

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Ciências Fisiológicas
Laboratório de Estudos Neuroendócrinos e Cardiovasculares
Curso de Graduação em Ciências Biológicas
Trabalho de Conclusão de Curso

*Efeitos da falha ovariana induzida quimicamente
com 4-vinilciclohexano diepóxido em ratas:
avaliação de reflexos cardiovasculares*

Darlan da Silva Bazilio
Orientadora: Profa. Dra. Domitila Augusta Huber

Florianópolis, 2015

Darlan da Silva Bazilio

*Efeitos da falha ovariana induzida quimicamente
com 4-vinilciclohexano diepóxido em ratas:
avaliação de reflexos cardiovasculares*

Trabalho de conclusão de curso da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do título de licenciatura em Ciências Biológicas, sob a orientação da professora Dra. Domitila Augusta Huber.

Florianópolis, 2015

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à minha mãe e meu pai,
por todo o apoio, amor e educação que me deram.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha gratidão:

-a Profa. Dra. Domitila Huber pela oportunidade que me concedeu para desenvolvimento deste trabalho, pela prestatividade e por todos os ensinamentos;

- ao Prof. Dr. Alex Rafacho pelo espaço e pelo material laboratorial fornecido para execução desta pesquisa;

- a UFSC pelo apoio e suporte à graduação;

- a todos os Professores com quem tive aulas e que participaram de minha trajetória no curso de Biologia;

- aos membros da banca pela atenção e pela disponibilidade em fazer parte da avaliação deste trabalho;

- aos meus amigos da Biologia e a minha namorada Cristiane dos Santos, que sempre estiveram ao meu lado, participaram de muitos momentos e acompanharam minha formação;

- a minha mãe, meu pai e meu irmão, pelo amor, carinho, acolhimento, exemplo, força e tudo mais que fizeram por mim.

RESUMO

A hipertensão arterial (HA) está relacionada com o aumento da incidência de doenças cardiovasculares após a menopausa. Alterações no tônus autonômico e nos controles reflexos cardiovasculares podem ter papel na gênese da HA. Os esteroides ovarianos possuem efeito cardioprotetor, porém o advento da menopausa é acompanhado de reduções nos níveis plasmáticos desses hormônios, tornando a menopausa um período de risco para o desenvolvimento de HA e complicações cardíacas. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da falha ovariana prematura (perimenopausa) e estabelecida (menopausa) em ratas sobre valores basais de pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC), assim como sobre o tônus simpático para manutenção da PA, o barorreflexo, o quimiorreflexo e o reflexo de Bezold-Jarisch. Ratas Wistar com 28 dias de idade foram tratadas diariamente com 4-vinilciclohexano diepóxido (160mg/kg) que, como já descrito na literatura, induz depleção dos folículos ovarianos, ou óleo placebo por 15 dias. Os experimentos foram conduzidos após 80 e 180 dias do início do tratamento. Os animais foram divididos aleatoriamente nos grupos VCD80 (perimenopausa, $n = 10$), CTL80 (controle, $n = 9$), VCD180 (menopausa, $n = 7$) e CTL180 (controle, $n = 9$). No dia anterior aos experimentos, as ratas foram anestesiadas com cetamina (90 mg/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/kg, i.p.) para implante de cânulas de polietileno na artéria e veia femorais, por onde a PA foi registrada e drogas foram administradas, respectivamente. As cânulas foram conduzidas por baixo da pele e exteriorizadas entre as escápulas. No dia dos experimentos, a PA foi registrada com o animal livre e consciente, a uma frequência de aquisição de 1 kHz e com a cânula arterial conectada a um transdutor de pressão acoplado a um sistema de aquisição de dados com base em computador. Os valores de PA média (PAM) e FC foram simultaneamente e continuamente registrados a partir da PA pulsátil (PAP). Os valores basais de PAM, PA diastólica (PAD), PA sistólica (PAS) e FC não foram diferentes entre os grupos VCD80 e CTL80 ou VCD180 e CTL180. Quando comparado ao CTL80, o grupo VCD80 apresentou uma redução discreta na taquicardia barorreflexa induzida por nitroprussiato de sódio (NPS) ($4,12 \pm 0,3$ vs. $3,15 \pm 0,29$ bpm/mmHg, $P < 0,05$) e uma resposta pressora menor no quimiorreflexo induzido por cianeto de potássio (KCN) ($50,88 \pm 3,88$ vs. $28,89 \pm 5,03$ mmHg, $P < 0,01$). Já as ratas do grupo VCD180, em comparação com CTL180, apresentaram: queda maior da PAM após

bloqueio ganglionar com hexametônio ($-43,14 \pm 3,12$ vs. $-34,33 \pm 2,63$ mmHg, $P < 0,05$); redução da sensibilidade do barorreflexo (SBR) para bradicardia induzida por fenilefrina (FE) ($-1,35 \pm 0,14$ vs. $-2,01 \pm 0,24$ bpm/mmHg, $P < 0,05$) e taquicardia induzida por NPS ($3,00 \pm 0,46$ vs. $4,63 \pm 0,43$ bpm/mmHg, $P < 0,05$), assim como prejuízo da sensibilidade do barorreflexo avaliado por meio de flutuações espontâneas da PA ($1,33 \pm 0,09$ vs. $2,08 \pm 0,20$ ms/mmHg para bradicardia, $P < 0,01$; e $1,21 \pm 0,11$ vs. $1,97 \pm 0,21$ ms/mmHg para taquicardia, $P < 0,01$); quimiorreflexo comparável; e maior resposta hipotensora no reflexo de Bezold-Jarisch ($-22,14 \pm 3,14$ vs. $-13,33 \pm 2,63$ mmHg, $P < 0,05$). Apesar de PAM, PAD, PAS e FC não terem se alterado nos períodos de 80 e 180 dias, nossos dados sugerem que a depleção química dos folículos ovarianos pode aumentar significativamente a atividade simpática para manutenção da PA basal após 180 dias, assim como reduzir a SBR e o ganho de outros reflexos cardiovasculares, possivelmente devido a variações nos níveis dos esteroides ovarianos com perda de seus efeitos protetores sobre áreas de controle cardiovascular no tronco cerebral, podendo estas alterações participarem da patogênese da hipertensão na menopausa.

Palavras-chave: VCD, perimenopausa, menopausa, reflexos cardiovasculares.

ABSTRACT

Hypertension is associated with an increased incidence of cardiovascular disease after menopause. Changes in autonomic tone and cardiovascular reflex controls can play a role in the genesis of hypertension. Although the ovarian steroids have cardioprotective effects, the advent of menopause is accompanied by decreases in plasma levels of these hormones, which increases the risk for developing hypertension and cardiac complications after this period. This work aimed to evaluate the effects of premature (perimenopause) and established (menopause) ovarian failure on baseline arterial pressure (AP) and heart rate (HR), sympathetic tone over AP, baroreflex, chemoreflex, and Bezold-Jarisch reflex. 28-day-old female Wistar rats were treated daily with 4-vinylcyclohexene diepoxide (160mg/kg) (which induces depletion of ovarian follicles, as described in the literature) or placebo oil for 15 days. Experiments were conducted 80 and 180 days after the onset of treatment. Animals were divided randomly into the following groups: VCD80 (perimenopause, $n = 10$), CTL80 (control, $n = 9$), VCD180 (menopause, $n = 7$) and CTL180 (control, $n = 9$). The day before the experiments, rats were anesthetized with ketamine (90 mg/kg, i.p.) and xylazine (10 mg/kg, i.p.) to implant polyethylene cannulas into the femoral artery and vein, so that blood pressure could be recorded and drugs infused, respectively. Cannulas were tunneled beneath the skin and exteriorized between the scapulae. On the day of the experiments, AP was recorded with the animal freely moving, at a sampling rate of 1 kHz, and with the arterial cannula connected to a pressure transducer coupled to a computer-based acquisition system. Mean AP (MAP) and HR values were simultaneously and continuously recorded from the pulsatile AP (PAP). Baseline MAP, diastolic AP (DAP), systolic AP (SAP) and HR were not different between VCD80 and CTL80 or VCD180 and CTL180. Compared to CTL80, VCD80 showed a slight decrease in sodium nitroprusside-induced baroreflex tachycardia (4.12 ± 0.3 vs. 3.15 ± 0.29 bpm/mmHg, $P < 0.05$) and an attenuated potassium cyanide-induced pressor response (chemoreflex) (50.88 ± 3.88 vs. 28.89 ± 5.03 mmHg, $P < 0.01$). VCD180 group, when compared to CTL180, exhibited augmented decrease in MAP after hexamethonium-induced ganglionic blockade (-43.14 ± 3.12 vs. -34.33 ± 2.63 mmHg, $P < 0.05$); reduced phenylephrine-evoked baroreflex bradycardia (-1.35 ± 0.14 vs. -2.01 ± 0.24

bpm/mmHg, $P<0.05$) and sodium nitroprusside-evoked tachycardia (3.00 ± 0.46 vs. 4.63 ± 0.43 bpm/mmHg, $P<0.05$), as well as impaired baroreflex sensitivity evaluated by spontaneous AP fluctuations (1.33 ± 0.09 vs. 2.08 ± 0.20 ms/mmHg bradycardia, $P<0.01$, and 1.21 ± 0.11 vs. 1.97 ± 0.21 ms/mmHg tachycardia, $P<0.01$); comparable chemoreflex responses; and augmented hypotensive response in the Bezold-Jarisch reflex (-22.14 ± 3.14 vs. -13.33 ± 2.63 mmHg, $P<0.05$). Although MAP, DAP, PAS and HR remained unchanged after 80 and 180 days, our data suggest that chemical depletion of ovarian follicles may significantly increase basal sympathetic activity after 180 days, as well as reduce BRS and other reflex responses. This may be due to variations on ovarian steroids levels and loss of their protective effect on cardiovascular control centers in the brainstem. These changes may play role in the pathogenesis of hypertension in menopause.

Keywords: VCD, perimenopause, menopause, cardiovascular reflexes.

LISTA DE ABREVIATURAS

HA	Hipertensão arterial
E	Estrogênio
P	Progesterona
PA	Pressão arterial
FE	Fenilefrina
KCN	Cianeto de potássio
NTS	Núcleo do trato solitário
NA	Núcleo ambíguo
NMDV	Núcleo motor dorsal do vago
BVLC	Bulbo ventrolateral caudal
BVLR	Bulbo ventrolateral rostral
SBR	Sensibilidade (ganho) do barorreflexo
FC	Frequência cardíaca
FSH	Hormônio folículo estimulante
LH	Hormônio luteinizante
VCD	4-vinilciclohexano diepóxido
PAP	Pressão arterial pulsátil
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
PAS	Pressão arterial sistólica
5-HT	5-hidroxitriptamina (serotonina)
IP	Intervalo de pulso
EPM	Erro padrão da média
NOS	Óxido nítrico-sintase
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
NO	Óxido nítrico
i.p.	Intraperitoneal

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do protocolo experimental.....	20
Figura 2. Exemplo de resposta bradicárdica e pressora em um registro após injeção de fenilefrina.....	21
Figura 3. Exemplo de resposta taquicárdica e hipotensora em um registro após injeção de nitroprussiato de sódio.....	22
Figura 4. Exemplo de resposta bradicárdica e pressora em um registro após injeção de cianeto de potássio.....	23
Figura 5. Exemplo de resposta bradicárdica e hipotensora em um registro após injeção de serotonina.....	24
Figura 6. Exemplo de resposta hipotensora em um registro após injeção de hexametônio.	25
Figura 7. Alterações na pressão arterial média promovidas pela administração intravenosa de hexametônio.....	27
Figura 8. Índice do barorreflexo calculado pela divisão da alteração da frequência cardíaca pela alteração da pressão arterial.....	28
Figura 9. Ganho do barorreflexo espontâneo.....	29
Figura 10. Componentes pressórico e bradicárdico do quimiorreflexo produzidos pela injeção de cianeto de potássio.....	30
Figura 11. Componentes pressórico e bradicárdico do reflexo de Bezold–Jarisch produzidos pela injeção serotonina.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros Basais. 27

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Justificativa	16
2. OBJETIVOS.....	18
2.1 Objetivos Gerais.....	18
2.2 Objetivos Específicos.....	18
3. METODOLOGIA.....	18
3.1 Animais.....	18
3.2 Desenho Experimental	19
3.3 Desenvolvimento do modelo experimental de menopausa com VCD	19
3.4 Registros da pressão arterial e da frequência cardíaca.....	19
3.5 Análise do controle reflexo da PA e da FC.....	21
3.6 Análise estatística.....	26
4. RESULTADOS	26
5. DISCUSSÃO.....	32
6. CONCLUSÕES.....	38
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares representam hoje um problema importante de saúde pública em todo o mundo. A hipertensão arterial (HA) é um dos fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, cerebrovasculares e renais, sendo responsável por cerca de 40% dos óbitos por acidente vascular cerebral e por 25% das mortes por doença arterial coronariana (BRASIL, Ministério da Saúde, 2006).

Segundo a Sociedade Brasileira de Hipertensão (SBH) (2010), os homens até 50 anos de idade são mais afetados por HA que mulheres na mesma faixa etária, porém este quadro se inverte após esse período. Além disso, de acordo com o HIPERDIA, o maior número de pacientes hipertensos encontra-se na faixa etária entre 50–59 anos e 60–69 anos, ou seja, na faixa etária aproximada em que as mulheres se encontram na menopausa. Dessa forma, torna-se importante o estudo de HA em mulheres, especialmente no período da menopausa.

A menopausa é caracterizada pelo declínio dos níveis circulantes de estrógeno (E) e progesterona (P), e estudos recentes demonstram um efeito neuroprotetor dos esteroides ovarianos (BETHEA et al. 2009; LIMA; BETHA, 2009). A incidência das doenças cardiovasculares aumenta significativamente com a instalação da menopausa, sendo uma das principais causas da morte de mulheres nesta faixa etária. A mortalidade por doenças cardiovasculares cresce progressivamente com aumentos de pressão arterial (PA). A PA, constatada pelo Framingham Study, na qual a seqüela cardiovascular já aparece, é 130/80 mmHg (KANNEL, 2000). Em 2001, em torno de 7,6 milhões de mortes ocorreram em todo o mundo, aproximadamente 14% foram atribuídas aos níveis elevados de PA sistólica (LAWES; HOORN; RODGERS, 2008).

Durante grande parte da vida as mulheres apresentam PA mais baixa comparadas a homens da mesma idade (BURT et al. 1995; WIINBERG et al. 1995). No entanto, com o advento da menopausa ocorre um aumento da PA (ONG et al., 2008). Comparadas às mulheres na fase pré-menopausa, as menopausadas têm o dobro de risco de desenvolverem doenças cardiovasculares (ATSMA et al., 2006). De acordo com pesquisa realizada em 2010 pelo NCHS (National Center for Health Statistics, 2011) nos Estados Unidos, 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., 2004). Isso sugere que os mecanismos de controle da PA possam ser diferentes entre homens e mulheres. Assim, com o início da menopausa as mulheres perdem a ação protetora dos esteroides ovarianos contra as doenças cardiovasculares [para revisão ver (KALLEN; PAL, 2011)], o que contribui para o risco de desenvolvimento destas doenças e torna-se, portanto, uma importante questão de saúde pública.

O presente trabalho ressalta a importância do estudo de alterações do controle da PA, na progressão da menopausa, para entendermos os mecanismos que levam a possíveis aumentos da PA em mulheres nesta fase. O barorreflexo é o principal mecanismo de controle da PA em curto prazo e opera por meio de sensores (mecanorreceptores denominados de barorreceptores) localizados nas artérias carótidas e arco aórtico e que são estimulados pelo estiramento da parede desses vasos em condições de aumento da PA (CHAPLEAU et al. 1995). As informações geradas por esses receptores são conduzidas pelo nervo depressor aórtico e sinusal até uma importante região da superfície dorsal do bulbo denominada de 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 (NA) e núcleo motor dorsal do vago (NMDV), por meio de uma projeção excitatória, controlando o tônus vagal (sistema nervoso parassimpático) sobre o coração (DAMPNEY, 1994). Além disso, do NTS partem também projeções excitatórias para os neurônios gabaérgicos da região caudal ventrolateral do bulbo (bulbo ventrolateral caudal, BVLC) (GUYENET, 2006; SCHREIHOFER; GUYENET, 2002) os quais exercem ação inibitória tônica sobre os neurônios pré-motores simpáticos da região rostral ventrolateral do bulbo (bulbo ventrolateral rostral, BVLR) (HUBER; SCHREIHOFER, 2011; SCHREIHOFER; GUYENET, 2002). Assim, o comprometimento da função do barorreflexo pode atuar como elemento permissivo ao estabelecimento de alterações primárias de outros mecanismos de controle da função cardiovascular, por não modular a atividade autonômica simpática e parassimpática de modo adequado (IRIGOYEN et al., 1995).

O E é capaz de modular diretamente a função autonômica e o barorreflexo nos grupos neuronais do tronco encefálico, principalmente no NTS (HE et al., 1998; SALEH;

CONNELL; SALEH, 2000a, 2000b; PAMIDIMUKKALA et al, 2003). A reposição com E em ratas ovariectomizadas inclusive já foi demonstrada como supressora no desenvolvimento de hipertensão (SASAKI et al., 2000). Além disso, é sabido que a sensibilidade do controle barorreflexo (SBR) varia de acordo com o ciclo menstrual em mulheres e ciclo estral em ratas (GOLDMAN et al., 2009), assim como a expressão de receptores para E no NTS (SPARY; MAQBOOL; BATTEN, 2010) e possivelmente em outros núcleos de controle cardiovascular. Portanto, variações da PA, frequência cardíaca (FC) e o barorreflexo acompanham as flutuações dos níveis circulantes de E no ciclo estral e após ovariectomia.

Além de determinar o comprometimento do controle barorreflexo durante a progressão da menopausa, o presente estudo também avaliou outros importantes reflexos envolvidos no controle da PA, tais como o quimiorreflexo e o reflexo de Bezold-Jarish. O quimiorreflexo inclui quimiorreceptores localizados nos corpos carotídeos e aórticos e são sensíveis a variações na composição química do sangue arterial, incluindo diminuição na pressão parcial do gás oxigênio (PO_2), aumento da pressão parcial de dióxido de carbono (PCO_2) ou queda do pH sanguíneo, podendo ser estimulados também por drogas específicas. Via nervos glossofaríngeo e vago, as fibras aferentes desses receptores terminam no NTS, de onde partem projeções estimulatórias diretas ao BVLN, assim como ao centro vagal (DAMPNEY, 1994). O quimiorreflexo induz, portanto, aumento da atividade simpática (e consequentemente resposta pressora) mediada pela ativação glutamatérgica de neurônios pré-motores simpáticos localizados no BVLN, e resposta bradicárdica mediada pelo sistema nervoso parassimpático (BARROS et al. 2002). Já o reflexo de Bezold-Jarish, de acordo com Mark (1983), se origina em receptores sensoriais cardíacos e se propaga por vias amielinizadas (fibras C) vagais ao serem estimulados por distensão mecânica das câmaras cardíacas ou substâncias químicas. A ativação desses receptores ativa aferências vagais com respostas semelhantes aos mecanoreceptores arteriais (barorreceptores) descritos anteriormente, uma vez que a integração no bulbo envolve os mesmos núcleos de controle cardiovascular. Portanto, o reflexo de Bezold-Jarish envolve ativação do sistema nervoso parassimpático e concomitante inibição simpática, evocando resposta bradicárdica e hipotensora (CALLERA et al., 2005). Sugere-se que respostas cardiovasculares exacerbadas a estímulos simpato-excitatórios ou reduzidas aos estímulos simpato-inibitórios possam ter

importância no desenvolvimento de hipertensão, porém, pouco se sabe sobre as alterações desses reflexos durante a progressão da menopausa.

A hipertensão na menopausa tem múltiplas etiologias e o fato de mulheres menopausadas 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 para mulheres. Sabemos que a longevidade dessa população de mulheres menopausadas é alta e, portanto, é necessário que se busque melhorias nas terapias para hipertensão e conseqüentemente na prevenção do surgimento de doenças cardiovasculares associadas, para que haja melhoria na qualidade de vida destas mulheres.

1.1 Justificativa

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. Evidências suportam o modelo experimental com os roedores: 1) o evento que antecede a menopausa, o aumento dos níveis plasmáticos de hormônio folículo estimulante (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 dos níveis de E, eles permanecem constantes ou até mesmo aumentados; e 5) ocorre uma atenuação da habilidade do E em estimular os picos de LH, tanto em mulheres na perimenopausa quanto em ratas de “meia-idade” [para revisão: (WISE et al., 2002)]. Por todas essas razões, os roedores vêm sendo considerados excelentes 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 1 ano (WU et al. 2005). A perimenopausa é definida como o período entre o advento de um aumento da variabilidade da duração do ciclo menstrual e o

12º mês de amenorreia. O aumento da variabilidade da duração do ciclo é definido como uma diferença persistente de 7 dias ou mais na duração de ciclos consecutivos, sendo considerado persistência se ocorre pelo menos em 10 ciclos a partir do primeiro (HARLOW et al. 2012). Em mulheres, os níveis de FSH começam a aumentar no período final da perimenopausa (BURGER et al. 1998), possivelmente em decorrência de um reduzido feedback negativo de inibina ou E sobre o eixo hipotálamo-hipófise para secreção de FSH. Infelizmente, o modelo mais usado para estudo da menopausa é o da ovariectomia, o qual não mimetiza a progressão natural da perimenopausa para a menopausa, um processo gradual pelo qual a maioria das mulheres passa entre as idades de 40 a 45 anos.

Como alternativa, um novo 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 um animal depletado de folículos, mas que retém tecido ovariano residual, assim como ocorre na mulher menopausada (KAO; SIPES; HOYER, 1999; MAYER et al., 2004; SPRINGER et al. 1996). Com doses diárias de 160mg/kg (i.p.) por 15 dias, níveis aumentados de FSH têm sido observados após 90 dias do início da exposição (REIS et al., 2014), porém não após 80 dias, caracterizando a transição de perimenopausa para menopausa. Essa droga destrói seletivamente os folículos primordiais e primários por meio da aceleração do processo natural de atresia folicular (apoptose). Portanto, a falha ovariana prematura ocorre pela depleção dos folículos ovarianos e conseqüentemente leva à queda dos níveis de E e P, já que os folículos são os principais produtores dos hormônios ovarianos. Assim, este é um modelo bastante interessante para se fazer inferências sobre a dinâmica da perda folicular e seus efeitos nas mulheres em menopausa. Sendo assim, nosso principal objetivo foi caracterizar a função cardiovascular em ratas com falha ovariana induzida pelo tratamento com VCD, um modelo que permite estudos sobre os mecanismos de ação dos esteroides ovarianos na regulação da função cardiovascular.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Este trabalho teve como objetivo avaliar se a falha ovariana induzida quimicamente com VCD promove alterações cardiovasculares em ratas nos períodos de 80 dias (perimenopausa) e 180 dias (menopausa) após o início do tratamento.

2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos deste trabalho constituíram a determinação de PAM, PAS, PAD e FC basais; determinação da sensibilidade ou ganho do barorreflexo (espontâneo e evocado pela administração de drogas vasoativas); determinação da resposta pressórica e bradicárdica evocada pelo quimiorreflexo; determinação da resposta simpato-inibitória evocada pela estimulação do reflexo de Bezold-Jarish, e avaliação da contribuição do sistema nervoso simpático para a manutenção da PA.

3. METODOLOGIA

3.1 Animais

No presente estudo, foram utilizadas 40 ratas Wistar, de 28 dias de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Campus Trindade, Florianópolis, SC. As ratas foram mantidas em gaiolas plásticas (30 x 19 x 13 cm) sob um ciclo claro-escuro de 12h (luzes acesas às 06:00h) e temperatura controlada (22 ± 1 C). Água e ração foram oferecidos ad libitum. Os protocolos e procedimentos experimentais relativos a este trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC (P00832 e PP00842).

3.2 Protocolo Experimental

Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais, conforme mostra a Figura 1:

- 1) Grupo VCD 80 dias (perimenopausa) (VCD80): ratas tratadas com VCD aos 28 dias de idade por 15 dias consecutivos foram estudadas 80 dias após o início do tratamento ($n = 10$).
- 2) Grupo controle 80 dias (perimenopausa) (CTL80): ratas tratadas com óleo aos 28 dias de idade por 15 dias consecutivos foram estudadas 80 dias após o início do tratamento ($n = 9$).
- 3) Grupo VCD 180 dias (menopausa) (VCD180): ratas tratadas com VCD aos 28 dias de idade por 15 dias consecutivos foram estudadas 180 dias após o início do tratamento ($n = 7$).
- 4) Grupo controle 180 dias (perimenopausa) (CTL180): ratas tratadas com óleo aos 28 dias de idade por 15 dias consecutivos foram estudadas 180 dias após o início do tratamento ($n = 9$).

3.3 Desenvolvimento do modelo experimental de menopausa com VCD

Quando as fêmeas atingiram 28 dias de vida o tratamento com VCD foi iniciado. Cada fêmea recebeu uma injeção diária intraperitoneal contendo 4-vinilciclohexano diepóxido, 160mg/kg (VCD, Sigma, V3630) ou óleo de milho (grupo controle, CTL) por 15 dias consecutivos. A dose escolhida, a via e o período de administração foram baseados em estudos prévios (MAYER et al., 2004; REIS et al., 2014).

3.4 Registros da pressão arterial e da frequência cardíaca

Um dia antes dos registros, os animais foram anestesiados com cetamina (90 mg/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/kg, i.p.) para o implante de cânulas de polietileno (PE-10 conectado ao PE-50, Clay Adams, Parsippany, NJ, EUA) na artéria e veia femorais. As cânulas foram exteriorizadas no dorso do animal com auxílio de um trocater. Após a cirurgia, os animais foram acondicionados na sala do experimento em gaiolas individuais, sob supervisão constante durante o período de recuperação anestésica. Em estado consciente e

movimentando-se, esses animais foram mantidos em condições controladas de luminosidade, temperatura e exaustão durante 24h para recuperação, com ração e água ad libitum.

No dia seguinte ao procedimento cirúrgico, a cânula arterial foi 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, Australia) 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, Australia). 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. 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.

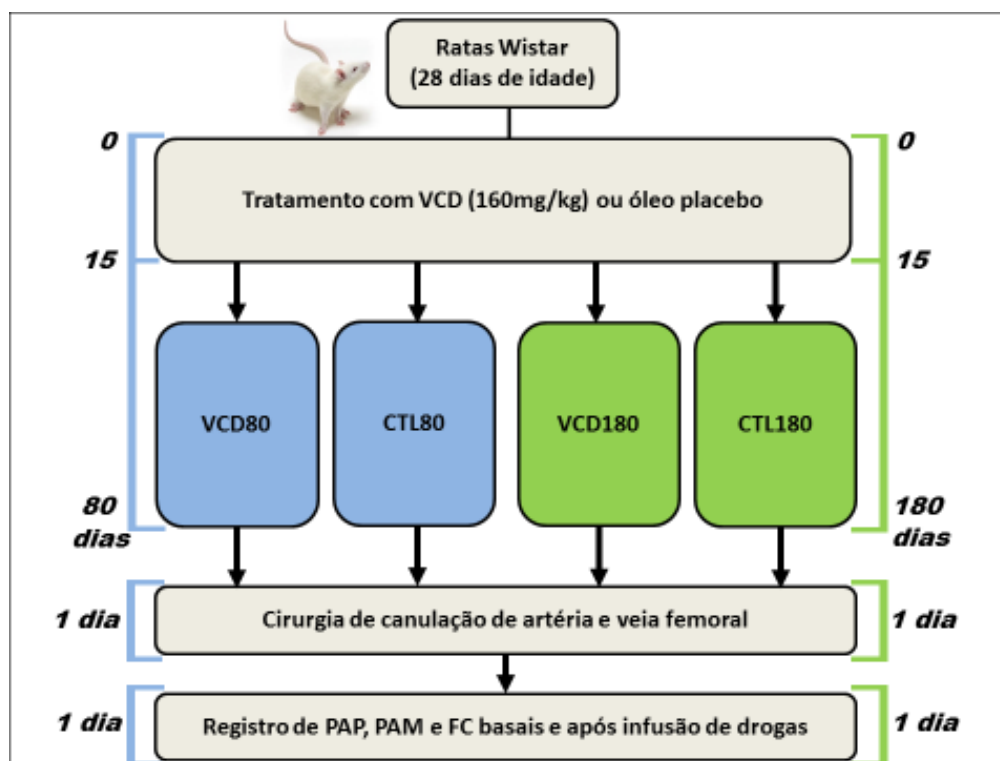


Figura 1. Representação esquemática do protocolo experimental. PAP = pressão arterial pulsátil; PAM = pressão arterial média; FC = frequência cardíaca; VCD = 4-vinilciclohexano diepóxido.

3.5 Análise do controle reflexo da PA e da FC

Após o registro da PAP, PAM e da FC durante 30 minutos estáveis, os reflexos cardiovasculares foram avaliados como descrito abaixo.

O barorreflexo e outros importantes reflexos que controlam a PA foram estudados através da evocação por drogas vasoativas. Adicionalmente, avaliamos a contribuição do sistema nervoso simpático na ação vasoconstritora em ratas na perimenopausa e na pós-menopausa.

- Barorreflexo: Foi determinado por meio da injeção intravenosa de drogas vasoativas. A administração intravenosa de fenilefrina (FE, 8 $\mu\text{g}/\text{kg}$, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), um agonista α_1 adrenérgico, evocou uma breve elevação da pressão arterial em torno de 50 mmHg, gerando uma resposta de bradicardia reflexa (Figura 2). Por outro lado, a administração intravenosa de nitroprussiato de sódio (NPS, 32 $\mu\text{g}/\text{kg}$, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), um doador de óxido nítrico, evocou uma breve redução da pressão arterial, em torno de 50 mmHg, gerando uma resposta de taquicardia reflexa (Figura 3).

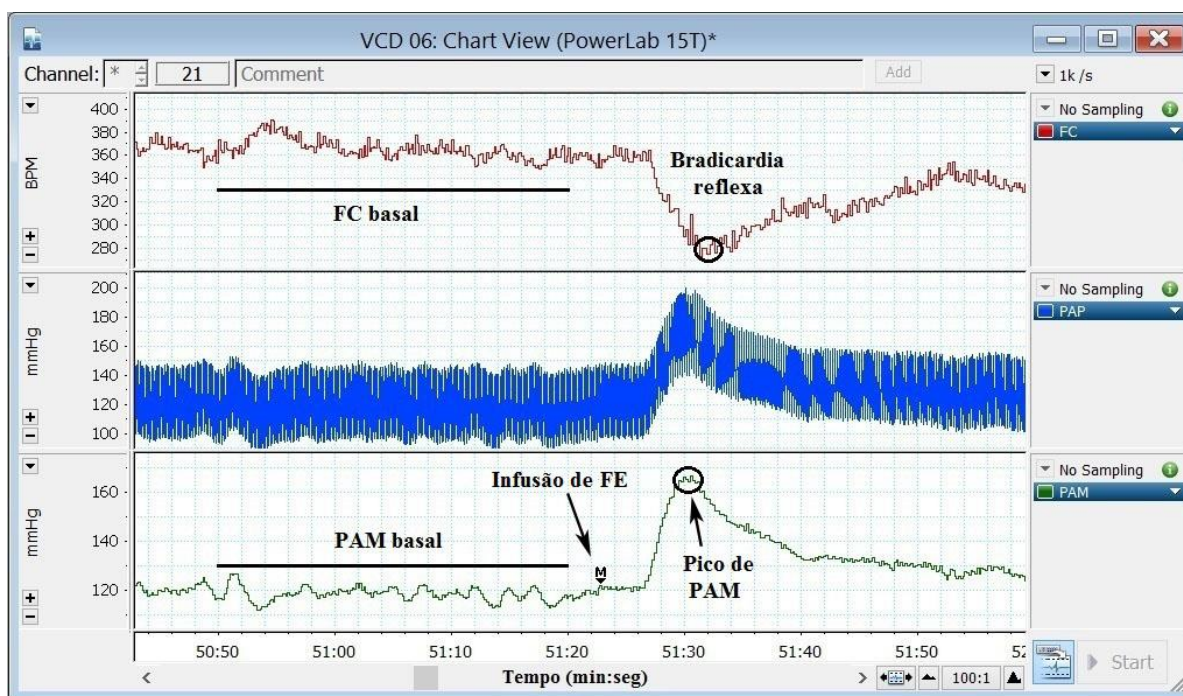


Figura 2. Exemplo de resposta bradicárdica e pressora em um registro após injeção em *bolus* (50 μl) de fenilefrina (FE). PAP = pressão arterial pulsátil; PAM = pressão arterial média; FC = frequência cardíaca.

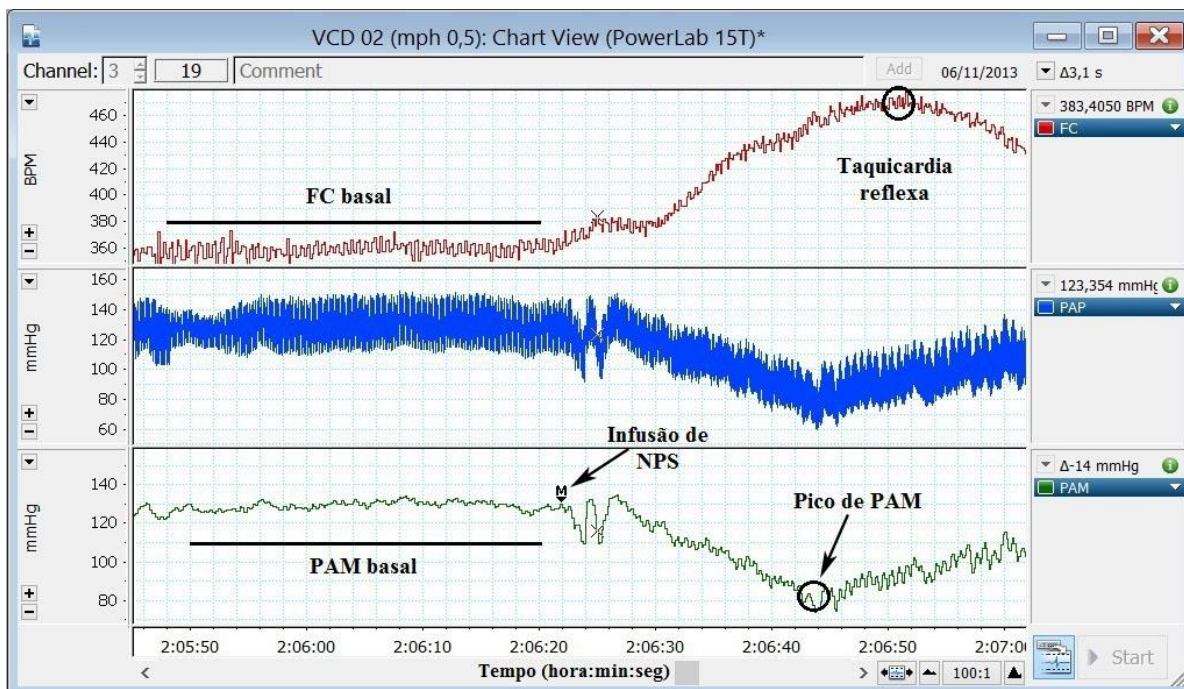


Figura 3. Exemplo de resposta taquicárdica e hipotensora em um registro após injeção em *bolus* (50 μ l) de nitroprussiato de sódio (NPS). PAP = pressão arterial pulsátil; PAM = pressão arterial média; FC = frequência cardíaca.

- Quimiorreflexo: Foi determinado por meio de injeção intravenosa de cianeto de potássio (KCN, 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), que evocou breve resposta pressora e bradicárdica (Figura 4).

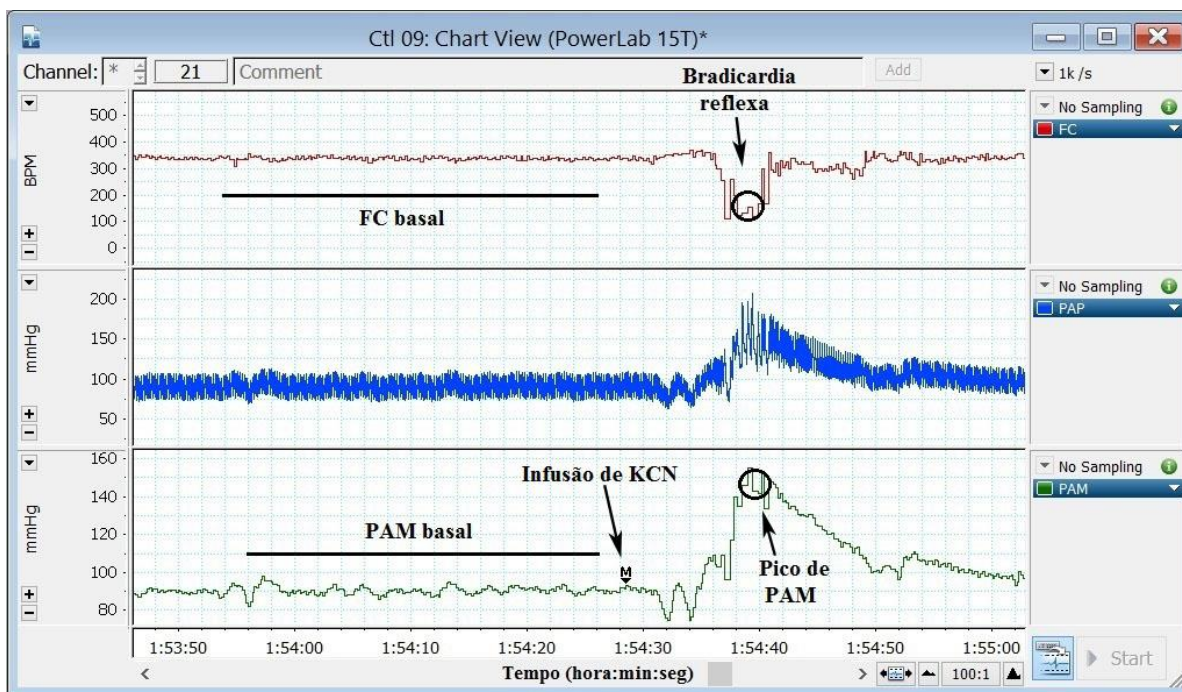


Figura 4. Exemplo de resposta bradicárdica e pressora em um registro após injeção em *bolus* (50 μl) de cianeto de potássio (KCN). PAP = pressão arterial pulsátil; PAM = pressão arterial média; FC = frequência cardíaca.

- Reflexo de Bezold-Jarisch: Foi determinado por meio de injeção intravenosa de 5-hidroxitriptamina (serotonina) (5-HT, 32 $\mu\text{g}/\text{kg}$, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), um agonista de receptores 5-HT₃, que evocou breve resposta hipotensora e bradicárdica (Figura 5).

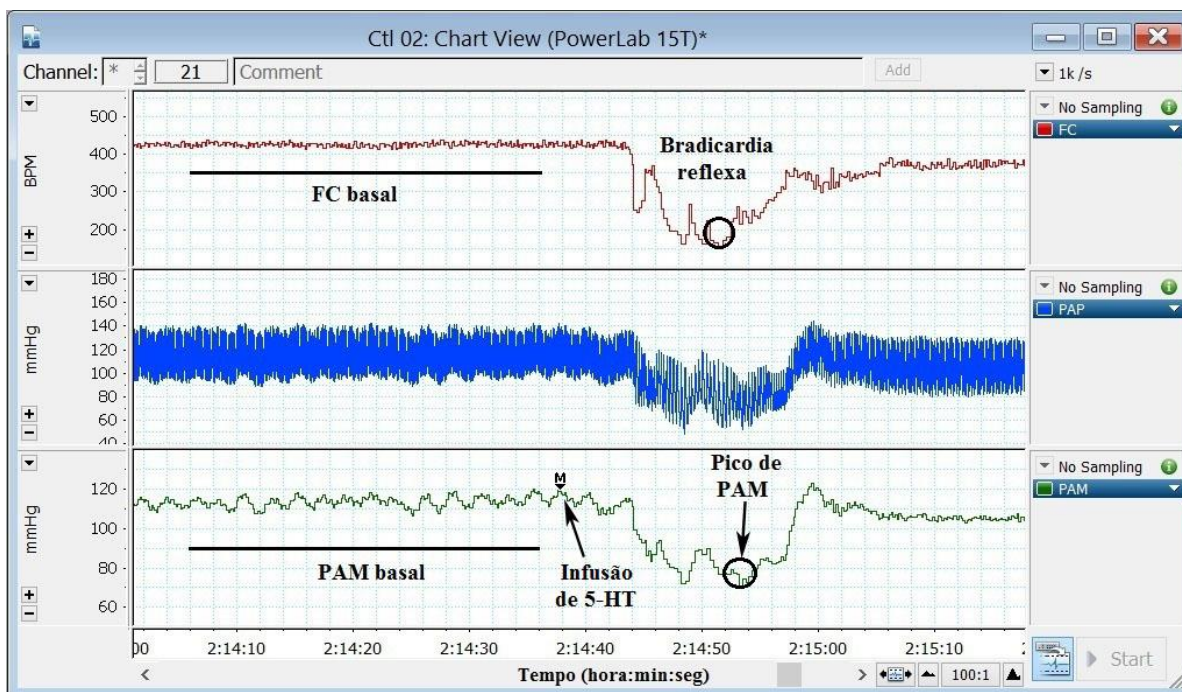


Figura 5. Exemplo de resposta bradicárdica e hipotensora em um registro após injeção em *bolus* (50 μl) de serotonina (5-HT). PAP = pressão arterial pulsátil; PAM = pressão arterial média; FC = frequência cardíaca.

- Contribuição do sistema nervoso simpático: A contribuição do sistema nervoso simpático na ação vasoconstritora foi determinada pela injeção intravenosa de hexametônio (25 mg/kg, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Hexametônio é um antagonista de receptores nicotínicos, frequentemente referido como o bloqueador ganglionar protótipo. É amplamente utilizado para avaliar a atividade simpática em diversos modelos experimentais. A magnitude da queda na PAM foi utilizada para avaliar a contribuição do sistema nervoso simpático para a manutenção da PA basal. Como o bloqueio ganglionar promove redução prolongada da PA, o hexametônio foi o último efeito a ser testado, seguido do método indolor para eutanásia com dose excessiva de anestésico (uretana).

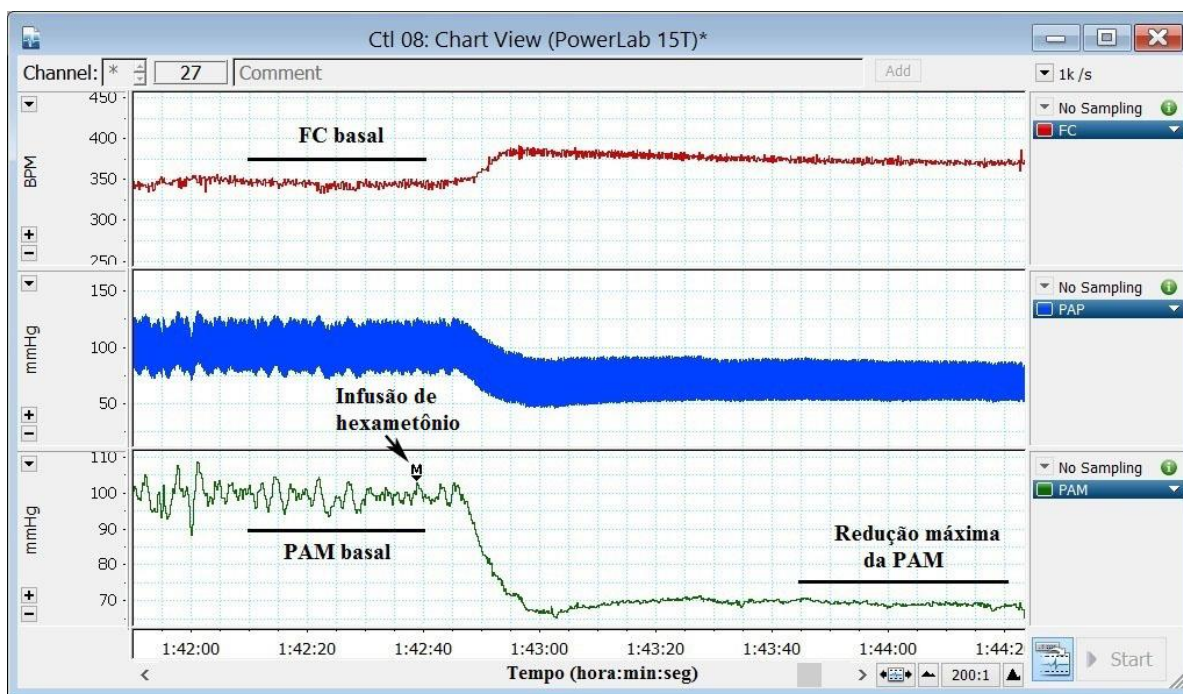


Figura 6. Exemplo de resposta hipotensora em um registro após injeção em *bolus* (50µl) de hexametônio. PAP = pressão arterial pulsátil; PAM = pressão arterial média; FC = frequência cardíaca.

Todas as soluções citadas foram preparadas com salina 0,9 %, e injetadas intravenosamente em *bolus* de 50 µL. A média de 30 segundos estáveis basais e a média de 2 segundos do pico de resposta foram utilizadas para calcular a intensidade da resposta para as drogas FE, NPS, KCN e 5-HT (Figuras 2 a 5). Para hexametônio, foram utilizadas a média de 30 segundos estáveis basais e a média de 30 segundos do trecho máximo de resposta hipotensora (Figura 6). Entre as injeções, foram esperados em torno de 3 minutos para que os parâmetros cardiovasculares retornassem à valores basais.

Além da análise do controle barorreflexo da FC por meio de alterações farmacológicas da PA, também avaliamos o ganho do barorreflexo espontâneo por meio da técnica de análise das sequências. Para isso utilizamos um software apropriado (CardioSeries, versão 2.4), o qual detecta automaticamente rampas espontâneas com aumentos ou diminuições progressivas de 3 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, em um período de 30 minutos de registro da PA estável, foram obtidas sequências com aumentos na PAS que promoveram aumentos correlacionados do IP, definidas como *up sequences* e sequências com reduções na PAS que promoveram correlacionadas reduções do IP, definidas como *down sequences*. 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. Essa análise permite uma avaliação do barorreflexo durante alterações fisiológicas da PA.

3.6 Análise estatística

A fim de avaliar as alterações evocadas na PAM e FC devido a ativação de reflexos em ratas com falha ovariana prematura (perimenopausa) ou estabelecida (menopausa), VCD80 e VCD180 foram comparados com os respectivos grupos controle (CTL80 ou CTL180, respectivamente) por meio de testes *t* não pareados. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas se $P < 0,05$. Os resultados são apresentados como médias dos grupos \pm EPM sob a forma de figuras e tabelas.

4. RESULTADOS

Os valores de peso corporal, PAS, PAD, PAM e FC, dos quatro grupos avaliados, encontram-se na tabela 1. As PAS, PAD, PAM apresentaram-se semelhantes entre os animais após 80 ou 180 dias do tratamento com óleo ou VCD. Da mesma maneira, não foram observadas alterações na FC dos grupos de animais estudados. Já o peso corporal das ratas após 80 dias do tratamento com VCD (VCD80) mostrou-se reduzido em relação às ratas após o mesmo tempo de tratamento com o veículo (CTL80, $p < 0,05$). Porém, esse parâmetro permaneceu semelhante entre os grupos VCD180 e CTL180.

Tabela 1. Parâmetros Basais.

Grupos	PC (g)	PAS (mmHg)	PAD (mmHg)	PAM (mmHg)	FC (bpm)
CTL80 (n=10)	211±3	130±4	87±3	102±3	372±19
VCD80 (n=9)	200±3*	130±2	94±2	106±2	357±7
CTL180 (n=8)	248±8	124±5	87±4	99±4	342±10
VCD180 (n=7)	241±5	130±2	92±2	105±2	343±9

Peso corporal (PC), pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em ratos com 80 (perimenopausa) dias após o início do tratamento com 4-vinilciclohexano diepóxido (VCD80) ou de veículo (CTL80) e 180 (menopausa) dias após o início do tratamento com 4-vinilciclohexano diepóxido (VCD180) ou veículo (CTL180). * $P < 0,05$ em comparação com CTL80.

A figura 7 mostra os gráficos de alteração da PAM após a administração do bloqueador ganglionar hexametônio. Não houve diferença significativa na redução da PAM promovida pelo bloqueio ganglionar nas ratas após 80 dias do tratamento com óleo ou VCD (Fig. 7A). Porém, nas ratas após 180 dias do tratamento com VCD, o bloqueio ganglionar acentuou a redução da PAM quando comparadas as ratas controle ($-43,14 \pm 3,12$ vs. $-34,33 \pm 2,63$ mmHg, $P < 0,05$) (Fig. 7B), sugerindo que a progressão da menopausa pode estar levando à uma maior contribuição da atividade autonômica simpática sobre a PAM.

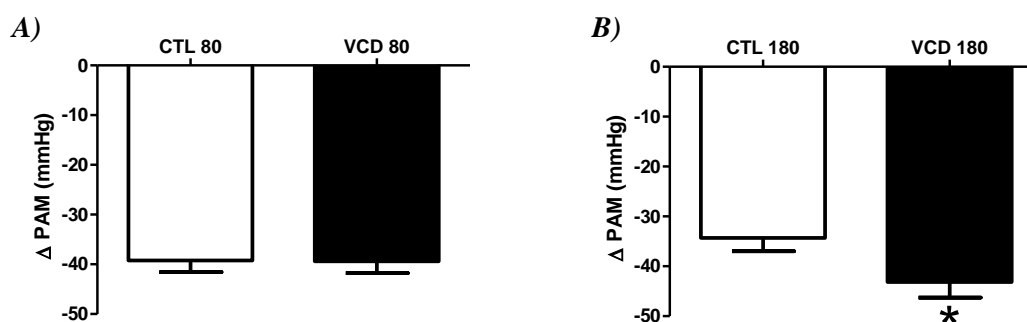


Figura 7. Alterações na pressão arterial média (PAM) promovidas pela administração intravenosa de hexametônio (25 mg/kg) em ratas com 80 dias (perimenopausa; A) após o início do tratamento com 4-vinilciclohexano diepóxido (VCD 80, $n = 10$) ou veículo (CTL 80, $n = 9$) e 180 dias (menopausa; B) após o início do tratamento com 4-vinilciclohexano diepóxido (VCD 180, $n = 7$) ou veículo (CTL 180, $n = 9$). * $P < 0,05$ em comparação com o respectivo CTL.

A figura 8 mostra as respostas reflexas da FC frente às alterações agudas de PAM induzidas pela administração de FE (8 $\mu\text{g}/\text{kg}$) ou NPS (32 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Mediante o aumento da

PAM induzida pela FE, avaliamos a resposta bradicárdica induzida pelo barorreflexo por meio do índice do barorreflexo ($\Delta FC/\Delta PAM$, bpm/mmHg). Os valores não diferiram entre as ratas após 80 dias do tratamento com VCD (VCD80) ou óleo (CTL80) (Fig. 8A). Por outro lado, a bradicardia reflexa induzida por FE mostrou-se reduzida nas ratas após 180 dias do tratamento com VCD (VCD180) ($-1,35 \pm 0,14$ bpm/mmHg), quando comparadas com o controle (CTL180) ($-2,01 \pm 0,24$ bpm/mmHg) ($P < 0,05$) (Fig. 8B).

A redução da PAM induzida pela administração de NPS induziu uma resposta taquicárdica reflexa, que foi avaliada por meio do índice do barorreflexo. Observamos que a sensibilidade da resposta taquicárdica já se apresentou menor no grupo VCD80 quando comparado com seu respectivo controle (CTL80) ($3,15 \pm 0,29$ vs. $4,12 \pm 0,3$ bpm/mmHg, $P < 0,05$) (Fig. 8C). Tal resposta permaneceu reduzida no grupo VCD180 em relação ao grupo CTL180 ($3,00 \pm 0,46$ vs. $4,63 \pm 0,43$ bpm/mmHg, $P < 0,05$) (Fig. 8D).

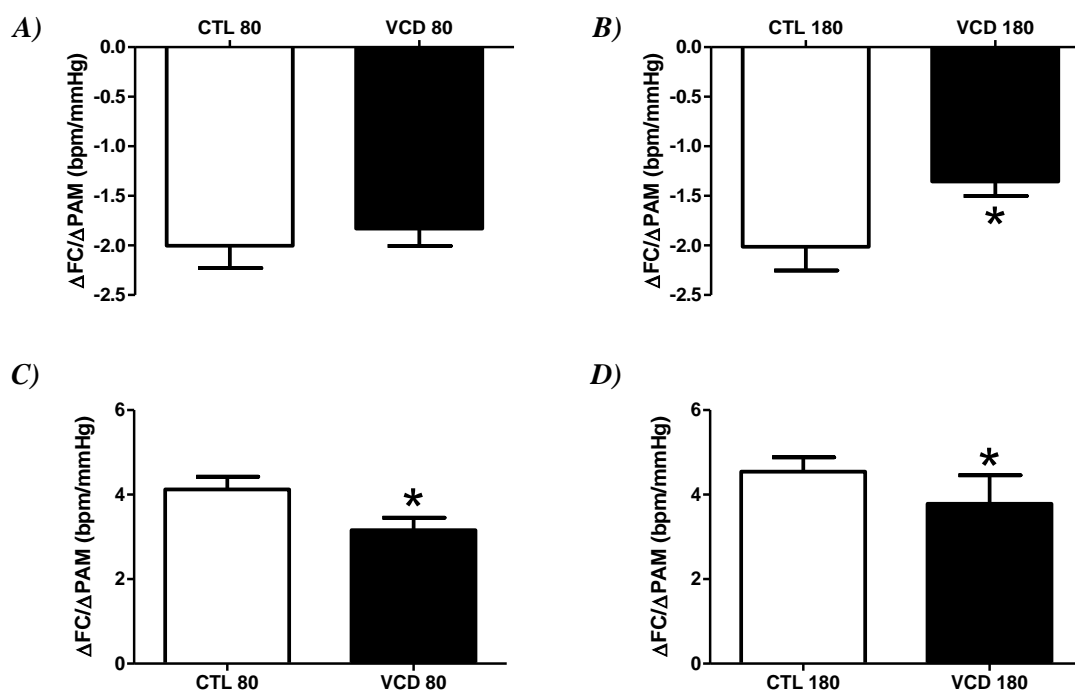


Figura 8. Índice do barorreflexo, calculado pela divisão entre a alteração da frequência cardíaca (FC) pela alteração da pressão arterial (PA). A e B. Bradicardia reflexa induzida por injeção em bolus ($50 \mu\text{L}$) de fenilefrina ($08 \mu\text{g}/\text{kg}$) em ratas com 80 (perimenopausa) e 180 (menopausa) dias após o início do tratamento com 4-vinilciclohexano diepóxido (VCD80, $n = 10$; VCD180, $n = 7$) ou veículo (CTL80, $n = 9$; CTL180, $n = 8$). C e D. Alterações na taquicardia reflexa ($\Delta FC/\Delta PAM$, bpm/mmHg) induzida por injeção em bolus ($50 \mu\text{L}$) de nitroprussiato de sódio ($32 \mu\text{g}/\text{kg}$) em ratas com 80 (perimenopausa) e 180 (menopausa) dias após o início do tratamento com 4-vinilciclohexano diepóxido (VCD80, $n = 9$; VCD180, $n = 6$) ou veículo (CTL80, $n = 9$; CTL180, $n = 8$). * $P < 0,05$ em comparação com o respectivo CTL.

A avaliação do ganho do barorreflexo espontâneo, calculado por técnica de análise das sequências a partir de alterações fisiológicas da PA, está representada na figura 9. O grupo VCD80 (perimenopausa) apresentou ganho equivalente do barorreflexo para bradicardia quando comparado ao controle (CTL80) (Fig. 9A). Entretanto, o grupo VCD180 (menopausa) demonstrou redução significativa no ganho do barorreflexo para bradicardia quando comparado ao controle (CTL180) ($1,33 \pm 0,09$ vs $2,08 \pm 0,20$ ms/mmHg, $P < 0,01$) (Fig. 9B). Por sua vez, o ganho para taquicardia reflexa também não sofreu alteração significativa no grupo VCD80 em comparação com CTL80 (Fig. 9C). O grupo VCD180, entretanto, apresentou ganho reduzido do barorreflexo para taquicardia quando comparado ao CTL180 ($1,21 \pm 0,11$ vs $1,97 \pm 0,21$ ms/mmHg, $P < 0,01$) (Fig. 9D).

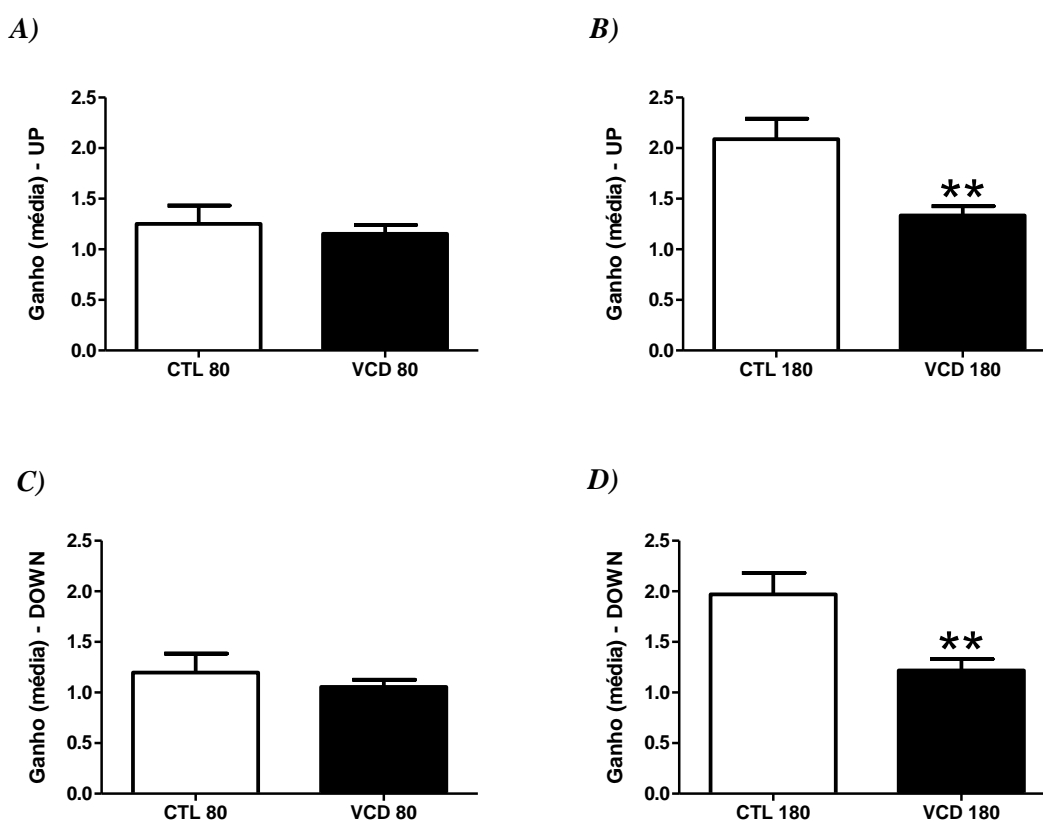


Figura 9. Ganho do barorreflexo espontâneo. A e B. Bradicardia reflexa calculada por meio de análise de sequências de 3 aumentos progressivos de PAS correlacionados com aumentos no IP em ratos com 80 (perimenopausa) e 180 (menopausa) dias após o início do tratamento com 4-vinilciclohexano diepóxido (VCD80, $n = 10$; VCD180, $n = 8$) ou veículo (CTL80, $n = 9$; CTL180, $n = 9$). C e D. Taquicardia reflexa calculada por meio de análise de sequências de 3 reduções progressivas de PAS correlacionadas com reduções no IP em ratos com 80 (perimenopausa) e 180 (menopausa) dias após o início do tratamento com 4-vinilciclohexano diepóxido (VCD80, $n = 10$; VCD180, $n = 8$) ou veículo (CTL80, $n = 9$; CTL180, $n = 9$). ** $P < 0,01$ em comparação com o respectivo CTL.

Na figura 10 estão apresentados os resultados das variações na PAM e FC promovidas pela injeção intravenosa de KCN (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$) para ativação do quimiorreflexo. A resposta pressora decorrente da ativação do quimiorreflexo com KCN apresentou-se diminuída no grupo VCD80 em relação ao seu controle (CTL80) ($28,89 \pm 5,03$ vs. $50,88 \pm 3,88$ mmHg, $P < 0,01$) (Fig. 10A), porém na condição de menopausa, esta manteve-se semelhante entres os grupos CTL180 e VCD180 (Fig. 10B). As respostas bradicárdicas não diferiram nos animais VCD80 e VCD180 quando comparados com seus respectivos controles (Fig. 10C e 10D).

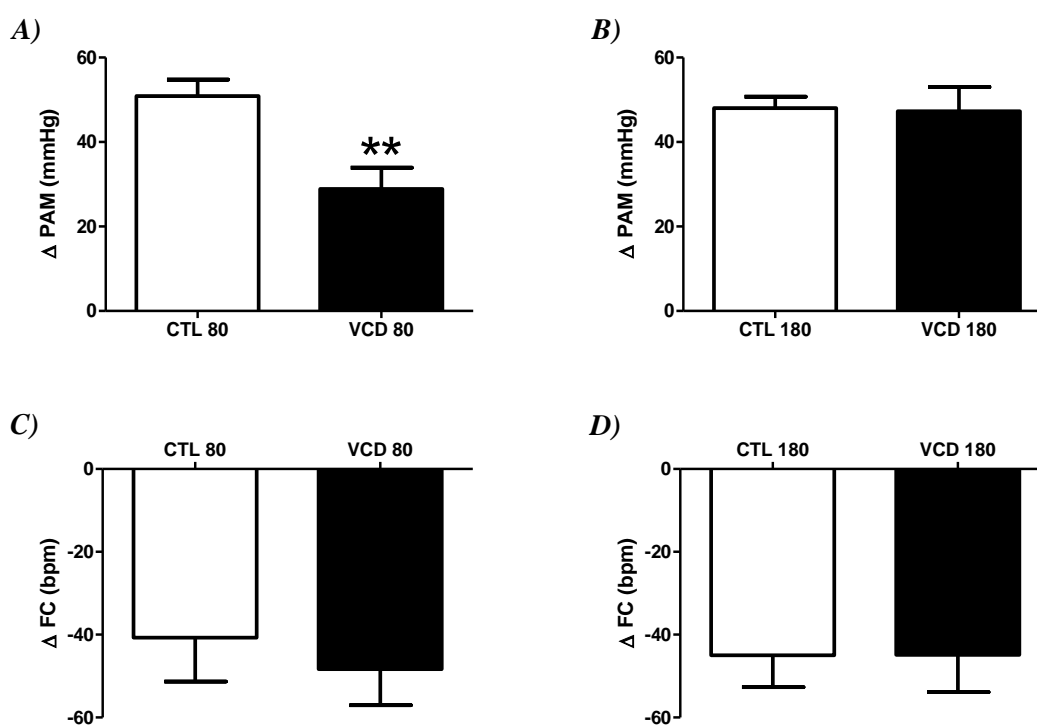


Figura 10. Componente pressórico (A e B) e bradicárdico (C e D) produzidos pela injeção em bolus de cianeto de potássio (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$) em ratos com 80 (perimenopausa) e 180 (menopausa) dias após o início do tratamento com 4-vinilciclohexano diepóxido (VCD 80, $n = 9$; VCD 180, $n = 7$) ou veículo (CTL 80, $n = 8$; CTL 180, $n = 9$). ** $P < 0,01$ em comparação com o respectivo CTL.

A figura 11 mostra os resultados das variações na PAM e FC promovidas pela injeção intravenosa de 5-HT (32 $\mu\text{g}/\text{kg}$) para ativação do reflexo de Bezold–Jarisch. As respostas pressoras advindas da administração de 5-HT permaneceram inalteradas em VCD80 em relação ao CTL80 (Fig. 11A). Entretanto, o grupo VCD180 apresentou maior redução da PAM em relação ao CTL180 ($-22,14 \pm 3,14$ vs. $-13,33 \pm 2,63$ mmHg, $P < 0,05$) (Fig. 11B). As respostas bradicárdicas decorrentes da ativação do reflexo de Bezold–Jarisch com 5-HT

foram semelhantes nos animais VCD80 e VCD180 quando comparados com seus respectivos controles (Fig. 11C e 11D).

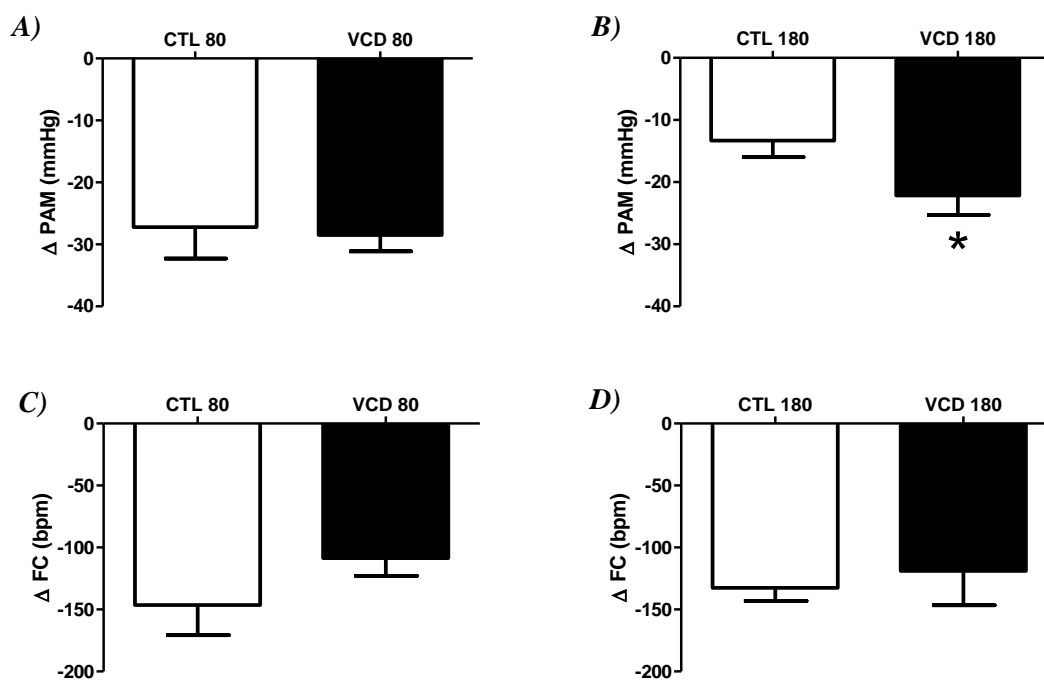


Figura 11. Componentes pressórico (A e B) e bradicárdico (C e D) do reflexo de Bezold–Jarisch produzidos pela injeção em bolus de serotonina (5-HT, 32 μ g/kg) em ratos com 80 (perimenopausa) e 180 (menopausa) dias após o início do tratamento com 4-vinilciclohexano diepóxido (VCD80, $n = 10$; VCD180, $n = 7$) ou veículo (CTL80, $n = 9$; CTL180, $n = 9$). * $P < 0,05$ em comparação com o respectivo CTL.

5. DISCUSSÃO

Mulheres na fase reprodutiva são resistentes ao desenvolvimento da hipertensão, porém esta proteção é perdida com o início da menopausa, sugerindo que essa mudança na regulação da PA seja devida a redução dos esteroides ovarianos plasmáticos (ONG et al., 2008).

Neste estudo observamos que a PAM e a FC das ratas 80 e 180 dias após a indução da falha ovariana com VCD não diferiram em relação aos respectivos grupos controles. Desta forma, a hipertensão não foi instalada nos períodos avaliados. Apesar de já estabelecida a relação entre menopausa e o aumento na incidência de hipertensão em mulheres, o tratamento com VCD por 180 dias não foi capaz de alterar a PAM e a FC de forma significativa. Entretanto, considerando a capacidade do organismo de corrigir variações abruptas destes parâmetros, ainda assim a PA pode variar em níveis médios (BASELLI et al., 1986; CERUTTI et al., 1991) e indicar um possível comprometimento da SBR em condições basais, o que poderia levar à um quadro hipertensivo através de alterações primárias de outros mecanismos de controle cardiovascular (IRIGOYEN et al., 1995). Além disso, uma diminuição da SBR pode incidir antes do desenvolvimento de um quadro hipertensivo efetivo, sugerindo assim uma correlação entre estes eventos (BUÑAG; BARRINGER, 1988).

Por outro lado, neste trabalho foi observada uma contribuição aparentemente maior do sistema nervoso simpático para a manutenção da PA nas ratas após 180 dias de indução da falha ovariana, avaliada por meio da eliminação do tono autonômico via bloqueio ganglionar com hexametônio, que evocou maior redução na PAM nessas ratas quando comparadas ao grupo CTL180. Possivelmente, esse aumento da atividade simpática para os vasos sanguíneos foi resultante da progressão da falha ovariana, uma vez que não foram observados no grupo VCD80 (perimenopausa). Em estudo feito com ratas ovariectomizadas foram observadas reduções na atividade simpática dos nervos renal e esplâncnico, assim como na FC, dentro do período de 20 minutos após injeção intravenosa de estradiol quando comparado ao controle (veículo), apesar da PAM não ter alterado (HE et al., 1998). Estudo subsequente da literatura demonstrou que a microinjeção de E no BVLR, região do tronco cerebral onde estão localizados os neurônios pré-motores simpáticos que se projetam para a medula espinhal, promove redução da atividade do nervo simpático renal de ratas ovariectomizadas (SALEH; CONNELL; SALEH, 2000b). Dessa forma, a redução desse

hormônio com o advento da menopausa pode causar um possível desbloqueio desses neurônios, que por sua vez promoverão um aumento da atividade simpática. Esse efeito a longo prazo pode contribuir para o aumento da PA basal.

Uma atividade simpática aumentada em repouso na menopausa condiz com dados já descritos na literatura. Em um estudo com mulheres e homens entre 16 e 80 anos, Matsukawa et al. (1998) demonstraram que, apesar de observarem um aumento progressivo da atividade nervosa simpática muscular (obtida a partir de um fascículo muscular do nervo tibial na fossa poplítea) com o avançar da idade tanto em homens quanto em mulheres, nas mulheres esse aumento se mostrou mais acelerado com o avanço da idade. Além disso, mulheres jovens tiveram atividade simpática mais baixa que homens jovens, apesar dessa diferença não ter sido observada ao compararem mulheres e homens acima de 50 anos, corroborando assim a hipótese de um possível efeito protetor dos hormônios ovarianos em mulheres jovens. O mesmo estudo também obteve níveis significativamente menores de atividade nervosa simpática em mulheres jovens ou de meia idade na pré-menopausa em comparação com mulheres de meia idade na pós-menopausa ou idosas. Czarnecka et al. (2009) também mostraram que, em um grupo de mulheres moderadamente hipertensas e com idades entre 45 e 55 anos, houve uma correlação entre a idade e os níveis de noradrenalina no plasma, assim como entre idade e os níveis de leptina plasmática. Através da análise da variabilidade cardíaca, o mesmo estudo ainda mostrou atividade parassimpática diminuída e simpática aumentada em mulheres na pós-menopausa quando comparadas a mulheres em período de pré-menopausa. Tollan et al. (1993) já haviam descrito anos antes que homens tratados com progesterona apresentaram níveis menores de norepinefrina no plasma em comparação com o controle, sugerindo assim uma diminuição da descarga simpática. Mais recentemente, mulheres na pós-menopausa suplementadas com E transdérmico tiveram uma redução da atividade nervosa simpática (VONGPATANASIN et al., 2001; WEITZ et al., 2001). Esses resultados indicam, portanto, uma disfunção autonômica na menopausa em decorrência de alterações nos níveis de esteroides ovarianos, podendo esta ser responsável pela patogênese da hipertensão nesta condição.

Não podemos descartar que o nosso resultado de maior redução da PA após o bloqueio ganglionar pode ser devido a uma reatividade vascular adrenérgica aumentada em um tono simpático comparável (preservado). Estudos têm mostrado que o E possui influência na

sensibilidade adrenérgica vascular, o que poderia explicar, pelo menos em parte, a maior queda da PA observada após bloqueio ganglionar e injeção de 5-HT. Um estudo com camundongos deficientes em receptores para estradiol do tipo β (ER- β) mostrou que agonistas de receptores α -adrenérgicos induzem hipertensão e resposta vasoconstritora exagerada nestes animais, sendo que em camundongos selvagens o E atenua a vasoconstrição através de aumento da expressão de óxido nítrico-sintase (NOS) (ZHU et al., 2002). Outro estudo mostrou um aumento da atividade da NOS endotelial (eNOS) induzido por estradiol via ativação da proteína quinase B (Akt) (FLORIAN et al., 2004), uma importante proteína que fosforila diversos substratos intracelulares, incluindo a eNOS (TANAKA et al., 2005). Mais recentemente foi demonstrado que ratas ovariectomizadas e tratadas com E apresentaram diminuição da vasoconstrição simpática e da PA devido ao efeito antioxidante do E, que aumentou a biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) (CAMPOS et al., 2014). Portanto, estresse oxidativo na menopausa em decorrência da falta de E pode diminuir a simpátólise funcional, evento em que a vasoconstrição simpática é atenuada por NO ou outros vasodilatadores locais.

Com relação ao controle barorreflexo da FC, uma atenuação significativa da bradicardia e da taquicardia do barorreflexo foram observadas no grupo VCD180 quando comparado ao CTL180, tanto em resposta às drogas vasoativas (FE e NPS, respectivamente) quanto em condição basal, representada pela diminuição do ganho do barorreflexo espontâneo. Interessantemente, os animais VCD80 já apresentaram taquicardia reflexa atenuada em resposta ao NPS no período de 80 dias após início do tratamento com VCD, apesar da bradicardia reflexa ter permanecido inalterada nesse período. Esses dados corroboram estudos prévios que mostram participação do E no aumento do controle barorreflexo sobre a FC e a atividade simpática. Saleh, Connell e Saleh (2000a) mostraram que em ratos machos, 30 minutos após a injeção de estradiol no NTS, o teste do barorreflexo com FE resultou em resposta bradicárdica aumentada acompanhada de resposta pressora atenuada. A injeção no NA resultou em resposta pressora inalterada e bradicardia aumentada. Já a injeção no BVLR promoveu resposta pressora atenuada e bradicardia inalterada. Além disso, os autores verificaram que os ratos machos injetados com estradiol no NTS, NA e BVLR apresentaram aumento da SBR evocado por FE nos três casos em comparação com o controle. Ainda no mesmo estudo, a evocação do barorreflexo indicou: (1) atividade aumentada do nervo

simpático renal e inalterada do nervo vago após injeção de estradiol no BVLN, (2) atividade aumentada do nervo vago e inalterada do nervo renal após injeção no NA e (3) atividade aumentada no nervo vago e diminuída no nervo renal após injeção no NTS. Os autores ainda foram além e mostraram que a administração simultânea de antagonista de receptor de E bloqueia todas as alterações anteriormente citadas, confirmando o papel do E na modulação central do controle cardiovascular. Saleh, Connell e Saleh (2000b) também mostraram que ratas ovariectomizadas e injetadas com estradiol na BVLN e NTS tiveram uma diminuição da PA e da atividade do nervo simpático renal, tanto em condições basais quanto após evocação com FE, além de uma queda maior da FC e atividade parassimpática aumentada após injeção de estradiol no NTS e NA seguida de evocação do barorreflexo com FE. Além disso, em um estudo anterior com ratas ovariectomizadas foram observadas reduções na atividade simpática dos nervos renal e esplâncnico, assim como na FC, dentro do período de 20 minutos após injeção intravenosa de estradiol quando comparado ao controle (veículo), apesar da PAM não ter alterado. O mesmo estudo mostrou também que o tratamento crônico com estradiol diminuiu a resposta pressora estimulada por administração de FE, sugerindo assim um aumento na SBR quando em comparação com o controle (HE et al., 1998). Em 2003, ratas ovariectomizadas e tratadas com estradiol cronicamente exibiram um aumento da bradicardia reflexa em resposta à FE, porém as respostas taquicardicas ativadas por NPS foram mantidas em níveis comparáveis ao controle (PAMIDIMUKKALA et al, 2003), sugerindo que a ausência do E pode, portanto, não necessariamente levar à uma taquicardia reflexa aumentada. Os estudos citados aqui, em adição aos nossos resultados, levam a crer que o E pode atuar facilitando a ativação de neurônios do NTS e do NA, enquanto atenua a atividade de neurônios do BVLN, de modo que as flutuações neste hormônio em função da menopausa podem diminuir a SBR.

A redução da SBR 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 et al., (2003) sugerem que uma labilidade elevada da pressão sanguínea, independentemente do nível de pressão sanguínea média, prejudica a função endotelial pela inibição da produção de NO, o que pode contribuir para o surgimento de hipertensão devido aumento do tônus vascular. Diversos modelos experimentais que

desenvolvem hipertensão possuem redução do controle barorreflexo, sendo que este último pode contribuir para o surgimento e/ou comprometimento do quadro hipertensivo. Foi verificada uma redução significativa do controle barorreflexo da atividade do nervo simpático e da FC em ratos obesos Zucker (SCHREIHOFFER et al., 2007; HUBER; SCHREIHOFFER, 2011) e em ratos com obesidade induzida por dieta (ZHAO; MCCULLY; BROOKS, 2012). Um estudo com ratas obesas Zucker mostrou que a redução do ganho do barorreflexo ocorreu antes do desenvolvimento da hipertensão, sugerindo que a redução da SBR pode contribuir para o início da elevação da PA (BUÑAG; BARRINGER, 1988). Em ratos espontaneamente hipertensos, a redução do barorreflexo já é evidente em animais com apenas 8 semanas de idade, quando comparado ao seu controle de mesma idade (CISTERNAS et al., 2010).

Além do barorreflexo, também avaliamos o quimiorreflexo, que induz aumento da atividade simpática (e conseqüentemente resposta pressora) mediada pela ativação glutamatérgica de neurônios pré-motores simpáticos localizados no BVLN, e resposta bradicárdica mediada pelo sistema nervoso parassimpático (BARROS et al., 2002). Nesse sentido, a resposta pressora evocada por KCN foi atenuada durante a perimenopausa, mas recuperou-se no estado menopausa. Essa possível atenuação da atividade simpática em resposta ao quimiorreflexo induzido após 80 dias, apesar de ter sido observada após 180 dias, pode já indicar um prejuízo do NTS em estimular o BVLN em decorrência de alterações nos níveis de esteroides ovarianos e da ação destes sobre o NTS.

Já o reflexo de Bezold-Jarish envolve ativação do sistema nervoso parassimpático e concomitante inibição simpática, evocando resposta bradicárdica e hipotensora (CALLERA et al., 2005). Aferências vindo do coração, em resposta à estimulação de receptores 5-HT₃ por 5-HT, excitam neurônios de segunda ordem do NTS via sinapses glutamatérgicas. O NTS, através de projeções glutamatérgicas, excita neurônios do centro vagal e os interneurônios do BVLC. O centro vagal excitado promove descarga parassimpática sobre o coração com conseqüente queda da FC. O BVLC, por projeções GABAérgicas, inibe os neurônios pré-motores do BVLN, com conseqüente atenuação simpática. Nosso estudo mostrou que o grupo VCD180 apresentou maior queda da PAM após administração de 5-HT para ativação do reflexo de Bezold-Jarish, apesar da FC ter permanecido inalterada quando comparação com o controle (CTL180). Esses dados corroboram a hipótese de atividade

simpática vasomotora aumentada para manutenção da PA em ratas após tratamento com VCD, uma vez que a eliminação do tônus simpático pelo reflexo de Bezold-Jarish promoveu maior queda da PAM no grupo menopausado. Não podemos, entretanto, descartar a hipótese de uma sensibilidade vascular adrenérgica aumentada neste grupo.

Apesar das alterações na regulação da PA, observadas após a menopausa, serem atribuídas às alterações hormonais em virtude da atresia natural dos folículos ovarianos (ERICKSON, 2000), este estudo não avaliou os níveis de hormônios ovarianos no plasma nos períodos de 80 (perimenopausa) e 180 (menopausa) dias após o início do tratamento com VCD; porém estudos da literatura nos dão suporte sobre os efeitos do tratamento em relação aos níveis hormonais nesses períodos. Em mulheres, a menopausa inicia a partir do 12º mês de amenorreia. Os níveis de FSH começam a aumentar no período final da perimenopausa (BURGER et al. 1998), fenômeno que pode ser atribuído a um reduzido feedback negativo de inibina ou E sobre o eixo hipotálamo-hipófise para secreção de FSH. Reis et al. (2014) observaram níveis aumentados de FSH 90 dias após o início do tratamento com VCD em ratas, porém não aos 80 dias (dados não publicados). Em 2014, a depleção folicular observada 80 dias após tratamento diário com VCD (160mg/kg, i.p. por 15 dias) foi acompanhada de reduções significativas nos níveis circulantes de P, testosterona e dihidrotestosterona, porém não alterou os níveis de FSH, estradiol e costicosterona (REIS et al., 2014). Entretanto, um estudo prévio e de longo prazo mostrou níveis aumentados de FSH nos períodos de 120, 240 e 360 dias após início do tratamento diário com VCD (80mg/kg, i.p. por 30 dias), porém nenhuma diferença significativa 60 dias após início do tratamento (MAYER et al., 2002). O mesmo estudo ainda observou uma progressiva diminuição no número de folículos pré-antrais a partir do 30º dia após início do tratamento, e de folículos antrais a partir do 120º dia, além de uma total interrupção da ciclicidade e níveis altamente variados de estradiol circulante nos indivíduos do grupo VCD após 360 dias. Assim, o VCD parece induzir depleção inicial dos folículos primordiais e primários, sendo que a diminuição do número de folículos secundários e antrais ocorre posteriormente, possivelmente devido à redução dos folículos menores. Esta sequência de eventos, associada à aumentos dos níveis de FSH e níveis irregulares de E, precede a consequente falha ovariana, quando o FSH atinge níveis máximos e o E reduz.

Dessa forma, podemos perceber que o tratamento com VCD gera uma falha ovariana que embasa nossos achados, mas futuramente realizaremos as dosagens hormonais em nosso próprio laboratório para melhor caracterizar o nosso modelo de estudo. Além disso, cabe destacar que em diversos modelos experimentais, a atenuação do controle barorreflexo ocorre anteriormente à instalação da hipertensão, podendo o comprometido controle cardiovascular ser de grande importância para o desenvolvimento da hipertensão. Por isso, não descartamos a possibilidade de um aumento significativo da PA em nosso modelo experimental, quando for avaliado um período superior a 180 dias do início do tratamento com VCD, uma vez que já sabemos que o barorreflexo está comprometido. Dessa forma estudos subsequentes serão necessários para elucidar os mecanismos pelos quais a falha ovariana pode contribuir na gênese da hipertensão após a menopausa.

6. CONCLUSÕES

Após 180 dias do início do tratamento com VCD, a resultante falha ovariana parece estar associada a um aumento do tônus simpático para manutenção da PA e a um ganho reduzido do barorreflexo espontâneo e evocado por drogas vasoativas, possivelmente devido a variações nos níveis dos esteroides ovarianos com perda de seus efeitos protetores sobre áreas de controle cardiovascular no tronco cerebral. Apesar dessas alterações não terem sido acompanhadas de mudanças nos valores basais de PAM e FC nos períodos estudados, podem participar da patogênese da hipertensão na menopausa.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AT SMA, F. et al. Postmenopausal status and early menopause as independent risk factors for cardiovascular disease: a meta-analysis. **Menopause**, [s.l.], v. 13, n. 2, p.265-279, 2006.

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. **Journal of Neuroscience**, [s.l.], v. 26, n. 46, p.11893-11902, 15 nov. 2006.

BARROS, R. C. H. et al. Cardiovascular responses to chemoreflex activation with potassium cyanide or hypoxic hypoxia in awake rats. **Autonomic Neuroscience**, [s.l.], v. 97, n. 2, p.110-115, maio 2002.

BASELLI, G. et al. Spectral and cross-spectral analysis of heart rate and arterial blood pressure variability signals. **Computers and Biomedical Research**, [s.l.], v. 19, n. 6, p.520-534, dez. 1986.

BETHEA, C. L. et al. Protective actions of ovarian hormones in the serotonin system of macaques. **Frontiers in Neuroendocrinology**, [s.l.], v. 30, n. 2, p.212-238, jul. 2009.

BUÑAG, R. D.; BARRINGER, D. L. Obese Zucker Rats, Though Still Normotensive, Already have Impaired Chronotropic Baroreflexes. **Clinical and Experimental Hypertension. Part A: Theory and Practice**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.257-262, jan. 1988.

BURGER, H. G. et al. Serum Inhibins A and B fall differentially as FSH rises in perimenopausal women. **Clin Endocrinol**, [s.l.], v. 48, n. 6, p.809-813, jun. 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**, [s.l.], v. 25, n. 3, p.305-313, 1 mar. 1995.

CALLERA, J. C. et al. The bradycardic and hypotensive responses to serotonin are reduced by activation of GABA A receptors in the nucleus tractus solitarius of awake rats. **Braz J Med Biol Res**, [s.l.], v. 38, n. 7, p.1123-1131, 2005.

CAMPOS, C. et al. Low-dose Estrogen Is as Effective as High-dose Treatment in Rats with Postmenopausal Hypertension. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, [s.l.], v. 63, n. 2, p.144-151, 2014.

CERUTTI, C. et al. Autonomic nervous system and cardiovascular variability in rats: a spectral analysis approach. **American Journal of Physiology**, [s.l.], v. 261, n. 4, p.H1292-H1299, 1991.

CISTERNAS, J. R. et al. Cardiac baroreflex is already blunted in eight weeks old spontaneously hypertensive rats. **Int Arch Med**, [s.l.], v. 3, n. 1, p.2, 2010.

CHAPLEAU, M. W. et al. Structural Versus Functional Modulation of the Arterial Baroreflex. **Hypertension**, [s.l.], v. 26, n. 2, p.341-347, 1 ago. 1995.

CZARNECKA, D. et al. Indices of autonomic nervous system activity in women with mild hypertension in the perimenopausal period. **Kardiologia Polska**, [s.l.], v. 67, n. 3, p.243-251, 2009.

DAMPNEY, R. A. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. **Physiological Reviews**, [s.l.], v. 74, n. 2, p.323-353, 1994.

ETO, M. et al. Reduced Endothelial Vasomotor Function and Enhanced Neointimal Formation after Vascular Injury in a Rat Model of Blood Pressure Lability. **Hypertension Research**, [s.l.], v. 26, n. 12, p.991-998, 2003.

ERICKSON, G. F. Ovarian anatomy and physiology. In: LOBO, R.; KELSEY, J.; MARCUS, R. (Ed.). **Menopause: biology and pathobiology**. San Diego: Academic Press, 2000. p. 13-21.

FLORIAN, M. et al. Estrogen induced changes in Akt-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase and vasodilation. **Steroids**, [s.l.], v. 69, n. 10, p.637-645, set. 2004.

GOLDMAN, R. K. et al. Baroreflex sensitivity varies during the rat estrous cycle: role of gonadal steroids. **Ajp: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, [s.l.], v. 296, n. 5, p.R1419-R1426, 4 mar. 2009.

GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. **Nature Reviews Neuroscience**, [s.l.], v. 7, n. 5, p.335-346, maio 2006.

HE, X. R. et al. Effects of 17 β -estradiol on sympathetic activity and pressor response to phenylephrine in ovariectomized rats. **American Journal of Physiology**, [s.l.], v. 275, n. 4, p. R1202-R1208, 1998.

HARLOW, S. D. et al. Executive summary of the Stages of Reproductive Aging Workshop + 10. **Menopause**, [s.l.], v. 19, n. 4, p.387-395, 2012.

HUBER, D. A.; SCHREIHOFER, A. M. Altered regulation of the rostral ventrolateral medulla in hypertensive obese Zucker rats. **Ajp: Heart and Circulatory Physiology**, [s.l.], v. 301, n. 1, p.H230-H240, 2 maio 2011.

IRIGOYEN, M. C. et al. Changes of Renal Sympathetic Activity in Acute and Chronic Conscious Sinoaortic Denervated Rats. **Hypertension**, [s.l.], v. 26, n. 6, p.1111-1116, 1 dez. 1995.

KALLEN, A. N.; PAL, L. Cardiovascular disease and ovarian function. **Current Opinion In Obstetrics and Gynecology**, [s.l.], v. 23, n. 4, p.258-267, 2011.

KANNEL, W. Risk stratification in hypertension: new insights from the Framingham study. **American Journal of Hypertension**, [s.l.], v. 13, n. 1, p.S3-S10, jan. 2000.

KAO, K. S.; SIPES, I. G.; HOYER, P. B. Early effects of ovotoxicity induced by 4-vinylcyclohexene diepoxide in rats and mice. **Reproductive Toxicology**, [s.l.], v. 13, n. 1, p.67-75, 2 jan. 1999.

KIM, J. K. et al. Recent Changes in Cardiovascular Risk Factors among Women and Men. **Journal of Women's Health**, [s.l.], v. 15, n. 6, p.734-746, jul. 2006.

LAWES, C. M.; HOORN, S. V.; RODGERS, A. Global burden of blood-pressure-related disease, 2001. **The Lancet**, [s.l.], v. 371, n. 9623, p.1513-1518, maio 2008. Lawes, Hoorn e Rodgers (2008).

LIMA, F. B.; BETHEA, C. L. Ovarian Steroids Decrease DNA Fragmentation in the Serotonin Neurons of Non-Injured Rhesus Macaques. **Molecular Psychiatry**, [s.l.], v. 15, n. 6, p.657-668, 13 out. 2009.

MATSUKAWA, T. et al. Gender difference in age-related changes in muscle sympathetic nerve activity in healthy subjects. **American Journal Of Physiology**, [s.l.], v. 275, n. 5, p.1600-1604, 1998.

MAYER, L. P. et al. Long-term effects of ovarian follicular depletion in rats by 4-vinylcyclohexene diepoxide. **Reproductive Toxicology**, [s.l.], v. 16, n. 6, p.775-781, nov. 2002.

MAYER, L. P. et al. The Follicle-Deplete Mouse Ovary Produces Androgen. **Biology of Reproduction**, [s.l.], v. 71, n. 1, p.130-138, 1 jul. 2004.

MARK, A. L. The Bezold-Jarisch reflex revisited: Clinical implications of inhibitory reflexes originating in the heart. **Journal Of The American College Of Cardiology**, [s.l.], v. 1, n. 1, p.90-102, jan. 1983.

NCHS (National Center for Health Statistics). Health, United States, 2010: With special feature on death and dying. Hyattsville MD: Data Tables; 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Cadernos de atenção básica: hipertensão arterial sistêmica para o Sistema Único de Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. v.15.

ONG, K. L. et al. Gender Difference in Blood Pressure Control and Cardiovascular Risk Factors in Americans With Diagnosed Hypertension. **Hypertension**, [s.l.], v. 51, n. 4, p.1142-1148, 7 fev. 2008.

PAMIDIMUKKALA, J. et al. Estrogen modulation of baroreflex function in conscious mice. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, [s.l.], v. 284, n. 4, p.R983-R989, 9 jan. 2003.

REIS, F. M. et al. Hormonal changes and increased anxiety-like behavior in a perimenopause-animal model induced by 4-vinylcyclohexene diepoxide (VCD) in female rats. **Psychoneuroendocrinology**, [s.l.], v. 49, p.130-140, nov. 2014.

SALEH, M. C.; CONNELL, B. J.; SALEH, T. M. Medullary and intrathecal injections of 17 β -estradiol in male rats. **Brain Research**, [s.l.], v. 867, n. 1-2, p.200-209, jun. 2000a.

SALEH, M. C.; CONNELL, B. J.; SALEH, T. M. Autonomic and cardiovascular reflex responses to central estrogen injection in ovariectomized female rats. **Brain Research**, [s.l.], v. 879, n. 1-2, p.105-114, out. 2000b.

SASAKI, T. et al. Oestrogen attenuates the increases in blood pressure and platelet aggregation in ovariectomized and salt-loaded Dahl salt-sensitive rats. **Journal of Hypertension**, [s.l.], v. 18, n. 7, p.911-917, 2000.

SCHREIHOFFER, A. M.; GUYENET, P. G. Baro-Activated Neurons With Pulse-Modulated Activity in the Rat Caudal Ventrolateral Medulla Express GAD67 mRNA. **Journal Of Neurophysiology**, [s.l.], v. 89, n. 3, p.1265-1277, 13 nov. 2002. Schreihoffer e Guyenet (2002), (SCHREIHOFFER; GUYENET, 2002)

SCHREIHOFFER, A. M. et al. Impairment of sympathetic baroreceptor reflexes in obese Zucker rats. **Ajp: Heart and Circulatory Physiology**, [s.l.], v. 293, n. 4, p.H2543-H2549, 13 jul. 2007.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO (SBH). Diretrizes Brasileiras de Hipertensão VI. São Paulo: 2010. [documento da Internet]. Disponível em: http://www.sbh.org.br/pdf/diretrizes_final.pdf

SPARY, E. J.; MAQBOOL, A.; BATTEN, T. F. C. Changes in Oestrogen Receptor α Expression in the Nucleus of the Solitary Tract of the Rat Over the Oestrous Cycle and Following Ovariectomy. **Journal of Neuroendocrinology**, [s.l.], v. 22, n. 6, p.492-502, 2 mar. 2010.

SPRINGER, L. N. et al. Follicular mechanisms associated with 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced ovotoxicity in rats. **Reproductive Toxicology**, [s.l.], v. 10, n. 2, p.137-143, mar. 1996.

TANAKA, T. et al. Redox regulation of the signaling pathways leading to eNOS phosphorylation. **Free Radical Biology and Medicine**, [s.l.], v. 38, n. 9, p.1231-1242, 1 maio 2005.

TOLLAN, A. et al. Progesterone Reduces Sympathetic Tone without Changing Blood Pressure or Fluid Balance in Men. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, [s.l.], v. 36, n. 4, p.234-238, 1993.

VONGPATANASIN, W. et al. Transdermal Estrogen Replacement Therapy Decreases Sympathetic Activity in Postmenopausal Women. **Circulation**, [s.l.], v. 103, n. 24, p.2903-2908, 19 jun. 2001.

WEITZ, G. et al. Postmenopausal Estrogen Administration Suppresses Muscle Sympathetic Nerve Activity 1. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [s.l.], v. 86, n. 1, p.344-348, jan. 2001.

WIINBERG, N. et al. 24-h ambulatory blood pressure in 352 normal Danish subjects, related to age and gender. **American Journal of Hypertension**, [s.l.], v. 8, n. 10, p.978-986, out. 1995. Wiinberg et al. (1995), (WIINBERG et al., 1995)

WISE, P. M. et al. Neuroendocrine Modulation and Repercussions of Female Reproductive Aging. **Recent Progress in Hormone Research**, [s.l.], v. 57, n. 1, p.235-256, 1 jan. 2002.

WU, J. M. et al. Ovarian aging and menopause: current theories, hypotheses, and research models. **Experimental Biology and Medicine (Maywood)**, [s.l.], v. 230, n. 11, p.818-828, 2005.

ZHAO, D.; MCCULLY, B. H.; BROOKS, V. L. Rosiglitazone Improves Insulin Sensitivity and Baroreflex Gain in Rats with Diet-Induced Obesity. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, [s.l.], v. 343, n. 1, p.206-213, 18 jul. 2012.

ZHU, Y. et al. Abnormal Vascular Function and Hypertension in Mice Deficient in Estrogen Receptor beta. **Science**, [s.l.], v. 295, n. 5554, p.505-508, 18 jan. 2002.