura de maravalha, cinco animais por caixa e ambientados sob condições controladas de temperatura ( $21^{\circ}\text{C} \pm 2$ ), exaustão e luminosidade, sendo essa mantida em ciclo invertido, com lâmpadas ligadas as 18h e desligadas as 06h. A limpeza das caixas e troca de maravalha foram procedidas três vezes por semana e durante todo período dos experimentos, água e ração (BioBase Ltda) foram disponibilizadas *ad libitum*. Todos os protocolos e procedimentos experimentais relativos ao projeto foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC sob o número de protocolo PP00832 e PP00842.

#### 3.2 Fármacos utilizados, concentrações e vias de administração

-VCD (160mg/kg), Sigma - Aldrich Brasil Ltda, diluído em óleo de milho e administrado por via intraperitoneal;

-Cloridrato de cetamina (90mg/kg), Syntec do Brasil, administrado por via intraperitoneal;

-Cloridrato de xilaxina (10 mg/kg), Syntec do Brasil, administração intraperitoneal.

-Fenilefrina diluída em solução salina a 0,9%, foi administrada intravenosamente nas doses de 2, 4, 8 e 16  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bem como nas doses de 1, 5, 10, 50, 100, 150 e 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

-Nitroprussiato de sódio diluído em solução salina 0,9% nas doses de 4,8,16 e 32  $\mu\text{g}/\text{kg}$  foi administrado por via intravenosa.

-Cloreto de hexametônio (25mg/kg, Sigma - Aldrich Brasil Ltda foi administrado por via intravenosa.

### 3.3 Indução da falha ovariana

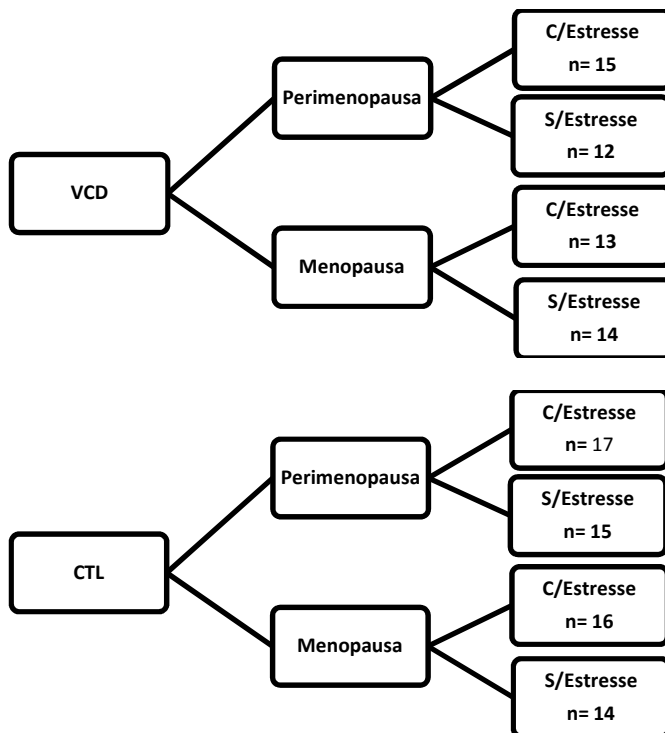
Após completarem 28 dias de vida, os animais foram divididos em dois grupos: indução da falha ovariana (VCD) e controle (CTL), e então cada fêmea recebeu intraperitonealmente uma injeção contendo 4-vinil ciclohexano diepóxido, 160mg/kg (VCD, Sigma, V3630) ou óleo de milho (CTL) durante 15 dias consecutivos. A dose escolhida, a via e o período de administração foram baseados em estudos prévios (Mayer *et al.*, 2004; Acosta *et al.*, 2009; Reis *et al.*, 2014;).

Após o período de administração do composto, os animais foram novamente divididos em quatro grupos: controle com 80 dias após o início da administração do óleo de milho (CTL/80), perimenopausa com 80 dias após o início da administração do VCD (VCD/80), controle com 180 dias após o início da administração do óleo (CTL/180) e menopausa com 180 dias após o início da administração do VCD (VCD/180). Dez dias antes do protocolo cirúrgico para implantação de cateteres nos vasos femorais, cada grupo foi novamente subdividido em dois grupos: com estresse crônico imprevisível (c/ECI) e sem estresse crônico imprevisível (s/ECI).



### 3.4 Grupos experimentais

Figura 1. Divisão dos grupos experimentais



### 3.5 Estresse crônico imprevisível

Exatamente dez dias antes da execução do protocolo cirúrgico para cateterização dos vasos femorais, os animais foram submetidos ao protocolo de estresse crônico imprevisível, modelo já validado na literatura (Willner *et al.*, 1987; Grippo *at al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2012), que consistiu na aplicação, duas vezes ao dia, de diferentes estímulos estressores ao longo de dez dias (adaptado de Ortiz *et al.*, 1996). Os estímulos utilizados foram:

**Imobilização:** o aparato utilizado para imobilização consiste em um cilindro de PVC branco de 20 cm de comprimento e 6 cm de diâmetro,

com uma das extremidades parcialmente fechada, apenas com uma abertura central para exteriorizar a cauda do animal e evitar que esta permaneça em uma posição desconfortável, evitando estresse maior que o desejado e a outra, com várias aberturas para circulação de ar.

**Nado forçado:** Os animais foram colocados em tanques de PVC opaco (marrom) com capacidade para 50 L e preenchido com água a temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C), de maneira que a cauda do animal não encostasse no fundo do recipiente. Ao final de 5 minutos, os animais foram cuidadosamente secos e recolocados em suas caixas.

**Isolamento frio:** os animais foram colocados em caixas sem maravalha, água ou comida, no refrigerador para que fossem expostos a uma temperatura de  $4 \pm 2$  °C durante 60 min, ao término desse tempo, foram devolvidos às suas caixas e às condições ideais de temperatura.

**Privação hídrica e alimentar:** Os animais permaneceram em condições ideais de temperatura e exaustão e durante 12 horas, as garrafas de água e a ração foram retiradas das caixas, ao final desse tempo, a ração e a água foram repostas.

**Inversão do ciclo circadiano:** os animais foram mantidos em suas caixas e acondicionados em uma sala com condições ideais de temperatura e exaustão onde o ciclo circadiano foi invertido: luz apagada no período escuro ou luz acesa no período claro.

O protocolo detalhado e a ordem de aplicação dos estímulos estressores encontram-se no quadro a seguir:

**Quadro 1-** Protocolo de ordem de aplicação e tipos de estímulos estressores utilizados.

<b>DIA</b>	<b>TIPO DE ESTRESSE</b>	<b>HORÁRIO</b>
<b>1</b>	Imobilização por 60 minutos	Manhã
	Natação forçada por 5 minutos	Tarde
<b>2</b>	Isolamento/frio por 60 minutos	Manhã
	Luz apagada à noite	Noite
<b>3</b>	Privação hídrica e alimentar	Manhã
	Imobilização por 60 min	Tarde
<b>4</b>	Natação forçada por 5 minutos	Manhã
	Isolamento/frio por 60 minutos	Tarde
<b>5</b>	Luz acesa de dia	Manhã e tarde
	Privação hídrica e alimentar	Tarde
<b>6</b>	Imobilização por 60 min	Manhã
	Natação forçada por 5 minutos	Tarde
<b>7</b>	Isolamento/frio por 60 minutos	Manhã
	Luz apagada à noite	Noite
<b>8</b>	Privação hídrica e alimentar	Manhã
	Imobilização por 60 min	Tarde
<b>9</b>	Natação forçada por 5 minutos	Manhã
	Isolamento/frio por 60 minutos	Tarde
<b>10</b>	Luz acesa de dia	Manhã e tarde
	Privação hídrica e alimentar	Tarde

### **3.6 Implante das cânulas vasculares**

Um dia antes das aferições dos parâmetros cardiovasculares, todos os animais foram submetidos à cirurgia para implante de cânulas na artéria e veia femorais, protocolo amplamente usado para aquisição de parâmetros hemodinâmicos e administração de fármacos, respectivamente (Silva *et al.*, 2009; Losurdo *et al.*, 2015; Pourshanzari *et al.*, 2015). Os animais foram anestesiados com cetamina (90 mg/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/kg, i.p.) e foram avaliados os reflexos palpebral, pupilar e interdigital e então, com o animal em plano anestésico cirúrgico foi feita a tricotomia da região dorsal escapular e da face medial da coxa esquerda. A assepsia da região foi realizada com etanol 70% e álcool iodado 0,1%.

Uma incisão foi feita na face medial da coxa esquerda, com tamanho médio de 1cm, os vasos femorais foram então dissecados,

expostos e cateterizados com cânulas de polietileno 50mm (PE50) para veia e PE50 soldado a polietileno 10mm para artéria. A porção de PE50 exterior ao vaso foi conduzida subcutaneamente até o dorso do animal e exteriorizada entre as escápulas. As incisões foram suturadas de forma que as cânulas permanecessem fixadas ao dorso do animal, permitindo que o registro da pressão arterial se desse de maneira que o animal pudesse estar acordado e em livre movimentação.

Após a cirurgia, os animais foram acondicionados na sala do experimento em gaiolas individuais, sob lâmpadas incandescentes de 40 Watts para que a temperatura ambiente se mantivesse levemente aumentada durante o período de recuperação anestésica e, após estar em estado consciente e movimentando-se, foram mantidos em condições controladas de luminosidade, temperatura e exaustão durante 24h para recuperação. No decorrer desse período os animais permaneceram recebendo ração e água *ad libitum*.

### **3.7 Parâmetros cardiovasculares e autonômicos**

A avaliação de parâmetros cardiovasculares foi realizada aos 80 dias (grupos 1 a 4) e 180 dias (grupos 5 a 10) após o início do tratamento com VCD ou óleo. Para isso foram necessários dois dias de registros. No primeiro ocorreu o registro basal dos parâmetros cardiovasculares e a avaliação do barorreflexo por meio de fármacos vasoativos, enquanto no segundo dia houve a avaliação da contribuição do sistema nervoso simpático para vasculatura bem como a responsividade dos receptores vasculares  $\alpha$ 1-adrenérgicos. O detalhamento da avaliação de cada parâmetro encontra nos tópicos a seguir.

#### **3.7.1 Registros da pressão arterial e frequência cardíaca**

No dia seguinte ao procedimento cirúrgico, primeiro dia de registros, os animais, dentro de suas caixas, foram alojados no interior de uma gaiola de Faraday e então, a cânula arterial foi preenchida com salina heparinizada (20:1) para evitar a formação de coágulos durante o registro e então, conectada a um transdutor de pressão (AVS Projetos, São Carlos, Brasil), o qual, por sua vez, foi conectado a um amplificador (Amplificador AECAD 04P, AVS Projetos). Os sinais da pressão arterial pulsátil (PAP) foram adquiridos por um sistema de aquisição (PowerLab 15T, ADInstruments, Bella Vista, Austrália) e registrados em um computador a uma frequência de aquisição de 1 kHz por meio de

um software apropriado (LabChart v7.0, ADInstruments, Bella Vista, Austrália). Os valores das pressões arteriais diastólica (PAD), média (PAM) e sistólica (PAS) e da frequência cardíaca (FC) foram derivados a partir dos sinais da PAP utilizando o software de aquisição.

### **3.7.2 Análise da variabilidade da pressão arterial sistólica e frequência cardíaca**

A partir de trechos de 30 minutos de registros estáveis, do primeiro dia de aquisição dos parâmetros cardiovascular, foi realizado o estudo da variabilidade da pressão arterial sistólica (PAS) e da frequência cardíaca (FC) como uma ferramenta para a avaliação do tônus autonômico para o sistema cardiovascular. Durante todo o período de registro, os animais não foram manipulados e os registros foram realizados em uma sala isolada para evitar efeitos indesejáveis de ruídos que poderiam estressar os animais.

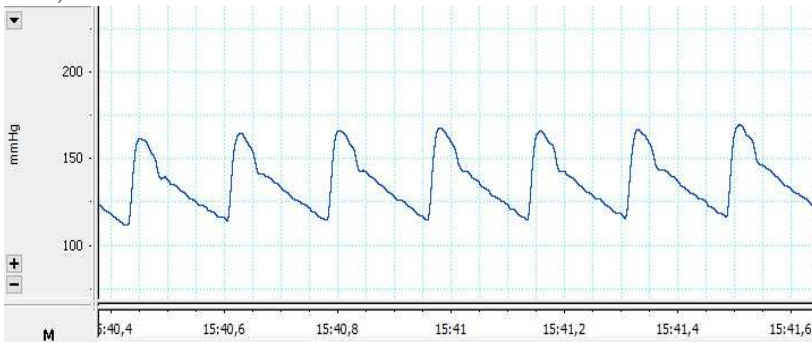
As séries obtidas com valores médios da pressão arterial e intervalo de pulso, batimento a batimento, foram processadas por um software (LabChart) que aplica um algoritmo para detectar pontos de inflexão no sinal da pressão arterial pulsátil. Séries de intervalo de pulso foram geradas a partir do sinal da PAP pela medição do intervalo de tempo entre vales de pressão arterial sistólica adjacentes. Após, series batimento a batimento da pressão arterial sistólica e intervalo de pulso foram convertidas em ponto de dados com 100ms, usando interpolação spline cúbica (10Hz). As séries interpoladas foram divididas em conjuntos sequenciais semi-sobrepostos de 512 pontos de dados. A regularidade dos segmentos foi inspecionada visualmente buscando por transientes que poderiam afetar o cálculo da potência da densidade espectral e retirados da análise quando apresentavam distorções do sinal que poderiam comprometer o resultado (Porta *et al.*, 2001; van de Borne *et al.*, 1997; Dias *et al.*, 2010).

Séries temporais da PAS (batimento a batimento) e da FC (intervalos entre sucessivos valores da PAS, Quadro 1) geradas a partir do sinal de pressão arterial pulsátil obtido, foram analisadas utilizando o método da transformada rápida de Fourier (Zoccal e colaboradores, 2009). Para isso, foi utilizado um software apropriado (CardioSeries, versão 2.4, <http://www.danielpenteado.com>), que permite a análise dos dados no domínio do tempo e no domínio da frequência.

Com relação à análise da variabilidade da PAS e do intervalo de pulso (IP), cada componente foi caracterizado pela sua amplitude (magnitude), expressa como potência e sua frequência correspondente.

Espectros de cada segmento foram obtidos e agrupados em um espectro médio resultante para a PAS e IP. Os componentes oscilatórios foram quantificados nas faixas de baixa frequência (LF - 0,20 – 0,75 Hz) a qual representa componentes de modulação simpática e alta frequência (HF - 0,75 – 3,0 Hz) que corresponde aos componentes da modulação parassimpática (Silva *et al.*, 2015).

**Figura 2.** Sinal de PAP, pelo qual foram obtidas as derivações da PAM, PAS, PAD E FC.



### 3.7.3 Análise do barorreflexo espontâneo

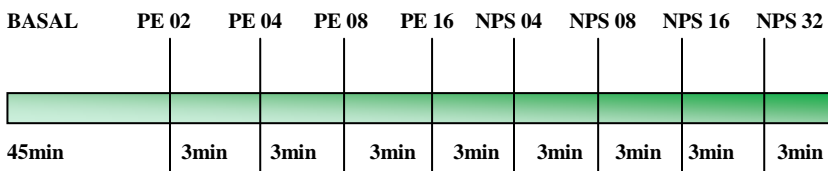
A partir dos registros da PA e da FC, a sensibilidade e ganho do barorreflexo espontâneo foram calculados por meio da técnica de análise das sequencias. Para tanto, por meio de um software apropriado (CardioSeries, versão 2.4), foram detectadas, automaticamente, rampas espontâneas com progressivos aumentos ou diminuições de 3 ou 4 valores da PAS, os quais apresentam alterações em paralelo no intervalo de pulso (IP, intervalo de tempo entre sucessivos pulsos da PAP) com uma correlação linear maior do que 0,8. Dessa forma, as sequencias foram definidas como *up sequences* quando aumentos na PAS estiveram correlacionados a um aumento do IP ou como *down sequences* quando reduções na PAS estiveram correlacionadas a uma redução do IP. A partir dessas sequências, o ganho do barorreflexo foi calculado como a inclinação (ms/mmHg) da reta gerada pela regressão linear entre as modificações correspondentes na PAS e no IP.

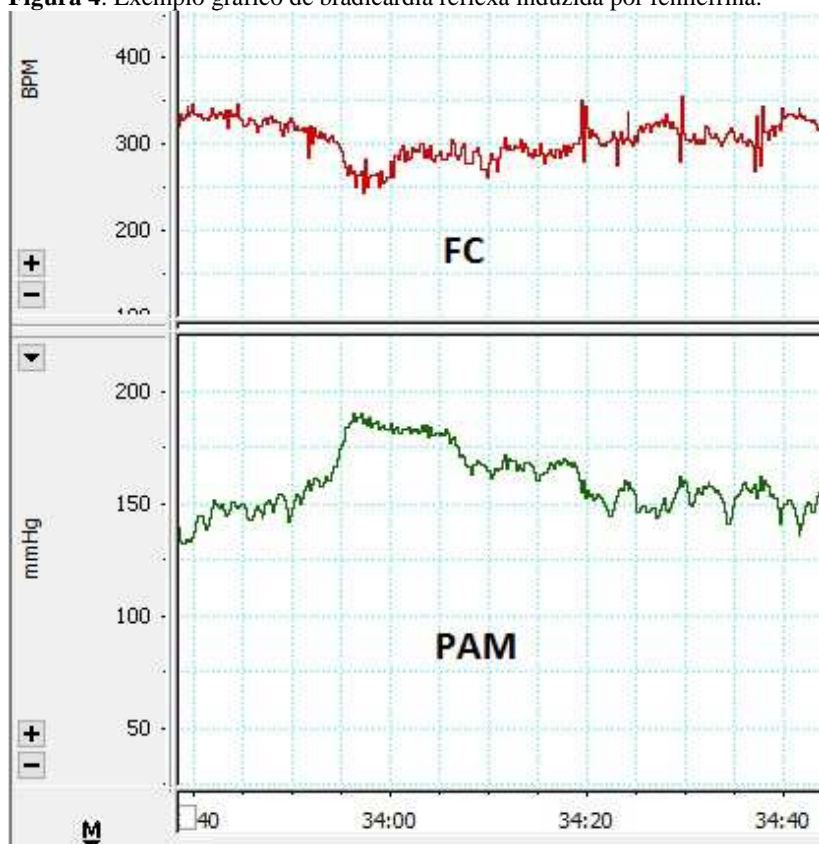
### 3.7.4 Análise do controle barorreflexo da frequência cardíaca

Durante o primeiro dia de registro, após o período basal de 45 minutos, foram realizados os testes para avaliar a resposta da frequência cardíaca e pressão arterial média frente à estimulação dos barorreceptores arteriais por meio de fármacos vasoativos. A administração dos fármacos ocorreu por acesso venoso, por injeções *in bolus* de doses crescentes de fenilefrina (PE 2,4,8,16  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) e nitroprussiato de (NPS 4,8,16,32  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Esses fármacos são frequentemente usados para avaliação da sensibilidade barorreflexa em ratos (Bearler, 2000). O volume das injeções não foi superior a 200  $\mu\text{l}$  por dose, para que não houvesse alteração na resposta pressora por mudanças na volemia do animal. A administração iniciou-se com as doses de fenilefrina de maneira progressiva, seguido pelas doses de nitroprussiato de sódio, também de maneira progressiva. O intervalo de administração entre as doses foi de 3 minutos tempo suficiente para que a frequência cardíaca e a pressão arterial média pudessem voltar aos valores basais.

A diferença entre o período basal e a resposta a cada fármaco para PAM e FC, foi calculada usando o valor máximo ou mínimo das médias adquiridas de 2 em 2 segundos entre o início e fim do efeito dos fármacos menos a média de 10 segundos do período basal anterior a administração dos fármacos. O índice barorreflexo foi então calculado dividindo a diferença do efeito reflexo dos fármacos na FC pela diferença do efeito vasoativo na PAM. A figura 3 a seguir, esquematiza o protocolo de avaliação descrito acima e a figura 4 apresenta um exemplo de sinal gráfico da bradicardia reflexa induzida por fenilefrina enquanto que a figura 5 apresenta um exemplo de sinal gráfico da taquicardia reflexa induzida por nitroprussiato de sódio.

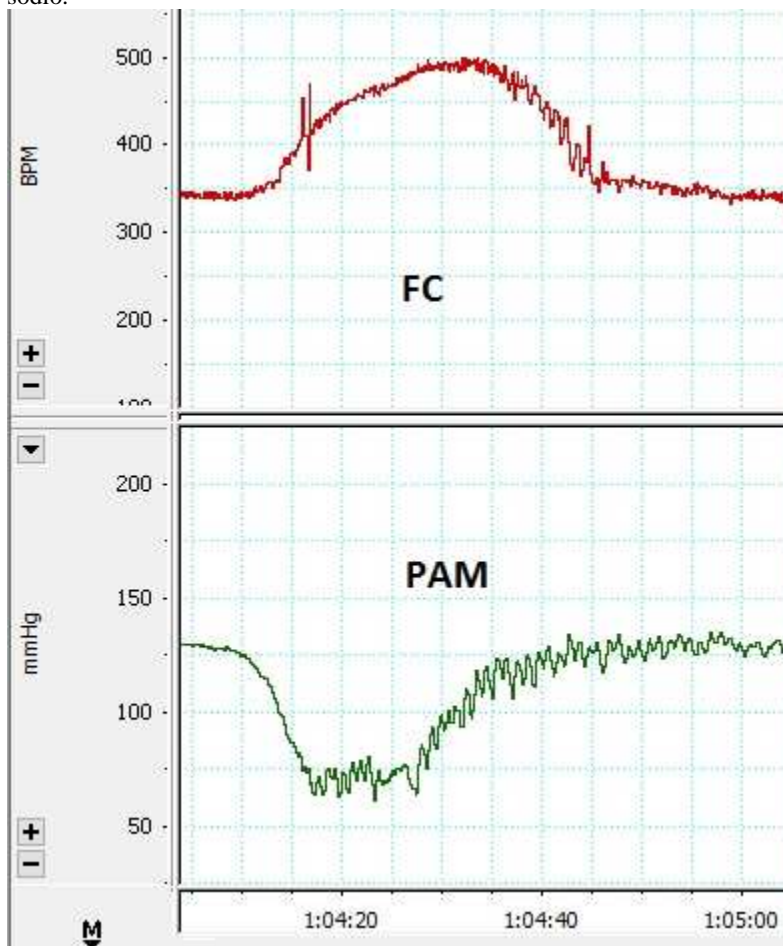
**Figura 3.** Esquema de avaliação da sensibilidade barorreflexa por meio da administração dos fármacos fenilefrina e nitroprussiato de sódio.



**Figura 4.** Exemplo gráfico de bradicardia reflexa induzida por fenilefrina.



**Figura 5.** Exemplo gráfico de taquicardia reflexa induzida por nitroprussiato de sódio.



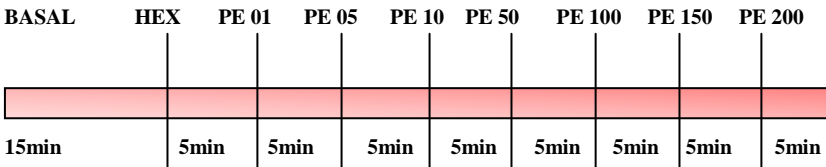
### 3.7.5 Avaliação da atividade simpática vascular e responsividade dos receptores $\alpha$ -1 adrenérgicos

No segundo dia de registro, após 15 minutos de ambientação, foi administrado hexametônio (25mg/kg) de acordo com Nishida, 2012 e esperado 5 minutos para iniciar o protocolo seguinte. A amplitude da alteração da pressão arterial média após administração de hexametônio foi calculada usando a média de 10 segundos do vale da PAM menos o

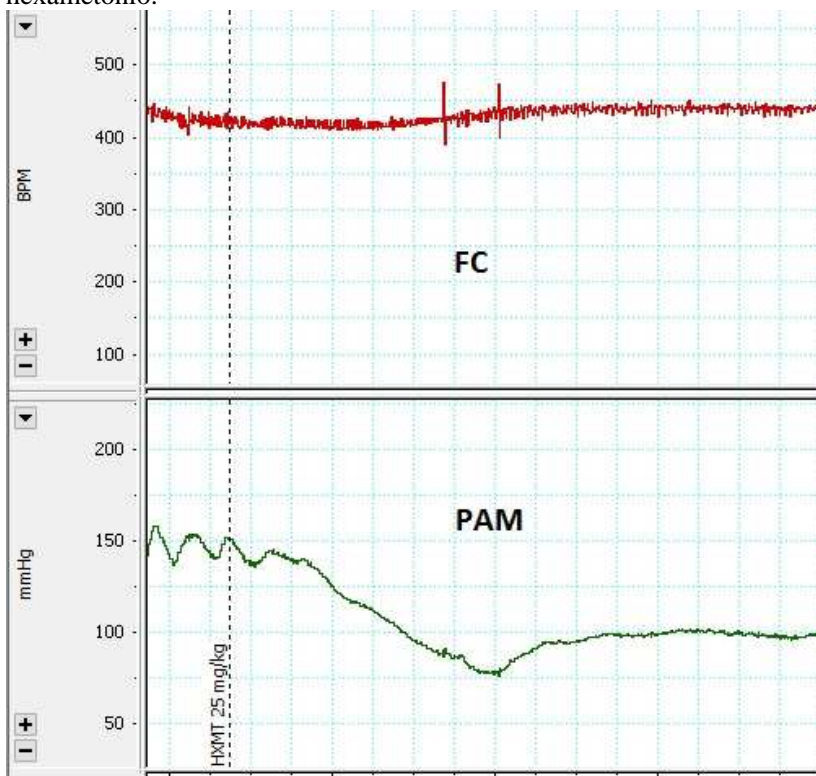
valor basal da média de 10 segundos anterior à aplicação do fármaco. A figura 5 apresenta o sinal gráfico da PAM após administração de hexametônio. Os animais foram submetidos ao protocolo para avaliação da responsividade dos receptores vasculares  $\alpha$ -1 adrenérgicos de acordo com Silva *et al.* (2011). Para isso, 5 minutos após a administração do hexametônio, foram administradas sete doses crescentes de fenilefrina nas concentrações de 1,5,10,50,100,150 e 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  em um volume máximo de 200 microlitros por dose, com um intervalo de 5min entre as doses, tempo suficiente para que a PAM retornasse aos níveis basais antes que a dose seguinte fosse aplicada. Ao término da última dose, o registro foi encerrado e os animais foram anestesiados e encaminhados para perfusão com paraformaldeído e extração de tecidos.

Para calcular a diferença entre o período basal e o valor da PAM após a administração de cada dose, foi usado o valor máximo da resposta pressora evocada pela PE menos a média basal de 10 segundos anteriores a aplicação da mesma. A figura 6 esquematiza o protocolo descrito, a figura 7 apresenta as alterações gráficas na PAM após bloqueio ganglionar e a figura 8 apresenta um exemplo gráfico da avaliação, com 3 doses, embora o protocolo tenha usado sete.

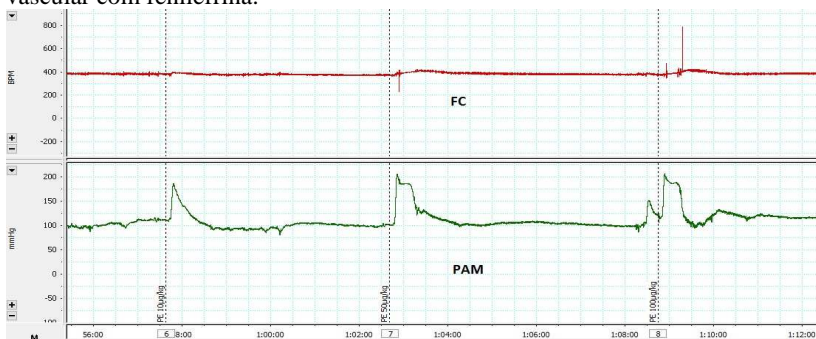
**Figura 6.** Esquema de avaliação da atividade simpática vascular com a administração de hexametônio e o protocolo de avaliação da responsividade dos receptores  $\alpha$ -1 adrenérgicos vasculares pela administração de doses crescentes de fenilefrina.



**Figura 7.** Sinal gráfico da alteração na PAM após administração de hexametônio.



**Figura 8.** Exemplo gráfico da avaliação da responsividade  $\alpha$ -1 adrenérgica vascular com fenilefrina.



### 3.8 Perfusão e extração de órgãos

Após o término dos registros dos parâmetros cardiovasculares, os animais foram anestesiados com uretana (1.3 g/ kg, i.p.), o qual tem sido amplamente utilizado devido ao seu nível estável de longa duração da anestesia com efeitos mínimos sobre os sistemas fisiológicos ( Zheng e Zhang , 2013 ) e foram avaliados os reflexos palpebral, pupilar e interdigital. Com o animal em plano anestésico cirúrgico, foi realizada coleta de sangue intracardíaca e para a coleta de tecidos foi feita uma incisão longitudinal mediana na pele e musculatura, iniciada na região pré-pubiana indo na direção caudo-cranial até o manúbrio. O sangue foi centrifugado a 400G e o plasma armazenado a -20°C.

Auxiliado por uma pinça cirúrgica o esterno foi elevado, e com uma tesoura o diafragma foi perfurado e as costelas cortadas, com o objetivo de expor o coração e realizar a perfusão intracardíaca. O ventrículo esquerdo foi perfurado com uma agulha conectada a um cateter ligado a frascos contendo solução de sacarose (9,25%) heparinizada ou paraformaldeído 4% dissolvido em PBS (0,1 M). Para gerenciar a passagem das soluções, a agulha com o cateter possui um adaptador que permite escolher qual dos líquidos deve passar pela agulha e conseqüentemente para o animal. O adaptador foi aberto somente após pequeno corte no átrio direito do animal, permitindo a passagem de sacarose em uma quantidade suficiente para retirar o sangue dos tecidos do animal ( $\pm 200$  ml). Em seguida, foi interrompida a passagem da sacarose e permitida a passagem de paraformaldeído 4%, até os animais ficarem rígidos ( $\pm 200$  ml).

Posteriormente a perfusão, os órgãos de interesse foram visualizados e identificados. Com o auxílio de uma pinça e uma tesoura, foram removidos na seguinte ordem: ovário esquerdo, ovário direito, adrenal esquerda, adrenal direita e coração e posteriormente pesados. Para remoção do cérebro, o animal já eutanaziado, foi decapitado e com o auxílio de uma tesoura, uma pinça e uma espátula, o cérebro foi removido. Depois da remoção, os órgãos foram identificados, pesados e fixados em PFA 4%, com exceção do cérebro que após 24h de afixação em PFA 4%, foi passado para uma solução de sacarose 30% e mantido refrigerado a uma temperatura de 4 °C pelo período de uma semana, quando então foi imediatamente congelado com nitrogênio líquido e mantido a -80°C para estudos futuros.

### 3.9 Análise estatística

Para análise espectral foram utilizados os registros com estacionaridade regular, além disso, quando apresentaram pequenas irregularidades, os segmentos não-estacionários foram retirados da análise utilizando o software CardioSeries v2.4. Todos os dados foram analisados estatisticamente usando o software Graph Pad Prism 6.0 (San Diego, Ca, EUA). Para todos os parâmetros foi utilizado ANOVA de duas vias com pós teste de *Tukey* no caso de haver interação entre os fatores VCD e estresse, e quando o pós teste não confirmou a diferença, aplicou-se o Teste T de *Student*. Os dados estão apresentados no texto e gráficos como média  $\pm$  erro padrão da média. Para a análise estatística foram retirados os *outliers* de cada grupo e para isso a fórmula Média  $\pm$  2 vezes Desvio Padrão da Média foi aplicada para cada conjunto de dados, e os valores acima do valor máximo dado pela fórmula ou os valores abaixo do valor mínimo dado pela fórmula foram desconsiderados para análise.



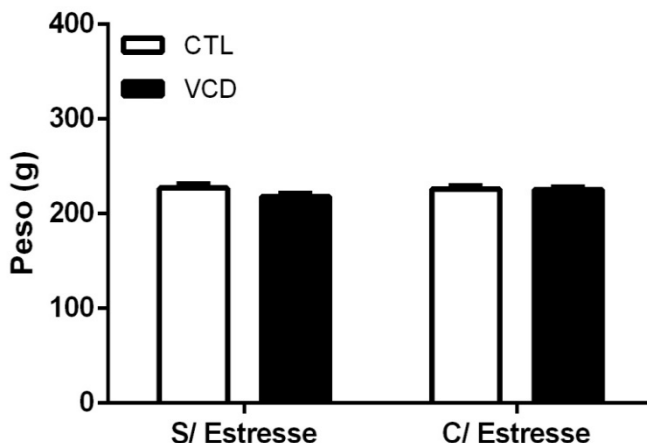
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Resultados avaliados aos 80 dias após a administração de VCD ou óleo (perimenopausa)

#### 4.1.1 Peso corporal e massa ovariana

A massa corporal das ratas estudadas aos 80 dias após administração do VCD ou óleo controle foi similar entre os grupos estudados. A Figura 9 apresenta os gráficos dos valores. (**CTL80 s/ECI**,  $227 \pm 16$  g,  $n=15$ ; **CTL80 c/ECI**,  $228 \pm 15$  g,  $n=17$ ; **VCD80 s/ECI**,  $217 \pm 12$  g,  $n=12$ ; **VCD80 c/ECI**,  $226 \pm 9$  g,  $n=15$ ,  $p < 0,05$ ; Interação:  $F=1,08$ ,  $P=0,30$ ; Estresse:  $F=1,71$ ,  $P=0,19$ ; VCD=  $F=2,45$ ,  $P=0,12$ )

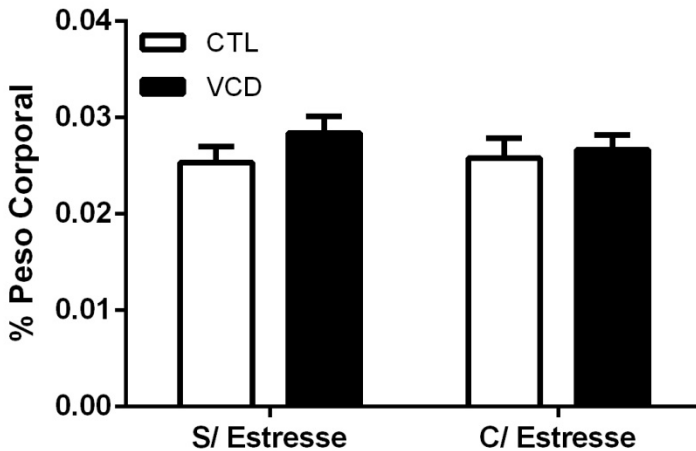
**Figura 9.** Peso corporal (g) dos animais estudados 80 dia após o início do tratamento com VCD ou óleo. Valores expressos como média  $\pm$ epm. Two way ANOVA,  $p < 0,05$ .



O peso relativo dos ovários foi similar entre os grupos estudados (Figura 10). (**CTL80 s/ECI**,  $0,025 \pm 0,005$  %PC,  $n=22$ ; **CTL80 c/ECI**,  $0,026 \pm 0,007$  %PC,  $n=22$ ; **VCD80 s/ECI**,  $0,028 \pm 0,007$  %PC,  $n=22$ ; **VCD80 c/ECI**,  $0,028 \pm 0,007$  %PC,  $n=22$ )

%PC, n=16; **VCD80 c/ECI**,  $0,027 \pm 0,005$  %PC, n=20,  $p < 0,05$ ; Interação:  $F = 0,36$ ,  $P = 0,54$ ; Estresse:  $F = 0,13$ ,  $P = 0,71$ ; VCD=  $F = 1,18$ ,  $P = 0,28$ ).

**Figura 10.** Peso relativo dos ovários dos animais estudados aos 80 dias após o início do tratamento com VCD ou óleo. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Two way ANOVA,  $p < 0,05$ .



#### 4.1.2 Parâmetros cardiovasculares basais

A análise estatística mostrou efeito significativo do estresse sobre os níveis de pressão arterial média (PAM) independente destes terem sido tratados com VCD ou óleo (**CTL80 s/ECI**,  $108 \pm 7$  mmHg, n=10 vs **CTL80 c/ECI**,  $118 \pm 4$  mmHg, n=7; **VCD80 s/ECI**,  $110 \pm 8$  mmHg, n=10 vs **VCD80 c/ECI**,  $119 \pm 8$  mmHg, n=10;  $p < 0,0003$ ; Interação:  $F = 0,05$ ,  $P = 0,82$ ; Estresse:  $F = 6,39$ ,  $P = 0,0003$ ; VCD=  $F = 0,42$ ,  $P = 0,51$ ). Similarmente os níveis basais de pressão arterial sistólica (PAS) também sofreram efeito significativo do estresse, e os grupos submetidos ao protocolo de ECI apresentaram aumento desse parâmetro quando comparados aos grupos não submetidos ao protocolo de ECI (**CTL80 s/ECI**,  $130 \pm 8$  mmHg, n=10 vs **CTL80 c/ECI**,  $146 \pm 8$  mmHg, n=8; **VCD80 s/ECI**,  $132 \pm 9$  mmHg, n=10 vs **VCD80 c/ECI**,  $148 \pm 7$  mmHg, n=8;  $p < 0,0001$ ; Interação:  $F = 0,007$ ,  $P = 0,93$ ; Estresse:  $F = 32,35$ ,  $P = 0,0001$ ; VCD=  $F = 0,38$ ,  $P = 0,54$ ). Já os níveis de pressão arterial diastólica (Interação:  $F = 0,06$ ,  $P = 0,80$ ; Estresse:  $F = 1,35$ ,  $P = 0,25$ ;



VCD= F=0,01, P=0,89) e frequência cardíaca (Interação: F= 2,17, P= 0,14; Estresse: F=0,22, P=0,63; VCD= F=0,003, P=0,95 mantiveram-se comparáveis entre os grupos estudados.

A tabela 1 resume os valores dos parâmetros basais estudados nos animais com 80 dias após o início da administração de VCD ou óleo.

**Tabela 1.** Parâmetros cardiovasculares basais. PAM= Pressão arterial média; PAD= Pressão arterial diastólica; PAS= Pressão arterial sistólica e FC= Frequência cardíaca. @@@ p= 0,0003 e @@@@ p=0,0001, fator estresse, para redução da PAM e PAS, respectivamente, nos grupos expostos ao protocolo de ECI em relação aos grupos que não foram expostos (CTL80 s/ECI vs CTL80 c/ECI , e VCD80 s/ECI vs VCD80 c/ECI). Valores expressos como média ± epm. Two way ANOVA, p<0,05.

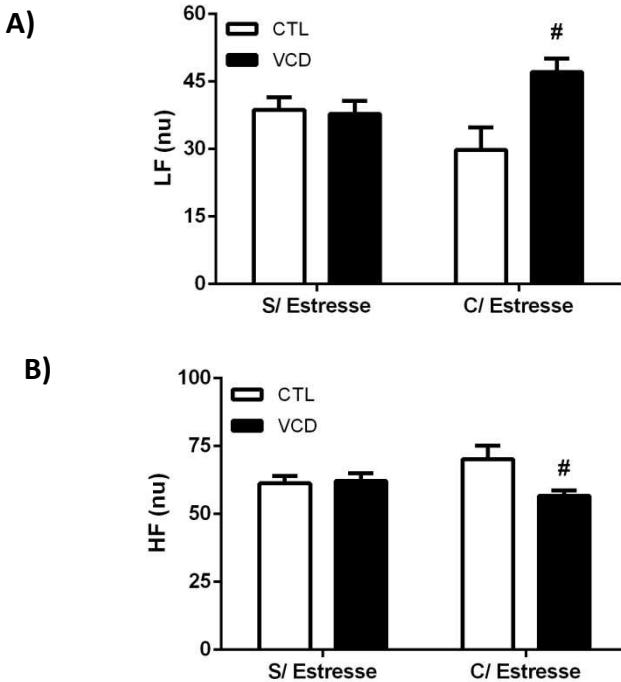
<i>Grupos</i>	<i>PAM (mmHg)</i>	<i>PAD (mmHg)</i>	<i>PAS (mmHg)</i>	<i>FC (bpm)</i>
CTL80 s/ECI	108±6	93±6	130±8	370±34
CTL80 c/ECI	118±4 <sup>@@@</sup>	97±6	146±8 <sup>@@@@</sup>	383±34
VCD80 s/ECI	110±8	94±8	132±9	376±37
VCD80 c/ECI	119±8 <sup>@@@</sup>	97±10	148±7 <sup>@@@@</sup>	362±48

#### 4.1.3 Análise da variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência

Houve interação significativa entre os fatores “tratamento com VCD” e “estresse” sobre a potência espectral da banda de baixa frequência (LF) do intervalo de pulso (IP). Este sofreu aumento significativo no grupo **VCD80 c/ECI** quando comparado ao controle com estresse (47±9 nu, n=9 vs 30±11 nu, n=5), efeito esse não observado na comparação com os outros grupos. (**CTL80 s/ECI**, 39±7, n=7 e **VCD80 s/ECI**, 38±9, n=10). O gráfico A da figura 11 mostra, em unidades normalizadas (nu), a banda LF do IP dos animais estudados aos 80 dias depois do início do tratamento com VCD ou óleo (Interação: F= 7,26, P= 0,01; Estresse: F=0,003, P=0,95; VCD= F=5,88, P=0,02).

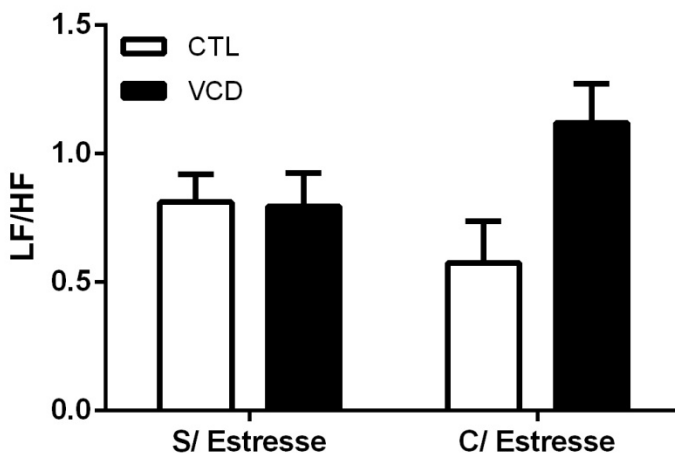
De igual modo, houve interação significativa entre os fatores “tratamento com VCD” e “estresse” sobre a potência espectral da banda de alta frequência (HF) do IP, que teve redução significativo no grupo **VCD80 c/ECI** quando comparado ao seu controle ( $57 \pm 5$  nu,  $n=7$  vs  $70 \pm 11$  nu,  $n=5$ ), diferença essa não observada na comparação com os outros grupos (**CTL80 s/ECI**  $61 \pm 7$ ,  $n=7$  e **VCD80 s/ECI**,  $62 \pm 9$ ,  $n=10$ ). O gráfico B da figura 11 mostra, em unidades normalizadas, a banda HF do IP dos animais estudados aos 80 dias depois do início do tratamento com VCD ou óleo (Interação:  $F= 5,07$ ,  $P= 0,03$ ; Estresse:  $F=0,28$ ,  $P=0,59$ ; VCD=  $F=3,87$ ,  $P=0,06$ ).

**Figura 11.** Potência espectral do intervalo de pulso em banda de baixa (LF; painel A) e alta frequência (HF; painel B), de ratas estudadas aos 80 dias após o início do tratamento com VCD ou óleo. # interação dos fatores  $p=0,03$  para HF e  $p=0,01$  para LF na comparação **VCD80 c/ECI** vs **CTL80 c/ECI**. Valores expressos como média  $\pm$ epm. Two way ANOVA com pós-teste de Tukey,  $p<0,05$ .



O balanço simpato- vagal caracterizado pelos valores da relação LF/HF (CTL80 s/EIC,  $0,81 \pm 0,30$ ,  $n=7$ ; CTL80 c/EIC,  $0,57 \pm 0,37$ ,  $n=5$ ; VCD80 s/EIC,  $0,80 \pm 0,41$ ,  $n=10$ ; VCD80 c/EIC,  $1,12 \pm 0$ ,  $n=9$ ;  $p < 0,05$ ; Interação:  $F= 3,60$ ,  $P= 0,06$ ; Estresse:  $F=0,08$ ,  $P=0,77$ ; VCD=  $F=3,21$ ,  $P=0,08$ ; figura 12) não apresentou diferença significativa, embora o valor de  $p$  para interação entre os fatores tenha sido próximo da significância ( $p=0,06$ ).

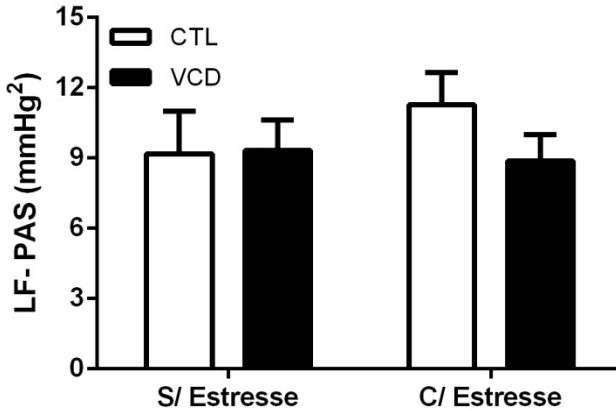
**Figura 12.** Relação LF/HF de ratas estudadas 80 dias após o início do tratamento com VCD ou óleo. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Two way ANOVA,  $p < 0,05$ .



#### 4.1.4 Análise da variabilidade da pressão arterial sistólica

A atividade simpática para vasos, avaliada através da potência espectral da banda de baixa frequência da pressão arterial sistólica (CTL80 s/EIC,  $9,18 \pm 5,16$  mmHg<sup>2</sup>,  $n=8$ ; CTL80 c/EIC,  $11,26 \pm 3,9$  mmHg<sup>2</sup>,  $n=8$ ; VCD80 s/EIC,  $9,33 \pm 3,62$  mmHg<sup>2</sup>,  $n=8$ ; VCD80 c/EIC,  $8,88 \pm 3,36$ ,  $n=9$ ;  $p < 0,05$ ; Interação:  $F= 0,80$ ,  $P= 0,37$ ; Estresse:  $F=0,33$ ,  $P=0,56$ ; VCD=  $F=0,62$ ,  $P=0,43$ . Figura 13), não apresentou diferença significativa entre os grupos estudados.

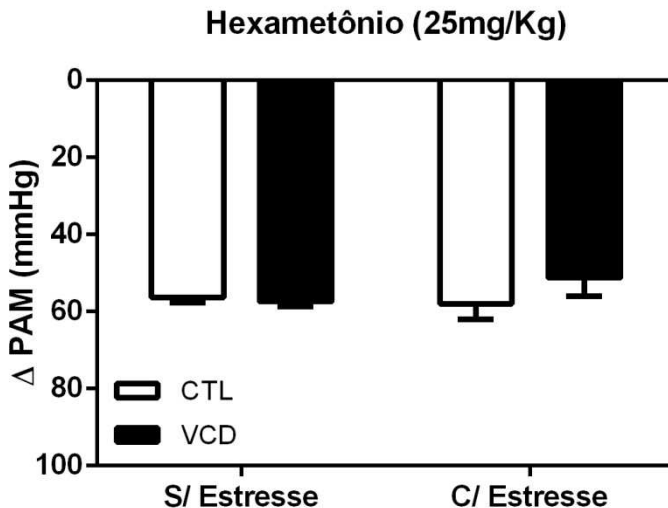
**Figura 13.** Potência do espectro da pressão arterial sistólica em banda de baixa frequência dos animais estudados aos 80 dias após a administração de VCD ou óleo. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Two way ANOVA,  $p < 0,05$ .



#### 4.1.5 Contribuição simpática para vasos

A resposta pressora após a administração do bloqueador ganglionar hexametônio (**CTL80 s/ECI**,  $56 \pm 4$  mmHg,  $n=10$ ; **CTL80 c/ECI**,  $58 \pm 10$  mmHg,  $n=7$ ; **VCD80 s/ECI**,  $57 \pm 4$  mmHg,  $n=11$ ; **VCD80 c/ECI**,  $51 \pm 13$ ,  $n=8$ ;  $p < 0,05$ ; (Interação:  $F = 1,86$ ,  $P = 0,18$ ; Estresse:  $F = 0,98$ ,  $P = 0,44$ ; VCD =  $F = 0,59$ ,  $P = 0,32$ . Figura 14), vista pelo delta da pressão arterial média manteve-se semelhante entre os grupos estudados.

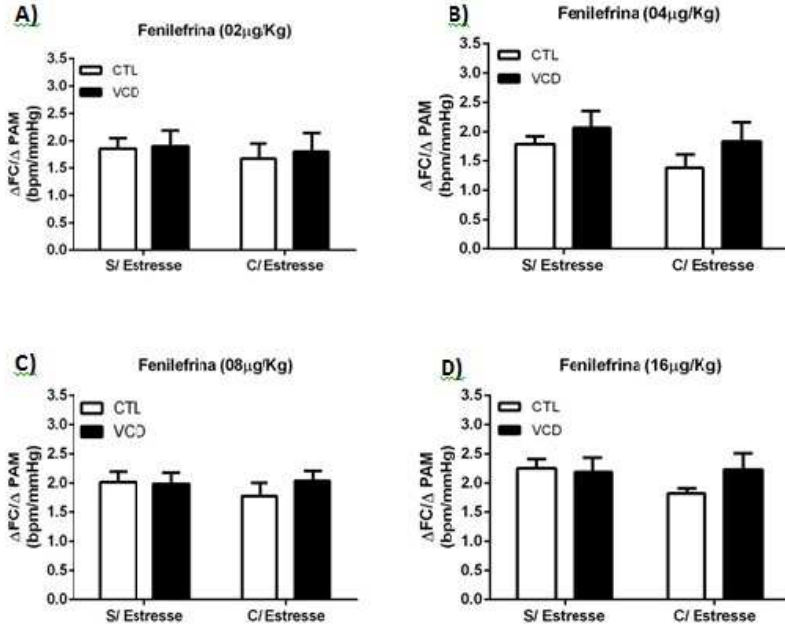
**Figura 14.** Mudanças na pressão arterial média (PAM) produzidas pela injeção i.v. de hexametônio (25 mg/kg). Valores expressos como média  $\pm$  epm. Two wayANOVA,  $p < 0,05$ .



#### 4.1.6 Avaliação da bradicardia e taquicardia reflexa

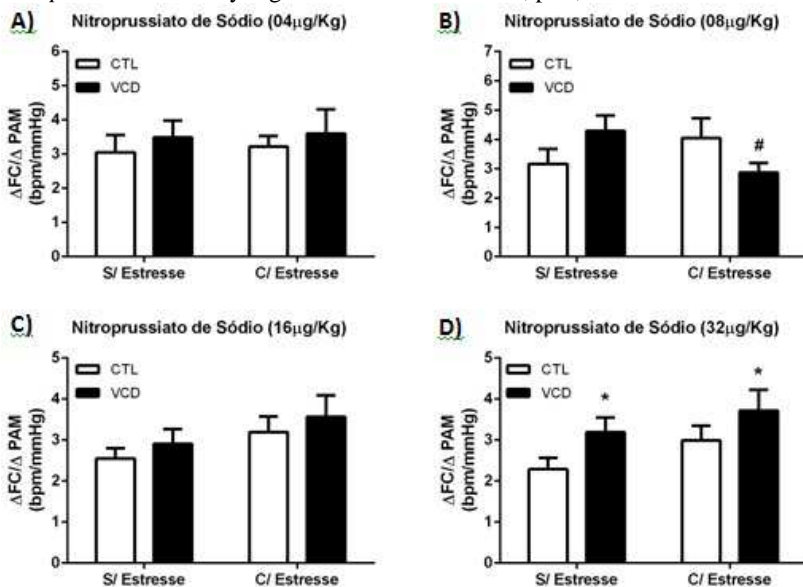
O índice médio de sensibilidade barorreflexa ( $\Delta FC/\Delta PAM$ ) para bradicardia, não apresentou diferença significativa entre os grupos estudados, em nenhuma das doses de fenilefrina administradas. A figura 15 apresenta os gráficos desses valores de acordo com a dose de fenilefrina administrada e a tabela 2 apresenta os valores de F e P da ANOVA.

**Figura 15.** Índice médio de sensibilidade barorreflexa ( $\Delta FC/\Delta PAM$ ) para bradicardia reflexa induzida pela administração de doses crescentes de fenilefrina. PAINEL A (02 $\mu$ g/kg) PAINEL B (04  $\mu$ g/kg), PAINEL C (08  $\mu$ g/kg) e PAINEL D (16  $\mu$ g/kg) em ratas estudadas aos 80 dias após a administração de VCD ou óleo. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Two way ANOVA,  $p < 0,05$ .



O valor do índice médio de sensibilidade barorreflexa para taquicardia ( $\Delta FC/\Delta PAM$ ) provocada por administração de nitroprussiato de sódio na dose de 08  $\mu$ g/kg, apresentou redução significativa no grupo VCD80 c/ECI em relação ao VCD80 s/ECI, mas em outras comparações não houve diferença significativa. Contrariamente, na dose de 32  $\mu$ g/kg o tratamento com VCD aumentou o valor do índice de sensibilidade barorreflexa, independente dos animais terem sido ou não expostos ao protocolo de ECI. As outras doses administradas não causaram diferença significativa no parâmetro avaliado. A figura 16 apresenta os gráficos desses valores de acordo com a dose de nitroprussiato de sódio administrada e a tabela 2 apresenta os valores de F e P da ANOVA.

**Figura 16.** Índice médio de sensibilidade barorreflexa ( $\Delta FC/\Delta PAM$ ) para taquicardia reflexa induzida pela administração de doses crescentes de nitroprussiato de sódio. Painel A (04 $\mu g/kg$ ), painel B (08  $\mu g/kg$ ), painel C (16  $\mu g/kg$ ) e painel D (32  $\mu g/kg$ ) em ratas estudadas aos 80 dias após a administração de VCD ou óleo. \* fator VCD  $p=0,04$  para dose de 32  $\mu g/kg$  na comparação CTL80 s/ECI vs VCD80 s/ECI e CTL80 c/ECI vs VCD80 c/ECI; # interação dos fatores,  $p=0,03$  na comparação entre VCD80 s/ECI e VCD80 c/ECI na dose de 08  $\mu g/kg$ . Valores expressos como média  $\pm$  epm. ANOVA com *pós-teste* de Tukey seguido de Teste T Student,  $p<0,05$ .



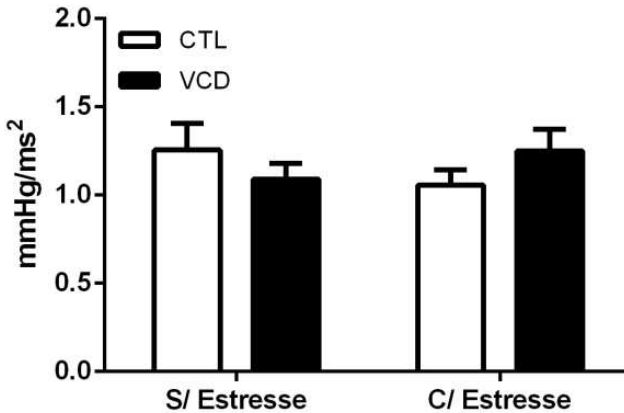
**Tabela 2.** Valores de P e F da ANOVA para taquicardia e bradicardia reflexa induzidas por administrações de Fenilefrina(PE) e Nitroprussiato de Sódio (NPS).

	Interação		Estresse		VCD	
	F	P	F	P	F	P
PE 02	0,02	0,88	0,25	0,62	0,09	0,76
PE 04	0,09	0,75	1,47	0,23	1,89	0,23
PE 08	0,56	0,45	0,24	0,62	0,36	0,54
PE 16	1,12	0,29	0,78	0,38	0,61	0,44
NPS 04	0,002	0,95	0,06	0,80	0,60	0,440
NPS 08	4,87	0,03	0,27	0,60	0,001	0,96
NPS 16	0,0001	0,99	2,80	0,10	0,89	0,35
NPS 32	0,05	0,82	2,48	0,12	4,33	0,04

#### 4.1.7 Análise do barorreflexo espontâneo

A sensibilidade barorreflexa avaliada pelo ganho visto através do método da sequência, utilizando-se séries de três batimentos, manteve-se comparável entre os grupos estudados (**CTL80 s/ECI**,  $1,25 \pm 0,47$  mmHg/ms<sup>2</sup>, n=10; **CTL80 c/ECI**,  $1,05 \pm 0,24$  mmHg/ms<sup>2</sup>, n=8; **VCD80 s/ECI**,  $1,09 \pm 0,29$  mmHg/ms<sup>2</sup>, n=11; **VCD80 c/ECI**,  $1,24 \pm 0,34$  mmHg/ms<sup>2</sup>, n=8, (Interação: F= 2,26, P= 0,14; Estresse: F=0,02, P=0,86; VCD= F=0,01, P=0,91, figura 17).

**Figura 17.** Ganho barorreflexo analisado pelo método da sequência em ratas estudadas aos 80 dias após a administração de VCD ou óleo. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Two way ANOVA,  $p < 0,05$ .

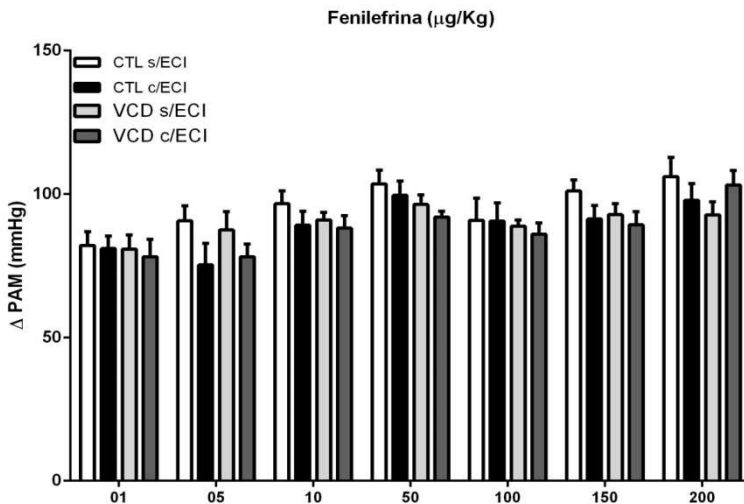


#### 4.1.8 Responsividade dos receptores $\alpha$ -1 adrenérgicos vasculares

A resposta pressora frente à estimulação dos receptores  $\alpha$ -1 adrenérgicos vasculares com doses crescentes de fenilefrina mostrou-se comparável entre os grupos estudados. A figura 18 apresenta esse parâmetro e a tabela 3 mostra os valores de P e F da ANOVA para esse conjunto de dados.



**Figura 18.** Resposta pressora frente à estimulação dos receptores  $\alpha$ -1 adrenérgicos vasculares com doses crescentes de fenilefrina (01, 05, 10, 50, 100, 150 e 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) em animais estudados aos 80 dias após a administração de VCD ou óleo. Two way ANOVA,  $p < 0,05$ .



**Tabela 3.** Valores de P e F da ANOVA para responsividade dos receptores  $\alpha$ -1 adrenérgicos avaliada por administração de Fenilefrina (PE).

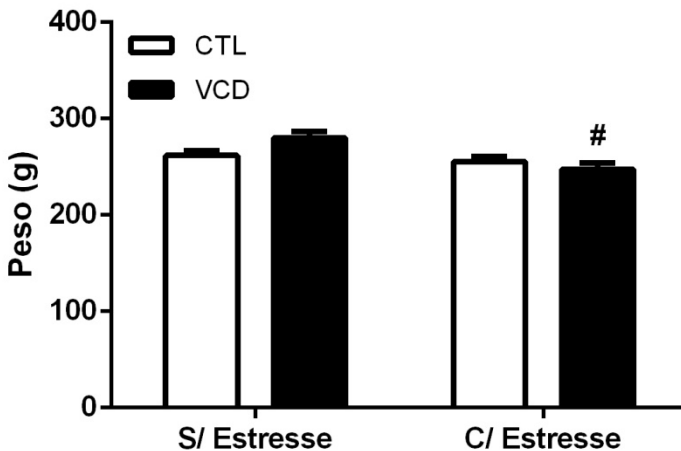
	<i>Interação</i>		<i>Estresse</i>		<i>VCD</i>	
	F	P	F	P	F	P
PE 01	0,23	0,88	0,13	0,71	0,16	0,68
PE 05	0,24	0,62	4,08	0,05	0,0007	0,97
PE 10	0,30	0,58	1,53	0,22	0,63	0,43
PE 50	0,002	0,96	0,97	0,33	3,04	0,09
PE 100	0,04	0,82	0,06	0,79	0,32	0,57
PE 150	0,53	0,47	2,43	0,12	1,44	0,23
PE 200	2,44	0,12	0,03	0,85	0,45	0,50

## 4.2 Resultados avaliados aos 180 dias após a administração de VCD ou óleo (menopausa)

### 4.2.1 Peso corporal e massa ovariana

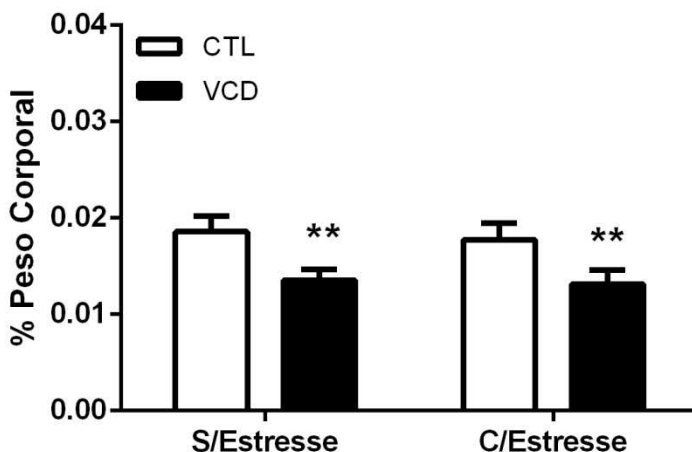
Antes do protocolo cirúrgico para implantação dos cateteres venoso e arterial, foi determinado o peso corporal dos animais. A Figura 19 apresenta a média dos pesos, em gramas, dos grupos. A análise estatística revelou interação significativa entre os fatores “tratamento com VCD” e “estresse” sobre este parâmetro. Houve redução no peso dos animais do grupo **VCD180 c/ECI** quando comparado ao **VCD180 s/ECI** ( $247 \pm 24$ g,  $n=13$  vs  $280 \pm 24$ g,  $n=14$ ,  $p < 0,05$ ), enquanto que os outros grupos mantiveram-se comparáveis (**CTL180 s/ECI**,  $262 \pm 18$  g,  $n=14$ ; **CTL180 c/ECI**,  $255 \pm 20$ g,  $n=16$ ,  $p < 0,05$ ; Interação:  $F= 5,20$ ,  $P= 0,02$ ; Estresse:  $F=11,54$ ,  $P=0,001$ ; VCD=  $F=0,75$ ,  $P=0,39$ ).

**Figura 19.** Peso corporal (g) dos animais estudados 180 dia após o início do tratamento com VCD ou óleo. # interação entre os fatores,  $p=0,02$  redução de peso quando comparado ao VCD180 s/ECI). Valores expressos como média  $\pm$  epm. Two way ANOVA,  $p < 0,05$ .



Logo após o segundo dia de registro dos parâmetros cardiovasculares, os animais foram eutanasiados e seus ovários foram coletados, dissecados e pesados para verificação da ação do VCD sobre a massa ovariana (Figura 20). O peso relativo do tecido reduziu nos grupos tratados com VCD (**CTL180 s/ECI**,  $0,019 \pm 0,006$  %PC,  $n=25$  vs **VCD180 s/ECI**,  $0,014 \pm 0,004$  %PC,  $n=23$ ; **CTL180 c/ECI**,  $0,018 \pm 0,007$  %PC,  $n=23$ , vs **VCD180 c/ECI**,  $0,013 \pm 0,005$  mg,  $n=22$ ,  $p < 0,05$ ; Interação:  $F = 0,02$ ,  $P = 0,87$ ; Estresse:  $F = 0,16$ ,  $P = 0,68$ ; VCD =  $F = 9,70$ ,  $P = 0,003$ ).

**Figura 20.** Peso dos ovários dos animais estudados aos 180 dias após o início do tratamento com VCD ou óleo\*\* fator VCD  $p = 0,0001$  quando comparados aos grupos controles. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Two way ANOVA,  $p < 0,05$ .



#### 4.2.2 Parâmetros cardiovasculares basais

A análise estatística mostrou efeito significativo do estresse sobre os valores basais de pressão arterial média (PAM), os quais mostraram-se aumentados nos grupos submetidos ao protocolo de ECI, independente de terem sido tratados com VCD ou óleo (**CTL180 s/ECI**,  $105 \pm 15$  mmHg,  $n=10$  vs **CTL180 c/ECI**,  $117 \pm 10$  mmHg,  $n=15$ ; **VCD180 s/ECI**,  $109 \pm 7$  mmHg,  $n=09$  vs **VCD180 c/ECI**,  $115 \pm 9$  mmHg,  $n=11$ ;  $p < 0,0003$ ; Interação:  $F = 0,81$ ,  $P = 0,37$ ; Estresse:  $F = 7,47$ ,

P=0,009; VCD= F=0,15, P=0,69). Similarmente os níveis basais de pressão arterial diastólica (PAD) também sofreram efeito do estresse, e os grupos submetidos ao protocolo de ECI apresentaram aumento desse parâmetro quando comparados aos grupos não submetidos ao protocolo de ECI (**CTL180 s/ECI**, 85±12 mmHg, n=10; **CTL180 c/ECI**, 98±10 mmHg, n=9; **VCD180 s/ECI**, 94±6 mmHg, n=9; **VCD180 c/ECI**, 102±10 mmHg, n=11; p<0,05; Interação: F= 0,72, P= 0,40; Estresse: F=12,59, P=0,001; VCD= F=4,53, P=0,03).

Já os níveis de pressão arterial sistólica (Interação: F= 1,14, P= 0,29; Estresse: F=2,69, P=0,10; VCD= F=0,46, P=0,49) e frequência cardíaca (Interação: F= 0,04, P= 0,84; Estresse: F=0,35, P=0,55; VCD= F=1,18, P=0,28) não sofreram efeito do VCD nem do estresse, mantendo-se comparáveis entre os grupos. A Tabela 4 apresenta os níveis médios da PAM, PAS, PAD e FC dos grupos estudados 180 dias após a administração de VCD ou óleo.

**Tabela 4.** Parâmetros cardiovasculares basais. PAM= Pressão arterial média; PAD= Pressão arterial diastólica; PAS= Pressão arterial sistólica e FC= Frequência cardíaca. <sup>@</sup>p= 0,009 para PAM na comparação entre os grupos não expostos ao protocolo de ECI com os expostos. <sup>@@</sup>p=0,001 para PAD na comparação entre os grupos não expostos ao protocolo de ECI com os expostos. Valores expressos como média ± epm. Two way ANOVA, p<0,05

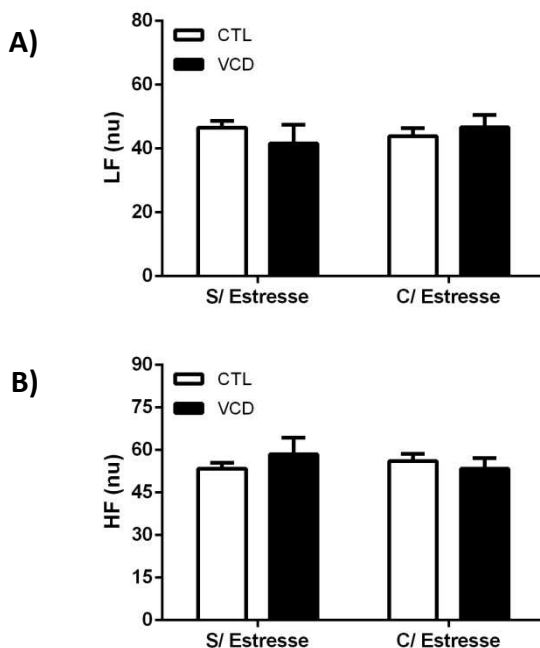
Grupos	PAM (mmHg)	PAD (mmHg)	PAS (mmHg)	FC (bpm)
<b>CTL180 s/ECI</b>	105±14	85±12	130±19	363±9
<b>CTL180 c/ECI</b>	117±10 <sup>@</sup>	98±9 <sup>@@</sup>	142±11	354±44
<b>VCD180 s/ECI</b>	109±6	94±6	138±13	374±51
<b>VCD180 c/ECI</b>	115±8 <sup>@</sup>	102±10 <sup>@@</sup>	140±10	369±22

#### 4.2.3 Análise da variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência

Tanto a banda de baixa frequência (LF) (**CTL180 s/ECI**, 47±7 nu, n=10; **CTL180 c/ECI**, 44±9 nu, n=12; **VCD180 s/ECI**, 42±16 nu, n=7; **VCD180 c/ECI**, 47±12 nu, n=9; p<0,05; Interação: F= 1,23, P= 0,27; Estresse: F=0,11, P=0,73; VCD= F=0,10, P=0,74) quanto a banda

de alta frequência (HF) (**CTL180 s/ECI**,  $53 \pm 7$  nu,  $n=10$ ; **CTL180 c/ECI**,  $56 \pm 9$  nu,  $n=12$ ; **VCD180 s/ECI**,  $56 \pm 16$  nu,  $n=7$ ; **VCD180 c/ECI**,  $53 \pm 12$  nu,  $n=9$ ;  $p < 0,05$ ; Interação:  $F= 1,23$ ,  $P= 0,27$ ; Estresse:  $F=0,11$ ,  $P=0,73$ ; VCD:  $F=0,10$ ,  $P=0,74$ ) do intervalo de pulso (IP) não tiveram diferença significativa entre os grupos. O painel A da figura 21 mostra, em unidades normalizadas (nu), a banda LF do IP dos animais durante a menopausa, enquanto que o painel B mostra, também em unidades normalizadas, os valores da banda HF do IP dos animais estudados durante a menopausa.

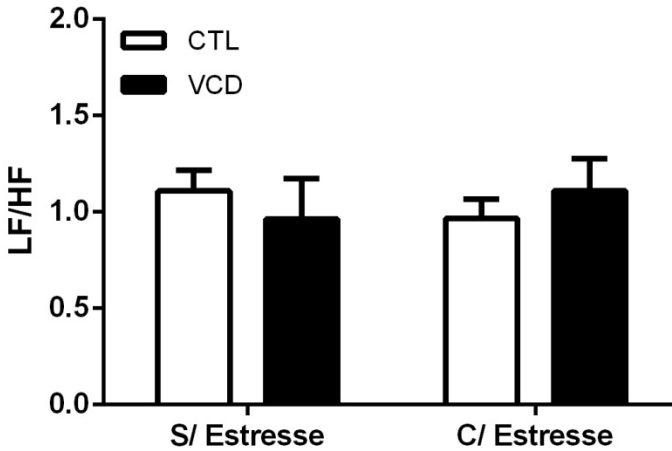
**Figura 21.** Potência espectral do intervalo de pulso em banda de baixa frequência (LF; painel A) e em banda de alta frequência (HF; painel B), de ratas estudadas 180 dias após o início do tratamento com VCD ou óleo. Valores expressos como média  $\pm$  epm .Two way ANOVA,  $p < 0,05$ .



O balanço simpato- vagal (Figura 16), caracterizado pelos valores da relação LF/HF (**CTL180 s/ECI**,  $1,10 \pm 0,33$ ,  $n=10$ ; **CTL180 c/ECI**,  $0,96 \pm 0,34$ ,  $n=12$ ; **VCD180 s/ECI**,  $0,96 \pm 0,55$ ,  $n=7$ ; **VCD180 c/ECI**,  $1,11 \pm 0,49$ ,  $n=9$ ;  $p < 0,05$ ; Interação:  $F= 1,05$ ,  $P= 0,31$ ; Estresse:

F=0,0003, P=0,98; VCD= F=1,54, P=0,99, Figura 22) não apresentou diferença significativa entre os grupos estudados.

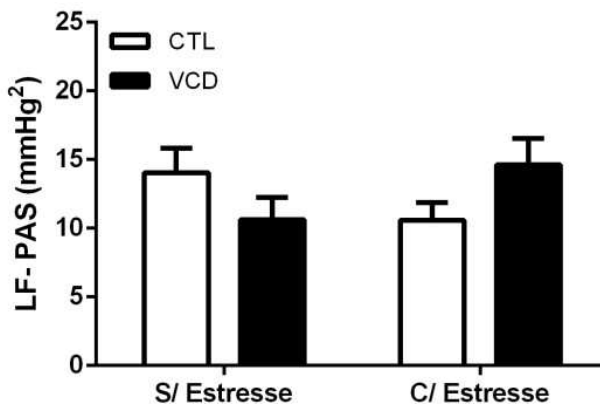
**Figura 22.** Relação LF/HF de ratas estudadas 180 dias após o início do tratamento com VCD ou óleo. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Two way ANOVA,  $p < 0,05$



#### 4.2.4 Análise da variabilidade da pressão arterial sistólica

A atividade simpática para vasos, avaliada através da potência espectral da banda de baixa frequência da pressão arterial sistólica (CTL180 s/ECl,  $14,05 \pm 5,3 \text{ mmHg}^2$ ,  $n=9$ ; CTL180 c/ECl,  $10,58 \pm 4,6 \text{ mmHg}^2$ ,  $n=13$ ; VCD180 s/ECl,  $10,63 \pm 4,90 \text{ mmHg}^2$ ,  $n=9$ ; VCD180 c/ECl,  $14,63 \pm 5,70 \text{ mmHg}^2$ ,  $n=9$ ;  $p < 0,05$ ; Interação:  $F= 5,20$ ,  $P= 0,02$ ; Estresse:  $F=0,02$ ,  $P=0,87$ ; VCD=  $F=0,03$ ,  $P=0,84$  Figura 23), embora, com a análise de variância, tenha apresentado interação significativa entre os fatores ( $p=0,02$ ), o pós teste de Tukey e o test t de *student* não confirmaram essa diferença.

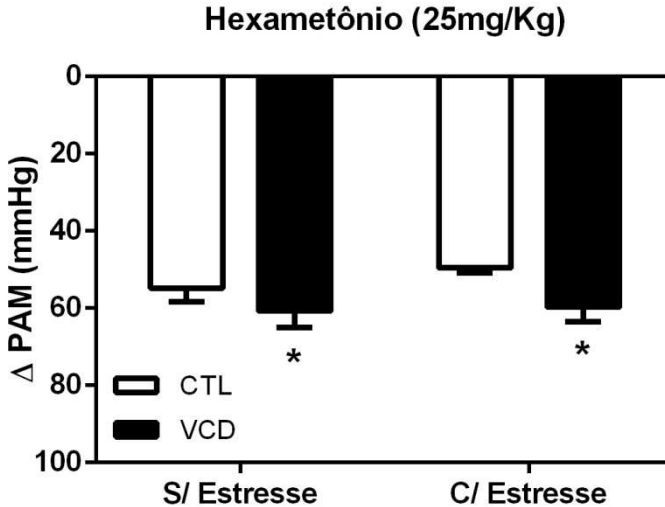
**Figura 23.** Potência do espectro da pressão arterial sistólica em banda de baixa frequência dos animais estudados aos 180 dias após administração de VCD ou óleo Valores expressos como média  $\pm$  epm. Two way ANOVA,  $p < 0,05$ .



#### 4.2.5 Contribuição simpática para vasos

A resposta pressora, após a administração do bloqueador ganglionar hexametônio, apresentou aumento significativo nos animais tratados com VCD, independente de terem sido ou não expostos ao protocolo de ECI, evidenciando o efeito significativo do tratamento com VCD (**CTL180 s/ECI**,  $55 \pm 11$  mmHg,  $n=10$  vs **VCD180 s/ECI**,  $61 \pm 11$  mmHg,  $n=7$ ; **CTL180 c/ECI**,  $50 \pm 4$  mmHg,  $n=13$  vs **VCD180 c/ECI**,  $60 \pm 12$ ,  $n=9$ ;  $p < 0,05$ ; Interação:  $F= 0,48$ ,  $P= 0,49$ ; Estresse:  $F=1,07$ ,  $P=0,30$ ; VCD=  $F=6,64$ ,  $P=0,01$ ; Figura 24).

**Figura 24.** Mudanças na pressão arterial média (PAM) produzidas pela injeção i.v. de hexametônio (25 mg/kg). \*fator VCD,  $p=0,01$  na comparação dos grupos submetidos ao tratamento com VCD em relação aos seus controles. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Two way ANOV,  $p<0,05$ .

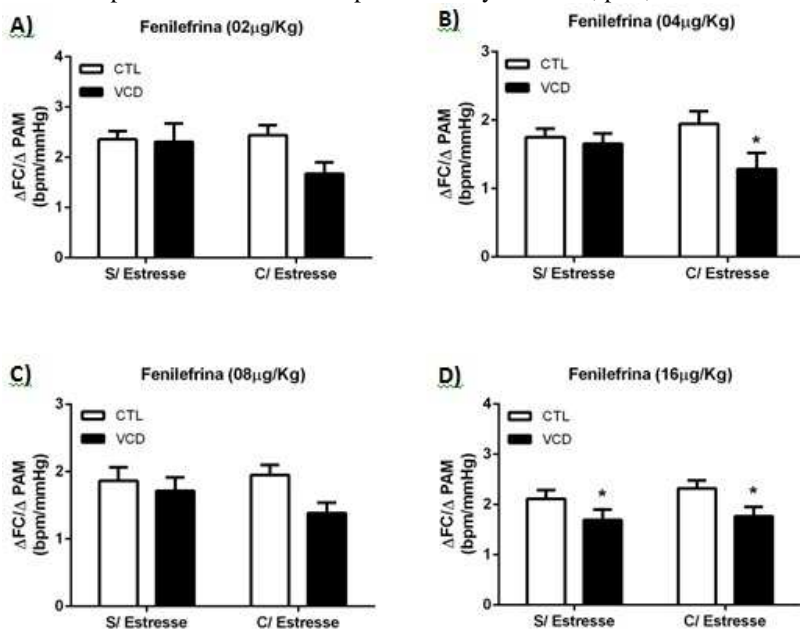


#### 4.2.6 Avaliação da bradicardia e taquicardia reflexa

Houve efeito significativo do tratamento com VCD sobre o índice médio de sensibilidade barorreflexa ( $\Delta FC/\Delta PAM$ ) para bradicardia na dose de  $04\mu\text{g/kg}$  de fenilefrina, que foi reduzido no grupo **VCD180 c/ECI** quando comparado ao seu controle ( $1,28\pm 0,72$  bpm/mmHg,  $n=10$  vs  $1,94\pm 0,67$  bpm/mmHg,  $n=13$ ;  $p>0,05$ ). O mesmo ocorreu na dose de  $16\mu\text{g/kg}$  nos grupos tratados com VCD, independente de terem sido expostos ao protocolo de ECI (**CTL180 s/ECI**,  $2,11\pm 0,17$  bpm/mmHg,  $n=11$  vs **VCD180 s/ECI**,  $1,69\pm 0,20$  bpm/mmHg,  $n=9$ ; **CTL180 c/ECI**,  $2,32\pm 0,15$  bpm/mmHg,  $n=14$  vs **VCD180 c/ECI**,  $1,77\pm 0,18$  bpm/mmHg,  $n=10$ ;  $p<0,05$ ). A figura 25 apresenta os gráficos desses valores e a tabela 5 apresenta os valores de F e P da ANOVA.

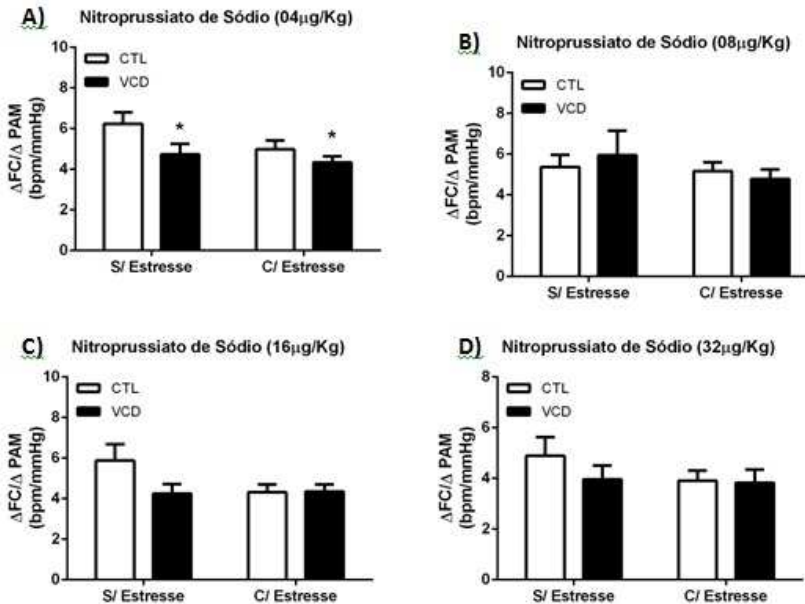


**Figura 25.** Índice médio de sensibilidade barorreflexa ( $\Delta FC/\Delta PAM$ ) para bradicardia reflexa induzida pela administração de doses crescentes de fenilefrina. PAINEL A (02  $\mu g/kg$ ) PAINEL B (04  $\mu g/kg$ ), PAINEL C (08  $\mu g/kg$ ) e PAINEL D (16  $\mu g/kg$ ) em ratas estudadas aos 180 dias após a administração de VCD ou óleo. \* fator VCD,  $p=0,04$  na dose de 04  $\mu g/kg$  na comparação VCD c/ECI vs CTL c/ECI; \*fator VCD,  $p=0,01$  na dose de 16  $\mu g/kg$  na comparação dos grupos submetidos ao tratamento com VCD em relação aos seus controles. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Two way ANOVA,  $p<0,05$ .



Houve efeito significativo do tratamento com VCD, mas não do estresse ou interação entre os dois fatores quando avaliamos o índice médio de sensibilidade barorreflexa para taquicardia ( $\Delta FC/\Delta PAM$ ) provocada por administração de nitroprussiato de sódio na dose de 04  $\mu g/kg$ . Houve redução significativa nos grupos tratados com VCD em relação aos seus controles, independente de terem sido ou não expostos ao protocolo de ECI (CTL180 s/ECI,  $6,23 \pm 1,80$  bpm/mmHg,  $n=10$  vs VCD180 s/ECI,  $4,73 \pm 1,64$  bpm/mmHg,  $n=10$ ; CTL180 c/ECI,  $4,99 \pm 1,64$  bpm/mmHg,  $n=15$  vs VCD180 c/ECI,  $4,34 \pm 0,90$  bpm/mmHg,  $n=9$ ;  $p<0,05$ ). A figura 26 apresenta os gráficos desses valores e a tabela 5 apresenta os valores de F e P da ANOVA.

**Figura 26.** Valores do índice médio de sensibilidade barorreflexa ( $\Delta FC/\Delta PAM$ ) para taquicardia reflexa induzida pela administração de doses crescentes de nitroprussiato de sódio (04, 08, 16 e 32  $\mu g/kg$ ) em ratas estudadas aos 80 dias após a administração de VCD ou óleo. \* fator VCD,  $p=0,03$  na dose de 04  $\mu g/kg$  na comparação dos grupos submetidos ao tratamento com VCD em relação aos seus controles. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Two way ANOVA,  $p<0,05$ .



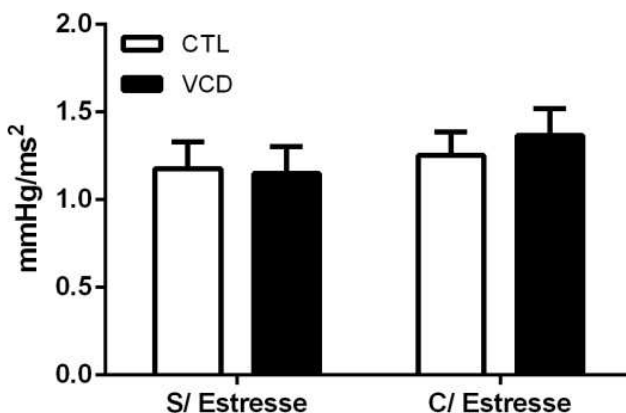
**Tabela 5.** Valores de P e F da ANOVA para taquicardia e bradicardia reflexa induzidas por administrações de Fenilefrina(PE) e Nitroprussiato de Sódio (NPS).

	Interação		Estresse		VCD	
	F	P	F	P	F	P
PE 02	2,17	0,14	1,29	0,26	2,82	0,10
PE 04	2,40	0,12	0,23	0,63	4,29	0,04
PE 08	1,37	0,24	0,47	0,49	4,00	0,05
PE 16	0,13	0,71	0,61	0,43	7,29	0,01
NPS 04	0,78	0,38	2,91	0,09	5,00	0,03
NPS 08	0,45	0,50	0,88	0,35	0,01	0,89
NPS 16	2,52	0,12	1,99	0,16	2,35	0,13
NPS 32	0,59	0,44	1,02	0,31	0,81	0,37

#### 4.2.7 Análise do barorreflexo espontâneo

A sensibilidade barorreflexa avaliada pelo ganho visto através do método da sequência, utilizando-se séries de três batimentos, manteve-se comparável entre os grupos estudados (**CTL180 s/ECI**,  $1,18 \pm 0,43$  mmHg/ms<sup>2</sup>, n=8; **CTL180 c/ECI**,  $1,25 \pm 0,51$  mmHg/ms<sup>2</sup>, n=15; **VCD180 s/ECI**,  $1,15 \pm 0,43$  mmHg/ms<sup>2</sup>, n=8; **VCD180 c/ECI**,  $1,37 \pm 0,51$  mmHg/ms<sup>2</sup>, n=11; ; Interação: F= 0,20, P= 0,65; Estresse: F=0,88, P=0,35; VCD= F=0,07, P=0,78, figura 27).

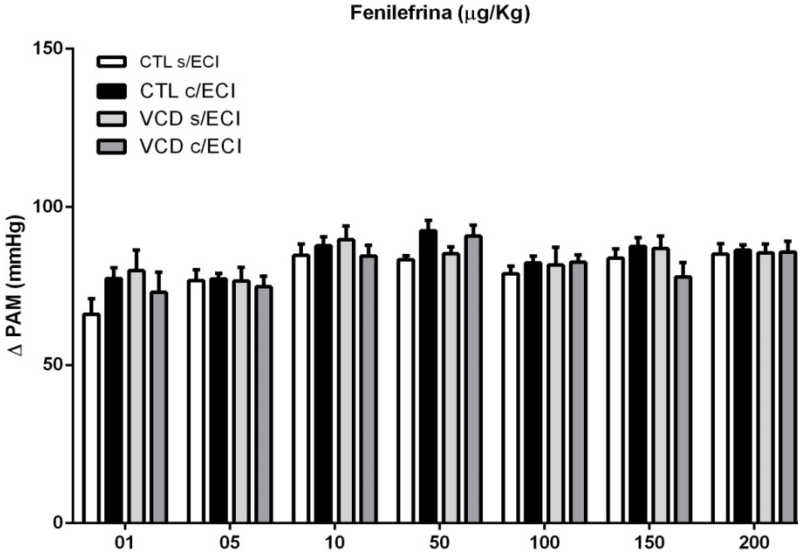
**Figura 27.** Ganho barorreflexo avaliado pelo método da sequência em ratos estudadas aos 180 dias após a administração de VCD ou óleo. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Two way ANOVA,  $p < 0,05$ .



#### 4.2.8 Responsividade dos receptores $\alpha$ -1 adrenérgicos vasculares

A resposta pressora frente à estimulação dos receptores  $\alpha$ -1 adrenérgicos vasculares com doses crescentes de fenilefrina mostrou-se semelhante entre os grupos estudados. A figura 28 apresenta esse parâmetro e a tabela 6 apresenta os valores de F e P da ANOVA para esse conjunto de dados.

**Figura 28.** Resposta pressora frente à estimulação dos receptores  $\alpha$ -1 adrenérgicos vasculares com doses crescentes de fenilefrina (01, 05, 10, 50, 100, 150 e 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Valores expressos como média  $\pm$  epm. Two way ANOVA,  $p < 0,05$ .



**Tabela 6.** Valores de P e F da ANOVA para responsividade dos receptores  $\alpha$ -1 adrenérgicos avaliada por administração de Fenilefrina (PE).

	<i>Interação</i>		<i>Estresse</i>		<i>VCD</i>	
	F	P	F	P	F	P
PE 01	3,10	0,08	0,18	0,66	0,83	0,36
PE 05	0,13	0,71	0,03	0,84	0,14	0,70
PE 10	1,22	0,27	0,08	0,77	0,05	0,81
PE 50	1,87	0,17	0,0006	0,97	2,11	0,15
PE 100	0,12	0,72	0,35	0,55	0,17	0,68
PE 150	3,21	0,08	0,54	0,46	0,86	0,35
PE 200	0,02	0,86	0,07	0,7	0,0005	0,98

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Animais estudados 80 dias após tratamento com VCD

Nossos resultados demonstraram que aos 80 dias após o início do tratamento com VCD ou óleo, período cujas variações hormonais são similares àquelas que ocorrem na perimenopausa, as ratas submetidas às sessões de ECI apresentaram aumento da PAM e PAS, sem alterações na PAD e FC. Além disso, animais previamente tratados com VCD quando expostos ao ECI apresentaram disautonomia caracterizada por predomínio de atividade simpática e redução no tônus vagal para o coração, como visto pela análise espectral. Por outro lado, a atividade barorreflexa não esteve comprometida por nenhum dos fatores estudados, falha ovariana ou estresse, assim como não houve alteração na participação simpática para o tônus vascular. Além disso, a contribuição adrenérgica via receptor alfa-1 para o tônus vascular, avaliada pela administração de doses crescentes do agonista fenilefrina, manteve-se semelhante entre os grupos estudados. É importante lembrar que, apesar do presente trabalho não apresentar dosagens hormonais dos animais estudados e das ratas tratadas com VCD não terem apresentado uma redução significativa da massa ovariana neste período de 80 dias após o tratamento, dados da literatura utilizando o mesmo modelo mostram que os níveis séricos de estradiol ainda não estão em declínio neste período de 80 dias após o tratamento com VCD (Reis *et al.*, 2014). Entretanto, estes mesmos autores demonstraram alterações nas secreções de outros hormônios ovarianos neste período de 80 dias que são semelhantes às alterações endócrinas encontradas em mulheres na perimenopausa (Lukefahr *et al.*, 2012, Reis *et al.*, 2014) e que podem afetar o controle do sistema cardiovascular.

A hipertensão observada em nosso estudo após o ECI tem sido demonstrada em outros trabalhos que avaliam os efeitos do estresse sob o sistema cardiovascular, tanto em fêmeas quanto em machos, sobretudo sobre a pressão arterial (Timio *et al.*, 1999; Chia, Xun-Mei *et al.*, 2008; Du, D. *et al.*, 2013). Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da hipertensão induzida pelo estresse são amplamente investigados, sendo que a participação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) e a atividade simpática estão intimamente implicadas nos processos que envolvem riscos cardiovasculares. (Ritchie *et al* 1990; Rozanski *et al.*, 1999;)

Estudos demonstram a presença de estimulação simpática significativa em animais submetidos ao estresse crônico e agudo (Everson-Rose *et al.*, 2014), com liberação de aminas biogênicas pelas adrenais e terminações simpáticas, marcadamente adrenalina e noradrenalina (Esler *et al.*, 1989; Rumantir *et al.*, 2000) as quais possuem efeito constritor sobre a vasculatura e efeito cronotrópico e ionotrópico positivo para o coração, contribuindo assim para o aumento do risco de desenvolver doenças cardiovasculares.

A participação do SRAA também possui papel importante no desenvolvimento da hipertensão induzida por estresse (DiBona, 2000). Dados da literatura apontam aumento na renina plasmática e subsequente aumento na produção de angiotensina-II após ativação do sistema nervoso simpático (Kirchheim *et al.*, 1989; Kopp e DiBona, 2000). Sabendo do papel hipertensivo do SRAA e do aumento da atividade do mesmo em situações de estresse, a contribuição deste parece estar fortemente ligada ao desenvolvimento da hipertensão induzida pelo estresse.

Outros sistemas também parecem estar envolvidos no quadro hipertensivo durante situações em que o cortisol está elevado, como é o caso de fatores vasoconstritores como a arginina vasopressina, tromboxano e endotelina que estão elevados em humanos com síndrome de cushing ou saudáveis que foram submetidos ao tratamento com cortisol (Fimognari *et al* 1996; Kirilov *et al* 2003; Giuditta *et al* 2004). Há evidência da redução na participação de fatores vasodilatadores como o sistema caliceína-quinina, prostanóides, peptídeo natriurético atrial e o óxido nítrico (Yamaji *et al* 1988; Saruta 1996; Whitworth *et al* 2000) que podem contribuir para o desenvolvimento de hipertensão, porém todos estes mecanismos ainda precisam de investigações mais detalhadas.

Além disso, alguns estudos têm reportado diferenças na ativação do SRAA entre os sexos, sendo que Rands e colaboradores (2012) mostraram que a ativação intrarrenal do SRAA é maior em machos do que em fêmeas, e isso se deve, em parte, ao papel dos esteroides sexuais na modulação desse sistema. Em machos, a castração reduz a atividade intrarrenal do SRAA, sugerindo um papel importante dos andrógenos na regulação do mesmo (Reckelhoff, 1999). No que diz respeito ao papel dos esteroides sexuais femininos, os estrógenos reduzem a ação de vários componentes do SRAA (Chappell, 2008). Além disso, outros estudos tem demonstrado que os estrógenos tem capacidade de modular a expressão de elementos não clássicos do SRAA, tendo assim papel importante no balanço vasoconstritor-

vasodilatador deste sistema (Brosnihan *et al.*, 1997; Ji *et al.*, 2008), e contribuindo para os menores níveis de pressão arterial em fêmeas.

A ativação do sistema nervoso autônomo após situações estressantes é observada em ambos os sexos, contudo, importantes diferenças sexuais são encontradas em diversos pontos do eixo hipotálamo hipófise adrenal, compreendendo as aferências ao núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), neuromodulação dos neurônios CRH e a proporção de ativação da esteroidogênese pelo córtex das glândulas adrenais (Handa *et al.*, 1994; Goel; Bale, 2008). Essas diferenças são, em grande parte, impulsionadas por alterações hormonais que ocorrem ao longo do período de desenvolvimento e maturação do organismo, contribuindo assim, para as diferenças sexuais na resposta ao estresse ao longo da vida (Walker *et al.*, 1986).

Considerando estas diferenças sexuais na resposta ao estresse, um estudo com camundongos avaliou a atividade simpática após administração de angiotensina II e no sétimo dia de administração, fêmeas apresentaram menor redução da pressão arterial após bloqueio ganglionar, quando comparadas aos machos (Xu *et al.*, 2005). Para testar o papel dos esteroides ovarianos no controle autonômico simpático em fêmeas, outro estudo as submeteu à ovariectomia e observou maior redução da PA após bloqueio ganglionar quando comparadas as fêmeas intactas, sugerindo assim, um papel importante dos esteroides ovarianos na manutenção de uma menor contribuição simpática nas fêmeas (Xu *et al.*, 2007).

Além disso, os esteróides ovarianos, principalmente o estradiol, exercem papel modulatório sobre diversos núcleos centrais de controle autonômico, como a área postrema, um núcleo circunventricular do rombencéfalo envolvido na regulação neuro-humoral da atividade simpática (Bishop, Hay, 1993), e o núcleo do trato solitário (NTS), um importante núcleo de controle do barorreflexo que expressa tanto os receptores para estradiol do subtipo alfa ( $ER\alpha$ ), quanto os do subtipo beta ( $ER\beta$ ) (Vanderhorst *et al.*, 2005; Spary *et al.*, 2010). A modulação pelo estradiol no bulbo ventrolateral rostral, um núcleo de regulação autonômica, foi demonstrada por um estudo onde, ao serem ativadas, os receptores para estradiol preveniram a hipertensão induzida por aldosterona (Xu *et al.* 2013). O PVN, importante núcleo integrador de respostas ao estresse e funções cardíacas também sofre influências dos estrógenos, sendo que o subtipo  $ER\beta$  é predominantemente expresso neste núcleo (Grassi *et al.* 2013).

Durante a perimenopausa, período que se inicia na transição para a menopausa e termina 12 meses após o fim do último ciclo

menstrual (Harlow *et al.*, 2012), o organismo experimenta alterações metabólicas e endócrinas, (Bromberger *et al.*, 2001; Freeman *et al.*, 2008; Prior and Hitchcock, 2011) decorrentes do início das irregularidades nos ciclos menstruais e subsequentes alterações nas secreções ovarianas (Burger *et al.*, 1995; Santoro *et al.*, 1996). Durante essa transição, os ovários ficam menos sensíveis a estimulação das gonadotropinas, o que pode levar a alterações nos níveis séricos de estradiol e progesterona (Reyes *et al.*, 1977).

Um estudo recente mostrou que a administração crônica de estradiol no órgão subfornical, núcleo com projeções diretas para o PVN, reduz a atividade neuronal bem como o efeito excitatório da angiotensina II nessa área (Ciriello, Roder, 2013). O PVN por sua vez, também expressa receptores ER $\beta$  (Chung *et al.*, 2007), e estudo usando *siRNA-knockdown* para ER $\beta$  no PVN aponta que a supressão da expressão desse receptores promove aumento na hipertensão induzida por aldosterona. Isto sugere que o ER $\beta$  seja parcialmente responsável pela proteção dos efeitos centrais da aldosterona e do aumento da atividade simpática em fêmeas (Xue *et al.*, 2013). Além disso, um estudo mostrou redução na expressão de mRNA para ER $\beta$  no PVN de ratas ovariectomizadas, sugerindo assim que esse possa mediar a inibição da resposta do eixo HHA no PVN pelos estrógenos. (Weiser e Handa, 2009; Liu *et al.*, 2011).

Estudos sobre a participação da progesterona no controle autonômico cardíaco são escassos e controversos. Genazzani e colaboradores (2000) associaram à progesterona o aumento na liberação de norepinefrina e uma consequente ativação simpática neuronal. Além disso, com exceção da drospirenona (Archer, 2007, White *et al.*, 2008), as progestinas sintéticas possuem pouco ou nenhum efeito sobre a regulação da pressão arterial em mulheres [para revisão: (Cannoletta & Cagnacci, 2014)]. Outro estudo mostrou que não há relação entre os níveis de progesterona e o tônus autonômico cardíaco em mulheres e homens (Ramesh *et al.*, 2014).

Por outro lado, estudos apontam para um efeito cardioprotetor dos progestágenos. A drospirenona, por exemplo, age como antagonista no receptor de aldosterona, proporcionando efeitos hipotensivos por meio da redução da retenção hidrosalina (Mallareddy *et al.*, 2007; White, 2007). Além disso, foi demonstrado que a ativação dos receptores de aldosterona, presentes em diversos órgãos como coração, vasculatura e cérebro, induz alterações estruturais e funcionais desses órgãos, tais como fibrose miocárdica, remodelamento cardíaco, aumento na pressão glomerular e estresse oxidativo (McMahon,



2001;Conlin, 2005), podendo causar danos no órgãos envolvidos. A progesterona endógena, assim como a drospirenona, tem afinidade pelos receptores mineralocorticoides, promovendo antagonismo das ações da aldosterona, induzindo a excreção hídrica e salina, podendo contribuir para o papel cardioprotetor da progesterona (Elger *et al.*, 2003; Pollow *et al.*, 2005).

Adicionalmente aos efeitos antiaterogênicos da progesterona, Smiley e Khalil (2009) mostraram efeito similar ao dos estrógenos no que diz respeito ao seu efeito antiaterogênico, com redução nas lipoproteínas de baixa densidade e aumento nas lipoproteínas de alta densidade. Além disso, um estudo usando células da veia umbilical de humanos mostrou que a progesterona aumenta a biossíntese do óxido nítrico (Simoncini *et al.*, 2004). Considerando-se todas estas ações benéficas da progesterona sobre diferentes níveis do sistema cardiovascular, pode-se inferir que a redução na concentração de progesterona nas fêmeas VCD, já demonstrada por Reis e colaboradores (2014), possa ter contribuído para os efeitos deletérios no sistema cardiovascular das ratas submetidas ao tratamento com VCD no presente estudo.

Além dos esteroides ovarianos clássicos, os androgênios podem influenciar no controle autonômico cardíaco. Embora haja poucos estudos sobre a influência destes no tônus autonômico cardiovascular, um trabalho demonstrou associação positiva entre os níveis totais de testosterona e atividade parassimpática, bem como, associação negativa entre os níveis de testosterona e atividade simpática (Dogru *et al.*, 2010). Em relação ao papel que os androgênios exercem sobre a pressão arterial, alguns estudos demonstram que homens hipertensivos apresentam baixos níveis circulantes de testosterona e androstenediona, sugerindo que a redução na concentração de androgênios tenha papel hipertensivo (Hughes *et al.*, 1989). Por outro lado, alguns dados demonstram que a testosterona tem um efeito pro-hipertensivo. Quando comparada a pressão de perfusão renal de ratos SHR castrados e ratas ovariectomizadas, ambos recebendo testosterona exógena apresentam redução da natriurese quando comparados a ratos castrados, fêmeas ovariectomizadas e fêmeas intactas (Reckelhoff *et al.*, 1998; Reckelhoff e Granger, 1999)

Reis e colaboradores (2014) demonstraram redução dos níveis séricos de progesterona, testosterona e di-hidrotestosterona em fêmeas tratadas com VCD e estudadas durante a perimenopausa. Considerando o perfil hormonal do modelo utilizado em nosso estudo, podemos sugerir que tanto a redução dos níveis séricos de androgênios quanto de

progesterona, possam ter contribuído para o aumento no tônus simpático e redução no tônus vagal encontrado nas ratas submetidas à falha ovariana e estresse, concomitantemente.

Considerando-se que dados da literatura mostram que 80 dias após a administração de VCD as ratas apresentam flutuações significativas na secreção dos hormônios ovarianos, sem necessariamente haver declínio dos níveis séricos de estradiol (Lukefahr *et al.*, 2012, Reis *et al.*, 2014), o conjunto de nossos resultados leva a inferir que a disautonomia cardiovascular encontrada no presente estudo, sem que isso leve a hipertensão, seja, pelo menos em parte, devido às flutuações hormonais decorrentes da transição para menopausa.

O declínio da dilatação mediada pelo fluxo (Bechlioulis *et al.*, 2010), aumento da rigidez arterial (Zaydun *et al.*, 2006) e alterações no controle autonômico vascular (Huikuri *et al.*, 1996) ocorrem durante fases precoces da menopausa. A sensibilidade barorreflexa, ou seja, a capacidade de manter a pressão arterial em níveis médios frente a estímulos pressores ou depressores, é considerada uma ferramenta já estabelecida para avaliar a função autonômica cardiovascular. O comprometimento do barorreflexo está associado com aumento na mortalidade devido a complicações cardiovasculares (Kleiger *et al.*, 1987; La Royere *et al.*, 1987) e este já foi descrito durante a menopausa, tanto em humanos (Kim *et al.*, 2010) como em modelos animais (Morey *et al.*, 1997). Contudo, há poucos dados na literatura que avaliem esse parâmetro durante a transição para a menopausa.

O presente estudo é o primeiro a avaliar a função barorreflexa em ratas em um modelo de perimenopausa, o que foi possível graças à utilização do modelo de falha ovariana induzida pelo VCD, que leva a depleção gradativa dos folículos ovarianos, assim como ocorre na transição para menopausa em mulheres. Avaliada por meio de fármacos vasoativos, a bradicardia reflexa apresentou respostas distintas entre as doses de 08 e 32  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de nitroprussiato de sódio e a taquicardia reflexa não se mostrou alterada em nenhuma das doses de fenilefrina administradas. Sendo assim, a função barorreflexa parece estar inalterada entre os grupos estudados. Essa metodologia é amparada pelo resultado nulo na análise barorreflexa utilizando o método da sequência, o qual não apresentou diferença significativa no índice de sensibilidade barorreflexa.

Alguns estudos mostram a sensibilidade barorreflexa reduzida após a administração de 3 $\alpha$ -hidroxi-dihidroprogesterona, um importante metabólito da progesterona (Heesch & Rogers, 1995; Minson *et al.*,

2000), bem como durante o início da prenhez de ratas, fase em que a progesterona está elevada (Masilamani & Heesch, 1997). O perfil hormonal descrito por Reis e colaboradores (2014) das ratas submetidas ao tratamento com VCD e estudadas durante a perimenopausa, mostra redução nos níveis de progesterona, sendo assim, isso pode ter contribuído para que nenhuma alteração fosse observada no controle barorreflexo dos nossos animais. Deve-se considerar ainda a questão do envelhecimento associado ao processo da menopausa em humanos. No presente modelo experimental a falha ovariana é precoce, ou seja, considerando-se a maturação sexual de acordo com Sengupta (2013), as ratas são adultas jovens, o que pode ter contribuído para que o controle barorreflexo estivesse intacto nestes animais. Este resultado abre a perspectiva para hipóteses que considerem que pelo menos alguns dos sintomas e distúrbios associados à menopausa sejam consequência apenas do processo de envelhecimento que acompanha o climatério e não necessariamente à variação ou queda dos hormônios ovarianos característica desta fase da vida.

Brian e colaboradores, 2001, analisaram a atividade simpática vascular de mulheres na menopausa após reposição hormonal e não observaram alterações desse parâmetro. Quando analisada em nosso trabalho, através do delta da pressão arterial média após administração do bloqueador ganglionar e pelo valor da banda de baixa frequência da pressão arterial sistólica, a atividade simpática vascular também esteve inalterada. Com isso, pode-se inferir que, apesar dos níveis plasmáticos de androgênios e progesterona estarem reduzidos neste modelo (Reis *et al.*, 2014), o que poderia ter ocasionado alterações no parâmetro analisado, a não redução nos níveis séricos de estradiol, demonstrada pelos mesmos autores, pode ter influenciado significativamente na manutenção da atividade simpática semelhante às fêmeas controle encontrada neste estudo.

Vários estudos mostram o aumento da resposta pressora a vasoconstritores como a fenilefrina em ratas jovens (Liu *et al.*, 2001) e velhas (Castillo *et al.*, 2005) submetidas a ovariectomia. A terapia de reposição hormonal reestabelece esse parâmetro em ratas jovens (Liu *et al.*, 2001), enquanto em ratas velhas ela aumenta a sensibilidade a fenilefrina, podendo ter efeitos deletérios sobre a vasculatura desses animais (Dellice *et al.*, 2008). A responsividade dos receptores alfa-1 adrenérgicos, avaliada no presente estudo, não apresentou diferença entre os grupos estudados, sugerindo um papel importante da idade e do status hormonal na resposta arterial a vasoconstritores, visto que no modelo de falha ovariana induzida pelo VCD, as ratas são adultas

jovens (108 dias de idade) e os níveis de estradiol ainda não apresentam redução significativa (Reis et al., 2014).

Com isso, nossos dados mostram que o sistema cardiovascular de controle da PA em ratas com falha ovariana precoce responde a eventos estressantes da mesma maneira que ratas intactas, indicando que em detrimento da falha ovariana parcial, elas se mantêm capazes de responder adequadamente frente a desafios estressores.

## **5.2 Animais estudados 180 dias após tratamento com VCD**

Em relação aos resultados dos animais que foram estudados 180 dias após o início do tratamento com VCD ou óleo, observou-se que o tratamento com VCD levou a uma redução significativa da massa ovariana, independente de haver ou não o estímulo estressor. Este dado indica que o VCD foi eficiente em instalar uma falha ovariana, apesar dos estudos morfológicos e do perfil hormonal serem necessários para a confirmação deste resultado. De qualquer maneira, espera-se que neste período de falha ovariana, 180 dias, as variações hormonais e o perfil ovariano sejam similares àqueles que ocorrem na menopausa instalada. Com relação aos resultados cardiovasculares nos animais estudados após 180 dias do tratamento com VCD, aqueles submetidos às sessões de ECI apresentaram aumento da PAM e PAD, sem alterações na PAS e FC. Entretanto, diferentemente do que se observou nas ratas estudadas 80 dias após o tratamento, o controle autonômico para o coração das fêmeas estudadas após 180 dias não apresentou alterações quando estudado por meio da análise espectral. Por outro lado, a atividade barorreflexa, que aos 80 dias não havia apresentado alteração, apresentou redução significativa nos animais que foram submetidos apenas ao tratamento com VCD, com redução tanto na taquicardia quanto na bradicardia reflexa após administração de fármacos vasoativos. Além disso, a participação simpática para o tônus vascular, analisada pelo delta da PAM após administração do bloqueador ganglionar hexametônio, que também não havia apresentado alteração aos 80 dias, esteve aumentada apenas nos animais tratados com VCD. A contribuição adrenérgica via receptor alfa-1 para o tônus vascular, avaliada pela administração de doses crescentes do agonista fenilefrina, manteve-se semelhante entre os grupos estudados.

O aumento na PAM e PAD como consequência das sessões de ECI, pode ter ocorrido pelos mesmos fatores citados anteriormente, quando foi discutido o aumento das pressões arteriais nos animais durante a perimenopausa, visto que os parâmetros avaliados sofreram

alterações semelhantes. Além disso, embora a pressão arterial não aumente durante o período de transição da perimenopausa para a menopausa, fora do contexto de estresse, (Luoto *et al.* 2000), esse aumento parece acontecer entre 5 e 20 anos após a menopausa instalada (Burt *et al.* 1995), sugerindo que as alterações no perfil hormonal pós-menopausa não sejam o único causador das alterações encontradas e que o envelhecimento pode estar associado a esta alteração. Dados da literatura a respeito do perfil hormonal de roedoras com mais de 80 dias após o tratamento com VCD são controversos. Alguns mostram que, em camundongas, os níveis plasmáticos de FSH estão aumentados 180 dias após, enquanto os níveis de androstenediona estão reduzidos e os de LH ficam inalterados (Rivera *et al.*, 2009). Lohff e colaboradores (2005) mostraram aumento nos níveis plasmáticos de FSH e nenhuma diferença nas concentrações de estradiol e progesterona em camundongas estudadas 156 dias após a administração de VCD. Entretanto, outro estudo avaliou o perfil hormonal de camundongas e 127 dias após administração do VCD e constatou que além do aumento de FSH, o LH também aumentou, enquanto que a progesterona e androstenediona apresentaram concentrações plasmáticas reduzidas, sem alterações nos níveis de estradiol plasmático (Mayer *et al.*, 2004). A ovariectomia, o modelo mais utilizado para o estudo da menopausa em animais, promove a retirada abrupta dos ovários, sem deixar tecido ovariano residual. Com isso, a queda dos esteroides ovarianos é também abrupta, sem promover o declínio gradual destes como ocorre na menopausa fisiológica humana. A literatura mostra um prejuízo no controle autonômico cardíaco, com conseqüente aumento da atividade simpática e redução da atividade parassimpática para o coração em mulheres na pós menopausa quando os níveis de estradiol já estão baixos (Mercurio *et al.*, 2000) o que pode ser revertido com terapia de reposição hormonal (Rosano *et al.*, 1997; Mercurio *et al.*, 2000).

O controle autonômico do coração de ratas ovariectomizadas, visto através da análise espectral, apresenta dados controversos. Dias da Silva e colaboradores (2009) não mostraram alteração no controle autonômico para o coração de ratas submetidas à ovariectomia. Entretanto, um estudo longitudinal avaliou o controle autonômico cardíaco de ratas ovariectomizadas ao longo de 16 semanas e mostrou que a deficiência de estradiol causa prejuízo autonômico, com aumento simpático e redução parassimpática, que pôde ser revertido com terapia de reposição hormonal (Mahmoud e Abdel, 2009). A discrepância entre os dois resultados é provavelmente resultado do tempo após a ovariectomia em que a avaliação ocorreu.

O efeito benéfico do estradiol sobre o sistema autonômico se dá através do seu papel em reduzir a atividade simpática cardíaca (Neves *et al.*, 2007). Corroborando isso, o mesmo estudo não apontou diferença na PAM desses animais, o que indica que a deficiência de estrógenos não tem efeito relevante na regulação tônica da pressão arterial média após a menopausa.

No modelo utilizado no presente estudo, o controle autonômico para o coração, visto pela análise espectral, não apresentou diferença entre os grupos. Os animais tratados com VCD não apresentam redução nos níveis de estradiol (Mayer *et al.*, 2002; Lohff *et al.*, 2005) e a literatura tem mostrado que é a retirada deste que causa o prejuízo autonômico após a ovariectomia em ratas. Contudo, durante a perimenopausa, nossos animais apresentaram prejuízo autonômico, que foi discutido anteriormente.

Um estudo mostrou redução na concentração plasmática de androstenediona em animais estudados 180 dias após administração de VCD (Rivera *et al.*, 2009) e além disso, a progesterona também está reduzida 127 dias após a administração do VCD (Mayer *et al.*, 2004). Considerando o conceito de que a progesterona é simpato-excitatória (Yang *et al.*, 2005) e o resultado de um estudo que demonstrou simpato-excitação em mulheres com síndrome do ovário policístico devido à hiperandrogenemia, pode-se inferir que a não alteração autonômica nos animais estudados 180 dias após a administração do VCD do presente estudo, possa ser pelo menos em parte, devido a redução desses dois agentes simpato excitatórios descritos na literatura. Outra possível explicação para isso é que durante a perimenopausa as flutuações hormonais possam ter ocasionado as alterações observadas, e que durante a menopausa, mesmo com variações na concentração de estradiol entre os indivíduos (Mayer *et al.*, 2002), os níveis desse se encontrem mais estáveis, o que explicaria o controle autonômico inalterado durante a menopausa. Além disso, com o estabelecimento da menopausa outros fatores podem afetar os centros neurais de controle cardiovascular e compensar o prejuízo autonômico visto nas fêmeas após 80 dias.

A sensibilidade barorreflexa é aceita como um teste diagnóstico para o risco de doenças cardiovasculares (Parmer *et al.*, 1992; La Rovere *et al.*, 2008). O NTS é o principal núcleo integrador do barorreflexo, sendo que seus neurônios são essenciais nas vias que medeiam os reflexos cardiovasculares e regulam a pressão arterial (Weinstock *et al.*, 1984; Ross *et al.*, 1981). Injeções de estradiol em núcleos de controle autonômico, como o NTS, promovem redução na

atividade simpática renal, tônus simpático e altera a sensibilidade barorreflexa (Seleh *et al.*, 2000; Saleh e Connell, 2007; Spary *et al.*, 2009).

Segundo a literatura, nosso modelo não apresenta redução dos níveis de estradiol (Mayer *et al.*, 2002; Lohff *et al.*, 2005), contudo, a sensibilidade barorreflexa avaliada por meio da administração de fenilefrina e nitroprussiato de sódio encontrou-se reduzida nos animais submetidos ao tratamento com VCD. Com isso pode-se sugerir que outras alterações hormonais ovarianas não relacionadas ao estradiol e as alterações no eixo HPG causadas pela falha ovariana, possam estar influenciando no prejuízo barorreflexo encontrado em nosso estudo. Um possível mecanismo envolvido é a alteração na sensibilidade dos receptores de estradiol nos núcleos de controle barorreflexo da frequência cardíaca, induzida pelo aumento sustentado do FSH, já demonstrado na literatura (Rivera *et al.*, 2009).

Chakraborty e Roy (2013) relacionaram o aumento na expressão de ER $\alpha$ 36, um receptor não genômico para estrogênios, em células ovarianas, exceto ovócitos, de hamsters com o aumento na liberação das gonadotropinas, principalmente o FSH, sugerindo papel do mesmo na regulação da expressão dos receptores de estradiol ao longo do ciclo estral. Além disso, sabe-se da existência de receptores para FSH em tecidos não reprodutivos, como estômago humano, glândula submaxilar de ratos e tecido adiposo de galinhas (Mandrekar *et al.*, 1990; Fu *et al.*, 2005; Huanxian *et al.*, 2012). Sendo assim, são necessários estudos que visem avaliar a expressão desses receptores nos núcleos de controle autonômico cardiovascular para que os resultados do presente estudo possam ser melhor esclarecidos.

Em homens jovens, há uma relação positiva entre a atividade nervosa simpática muscular e a resistência periférica total, e uma relação inversa entre esses fatores e o débito cardíaco (Charkoudian *et al.* 2005; Hart *et al.* 2009). Contudo, em mulheres jovens a relação positiva entre atividade nervosa simpática muscular e a resistência periférica total não existe, o que sugere a existência de outros mecanismos, além da atividade simpática, que regulem o tônus vasomotor corporal (Hart *et al.* 2009). Um possível mecanismo é o papel vasodilatador dos receptores  $\beta$ 2 adrenérgicos após estimulação com noradrenalina, o qual é maior em mulheres jovens, comparadas a homens na mesma idade ou mulheres após a menopausa (Freedman *et al.* 1987; Kneale *et al.* 2000; Hart *et al.* 2011). Isso sugere um importante papel dos hormônios ovarianos na responsividade dos receptores  $\beta$  adrenérgicos em mediar a vasodilatação induzida pela atividade simpática. Os níveis séricos de esteroides

ovarianos podem regular tanto o número dos receptores  $\beta$  adrenérgicos como o acoplamento dos seus efetores (White *et al.*, 1995). Ferrer e colaboradores (1996) demonstraram que a terapia de reposição hormonal com estrógenos aumenta a vasodilatação mediada pelos receptores  $\beta$  adrenérgicos no músculo liso de artérias mesentéricas de ratas ovariectomizadas. Além disso, um estudo em mulheres na pós-menopausa mostrou redução na capacidade vasodilatadora dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos que deveria compensar a vasoconstrição induzida pelos receptores  $\alpha$ -adrenérgicos (Hart *et al.*, 2011).

A maior queda na PAM após bloqueio ganglionar com hexametônio, vista nas ratas 180 dias após serem submetidas ao tratamento com VCD, pode ter sido em parte, ocasionada por uma redução na expressão destes receptores  $\beta$ -adrenérgicos, induzida pelas alterações hormonais e/ou centrais consequentes da falha ovariana, já que as ratas controle não apresentaram esta redução, mesmo sendo também adultas de meia idade, de acordo com critérios de maturação sexual (Sengupta, 2013). Sendo assim, a vasodilatação mediada pelos receptores  $\beta$ -adrenérgicos pode ter sido reduzida, conseqüentemente, não atenuando a vasoconstrição mediada pela noradrenalina liberada pelas terminações simpáticas nos receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, causando aumento do tônus vascular.

Os estrógenos podem influenciar a responsividade dos receptores  $\alpha$ -adrenérgicos indiretamente, influenciando a liberação ou distribuição de transmissores simpáticos (Bengtsson, 1978; Hamlet, 1980), ou diretamente afetando o número ou afinidade desses receptores (Hoffman *et al.*, 1981; Colucci *et al.*, 1982). Minami e colaboradores (2002) mostraram aumento na resposta pressora à fenilefrina, um agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico, em ratas ovariectomizadas. Estudos *ex vivo* mostram que a reposição hormonal a longo prazo atenua a sensibilidade adrenérgica de artérias mesentéricas (Zhang e Davidge, 1999) e anéis aórticos (Paredes-Carbajal, 1995). Nesses estudos a inibição da liberação do NO atenuou essa resposta, mostrando que esse sistema é importante na determinação da resposta pressora adrenérgica. Além disso, Meyer e colaboradores (1997) mostraram que o bloqueio da ciclooxigenase reverte o efeito dos estrógenos na resposta à estimulação adrenérgica, o que sugere um papel vasodilatador das prostaglandinas nessa resposta. Em nosso estudo ainda não era esperada uma queda nos níveis circulantes de estradiol (Mayer *et al.*, 2002), o que poderia explicar os dados que mostram a responsividade  $\alpha_1$ -adrenérgica não alterada durante a falha ovariana e exposição ao protocolo de ECI. Porém, deve-se salientar que não avaliamos o papel das prostaglandinas, cujos níveis



poderiam estar alterados nas ratas tratadas com VCD. Além disso, no protocolo de avaliação da responsividade  $\alpha$ 1-adrenérgica utilizado em nosso estudo, não promovemos o bloqueio do SRAA, fato que pode ter mascarado qualquer alteração na resposta à estimulação adrenérgica com fenilefrina, visto que o bloqueio desse sistema evitaria a restauração da pressão arterial (Hiwatari *et al.*, 1995).

O conjunto de resultados do presente estudo nos permite concluir que as alterações endócrinas consequentes da falha ovariana no período que mimetiza a perimenopausa parecem não influenciar diretamente a pressão arterial dos animais estudados. Adicionalmente, quando estes são expostos ao estresse crônico imprevisível, ocorre um aumento no tônus cardíaco simpático e redução parassimpática. A sensibilidade barorreflexa, a atividade simpática vascular e a responsividade  $\alpha$ -1 adrenérgica vascular também não sofrem influência do estresse nem do tratamento com VCD.

Quando estudadas mais tardiamente, no período que mimetiza a menopausa, a falha ovariana parece contribuir para uma redução na sensibilidade barorreflexa, porém não influencia no controle autonômico cardíaco. A resposta pressora frente ao bloqueio ganglionar se mostrou reduzida em consequência da falha ovariana, mas parece não ter sido mediada pela responsividade dos receptores  $\alpha$ -1 adrenérgicos vasculares. Com isso pode-se concluir que o comprometimento autonômico cardíaco durante a perimenopausa é influenciado pela combinação do estresse e da falha ovariana, enquanto mais tardiamente, na menopausa, o comprometimento barorreflexo e vascular parece ser ocasionado pelas alterações no perfil endócrino e ovariano dessa fase.



## 6 CONCLUSÃO

O presente estudo nos permite concluir que a falha ovariana precoce traz consequências cardiovasculares diferentes, dependendo de dois fatores distintos: o tempo em que os animais foram expostos a esta falha ovariana e se esta se encontra ou não associada a estímulos estressores.

Quando as ratas são expostas à falha ovariana por menos tempo (80 dias), elas são capazes de manter o controle da pressão arterial, mesmo frente a estímulos estressores. Entretanto, o comprometimento autonômico cardíaco é influenciado pela combinação dos dois fatores, estresse e falha ovariana.

Quando as ratas são expostas à falha ovariana por mais tempo (180 dias), elas são capazes de manter o controle da pressão arterial, mesmo frente a estímulos estressores, bem como, tornam-se capazes de fazer a regulação autonômica cardíaca, provavelmente por mecanismos compensatórios. Entretanto, o comprometimento barorreflexo e vascular é ocasionado pela falha ovariana prolongada, independente de haver ou não estímulo estressor.



## 7 REFERÊNCIAS

AGUILERA, G. Corticotropin releasing hormone, receptor regulation and the stress response. **Trends Endocrinol. Metab**, v. 9, n. 8, p. 329-336, 1998.

AKSELROD, S. *et al.* Power spectrum analysis of heart rate fluctuation: a quantitative probe of beat-to-beat cardiovascular control. **Science**, v.213, n., p.220-222, 1981.

ALMELA, M. *et al.*. The impact of cortisol reactivity to acute stress on memory: sex differences in middle-aged people. **Stress**, v.14, n., p.17-127, 2011.

ARCHER DF. Drospirenone, a progestin with added value for hypertensive postmenopausal women. **Menopause**, v. 14, p. 352–354, 2007.

AT SMA, F. *et al.* Postmenopausal status and early menopause as independent risk factors for cardiovascular disease: a meta-analysis. **Menopause**, v.13, n., p.265-279, 2006.

AUBERT, A.E. *et al.* Heart rate variability in athletes. **Sports Med**, v. 33, n. 12, p. 889-919, 2003.

BADIANI, A., *et al.* Circulating adrenal hormones are not necessary for the development of sensitization to the psychomotor activating effects of amphetamine. **Brain Reserch**, v.173, n.1, p 13-24, 1995.

BADOER, E. Hypothalamic paraventricular nucleus and cardiovascular regulation. **Clin Exp Pharmacol Physio**, v.28, n.1, p.95-99, 2001.

BAILEY, T.W. *et al.* Cranial visceral afferent pathways through the nucleus of the solitary tract to caudal ventrolateral medulla or paraventricular hypothalamus: target-specific synaptic reliability and convergence patterns. **J Neurosci**, v.26, n., p.11893-11902, 2006.

BALE, T., EPPERSON, N.C. Sex differences and stress across the lifespan. **Nat Neurosci**, v18, n.10, p. 1413–1420, 2015.

BASELLI, G. *et al.* Spectral and cross-spectral analysis of heart rate and arterial blood pressure variability signals. **Comput Biomed Res**, v.19, n., p.520-534.1986.

BAUDRIE V, T. *et al.* Autonomic components of the cardiovascular responses to an acoustic startle stimulus in rats. **J Auton Pharmacol**, v.17, p.303–309, 1997.

BAYRAMGURLER, D. *et al.* The effect of etanercept on aortic nitric oxide-dependent vasorelaxation in an unpredictable chronic, mild stress model of depression in rats. **Eur J Pharmacol**, v.710, p. 67-72, 2013.

BECHLIOULIS, S.N. *et al.* Endothelial function, but not carotid intima-media thickness, is affected early in menopause and is associated with severity of hot flushes. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 95, n. 3, p. 1199-1206, 2010.

BENGTSSON, B. Estrogen-induced inhibition of 3H-noradrenaline release in the uterus and portal vein of rat. **Acts Physiol Scand**, v.104, n.3, p. 287-298, 1978.

BISHOP VS, Hay M. Involvement of the area postrema in the regulation of sympathetic outflow to the cardiovascular system. **Front Neuroendocrinol**, v. 14, n. 2. P. 57-75, 1993.

BLANCHARD, R.J. *et al.* The characterization and modelling of antipredator defensive behavior. **Neurosci. Biobehav**, v. 14, p. 463-472, 1990.

BROSNIHAN KB, Li P, Ganten D, Ferrario CM. Estrogen protects transgenic hypertensive rats by shifting the vasoconstrictor-vasodilator balance of RAS. **Am J Physiol**, v. 273, p. 1908-1915, 1997.

BURGER, H.G. *et al.* Serum inhibins A and B fall differentially as FSH rises in perimenopausal women. **Clin.Endocrinol**, v.48, n.6, p. 809-813, 1998.

BURT, V.L. *et al.* Prevalence of hypertension in the US adult population. Results from the Third National Health and Nutrition

Examination Survey, 1988–1991 **Hypertension**, v.25, n.3, p. 305-313, 1995.

BURT, V.L.*et al.* Prevalence of hypertension in the US adult population. Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1991. **Hypertension**, v.25, p.305-313, 1995.

CANNOLETTA, M., CAGNACCI, A. Modification of blood pressure in postmenopausal women: role of hormone replacement therapy. **International Journal of Women's Health**, v. 11, p.745-757, 2014.

CARUANA-MONTALDO, B. The control of breathing in clinical practice. **Chest**, v.117, n.1, p. 205-25, 2000.

CASTILLO, C. *et al.* Effects of ovariectomy and growth hormone administration on body composition and vascular function and structure in old female rats. **Biogerontology**, v.6, n.1, p. 49-60, 2005.

CERESINI, G.*et al.* The effects of transdermal estradiol on the response to mental stress in postmenopausal women: a randomized trial. **Am. J. Med**, v.109, p. 463-468, 2000.

CERUTTI, C. *et al.* Autonomic nervous system and cardiovascular variability in rats: a spectral analysis approach. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.261, p.1292-1299, 1991.

CERUTTI, C. *et al.* Baroreflex modulation of blood pressure and heart rate variabilities in rats: assessment by spectral analysis. **Am J Physiol**, v.266, p.1993-2000, 1994.

CHAKRABORTY, P.; ROY, S.K. Expression of Estrogen Receptor  $\alpha$  36 (ESR36) in the Hamster Ovary throughout the Estrous Cycle: Effects of Gonadotropins. **PLoS ONE**, v.8, n.3, p. e58291, 2013.

CHAPLEAU, M.W. *et al.* Structural versus functional modulation of the arterial baroreflex. **Hypertension**, v.26, p. 341-347, 1995.

CHAPPELL M.C. Differential effects of sex steroids in young and aged female mRen2.Lewis rats: a model of estrogen and salt-sensitive hypertension. **Gend Med**, v. 5, p. 65-75, 2008.

CHAPPELL, M.C. *et al.* Differential effects of sex steroids in young and aged female mRen2.Lewis rats: a model of estrogen and salt-sensitive hypertension. **Gend Med**, v. 5, p.65-75, 2008.

CHARKOUDIAN, N. *et al.* Balance between cardiac output and sympathetic nerve activity in resting humans: role in arterial pressure regulation. **J Physiol**, v.568, n.1, p.315-321, 2005.

CHRISTOPHER, T. *et al.* Influence of the Menstrual Cycle on Sympathetic Activity, Baroreflex Sensitivity, and Vascular Transduction in Young Women. **Circulation**, v. 101, n. 8, p. 862-868, 2000.

CHUNG, W.C. *et al.* Detection and localization of an estrogen receptor beta splice variant protein (ERbeta2) in the adult female rat forebrain and midbrain regions. **J Comp Neurol**, v. 505, n. 3, p. 249-67, 2007;

CIRIELLO, J.; RODER, S. 17 $\beta$ -Estradiol alters the response of subfornical organ neurons that project to supraoptic nucleus to plasma angiotensin II and hypernatremia. **Brain Res**, v. 1526, n. 14, p. 54-64, 2013.

COLUCCI, W. S. *et al.* Regulation of myocardial and vascular alpha-adrenergic receptor affinity. Effect of guanine nucleotides, cations, estrogens and catecholamine depletion. **Circ. Res**, v.55, n.1, p.78-88, 1984.

CONLIN, P.R. Interactions of high salt intake and the response of the cardiovascular system to aldosterone. **Cardiol Ver**, v.13, n.3, p.118-24, 2005.

COOTE, J.H. *et al.* Control of sympathetic outflows by the hypothalamic paraventricular nucleus. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v.2, n.6, p.461-463, 1998.

CRITCHLOW, V. *et al.* Sex difference in resting pituitary–adrenal function in the rat. **Am. J. Physiol**, v. 205, n.5, p. 807–815. 1963.

CRUZ, J.C.; MACHADO, B.H. GABA and nitric oxide in the PVN are involved in arterial pressure control but not in the chemoreflex responses in rats. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v.146, n.2, p.47-55, 2009.



DAL-ZOTTO, S. *et al.* Influence of single or repeated experience of rats with forced swimming on behavioural and physiological responses to the stressor. **Behav. Brain Res**, v. 114, n. 1/2, p. 175-181, 2000.

DAMPNEY, R.A. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. **Physiol Rev**, v.74, p.323-364, 1994.

DAMPNEY, R.A. Central mechanisms regulating coordinated cardiovascular and respiratory function during stress and arousal. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.309,p.429-443, 2015.

DANILOVICH, N. *et al.* Emergence of uterine pathology during accelerated biological aging in FSH receptor-haploinsufficient mice. **Endocrinol**, v.143, n.9,p.3618–3627, 2002.

DANILOVICH, N.; SAIRAM, M.R. Recent female mouse models displaying advanced reproductive aging. **Experimental Gerontology**, v.41, p.117-122, 2006.

DAVIES, A. O.; LEFKOWITZ, R. J. Regulation of  $\beta$ -adrenergic receptors by steroid hormones. **Annu. Rev. Physiol**, v.46, p. 119-130, 1984.

DAYAS, C.V. *et al.* Stressor categorization: acute physical and psychological stressors elicit distinctive recruitment patterns in the amygdala and in medullary noradrenergic cell groups. **Eur J Neurosci**, v.14, p.1143–1152, 2001.

DECAVEL, C.; VAN DEN POL, A.N. GABA: a dominant neurotransmitter in the hypothalamus. **J Comp Neuro**, v.302, n.4,p.1019-1037, 1990.

DELLICE, J. *et al.* Ovariectomy, but Not Estrogen Deficiency, Increases CYP4A Modulation of  $\alpha$ 1-Adrenergic Vasoconstriction in Aging Female Rats. **Am J Hypertens**, v. 21, n. 6, p. 685-690, 2008.

DESS, N.K. *et al.* Suppression of feeding and body weight by inescapable shock: Modulation by quinine adulteration, stress

reinstatement, and controllability. **Physiol. Behav.**, v. 45, p. 975-983, 1989.

DI BONA, G.F. *et al.* Nervous kidney. Interaction between renal sympathetic nerves and the renin-angiotensin system in the control of renal function. **Hypertension**, v.36, n.6, p.1083-1088, 2000.

DIAS DA SILVA, V. *et al.* Heart rate and arterial pressure variability and baroreflex sensitivity in ovariectomized spontaneously hypertensive rats. **Life Sciences**, v. 84, n.21, p. 719-724, 2009.

DOG˘RU M.T. *et al.* The relationship between serum sex steroid levels and heart rate variability parameters in males and the effect of age. **Turk Kardiyol Derns Ars**, v.38, n.7, p. 459-65, 2010.

DOS SANTOS, R.L. *et al.* Sex hormones in the cardiovascular system. **Horm Mol Biol Clin Investig**, v.18, n.2, p.89-103, 2014.

ELGER, W. *et al.* Conception and pharmacodynamic profile of drospirenone. **Steroids**, v. 68, p.891-905, 2003.

ESLER, M. *et al.* Measurement of overall and cardiac norepinephrine release into plasma during cognitive challenge. **Psychoneuroendocrinology**, v.14, n.6, p.477-481, 1989.

ETO, M. *et al.* Reduced endothelial vasomotor function and enhanced neointimal formation after vascular injury in a rat model of blood pressure lability. **Hypertens, Res** v.26, p.991-998, 2003.

EVERSON-ROSE, S.A. *et al.* Chronic stress, depressive symptoms, anger, hostility, and risk of stroke and transient ischemic attack in the multi-ethnic study of atherosclerosis. **Stroke**, v.45, n.8, p.2318-2323, 2014.

FAZAN, R, Jr. *et al.* Frequency-dependent baroreflex modulation of blood pressure and heart rate variability in conscious mice. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.28. p.1968-1975, 2005.

FERRER, M. *et al.* Estrogen replacement increases  $\beta$ -adrenoceptor-mediated relaxation of rat mesenteric arteries. **J. Vasc. Res**, v.33, n.2, p.124-131, 1996.

FIMOIGNARI, F.L. *et al.* Associated daily biosynthesis of cortisol and thromboxane A2: a preliminary report. **J Lab Clin Med**, v.128, n.1, p.115-121, 1996.

FLORAS, J.S. *et al.* Differential sympathetic nerve and heart rate spectral effects of nonhypotensive lower body negative pressure. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 281, n.2, p. 468-475, 2001.

FREEDMAN, R.R. *et al.* Sex differences in peripheral vascular adrenergic receptors. **Circ Res**, v.61, n.4, p.581-585, 1987.

FU, J. *et al.* Studies on distribution of FSH, LH and colocalization with GnRHR in rat submaxillary glands. **Acta Anatomica Sinica**, v.35, p.652-655, 2004.

FU, Q. *et al.* Effects of lower body positive pressure on muscle sympathetic nerve activity response to head-up tilt. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 281, n.3, p. 778-785, 2001.

GALLAGHER, P.E. *et al.* Estrogen regulation of angiotensin-converting enzyme mRNA. **Hypertension**, v.33, p.323-328, 1999.

GENAZZI, A.R. *et al.* Progesterone, progestagens and the central nervous system. **Hum Reprod** v.15, p. 14-27, 2000.

GOEL ,N.; BALE, T.L. Organizational and activational effects of testosterone on masculinization of female physiological and behavioral stress responses. **Endocrinology**, v. 149, n.12, p. 6399-6405, 2008.

GOLBIDI, S. *et al.* Chronic stress impacts the cardiovascular system: animal models and clinical outcomes. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.308, p.1476--1498, 2015.

GRIPPO, A.J. *et al.* Behavioral and cardiovascular changes in the chronic mild stress model of depression. **Physiol Behav**, v.78, p.703-710, 2003.

GRASSI, D. *et al.* Estradiol and testosterone regulate arginine-vasopressin expression in SH-SY5Y human female neuroblastoma cells through estrogen receptors alpha and beta **Endocrinology**, v.154, p.2092-2100, 2013.

- GUYENET, P.G. The sympathetic control of blood pressure. **Nat Rev Neurosc**, v.7, p.:335-346, 2006.
- HAMLET, M. A. *et al.* Effect of estradiol on release and disposition of norepinephrine from nerve endings. **Am. J. Physiol**, v.239, n.4, p.450-456, 1980.
- HANDA, R.J. *et al.* Androgen regulation of adrenocorticotropin and corticosterone secretion in the male rat following novelty and foot shock stressors. **Physiol. Behav**, v. 55, n.1, p. 117-124, 1994.
- HANDA, R.J. *et al.* Gonadal steroid hormone receptors and sex differences in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. **Horm. Behav**, v. 28. n. 4. P.464-476, 1994.
- HART , E. C. J.; CHARKOUDIAN, N. Sympathetic Neural Regulation of Blood Pressure: Influences of Sex and Aging. **Physiology**, v.29, p.8-15, 2014.
- HART, E.C. *et al.* Sex and ageing differences in resting arterial pressure regulation: the role of the  $\beta$ -adrenergic receptors. **J. Physiol.**, v.589, n.21, p. 5285-5297, 2011.
- HART, E.C. *et al.* Sex differences in sympathetic neural-hemodynamic balance: implications for human blood pressure regulation. **Hypertension**, v.53, n.3, p.571-576, 2009.
- HEESCH, C.M. ROGERS, R.C. Effects of pregnancy and progesterone metabolites on regulation of sympathetic outflow. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 22, n. 2,p. 136-142, 1995.
- HERMAN, J.P. *et al.* Expression of ionotropic glutamate receptor subunit in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. **J Comp Neurol**, v.422, n.3, p.352-362, 2000.
- HIWATARI, M. *et al.* The contribution of vasopressin and angiotensin to the maintenance of blood pressure after autonomic blockade. **Hypertension**. v.7, n.4, p. 547-553, 1985.

HOFFMAN, B. B. *et al.* Alpha adrenergic subtypes in rabbit uteris: Mediation of myometrial contraction and regulation by estrogens. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.219, n.2, p.290-295, 1981.

HUAN, Y. *et al.* Role of the ovarian cycle on neural cardiovascular control in sleep-deprived women. **J Appl Physiol**, v.118, n.4, p.419-426, 2015.

HUANXIAN, C. *et al.* FSH stimulates lipid biosynthesis in chicken adipose tissue by upregulating the expression of its receptor FSHR. **J Lipid Res**, v.54, n.5, p.909-917, 2012.

HUBER, D.A.; SCHREIHOFFER, A.M. (2011). Altered regulation of the rostral ventrolateral medulla in hypertensive obese Zucker rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.301, p.230-240, 2011.

HUGHES, G.S. *et al.* Sex steroid hormones are altered in essential hypertension. **J Hypertens**, v.7, n.3, p.181-187, 1989.

HUIKURI, H.V. *et al.* Sex-related differences in autonomic modulation of heart rate in middle-aged subjects. **Circulation**, v. 94, n. 2, p. 122-125, 1996.

HUNT, B. E. *et al.* Estrogen Replacement Therapy Improves Baroreflex Regulation of Vascular Sympathetic Outflow in Postmenopausal Women. **Circulation**, v. 103. n 24. p. 2909-2914, 2001.

JAPUNDZIC, N. *et al.* Spectral analysis of blood pressure and heart rate in conscious rats: effects of autonomic blockers. **J Auton Nerv Syst**, v.30, p.91-100, 1990.

JI, H. *et al.* Role of angiotensin converting enzyme 2 and angiotensin(1-7) in 17beta- oestradiol regulation of renal pathology in renal wrap hypertension in rats. **Exp Physiol**, v. 93, n.5, p. 648-657, 2008.

KAJANTIE, E.; PHILLIPS, D.I. The effects of sex and hormonal status on the physiological response to acute psychosocial stress. **Psychoneuroendocrinology**, v.31, p.151-178, 2006.

KALLEN, A. N.; PAL, L. Cardiovascular disease and ovarian function. **Curr Opin Obstet Gynecol**, v.23, p.258-267, 2011.

KANNAN, H.; YAMASHITA, H. Increase in sympathetic by paraventricular nucleus stimulation in awake rats. **Am J Physiol**, v.256, n.6/2, p.1325-1330, 1989.

KAO, S.W. *et al.* Early effects of ovotoxicity induced by 4-vinylcyclohexene diepoxide in rats and mice. **Reprod. Toxicol**, v.13, p. 67-75, 1999.

KATAFUCHI, T. *et al.* Effects of chemical stimulation of paraventricular nucleus on adrenal and renal nerve activity in rats. **Neurosci Lett**, v.86, n.2, p.195-200, 1988.

KELLER-WOOD, M. ACTH responses to hypotension and feedback inhibition of ACTH increased by chronic progesterone treatment. **Am. J. Physiol**, v. 274, p. 81-87, 1998.

KIM, A.M. *et al.* Sex bias in trials and treatment must end. **Nature**, v. 465, n.7299, p. 688-689, 2010.

KIM, J.K. *et al.* Recent changes in cardiovascular risk factors among women and men. **J Womens Health (Larchmt)**, v.15, p.734-746, 2006.

KIRCHHEIM, H. *et al.* Sympathetic modulation of renal hemodynamics, renin release and sodium excretion. **Klin Wochenschr**, v.67, n.17, p.858-864, 1989.

KIRILOV, G. *et al.* Elevated plasma endothelin as an additional cardiovascular risk factor in patients with Cushing's syndrome. **Eur J Endocrinol**, v.149, n.6, p.549-53, 2003.

KLEIGER, R.E. *et al.* Decreased heart rate variability and its association with increased mortality after acute myocardial infarction. **Am J Cardiol**, v. 59, n. 4, pag. 256- 262, 1987.

KNEALE, B.J. *et al.* Gender differences in sensitivity to adrenergic agonists of forearm resistance vasculature. **J Am Coll Cardiol**, v. 36, n4., p.1233–1238, 2000.

KOPP, U.C.; DIBONA, G.F. *Neural regulation of renin secretion.* **Semin Nephrol**, v.13, n.6, p.543-551, 2000.

KUDIŁKA, B.M. *et al.* Psychological and endocrine responses to psychosocial stress and dexamethasone/corticotropin-releasing hormone in healthy postmenopausal women and young controls: the impact of age and a two-week estradiol treatment. **Neuroendocrinology**, v.70, n.6, p.422-30, 1999.

LA ROVERE, M.T. *et al.* Baroreflex sensitivity and heart-rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. ATRAMI (Autonomic Tone and Reflexes After Myocardial Infarction). **Lancet**. v. 351, n, 9101, p, 478-484, 1998.

LA ROVERE, M.T. *et al.* Baroreflex sensitivity: Measurement and clinical implications. **Ann Noninvasive Electrocardiol**, v.13. n.2, p. 191-207, 2008.

LEFRANDT, J.D. *et al.* Inverse relationship between blood glucose and autonomic function in healthy subjects. **Diabetes Care**, v.23, p.1862-1864, 2000.

LI, Y.F.; PATEL, K.P. Paraventricular nucleus of the hypothalamus and elevated sympathetic activity in heart failure: the altered inhibitory mechanisms. **Acta Physiol Scand**, v.177, n.1, p.17-26, 2003.

LI, Y.F. *et al.* NMDA-mediated increase in renal sympathetic nerve discharge within the PVN: role of nitric oxide. **Am J Physiol**, v.281, n.6, p.2328-2336, 2001.

LI, Y.F. *et al.* Interaction between glutamate and GABA systems in the integration of sympathetic outflow by the paraventricular nucleus of the hypothalamus. **Am J Physiol Heart Circ.Physiol**, v.291, n.6, p.2847-2856, 2006.

LINDHEIM, S.R. *et al.* Behavioral stress responses in premenopausal and postmenopausal women and the effects of estrogen. **Am. J. Obstet. Gynecol**, v.167, p.1831-1836, 1992.

LIU, M.Y. *et al.* Alterations in EDHF-mediated hyperpolarization and relaxation in mesenteric arteries of female rats in long-term deficiency of oestrogen and during oestrus cycle. **Br J Pharmacol**, v. 132, n. 5, p. 1035- 1046, 2001.

LOHFF, J.C. *et al.* Characterization of cyclicity and hormonal profile with impending ovarian failure in a novel chemical-induced mouse model of perimenopause. **Comparative Medicine**, v.55, n.6, p.523-527, 2005.

LORETTA, P. *et al.* The Follicle-Deplete Mouse Ovary Produces Androgen. **Biology of Reproduction**, v.71, n.1, p.130-138, 2014.

LUNDBER, G.U. Stress hormones in health and illness: the roles of work and gender. **Psychoneuroendocrinology**, v.30, p.1017-1021, 2005.

LUOTO, R. *et al.* Blood pressure and menopausal transition: The Atherosclerosis Risk in Communities study (1987–95). **Journal of Hypertension**, v.18, n.1., p. 27-33, 2000.

MAHMOUD, M.; *et al.* Longitudinal assessment of the effects of estrogen on blood pressure and cardiovascular autonomic activity in female rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v.36, n. 10, p. 1002-1009, 2009.

MALIK, M. *et al.* Heart rate variability: Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. **European Heart Journal**, v.17, n.3, p.354-381, 1996.

MALLAREDDY, M. *et al.* Drospirenone, a new progestogen, for postmenopausal women with hypertension. **Drugs Aging**, v. 24, n.6, p.453-66, 2007.

MALLIANI, A. *et al.* Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. **Circulation**, v.84, p.482–492, 1991.

MALPAS, S.C. Neural influences on cardiovascular variability: possibilities and pitfalls. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.282, n.1, p.6-20, 2002.

MANDREKAR, P. S. *et al.* Immuno-cytochemical localization of follicle stimulating hormone in normal human stomach. **Anat. Rec**, v.227, n.3, p.334-339, 1990.



MARTIN, D.S.; HAYWOOD; J.R. Sympathetic nervous system activation by glutamate injections into the paraventricular nucleus. **Brain Res**, v.577, n.2, p.261-267, 1992.

MASILAMANI, S.; HEESCH; C.M. Effects of pregnancy and progesterone metabolites on arterial baroreflex in conscious rats. **Am J Physiol**, v.272, n.3, p. 924-934, 1997.

MAYER, L.P. *et al.* The follicle-deplete mouse ovary produces androgen. **Biol. Reprod**, v.71, p.130-138, 2004.

MCMAHON, E.G. Recent studies with eplerenone, a novel selective aldosterone receptor antagonist. **Curr Opin Pharmacol**, v.1, n.2, p. 190-196, 2001.

MERCURO, G, *et al.* Evidence of a role of endogenous estrogen in the modulation of autonomic nervous system. **Am. J. Cardiol**, v.85, n.6, p. 787-789, 2000.

MEYER, M.C. Estrogen replacement attenuates resistance artery adrenergic sensitivity via endothelial vasodilators. **Am J Physiol**, v.272, p.2264-2270, 1997.

MIDDLEKAUFF, H.R. *et al.* Acupuncture effects on reflex responses to mental stress in humans. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.280, n.5, p.1462-1468, 2001.

MINAMI, N. *et al.* Effect of Estrogen on Pressor Responses to  $\alpha 1$ -Adrenoreceptor Agonist in Conscious Female Rats. **Hypertens Res**, v.25, n.4, p. 609-613, 2002.

MOREY.A.K. *et al.* Estrogen and progesterone inhibit vascular smooth muscle proliferation. **Endocrinology**, v. 138, n. 8, p. 3330-3339, 1997.

NEVES, V.F. *et al.* Autonomic modulation of heart rate of young and postmenopausal women undergoing estrogen therapy. **Braz J Med Biol Res**, v.40, n.4, p. 491-499, 2007.

NEVES, V.J. *et al.* Proatherosclerotic effects of chronic stress in male rats: altered phenylephrine sensitivity and nitric oxide synthase activity of aorta and circulating lipids. **Stress**, v.12, p.3207-3207, 2009.

NICKENIG, G. *et al.* Estrogen modulates AT1 receptor gene expression in vitro and in vivo. **Circulation**, v.97, p.2197-2201, 1998.

ONG, K.L. *et al.*. Gender difference in blood pressure control and cardiovascular risk factors in Americans with diagnosed hypertension. **Hypertension**, v.51, p.1142-1148, 2008.

ORTIZ, J. *et al.* Biochemical adaptations in the mesolimbic dopamine system in response to repeated stress. **Neuropsychopharmacology**, v. 14, n. 6, p. 443-452, 1996.

OTTENWELLER, J.E. *et al.* A chronic stress state in rats: Effects of repeated stress on basal corticosterone and behavior. **Physiol. Behav**, v. 51, p. 689-698, 1992.

PAGANI, M. *et al.* Power spectral analysis of heart rate and arterial pressure variabilities as a marker of sympatho-vagal interaction in man and conscious dog. **Circ Res**, v.59,p.178-193, 1986.

PAREDES-CARBAJAL. M.C. Effects of acute and chronic estrogenic treatment on vasomotor responses of aortic rings from ovariectomized rats. **Life Sci**, v.57, n.5, p. 473-486, 1995.

PARMER, R.J. *et al.* Baroreflex sensitivity and heredity in essential hypertension. **Circulation.**, v.85, n.2, p. 497-503,1992.

PENDERGRASS, K.D. *et al.* Sex differences in circulating and renal angiotensins of hypertensive mRen(2). Lewis but not normotensive Lewis rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.295, p.10-20, 2008.

PERSSON, P.B. Spectrum analysis of cardiovascular time series. **Am J Physiol**, v.273, p.1201-1210, 1997.

POLLOW, K. *et al.* Dihydrospirorenone ZK30595): a novel synthetic progestagen -characterization of binding to different receptor proteins. **Contraception**, v.46, n.6, p. 561-574, 1992.

PORTER, J.P. BRODY, M.J. A comparison of the hemodynamic effects produced by electrical stimulation of subnuclei of the paraventricular nucleus. **Brain Res**, v.375, n.1, p.20-29, 1986.

- PRIOR, J.C. et al. Progesterone therapy, endothelial function and cardiovascular risk factors: a 3-month randomized, placebo-controlled trial in healthy early postmenopausal women. **PLoS One**, v.9, n.1. p.e84698, 2014.
- REIS, F.M.C.V., *et al.* Hormonal changes and increased anxiety-like behavior in a perimenopause-animal model induced by 4-vinylcyclohexene diepoxide (VCD) in female rats. **Psychoneuroendocrinology**, v.49, p. 130-140, 2014.
- RIVERA., *et al.* Steroidogenic Capacity of Residual Ovarian Tissue in 4-Vinylcyclohexene Diepoxide-Treated Mice. **Biol Reprod**, v.80, n.2, p.328-336, 2009.
- RODGERS, R.J.; COLE, J.C. Anxiety enhancement in the murine elevated plus maze by immediate prior exposure to social stressors. **Physiol. Behav**, v.53, p.383-388, 1993.
- ROSANO, G. M. C. *et al.* Effect of estrogen replacement therapy on heart rate variability and heart rate in healthy postmenopausal women. **Am. J. Cardiol**, v.80, n.6., p. 815-817, 1997.
- ROSS, C.A. *et al.* Afferent projections to cardiovascular portions of the nucleus of the tractus solitarius in the rat. **Brain Res**, v. 223, n.2, p. 402-408, 1981.
- ROY, B.N. *et al.* The effects of estrogen and progesterone on corticotropin-releasing hormone and arginine vasopressin Messenger ribonucleic acid levels in the paraventricular nucleus and supraoptic nucleus of the rhesus monkey. **Endocrinology**, v. 140, n.5, p. 2191–2198, 1999.
- ROZANSKI, A. *et al.* Impact of psychological factors on the pathogenesis of cardiovascular disease and implications for therapy. **Circulation**, v.99, n.16, p.2192-217, 1999.
- RUMANTIR, M.S. *et al.* The 'adrenaline hypothesis' of hypertension revisited: evidence for adrenaline release from the heart of patients with essential hypertension. **J Hypertens**, v.18, n.6, p.717–723, 2000.

SALEH, M.C. *et al.* Autonomic and cardiovascular reflex responses to central estrogen injection in ovariectomized female rats. **Brain Res**, v.879, p. 105–114, 2000.

SALEH, T.M.; CONNELL, B.J. Role of oestrogen in the central regulation of autonomic function. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v.34, n.9, p.827-832, 2007.

SAPER, C.B. *et al.* Direct hypothalamo-autonomic connections. **Brain Res**. v.117, n.2, p.305-312, 1976.

SCHLENKER, E. *et al.* Cardiorespiratory and metabolic responses to injection of bicuculline into the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) of conscious rats. **Brain Res**, v.895, n.1/2, p.33-40, 2001.

SCHMIDT, P.J. *et al.* Estrogen replacement in perimenopause-related depression: a preliminary report. **Am. J. Obstet, Gynecol**, v.183, p.414-420, 2000.

SCHREIHOFFER, A.M.; GUYENET, P.G. Baro-activated neurons with pulse-modulated activity in the rat caudal ventrolateral medulla express GAD67 mRNA. **J Neurophysiol**, v.89, p.1265-1277, 2003.

SCHUNKERT, H. *et al.* Effects of estrogen replacement therapy on the renin-angiotensin system in postmenopausal women. **Circulation**, v. 95, p.39-45, 1997.

SELYE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. **Nature**, v. 138, 1936.

SHAFTON, A.D. *et al.* Neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus send collaterals to the spinal cord and to the rostral ventrolateral medulla in the rat. **Brain Res**, v.801, n.1/2, p.239-243, 1998.

SHERWOOD, A. *et al.* Cardiovascular hemodynamics during stress in premenopausal versus postmenopausal women. **Menopause**, v.17, p. 403-409, 2010.

SIMONCINI, T. *et al.* Differential signal transduction of progesterone and medroxyprogesterone acetate in human endothelial cells. **Endocrinology**, v.145, n.12, p.5745-5756, 2004.

SMILEY, D.A.; KHALIL, R.A. Estrogenic compounds, estrogen Receptors and vascular cell signaling in the aging blood vessels. **CurrMed Chem**, v.16, n.15, p.1863-1887, 2009.

SØRENSEN, M.B. *et al.* Temporal changes in clinic and ambulatory blood pressure during cyclic post-menopausal hormone replacement therapy. **J Hypertens**, v.18, n.10, p.1387-1391, 2000.

SPARY, E.J. *et al.* Changes in oestrogen receptor alpha expression in the nucleus of the solitary tract of the rat over the oestrous cycle and following ovariectomy. **J. Neuroendocrinol**, v. 22, n. 6, p. 492-502, 2010.

SPARY, E.J. Oestrogen receptors in the central nervous system and evidence for their role in the control of cardiovascular function. **J Chem Neuroanat**, v.38, n.3 ,p. 185-196, 2009.

SPRINGER, L.N. *et al.* Follicular mechanisms associated with 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced ovotoxicity in rats. **Reprod. Toxicol**, v.10, p.137-143, 1996.

STEENBERGEN, H.L. *et al.* Sex-dependent effects of aversive stimulation on holeboard and elevated plus-maze behavior. **Behav. Brain Res**, v. 43, p. 159-165, 1991.

STOCKER, S.D. *et al.* Water deprivation increases Fos immunoreactivity in PVN autonomic neurons with projections to the spinal cord and rostral ventrolateral medulla. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.287, n.5, p.1172-1183, 2004b.

STOCKER, S.D. *et al.* . Acute inhibition of the hypothalamic paraventricular nucleus decreases renal sympathetic nerve activity and arterial blood pressure in water-deprived rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.286. n.4. p.719-725, 2004a.

SWANSON, L.W.; KUYPERS, H.G. The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods. **J Comp Neurol**, v.194, n.3, p.555-570, 1980.

TAGAWA, T, DAMPNEY, R.A. AT(1) receptors mediate excitatory inputs to rostral ventrolateral medulla pressor neurons from hypothalamus. **Hypertension**, v.34, n.6, p.301-1307, 1999.

THURSTON, R.C. *et al.* Is the association between socioeconomic position and coronary heart disease stronger in women than in men? **Am. J. Epidemiol**, v.162, p.57-65, 2005.

THURSTON, R.C.; KUBZANSKY, L.D. Multiple sources of psychosocial disadvantage and risk of coronary heart disease. **Psychosom. Med**, v.69, p.748-755, 2007.

TIMIO, M. *et al.* Blood pressure in nuns in a secluded order a 30-year follow-up. **Miner Electrolyte Metab**, v. 25, n.1, p. 73-79 ,1999.

ULRICH-LAI Y. M.; HERMAN J. P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. **Nat Rev Neurosci**, Jun;10(6):397-409, 2009.

VALENCIA-HERNANDEZ, I. *et al.* The effects of 17 $\beta$ -oestradiol on increased  $\alpha$ (1)-adrenergic vascular reactivity induced by prolonged ovarian hormone deprivation: the role of voltage-dependent L-type Ca channels. **Pharmacology**. v.90, n.5, p.316-323, 2012.

VAN KEMPEN, T.A. *et al.* Characterization of neural estrogen signaling and neurotrophic changes in the accelerated ovarian failure mouse model of menopause. **Endocrinology**, v.155, n.9, p.3610-3623, 2014.

VAN VLIET, B.N. *et al.* Baroreflex stabilization of the double (pressure-rate) product at 0.05 Hz in conscious rabbits. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.282, p.1746-R1752, 2002.

VANDERHORST, V.G. *et al.* Estrogen receptor-alpha and -beta immunoreactive neurons in the brainstem and spinal cord of male and female mice: relationships to monoaminergic, cholinergic, and spinal projection systems. **J. Comp Neurol**, v. 488, n. 2. p. 152-179, 2005.

VIAU, V.; MEANEY, M.J. Testosterone-dependent variations in plasma and intrapituitary corticosteroid binding globulin and stress

hypothalamic- pituitary–adrenal activity in the male rat. **J. Endocrinol**, v.181, n. 2, p. 223–231, 2004.

WALKER C.D. *et al.* Ontogeny of the stress response in the rat: role of the pituitary and the hypothalamus. **Endocrinology**, v. 118, n. 4, p. 1445-1451, 1986.

WALKER, Q.D. *et al.* Effect of ovarian hormones and estrous cycle on stimulation of the hypothalamo–pituitary–adrenal axis by cocaine. **J. Pharmacol. Exp. Ther**, v. 297, n. 1, p. 291–298, 2001.

WASSTERTHEIL-SMOLLER, S. *et al.* Hypertension and its treatment in postmenopausal women: baseline data from the Women's Health Initiative. **Hypertension**, v.36, p.780-789, 2000.

WATKINS, L.L. *et al.* Is there a glycemic threshold for impaired autonomic control? **Diabetes Care**, v.23, p.826-830, 2000.

WEINSTOCK, M. *et al.* Baroreflex sensitivity and susceptibility to systolic hypertension induced by DOCA-salt in the Sabra rat. **Am J Physiol**, v.246, p. 448-452, 1984

WHITE, M. M. *et al.* Estrogen, progesterone, and vascular reactivity: potential cellular mechanisms. **Endocr. Rev**, v.16, n.6, p. 739-751, 1995.

WHITE, W.B. Effects of the hormone therapy, drospirenone and 17-beta estradiol, on early morning blood pressure in postmenopausal women with hypertension. **J Am Soc Hypertens**, v. 2, n. 1, p. 20-27, 2008.

WHITE, W.B. *et al.* Drospirenone with 17beta-estradiol in the postmenopausal woman with hypertension. **Climacteric**, v.1, p.25-31, 2007.

WHITE, W.B. *et al.* Effects of a new hormone therapy, drospirenone and 17-beta-estradiol, in postmenopausal women with hypertension. **Hypertension**, v.48, n.2, p.246-253, 2006.

WIINBERG, N. *et al.* 24-h ambulatory blood pressure in 352 normal Danish subjects, related to age and gender. **Am J Hypertens**, v.8, p.978-986, 1995.

WILLNER, P. *et al.* Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. **Psychopharmacology**, v.93, n.3, p.358-64, 1987.

WILLNER, P. *et al.* Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. **Psychopharmacology (Berl)**, v.93, p.358-364, 1987

WISE, P.M. *et al.* Neuroendocrine modulation and repercussions of female reproductive aging. **Recent Prog. Horm. Res.**, v.57, p.235-256, 2002.

WOODMANSEE, W.W. *et al.* Factors that modulate inescapable shock-induced reductions in daily activity in the rat. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 45, p. 553-559, 1993.

WU, J.M. *et al.* Ovarian aging and menopause: current theories, hypotheses, and research models. **Exp. Biol. Med. (Maywood)**, v.230, p.818-828, 2005.

XUE, B. *et al.* Estrogen receptor- $\beta$  in the paraventricular nucleus and rostromedial lateral medulla plays an essential protective role in aldosterone/salt-induced hypertension in female rats. **Hypertension**, v. 61, n. 6, p. 1255-1262, 2013.

XUE, B. *et al.* Estrogen receptor-alpha mediates estrogen protection from angiotensin II-induced hypertension in conscious female mice. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 292, n.4, p. 1770-1776, 2007.

XUE, B. *et al.* Sex differences in the development of angiotensin II-induced hypertension in conscious mice. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.200, n. 5, p.2177-2184, 2005.

YANES, L.L. *et al.* Postmenopausal hypertension: role of the Renin-Angiotensin system. **Hypertension**, v.56, p.359-363, 2010.

ZAYDUN, G. *et al.* Menopause is an independent factor augmenting the age-related increase in arterial stiffness in the early postmenopausal phase. **Atherosclerosis**, v. 184, n. 1, p. 137-142, 2006.



ZHANG, K.; PATEL, K.P. Effect of nitric oxide within the paraventricular nucleus on renal sympathetic nerve discharge: role of GABA. **Am. J. Physiol**, v.275, n.3/2, p.728-734, 1998.

ZHANG, W.Y. *et al.* Chronic unpredictable mild stress affects myocardial metabolic profiling of SD rats. **J. Pharm. Biomed. Anal**, v.70, p.534-538, 2012.

ZHANG, Y.; DAVIDGE, S.T. Effect of estrogen replacement on vasoconstrictor responses in rat mesenteric arteries. **Hypertension**, v.34, n.5, p. 1117-1122, 1999.

ZHANG, W.Y. *et al.* Chronic unpredictable mild stress affects myocardial metabolic profiling of SD rats. **J. Pharm. Biomed**, v.70, p.534-538, 2012.

ZHENG, C.; ZHANG, T. Alteration of phase–phase coupling between theta and gamma rhythms in a depression-model of rats. **Cogn Neurodyn**, v.7, n.2, p.167-172, 2013.

ZOCCAL, D.B. *et al.* Sympathetic-mediated hypertension of awake juvenile rats submitted to chronic intermittent hypoxia is not linked to baroreflex dysfunction. **Exp Physiol**, v.94, p.972-983, 2009.

## LISTA DE ANEXOS

### ANEXO 1. Protocolo de aprovação do comitê de ética no uso de animais (1)

<http://notes.ufsc.br/aplic/ceua.ms/fv/Resultados/25422f6fE6E694A4>.

**Resultado de Solicitação de Protocolo**

**Protocolo**  
 PP00832  
**Título**  
 Alterações Cardiovasculares e Autonômicas em Modelos Experimentais de Intolerância à Glicose  
**Data de Entrada**  
 25/09/2012

**Resultado:**  
 Aprovado  
**Data/Prazo**  
 07/12/2012

**Considerações**  
 Ofício nº 124/CIUEA/PRPE/2012  
 Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA  
 Ao(s): Prof(a) Dr(a) Domitila Augusta Haber, Departamento de Ciências Fisiológicas - CCB

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por três anos, para a utilização de ceticas rates (*Rattus Norvegicus*).

- Procedência do animal: Biotério Central da UFSC

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

**Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento de apresentação de um novo protocolo)**

**Data 14/03/2016**

Data 14/12/2012

**Paracar[ee]:**



**Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.**  
**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC**  
**PRESIDENTE**

[Abrir Solicitação](#) [Criar Relatório](#)



[Paracar1\\_PP00832.pdf](#)



[Paracar2\\_PP00832.pdf](#)

## ANEXO 2. Protocolo de aprovação do comitê de ética no uso de animais (2)

### Resultado de Solicitação de Protocolo

**Protocolo**  
PP00842  
**Título**  
Procedimentos para o uso de animais experimentais no Laboratório de Neuroendocrinologia da Reprodução  
**Data de Entrada**  
20/12/2012  
**Resultado:**  
Aprovado  
**Data / Prazo**  
03/05/2013

**Considerações**  
Ofício nº 023/CEUA/PROPESQ/2013  
Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA  
Ao(s): Prof(a) Dr(a) Fernanda Barbosa Lima Christian, Depto. Ciências Fisiológicas - CCB  
Prezdo(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por quatro anos, para a utilização de quinhentos ratos (Wistar) fêmeas.

- Procedência do animal: Biotério Central

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

**Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)**  
**Data 03/08/2017**

Data 07/05/2013

**Parecer(es):**



Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC  
PRESIDENTE

   
[Parecer01\\_PP00842.pdf](#) [Parecer02\\_PP00842.pdf](#)

   
[Resposta\\_Pesquisador\\_PP00842.pdf](#) [Parecer\\_Final\\_PP00842.pdf](#)