

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA**

**A REPOSIÇÃO DE ESTROGÊNIO DIMINUI O DANO OXIDATIVO, AUMENTA A
ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES E MELHORA A FUNÇÃO
CARDÍACA EM RATAS**

MARIA ISABEL MORGAN MARTINS

Orientadora: Dra. ADRIANE BELLÓ KLEIN

Co-orientadora: Dra. SUSANA LLESUY

**Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, área
de concentração: Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como
requisito para a obtenção do grau de Doutora em Ciências Biológicas -
Fisiologia.**

Porto Alegre,

2003



Lucas Cranach, el Viejo (1472-1573). La familia de la Virgen.

“O tempo é o descobridor de todas as coisas”.

(Prof. Dr. Antonio Andréa Belló)

“O respeito é um sentimento que devemos ter dentro de nós”.

(Marina, minha filha)

“Nunca devemos estar alegres demais ou triste demais, pois tudo passa”.

(Toni Ana, minha Mãe)

“O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza de seus sonhos”.

(Eleanor Roosevelt)

Dedico este trabalho a meu marido
Heráclito, meu Amor, meu grande incentivador
e a Marina, que fizeram com que tudo valesse
a pena.

AGRADECIMENTOS

A Deus e à Mãe de todas as Mães, Maria, pela certeza que todo esforço vale a pena, pelo amparo e consolo, que me concedem fazer coisas que às vezes detenho-me a pensar serem extremamente impossíveis.

Agradeço ao meu marido pelo estímulo constante, pelas palavras de incentivo, determinação, que me ajudaram a atingir meus objetivos e não desanimar, pois estava sempre a meu lado, firme, seguro.

A minha filha Marina, o meu presente de Deus, razão e motivo de caminhar. A Daniel, um grande filho, pelo exemplo de maturidade e coragem, de ir em busca de seus sonhos.

Aos meus pais, Vasco e Ana, pelo incentivo constante à busca do crescimento e realização pessoal. Pela coragem que tem e muita vontade de viver.

A minha Orientadora, Adriane Belló Klein, uma grande pessoa, uma grande amiga, pelo apoio recebido, ajuda constante, orientações seguras, pela compreensão e exemplo de pesquisadora.

A Dra. Susana pelo exemplo e determinação pelo trabalho.

A todos os meus familiares e amigos pelo apoio recebido.

Aos meus queridos Bolsistas de Iniciação Científica, grandes pessoas: Caroline, Fabiano, Marcus e Rafael. Ao Prof. Álvaro pelo apoio e auxílio no protocolo de perfusão cardíaca. Aos colegas do laboratório de fisiologia cardiovascular, o meu agradecimento pelas oportunidades de crescimento e amadurecimento pessoal. A Tânia pelo apoio na parte experimental. Ao carinho da Rita.

À Maria Amália, pela amizade e apoio recebido.

A Profa. Dra. Norma Possa Marroni, pelo exemplo de vida profissional, por suas palavras de incentivo “tudo vai dar certo”.

Ao grande Mestre Prof. Dr. Belló, pelas suas lições de vida, e com certeza continua inspirando-nos.

Aos colegas da Feevale pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

Ao Departamento de Fisiologia, pela oportunidade de crescimento profissional.

Agradeço a todos que passaram por mim, neste período aprendi que é bobagem fugir das dificuldades, mais cedo ou mais tarde, será preciso tirar as pedras do caminho para conseguir avançar. Aprendi que, ao invés de ficar esperando alguém me trazer flores, é melhor plantar um jardim. E, cabe a mim a tarefa de apostar nos meus talentos e realizar os meus sonhos.

RESUMO

A menopausa é marcada por um progressivo decréscimo nos níveis hormonais sexuais circulantes, sendo que esta tem sido associada a aumento dos riscos de eventos cardiovasculares. Uma vez que o estrogênio tem sido apontado como um possível antioxidante, buscou-se verificar o efeito da terapia estrogênica na função cardiovascular e sua correlação com o estresse oxidativo. Assim, este estudo foi realizado com ratas fêmeas Wistar castradas e com reposição hormonal, onde foram investigados os efeitos do estrogênio no estresse oxidativo cardíaco e sistêmico, a produção do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em aorta, a produção do óxido nítrico (NO) avaliado pelos seus metabólitos: nitratos (NO_3) e nitritos (NO_2) teciduais e plasmáticos. Foram avaliados os parâmetros hemodinâmicos e o coração foi isolado e perfundido, para a realização de curvas de Starling e isquemia seguida da reperfusão. Três grupos experimentais foram estabelecidos: Controle (CO) foi realizado simulação ovariectomia + placebo; grupo Castrado (CS) foi realizada ovariectomia + placebo; Grupo Castrado+Hormônio (CH) foi realizada a ovariectomia e recebeu 17β -estradiol. O estradiol foi administrado intramuscular (IM), intraperitonealmente (IP) e implantado subcutaneamente (transdermal) (VT). A dose utilizada nas vias IM e IP foi de $40\mu g/Kg$ de peso, ou igual volume de placebo, durante sete dias; os *pellets* $0,25$ mg/pellet durante 21 dias de liberação contínua.

Os resultados da lipoperoxidação (LPO) avaliada por quimiluminescência (QL) e as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), demonstraram que o grupo CH apresentou menor LPO que o grupo CS, e estes valores foram semelhantes ao grupo CO, estes valores foram semelhantes tanto no tecido cardíaco, nas três vias de administração, quanto sistêmico. Quanto às enzimas antioxidantes foi encontrado que o grupo CH apresentou aumentadas as atividades das enzimas SOD, GPX, GST e alta concentração da GSH, bem como na avaliação sistêmica em relação ao CS. Na avaliação dos metabólitos do NO observamos os níveis de nitrato tecidual e plasmático apresentam-se elevados no grupo CH, e nitrito está aumentado também no plasma neste grupo. Isto reforça a idéia de que o estrogênio induz a formação do NO. A produção do $O_2^{\cdot-}$, pelo método da lucigenina, avaliou a atividade da enzima NADH/NADPH oxidase em aorta isolada. A atividade da enzima estava aumentada no grupo CH. Os animais castrados que receberam reposição hormonal mostraram, não somente, maior formação do $O_2^{\cdot-}$, mas também níveis maiores de NO que os CS. Assim, não foram observadas diferenças na avaliação hemodinâmica. A curva de Starling não mostrou diferenças entre os grupos estudados. No processo de isquemia e reperfusão, o grupo CH recuperou-se melhor quando comparado com os demais grupos, os quais mostraram uma contratatura isquêmica importante.

Estes resultados demonstram claramente um papel benéfico da terapia estrogênica no insulto isquêmico cardíaco, sem alterar variáveis hemodinâmicas, sendo que estas respostas coincidem com uma redução do dano oxidativo e aumento das defesas antioxidantes.

ABSTRACT

Menopause is characterized by a progressive decrease on hormonal level and is usually associated with an increase in cardiovascular disfunctions. Given that estrogen has been considered as a possible antioxidant, this work deals with experimental evaluation of the effects of estrogen withdrawal and replacement therapy on myocardial and systemic oxidative stress. Superoxide anion production and nitric oxide (NO) metabolites (nitrate and nitrite) in plasma and cardiac tissue of female Wistar rats were investigated. Hemodynamic evaluations were performed in the whole animal and analysis of Starling curves and ischemia and reperfusion effects were studied in the isolated and perfused heart.

Three experimental groups were established: a) Control (CO): ovariectomy was simulated and received placebo pellets; b) Castrated (CS): bilateral ovariectomy was done and received placebo pellets; c) Castrated + hormone (CH): ovariectomy was done and 17 β -estradiol pellets were implanted. 17 β -estradiol was given by three different ways: intramuscularly (IM), intraperitoneal (IP) and transdermal (VT). In the IM and IP way, the estradiol dose utilized was 40 μ g/Kg bodyweight or the same volume of placebo during seven days. In the VT, 0.25 mg pellets were implanted and hormone was released during 21 days.

Lipid peroxidation (LPO) was evaluated by chemiluminescence (CL) and thiobarbituric acid reactive substance (TBARS). The CH group has shown lower myocardial as well as systemic LPO than CS, and the last was not different from CO. In terms of antioxidant enzyme activities, in the CH group was found higher SOD, GPx, GST activities and higher GSH concentration in cardiac tissue as compared to the CS ones. In the NO/metabolites evaluation, cast+horm group presented higher plasma and tissue levels of nitrate. This data reinforces the idea that estrogen induces NO formation. Superoxide anion production was estimated through lucigenin method, which evaluates NADH/NADPH oxidase activity in isolated aorta. The activity of this enzyme was enhanced in the CH group. Since not only did the group animals that received hormone replacement show higher superoxide anion formation but also higher levels of NO than CS group, no significant hemodynamic changes were observed. Analysis of Starling curves did not show differences among the three groups studied. In terms of ischemia and reperfusion, the CH group has shown the best recovery as compared to the others while CS group exhibited an important ischemic contracture.

The achieved results clearly indicate cardiovascular benefits when using estrogen therapy with the ischemic cardiac damages. Additionally, no major variations in the hemodynamics variables could be observed. These results also indicate that an increase in the antioxidants defenses led to a reduction in the oxidative stress.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE ABREVIATURAS	16
1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Síntese de Estrogênios e seus Receptores	17
1.2 Metabolismo e Vias de Administração	21
1.3 Benefícios e Riscos da Reposição Estrogênica	25
1.4 Estrogênio como Cardioprotetor?	31
1.4.1 Papel dos Estrogênios no Metabolismo do Óxido Nítrico (NO).....	34
1.5 Papel do Estrogênio no Estresse Oxidativo	38
1.6 Espécies Reativas de Oxigênio (Ero) em Sistemas Biológicos e Defesas Enzimáticas	40
1.7 Efeitos Biológicos dos Radicais Livres.....	46
1.8 Defesas Antioxidantes não Enzimáticas	49
1.9 Hipótese.....	53
1.10 Objetivo.....	53
1.10.1 Objetivo Geral	53
1.10.2 Objetivos Específicos	53
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
2.1 ANIMAIS	55
2.2 REAGENTES	55
2.3 SOLUÇÕES	56
2.3.1 Solução de Krebs-Hepes para Lucigenina:.....	56
2.3.2 Líquidos de Perfusão	56
2.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	57
2.5 SEQÜÊNCIA EXPERIMENTAL	58
2.6 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS	60
2.6.1 Cirurgia de Ovariectomia.....	60
2.6.2 Cirurgia de Implantação dos <i>pellet</i>	61

2.6.3 Canulação	61
2.7 REGISTRO E PROCESSAMENTO DE SINAL – PRESSÃO ARTERIAL	62
2.8 COLETA DE SANGUE.....	64
2.9 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS E PREPARO DOS HOMOGENEIZADOS	64
2.10 DOSAGEM HORMONAL	65
2.11 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	66
2.12 DOSAGEM DE HEMOGLOBINA	67
2.13 MEDIDAS DE LIPOPEROXIDAÇÃO (LPO)	67
2.13.1 Quimiluminescência Iniciada por t-BOOH.....	67
2.13.2 Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)	68
2.14 DETERMINAÇÕES ENZIMÁTICAS.....	69
2.14.1 Superóxido Dismutase (SOD)	69
2.14.2 Catalase (CAT)	71
2.14.3 Glutathione Peroxidase (GPx).....	72
2.14.4 Glutathione S-Transferase	74
2.15 DEFESA NÃO ENZIMÁTICA	75
2.15.1 Glutathione Total.....	75
2.16 DETERMINAÇÃO DE NITRATOS E NITRITOS	75
2.17 DETERMINAÇÃO DO ÂNION RADICAL SUPERÓXIDO PELA OXIDAÇÃO DA LUCIGENINA.....	76
2.18 PERFUSÃO DO CORAÇÃO.....	77
2.19 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	83
3 RESULTADOS.....	84
3.1 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA CIRURGIA DE CASTRAÇÃO E DA REPOSIÇÃO HORMONAL.....	84
3.2 ESTRESSE OXIDATIVO CARDÍACO.....	87
3.2.1 Via de Administração Intramuscular.....	87
3.2.1.1 Medidas de Lipoperoxidação	88
3.2.1.2 Atividade das Enzimas Antioxidantes	90
3.2.2 Via de Administração Intraperitoneal	91
3.2.2.1 Medidas de Lipoperoxidação	92
3.2.2.2 Atividade das Enzimas Antioxidantes	94
3.2.3. Via de Administração Transdermal	96
3.2.3.1 Medidas de Lipoperoxidação (LPO).....	96
3.2.3.2 Medidas das enzimas antioxidantes	98
3.2.3.3 Capacidade antioxidante não enzimática.....	100
3.3 ESTRESSE OXIDATIVO SISTÊMICO NA VIA TRANSDERMAL	101
3.3.1 Medidas de Lipoperoxidação	101
3.3.2 Enzimas antioxidantes	102
3.3.3 Defesa antioxidante não enzimática	104
3.4 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DO ÂNION RADICAL SUPERÓXIDO – LUCIGENINA.....	105
3.5 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS METABÓLITOS DO ÓXIDO NÍTRICO.....	107
3.5.1 Concentração de Nitrato em tecido cardíaco.....	107
3.5.2 Concentração de Nitrito em tecido Cardíaco:.....	108
3.5.3 Concentração de Nitrato em plasma.....	108
3.5.4 Concentração de Nitrito em plasma	109
3.6 PERFIL HEMODINÂMICO	111

3.6.1 Hemodinâmica do Grupo Intraperitoneal.....	111
3.6.1.1 Pressão Arterial Sistólica (PAS), Pressão Arterial Diastólica (PAD), Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC).....	111
3.6.2 Hemodinâmica do Grupo Transdermal	112
3.6.2.1 Pressão Arterial Sistólica (PAS), Pressão arterial diastólica (PAD), Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC).....	112
3.7 PERFUSÃO DO CORAÇÃO na Via Transdermal.....	113
3.7.1 Curvas de função Ventricular - Starling.....	113
3.7.1.1 Frequência Cardíaca (FC)	113
3.7.1.2 Pressão Ventricular Sistólica (PVSist)	115
3.7.1.3 Pressão Ventricular Desenvolvida (PVD)	117
3.7.1.4 Velocidade de Contração Ventricular Esquerda (+dP/dt)	119
3.7.1.5 Velocidade de Relaxamento Ventricular Esquerdo (-dP/dt)	121
3.7.1.6 Pressão de Perfusão (PP).....	123
3.7.2. Isquemia e Reperfusão.	125
3.7.2.1 Frequência Cardíaca (FC – bpm) – IR	126
3.7.2.2 Pressão Ventricular Sistólica (PVSist)	128
3.7.2. 3 Pressão Ventricular Diastólica (PVDiast)	130
3.7.2. 4 Velocidade de Contração Ventrículo esquerdo (+dP/dt)	132
3.7.2. 5 Velocidade de Relaxamento Ventricular Esquerdo (-dP/dt)	134
3.7.2. 6 Pressão de Perfusão (PP).....	137
4. DISCUSSÃO	140
4.1 EFICÁCIA DA CASTRAÇÃO E REPOSIÇÃO ESTROGÊNICA.....	141
4.2 ESTRESSE OXIDATIVO.....	143
4.2.1 LPO nas três vias de administração.....	143
4.2.2 Enzimas antioxidantes	145
4.2.3 LPO Sistêmica	149
4.2.4 Sistema de defesa enzimático e não enzimático sistêmico.....	150
4.3 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DO ÂNION SUPERÓXIDO EM AORTA	151
4.4 AVALIAÇÃO DOS METABÓLITOS DO ÓXIDO NÍTRICO.	153
4.5 AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS HEMODINÂMICAS	155
4.6 PERFUSÃO CARDÍACA.....	157
4.6.1 Curva de Função Ventricular - Frank Starling	157
4.6.2 Isquemia seguida da reperfusão	160
SUMÁRIO DOS RESULTADOS.....	167
CONCLUSÕES	170
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	172

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Seqüência experimental das diferentes vias de administração e do grupo de perfusão cardíaca.	58
Tabela 3.1: Concentração plasmática do hormônio 17 β -estradiol (pg/mL).....	87
Tabela 3.2: Atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD) em homogeneizados cardíacos de ratas na Via Intramuscular.	91
Tabela 3.3: Atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD) em homogeneizados cardíacos de ratas na via intraperitoneal.	95
Tabela 3.4: Atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD), glutathione reduzida (GSH) e glutathione S-transferase (GST) em homogeneizados cardíacos de ratas na via Transdermal (pellets).	104
Tabela 3.5: Concentração da glutathione (GSH) em homogeneizados cardíacos de ratas na via Transdermal (pellet).	101
Tabela 3.6: Atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD), glutathione total (GSH-TOTAL) e glutathione S-transferase (GST) em nível sistêmico (eritrócitos) de ratas na via transdermal.	104
Tabela 3.7: Atividade da glutathione (GSH) em nível sistêmico (eritrócitos) de ratas na via Transdermal.....	104
Tabela 3.8: Pressão Arterial Diastólica (PAD), Pressão Arterial Sistólica (PAS), Pressão Arterial Média (PAM) dos grupos CONTROLE, CASTRADO e CAST+HORM, na Via Intraperitoneal.....	111

Tabela 3.9: Pressão Arterial Diastólica (PAD), Pressão Arterial Sistólica (PAS), Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC) dos grupos experimentais, na Via Transdermal.....	112
Tabela 3.10: Frequência Cardíaca usando (FC), a análise de variância utilizando o delineamento em medidas repetidas, na curva de Starling.....	115
Tabela 3.11: Pressão Ventricular Sistólica (PVSist), análise de variância utilizando o delineamento em medidas repetidas, na curva de Starling.....	117
Tabela 3.12: Pressão Ventricular Desenvolvida (PVD), análise de variância utilizando o delineamento em medidas repetidas, na curva de Starling.....	119
Tabela 3.13: Velocidade de Contração do ventrículo esquerdo (+dP/dt), análise de variância utilizando o delineamento em medidas repetidas, na curva de Starling.....	121
Tabela 3.14: Velocidade de Relaxamento (-dP/dt), análise de variância utilizando o delineamento em medidas repetidas, na curva de Starling.....	123
Tabela 3.15: Pressão de Perfusão (PP), análise de variância utilizando o delineamento em medidas repetidas, na curva de Starling.....	125
Tabela 3.16: Frequência cardíaca (FC), análise de variância utilizando o delineamento em medidas repetidas, na isquemia e reperfusão.....	128
Tabela 3.17: Pressão Ventricular Sistólica (PVSist), análise de variância utilizando o delineamento em medidas repetidas, na isquemia e reperfusão.....	130
Tabela 3.18: Pressão Ventricular Diastólica (PVDiast), análise de variância utilizando o delineamento em medidas repetidas, na isquemia e reperfusão.....	132
Tabela 3.19: Velocidade de Contração do Ventrículo Esquerdo (+dP/dt), análise de variância utilizando o delineamento em medidas repetidas, na isquemia e reperfusão.....	134
Tabela 3.20: Velocidade de relaxamento do ventrículo esquerdo (-dP/dt), análise de variância utilizando o delineamento em medidas repetidas, na isquemia e reperfusão.....	137
Tabela 3.21: Pressão de Perfusão (PP), análise de variância utilizando o delineamento em medidas repetidas, na isquemia e reperfusão.....	139

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Estrutura e produção dos estrogênios endógenos.....	18
Figura 1.2: Complexidade do Metabolismo do Estrogênio.....	19
Figura 1.3: Efeito do estrogênio em diferentes órgãos e sistemas.....	22
Figura 1.4: Síntese no ovário, transporte e metabolismo dos estrogênios.....	23
Figura 1.5: Molécula de estradiol.	24
Figura 1.6: Formação do Óxido Nítrico (NO) e suas ações.....	36
Figura 1.7: Produção de radical superóxido, sua interação com o Óxido Nítrico formando peroxinitrito..	37
Figura 1.8: Redução monoelétrica do oxigênio formando ERO.	40
Figura 1.9: Estrutura eletrônica de espécies ativas de oxigênio (ERO).	40
Figura 1.10: Esquema geral das principais fontes celulares de produção e metabolização das ERO.....	46
Figura 1.11: Reações em cadeia da lipoperoxidação.....	48
Figura 1.12: A figura representa o processo de oxidação da glutathiona.....	51
Figura 1.13: Mecanismos envolvidos na dismutação das espécies reativas de oxigênio (ERO), induzida pelos estrogênios..	52
Figura 2.1: Procedimento da cirurgia de castração ou da simulação da castração.....	61
Figura 2.2: Procedimento cirúrgico de implantação de cateter na artéria carótida.	62

Figura 2.3: Equipamento, sistema de aquisição de dados Codas, para o registro da PA.	63
Figura 2.4: Aparato mostrando banho para a incubação das aortas da técnica de Lucigenina.....	77
Figura 2.5: Esquema da posição do balonete no ventrículo esquerdo.....	78
Figura 2.6: Esquema da perfusão coronariana.	78
Figura 2.7: Aparelho de perfusão de coração isolado tamanho 3, modo fluxo constante, modelo Langendorff.....	79
Figura 2.8: Esquema do sistema de perfusão Langendorff (adaptado do Manual de Perfusão Langendorff).....	81
Figura 3.1: Aparência do trato reprodutivo nos diferentes grupos experimentais.....	85
Figura 3.2: Peso úmido e peso seco dos cornos uterinos das ratas nos diferentes grupos experimentais.	86
Figura 3.3: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em homogeneizado cardíaco nos distintos grupos, na via intramuscular.	89
Figura 3.4: Quimiluminescência em homogeneizado cardíaco nos distintos grupos, na via intramuscular..	90
Figura 3.5: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em homogeneizados cardíacos nos distintos grupos, na via de administração intraperitoneal.	93
Figura 3.6: Quimiluminescência (QL) em homogeneizados cardíacos, nos distintos grupos da via de administração Intraperitoneal.....	94
Figura 3.7: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em homogeneizado cardíaco nos distintos grupos, na via transdermal..	97
Figura. 3.8: Quimiluminescência (QL) em homogeneizado cardíaco nos distintos grupos, na via transdermal.....	98
Figura 3.9.: Quimiluminescência (QL) iniciada por t-BOOH em eritrócitos nos diferentes grupos experimentais na via transdermal.....	102
Figura 3.10: Quimiluminescência obtida em anéis de aorta incubados com NADH ou NAD(P)H, nos diferentes grupos experimentais (Lucigenina)	106
Figura 3.11: Concentração de Nitrato (NO ₃) em tecido cardíaco nos diferentes grupos experimentais.	107

Figura 3.12: Concentração de Nitrito (NO_2) em tecido cardíaco nos diferentes grupos experimentais na via transdermal.....	108
Figura 3.13: Concentração de Nitrato (NO_3) em plasma nos diferentes grupos experimentais na via transdermal.....	109
Figura 3.14: Concentração de Nitrito (NO_2) em plasma nos diferentes grupos experimentais na via transdermal.. ..	110
Figura 3.15: Frequência Cardíaca (FC) em bpm de corações de ratas submetidos a variações de PVDiast nos diferentes grupos experimentais na via transdermal. Na curva de Starling.	114
Figura 3.16: Pressão Ventricular Sistólica (PVSist) de corações de ratas submetidos a variações de PADiast nos diferentes grupos experimentais na via transdermal. Na curva de Starling.	116
Figura 3.17: Pressão Ventricular Desenvolvida (PVD) de corações de ratas submetidos a variações de PVDiast nos diferentes grupos experimentais na via transdermal. Na curva de Starling.	118
Figura 3.18: Velocidade de Contração (+dP/dt) em mmHg/min, de corações de ratas submetidos a variações de PVDiast nos diferentes grupos experimentais na via transdermal. Na curva de Starling.	120
Figura 3.19: Velocidade de Relaxamento (-dP/dt) em mmHg/min de corações de ratas submetidos a variações de PVDiast nos diferentes grupos experimentais na via transdermal. Na curva de Starling.	122
Figura 3.20: Pressão de Perfusão (PP) em mmHg de corações de ratas submetidos a variações de PVDiast nos diferentes grupos experimentais na via transdermal. Na curva de Starling.	124
Figura 3.21: Frequência cardíaca (FC) em batimento por minuto (bpm) de corações de ratas submetidos à Isquemia e Reperfusão nos diferentes grupos experimentais na via transdermal. Na isquemia e reperfusão.....	127
Figura 3.22: Pressão Ventricular Sistólica (PVSist) (em mmHg) de corações de ratas submetidos à Isquemia e Reperfusão nos diferentes grupos experimentais na via transdermal.....	129
Figura 3.23: Pressão Ventricular Diastólica (PVDiast) (em mmHg) de corações de ratas submetidos à isquemia e reperfusão nos diferentes grupos experimentais na via transdermal.....	131
Figura 3.24: Velocidade de Contração do Ventrículo Esquerdo (+dP/dt) de corações de ratas submetidos à Isquemia e Reperfusão nos diferentes grupos experimentais na via transdermal.. ..	133

- Figura 3.25: Velocidade de Relaxamento do Ventrículo Esquerdo ($-dP/dt$) de corações de ratas submetidos à isquemia e reperfusão nos diferentes grupos experimentais na via transdermal.....136
- Figura 3.26: Pressão de Perfusão (PP) de corações de ratas submetidos à Isquemia e Reperfusão nos diferentes grupos experimentais na via transdermal.....138
- Figura 4.1: Mecanismo gerador do dano celular mediado por ERO durante o processo de isquemia-reperfusão.....162

LISTA DE ABREVIATURAS

AZO: 2,2' Azo-bis (2-amidino-propano)
CAST+HORM: grupo castrado que recebeu Reposição Hormonal
CAT: Catalase
CDNB: 1-cloro-2,4-dinitro-benzeno
DNP-SG: 2,4 dinitro-fenil-glutathiona
-dP/dt: Velocidade de Relaxamento do ventrículo esquerdo
+dP/dt: Velocidade de Contração do ventrículo esquerdo
DTNB: Ácido Ditionitrobenzóico
e⁻ : Elétrons
EPM: Erro Padrão da Média
FC: Frequência Cardíaca
GPx: Glutathiona Peroxidase
GSH: Glutathiona Reduzida
GSSG: Glutathiona Oxidada
HDL: Lipoproteína de Alta Densidade
IM: Intramuscular
IP: Intraperitoneal
LDL: Lipoproteína de Baixa Densidade
LPO: Lipoperoxidação
NO: Óxido Nítrico
NOS: Óxido Nítrico Sintase
O₂⁻: Radical Superóxido
PA: Pressão Arterial.
PAD: Pressão Arterial Diastólica
PAM: Pressão Arterial Média
PAS: Pressão Arterial Sistólica
PP: Pressão de Perfusão Média
PVD: Pressão Ventricular Desenvolvida
PVDiast: Pressão Ventricular Diastólica
PVSist: Pressão Ventricular Sistólica
QL: Quimiluminescência
SOD: Superóxido Dismutase
TBARS: Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
VT: Via Transdermal

1. INTRODUÇÃO

1.1 SÍNTESE DE ESTROGÊNIOS E SEUS RECEPTORES

A fonte primária de estradiol na mulher são as células da teca e granulosa dos ovários. A teoria da síntese dos estrogênios diz que as células da teca secretam androgênios que difundem para as células granulosa para serem aromatizadas para estrogênios. Entretanto, há evidências de que ambas as células são hábeis para formar androgênios e estrogênios. Estrona e estriol são primeiramente formados no fígado pelo estradiol (GANONG, 1993; GRUBER et al., 2002).

Os estrogênios que ocorrem naturalmente 17β -estradiol (E_2), estrona (E_1) e estriol (E_3) são esteróides, C_{18} , derivados do colesterol. Outros esteróides são formados por redução do número de átomos de carbono de 27 para 18. O passo limitante na produção de esteróides está na transferência do colesterol do citosol para dentro da membrana da mitocôndria, onde a enzima citocromo P450 catalisa a quebra da cadeia de colesterol no lado estabelecido. A aromatização é o primeiro passo na formação dos estrogênios. Esta reação é catalisada pelo complexo enzimático P450 aromatase monooxigenase que está presente no retículo

endoplasmático e com funções de demetilase. Em três consecutivas reações de hidroxilações, estrona e estradiol são formadas por precursores obrigatórios de androstenediona e testosterona respectivamente (Figura 1.1) (GRUBER, et al. 2002).

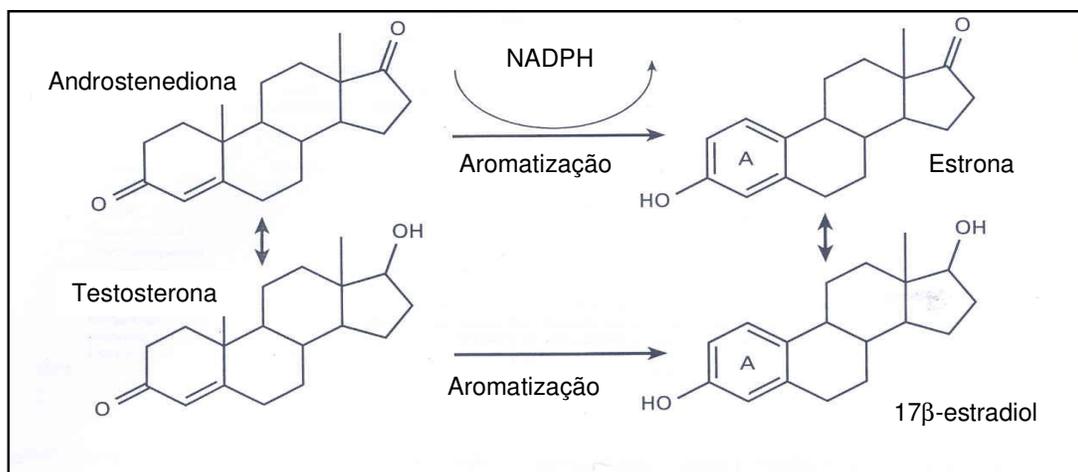


Figura 1.1: Estrutura e produção dos estrogênios endógenos. Androstenediona e testosterona são obrigatoriamente precursores dos estrogênios. O complexo enzimático P450 monooxigenase aromatase catalisa sua conversão para estrogênio. Este processo ocorre em três passos, três moléculas de oxigênio e três equivalentes redutores para NADPH são usadas. No fígado, o estradiol pode ser convertido a estrona (visto na figura) (Adaptado de Gruber, 2002).

O estradiol é sintetizado a partir da testosterona pela citocromo P450 aromatase nos ovários, placenta e em tecidos alvos como o cérebro, próstata, útero e glândulas mamárias. Uma vez formado, o estradiol pode ser metabolizado a múltiplos produtos hidroxilados por enzimas da família citocromo P450, e metabólitos 2,4-hidroxilados catecol estrogênio e pode ser o-metilado pela catecol-o-metiltransferase. O estradiol e seus metabólitos hidroxilados podem também ser esterificados a ésteres de ácidos graxos ou conjugados por glucuronidação ou sulfonação, os quais podem sofrer de-esterificação pela estearase ou deconjugação pela β -glucuronidase ou sulfatase para liberar estrogênios ativos no fígado ou diretamente em células-alvo. Essa complexidade na síntese e metabolismo do

estrogênio está descrita na figura 1.2, essa figura proporciona muitos sítios potenciais da regulação da ação do estrogênio. A participação das P450 no entendimento do metabolismo do estrogênio indica que mudanças na concentração dos xenobióticos podem também alterar a metabolização dos hormônios esteróides. Os fatores ambientais drogas, fumo, álcool, pesticidas e composição da dieta podem afetar o metabolismo dos hormônios (ZHU et al. 1998).

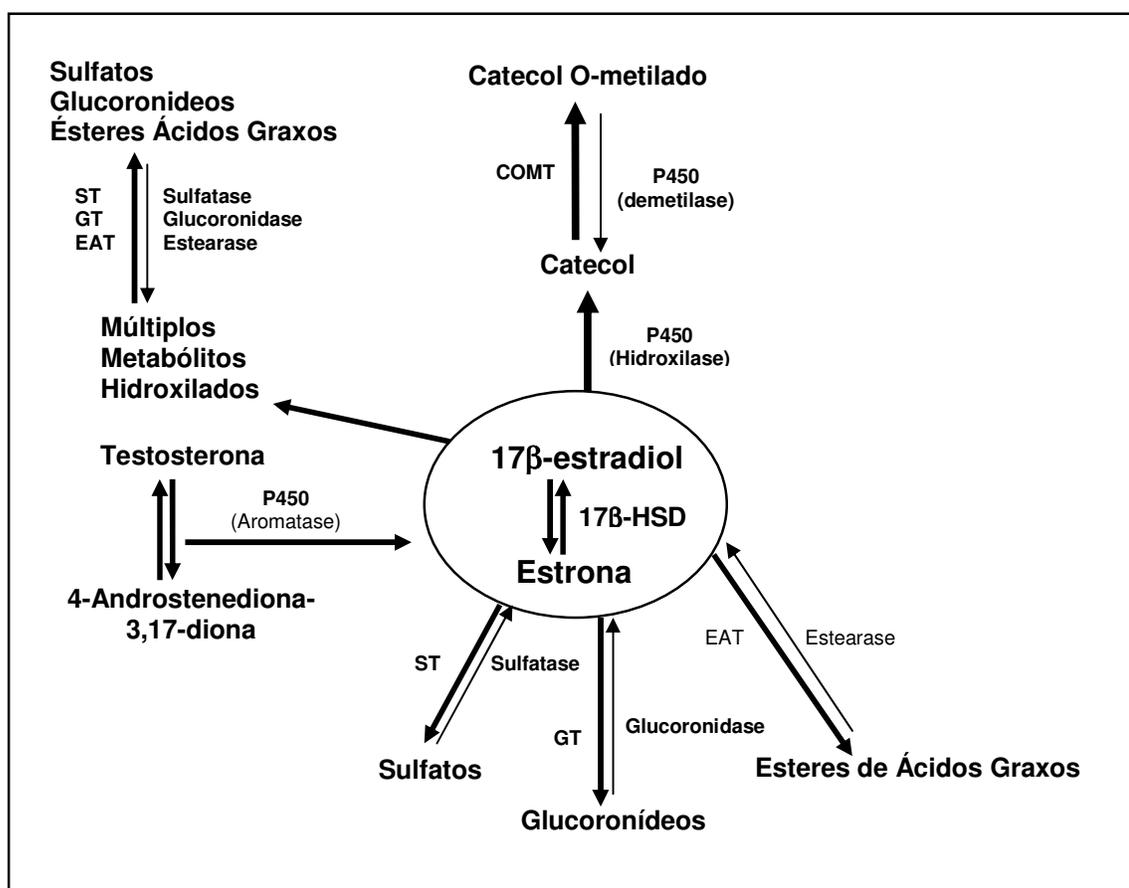


Figura 1.2: Complexidade do Metabolismo do Estrogênio. Abreviaturas usadas: ST (sulfotransferases), GT (Glucuronosiltransferase), EAT (estrogênio aciltransferase; para formação de ésteres de ácidos graxos), 17β-HSD (17β-hidroxiesteróides deidrogenase), COMT (catecol-o-metiltransferase) e P450 (citocromo P450) (Adaptado de Zhu, 1998).

A atividade de aromatase também tem sido detectada no músculo, no tecido adiposo, no tecido nervoso e células de Leydig do testículo. Na puberdade, nas meninas, é iniciado o pulso das gonadotrofinas noturno de baixa amplitude que aumenta a concentração sérica de estradiol. Durante o ciclo menstrual a produção varia ciclicamente com alta frequência e concentração sérica na fase pré-ovulatória e diminuição na pré-menstrual. Na pós-menopausa, as concentrações séricas são menores. O estradiol é formado por conversão extragonadal da testosterona. A estrona é predominante nessa fase na mulher. O nível da síntese de estrogênio no tecido extragonadal aumenta em função da idade e peso corporal. Sabe-se sobre os fatores que regulam a produção de estrogênio na pós-menopausa, e no período fértil esse controle é exercido pelas gonadotrofinas.

Receptores estrogênicos específicos têm sido identificados em vários tecidos: ovário, endométrio, epitélio vaginal, hipotálamo, osso, músculo liso vascular e endotélio. Assim, a ausência estrogênica leva ao surgimento de sintomas nestes órgãos-alvo (LEVIN, 2002).

Os receptores de estrogênio são o receptor α (ER α) e o receptor β (ER β). A distribuição tecidual dos dois tipos de receptores de estrogênio é diferente, embora haja algumas sobreposições. A célula granulosa e espermatídes contêm mais ER β e seus subtipos, e está presente em tecidos-alvo: rim, mucosa intestinal, parênquima pulmonar, medula do osso, cérebro, células endoteliais e próstata. O ER α encontra-se principalmente no endométrio, células tumorais do câncer de mamas, e estroma do ovário (GRUBER, 2002).

As ações do estrogênio em órgãos reprodutivos e não reprodutivos ocorrem via receptores estrogênicos, ambos expressos no endotélio e células do músculo liso

vascular e eles podem mediar o efeito protetor agudo vascular. Sendo que o ER β é mais expresso e regula mais fortemente as paredes dos vasos sanguíneos e suporta o dano vascular (LEVIN, 2002; ZHU, 1998). O estrogênio exerce profundo efeito na fisiologia de diversas células-alvo e estes efeitos parecem ser mediados pelos dois receptores estrogênicos, ER α e ER β , que regulam a transcrição de diferentes genes (KATZENELLENBOGEN. et al. 2000).

1.2 METABOLISMO E VIAS DE ADMINISTRAÇÃO

O estrogênio estimula o crescimento, o fluxo de sangue e a retenção de água nos órgãos sexuais e também está envolvido no câncer de mamas e câncer de endométrio. No fígado, o estrogênio aumenta os receptores de lipoproteínas, resultando na diminuição das concentrações séricas da lipoproteína de baixa densidade. Por outro lado, os estrogênios aumentam o potencial para a coagulação. No trato gastro-intestinal, o estrogênio protege contra o câncer de cólon. Na pele, o estrogênio aumenta o *turgor* e a produção de colágeno e reduz a profundidade das rugas (Figura 1.3) (GRUBER, et al. 2002).

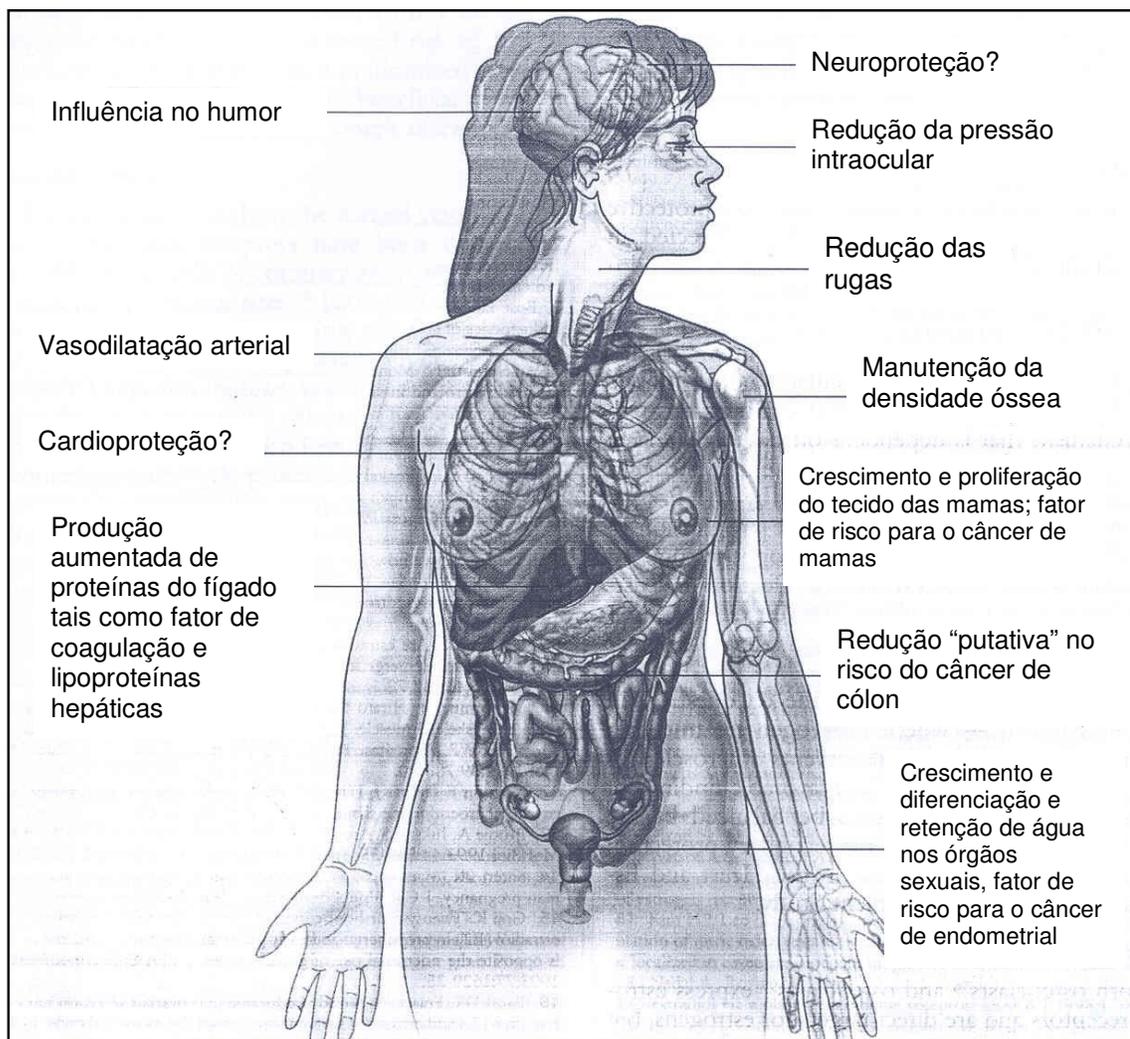


Figura 1.3: Efeito do estrogênio em diferentes órgãos e sistemas. O estrogênio tem efeito neuroprotetor e reduz as flutuações do humor em mulheres na perimenopausa. Nos olhos, o estrogênio diminui a pressão intraocular. O estrogênio é um vasodilatador arterial e pode ter ação cardioprotetora. No fígado, o estrogênio estimula captação das lipoproteínas séricas, bem como a produção dos fatores de coagulação. Estrogênios também previnem e revertem os quadros de osteoporose e aumentam a viabilidade em vários tecidos. O estrogênio estimula o crescimento endometrial e câncer de mamas, mas pode proteger contra o câncer de cólon. Na pós-menopausa, mulheres que recebem terapia de reposição estrogênica tem menor suscetibilidade ao câncer de cólon que mulheres que não recebem a terapia. Quando aplicado topicamente, o estrogênio na pele promove turgor na pele e produção de colágeno e reduz as rugas (Adaptado de GRUBER, 2002).

O estradiol é transportado por globulinas que se ligam aos hormônios sexuais, são elas: a β -globulina tem mais afinidade, a albumina tem menos afinidade e de 2 a 3% do estrogênio poder estar livres (Figura 1.4). O estrogênio é metabolizado por sulfonação ou glicuronidação e os conjugados são excretados pela bile ou urina. A hidrólise desses conjugados pela flora intestinal e subsequente absorção do estrogênio é feita pela circulação entero-hepática (GRUBER, 2002).

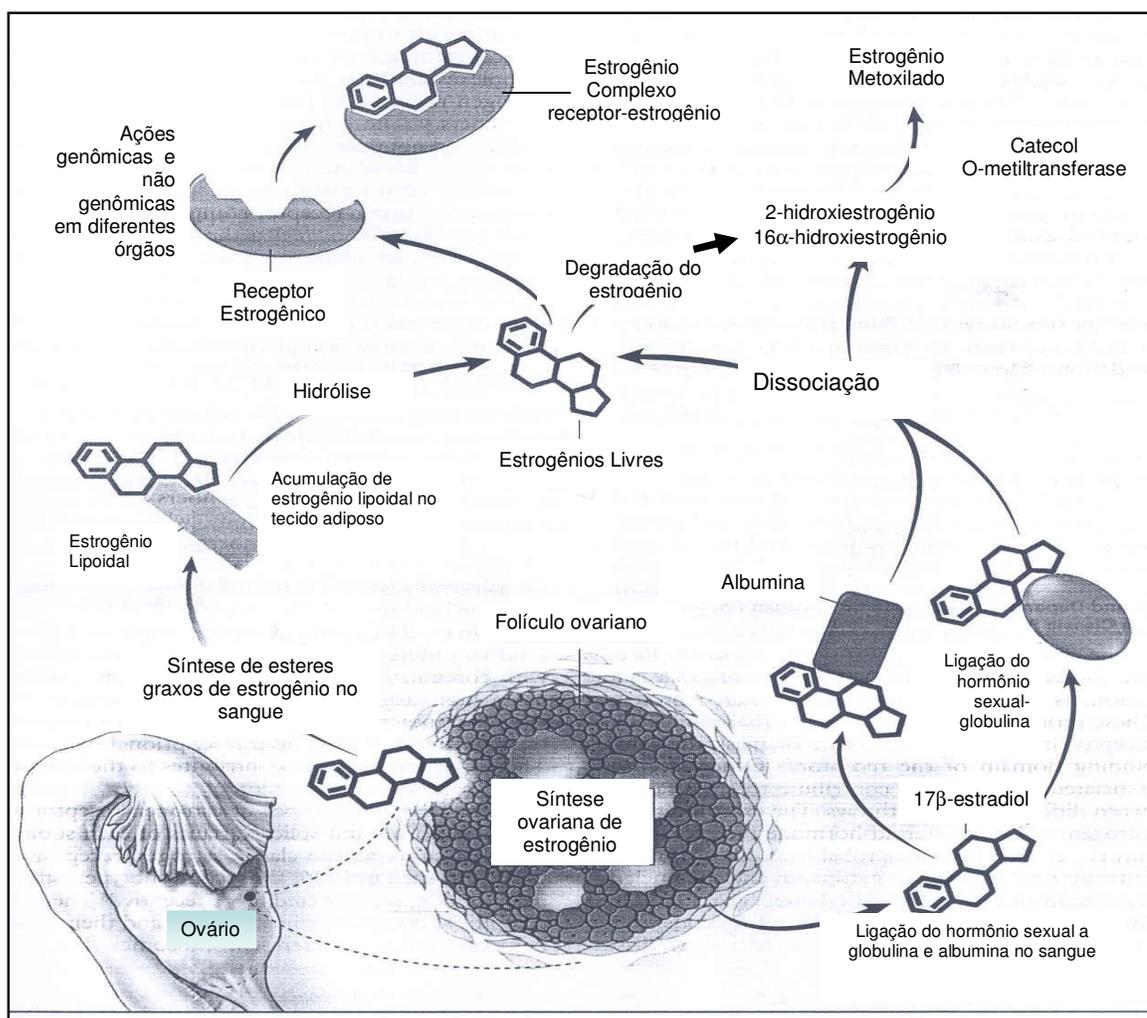


Figura 1.4: Síntese no ovário, transporte e metabolismo dos estrogênios. Após a síntese, normalmente no ovário, o 17 β -estradiol é secretado para a corrente sangüínea, onde é ligado a globulina ligada aos hormônios sexuais e à albumina. Os estrogênios livres difundem-se para as células-alvo e exercem seus efeitos específicos genômicos ou não-genômicos. Os estrogênios lipoidais são sintetizados no sangue e presumivelmente em outros tecidos mas se acumulam predominantemente no tecido adiposo. O catabolismo enzimático do estrogênio produz hidroxiestrogênio e metoxiestrogênio (Adaptado de Gruber, 2002).

Os hormônios estrogênicos são eliminados do corpo por conversão metabólica para metabólitos solúveis em água inativos (ou menos ativos) que são excretados na urina e ou fezes. Os dispositivos metabólicos do estrogênio incluem metabolismo oxidativo (hidroxilações) e metabolismo conjugativo por glucoronidação, sulfonação e/ou o-metilação. A família das citocromos P450 é a maior via de catálise do metabolismo oxidativo do estrogênio para formar múltiplos metabólitos hidroxilados. Embora a maioria do metabolismo oxidativo dos estrogênios ocorre no fígado, algumas isoformas do estrogênio são metabolizadas pela P450 em outros tecidos extra-hepáticos (Figura 1.5) (ZHU, 1998).

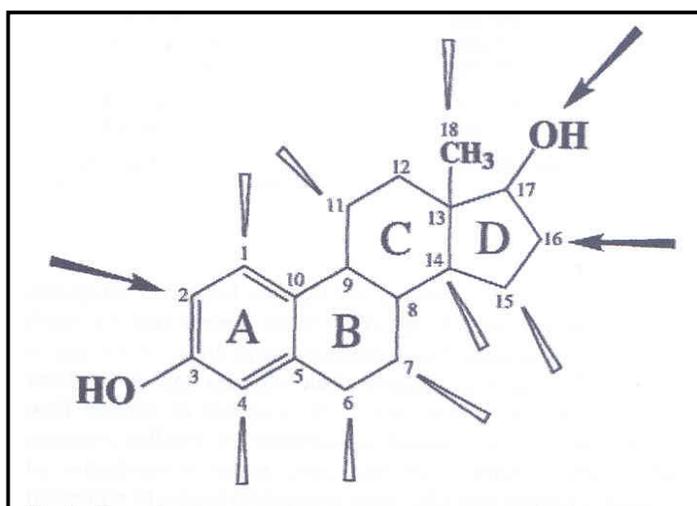


Figura 1.5 Molécula de estradiol. As setas marcam os sítios do metabolismo oxidativo do estradiol NADPH-dependente da enzima citocromo P450. O fígado é o local de maior metabolização do estradiol (2-hidroxilações, 16-hidroxilações e formação de estrona). (Adaptado de Zhu, 1998).

A administração oral de estrogênio precisa de um tempo mais prolongado para exercer seus efeitos, pois depende do metabolismo de primeira passagem, e o uso do estrogênio conjugado poderia aumentar a pressão arterial. O efeito do metabolismo de primeira passagem ocorre quando o estrogênio por via oral chega ao fígado via circulação porta após a absorção intestinal, sem previamente ter sido metabolizado. Muitos dos efeitos colaterais da terapia estrogênica (coleletíase,

hipertensão arterial sistêmica-HAS-, hipercoagulabilidade) parecem resultar desse fenômeno de “primeira passagem”. Os estrogênios por via oral afetam as proteínas hepáticas e o metabolismo lipídico. Eles aumentam a produção dos hormônios sexuais, globulina carreadora de cortisol, globulina carreadora de tiroxina, transferrina e ceruloplasmina. Tais modificações não constituem patologias, mas alteram resultados de testes clínicos laboratoriais usados na determinação dos níveis séricos das substâncias ligadas a essas proteínas carreadoras (LOBO, 1987).

O uso de estrogênio via oral influencia a síntese hepática de outras proteínas que têm sido apontadas como causadoras ou contribuintes para ocorrência de certos processos patológicos.

Na medida em que o fígado altera a síntese de proteínas como o substrato da renina, lipoproteínas e fatores de coagulação podem surgir como resultado de maior risco de hipertensão arterial sistêmica (HAS), dislipidemias e tromboembolismo podem surgir. A importância de se evitar a administração oral e utilizar via não orais reside no fato desta última levar a uma menor incidência destes para-efeitos (WENDER, 1993).

A vantagem fisiológica da terapia transdermal (percutâneo) para a oral está em que o estrogênio percutâneo (transdérmico) evita as modificações secundárias do metabolismo de 1^a. passagem hepática (WENDER, 1993).

1.3 BENEFÍCIOS E RISCOS DA REPOSIÇÃO ESTROGÊNICA

A descoberta dos hormônios ovarianos foi em 1924 por ALLEN e DOISY, e, em 1932, GEIST e SPIELMAN propuseram que as mulheres recebessem estrogênio para reverter à sintomatologia do climatério, introduzindo a idéia de prevenção desta

síndrome. O estradiol foi identificado por MacCARQUODALE, em 1935, como o principal hormônio secretado pelo ovário. Na época, extratos de ovários de animais foram utilizados com administração parenteral.

A Terapia de Reposição Hormonal (TRH) foi introduzida na Alemanha por volta de 1937, quando alguns médicos tratavam os fogachos com o uso estrogênico e teve sua expansão em 1950, nos Estados Unidos, despertando grande entusiasmo devido aos evidentes benefícios que proporcionava em curto prazo como o alívio dos sintomas do climatério. Um número cada vez maior de mulheres viverá um terço de suas vidas após a menopausa e, com o auxílio da TRH, poderá usufruir uma velhice com melhor qualidade de vida, uma vez que a reposição hormonal alivia acentuadamente esses sintomas num número expressivo de pacientes (MARSLEW, et al. 1991).

O climatério é um processo lento e gradual que persiste por alguns anos após a menstruação ter cessado (menopausa), sendo marcado por um progressivo decréscimo nos níveis hormonais sexuais circulantes (FUCHS, et al. 1995). A menopausa *per se* não é uma situação patológica, mas suas conseqüências o são e podem ser atenuadas pela TRH (SPRITZER et al., 1998). Com isso, podem surgir sintomas vasomotores típicos, os fogachos (ondas de calor, seguidas ou não de sudorese), além de insônia, irritabilidade, nervosismo, melancolia, vertigem, fadiga, artralgia ou mialgia, cefaléia, palpitações, dispareunia, parestesias, perda involuntária de urina, doenças degenerativas em médio prazo, atrofia urogenital e sintomas como: prurido vulvar, algopareunia, sensação de secura vaginal, polaciúria e incontinência urinária, aumentam de infecções urinárias, vulvovaginites e distopias genitais nas mulheres climatéricas (UTIAM, 1987; RAZ & STAM, 1993; MOOREN,

1996). Ao serem observadas estas queixas decorrentes da menopausa a relação custo/benefício é claramente a favor do uso da Terapia de Reposição Hormonal (TRH) (SPRITZER et al., 1998).

O uso da reposição hormonal trouxe evidências bastante positivas através de pesquisas básicas, ensaios clínicos e estudos observacionais de que a reposição diminui os riscos de osteoporose e das doenças cardiovasculares (ETTINGER et al., 1992; GRODSTEIN et al., 1997; GRUBER et al., 2002). Muitos estudos têm mostrado uma diminuição da mortalidade entre as mulheres possivelmente pelo efeito benéfico sobre o sistema cardiovascular, reduzindo o estresse e melhorando as funções psicológicas, embora isto não esteja bem descrito. Assim, as mulheres que fazem uso de estrogênio podem ter um importante benefício a longo prazo melhorando a qualidade de vida (DITKOFF et al., 1991). Muitos estudos não demonstram isto, o que pode ser devido a diferentes metodologias, tempo de uso, concentração do hormônio, via de administração o que leva a resultados contraditórios.

O estudo de Grodstein e colaboradores avaliaram a relação entre o uso de hormônios na pós-menopausa e mortalidade entre as participantes do Nurses` Health Study, em 1976, no qual participaram 121.700 enfermeiras entre 30 e 55 anos que responderam um questionário contendo as informações pertinentes ao desenvolvimento do estudo, incluindo informações sobre a menopausa, doenças cardiovasculares e câncer. No estudo, houve 3637 mortes no período de 1976 e 1994 entre as mulheres na menopausa: 461 morreram por doença coronariana, e 167 de stroke (acidente vascular cerebral); e 1985 de câncer, sendo que 425 mortes foram de câncer de mamas e 58 de câncer de endométrio. O estudo concluiu que a

mortalidade entre as mulheres que usam hormônios pós-menopausa é menor que as que não usam; entretanto, os benefícios diminuem com o longo tratamento e são menores em mulheres com baixo risco de doença coronariana (GRODSTEIN, et al. 1997).

Riscos apontados para a TRH estão especialmente relacionados ao aumento da incidência de câncer de mamas e endométrio com o uso prolongado do hormônio. Estas modificações sobre o útero devem-se à proliferação celular induzida isoladamente pelo estrogênio ou insuficientemente equilibrada pela progesterona que pode levar ao desenvolvimento de hiperplasias endometriais e até de adenocarcinoma de endométrio (UTIAN, et al. 1987).

Um dos órgãos-alvo atingido é o hipotálamo. Após ovariectomia bilateral, a concentração de dopamina se reduz e a de noradrenalina se eleva no hipotálamo levando a um aumento na atividade da tirosina hidroxilase (a enzima chave na síntese de catecolaminas), e no *turnover* da noradrenalina ao nível hipotalâmico. Tais mudanças sugerem que a queda do estrogênio pode causar aumento no índice noradrenalina/dopamina, que independe do processo de envelhecimento. Todas essas conseqüências podem ser revertidas com a administração estrogênica (WENDER, 1993).

No estudo de Simpkins e colaboradores foi sugerido que o estrogênio tem um papel importante na prevenção e/ou tratamento das doenças neurodegenerativas. Nesse estudo, eles demonstraram que fêmeas de ratos Sprague-Dawley ovariectomizadas apresentam uma diminuição na afinidade na regulação da atividade da colina com a colina acetiltransferase em hipocampus e córtex frontal e a terapia estrogênica reverte este quadro. O estrogênio promove o

aumento da expressão do RNAm do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e do fator de crescimento do nervo (NGF); estas duas substâncias têm sido reconhecidas como protetoras contra o efeito da idade e do dano aos neurônios colinérgicos. Assim, foi concluído que o estrogênio pode ser utilizado para o tratamento do mal de Alzheimer e outras doenças neurodegenerativas (SIMPKINS, et al. 1997).

No estudo de Hirvonem e colaboradores foi avaliada a eficácia, a dosagem e tolerabilidade do gel de estradiol e a aplicação de um adesivo transdérmico (tratamento combinado com 10mg de dihidroprogesterona) em mulheres na pós-menopausa. Após 12 meses de tratamento, foi observada atividade secretória endometrial na maioria dos casos e ausência de hiperplasia endometrial. Foi observada diminuição do colesterol total nos dois grupos, sem alteração no HDL-colesterol ou triglicerídios, talvez pelo curto período de administração (dois meses). Os dois tratamentos evitaram a perda de massa óssea. É necessária uma concentração de 150mmol/l de estradiol para obter proteção óssea. Assim, foi constatado que ambas as formas foram bem toleradas, exceto que 20% das pacientes manifestavam queixas de irritação cutânea no grupo adesivo.

O tempo de uso da TRH traz a diminuição da osteoporose e evita as fraturas patológicas (FELSON, et al. 1993). O uso precoce da terapia contribui para desacelerar a perda de massa óssea e reduzir o risco de osteoporose. Os estrogênios atuam principalmente inibindo a atividade osteoclástica e o fazem nas pacientes com osteoporose já estabelecida (CHRISTIANSEN & RIIS, 1990), enquanto que os progestogênios parecem estimular a atividade osteoblástica (PRIOR, 1990). Assim, tanto a reposição estrogênica isolada quanto a TRH

combinada conferem benefícios a curto prazo ao metabolismo ósseo na mulher no período da menopausa (NABULSI, et al. 1993; URBANETZ, et al. 1998). Em ratos ovariectomizados, a deficiência estrogênica aumenta a produção de interleucina-6, interleucina-1 e o fator de necrose tumoral nos osteoblastos e outras células estromais derivadas do osso. Estes fatores estimulam diretamente a diferenciação osteoclástica. Em extratos de osso de mulheres na pós-menopausa com osteoporose, a concentração de RNAm de interleucina-6, interleucina-1 eram altas também. A deficiência estrogênica é conhecida por acelerar a perda óssea e aumentar a suscetibilidade para fraturas. A terapia estrogênica diminui a perda óssea e reduz o risco de fraturas na mulher com osteoporose (GRUBER, 2002).

Muitos estudos mostram que os riscos da reposição hormonal são maiores que os benefícios, especialmente durante o primeiro ano do uso dos hormônios (MANSON, et al. 2003; Women's Health Initiative Investigators, 2002). A terapia hormonal aumenta o risco de eventos coronarianos, morte súbita, câncer de mamas e eventos tromboembólicos, assim, deveria-se considerar outras formas de terapias que não fosse a hormonal (GRADY, 2003). Mosca et al (2002), mostram que a terapia hormonal não deveria ser recomendada para a prevenção das doenças cardiovasculares secundárias e há estudos iniciais sugerindo uma proposta para a prevenção primária, mas há muitas incertezas quanto aos efeitos cardiovasculares.

Para fazer uso da terapia de reposição hormonal deve-se considerar a idade da paciente, o tipo físico, os hábitos de vida, a história familiar de câncer de mamas e endométrio, fatores de risco de perda de massa óssea e doenças cardiovasculares. Em seguida, deve-se avaliar a relação custo-benefício individual e escolher a terapia que mais favoreça à paciente.

1.4 ESTROGÊNIO COMO CARDIOPROTETOR?

Os mecanismos pelos quais o estrogênio reduz o desenvolvimento de doenças cardiovasculares são multifatoriais e incluem alterações no metabolismo lipídico, ações nos componentes das paredes vasculares (endotélio, músculo liso e células adventíciais), neurônios e elementos do sangue (plaquetas e leucócitos). Mudanças na produção de óxido nítrico (NO) têm sido sugeridas como um dos mecanismos bioquímicos celulares regulados pelo estrogênio e variações hormonais podem contribuir para a origem e progressão das doenças cardiovasculares (MILLER, 1999).

As ações do estrogênio são múltiplas, mas o mecanismo exato pelo qual este hormônio pode interferir no sistema cardiovascular continua sendo investigado.

O primeiro mecanismo proposto para explicar como os estrogênios reduzem o risco de doenças cardiovasculares foi à melhora do perfil lipídico. Esse benefício, contudo, depende da via de administração, da dose, do tempo de uso e de um provável efeito atenuante de alguns progestogênios. Após a menopausa, há um aumento no desenvolvimento da aterosclerose causada por uma deficiência estrogênica (KUHL, 1995). O mecanismo mais importante desta patologia é o aumento nos níveis de LDL-colesterol e triglicerídios e aumentada oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) na íntima arterial. Estudos em humanos têm mostrado que a redução na incidência de aterosclerose em mulheres na pré-menopausa em relação aos homens é devida, ao menos em parte, à habilidade dos estrógenos em reduzir a peroxidação das LDL (TIIDUS, 1995). O estrogênio melhora o perfil lipídico, (muda a expressão de genes que melhora o perfil lipídico) e diminui a expressão de proteínas da fibrinólise (MOSCA, et al. 2001). Está bem estabelecido

que o estrogênio diminui os níveis de colesterol total. A queda do colesterol resulta principalmente de uma redução nas concentrações de LDL-colesterol devido a uma “*up-regulation*” dos receptores da apolipoproteína B100. O maior decréscimo na LDL com a TRH parece ocorrer naquelas mulheres com os maiores níveis basais LDL. O efeito benéfico do estrogênio está em inibir a atividade da lipase hepática e aumentar a síntese da apolipoproteína AI. Este efeito se obtém com o estrogênio administrado via oral e resulta num aumento do HDL-colesterol, particularmente da subfração HDL-2, que é a mais importante em conferir efeito protetor contra o desenvolvimento da aterosclerose. O estradiol transdérmico parece ter menor efeito sobre o HDL-colesterol.

O tipo de via de administração dos estrogênios determina efeitos sobre os triglicerídios (TG), os quais constituem um fator de risco para Doenças Cardíacas Coronarianas (DCC) em mulheres. Os estrogênios eqüinos conjugados causam aumento nos TG. Administração de estradiol oral tem pequeno ou nenhum efeito no aumento de TG, mas o estradiol transdérmico causa redução nos TG (URBANETZ, et al. 1998). O estrogênio aumenta triglicerídeos por via oral, o uso transdérmico não causa variação.

A cárdio-proteção estrógeno-dependente pode ser mediada, ao menos em parte, pela síntese aumentada de óxido nítrico (NO). Várias observações dão suporte a essa suposição: 1) o NO está relacionado com várias ações cardioprotetoras como, por exemplo, vasodilatação, inibição da agregação plaquetária e crescimento de células do músculo liso vascular (MONCADA, et al. 1991; DUBEY, 1994; DUBEY, et al. 1995); 2) o tratamento de células endoteliais em cultura com 17β - estradiol estimula a atividade da NO sintase constitutiva

(HAYASHI, et al. 1992); 3) anéis de aorta retirados de fêmeas liberam mais NO do que o dos machos e esta maior liberação estão correlacionados com os níveis circulantes de estradiol (HAYASHI, et al. 1992; SUBBIAH, 2002); 4) o bloqueio farmacológico da NO sintase atenua a vasodilatação da circulação uterina induzida por estradiol (VAN-BUREN, et al. 1992); 5) em humanos, os níveis circulantes de NO aumentam com o desenvolvimento folicular e se correlacionam com os níveis de 17β -estradiol (ROSSELLI, et al. 1994). Embora existam indicações claras de que a função endotelial está alterada pelo estrogênio, os efeitos deste sobre o tônus vascular e conseqüentemente sobre a pressão arterial e a freqüência cardíaca não foram ainda elucidados.

Os estrogênios são considerados agentes vasoprotetores. Os receptores estrogênicos têm sido detectados nas células do músculo liso, artérias coronárias e células endoteliais (GRUBER, et al. 2002). Estrogênios causam em pouco tempo vasodilatação por aumentar a formação e liberação do NO e prostaciclina nas células endoteliais. Ele também reduz o tônus vascular por abrir canais de cálcio através do mecanismo que é dependente de guanosina monofosfato cíclica (GMPc). Ao nível celular, o estrogênio inibe a apoptose das células endoteliais e promove a atividade angiogênica in vitro (GRUBER, et al. 2002).

Kim e colaboradores (1996) demonstraram que o pré-tratamento, em modelos animais, com estrogênio preserva a função endotelial das artérias coronarianas logo após a isquemia/reperfusão. Administração de estrogênio equino, em cachorros totalmente anestesiados, diminui as arritmias de reperfusão e elimina a produção explosiva de radicais livres (MCHUGH, et al. 1998).

Há evidências de estudos observacionais e pesquisas randomizadas que indicam que a incidência de doenças coronarianas é menor em mulheres na pré-menopausa quando comparadas com homens na mesma faixa etária e em mulheres pós-menopausa que fazem uso de estrogênio. No entanto, alguns estudos epidemiológicos têm apontado para um aumento do risco das doenças cardiovasculares na menopausa (SALEH, et al. 2000).

Uma outra hipótese para explicar a cárdio-proteção oferecida pelo estrogênio é a da perda mensal de sangue pela menstruação, diminui a disponibilidade de ferro que participa como catalisador na reação de Fenton. As mulheres na menopausa apresentam níveis maiores de ferro, pois as cifras de ferritina triplicam (FERREIRA, 1994), quando comparadas as que apresentam atividade menstrual, por tanto, têm mais ferro disponível para a reação de Fenton e Haber-Weiss, e maior estresse oxidativo, por aumentar a produção do radical hidroxil (OH). Jerome L. Sullivan (1994), publicou o paradigma do ferro nas enfermidades coronarianas, no qual desenvolveu a hipótese de que o ferro acima dos valores de 4 a 5g total, predispõe às enfermidades coronárias e aumenta o estresse oxidativo cardíaco (BAUERMANN, 2000).

1.4.1 Papel dos Estrogênios no metabolismo do Óxido Nítrico (NO)

Alguns estudos clínicos e experimentais demonstram uma ação protetora direta do estrogênio sobre a parede vascular e se tem identificado receptores estrogênicos nas células do músculo liso vascular e endotélio, sugerindo que este hormônio possui uma ação ativa em ambos tecidos. Os estrogênios podem interferir na função endotelial, modulando a geração do fator de relaxamento do endotélio (EDRF), o óxido nítrico (NO).

A identificação do NO como fator de relaxamento do endotélio deve-se às pesquisas de Furchgott e Zawadski (1980). O NO produzido no endotélio é um segundo mensageiro. Ele atua na musculatura lisa se houver o estímulo, por exemplo da acetilcolina, que irá liberar o NO e este deve atravessar o estroma do tecido e atingir o músculo (ÉVORA, et al. 1995).

O NO é gerado quando a L-arginina é convertida em L-citrulina, reação esta catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) (MICHEL & FERON, 1997). A NOS consiste em três isoformas: neuronal (nNOS) é conhecida pela sua ampla distribuição e com importante expressão nas células do músculo esquelético; a iNOS (induzível) foi isolada em células de macrófagos e é expressa em diversas células como miócitos cardíacos, células gliais e células do músculo liso vascular; e a eNOS (endotelial) foi a última forma a ser isolada e tem sido encontrada em miócitos cardíacos, plaqueta, cérebro. Em humanos, os genes que identificam as isoformas nNOS, iNOS e eNOS são NOS1, NOS2 e NOS3, respectivamente (MICHAEL & FERON, 1997; MILLER, 1999; HARRISON, 1997). O papel fisiológico no tônus vascular e regulação da função plaquetária são atribuídos a eNOS. Logo, sua inativação implica em risco de vasoespasmo e trombose. Na figura 1.6, podemos observar um esquema da síntese do NO e um resumo de suas ações no músculo liso e plaquetas.

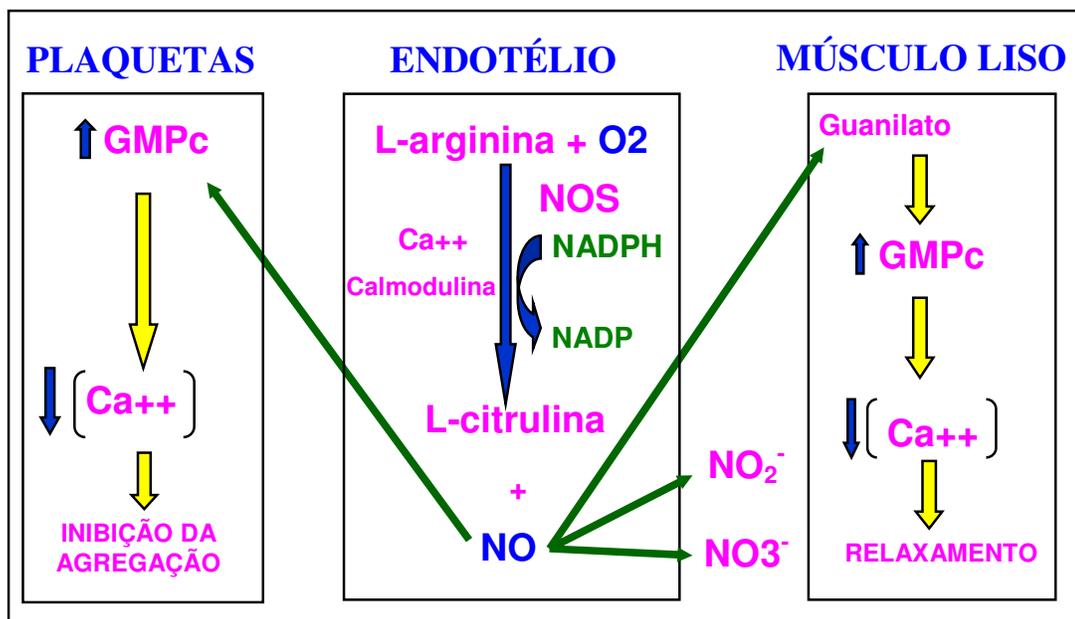


Figura 1.6. O esquema demonstra a formação do NO a partir da L-citrulina e oxigênio, e resume suas ações no vaso e nas plaquetas (Adaptado de KAROUI, et al. 1996 e GOSS, et al. 1997).

O NO age controlando o tônus muscular por ser o fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF) inibe a agregação plaquetária (adesão de leucócitos ao endotélio) e a produção de endotelina (peptídeo com potente ação vasoconstritora) (NOHL,1993).

Existem crescentes evidências que o radical superóxido ao reagir com o NO retira um fator de relaxamento do endotélio e remove um antioxidante que é o NO, formando um potente pró-oxidante, o peroxinitrito (OONO⁻) (Figura 1.7) (KAROUI, et al. 1994; GOSS, et al. 1997;).

O NO é liberado por fatores como o fluxo sanguíneo aumentado, o que gera um estresse de cisalhamento (shear stress) e aumento da pressão do sangue sobre o vaso.

Os trabalhos de Kim (1996), Thompson (2000), Gorodeski (1998), (Miller 1999) e outros mostram que o estrogênio estimula a dilatação coronariana via “up-regulation’ da transcrição da eNOS, assim melhorando a função endotelial”.

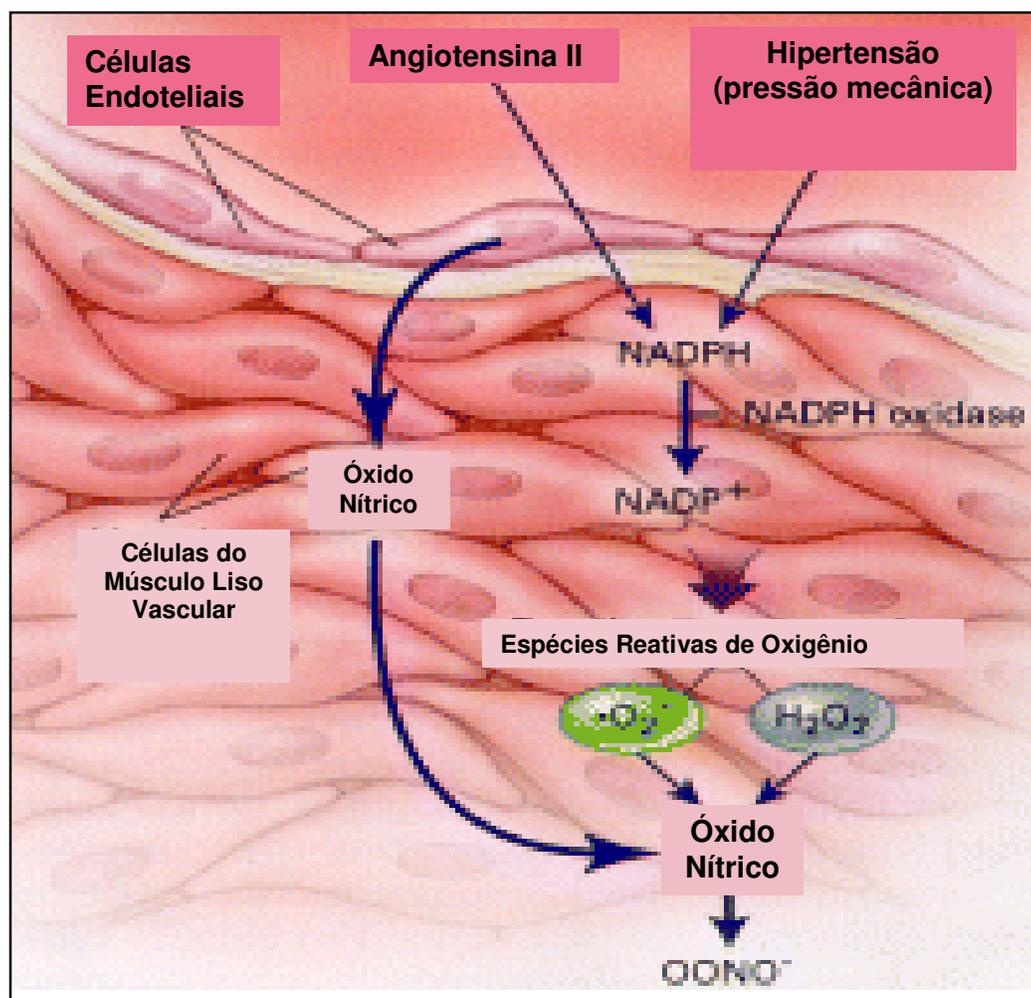


Figura 1.7: Produção de radical superóxido (O₂^{•-}) pela NAD(P)H oxidase e sua interação com o óxido nítrico formando peroxinitrito (OONO⁻) (Adaptado de Sowers, 2002).

Existem crescentes evidências de que os radicais livres como o ânion superóxido e o radical hidroxila participam criticamente da patogênese das doenças coronarianas. Assim, a produção aumentada dos radicais livres pode estar associada a várias patologias incluindo a hipertensão e aterosclerose (DANTAS,

2000; BELLÓ-KLEIN, et al. 2001). Quando o equilíbrio entre a produção de radicais livres (RL) e defesas antioxidantes é perturbado a favor de mais RL causa o estresse oxidativo que promove dano celular. O trabalho de Belló-Klein et al. (2001) sugere que a cardiomiopatia diabética está associada a uma diminuição de antioxidantes e que a terapia antioxidante pode melhorar a função cardíaca no diabete.

1.5 PAPEL DO ESTROGÊNIO NO ESTRESSE OXIDATIVO

Além das ações do estrogênio já citadas acima tem-se sugerido que ele apresenta um efeito protetor pelo seu papel como antioxidante.

A participação do estrogênio como cardioprotetor, agindo como um antioxidante atribui se à estrutura fenólica que pode agir como neutralizador dos radicais livres (Figura 1.5) (Niki, 1990). O grupamento hidrofenólico doa o hidrogênio para uma molécula instável, tornando-se um radical menos lesivo; o anel da molécula do estrogênio se reorganiza e se estabiliza, retirando do meio um radical livre.

O estrogênio tem ação antioxidante importante agindo como “scavenger” de radicais livres, ativando enzimas antioxidantes, aumentando a expressão da enzima superóxido dismutase (SOD), aumentando a síntese de mediadores vasoativos derivados do endotélio e diminuindo a expressão de enzimas pró-oxidantes (NADPH oxidase) (Niki, 1992; Kim et al., 1996;)

No trabalho de Hernández e colaboradores (2000), foi avaliado se a ausência do estrogênio estava associada com aumento do estresse oxidativo e diminuição do NO. Ele encontrou que reposição estrogênica em ratas

ovariectomizadas previne a perda dos níveis de nitritos/nitratos. O nível antioxidante diminuído, reduzidos grupos tióis, e um aumento de lipoperóxidos em ratas ovariectomizadas foram revertidos com o tratamento estrogênico. Outros trabalhos indicam que o estrogênio reduz hipercolesterolemia em suínos e a lipoperoxidação em humanos (TANG, 1996 apud HERNÁNDEZ, 2000).

O trabalho de Massafra e colaboradores (2000) avaliou as enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx), durante o ciclo menstrual de humanos. O sangue foi coletado em diferentes períodos do ciclo menstrual e as enzimas foram avaliadas em eritrócitos. Foi observado que no período de pico do estradiol há alta atividade da enzima GPx, o que não ocorria no período em que havia baixa concentração do hormônio, isso não foi observado com as outras enzimas avaliadas. Assim, os achados indicam que a produção fisiológica de estradiol pelos ovários durante o ciclo hormonal pode ter um papel importante na regulação eritrocitária da atividade da enzima glutathione peroxidase.

No trabalho de Thibodeau et al. (2002) são debatidas as propriedades pró- e antioxidantes dos estrogênios, sendo que estas discrepâncias são causadas pela grande heterogeneidade da família dos estrogênios e suas concentrações. Foram avaliados diversos metabólitos do estrogênio, sendo encontrado que o 2-metoxiestrogênio é um potente doador de elétrons e, com isso, inibe a peroxidação lipídica. Embora o 2-metoxiestrogênio não possa gerar superóxido in vitro, ele também pode ser considerado um pró-oxidante in vivo.

1.6 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO) EM SISTEMAS BIOLÓGICOS E DEFESAS ENZIMÁTICAS

As ERO são aquelas derivadas de reduções monoelétrônicas do oxigênio (Figura 1.8): radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxil ($\bullet OH$) e o oxigênio singlet, um estado excitado do oxigênio molecular que pode apresentar-se de duas formas: o estado sigma (mais reativo), e o estado delta (não é radical) (Figura 1.9).

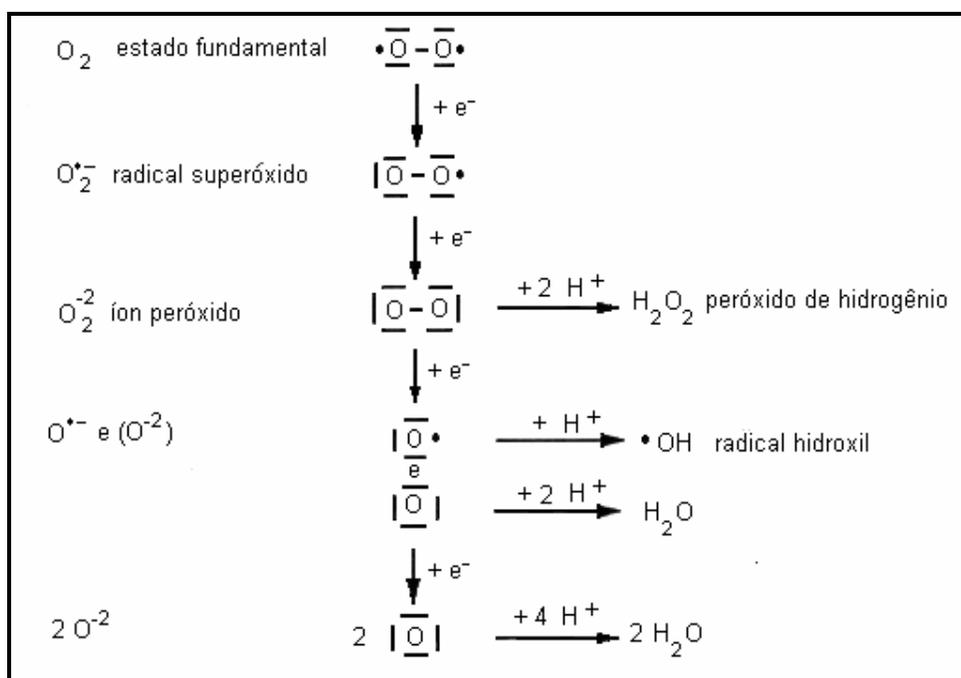


Figura 1.8: Redução monoelétrica do oxigênio formando ERO (BAST et al., 1991).

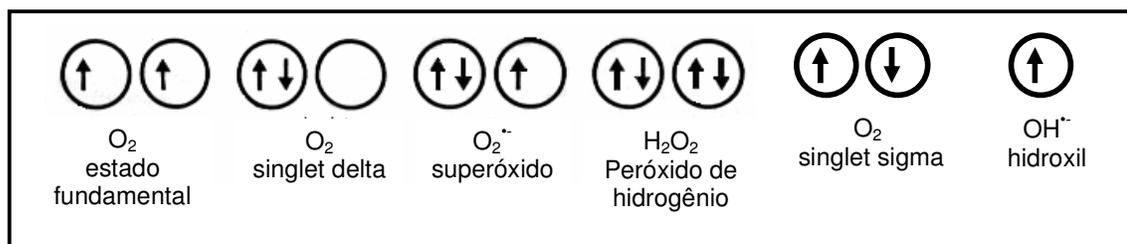
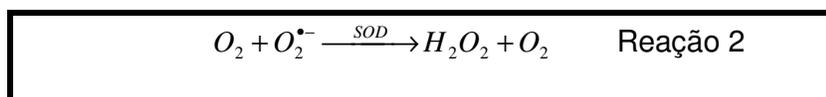


Figura 1.9: Estrutura eletrônica de espécies reativas de oxigênio (ERO). Só mostrados os dois orbitais π^* externos. Os demais orbitais internos ($\sigma 1s$, $\sigma^* 1s$, $\sigma 2s$, $\sigma^* 2s$, $\sigma 2p$ e $\pi 2p$) encontram-se todos plenamente ocupados. As flechas representam o sentido dos spins. (Adaptado Morgan-Martins, 1997; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1984; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1995).

O radical superóxido e o radical hidroxil apresentam elétrons desemparelhados o peróxido de hidrogênio não é radical (Figura 1.9).

O radical superóxido é instável com vida média de milissegundos em pH neutro. É instável (Figura 1.8) em meio aquoso, e em forma espontânea se dismuta para produzir peróxidos e oxigênio molecular (Reação 1 e Reação 2).



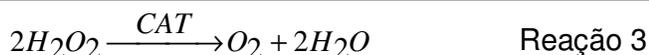
A baixa reatividade do superóxido indica não ser ele um mediador final da toxicidade das células, apesar de que algumas pesquisas indicam que o superóxido pode exercer sua citotoxicidade inativando enzimas específicas essenciais para a célula. Apesar destas reações poderem alterar o equilíbrio metabólico dos tecidos, a maior parte da literatura sugere que o superóxido não é tóxico *per se*, mas age como precursor para gerar RL provenientes do metabolismo de oxigênio com propriedades citotóxicas mais acentuadas (OLSZEWER, 1992).

Uma variedade de sistemas enzimáticos catalisa a redução univalente do oxigênio molecular a radical superóxido, como a xantina oxidase, aldeídos oxidase, di-hidro-orótico desidrogenase, flavinas desidrogenases e peroxidases (SOUTHORN & POWIS, 1988). As enzimas que catalisam a formação de prostaglandinas (ciclo-oxigenases) e leucotrienos (lipoxigenase) são também fontes de superóxido (MACHLIN & BENDICH, 1987). Essa redução univalente ocorre tanto em sistemas não-enzimáticos como durante reações de autooxidação incluindo aquelas que

envolvem catecolaminas, flavinas e ferridoxinas reduzidas. Uma importante fonte de radical superóxido é o sistema mitocondrial de transporte de elétrons (SOUTHORN & POWIS, 1988).

A reação de dismutação do superóxido é a maior fonte de peróxido de hidrogênio no organismo (SOUTHORN & POWIS, 1988). O peróxido de hidrogênio pode ser formado como resultado de dois tipos de reação: pela redução divalente do oxigênio molecular ou a partir da dismutação do ânion radical superóxido. O primeiro caso ocorre em organelas especializadas chamadas peroxissomas através de oxidases como a D-aminoácido oxidase e glicolato-oxidase. O segundo, durante a oxidação aeróbia dos substratos por certas enzimas, tais como xantina oxidase (FRIDOVICH apud DEL MAESTRO, 1980) ou autooxidação de vários compostos com a subsequente dismutação do superóxido para peróxido de hidrogênio, descrito na Reação 2 (DEL MAESTRO, 1980; SOUTHORN & POWIS, 1988).

Nos peroxissomas, há a presença da catalase (CAT), uma hemoproteína que reduz cataliticamente o peróxido de hidrogênio à água (Reação 3).



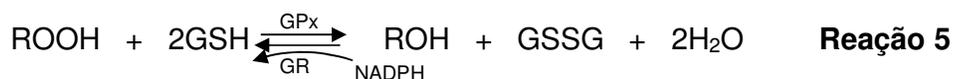
A catalase (CAT) está presente principalmente nos peroxissomas. Por não possuírem peroxissomas, alguns órgãos estão mais expostos aos danos provocados pela produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), como o coração, os pulmões e o cérebro. Nesses órgãos, um mecanismo de defesa pode ser a difusão do peróxido de hidrogênio para o sangue, onde reage com a CAT eritrocitária (BOVERIS & CHANCE 1973).

Entretanto, há outros mecanismos para tratar com o fluxo intracelular de H_2O_2 em todos os tecidos. Sugere-se que o maior sistema intracelular de decomposição de H_2O_2 é a glutathiona peroxidase (GPx). A família das glutathionas peroxidases (GPx) removem o H_2O_2 acoplado sua redução à água com a oxidação da glutathiona reduzida (GSH) reação 4. A GPx se utiliza de uma variedade de doadores de elétrons e também de glutathiona reduzida (GSH), esta por sua vez pode ser oxidada (GSSG) pelo peróxido de hidrogênio, removendo-o e formando água (reação 4). A glutathiona peroxidase também catalisa a redução de lipoperóxidos, prevenindo, desta forma, a lipoperoxidação (LPO) (DEL MAESTRO, 1980; SOUTHORN & POWIS, 1988).



A glutathiona peroxidase (GPx), descoberta em 1957 por Mills, é uma das enzimas que fazem parte das defesas antioxidantes primárias (MILLS, 1957; MILLS, 1960). Ela tem uma ação não-específica sobre o H_2O_2 , atuando sobre vários substratos como os hidroperóxidos orgânicos. Há dois tipos de GPx: uma utiliza selênio como cofator, o qual é encontrada tanto na mitocôndria como no citosol; a outra, uma selênio independente, que se encontra apenas no citosol e metaboliza exclusivamente hidroperóxidos orgânicos. A GPx catalisa a reação de hidroperóxidos com a glutathiona reduzida (GSH) para formar glutathiona oxidada (GSSG) e o produto de redução do hidroperóxido. Reação 5.

A GPx tem alta afinidade no fígado e nos eritrócitos, moderada atividade no coração e nos pulmões e baixa atividade no músculo (Mills, 1960). Fisiologicamente, a GPx atua acoplada à enzima glutathiona redutase (GR) que, por sua vez, catalisa a redução de GSSG, usando NADPH como cofator. Reação 5.

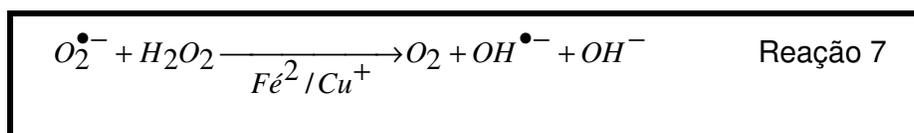
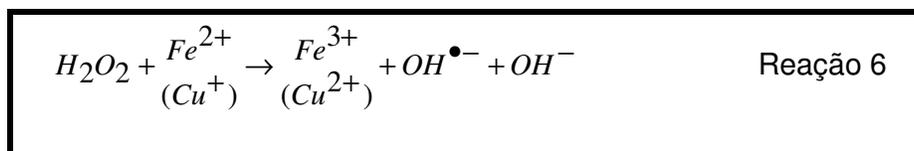


O peróxido de hidrogênio é uma molécula estável e não é essencialmente tóxico para as células, mas possui a característica de poder atravessar as membranas celulares, portanto é bastante difusível (semelhante a água); isso torna-se potencialmente importante, na medida em que o espaço extracelular possui pouca defesa antioxidante (SOUTHORN & POWIS, 1988).

A enzima GPx é uma peroxidase que utiliza doadores de e^- para reduzir o peróxido de hidrogênio à água. A mais importante peroxidase é a glutathione peroxidase que utiliza selênio (Se) no sítio catalítico, e utiliza o tripeptídeo tiólico glutathione (GSH - γ -glutamil-cisteil-glicina) como doador de e^- para a redução do peróxido de hidrogênio e outros peróxidos orgânicos, tais como os lipoperóxidos provenientes da LPO, impedindo assim a fase de propagação desse processo.

A adição de um elétron ao peróxido de hidrogênio (Figura 1.8) forma o radical hidroxil (OH^\bullet). O OH^\bullet é o mais reativo, o mais lesivo e, portanto é a ERO mais instável, que reage com uma grande variedade de compostos orgânicos (DORFMAN & ADAMS apud DEL MAESTRO, 1980); como resultado apresenta uma meia-vida extremamente curta (medida em frações de segundos 10^{-9} s); não se distancia do seu sítio de formação mais que 30Å; é altamente fugaz, apresenta-se em baixas concentrações nos tecidos e ao se formar reage rapidamente e os radicais encontrados nos tecidos são derivados do hidroxil (SOUTHORN, 1988).

O radical hidroxil pode ser formado através de duas reações: FENTON e HABER-WEISS. Sempre que o peróxido de hidrogênio entrar em contato com íons ferro ou cobre ocorre a reação de Fenton (Reação 6), que vai formar o radical hidroxil. Ele pode também ser formado pela interação entre o peróxido de hidrogênio e superóxido na presença de íons metais de transição na reação de Haber-Weiss (Reação 7). Outra fonte de radical hidroxil são as radiações ionizantes (SOUTHORN & POWIS, 1988).



As reações de Fenton e de Haber-Weiss ocorrem in vivo se houver Fe^{2+} livre no plasma. O ferro encontra-se ligado no plasma a proteínas (transferrina); nos tecidos é acumulado sob a forma de ferritina ou hemossiderina (nos lisossomos no tecido hepático). A transferrina libera o ferro que vai para a hemoglobina. O ferro também se encontra preso à porfirina ou protoporfirina, que estão ligadas à hemoglobina-mioglobina (FERREIRA, 1994). A CAT é uma hemoproteína que contém ferro na sua estrutura. Portanto, não há ferro livre para fazer as reações de Fenton e de Haber-Weiss, assim se faz necessário agentes redutores que ajam nessas proteínas liberando o Fe^{2+} . O ascorbato age como um pró-oxidante liberando o ferro que pode então se combinar com peróxido de hidrogênio ou superóxido para formar o radical hidroxil.

Observa-se na figura 1.10 as principais fontes celulares de ERO e sua metabolização.

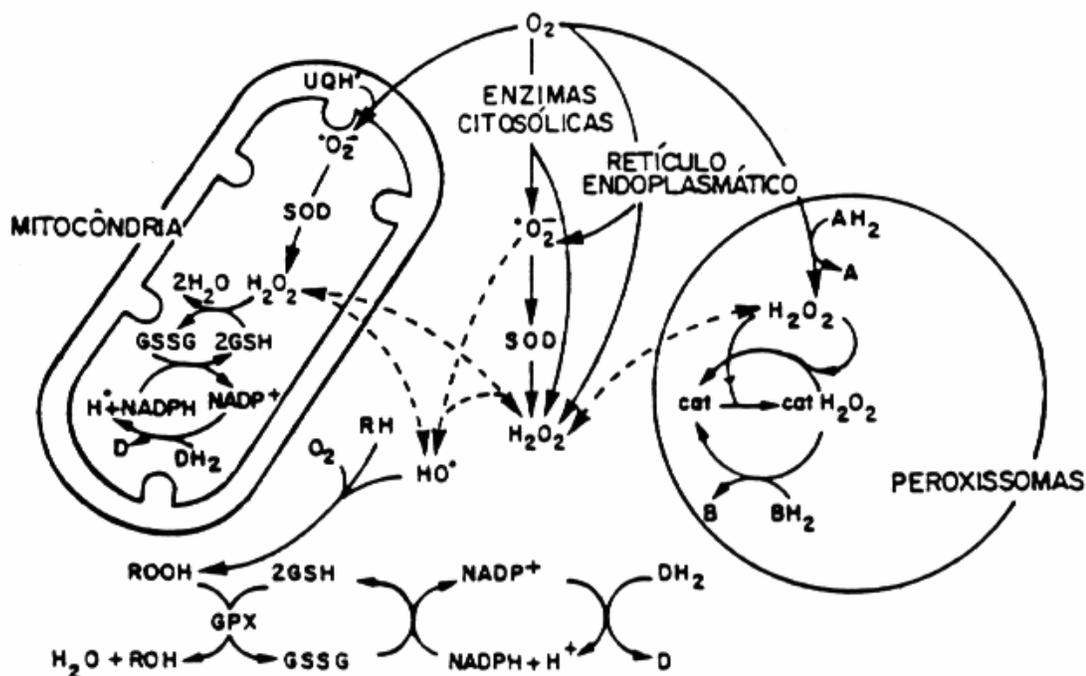


Figura 1.10: Esquema geral das principais fontes celulares de produção e metabolização das ERO. UQH* + ubisemiquinona; GSSG = glutatona oxidada; GSH = glutatona reduzida; DH₂ e D = sistemas redutores de NADP não-específicos; SOD = superóxido dismutase; GPx = glutatona peroxidase; CAT = catalase; B e BH₂ = doadores de hidrogênio (Adaptado de BOVERIS & CHANCE, 1973).

1.7 EFEITOS BIOLÓGICOS DOS RADICAIS LIVRES

Quando um RL reage com um composto não-radical, outro RL pode ser formado, induzindo, assim, reações em cadeia como é o caso da lipoperoxidação (LPO). Dessa forma, podem ser produzidos efeitos biológicos distantes do sítio de geração do primeiro RL formado. As reações em cadeia têm uma série de etapas durante as quais, se consome uma espécie intermediária, os reativos convertem-se em produtos e os intermediários são regenerados, permitindo que o ciclo recomece. As etapas do processo de LPO são: iniciação, propagação e terminação (Figura

1.11) (MEERSON, et al. 1982; MACHLIN & BENDICH, 1987; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989; CASTRO, et al. 1990).

A LPO além de ser um fator no processo de renovação das membranas é essencial para a biossíntese de prostaglandinas e leucotrienos, assim como na fagocitose, pinocitose e lise das membranas intracelulares podem ser classificados em, pelo menos, quatro grupos: a) mudanças no microambiente lipídico de enzimas ligadas à membrana e nos canais iônicos e receptores, ativando ou inibindo a atividade dessas proteínas; b) formação de novos canais de permeabilidade; c) formação de ligações cruzadas entre proteínas e fosfolipídios, inativando-os irreversivelmente; d) oxidação dos grupos –SH nos sítios ativos de enzimas ligadas à membrana, ocasionando perda de suas funções. Dependendo do grau de severidade, a LPO pode causar desde alterações na permeabilidade até perda da função secretória e morte celular (MEERSON, et al. 1982). Além disso, se a LPO atingir a membrana lisossomal pode haver a liberação de enzimas lisossômicas e fosfolipases, acelerando a degradação das membranas. Em adição, as alterações na permeabilidade podem levar a um acúmulo de cálcio intracelular, o que ativaria as fosfolipases cálcio-depedentes, ocasionando a formação de um ciclo vicioso (RICHTER & Frei, 1998 apud BAUERMANN, 2000)

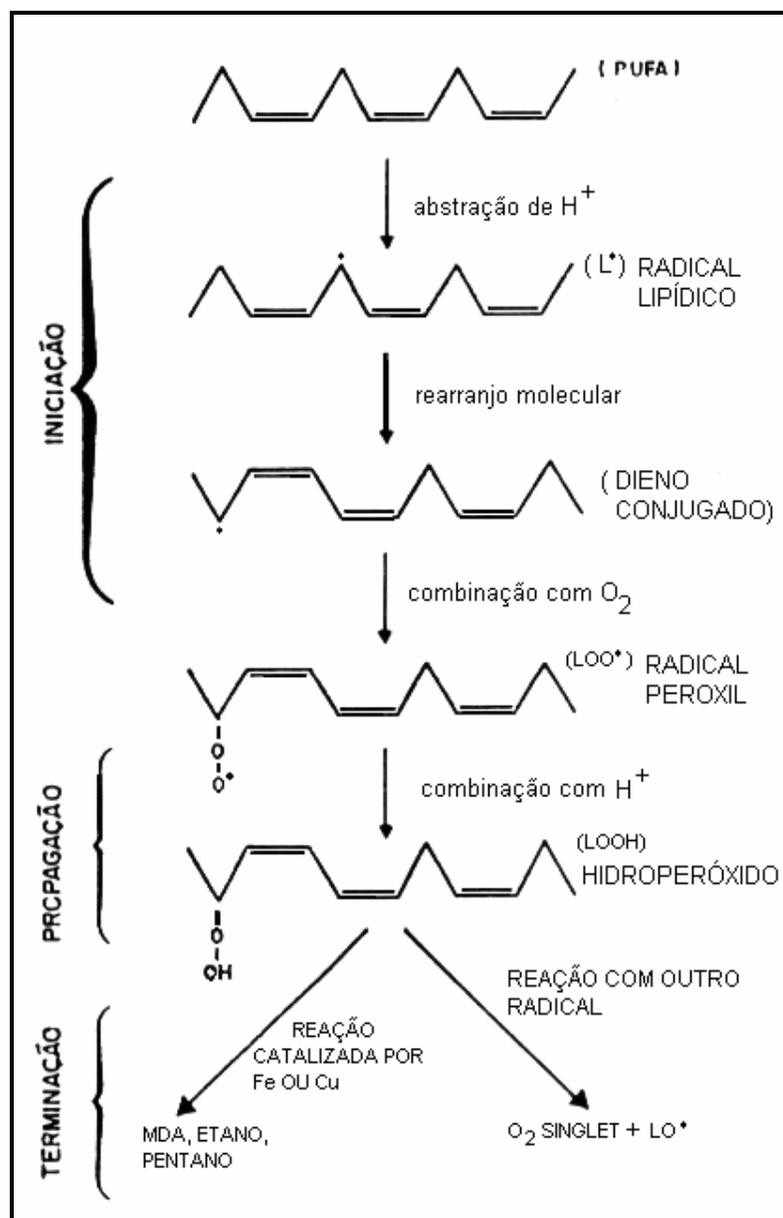


Figura 1.11: Reações em cadeia da lipoperoxidação (Adaptado de Morgan-Martins, 1997; DEL MAESTRO, 1980).

A LPO leva à perda da fluidez da membrana promovendo desarranjo dos receptores e potenciação da lise celular. O dano dos RL a enzimas que contêm enxofre e outras proteínas culmina em sua inativação, ligações cruzadas e desnaturação (MACHLIN & BENDICH, 1987).

No processo de isquemia/reperfusão, já está bem descrito a participação direta das ERO. Quando há a interrupção temporária da circulação (isquemia) em um tecido, seguida do seu restabelecimento (reperfusão), há a formação de ERO como o radical superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxil (Figura 1.8) (MC CORD, 1985). Existem várias teorias propostas para explicar o fenômeno, no entanto, todas elas apontam para a geração de peróxido de hidrogênio. Nos trabalhos realizados por BIANCHINI & BELLÓ, 1988; BELLÓ & BELLÓ, 1988, utilizaram-se injeções de peróxido de hidrogênio no coração isolado e perfundido (à pressão constante) de rato como modelo de estresse oxidativo. No coração de rato, doses de peróxido de hidrogênio (8-64mM) induziram um efeito inotrópico positivo com potenciação pós-extrassistólica (efeito similar ao “stunned heart”) (BIANCHINI & BELLÓ, 1988). Doses mais altas (128-2048mM) induziram contraturas cardíacas (“stone heart”) (BELLÓ & BELLÓ, 1988).

1.8 DEFESAS ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICAS

Os organismos aeróbios desenvolveram diferentes tipos de defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas prevenindo a formação de ERO, bem como mecanismos para reparar os danos causados pelos mesmos (BAST, et al, 1991). As defesas enzimáticas já foram exploradas no item 1.6, relata-se agora as não enzimáticas.

A desativação final de um composto radical consiste na formação de um outro produto não-radical. *Scavengers* de RL são substâncias que se combinam com um RL que leva a formação de um não-radical ou um radical menos lesivo, exemplos: tocoferóis e carotenóides. Substâncias que funcionam como *quencher*s de oxigênio singlet são aquelas que absorvem a energia de excitação e a liberam

em forma de calor ou movimento. Caso os outros mecanismos antioxidantes (interceptação e prevenção) falhem, há o mecanismo de reparo das biomoléculas modificadas: o mecanismo de reparo do DNA e a proteólise de proteínas oxidadas. O mecanismo de reparo do DNA dá-se pela excisão das bases (NIKI, 1993).

As defesas antioxidantes não-enzimáticas podem ser classificadas em lipossolúveis e hidrossolúveis. Os antioxidantes lipofílicos tem como exemplo os tocoferóis, carotenóides e bioflavonóides; os antioxidantes hidrofílicos tem como exemplo o ascorbato, glutathiona, indóis e catecóis.

A distribuição das defesas antioxidantes nas células está intimamente relacionada com as fontes de ERO. Estão em maior quantidade em locais particularmente expostos as ERO.

A glutathiona é um antioxidante importante que participa do processo de detoxificação de peróxidos orgânicos e não-orgânicos. No processo catalisado pela GPx, ocorre a oxidação da glutathiona reduzida (GSH), formando-se uma ponte dissulfeto entre duas moléculas de GSH (GSSG) e o respectivo álcool ou água, no caso peróxido de hidrogênio (Figura 1.12, reação 4 e 5). A glutathiona redutase (GR) utiliza elétrons do NADPH para a redução de pontes dissulfeto da GSSG e reestabelece os níveis intracelulares de GSH (DENEKE & FANBURG, 1989).

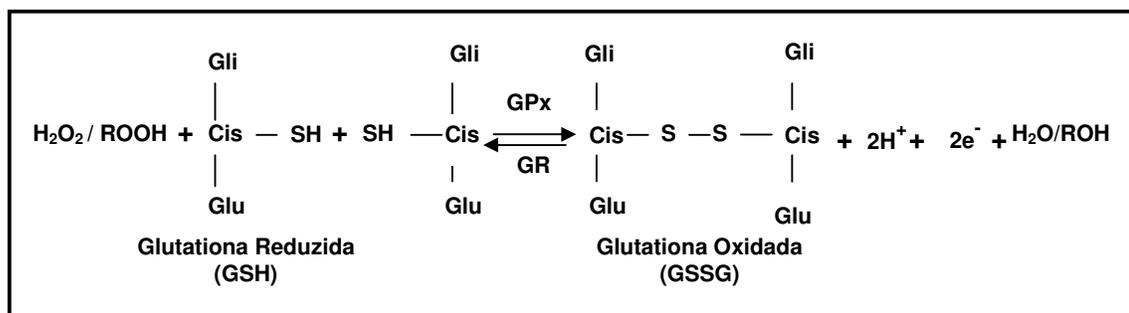


Figura 1.12: A figura representa o processo de oxidação da glutaciona (Adaptado de Morgan-Martins, 1997).

O α -tocoferol, também chamado vitamina E, é um antioxidante lipossolúvel eliminador de reação em cadeia muito importante: ligado às membranas das células, reage com o radical superóxido, o radical hidroxil, radical peroxil convertendo-os em formas menos reativas agindo como *scavenger* (SIES & MURPHY, 1991); e reage com oxigênio singlet, absorvendo a energia de excitação, agindo, assim, como *quencher* (KAISER et al., 1990). O antioxidante β -caroteno é o neutralizador mais potente do oxigênio singlet, conhecido como quencher do oxigênio singlet, impedindo a formação de lipídios hidroperóxidos, possui propriedades antioxidantes particulares a uma baixa pressão de oxigênio (KRINSKY, 1989). A vitamina A também pode atuar como cárdio-protetor (BELLÓ-KLEIN, et al. 1994). A vitamina C é um antioxidante hidrossolúvel eliminador de reação em cadeia, reage diretamente com o superóxido e com oxigênio singlet; regenera o tocoferol, quando interage com o radical tocoferil e convertendo-se em radical ascorbil, muito estável (BISBY, 1990; SIES & MURPHY, 1991).

Pesquisas mostram que o estrogênio especialmente alguns metabólitos, exibem importante efeito como *scavengers* e suprimem a peroxidação tanto in vivo quanto in vitro (Niki, 1990). No trabalho de Römer (1997) foi encontrado que

modificações estruturais no 17β -estradiol como deidroestrogênios têm propriedades potentes como *scavengers* de radicais, inibidor da LPO e inibidor do ânion radical superóxido. (Figura 1.13).

A figura 1.13 assinala a participação do estrogênio em diversos mecanismos intracelulares, apontando sua ação como antioxidante, diminuindo a formação das espécies reativas de oxigênio (ERO) agindo como *scavenger*, promovendo aumento da atividade das enzimas antioxidantes (superóxido dismutase), inibindo a oxidação de LDL, aumentando a atividade do fator de relaxamento do endotélio e diminuindo a agregação plaquetária (DANTAS & CARVALHO, 2000).

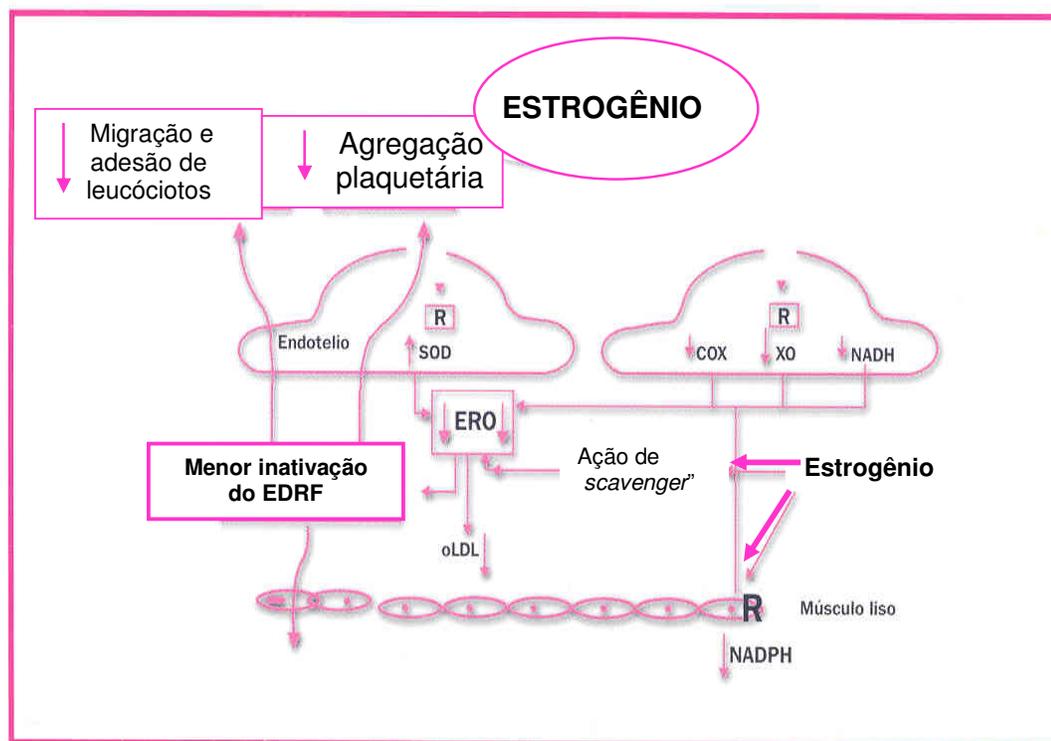


Figura 1.13: Mecanismos envolvidos na dismutação das espécies reativas de oxigênio (ERO), induzida pelos estrogênios. A interação do estrogênio com o receptor (R) produz um aumento da expressão gênica da enzima superóxido dismutase (SOD) e diminuição da expressão gênica das enzimas oxidantes como a ciclooxigenase (COX), xantina oxidase (XO) e NADH/NADPH oxidases. Os estrogênios podem atuar como *scavengers* de radicais livres. (Adaptado de DANTAS & CARVALHO, 2000).

1.9 HIPÓTESE

A retirada do estrogênio pela castração diminui as reservas antioxidantes, aumenta o estresse oxidativo e perturba a função cardiovascular, sendo que a reposição estrogênica recupera a mesma.

1.10 OBJETIVO

1.10.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo verificar a ação do hormônio feminino, 17β -estradiol, no estresse oxidativo e na mecânica cardíaca de ratas submetidas à castração e à reposição hormonal.

1.10.2 Objetivos específicos

- 1) Quantificar o estresse oxidativo no coração dos animais nos diferentes grupos experimentais nas três vias de administração, avaliando a lipoperoxidação (TBARS e QL) e atividade das enzimas antioxidantes (CAT, SOD, GPx, GST);
- 2) mensurar o estresse oxidativo sistêmico na via transdermal, avaliando a lipoperoxidação (QL) e atividade das enzimas antioxidantes (CAT, SOD, GPx, GST);
- 3) avaliar o antioxidante não-enzimático glutathiona reduzida (GSH) no tecido cardíaco nos diferentes grupos experimentais;
- 4) avaliar o metabolismo do óxido nítrico através da quantificação da concentração de nitritos e nitratos no plasma e no tecido cardíaco dos diferentes grupos experimentais;

- 5) avaliar a produção do radical superóxido através da medida da atividade da NADH/NADPH oxidase pelo método da lucigenina em aortas dos diferentes grupos experimentais;
- 6) estudar o efeito do estrogênio sobre as variáveis hemodinâmicas (Pressão Arterial Média, Pressão Arterial Sistólica, Pressão Arterial Diastólica e Frequência Cardíaca) nos diferentes grupos experimentais;
- 7) avaliar o efeito da retirada e reposição estrogênica na curva de função cardíaca na isquemia e reperfusão miocárdica em coração isolado das ratas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Foram utilizadas, neste trabalho, ratas fêmeas Wistar, pesando entre 180–250 gramas, em torno de 4 meses de idade, e não haviam tido gestação. Os animais foram provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da UFRGS. Eles foram mantidos em caixas plásticas de 27 x 26 x 31 cm, com o assoalho recoberto com serragem, tendo cinco animais por caixa. Receberam alimentação e água ad libitum (ração Guabi – Indústria de Alimentos Alisul Ltda). Foi mantida sob períodos de 12 horas luz, 12 horas escuro, cuja temperatura ficou em torno de 25°C.

Todos os procedimentos experimentais adotados nos animais obedeceram às normas estabelecidas pela Comissão de Pesquisa e ética em Saúde do Grupo de Pesquisa e da Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS (GOLDIN, 1997).

2.2 REAGENTES

Todos os reagentes utilizados nos protocolos foram de grau analítico.

2.3 SOLUÇÕES

2.3.1 Solução de Krebs-Hepes para Lucigenina:

Preparo da solução de Krebs-Hepes: NaHCO_3 10%, NaCl 30% Glicose 50%, CaCl_2 10%, KCl 19,1%, MgSO_4 10% , KH_2PO_4 20% e Hepes 1M, misturar quantidade suficiente para 500 mL, completando com água MILLI-Q, ajustar o pH para 7,4 - 7,42 com carbogênio.

2.3.2 Líquidos de Perfusão

Solução de Krebs-Henseleit (Tyrode): o líquido de perfusão empregado foi uma solução de Krebs-Henseleit, que apresentava a seguinte composição: NaCl 120mM; KCl 5,4 mM; MgCl_2 1,8mM; CaCl_2 1,25 mM; NaHCO_3 27 mM; NaH_2PO_4 2mM; Na_2SO_4 1,8 mM e Glicose 11,1 mM.

Foram preparadas três soluções-estoques: uma à base de cloretos contendo NaCl , KCl e MgCl_2 , outra à base de sódios contendo Na_2SO_4 , NaHCO_3 e NaH_2PO_4 , e outra contendo CaCl_2 . As soluções-estoque eram preparadas com uma concentração 20 vezes maior que aquela usada nas perfusões.

Para preparar um litro de solução de Krebs-Henseleit misturou-se 50 mL da solução de cloretos, 50 mL da solução de sódios, 12,5 mL da solução de cálcio e 2 gramas de glicose, completando o volume com água destilada.

As soluções estoques eram mantidas numa temperatura entre 0-4 °C. A solução de Krebs-Henseleit era filtrada através de uma membrana GS e éster de celulose com 0,22 μm de poro e 47 mm de diâmetro (MILLIPORE, SP), minutos antes de ser utilizada para a perfusão dos corações. Esse procedimento foi

executado a fim de remover qualquer partícula não dissolvida capaz de provocar microembolismo no órgão.

2.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram estabelecidos três grupos experimentais, sendo eles:

Grupo controle (**CONTROLE**): animais que sofreram apenas a simulação da cirurgia de indução de ovariectomia, e receberam placebo; o número de animais utilizados variou no protocolo.

Grupo castrado (**CASTRADO**): animais cujos ovários foram retirados e receberam placebo; o número de animais utilizados variou no protocolo.

Grupo castrado+hormônio (**CAST+HORM**): animais ovariectomizados, e que receberam o hormônio 17β -estradiol; o número de animais utilizados variou no protocolo.

2.5 SEQÜÊNCIA EXPERIMENTAL

Tabela 2.1: Seqüência experimental das diferentes vias de administração e do grupo de perfusão cardíaca. Abreviações utilizadas na tabela: **Intramuscular (IM)= 1; Intraperitoneal (IP)= 2; Transdermal (VT)= 3; Perfusão Cardíaca = 4.**

Via	1º dia	7º dia	14º dia	15º dia	36º dia	37º dia
1	Cirurgia de Castração	Início do tratamento	Procedimento de Canulação	Registro da PA*, sacrifício dos animais, preparação do tecido.	_*_	_*_
2	Cirurgia de Castração	Início do tratamento	Procedimento de Canulação	Registro da PA*, sacrifício dos animais, preparação do tecido.	_*_	_*_
3	Cirurgia de Castração	Implantação do <i>pellet</i>	_*_	_*_	Procedimento de Canulação	Registro da PA*, retirada de sangue. Sacrifício dos animais, preparação do tecido
4	Cirurgia de Castração	Implantação do <i>pellet</i>	_*_	_*_	Procedimento de Canulação	Registro da PA*, retirada de sangue. Sacrifício dos animais, preparação do tecido

*PA = Pressão Arterial

Todos os grupos após uma semana da cirurgia de simulação da castração ou da retirada dos ovários, receberam o placebo ou o hormônio, tempo necessário para determinar a diminuição de estrogênio plasmático, induzindo à “menopausa”.

Foram realizadas três vias de administração da droga.

O hormônio utilizado nas vias intramuscular e intraperitoneal foram adquiridos da RBI (Research Biochemicals International), (17 β)-estra-1,3,5(10)-triene-3,17-diol. A dose utilizada foi de 40 μ g/Kg de peso, ou igual volume de placebo (veículo 0,2% em etanol). O *pellet* de 21 dias de liberação contínua foi adquirido da Innovative Research of America,.

Na via intramuscular, as ratas fêmeas, após sete dias da cirurgia de castração, receberam injeções de placebo ou de hormônio (17 β -estradiol) na musculatura do gastrocnêmio por um período de sete dias (40 μ g/kg) (GORODESKI et al., 1995; KIM et al., 1996). Foram avaliados os níveis de lipoperoxidação através das técnicas das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúico (TBARS) e Quimiluminescência (QL), avaliação das enzimas antioxidantes catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD) pelo método da oxidação adrenalina.

Na via intraperitoneal, as ratas fêmeas, após sete dias da cirurgia de castração, receberam injeções de placebo ou de hormônio (17 β -estradiol), no peritônio por um período de sete dias (40 μ g/kg) (GORODESKI, et al. 1995; KIM, et al. 1996). As avaliações realizadas: foi registrada a pressão arterial através do sistema de aquisição de dados CODAS, os níveis de lipoperoxidação através das técnicas de TBARS e QL; a avaliação das enzimas antioxidantes CAT, GPx e SOD.

Por fim, na via transdermal, foram implantados pellet de placebo ou de hormônio 17 β -estradiol, 0,25 mg/*pellet* (Innovative Research of América), subcutaneamente na nuca das ratas, por um período de vinte e um dias de liberação contínua (KIM, et al. 1996, SHARKEY, et al. 1999, THOMPSON, 2000).

Após o período de tratamento, nas vias intraperitoneal e transdermal, os animais foram anestesiados para a implantação da cânula na artéria carótida. Após 24 horas da implantação do cateter, foram realizadas as medidas de pressão arterial pelo sistema de aquisição de dados CODAS, com o animal acordado. O registro da pressão arterial foi efetuado, uma alíquota de sangue foi retirada pelo cateter para futuras análises e, após, os animais foram mortos. No grupo onde foi realizada a perfusão cardíaca, os animais também foram canulados, a fim de que todos os grupos passassem pelo mesmo estresse cirúrgico.

2.6 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

2.6.1 Cirurgia de Ovariectomia

A ovariectomia é um procedimento cirúrgico de retirada dos ovários, a fim de induzir a “menopausa”. As ratas, foram anestesiadas com quetamina (cloreto de cetamina-Parke-Davis, São Paulo) na dose de 90 mg/Kg de peso do animal e xilasina (LAB) 10mg/Kg de peso do animal intramuscular. Foi feita uma incisão lateral logo abaixo das costelas na derme e peritônio, e se introduziu um estilete até encontrar uma massa de gordura que delimitava o ovário. Assim que o ovário era identificado, efetuava-se a ligadura abaixo da trompa uterina, retirando-o. O procedimento é repetido no outro lado. Nos animais controle, foi realizado a mesma cirurgia, no entanto não houve a ligadura nem a retirada dos ovários. Após a cirurgia, era feita a sutura da incisão da pele em planos separados, primeiro a camada muscular e depois a cutânea (Figura 2.1) (BAKER, et al. 1979).

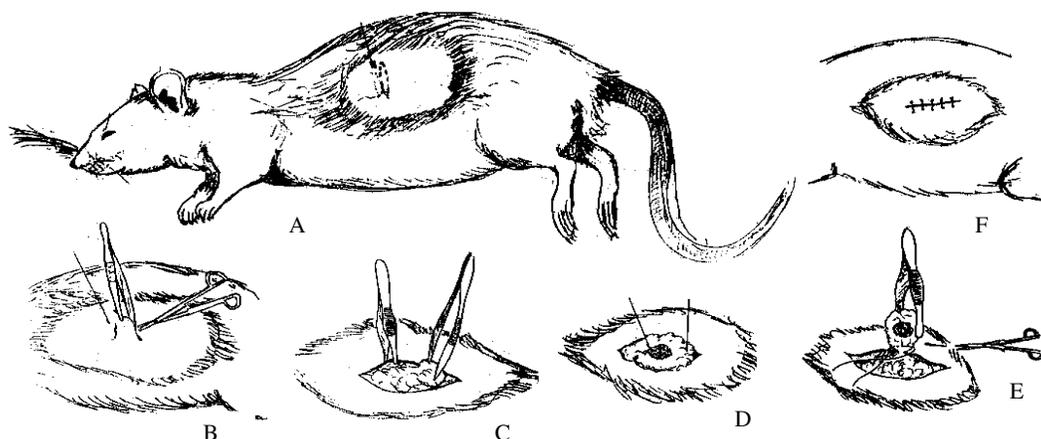


Figura 2.1: Procedimento da cirurgia de castração.

2.6.2 Cirurgia de Implantação dos *pellet*

Após sete dias da castração ou da simulação os animais receberam os *pellet*, sob anestesia etérea, visto que o procedimento era rápido. Foi realizada uma pequena incisão na nuca, em torno de 0,5 cm, na qual se introduziu o *pellet* de placebo ou hormônio nos respectivos grupos experimentais: CONTROLE e CASTRADO que receberam placebo, e CAST+HORM que recebeu o hormônio.

2.6.3 Canulação

O procedimento cirúrgico bem como o cuidado pós-operatório, foi baseado na descrição feita por Waynforth e Flecknell (1992).

Os animais foram anestesiados com quetamina (cloreto de quetamina-Parke-Davis, São Paulo) na dose de 90 mg/Kg de peso do animal e xilasina (Agribands do Brasil Ltda) 10mg/Kg de peso do animal intramuscular.

Foi implantada na artéria carótida um cateter silastic, e que, passado subcutaneamente, era exteriorizado e suturado na base do pescoço. Os cateteres foram confeccionados com tubos de Tygon PE-90, conectados a tubos de polietileno

PE-50 (Clay Adams, USA). A extremidade do tubo de silicone era conectada a uma agulha hipodérmica (romba 21), que era conectada a um cateter PE-50. A desobstrução das cânulas deu-se através da lavagem com heparina sódica (0,01 mL Liquemine - Roche, 5000U) em 0,1 ml de solução fisiológica de NaCl 0,9%, antes de cada registro de pressão. Após esses procedimentos os animais eram colocados em gaiolas individuais, aquecidos e receberam água e alimentos *ad libitum* (Baker, et al. 1979).



Figura 2.2: Procedimento cirúrgico de implantação de cateter na artéria carótida.

2.7 REGISTRO E PROCESSAMENTO DE SINAL – PRESSÃO ARTERIAL

Os registros foram obtidos a partir da conexão da cânula, introduzida na carótida, a um transdutor de pressão (P23Db, Gould-Statham, Oxford, CA, USA) acoplado a um pré-amplificador de sinais Hewlett Packard (HP 8805) que se encontrava ligado à placa analógico-digital CODAS (AT/MCA CODAS-DATAQ Instruments, Inc., Akron, Ohion, USA) por um seletor de canais, em um computador 486 (66 MHz e 8Mb RAM). A frequência de amostragem para realizar os registros de

PA e FC foi de 2000 Hz. O programa utilizado (CODAS) permite trabalhar diretamente com a onda de pressão, que é vista na tela do computador, e os dados podem ser gravados em disco rígido. Neste mesmo programa, podem-se executar cálculos a partir dos valores obtidos, assim é possível trabalhar com valores de pressão sistólica e pressão diastólica, pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) para cada batimento. A FC é obtida a partir do inverso do período, entre um pico e outro, multiplicado por 60 (segundos). Depois de gravados os sinais em disco rígido, gera-se uma planilha que poderá ser analisada em programa Excel for Windows. Sob anestesia, era introduzida uma cânula de polivinil (preenchida com heparina) na carótida de cada animal para o registro da pressão sangüínea arterial (PSA) a ser realizada na rata acordado no dia seguinte. Os animais permaneceram conscientes e com livre movimentação durante as medidas cardiovasculares. Os sinais de pressão arterial foram gravados durante um período de 20 minutos. (Figura 2.3)



Figura 2.3: Equipamento, sistema de aquisição de dados CODAS, para o registro da PA.

2.8 COLETA DE SANGUE

O sangue dos animais foi coletado após o registro da pressão arterial com o animal acordado. Na cânula arterial era introduzida uma seringa heparinizada com a qual se coletava o sangue. Após a coleta, o sangue foi centrifugado por 10 minutos a 3000 rpm em centrífuga refrigerada (Sorvall RC 5B – Rotor SM 24), o plasma foi retirado e congelado em freezer a -80°C para posteriores dosagens de estresse oxidativo e hormonal. Os eritrócitos foram lavados com soro fisiológico (NaCl 0,9%), novamente centrifugados e aliquotados. Uma parte foi ressuspensa em soro para medida de lipoperoxidação, ao restante foi adicionada uma solução de ácido acético 1mM e sulfato de magnésio 4mM, e as amostras foram congeladas em freezer a -80°C para posteriores dosagens das enzimas antioxidantes.

2.9 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS E PREPARO DOS HOMOGENEIZADOS

Os animais foram mortos após o registro de pressão arterial e a retirada de sangue (na via intramuscular e intraperitoneal no oitavo dia e na via transdermal no vigésimo segundo dia). No grupo de perfusão cardíaca, a morte ocorreu após a retirada de sangue pela cânula, o coração foi rapidamente conectado à cânula do langendorff. Nos demais grupos, após a morte dos animais, o coração foi rapidamente retirado e homogeneizado durante 30 segundos em Ultra-Turrax, na presença de KCl 1,15% (5 mL por g de tecido) e de fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF), na concentração de 100 mM em isopropanol (10µL por mL de KCl adicionado). O PMSF é um inibidor de proteases e foi utilizado para que não houvesse degradação das enzimas cuja atividade foi medida. Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm em centrífuga

refrigerada (Sorvall RC 5B – Rotor SM 24) e o sobrenadante foi retirado e congelado em freezer a -80°C para as dosagens posteriores (LLESUY, et al. 1985).

2.10 DOSAGEM HORMONAL

O método utilizado para dosar os estrogênios foi o de quimiluminescência por imunensaio competitivo. O aparelho utilizado para esta medida foi o IMMULITE 2000, com os seguintes reagentes: substrato quimiluminescente dioxietano (L2SUBM), reagente estradiol Wedge (L2E2A2), que é constituído pela combinação de estradiol com fosfatase alcalina e esferas recobertas com um anticorpo altamente específico para o estradiol (L2E212). O método baseia-se na competição, pelo anticorpo específico para estradiol, das moléculas de hormônio da amostra analisada com as moléculas do estradiol ligadas à fosfatase alcalina.

Inicialmente, a amostra sangüínea foi incubada com o reagente estradiol Wedge. Após o término dessa, fez-se a lavagem dos vials para remover o restante das moléculas não ligadas ao anticorpo. Imediatamente, adicionou-se o substrato quimiluminescente dioxietano que reage com a fosfatase alcalina presente no meio, emitindo energia quimiluminescente.

A concentração de locais de ligação, ou seja, a quantidade de anticorpos, é fixa e limitante. Por essa razão, o aumento progressivo do número de moléculas de estradiol da amostra vai deslocar do anticorpo das moléculas do reagente estradiol Wedge, levando a diminuição da quimiluminescência. Esse decaimento de energia deve-se a menor concentração de fosfatase alcalina no meio.

A quantidade absoluta de hormônio na amostra foi calculada através de uma curva padrão. Esta curva foi obtida pela incubação de quantidades variadas de

hormônio autêntico com quantidades idênticas de anticorpos e de hormônio marcado.

Os níveis plasmáticos dos estrogênios (17β -estradiol) foram avaliados no laboratório Weinmann. Os resultados foram expressos em pg por mL de plasma.

2.11 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

As proteínas foram quantificadas pelo método descrito por Lowry e colaboradores, que utiliza como padrão uma solução de albumina bovina na concentração de 1mg/mL (LOWRY, 1951). Para a realização das dosagens foram utilizados os seguintes reagentes:

Reativo de Folin Ciocalteu diluído em água destilada na proporção de 1:3.

Reativo C, que é composto por 50mL do reativo A, 0,5mL do reativo B1 e 0,5mL do reativo B2, cujos reativos A, B1 e B2 são respectivamente:

- NaHCO_3 (bicarbonato de sódio) 2% em NaOH (hidróxido de sódio) 0,1N.
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de cobre) 1%.
- $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (tartarato de sódio e potássio) 2%.

Em tubos de ensaio, foram adicionados 20 μ L de amostra (homogeneizado de tecido ou sangue) em 0,78mL de água destilada e 2mL de reativo C preparado a fresco, aguardando-se 10 minutos. Depois, adicionava-se 0,2mL do reativo de Folin Ciocalteu, aguardando-se mais 30 minutos. Após, a solução adquiria uma coloração azulada que foi medida em espectrofotômetro, marca Varian modelo Cary, a 625 nm.

O cálculo foi feito utilizando-se um fator de correção médio calculado a partir da curva de calibração construída utilizando-se a solução padrão de albumina bovina. Os resultados foram expressos em mg de proteína.

2.12 DOSAGEM DE HEMOGLOBINA

A hemoglobina foi dosada nas amostras de sangue preparadas para a medida de lipoperoxidação, ou seja, eritrócito diluído em soro fisiológico. Esta análise foi feita utilizando-se uma mistura de cianetos para se obter o reativo de Drabkin, que reage com a hemoglobina formando cianometahemoglobina, medida em espectrofotômetro, marca Varian modelo Cary, a 546 nm.

SOLUÇÃO DE DRABKIN:

⇒ 0,85mL de KCN 9mM.

⇒ 6,6mL de K₃[Fe(CN)₆] 0,9mM.

⇒ q.s.p. 10mL água destilada.

Em um tubo de ensaio foi adicionado 5mL de Drabkin e 20µL de amostra, deixou-se reagir por 5 minutos e a absorbância foi lida em espectrofotômetro.

2.13 MEDIDAS DE LIPOPEROXIDAÇÃO (LPO)

2.13.1 Quimiluminescência Iniciada por t-BOOH

Este método consiste em adicionar um hidroperóxido orgânico de origem sintética, o hidroperóxido de tert-butil (t-BOOH), a amostra sangüínea ou ao homogeneizado de tecido, avaliando a capacidade de resposta produzida pela amostra. A realização deste tipo de teste consiste no fato de que os hidroperóxidos são espécies químicas bastante instáveis, reagindo com lipídios por um mecanismo

radicalar, o qual gera produtos que emitem luz pela amostra em estudo. Este método é um dos mais sensíveis para a medida de LPO.

A QL foi medida em um contador beta (LKB Rack Beta Liquid Scintillation Spectrometer-1215; LKB Produkter AB, Brommma, Sweden) com o circuito de coincidência desconectado e utilizando o canal de trítio. As determinações foram realizadas em sala escura, em frascos de vidro mantidos na penumbra para evitar a fosforescência ativada pela luz fluorescente. O meio de reação no qual foi realizado o ensaio consistiu em 4mL de uma solução reguladora de KCl 140mM, fosfatos 20mM, pH 7,4, na qual foi adicionado 10 μ L de eritrócito diluído em soro fisiológico ou o homogeneizado de tecido. Após, foi realizada uma leitura inicial, considerada esta a emissão de luz basal. O hidroperóxido orgânico utilizado foi o hidroperóxido de tert-butila, na concentração de 400mM, dos quais foram adicionados 30 μ L no meio de reação, para uma concentração final de 3mM. Foi medida, então, a emissão de luz e, dessa, foi descontada a emissão basal para fins de cálculos. Os resultados foram expressos em contagens por segundo (cps) por miligrama de hemoglobina (quando medido em eritrócitos) ou miligrama de proteína (quando medido em homogeneizado) (GONZALEZ-FLECHA, et al. 1991).

2.13.2 Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Esta técnica é bastante utilizada para medir a LPO, porque o ácido tiobarbitúrico reage com os produtos da LPO, entre eles o malondialdeído e outros aldeídos.

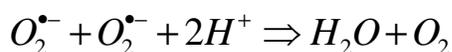
A técnica consiste em aquecer o material biológico a ser testado na presença de ácido tiobarbitúrico em meio ácido, para medir espectrofotometricamente a formação

de um composto corado (base de Schiff). Para que ocorresse a reação, adicionou-se, a 0,25mL de homogeneizado, 0,75mL de ácido tricloroacético (TCA) a 10%(P/V), que tem a função de desnaturar as proteínas presentes e acidificar o meio de reação. Essa mistura foi então agitada e centrifugada durante 3 minutos a 1000 g. Foram retirados 0,5mL do sobrenadante e a este foi adicionado 0,5mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% (P/V), que reage com os produtos da lipoperoxidação formando um composto de coloração rosada. A mistura foi incubada por 15 minutos a 100°C e em seguida resfriada no gelo. Em seguida, foi realizada a leitura da absorbância a 535 nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em nmoles de TBARS por mg de proteína (BUEGE & AUST, 1978).

2.14 DETERMINAÇÕES ENZIMÁTICAS

2.14.1 Superóxido Dismutase (SOD)

Esta enzima catalisa a reação de dois ânions superóxido, com a conseqüente formação de peróxido de hidrogênio, que é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas, como a catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx). A velocidade da reação catalisada pela SOD é 10^4 vezes maior do que a velocidade da dismutação espontânea em pH fisiológico (SOUTHORN & POWIS, 1988; BOVERIS, et al. 1983). Reação 2.1.



Reação 2.1

A técnica utilizada na via intramuscular está baseada da inibição da reação do radical superóxido com a adrenalina. A SOD presente na amostra em estudo compete pelo radical superóxido com o sistema de detecção. Dado que não se pode determinar a concentração da enzima nem sua atividade em termos de substrato

consumido por unidade de tempo, utiliza-se a quantificação em unidades relativas. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de oxidação do detector (adrenalina). A oxidação da adrenalina leva à formação de um produto colorido, o adrenocromo, detectado espectrofotometricamente. A atividade da SOD é determinada medindo a velocidade de formação do adrenocromo, observada a 480nm, em meio de reação contendo glicina-NaOH (50mM, pH 10) e adrenalina (1mM) (BOVERIS, et al. 1983). Reação 2.2.



Outra técnica utilizada neste trabalho para determinação da SOD baseou-se na inibição da reação do radical superóxido com o pirogalol. O superóxido é gerado pela autooxidação do pirogalol quando em meio básico. A SOD presente na amostra compete pelo radical superóxido com o sistema de detecção. Portanto, quanto maior fosse a concentração de SOD na amostra, menor seria a auto-oxidação do pirogalol. No primeiro grupo experimental, na via intramuscular, o método utilizado para avaliar a SOD, foi o da oxidação da adrenalina a adrenocromo, observa-se a curva de decaimento da adrenalina a adrenocromo.

A oxidação do pirogalol, foi realizada nas vias intraperitoneal e transdermal, esta leva à formação de um produto colorido, detectado espectrofotometricamente a 420 nm. A atividade da SOD é determinada medindo-se a velocidade de formação do pirogalol oxidado (MARKLUND, 1985). Para isso, utilizou-se uma solução tampão (Tris-base na concentração de 50mM; EDTA na concentração de 1mM em pH 8,2), pirogalol 24mM (em ácido clorídrico a 10mM) e catalase a 30µM. Para se ter o resultado em unidade de SOD, necessita-se de um fator de calibração. Por isso, fez-

se necessário a construção de uma curva padrão com uma solução de SOD de concentração conhecida. Desta forma, calculou-se o fator de calibração necessário para converter a percentagem de inibição da autooxidação em unidades de enzima. No ensaio, adicionou-se a cubeta 988 μ L de tampão Tris, 4 μ L de catalase. Zerou-se o espectrofotômetro e adicionou-se 8 μ L de pirogalol, observando a oxidação do mesmo. Desta forma, obtivemos o máximo (100%) de oxidação desta substância, para calcular a percentagem de inibição causada pela SOD da amostra. Com a amostra, procedeu-se da mesma forma, apenas com o reajuste do volume de tampão de acordo com a quantidade de sangue ou homogeneizado de tecido adicionada, para se ter um volume final de 1mL. Os resultados foram expressos em U/mg/proteína.

2.14.2 Catalase (CAT)

Esta enzima é altamente específica e possui atividade apenas para peróxido de hidrogênio, hidroperóxidos de metila e etila (WEBSTER & NUNN, 1998). No homem, a CAT é uma hemoproteína e catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio à água e oxigênio (BOVERIS & CHANCE, 1973).

A atividade da catalase é diretamente proporcional à taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio, e obedece a uma cinética de pseudo primeira ordem. Sendo assim, a atividade da enzima catalase pode ser medida através da avaliação do consumo do peróxido de hidrogênio.

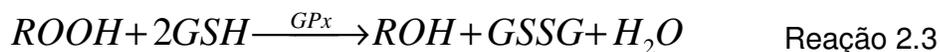
Este teste consiste em avaliar a diminuição da absorbância no comprimento de onda de 240 nm, sendo esse o comprimento de onda onde há a maior absorção

pelo peróxido de hidrogênio, utilizando-se cubetas de quartzo devido à alta energia do comprimento de onda no qual foram realizadas as medidas.

Para realização deste ensaio foram utilizados os seguintes reagentes: solução tampão de fosfato de sódio a 50mM e pH 7,4, e peróxido de hidrogênio 0,3M. Em cubeta de quartzo, foram adicionados 955µL do tampão fosfato e 10µL de amostra do tecido ou 30µL de amostra de sangue, essa cubeta foi colocada em espectrofotômetro e descontada contra um branco de tampão fosfato. Após, foram adicionados 35µL do peróxido de hidrogênio para o tecido e 15µL para a amostra de sangue e foi feito o monitoramento da diminuição da absorbância no comprimento de onda selecionado. Os resultados foram expressos em nmoles por mg de proteína (µmoles de H₂O₂) (BOVERIS & CHANCE, 1973).

2.14.3 Glutathione Peroxidase (GPx)

A enzima glutathione peroxidase (GPx) catalisa a reação de hidroperóxidos com a glutathione reduzida (GSH) para formar glutathione oxidada (GSSG) e o produto da redução do hidroperóxido, por isso, a sua atividade pode ser determinada medindo-se o consumo de NADPH, na presença de GSH e GR na reação de redução acoplada à reação da GPx. A azida sódica (N₃Na) é adicionada para inibir a catalase (WENDEL, 1981). Reação 2.3.



A amostra foi previamente preparada, adicionando-se uma mistura de cianetos (cianeto de potássio KCN 9mM e ferrocianeto de potássio K₃[Fe(CN)₆] 0,9mM), para inibir a atividade pseudo-peroxidase da hemoglobina. Inicialmente,

utilizou-se a mistura de cianetos para se obter o reativo de Drabkin, para medir a quantidade de hemoglobina. Depois de conhecida a concentração de hemoglobina, essas mesmas soluções foram utilizadas, em diferentes proporções, para se obter a solução transformante, que vai transformar toda a hemoglobina em cianometahemoglobina.

SOLUÇÃO DE DRABKIN:

0,85mL de KCN 9mM;

6,6mL de $K_3[Fe(CN)_6]$ 0,9mM;

q.s.p. 10mL água destilada.

SOLUÇÃO TRANSFORMANTE:

5,0mL de KCN 9mM;

5,0mL de $K_3[Fe(CN)_6]$ 0,9mM.

A atividade da GPx foi medida em um espectrofotômetro da marca Varian, modelo Cary. Foi monitorada a diminuição de absorvância do NADPH a 340 nm, em um meio de reação contendo os seguintes reagentes: a) Solução tampão de fosfatos 143mM e EDTA 1mM, com pH 7,5; b) NADPH 0,24mM; c) Azida sódica 1mM, utilizada para inibir a atividade da catalase; d) GSH 5mM; e) Glutathione redutase (GR) 0,25U/mL; f) Hidroperóxido de tert-butila 0,5mM.

Na cubeta do espectrofotômetro, foram adicionados 330 μ L de tampão, 50 μ L de homogeneizado de tecido, 500 μ L de NADPH, 10 μ L de azida sódica, 50 μ L de GSH e 10 μ L de GR. A absorvância foi registrada por um período de aproximadamente 3 minutos, até haver uma certa estabilização da linha base. Após, foram adicionados 50 μ L de hidroperóxido de tert-butila, e a diminuição da absorvância, devido ao consumo de NADPH, foi monitorada por aproximadamente 5

minutos. Os resultados foram expressos em nmoles por minuto por mg de proteína (FLOHÉ & GUNZLER, 1984).

2.14.4 Glutathione S-Transferase

As glutathione transferases são um grupo de enzimas que catalisam reações de conjugação de glutathione com vários substratos, tendo um papel importante na detoxificação de agentes alquilantes. Todas as transferases são ativas com o composto cloro-dinitro-benzeno (CDNB). A glutathione S-transferase (GST) vai catalisar a reação de conjugação da glutathione reduzida (GSH) com outras substâncias tóxicas, que possam vir a prejudicar o funcionamento celular. Essa combinação forma os conjugados de glutathione que serão exportados para fora da célula. Deste modo, esta enzima desempenha um papel importante na detoxificação celular.

Este ensaio está baseado na capacidade da GST de combinar o 1-cloro-2,4-dinitro-benzeno (CDNB) com a GSH formando 2,4 dinitro-fenil-glutathione (DNP-SG), que é um composto corado. A formação do DNP-SG pode ser observada espectrofotometricamente no comprimento de onda de 340 nm, utilizando os seguintes reagentes: Tampão fosfato de sódio 0,2M pH 6,5; GSH 20mM e CDNB 20mM. Na cubeta de 1mL foram adicionados 850 μ L de tampão, 50 μ L de amostra, mais 50 μ L de GSH (de concentração final de 1mM), zerou-se o espectrofotômetro a 340nm, e, por fim, adicionou-se 50 μ L de CDNB e observou-se a formação do DNP-SG. O resultado é dado em nmoles/minuto/mg proteína (MANNERVIK & GLUTHENBERG, 1981).

2.15 DEFESA NÃO ENZIMÁTICA

2.15.1 Glutathiona Total

A glutathiona total mede a reação de óxido redução entre GSH e GSSG. O meio de reação no qual foi realizado o ensaio consistiu em uma solução de tampão fosfato 300 mM ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$), e uma solução de DTNB (ácido ditionitrobenzólico). No momento do ensaio, agregava-se 1 mL de tampão fosfato, 100 μL de DTNB, zerava-se o espectro e após acrescentava-se 250 μL e fazia-se a leitura correspondente (BEUTLER et al, 1963).

2.16 DETERMINAÇÃO DE NITRATOS E NITRITOS

Os níveis de nitratos e nitritos no plasma e tecido foram medidos pela reação das amostras com o reagente de Griess. Alíquotas de 50 μL foram incubadas com cofatores enzimáticos e nitrato redutase por trinta minutos em temperatura ambiente, para conversão de nitrato em nitrito. O nitrito formado foi, então, analisado pela reação deste com o reagente de Griess. Forma-se um composto corado que foi medido em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm e expresso em mM (GRANGER, 1999).

A quantificação dos níveis de nitratos foi feita utilizando-se os seguintes reagentes: Reativo de Griess (1g de sulfanilamina, 0,1g de naftiletlenodiamina, 2,3mL de ácido ortofosfórico 85%, 97,7mL de água); Tris 1 M, pH 7,5; NADPH 0,02 mM; Glicose 6-fosfato (G6P) 5 mM; Glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) 10 U/mL e Nitrato redutase (NR) 1,0 U/mL. No meio de reação, foram adicionados 50 μL de amostra, 10 μL de NADPH, 7 μL de Tris, 23 μL de uma mistura de G6P/G6PDH e 10 μL de NR. A mistura foi incubada à temperatura ambiente, sob

agitação, por 30 minutos. Após, foi adicionado 100 μ L do reagente de Griess, o qual foi incubado, novamente, à temperatura ambiente sob agitação por mais 10 min e a absorbância foi lida a 540 nm. Os resultados foram avaliados comparando-se com uma curva padrão feita, utilizando-se nitrato de sódio 1 mM e expressos em mmol/L (GRANGER, 1999).

2.17 DETERMINAÇÃO DO ÂNION RADICAL SUPERÓXIDO PELA OXIDAÇÃO DA LUCIGENINA

Trata-se de um método simples que demonstra o ciclo de redução univalente da lucigenina seguido de sua auto-oxidação, levando a geração do radical superóxido, quando exposta a doadores de elétrons (e^-), como as NAD(P)H oxidases.

A aorta das ratas foi dissecada e isolada em três fragmentos iguais. Os fragmentos foram incubados por 45 minutos em Krebs - HEPES a 37 °C, sob atmosfera de carbogênio (Figura 2.4). Após, os vasos foram transferidos para frascos de cintilação onde foi acrescentada a lucigenina que é reduzida, gerando radicais e emissão de luz. A luminescência foi quantificada através de um contador beta (LKB Rack Beta Liquid Scintillation Spectrometer - 1215; LKB Produkter AB, Bromma, Sweden) com o circuito de coincidência desconectado e utilizando o canal de trítio, adaptado a contar a emissão de luz. A emissão basal foi lida por 4 vezes e, após, adicionado NADH ou NADPH e repetidas as contagens, expresso em (cpm/min/mg prot) $\times 10^2$ (Figura 2.4) (STEFAN & FRIDOVICH, 1996; JANISZEWSKI, et al. 2002).



Figura 2.4: Aparato mostrando banho para a incubação das aortas para a realização da técnica de Lucigenina; a aorta foi incubada com Krebs - Hepes a 37 °C, sob atmosfera de carbogênio.

2.18 PERFUSÃO DO CORAÇÃO

Os animais foram trazidos do biotério momentos antes de começar a perfusão. Foi retirado sangue pela cânula na carótida, a seguir, os animais foram mortos com pancada na cabeça e deslocamento cervical. O tórax foi aberto com o auxílio de uma tesoura e o coração foi rapidamente retirado e colocado em solução de Tyrode (ou Krebs-Henseleit) à temperatura ambiente. Em seguida, a aorta foi fixada à cânula do aparelho de perfusão e a bomba peristáltica (Modelo Miniplus 2 da Gilson Medical Elektronik, França) foi ligada para impulsionar a solução de perfusão através do coração (Figura 2.5). A perfusão do coração foi realizada retrogradamente (Figura 2.6). A bomba peristáltica foi regulada para perfundir os corações com uma velocidade de perfusão (fluxo) constante de 10 mL/min.

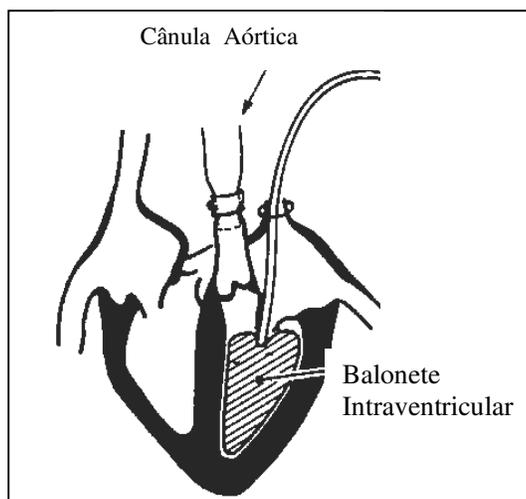


Figura 2.5: Esquema da posição do balonete no ventrículo esquerdo. (Adaptado de DÖRING & DEHNERT, 1987).

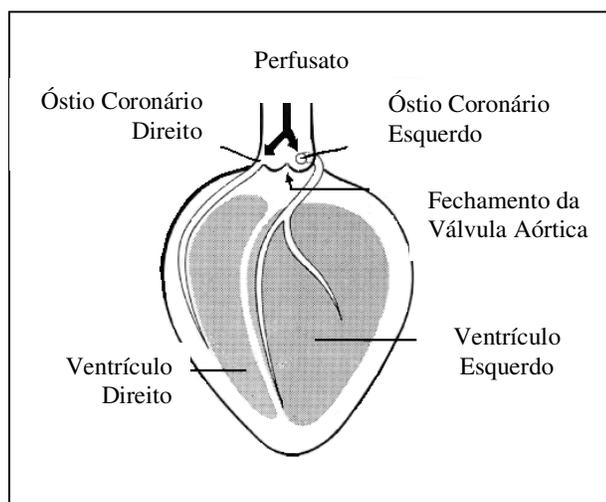


Figura 2.6: Esquema da perfusão coronariana (Copiada de BAUERMANN, 2000)

Após o coração ser fixado ao aparelho de perfusão, as veias pulmonares foram retiradas e, por esse orifício e através da válvula mitral, foi introduzido um balão de borracha de látex vulcanizada, cheia de água, no ventrículo esquerdo. Este balão estava conectado a um transdutor de pressão o qual estava ligado ao sistema de registro computadorizado do aparelho perfusor (Hugo Sachs Elektronik,

Alemanha) do tipo Langendorff (1985) (Figura 2.7 e 2.8). Esse aparelho estava acoplado a um sistema de aquisição de dados PLUGSYS da Hugo Sachs Elektronik, computadorizado (Programa Bios Setup da American Megatrends Inc.). Os dados foram passados para um amplificador e deste para uma placa de aquisição de dados que está conectada a um microcomputador PC-AT 486. O computador converte os dados para uma planilha D-Base utilizando o programa ISOHEART, o qual registrava os parâmetros hemodinâmicos cardíacos durante todo o período experimental.

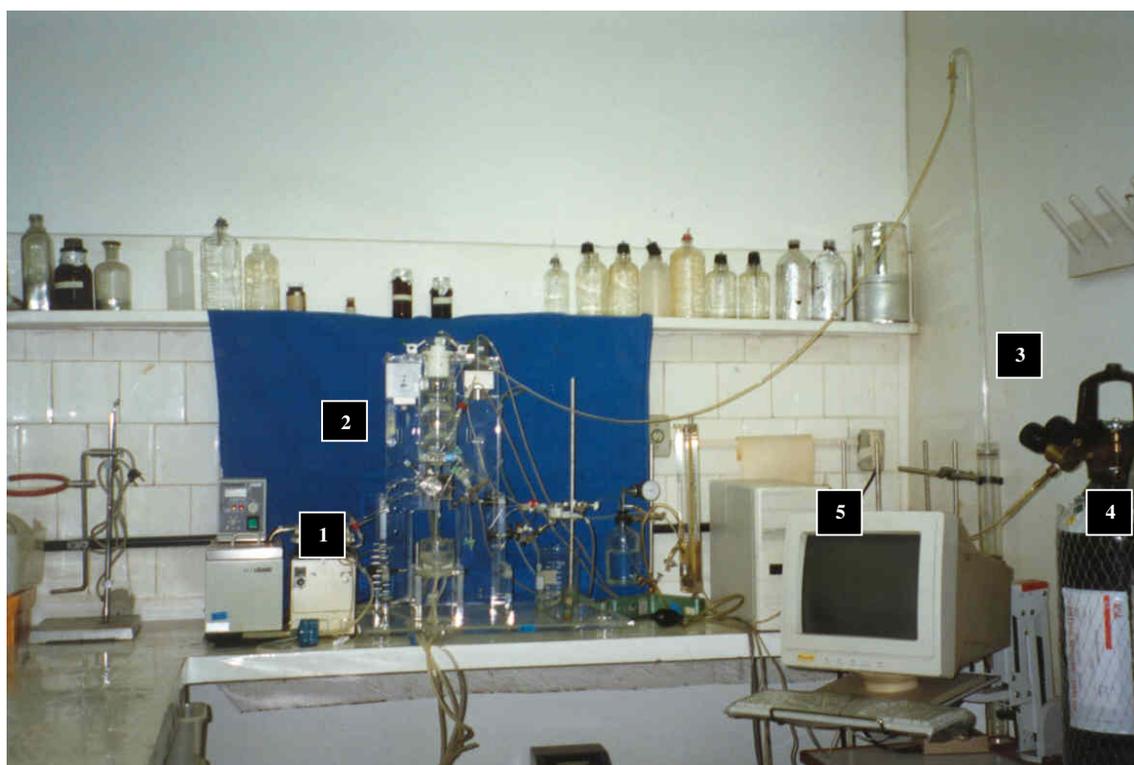


Figura 2.7: Aparelho de perfusão de coração isolado tamanho 3, modo fluxo constante. O aparelho está acoplado a um sistema de aquisição de dados (PLUGSYS) computadorizado. (1: Bomba de Perfusão; 2: Aparelho de perfusão tipo Langendorff; 3: Válvula Gottlieb; 4: tubo contendo carbogênio; 5: microcomputador PC-AT 486).

O volume do balão intraventricular era ajustado, usando uma seringa equipada com um micrômetro, a fim de proporcionar uma pressão ventricular diastólica (PVDiast) de 10 mmHg no período de estabilização, e que foi modificada

durante o protocolo experimental de Frank-Starling. Depois de ajustado o volume do balão intraventricular, o recipiente que continha Tyrode aquecida (37°C) era levantado até a altura do coração, e este ficava imerso na solução do líquido de perfusão.

Os sinais chegavam ao sistema de aquisição de dados oriundos de dois transdutores de pressão: um estava acoplado à cânula onde era fixada a aorta e sinalizava as variações na pressão de perfusão (PP); o outro estava acoplado ao balão intraventricular e informava as variações ventriculares de frequência cardíaca (FC), Pressão Ventricular Sistólica (PVSist), Pressão Ventricular Diastólica (PVDiast), Velocidade de Contração (+dP/dt) e Velocidade de Relaxamento (-dP/dt) (Figura 2.7 e 2.8).

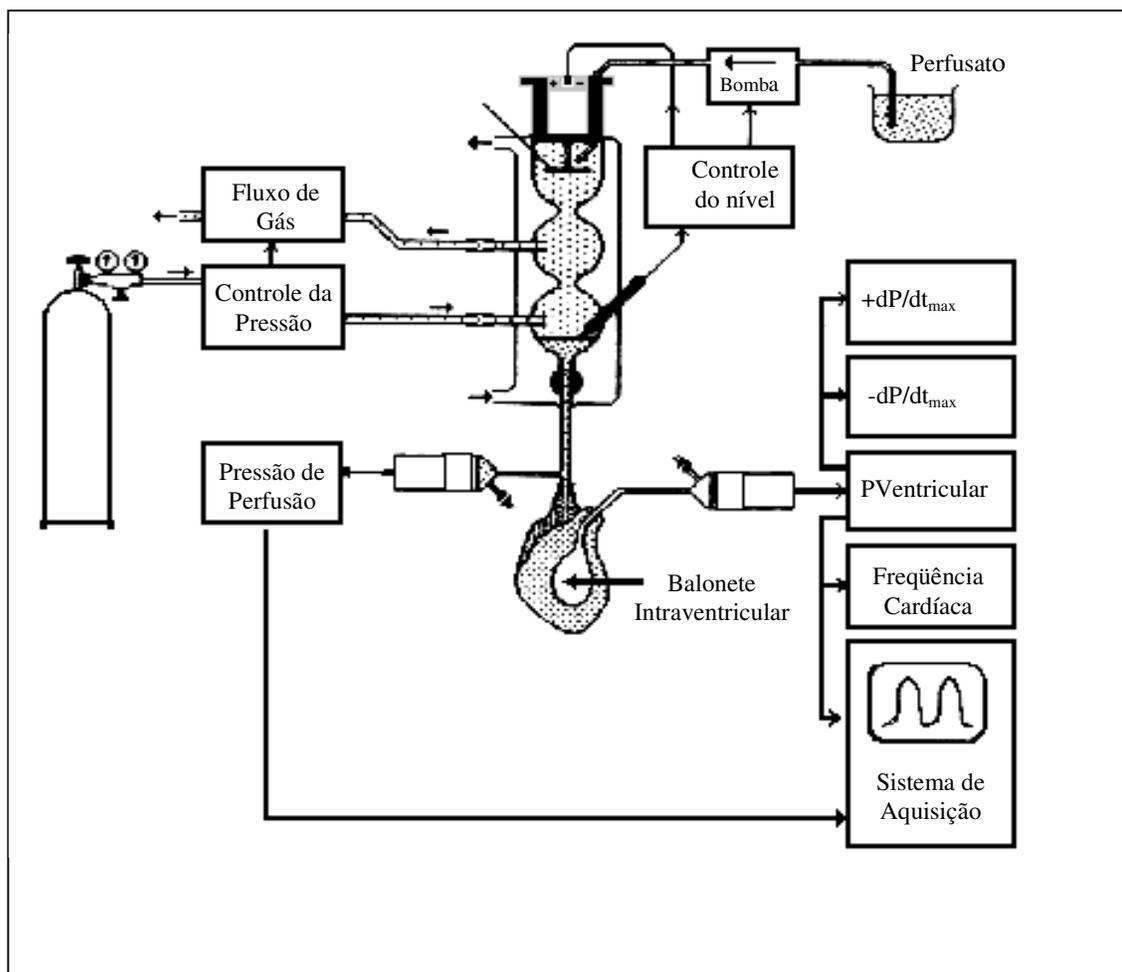


Figura 2.8: Esquema do sistema de perfusão Langendorff (Adaptado de DÖRING & DEHNERT, 1987, apud BAUERMAN, 2000).

As soluções perfusoras eram gaseificadas com carbogênio (95% de O_2 e 5% de CO_2) mantendo o pH em 7,4 durante todo o período dos experimentos. A pressão do carbogênio que chegava ao oxigenador (bulbo de vidro do aparelho perfusor onde a solução era oxigenada) foi controlada por uma válvula Gotlliebe (H. S. Elektronik), registrada no manômetro (Boso – Alemanha) do aparelho de perfusão e mantida entre 10-15 mmHg. A temperatura da água que circulava ao redor dos compartimentos por onde passavam as soluções perfusoras, assim como, em volta da câmara que alojava o líquido que circundava os corações, foi mantida em $37^\circ C$,

durante todo o período experimental. Isso foi realizado por uma bomba circuladora de água com aquecedor e termostato Modelo M3 Lauda (H. S. Elektronik).

Foram avaliados os parâmetros contráteis nos distintos grupos experimentais.

Foram realizados dois protocolos experimentais:

1) Curva de Frank-Starling: após um período de estabilização do coração ligado a cânula do perfusor, a PVDiast do ventrículo esquerdo foi sendo alterada progressivamente. Iniciou-se com 5mmHg, passando-se à 10mmHg, 15mmHg, 20mmHg, 25mmHg, 30mmHg, 35mmHg, 40mmHg.

2) Isquemia-reperfusão: logo após o procedimento anterior, o coração passou por um período de estabilização, e só então se desligou a bomba perfusora, por um período de 30 min. Após, o coração foi novamente reperfundido e avaliaram-se então os parâmetros propostos.

2.19 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após efetuados todos os testes, foram calculadas as médias e os erros padrões das médias para cada uma das medidas realizadas e para cada um dos grupos estudados. Para a análise estatística dos dados, foi realizado o teste de análise de variância complementado com o teste de comparações múltiplas de Student-Newmann-Keuls, sendo as diferenças consideradas significativas para $p < 0,05$ (nível de significância de, pelo menos, 5%).

No grupo perfusão os resultados são expressos como média \pm EPM (Erro Padrão da Média), para cada variável de estudo. Para a análise estatística das variações dentro de cada grupo foi utilizado o teste-t para duas amostras em par para médias, aceitando $\text{Stat } t > t \text{ crítico}$ aceita H_1 ; $\text{stat } t < t \text{ crítico}$ aceita H_0 ; onde foi considerado: $H_0: F_c(0) = F_c(5)$; $H_1: (0) > F_c(5)$, para intervalo $p < 0,05$. Para avaliação das diferenças entre grupos, foi utilizado a ANOVA de uma via com o teste complementar de Student Newmann Keuls ou Tukey, o programa Instat utilizado já avaliava o melhor teste a ser aplicado. Foi realizada também Análise de Variância, utilizando o delineamento em medidas repetidas, complementada pelo teste de Comparações Múltiplas de Tukey, ao nível de significância de 5%.

3 RESULTADOS

Os resultados serão apresentados de acordo com as vias de administração realizadas: intramuscular, intraperitoneal e transdermal, exceto para as medidas de estresse oxidativo sistêmico e a perfusão, já que apenas a via transdermal foi utilizada. As medidas hemodinâmicas foram efetuadas nas vias intramuscular e transdermal.

Todos os resultados são expressos como média \pm EPM (Erro Padrão da Média), para cada variável de estudo.

3.1 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA CIRURGIA DE CASTRAÇÃO E DA REPOSIÇÃO HORMONAL

A fim de observarmos a eficácia da cirurgia de castração e da reposição hormonal foram analisados o peso úmido e seco dos cornos uterinos dos animais e o nível plasmático hormonal. Na figura 3.1 podemos observar a aparência do trato reprodutivo das ratas nos três grupos experimentais, mostrando nítida redução de tamanho nos animais castrados e aumento nos que receberam reposição hormonal pela via transdermal, sendo que as outras vias de administração mostraram este mesmo padrão. As diferenças entre os pesos úmidos e secos dos cornos uterinos,

entre os três grupos experimentais, foram extremamente significativas e estão representadas na figura 3.2. Análise de variância de uma via para a variável peso úmido entre os grupos foi significativa para $p < 0,0001$ (valor de $F=50,946$) e para a variável peso seco foi também significativo entre os grupos para $p < 0,0001$ (valor de $F=52,041$). Na Tabela 3.1, está representado o nível hormonal dos grupos experimentais na via transdermal realizada. A análise de variância de uma via revelou diferenças significativas entre os grupos para $p < 0,0001$ ($F=27,587$).

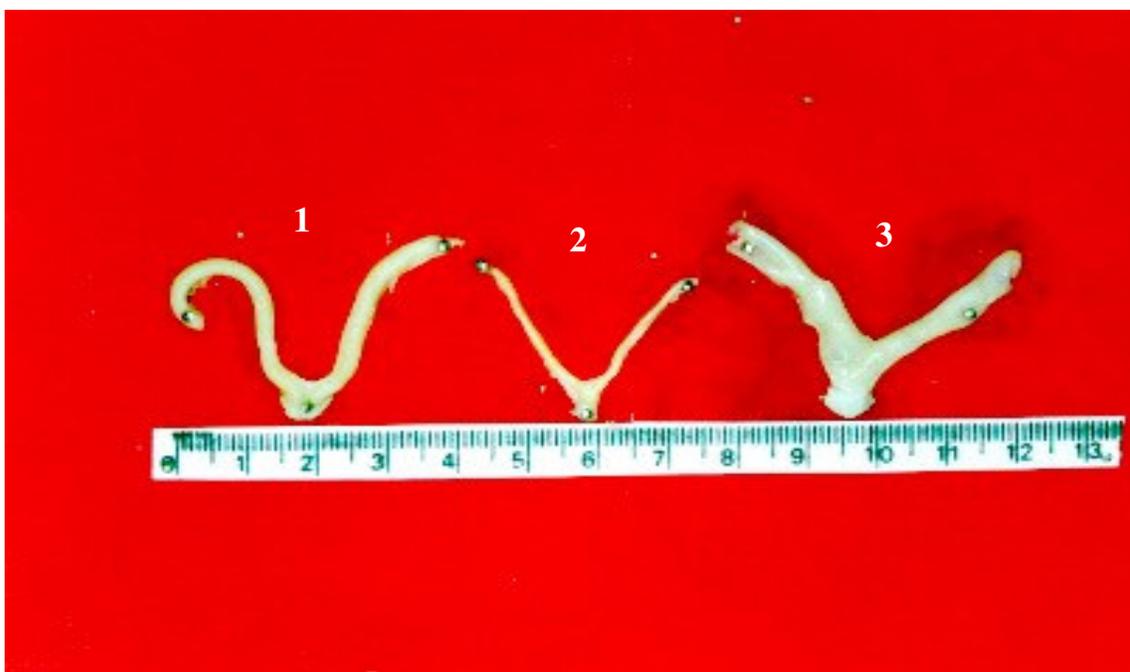


Figura. 3.1: Aparência do trato reprodutivo na necropsia confirmando o sucesso da ovariectomia e da reposição hormonal pela via transdermal. 1. CONTROLE; 2. CASTRADO; 3. CAST+HORM.

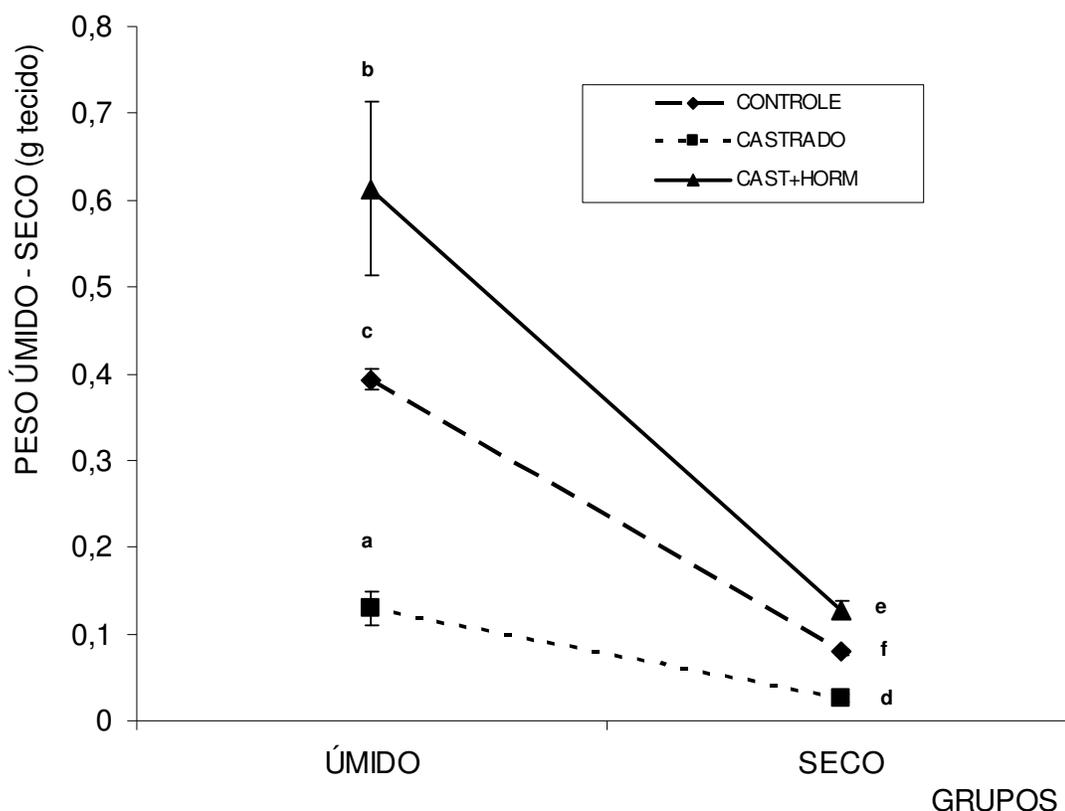


Figura 3.2: Peso úmido e peso seco dos cornos uterinos das ratas submetidas à cirurgia de castração e à reposição hormonal pela via transdermal. Os resultados estão expressos como média \pm EPM.

Utilizam-se as notações de significância

- a** - denota diferença significativa entre os grupos CASTRADO e CONTROLE ($p < 0,001$) para o parâmetro peso úmido;
- b** - denota diferença significativa entre os grupos CAST+HORM e CASTRADO ($p < 0,001$) para o parâmetro peso úmido;
- c** - denota diferença significativa entre os grupos CONTROLE e CAST+HORM ($p < 0,001$) para o parâmetro peso úmido;
- d** - denota diferença significativa entre os grupos CASTRADO e CONTROLE ($p < 0,001$) para o parâmetro peso seco;
- e** - denota diferença significativa entre os grupos CAST+HORM e CASTRADO ($p < 0,001$) para o parâmetro peso seco;
- f** - denota diferença significativa entre os grupos CONTROLE e CAST+HORM ($p < 0,001$) para o parâmetro peso seco;

Peso úmido: CONTROLE (n=10); CASTRADO (n=9); CAST+HORM (N=8);

Peso seco: CONTROLE (n=10); CASTRADO (n=9); CAST+HORM (N=9).

Tabela 3.1: Concentração plasmática do hormônio 17 β -estradiol (pg/mL), por quimiluminescência, nos diferentes grupos experimentais.

GRUPOS	17 β -estradiol (pg/ml)
CONTROLE	39 \pm 7
CASTRADO	ND ^c
CAST+HORM	113 \pm 12 ^{a b}

ND= não detectável

Os resultados estão expressos como média \pm EPM utilizam-se de seis a oito animais por grupo.

Utilizam-se as notações de significância:

- a** - denota diferença significativa entre os grupos CAST+HORM e CONTROLE ($p < 0,001$);
- b** - denota diferença significativa entre os grupos CAST+HORM e CASTRADO ($p < 0,001$);
- c** - denota diferença significativa entre os grupos CASTRADO e CONTROLE ($p < 0,01$).

3.2 ESTRESSE OXIDATIVO CARDÍACO

3.2.1 Via de Administração Intramuscular

Nesta via, o hormônio 17 β -estradiol ou o veículo foi administrado no músculo da coxa (intercalando-se ora na coxa direita, ora na coxa esquerda), sete dias após a cirurgia de castração ou de simulação da castração. A seguir, são apresentados os resultados de estresse oxidativo cardíaco, através das técnicas, já descritas no capítulo 2: para os níveis de lipoperoxidação (LPO), através da medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e quimiluminescência (QL), e a atividade das enzimas antioxidantes: CAT, SOD, GPx.

3.2.1.1 Medidas de Lipoperoxidação

Para os níveis de TBARS, a análise de variância de uma via demonstrou diferença significativa entre os grupos para um $p < 0,0001$, sendo o valor de $F = 33,22$. O grupo CASTRADO apresentou um aumento de 164% em relação ao grupo CONTROLE, sendo esta diferença significativa ($p < 0,001$) (Figura 3.3), enquanto que o nível de TBARS, no grupo CAST+HORM, diminuiu 60%, em relação ao grupo CASTRADO, sendo esta diferença significativa ($p < 0,001$). Os níveis de TBARS do grupo CAST+HORM não se diferiam dos valores encontrados no grupo CONTROLE.

Para os níveis de QL, a análise de variância de uma via demonstrou diferença significativa entre os grupos para $p < 0,0006$, sendo $F = 12,761$. Foi observado que o grupo CASTRADO apresentou um aumento significativo ($p < 0,01$) de 65%, em relação ao grupo CONTROLE (Figura 3.4). Ao repormos o hormônio, houve uma diminuição nos níveis de QL de 36% no grupo CAST+HORM em relação ao grupo CASTRADO ($p < 0,01$). Não houve diferença significativa entre o grupo CONTROLE e o CAST+HORM (Figura 3.4).

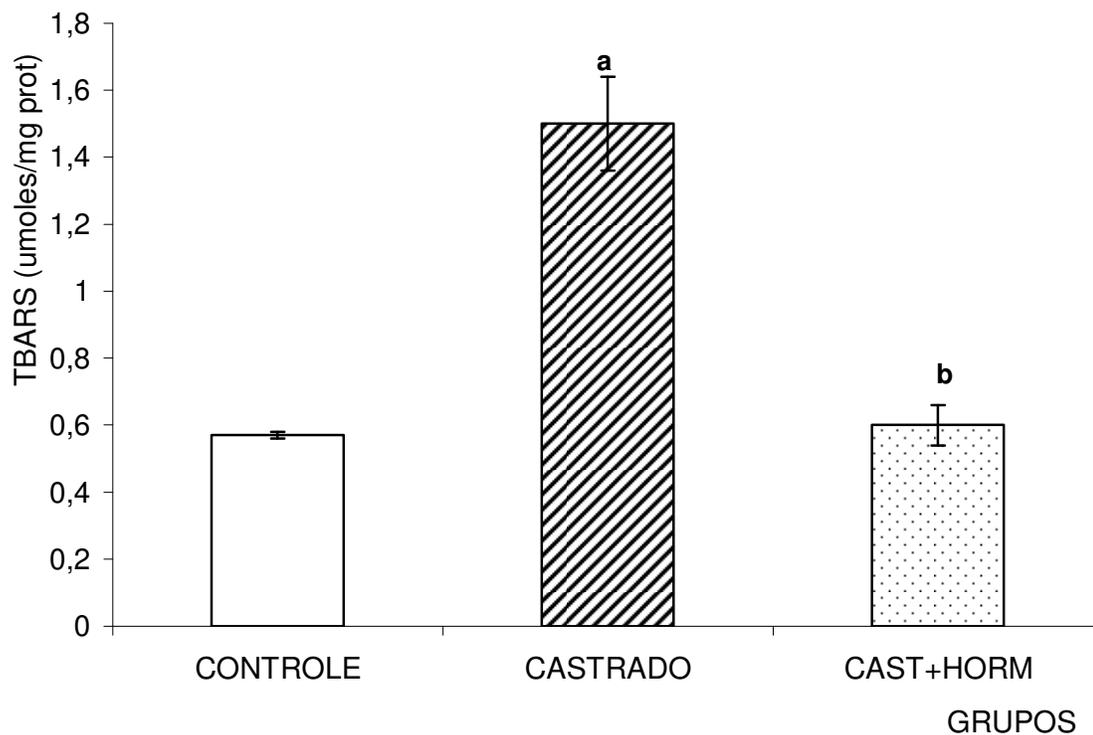


Figura 3.3: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS em $\mu\text{moles/mg prot}$) em homogeneizado cardíaco nos distintos grupos, na via intramuscular. Os resultados estão expressos como média \pm EPM de cinco a sete animais por grupo.

Utilizam-se as notações de significância:

a - diferença significativa entre os grupos CASTRADO e CONTROLE ($p < ,001$);

b - diferença significativa entre os grupos CAST+HORM e CASTRADO ($p < 0,001$).

ANOVA=0,0001; F= 33,22.

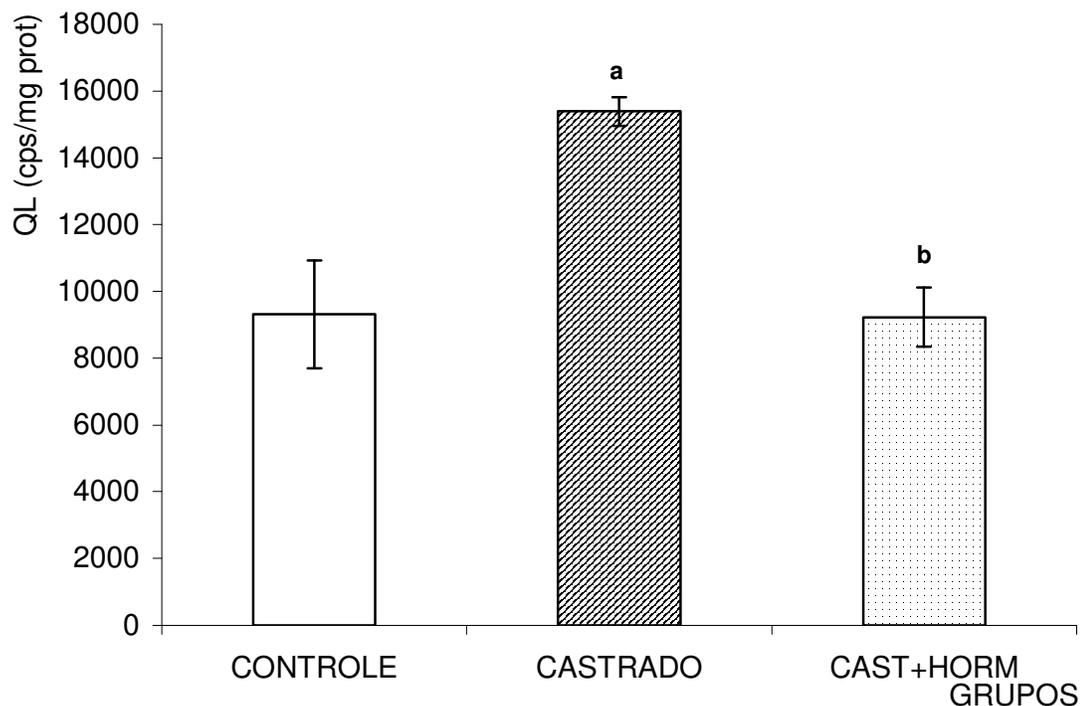


Figura 3.4: Quimiluminescência (QL em cps/mg prot), em homogeneizado cardíaco nos distintos grupos, na via intramuscular. Os resultados estão expressos como média \pm EPM de cinco a sete animais por grupo.

Utilizam-se as notações de significância:

a - diferença significativa entre os grupos CASTRADO e CONTROLE ($p < 0,01$).

b - diferença significativa entre os grupos CAST+HORM e CASTRADO ($p < 0,01$).

ANOVA=0,0006; F=12,76.

3.2.1.2 Atividade das Enzimas Antioxidantes

Quanto à atividade da enzima catalase (CAT), não foi observada diferença significativa entre os grupos. Análise de variância de uma via demonstrou um $p < 0,1478$, sendo o valor de $F=2,15$, ver Tabela 3.2.

A análise de variância de uma via para a atividade da enzima glutathione peroxidase (GPx), demonstrou diferença significativa entre os grupos para um $p < 0,0226$, sendo o valor de $F=4,85$. O grupo CASTRADO apresentou um aumento

de 26% em relação ao grupo CONTROLE, cuja diferença foi significativa ($p < 0,05$), ver Tabela 3.2. A atividade da enzima GPx não mostrou diferença significativa entre os grupos CASTRADO e CAST+HORM.

A análise de variância de uma via ($p < 0,0750$; $F = 3,09$), não mostrou variações significativas entre os grupos (Tabela 3.2), na atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD).

Tabela 3.2: Atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD) em homogeneizados cardíacos de ratas na Via Intramuscular.

GRUPOS	CAT (pmoles/mg prot)	GPx (nmoles/min/mg prot)	SOD (U SOD/mg prot)
CONTROLE	23,4 ± 1,2	62,2 ± 2,6	1,79 ± 0,12
CASTRADO	25,2 ± 0,7	78,3 ± 2,4 ^a	1,48 ± 0,07
CAST+HORM	21,0 ± 1,8	68,7 ± 3,9	1,54 ± 0,06

Os resultados estão expressos como média ± EPM. Utilizou-se de cinco a oito animais por grupo.

Utiliza-se as notações de significância:

a - diferença significativa com relação aos grupos CASTRADO e CONTROLE ($p < 0,05$).

3.2.2 Via de Administração Intraperitoneal

Nesta via, o hormônio 17 β -estradiol ou veículo foi administrado na cavidade peritoneal 7 dias após a cirurgia de castração ou de simulação da castração. A seguir são apresentados os resultados de estresse oxidativo cardíaco, através das técnicas, já descritas no capítulo no 2, para os níveis de lipoperoxidação (LPO), através da medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e

quimiluminescência (QL), e por meio da atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD).

3.2.2.1 Medidas de Lipoperoxidação

Os níveis de lipoperoxidação (LPO) avaliados pelo TBARS mostraram diferenças significativas entre os grupos (análise de variância de uma via $p < 0,0085$; $F = 5,835$). Foi observado que o grupo CASTRADO apresentou um aumento de 35% ($p < 0,05$), em relação ao grupo CONTROLE. Ao repormos o hormônio, houve uma diminuição nos níveis de TBARS de 25% no grupo CAST+HORM em relação ao grupo CASTRADO ($p < 0,05$). Constatamos que após a reposição hormonal houve uma diminuição nos níveis de TBARS, sendo estes valores semelhantes ao CONTROLE (Figura 3.5).

Os níveis de lipoperoxidação (LPO) avaliados por quimiluminescência mostraram diferença significativa entre os grupos (análise de variância de uma via $p < 0,0003$, $F = 13,17$). Foi observado que o grupo CASTRADO apresentou um aumento de 169%, em relação ao grupo CONTROLE ($p < 0,01$). Ao repormos o hormônio, houve uma diminuição de 88% no grupo CAST+HORM em relação ao grupo CASTRADO ($p < 0,01$). Constatamos que quando o hormônio foi repostado, o nível da QL foi reduzido a valores semelhantes ao controle (Figura 3.6).

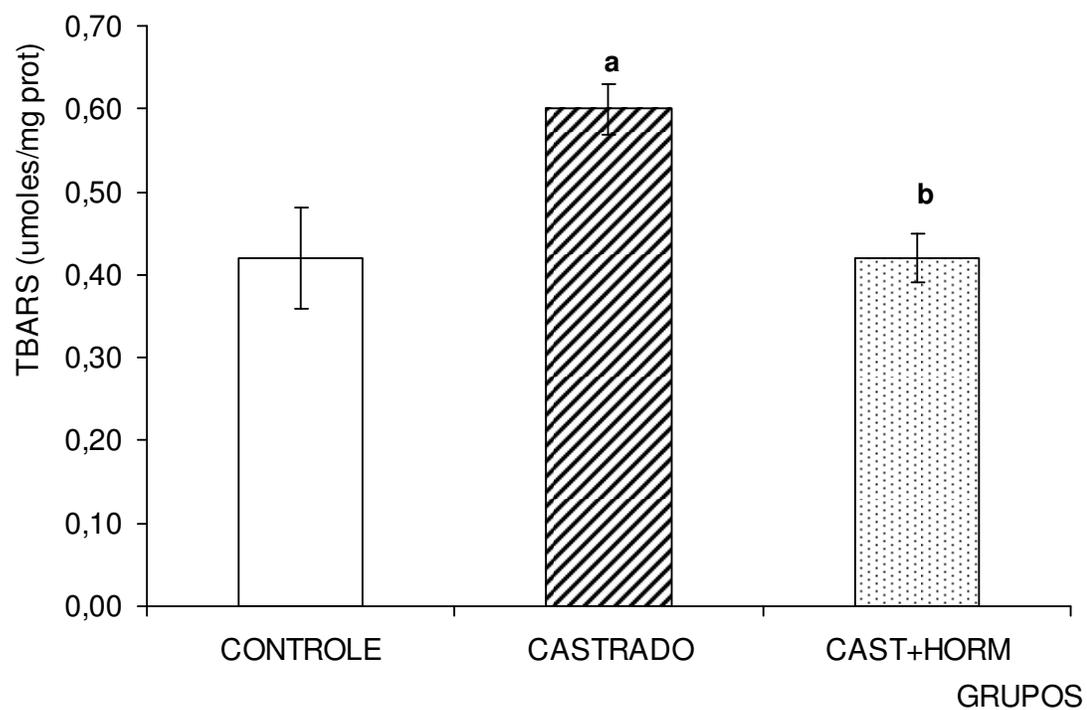


Figura 3.5: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS em $\mu\text{moles/mg prot}$), em homogeneizados cardíacos nos distintos grupos, sendo a reposição na via de administração intraperitoneal. Os resultados estão expressos como média \pm EPM, de seis a 10 animais por grupo.

Utilizam-se as notações de significância:

- a** - diferença significativa entre os grupos CASTRADO e CONTROLE ($p < 0,05$);
- b** - diferença significativa entre os grupos CASTRADO e CAST+HORM ($p < 0,05$).

ANOVA $p < 0,0085$; $F = 5,835$.

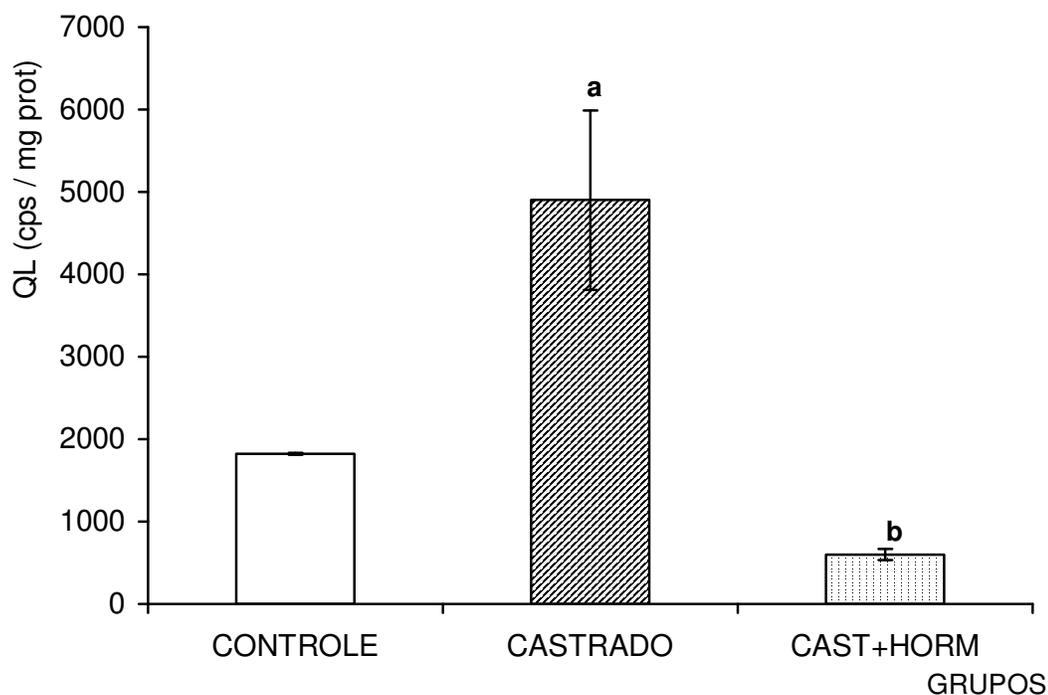


Figura 3.6: Quimiluminescência (QL em cps/mg prot), em homogeneizados cardíacos, nos distintos grupos da via de administração Intraperitoneal. Os resultados estão expressos como média \pm EPM, de sete a oito animais por grupo.

Utilizam-se as notações de significância:

a - diferença significativa entre os grupos CASTRADO e CONTROLE ($p < 0,01$);

b - diferença significativa entre os grupos CASTRADO e CAST+HORM ($p < 0,001$);

ANOVA $p < 0,0003$; $F = 13,17$.

3.2.2.2 Atividade das Enzimas Antioxidantes

Quanto à atividade da enzima catalase (CAT), não foi observada diferença significativa entre os grupos (análise de variância de uma via $p < 0,12$; $F = 2,328$) (Tabela 3.3).

A atividade da enzima glutathione peroxidase (GPx) apresentou diferença significativa entre os grupos (análise de variância de uma via $p < 0,003$; $F = 7,63$), (Tabela 3.3). Foi observado que o grupo CASTRADO apresentou uma diminuição de

31% na atividade desta enzima, quando comparado ao grupo CONTROLE ($p<0,01$). Ao repormos o hormônio, foi observado um aumento de cerca de 28%, em relação ao grupo CASTRADO ($p<0,05$).

Ao ser avaliada a atividade da enzima superóxido dismutase pelo método da adrenalina, a análise de variância de uma via demonstrou diferença significativa entre os grupos ($p<0,05$; $F=3,599$). Foi observada diferença significativa entre os grupos CASTRADO e CAST+HORM ($p<0,05$) (Tabela 3.3), sendo que este último 42% maior.

A atividade da enzima superóxido dismutase avaliada pelo método do pirogalol, apresentou diferença significativa entre os grupos ($p<0,0058$; $F=7,386$), (Tabela 3.3). O grupo CAST+HORM apresentou um aumento de 107% da atividade da SOD em relação ao grupo CASTRADO ($p<0,01$).

Tabela 3.3: Atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD) em homogeneizados cardíacos de ratas na via intraperitoneal.

	CAT (pmoles/mg prot)	GPx (nmoles/min/ mg prot)	SOD ADRE (U SOD/mg prot)	SOD PIRO (U SOD/mg prot)
CONTROLE	30,9±2,5	93,7±5,9	3,42±0,3	5,8±0,5
CASTRADO	25,8±2,6	64,9±5,9 ^a	2,9±0,2	4,2±0,6
CAST+HORM	23,7±2,2	83,4±3,64 ^b	4,18±0,4 ^b	8,7±1,2 ^c

Os resultados estão expressos como média ± EPM de seis a dez animais por grupo.

Utilizam-se as notações de significância:

a - diferença significativa entre os grupos CASTRADO e CONTROLE ($p<0,01$);

b - diferença significativa entre os grupos CAST+HORM e CASTRADO ($p<0,05$);

c - diferença significativa entre os grupos CAST+HORM e CASTRADO ($p<0,01$).

3.2.3. Via de Administração Transdermal

Nesta via de administração, o hormônio 17β -estradiol ou placebo foi implantado subcutaneamente (0,25 mg/pellet; 21 dias de liberação) na região cervical do dorso do animal, sete dias após a cirurgia de castração ou de simulação da castração. A seguir, são apresentados os resultados de estresse oxidativo cardíaco, através das técnicas já descritas no capítulo 2, para os níveis de lipoperoxidação (LPO), através da medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e quimiluminescência (QL), e a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD), bem como, a capacidade antioxidante total (TRAP), os níveis de nitritos e nitratos e a avaliação da produção do ânion radical superóxido por meio da oxidação da lucigenina.

3.2.3.1 Medidas de Lipoperoxidação (LPO)

A análise de variância de uma via mostrou diferença significativa entre os grupos ($p < 0,0001$, $F = 15,506$), ao ser avaliada a lipoperoxidação pelo TBARS, foi observado que o grupo CASTRADO apresentou um aumento de 706% em relação ao grupo CONTROLE ($p < 0,001$), (Figura 3.7). Os níveis de TBARS no grupo CAST+HORM diminuíram significativamente em 73% em relação ao grupo CASTRADO ($p < 0,001$). Após a reposição hormonal, nos níveis de TBARS foram observadas diferenças significativas entre os grupos. ANOVA apresentou um $p = < 0,0001$; $F = 32,709$.

Quanto à avaliação da lipoperoxidação pelo método da quimiluminescência foi observado que o CASTRADO ($p < 0,001$) apresentou um aumento significativo em relação ao CONTROLE (Figura 3.8). E após a reposição hormonal, ao compararmos

com o grupo CASTRADO, houve uma diminuição significativa da lipoperoxidação ($p < 0,001$). A análise de variância de um via demonstrou valores de significância entre os grupos de $p < 0,0001$ e $F = 32,709$. Este resultado corrobora com as outras vias de administrações do hormônio realizadas.

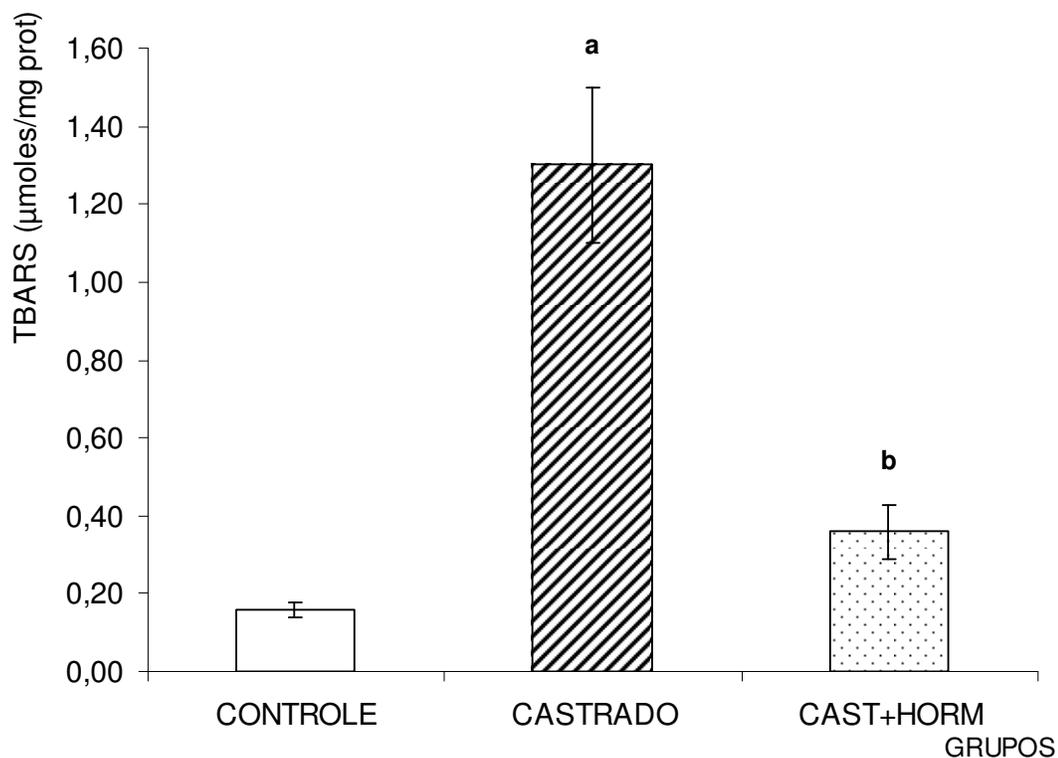


Figura 3.7: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS em $\mu\text{moles/mg prot}$) em homogeneizado cardíaco nos distintos grupos, na via transdermal. Os resultados estão expressos como média \pm EPM, de sete a oito animais por grupo.

Utilizam-se as notações de significância:

a - diferença significativa entre os grupos CASTRADO e CONTROLE ($p < 0,001$);
b - diferença significativa entre os grupos CAST+HORM e CASTRADO ($p < 0,001$).

ANOVA $p < 0,0001$; $F = 15,506$.

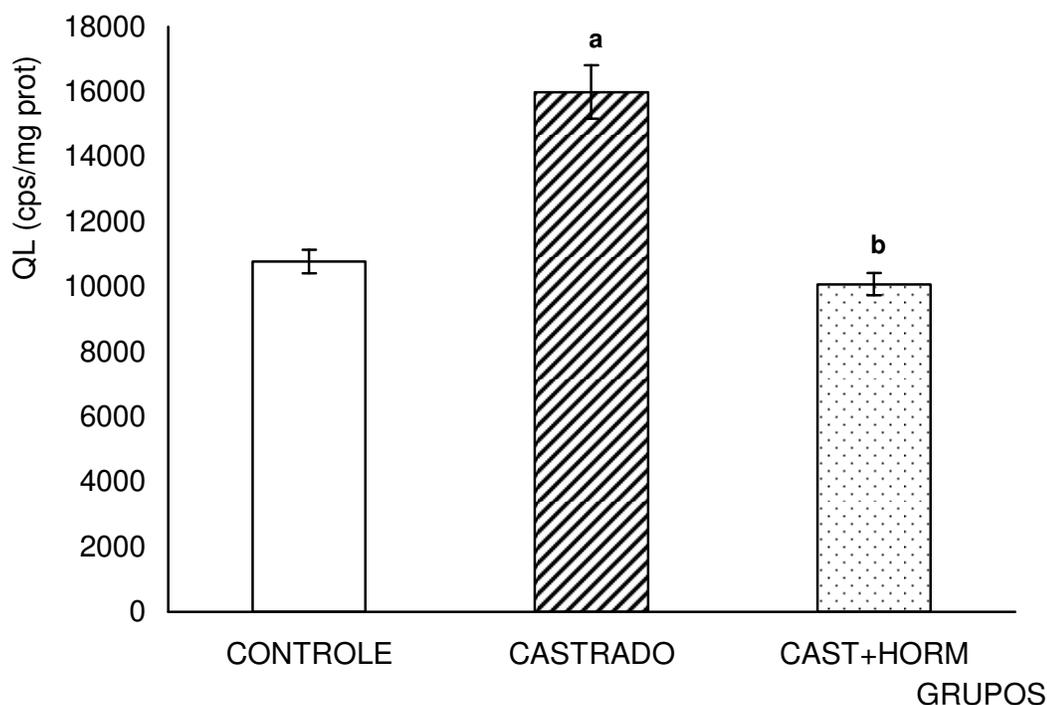


Figura. 3.8: Quimiluminescência (QL em cps/mg prot), em homogeneizado cardíaco nos distintos grupos, na via transdermal. Os resultados estão expressos como média \pm EPM, de seis a sete animais por grupo.

Utilizam-se as notações de significância:

a - diferença significativa entre os grupos CASTRADO e CONTROLE ($p < 0.001$);

b - diferença significativa entre os grupos CAST+HORM e CASTRADO ($p < 0.001$).

ANOVA $p = < 0,0001$; $F = 32,709$.

3.2.3.2 Medidas das enzimas antioxidantes

Ao ser avaliada a atividade da enzima catalase (CAT), a análise de variância de uma via demonstrou diferença significativa entre os grupos ($p < 0,0161$; $F = 4,735$). Foi observado que o grupo CASTRADO apresentou um aumento significativo de 34% em relação ao CONTROLE ($p < 0,05$), enquanto que a atividade da CAT no grupo CAST+HORM diminuiu em 28% em relação ao grupo CASTRADO ($p < 0,05$), (Tabela 3.4).

Quanto à atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx), a análise de variância de uma via demonstrou diferença significativa entre os grupos ($p < 0,0031$; $F = 9,32$), (Tabela 3.4). Foi observado que o grupo CASTRADO apresentou uma diminuição significativa de 34% em relação ao grupo CONTROLE ($p < 0,05$). Ao repormos o hormônio, foi observado um aumento de 71% da atividade desta enzima, em relação ao grupo CASTRADO ($p < 0,01$).

A atividade da enzima superóxido dismutase, avaliada pelo método do pirogalo, apresentou diferença significativa entre os grupos ($p < 0,0076$; $F = 7,04$), o grupo CASTRADO diminuiu 33% a atividade da SOD em relação ao CONTROLE ($p < 0,05$). O grupo CAST+HORM aumentou 78% a atividade desta enzima em relação ao grupo CASTRADO ($p < 0,01$). Não houve diferença entre os grupos CAST+HORM e CONTROLE (Tabela 3.4).

A análise de variância de uma via demonstrou uma variação significativa entre os grupos quanto à atividade da enzima glutathiona S-transferase ($p < 0,0014$; $F = 10,45$). Foi observado uma diminuição significativa de 41% do grupo CASTRADO em relação ao CONTROLE ($p < 0,05$), e um aumento significativo de 102% do grupo CAST+HORM, em relação ao CASTRADO ($p < 0,01$), (Tabela 3.4).

Tabela 3.4: Atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD) e glutathione S-transferase (GST) em homogeneizados cardíacos de ratas na via Transdermal (*pellet*).

	CAT (nmoles/mg prot)	GPX (nmoles/min/ mg prot)	SOD (U SOD/mg prot)	GST (μ mol/min/mg prot)
CONTROLE	0,38 \pm 0,03	69 \pm 8	17,06 \pm 1,58	702,8 \pm 75
CASTRADO	0,52 \pm 0,04 ^a	51 \pm 4 ^a	11,38 \pm 0,99 ^a	411 \pm 45 ^a
CAST+HORM	0,37 \pm 0,02 ^b	87 \pm 5 ^c	20,31 \pm 2,45 ^c	830 \pm 74 ^c

Os resultados estão expressos como média \pm EPM de 10 a 12 animais na catalase e nas demais enzimas variando de cinco a seis animais por grupos.

Utilizam-se as notações de significância:

- a** - diferença significativa entre os grupos CASTRADO e CONTROLE ($p < 0.05$);
b - diferença significativa entre os grupos CAST+HORM e CASTRADO ($p < 0.05$);
c - diferença significativa entre os grupos CAST+HORM e CASTRADO ($p < 0.01$);

3.2.3.3 Capacidade antioxidante não enzimática

Quanto à concentração da glutathione (GSH) total a análise de variância de uma via uma variação demonstrou uma diferença muito significativa entre os grupos ($p < 0,001$; $F = 11,505$). A atividade da GSH no grupo CASTRADO significativamente menor que o grupo CONTROLE ($p < 0,05$). No grupo CAST+HORM foi observado um aumento muito significativo de 109% em relação ao grupo CASTRADO ($p < 0,001$) (Tabela 3.5).

Tabela 3.5: Concentração da glutathiona reduzida (GSH) em homogeneizados cardíacos de ratas na via Transdermal.

GRUPOS	GSH –TOTAL (μ moles/mg prot)
CONTROLE	0,080 \pm 0,0071
CASTRADO	0,041 \pm 0,005 ^a
CAST+HORM	0,1003 \pm 0,01 ^b

Os resultados estão expressos como média \pm EPM de cinco a seis animais por grupos.

Utiliza-se a notação de significância:

a - diferença significativa entre os grupos CASTRADO e CONTROLE ($p < 0.05$).

b - diferença significativa entre os grupos CAST+HORM e CASTRADO ($p < 0.001$).

3.3 ESTRESSE OXIDATIVO SISTÊMICO NA VIA TRANSDERMAL

3.3.1 Medidas de Lipoperoxidação

Análise de variância de uma via demonstrou diferença significativa entre os grupos ($p < 0,005$; $F=10,289$), ao avaliarmos o estresse oxidativo sistêmico medido por quimiluminescência (QL). Observamos um aumento significativo de 112% do grupo CASTRADO em relação ao CONTROLE ($p < 0,001$). O grupo CAST+HORM diminui significativamente a QL em 39% em relação ao grupo CASTRADO ($p < 0,001$). Após a reposição hormonal, houve uma diminuição nos níveis de quimiluminescência, semelhante ao grupo CONTROLE (Figura 3.9).

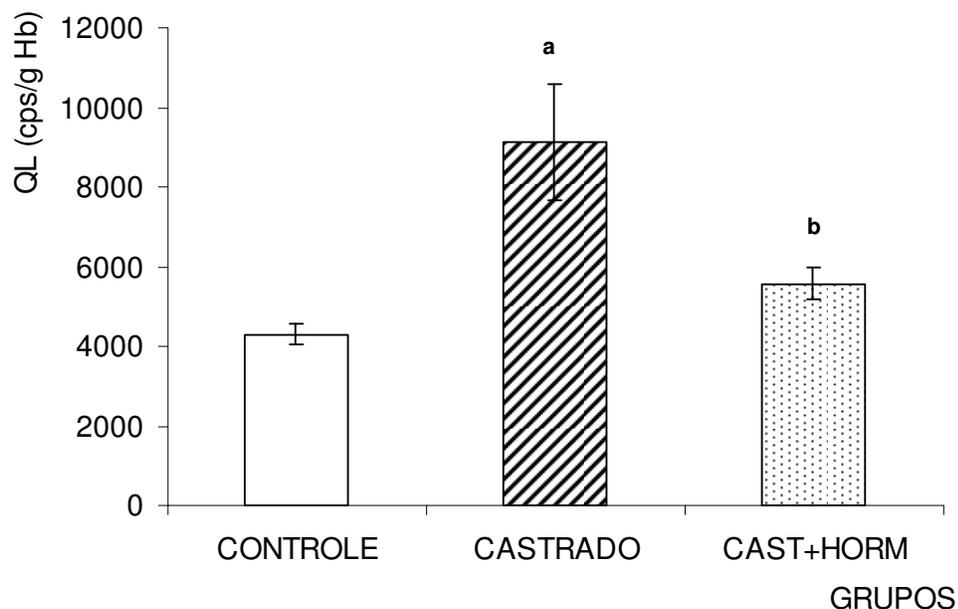


Figura 3.9.: Medida de quimiluminescência iniciada por t-BOOH em eritrócitos (cps/g Hb) nos diferentes grupos experimentais na via transdermal. Os resultados estão expressos como média \pm EPM, de nove a 11 animais por grupo.

Utilizam-se as notações de significância:

a - diferença significativa entre os grupos CASTRADO e CONTROLE ($p < 0.001$);

b - diferença significativa entre os grupos grupos CAST+HORM e CASTRADO ($p < 0.01$).

ANOVA de uma via $p < 0,005$: $F = 10,28$.

3.3.2 Enzimas antioxidantes

Ao avaliarmos a atividade da enzima catalase em eritrócitos, a análise de variância, demonstrou diferença significativa entre os grupos ($p < 0,0001$; $F = 20,7$). Quanto ao grupo CASTRADO foi observado um aumento de 58% da atividade da enzima deste grupo em relação ao CONTROLE ($p < 0,05$). O grupo CAST+HORM apresentou uma diminuição significativa 76% em relação ao grupo CONTROLE ($p < 0,01$) e, também, uma diminuição significativa de 85% em relação ao CASTRADO ($p < 0,0001$) (Tabela 3.6).

A análise de variância de uma via demonstrou diferença significativa entre os grupos ($p < 0,0001$; $F = 19,36$) ao avaliarmos a atividade da enzima glutathione peroxidase (GPx) sistêmica. A atividade no grupo CAST+HORM foi significativamente maior (106%) em relação ao CASTRADO ($p < 0,001$), e em relação ao grupo CONTROLE houve um aumento de 200% ($p < 0,001$) (Tabela 3.6). Os grupos CONTROLE e CASTRADO não apresentaram diferenças significativas.

Ao avaliarmos a atividade da enzima glutathione S-transferase (GST) não foi observada diferença significativa entre os grupos ($p < 0,157$; $F = 2,13$). De cinco a seis animais por grupo (Tabela 3.6).

Ao avaliarmos a enzima superóxido dismutase (SOD) pelo método do pirogalol, a análise de variância de uma via demonstrou diferença significativa entre os grupos ($p < 0,0001$; $F = 49,83$). O grupo CAST+HORM apresentou um aumento significativo de 110% em relação ao grupo CONTROLE ($p < 0,001$) e um aumento significativo de 294% em relação ao CASTRADO ($p < 0,001$) na atividade da SOD. O grupo CASTRADO diminuiu em 47% a atividade da enzima SOD em relação ao grupo CONTROLE ($p < 0,01$) (Tabela 3.6).

Tabela 3.6: Atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona S-transferase (GST) em nível sistêmico (eritrócitos) de ratas na via transdermal.

GRUPOS	CAT (nmoles/mg prot)	GPx (μ moles/min/mg prot)	GST (μ mol/min/mg prot)	SOD (U/mg prot)
CONTROLE	421 \pm 60	2,0 \pm 0,2	82 \pm 4	6,0 \pm 0,6
CASTRADO	546 \pm 75 ^f	3,0 \pm 0,5	79 \pm 5	3,2 \pm 0,5 ^c
CAST+HORM	89 \pm 28 ^{a b}	6,0 \pm 0,7 ^{d e}	67 \pm 6	12,6 \pm 0,8 ^{d e}

Os resultados estão expressos como média \pm EPM de nove a dez animais na catalase e nas demais enzimas variando de cinco a seis animais por grupo.

Utilizam-se as notações de significância:

- a** - diferença significativa entre os grupos CAST+HORM e CONTROLE ($p < 0.01$);
- b** - diferença significativa entre os grupos CAST+HORM e CASTRADO ($p < 0.001$);
- c** - diferença significativa entre os grupos CASTRADO e CONTROLE ($p < 0.01$);
- d** - diferença significativa entre os grupos CAST+HORM e CONTROLE ($p < 0.001$);
- e** - diferença significativa entre os grupos CAST+HORM e CASTRADO ($p < 0.001$);
- f** - diferença significativa entre os grupos CASTRADO e CONTROLE ($p < 0.05$).

3.3.3 Defesa antioxidante não enzimática

Ao avaliarmos a glutathiona reduzida (GSH), não foi observada diferença significativa entre os grupos ($p < 0,9662$; $F = 0,0345$). (Tabela 3.7).

Tabela 3.7: Atividade da glutathiona reduzida em nível sistêmico (eritrócitos) de ratas na via Transdermal.

	GSH (μ moles/mg prot)
CONTROLE	0,042 \pm 0,009
CASTRADO	0,044 \pm 0,008
CAST+HORM	0,040 \pm 0,013

3.4 Avaliação da produção do Ânion Radical Superóxido ($O_2^{\cdot-}$) pelo método da Lucigenina

O ciclo de redução univalente da lucigenina seguido de sua auto-oxidação, leva à geração do radical superóxido, quando exposta a doadores de elétrons (e^-), como o NAD(P)H. Assim esta técnica avalia a produção de $O_2^{\cdot-}$ vascular, através da enzima NAD(P)H oxidase. Quanto maior a emissão de luz (gerada pela lucigenina), maior será a produção de $O_2^{\cdot-}$.

Os fragmentos de aorta contendo apenas lucigenina (basal) não apresentaram diferenças entre os grupos (Figura 3.10).

A análise de variância de uma via mostrou uma variação significativa entre os grupos, sendo o $p < 0,047$ e $F = 3,98$, nos fragmentos de aorta incubados com NADH. Foi observado que o grupo CAST+HORM apresentou uma diminuição de 37% em relação ao grupo CASTRADO ($p < 0,05$) (Figura 3.10).

Nos fragmentos de aorta incubados com NADPH, a análise de variância de uma via mostrou uma variação significava entre os grupos, sendo o $p < 0,0087$ e $F = 6,78$. Foi observado que o grupo CASTRADO apresentou uma diminuição de 45% em relação ao CONTROLE ($p < 0,05$), e o grupo CAST+HORM apresentou um aumento de 88% em relação ao grupo CASTRADO ($p < 0,05$), (Figura 3.10).

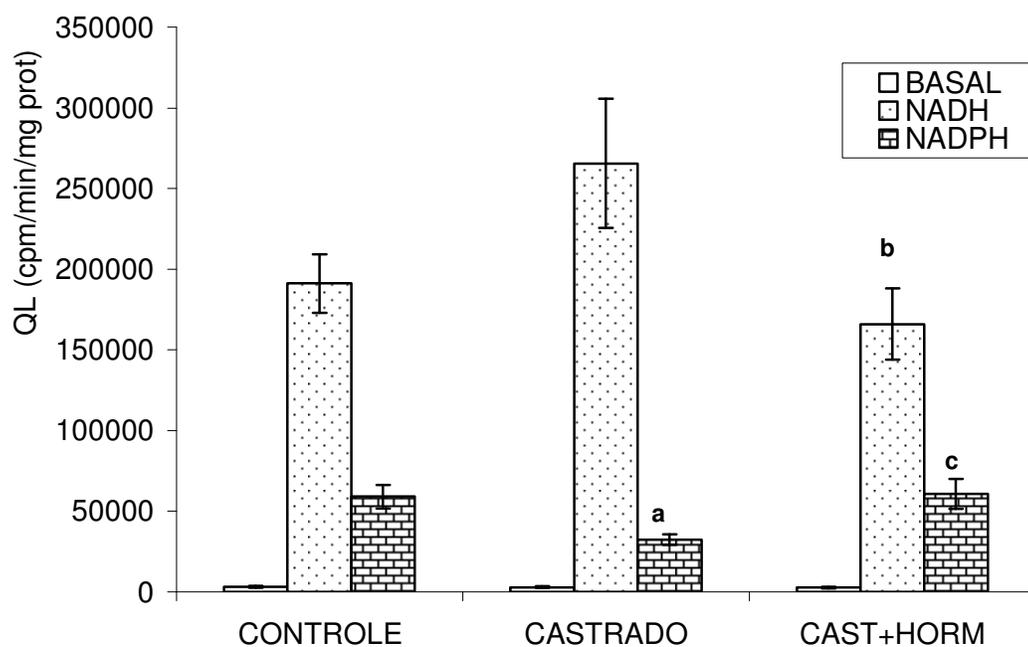


Figura 3.10: Quimiluminescência obtida em anéis de aorta incubados com NADH/NAD(P)H, em (cpm/min/mg prot) nos diferentes grupos experimentais. Os resultados estão expressos como média \pm EPM.

Utilizam-se as notações de significância:

- a** - diferença significativa entre os grupos CASTRADO e CONTROLE incubados com NADPH ($p < 0,05$);
- b** - diferença significativa entre os grupos CAST+HORM e CASTRADO incubados com NADH ($p < 0,05$);
- c** - diferença significativa entre os grupos CAST+HORM e CASTRADO incubados com NADPH ($p < 0,05$).

3.5 Avaliação da concentração dos metabólitos do óxido nítrico

3.5.1 Concentração de Nitrato em tecido cardíaco.

A concentração de nitrato apresentou uma variação significativa entre os diferentes grupos experimentais ($p < 0,0002$; $F = 16,174$). Na Figura 3.11, podemos observar um aumento significativo de 37% no nível de nitrato do grupo CASTRADO em relação ao CONTROLE ($p < 0,01$), e um aumento significativo de 61% do grupo CAST+HORM em relação ao CONTROLE ($p < 0,001$).

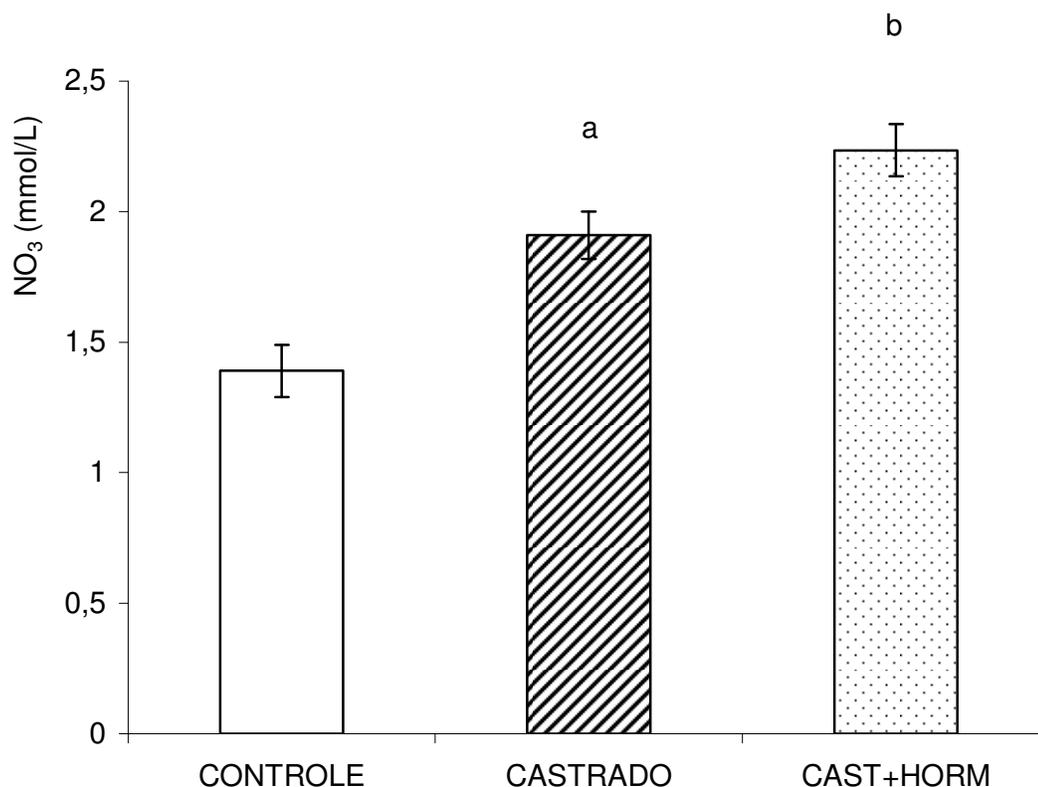


Figura 3.11: Concentração de Nitrato (NO₃) em tecido cardíaco nos diferentes grupos experimentais. Os resultados são expressos como média \pm EPM. Utilizam-se, por grupo, de cinco a oito animais.

Utilizam-se as notações de significância:

- a** - diferença significativa entre os grupo CASTRADO e CONTROLE ($p < 0,01$);
- b** - diferença significativa entre os grupo CAST+HORM e CONTROLE ($p < 0,001$).

3.5.2 Concentração de Nitrito em tecido Cardíaco:

A concentração de nitrito nos diferentes grupos experimentais não apresentou variação significativa entre os diferentes grupos ($p < 0,4165$; $F = 0,925$). (Figura 3.12).

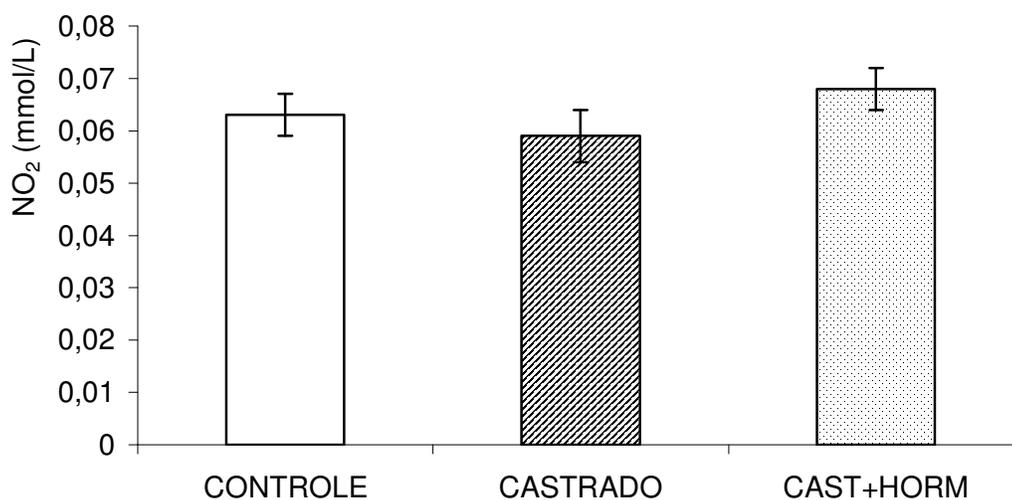


Figura 3.12: Concentração de Nitrito (NO₂) em tecido cardíaco nos diferentes grupos experimentais. Os resultados são expressos como média \pm EPM. Utilizam-se, por grupo, de seis a sete animais por grupo. Não houve variação significativa entre os grupos.

3.5.3 Concentração de Nitrato (NO₃) em Plasma

A análise de variância de uma via demonstrou diferença significativa entre os grupos ($p < 0,0007$; $F = 13,96$). O grupo CAST+HORM mostrou aumento significativo de 180% em relação ao CONTROLE ($p < 0,001$), e um aumento significativo de 75% em relação ao CASTRADO ($p < 0,05$) ao avaliarmos os níveis de nitrato plasmático (Figura 3.13).

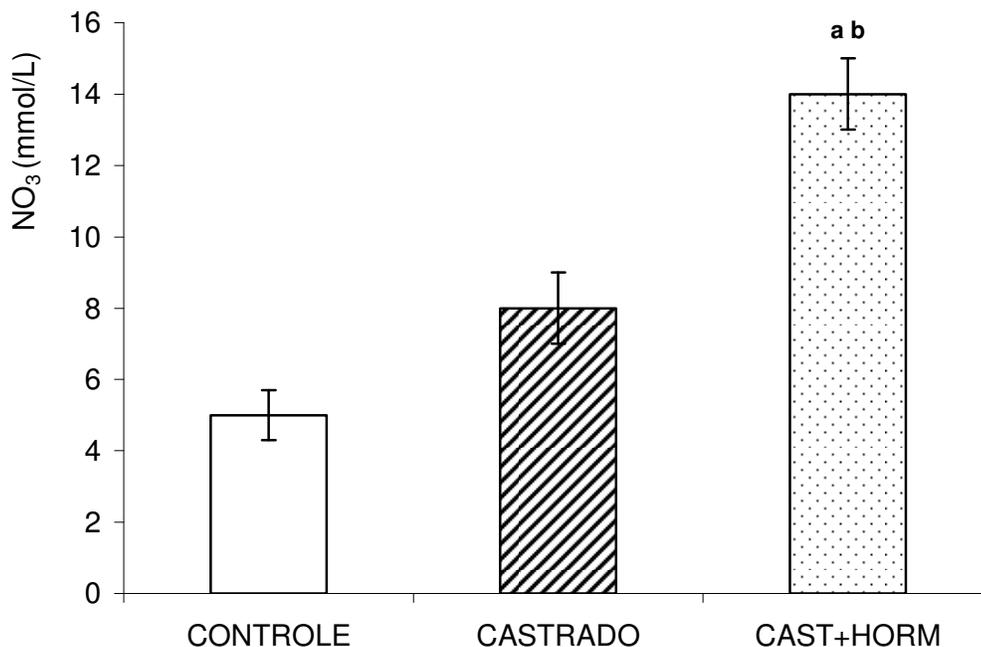


Figura 3.13: Concentração de Nitrato (NO₃) em plasma nos diferentes grupos experimentais na via transdermal. Os resultados estão expressos como média \pm EPM, cinco animais por grupo.

Utilizam-se as notações de significância:

a - diferença significativa entre os grupos CAST+HORM e CONTROLE ($p < 0.001$);

b - diferença significativa entre os grupos CAST+HORM e CASTRADO ($p < 0.05$).

ANOVA de uma via $p < 0,0007$; $F = 13,96$.

3.5.4 Concentração de Nitrito (NO₂) em Plasma

A análise de variância de uma via demonstrou diferença significativa entre os grupos ($p < 0,0004$; $F = 16,009$). O grupo CAST+HORM mostrou aumento significativo de 537% em relação ao CONTROLE ($p < 0,001$), e um aumento significativo de 155% em relação ao CASTRADO ($p < 0,01$). Não houve diferenças entre os grupos CONTROLE e CASTRADO (Figura 3.14).

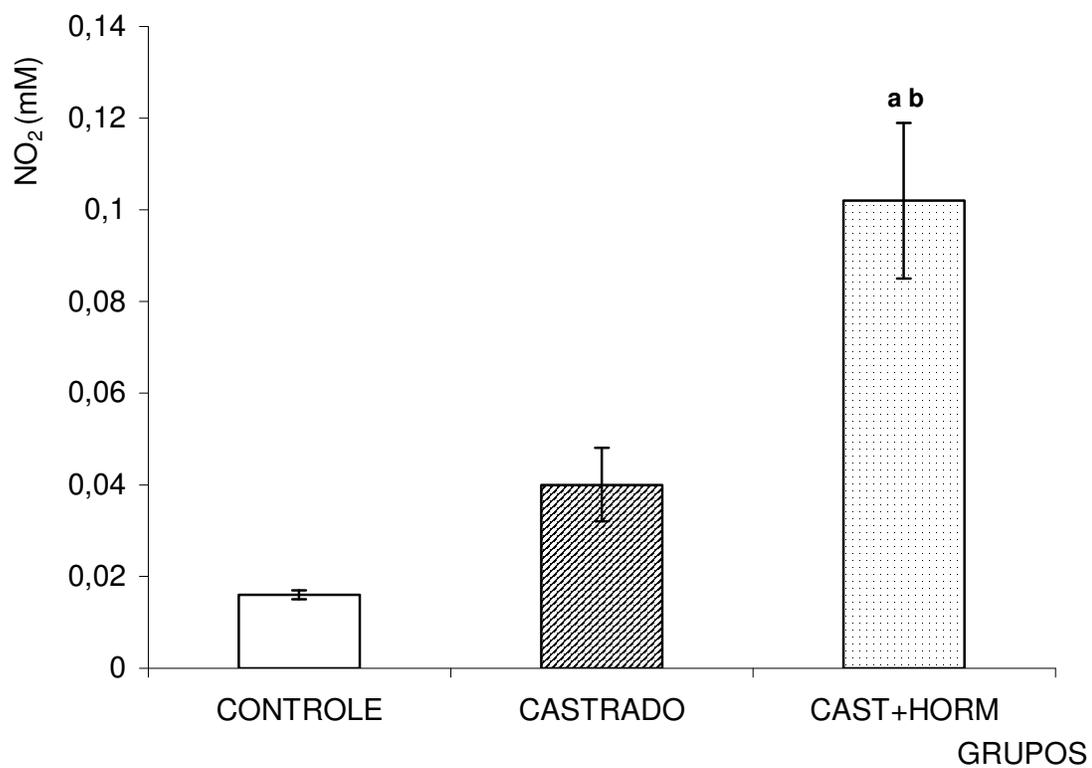


Figura 3.14: Concentração de Nitrito (NO₂) em plasma nos diferentes grupos experimentais na via transdermal. Os resultados estão expressos como média ± EPM, cinco animais por grupo.

Utilizam-se as notações de significância:

a - diferença significativa entre os grupos CAST+HORM e CONTROLE ($p < 0.001$);

b - diferença significativa entre os grupos CAST+HORM e CASTRADO ($p < 0.01$).

ANOVA de uma via $p < 0,0004$: $F = 16,009$.

3.6 PERFIL HEMODINÂMICO

3.6.1 Hemodinâmica do Grupo Intraperitoneal

3.6.1.1 Pressão Arterial Sistólica (PAS), Pressão Arterial Diastólica (PAD), e Pressão Arterial Média (PAM)

Análise de variância de uma via não demonstrou variação entre os grupos quanto à Pressão Arterial Diastólica (PAD) ($p < 0,06$; $F = 0,04$), a Pressão Arterial Sistólica (PAS) ($p < 0,477$; $F = 0,76$) e a Pressão Arterial Média (PAM) ($p < 0,185$; $F = 1,81$). Observa-se, através da Tabela 3.8, que não houve diferença nos resultados obtidos de PAD, PAS e PAM entre os grupos. Análise de variância de uma via não demonstrou variação significativa entre os grupos experimentais para a frequência cardíaca (FC) ($p < 0,68$; $F = 0,388$). Na Tabela 3.8, observou-se que não houve diferença entre os grupos CONTROLE, CASTRADO E CAST+HORM, quanto à FC.

Tabela 3.8: Pressão Arterial Diastólica (PAD), Pressão Arterial Sistólica (PAS), Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC) dos grupos CONTROLE, CASTRADO e CAST+HORM. Foram utilizados de sete a dez animais por grupo.

GRUPOS	PAS (mmHg)	PAD (mmHg)	PAM (mmHg)	FC (bpm)
CONTROLE	132 ± 4	100 ± 3	118 ± 3	359 ± 9
CASTRADO	133 ± 3	96 ± 3	116 ± 3	376 ± 14
CAST+HORM	126 ± 5	88 ± 4	108 ± 4	372 ± 17

Os resultados foram expressos como a média ± EPM.

3.6.2 Hemodinâmica do Grupo Transdermal

3.6.2.1 Pressão Arterial Sistólica (PAS), Pressão Arterial Diastólica (PAD) e Pressão Arterial Média (PAM)

Análise de variância de uma via não demonstrou variação entre os grupos quanto à Pressão Arterial Diastólica (PAD) ($p < 0,60$; $F = 0,51$), a Pressão Arterial Sistólica (PAS) ($p < 0,41$; $F = 0,89$) e a Pressão Arterial Média (PAM) ($p < 0,48$; $F = 0,748$). Observou-se, através da Tabela 3.9, que não houve diferença nos resultados obtidos de PAD, PAS e PAM entre os grupos.

Análise de variância de uma via não demonstrou variação significativa entre os grupos experimentais para a frequência cardíaca (FC) ($p < 0,39$; $F = 0,95$). Na Tabela 3.9, observa-se que não houve diferenças entre os grupos CONTROLE, CASTRADO E CAST+HORM, quanto à FC.

Tabela 3.9: Pressão Arterial Diastólica (PAD), Pressão Arterial Sistólica (PAS), Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC) dos grupos experimentais. Foram utilizados de 10 a 11 animais por grupo.

GRUPOS	PAD (mmHg)	PAS (mmHg)	PAM (mmHg)	FC (bpm)
CONTROLE	88 ± 4	121 ± 5	105 ± 4	355 ± 12
CASTRADO	84 ± 3	117 ± 3	101 ± 3	332 ± 14
CAST+HORM	88 ± 3	125 ± 4	108 ± 3	345 ± 8

Os resultados foram expressos como a média ± EPM.

3.7 PERFUSÃO DO CORAÇÃO NA VIA TRANSDERMAL:

A seguir, são apresentados os resultados da perfusão do coração, onde foram avaliadas inicialmente as curvas de função cardíaca e, após, os corações foram submetidos à isquemia seguida da reperfusão, conforme descrito no capítulo 2.

3.7.1 Curva de Função Ventricular - Starling

Os parâmetros mecânicos cardíacos registrados foram: Frequência Cardíaca (FC), pressão alcançada no final da sístole pelo ventrículo esquerdo (PVSist), pressão alcançada no final da diástole ou Pressão Ventricular Desenvolvida (PVD), Velocidade de Contração do Ventrículo ($+dP/dt$), velocidade de relaxamento do ventrículo ($-dP/dt$) e Pressão de Perfusão média (PP) do ventrículo esquerdo.

Os resultados representam valores dos parâmetros no início do período experimental (aos 30 min de perfusão – utilizados para estabilização da atividade cardíaca), após iniciamos as variações da pressão ventricular diastólica (PVDiast). Variações na PVDiast foram de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 mm de Hg. A cada variação da PVDiast, considerava-se um tempo para a estabilização do coração e iniciava-se, então, o registro naquela pressão.

3.7.1.1 Frequência Cardíaca (FC)

A análise de variância de uma via não demonstrou variação significativa entre os grupos experimentais nas diferentes PVDiast para a frequência cardíaca. Foi observada redução da FC no grupo CAST+HORM ao compararmos a PVDiast inicial zero (mmHg) e a PVDiast final 40 (mmHg). Não foram observadas diferenças dentro dos outros dois grupos (Figura 3.15).

Através da Análise de Variância, utilizando o delineamento em medidas repetidas, ao nível de significância de 5%, verifica-se não haver interação significativa entre Tempo e Grupo, quanto aos efeitos principais de Tempo e Grupo, ambos também não foram significativos (Tabela 3.10).

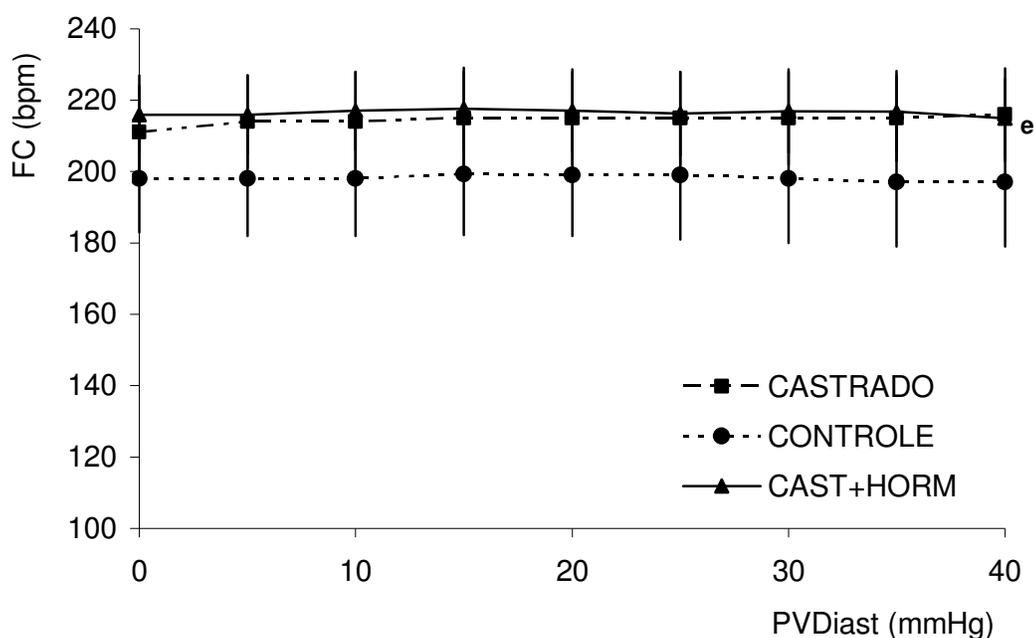


Figura 3.15: Frequência Cardíaca (FC) em bpm de corações de ratos submetidos a variações de PVDiast nos diferentes grupos experimentais na via transdermal. Curva de Starling. Os resultados estão expressos como média \pm EPM, de n=7 no grupo CONTROLE, n=6 no grupo CASTRADO, n= 8 no grupo CAST+HORM.

Utilizam-se as notações de significância:

e - diferença significativa no grupo CAST+HORM, entre as PVDiast 0 a 40.

Tabela 3.10: Freqüência Cardíaca usando a análise de variância de medidas repetidas. Curva de Starling.

PVDiast	Grupo						Total	
	Controle		Castrado		Cast+Horm			
	Média	Erro-padrão	Média	Erro-padrão	Média	Erro-padrão	Média	Erro-padrão
0	197	14	211	12	215	10	208	7
5	198	15	213	12	215	10	209	7
10	198	16	213	12	216	11	209	7
15	199	16	214	12	217	11	210	7
20	198	16	215	12	217	11	210	7
25	199	17	215	12	216	11	210	7
30	197	17	215	12	217	11	210	8
35	197	17	214	12	216	11	209	8
40	196	18	216	12	214	11	209	8
Total	198	5	214	3	216	3	209	2

3.7.1.2 Pressão Ventricular Sistólica (PVSist)

A análise de variância de uma via demonstrou diferença significativa nas seguintes PVDiast 10mmHg ($p < 0,025$; $F = 4,38$) e 40mmHg ($p < 0,0395$; $F = 3,78$), sendo observado um aumento significativo no grupo CAST+HORM em relação ao grupo CASTRADO. Também houve variações importantes dentro de cada grupo nas seguintes PVDiast: em distintos intervalos de tempo conforme mostra a legenda da figura 3.16. Assim, é possível observar que o grupo CAST+HORM apresenta maior PVSist do que o grupo CASTRADO ao final do período de avaliação (Figura 3.16).

Através da Análise de Variância, utilizando o delineamento em medidas repetidas, ao nível de significância de 5%, verifica-se não haver interação significativa entre PVDiast e Grupo, quanto aos efeitos principais somente Tempo foi significativo (Tabela 3.11).

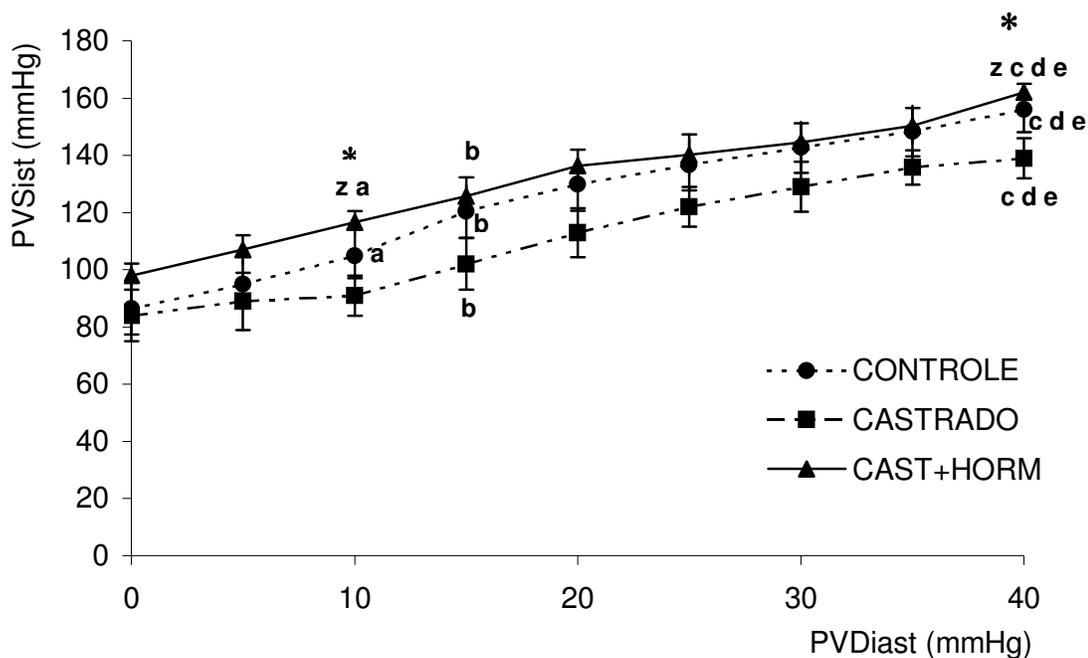


Figura 3.16: Pressão Ventricular Sistólica (PVSist) em mmHg de corações de ratas submetidos a variações de PADIast nos diferentes grupos experimentais na via transdermal. Curva de Starling. Os resultados estão expressos como média \pm EPM, tendo o grupo CONTROLE $n=7$, CASTRADO $n=6$, CAST+HORM $n=8$ animais por grupo.

Utilizam-se as notações de significância:

* - diferença significativa entre os grupos, ANOVA (PVDiast de 10mmHg $p<0,025$; PVDiast 40mmHg de $p<0,0395$).

z - diferença significativa entre os grupos CAST+HORM e CASTRADO $p<0,05$;

a - diferença significativa dentro do grupo, na PVDiast 0 a 10;

b - diferença significativa dentro do grupo, na PVDiast 0 a 15;

c - diferença significativa dentro do grupo, na PVDiast 15 a 40;

d - diferença significativa dentro do grupo, na PVDiast 0 e a de 40;

e - diferença significativa dentro do grupo, na PVDiast 0 a 40.

Tabela 3.11: Pressão Ventricular Sistólica (PVSist) usando análise de variância de medidas repetidas. Curva de Starling.

PVDiast	Grupo						Total	
	Controle		Castrado		Cast+Horm			
	Média	Erro-padrão	Média	Erro-padrão	Média	Erro-padrão	Média	Erro-padrão
0	86,63	9,07	84,14	9,43	98,44	4,15	90,33 ^h	4,37
5	95,25	7,93	88,57	9,58	108,22	4,86	98,17 ^{gh}	4,40
10	105,13	7,93	90,71	6,69	116,78	3,73	105,29 ^{fg}	4,06
15	120,75	9,21	102,00	8,61	126,00	6,71	117,25 ^e	4,95
20	130,00	9,16	113,14	8,67	136,33	5,63	127,46 ^d	4,73
25	136,75	8,87	122,43	7,39	140,33	7,29	133,92 ^{cd}	4,64
30	142,88	8,89	129,14	8,73	144,67	6,65	139,54 ^{bc}	4,64
35	148,50	8,86	135,86	6,24	150,44	6,24	145,54 ^{ab}	4,21
40	156,38	7,77	138,86	6,59	161,78	3,44	153,29 ^a	3,86
Total	124,69	3,86	111,65	3,57	131,44	2,81	123,42	2,03

Médias seguidas de letras disitintas diferem significativamente, através da Análise de Variância, utilizando o delineamento em medidas repetidas, complementada pelo teste de Comparações Múltiplas de Tukey, ao nível de significância de 5%.

3.7.1.3 Pressão Ventricular Desenvolvida (PVD)

A análise de variância de uma via não demonstrou variação significativa entre os grupos experimentais nas diferentes PVDiast para a Pressão Ventricular Desenvolvida (PVD). Na figura 3.17, foram observadas variações significativas dentro de cada grupo nas diferentes PVDiast. No grupo CAST+HORM e CONTROLE, da PVDiast de 15mmHg para a de 40mmHg, não foi observada diferença significativa, indicando assim que a Pressão Ventricular Desenvolvida foi estabilizada a 15mmHg neste grupo, e no grupo CASTRADO ela continua se alterando até a PVDiast de 40mmHg (Figura 3.17).

Através da Análise de Variância, utilizando o delineamento em medidas repetidas, ao nível de significância de 5%, verifica-se não haver interação

significativa entre Tempo e Grupo, quanto aos efeitos principais somente Tempo foi significativo (Tabela 3.12).

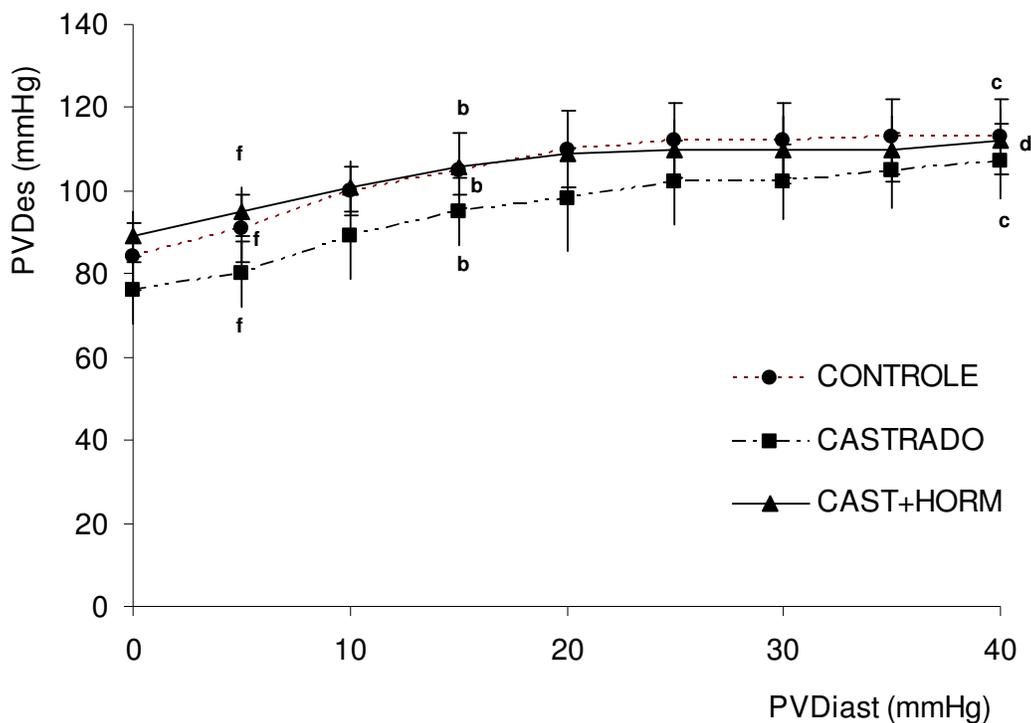


Figura 3.17: Pressão Ventricular Desenvolvida (PVD) de corações de ratas submetidos a variações de PVDiast nos diferentes grupos experimentais na via transdermal. Curva de Starling. Os resultados estão expressos como média \pm EPM, tendo o grupo CONTROLE n= 7, CASTRADO n= 6, CAST+HORM n= 8 animais por grupo.

Utilizam-se as notações de significância:

- b - diferença significativa dentro do grupo, entre a PVDiast 0 e a de 15;
- c - diferença significativa dentro do grupo, entre a PVDiast 15 e a de 40;
- d - diferença significativa dentro do grupo, entre a PVDiast 0 e a de 40;
- f - diferença significativa dentro do grupo, entre a PVDiast 0 e a de 5.

Tabela 3.12: Pressão Ventricular Desenvolvida usando análise de variância de medidas repetidas. Curva de Starling.

PVDiast	Grupo						Total	
	Controle		Castrado		Cast+Horm			
	Média	Erro-padrão	Média	Erro-padrão	Média	Erro-padrão	Média	Erro-padrão
0	84,38	8,19	75,71	7,99	88,89	6,26	83,54 ^d	4,25
5	90,88	8,12	80,43	7,77	95,44	5,83	89,54 ^d	4,17
10	100,38	6,43	88,71	10,04	100,89	5,73	97,17 ^c	4,17
15	105,75	9,21	95,00	7,71	106,33	7,10	102,83 ^{bc}	4,56
20	110,25	9,10	97,86	11,96	109,11	8,19	106,21 ^{ab}	5,41
25	112,00	8,95	102,14	10,22	110,11	7,53	108,42 ^{ab}	4,92
30	112,88	8,89	102,14	8,44	110,44	8,07	108,83 ^{ab}	4,77
35	113,50	8,86	106,00	9,07	111,00	7,97	110,38 ^a	4,79
40	113,75	9,03	107,71	9,36	113,00	7,90	111,71 ^a	4,83
Total	104,86	2,95	95,08	3,18	105,02	2,45	102,07	1,66

Médias seguidas de letras distintas diferem significativamente, através da Análise de Variância, utilizando o delineamento em medidas repetidas, complementada pelo teste de Comparações Múltiplas de Tukey, ao nível de significância de 5%.

3.7.1.4 Velocidade de Contração Ventricular Esquerda (+dP/dt)

Na figura 3.18, a análise de variância de uma via não demonstrou variação na contratilidade entre os grupos experimentais. Ao avaliarmos a média dentro de cada grupo em diferentes PVDiast, constatamos que o grupo CASTRADO sofre variações graduais ao longo das diferentes PVDiast a que foi submetido, enquanto os outros grupos, a partir da PVDiast de 15mmHg, não apresentam mais variações na velocidade de contração.

Na análise de variância, não houve variação significativa entre os grupos, mas entre as pressões diastólicas no grupo observamos diferenças significativas utilizando o delineamento em medidas repetidas, complementada pelo teste de Comparações Múltiplas de Tukey, ao nível de significância de 5% (Tabela 3.13).

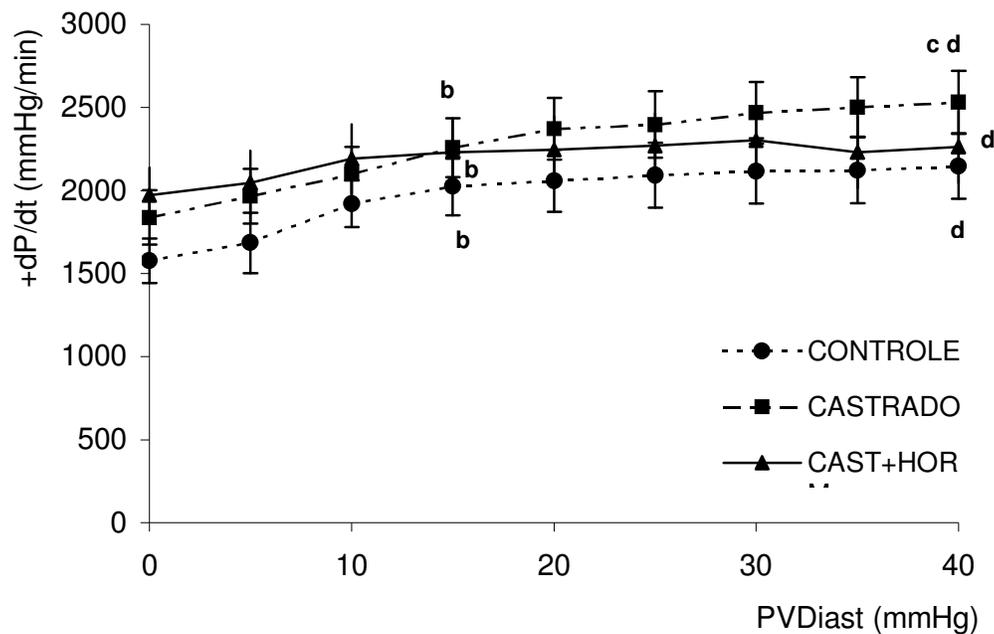


Figura 3.18: Velocidade de Contração (+dP/dt) em mmHg/min, de corações de ratas submetidos a variações de PVDiast nos diferentes grupos experimentais na via transdermal. Curva de Starling. Os resultados estão expressos como média \pm EPM, sendo o grupo CONTROLE n= 7, CASTRADO n= 6, CAST+HORM n= 8 animais por grupo.

Utilizam-se as notações de significância:

- b** - diferença significativa no grupo, entre a PVDiast 0 e a de 15;
- c** - diferença significativa no grupo, entre a PVDiast 15 e a de 40;
- d** - diferença significativa no grupo, entre a PVDiast 0 e a de 40.

Tabela 3.13: Velocidade de Contração do ventrículo esquerdo (+dP/dt) análise de variância utilizando o delineamento de medidas repetidas. Curva de Starling.

PVDiast	Grupo						Total	
	Controle		Castrado		Cast+Horm		Média	Erro-padrão
	Média	Erro-padrão	Média	Erro-padrão	Média	Erro-padrão		
0	1577,00 ^{Ac}	133,75	1838,50 ^{Ad}	162,95	1970,78 ^{Ab}	165,51	1799,30	93,67
5	1685,13 ^{Abc}	181,94	1965,67 ^{Acd}	164,89	2047,33 ^{Aab}	191,51	1900,04	107,99
10	1921,50 ^{Aab}	140,35	2099,00 ^{Abcd}	166,20	2190,78 ^{Aab}	206,78	2073,17	102,56
15	2025,50 ^{Aa}	174,38	2258,67 ^{Aabc}	177,49	2231,22 ^{Aab}	190,37	2166,83	104,30
20	2059,25 ^{Aa}	185,50	2371,67 ^{Aab}	185,76	2244,78 ^{Aa}	202,86	2213,35	111,36
25	2092,25 ^{Aa}	195,95	2397,00 ^{Aab}	199,14	2269,78 ^{Aa}	194,30	2241,22	112,36
30	2117,63 ^{Aa}	196,96	2468,33 ^{Aa}	187,04	2302,22 ^{Aa}	202,05	2281,35	114,12
35	2123,50 ^{Aa}	200,46	2501,17 ^{Aa}	180,75	2231,11 ^{Aab}	216,29	2264,13	118,49
40	2147,13 ^{Aa}	195,81	2531,17 ^{Aa}	188,78	2262,78 ^{Aa}	218,61	2292,57	119,09
Total	1972,10	61,02	2270,13	63,89	2194,53	64,09	2136,88	37,67

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na linha diferem significativamente e médias seguidas de letras minúsculas distintas na coluna diferem significativamente, através da Análise de Variância, utilizando o delineamento em medidas repetidas, complementada pelo teste de Comparações Múltiplas de Tukey, ao nível de significância de 5%.

3.7.1.5 Velocidade de Relaxamento Ventricular Esquerdo (-dP/dt)

Na figura 3.19, a análise de variância de uma via não demonstrou variações significativas entre os grupos na velocidade de relaxamento ventricular esquerdo em cada PVDiast analisada. Ao avaliarmos a média dentro de cada grupo em diferentes PVDiast, constatamos que o grupo CASTRADO sofre redução gradual ao longo das diferentes PVDiast a que foi submetido, enquanto o grupo CONTROLE apresenta variações de 0mmHg a 15mmHg e de 15mmHg a 40mmHg; e o grupo CAST+HORM apresenta variação na velocidade de relaxamento de 0mmHg a 15mmHg; mas, ao avaliarmos de 0mmHg a 40mmHg, constatamos que ele volta aos padrões de relaxamento iniciais.

Análise de variância de medidas repetidas não demonstrou diferença significativa entre os grupos, mas podemos observar que dentro de cada grupo, houve diferenças importantes. O grupo CASTRADO demonstrou maiores variações

dentro dele mesmo, enquanto que o grupo CAST+HORM, não apresentou variações importantes, ou seja as variações nas pressões diastólicas não provocaram alterações importantes na velocidade de relaxamento ventricular (Tabela 3.14).

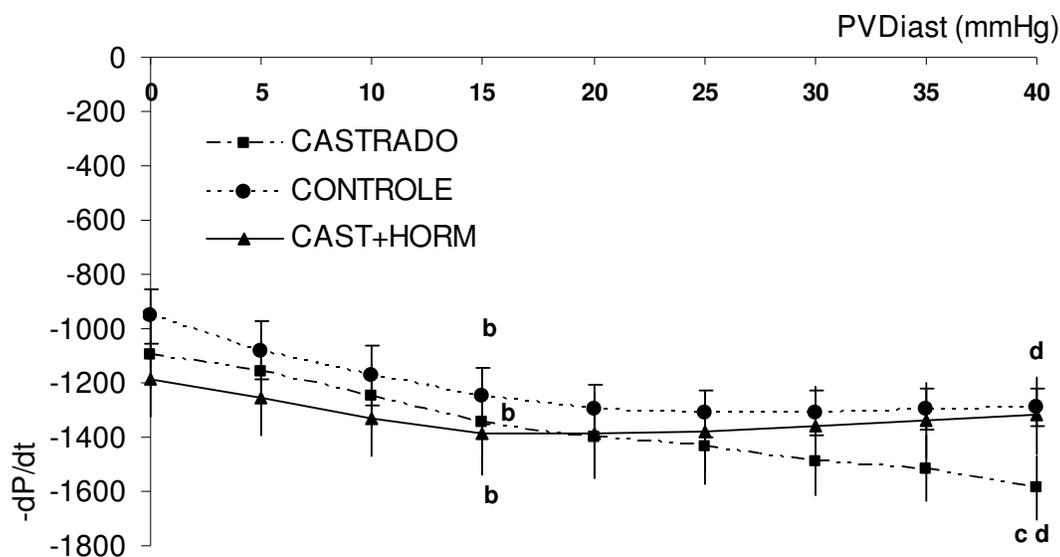


Figura 3.19: Velocidade de Relaxamento ($-dP/dt$) em mmHg/min de corações de ratos submetidos a variações de PVDiast nos diferentes grupos experimentais na via transdermal. Curva de Starling. Os resultados estão expressos como média \pm EPM, sendo o grupo CONTROLE $n=7$, CASTRADO $n=6$, CAST+HORM $n=8$ animais por grupo.

Utilizam-se as notações de significância:

- b** - diferença significativa no grupo, entre a PVDiast 0 e a de 15;
- c** - diferença significativa no grupo, entre a PVDiast 15 e a de 40;
- d** - diferença significativa no grupo, entre a PVDiast 0 e a de 40.

Tabela 3.14: Velocidade de Relaxamento (-dP/dt), análise de variância utilizando o delineamento de medidas repetidas. Curva de Starling.

PVDiast	Grupo						Total	
	Controle		Castrado		Cast+Horm		Média	Erro-padrão
	Média	Erro-padrão	Média	Erro-padrão	Média	Erro-padrão		
0	-980,88 ^{Ac}	88,95	-1096,44 ^{Ac}	122,75	-1186,43 ^{Aa}	138,15	-1091,46	69,56
5	-1081,02 ^{Abc}	106,17	-1162,81 ^{Ac}	120,61	-1255,50 ^{Aa}	136,58	-1170,63	70,85
10	-1172,38 ^{Aabc}	110,20	-1249,28 ^{Abc}	117,88	-1334,11 ^{Aa}	137,39	-1255,72	71,23
15	-1249,27 ^{Aab}	101,15	-1343,92 ^{Aabc}	133,05	-1386,98 ^{Aa}	150,28	-1327,85	74,55
20	-1293,58 ^{Aab}	89,25	-1401,75 ^{Aabc}	145,91	-1388,24 ^{Aa}	154,18	-1358,84	75,04
25	-1313,67 ^{Aa}	85,68	-1437,53 ^{Aab}	137,19	-1378,87 ^{Aa}	145,59	-1371,49	71,06
30	-1309,70 ^{Aa}	81,05	-1493,83 ^{Aab}	118,52	-1360,74 ^{Aa}	145,71	-1377,71	69,42
35	-1296,76 ^{Aab}	75,60	-1513,69 ^{Aa}	121,60	-1336,35 ^{Aa}	138,58	-1368,84	67,76
40	-1289,38 ^{Aab}	70,96	-1540,86 ^{Aa}	115,53	-1318,72 ^{Aa}	139,92	-1366,47	68,04
Total	-1220,74	31,45	-1360,01	43,93	-1327,33	45,79	-1298,78	24,15

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na linha diferem significativamente e médias seguidas de letras minúsculas distintas na coluna diferem significativamente, através da Análise de Variância, utilizando o delineamento em medidas repetidas, complementada pelo teste de Comparações Múltiplas de Tukey, ao nível de significância de 5%.

3.7.1.6 Pressão de Perfusão (PP)

A análise de variância de uma via demonstrou variações significativas na PP nas seguintes PVDiast 15mmHg ($p < 0,045$; $F = 3,58$), 20mmHg ($p < 0,043$; $F = 3,66$), 25mmHg ($p < 0,042$; $F = 3,67$), 30mmHg ($p < 0,0279$; $F = 4,265$), 35mmHg ($p < 0,0352$; $F = 3,94$) e 40mmHg ($p < 0,039$; $F = 3,802$) entre os grupos. Foi observada variação significativa entre os grupos CAST+HORM em relação ao grupo CASTRADO e CASTRADO em relação ao CONTROLE nas seguintes PVDiast de 30mmHg ($p < 0,05$) e 35mmHg ($p < 0,05$), sendo que o grupo CASTRADO apresenta os menores valores de PP. O grupo CASTRADO não apresenta variações nas diferentes PVDiast. O grupo CONTROLE apresenta variação quando comparadas as PVDiast 0mmHg e a 40mmHg demonstrando uma melhora na perfusão e o grupo CAST+HORM apresenta uma variação entre as PVDiast 0mmHg e 15mmHg e entre

a 0mmHg e a 40mmHg, demonstrando assim um aumento da PP ao longo das variações da PVDiast (Figura 3.20).

Análise de Variância, utilizando o delineamento em medidas repetidas, não demonstrou variações entre os grupos. Podemos observar que dentro dos grupos CONTROLE e CASTRADO não houve diferenças entre as diferentes pressões diastólicas, mas o grupo CAST+HORM apresentou variações significativas dentro do grupo, ou seja aumentou a PP com o aumento da pressão diastólica (Tabela 3.15).

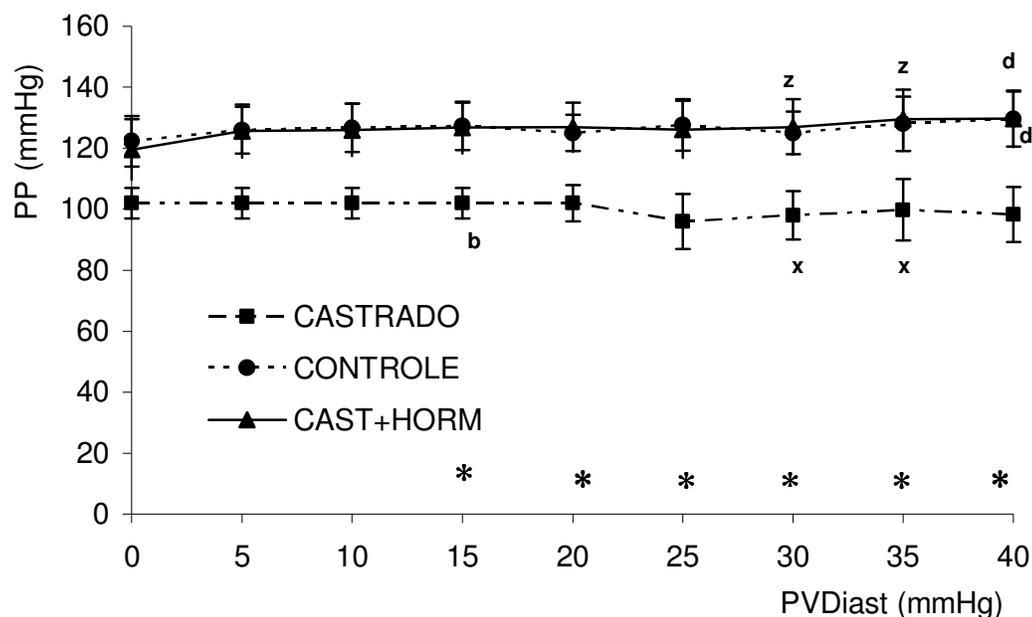


Figura 3.20: Pressão de Perfusão (PP) em mmHg de corações de ratos submetidos a variações de PVDiast nos diferentes grupos experimentais na via transdermal. Curva de Starling. Os resultados estão expressos como média \pm EPM, sendo o grupo CONTROLE n= 7, CASTRADO n= 6, CAST+HORM n= 8 animais por grupo.

Utilizam-se as notações de significância:

* - diferença significativa entre os grupos, ANOVA (PVDiast de 15mmHg ($p < 0,045$; $F = 3,58$), 20mmHg ($p < 0,043$; $F = 3,66$), 25mmHg ($p < 0,042$; $F = 3,67$), 30mmHg ($p < 0,0279$; $F = 4,265$), 35mmHg ($p < 0,0352$; $F = 3,94$) e 40mmHg ($p < 0,039$; $F = 3,802$)) 15mmHg ($p < 0,045$; $F = 3,58$), 20mmHg ($p < 0,043$; $F = 3,66$), 25mmHg ($p < 0,042$; $F = 3,67$), 30mmHg ($p < 0,0279$; $F = 4,265$), 35mmHg ($p < 0,0352$; $F = 3,94$) e 40mmHg ($p < 0,039$; $F = 3,802$));

z - diferença significativa entre os grupos CAST+HORM e CASTRADO $p < 0,05$;

x - diferença significativa entre os grupos CASTRADO e CONTROLE $p < 0,05$;

b - diferença significativa no grupo, na PVDiast 0 a 15;

d - diferença significativa no grupo, na PVDiast 0 a 40.

Tabela 3.15: Pressão de Perfusão (PP), análise de variância utilizando o delineamento de medidas repetidas. Curva de Starling.

PVDiast	Grupo						Total	
	Controle		Castrado		Cast+Horm			
	Média	Erro-padrão	Média	Erro-padrão	Média	Erro-padrão	Média	Erro-padrão
0	122,38 ^{Aa}	8,29	101,71 ^{Aa}	5,17	119,56 ^{Ab}	9,91	115,29	5,02
5	126,00 ^{Aa}	7,55	102,29 ^{Aa}	5,34	125,56 ^{Aab}	8,63	118,92	4,76
10	126,75 ^{Aa}	7,92	101,71 ^{Aa}	5,15	126,11 ^{Aab}	8,62	119,21	4,85
15	127,50 ^{Aa}	7,68	101,57 ^{Aa}	4,87	126,89 ^{Aab}	8,51	119,71	4,81
20	125,00 ^{Aa}	6,13	102,43 ^{Aa}	5,51	127,00 ^{Aab}	8,04	119,17	4,43
25	127,75 ^{Aa}	8,40	96,14 ^{Aa}	8,56	126,22 ^{Aab}	9,45	117,96	5,74
30	126,75 ^{Aa}	6,44	98,86 ^{Aa}	7,29	128,22 ^{Aa}	8,74	119,17	5,06
35	125,63 ^{Aa}	6,68	98,43 ^{Aa}	8,18	127,56 ^{Aab}	8,54	118,42	5,13
40	129,38 ^{Aa}	8,94	98,29 ^{Aa}	8,31	129,78 ^{Aa}	9,16	120,46	5,75
Total	126,35	2,40	100,16	2,09	126,32	2,82	118,70	1,66

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na linha diferem significativamente e médias seguidas de letras minúsculas distintas na coluna diferem significativamente, através da Análise de Variância, utilizando o delineamento em medidas repetidas, complementada pelo teste de Comparações Múltiplas de Tukey, ao nível de significância de 5%.

3.7.2 Isquemia e Reperfusão.

Os parâmetros mecânicos cardíacos registrados foram: Frequência Cardíaca (FC); pressão no final da sístole do ventrículo esquerdo (PVSist); Pressão Ventricular Diastólica esquerda (PVDiast), velocidade de contração do ventrículo esquerdo (+dP/dt); velocidade de relaxamento do ventrículo esquerdo (-dP/dt) e Pressão de Perfusão média (PP) do ventrículo esquerdo.

Os resultados representam valores dos protocolos de Isquemia e Reperfusão descritos no capítulo 2. Após realizada a curva de Starling, houve um período de 10 minutos para o coração estabilizar as suas funções, e só então, a bomba perfusora foi desligada para o período de isquemia, que teve uma duração de 30 minutos, após, os corações foram reperfundidos por um período de 20 minutos.

3.7.2.1 Frequência Cardíaca (FC – bpm)

A frequência cardíaca, nos tempos de 35 ($p < 0,044$; $F = 3,87$), 40 ($p < 0,035$; $F = 4,029$) e 45 ($p < 0,0023$; $F = 9,403$) minutos de reperfusão foi significativamente diferente entre os grupos experimentais. Foi observado um aumento significativo na frequência cardíaca no tempo 35 ($p < 0,05$) e no tempo 40 ($p < 0,05$) entre o grupo CAST+HORM e o grupo CONTROLE. No tempo 45, os grupos CAST+HORM ($p < 0,001$) e CASTRADO ($p < 0,001$) apresentaram um aumento muito significativo da frequência cardíaca em relação ao grupo CONTROLE. Houve variação significativa dentro de cada grupo logo após a reperfusão, e houve variação significativa do grupo CASTRADO entre o tempo 30 a 35 que continuou variando até o tempo 50. Os outros grupos já recuperaram a sua frequência no tempo 35, sendo que no tempo 50 os valores não foram diferentes deste tempo (Figura 3.21).

Na análise de variância utilizando o delineamento de medidas repetidas, observamos que no tempo 35 há diferenças significativas entre os grupos CAST+HORM e CASTRADO e CONTROLE, nos demais tempos não há diferença. Dentro do mesmo grupo, observamos diferença no grupo CASTRADO nos tempos 35 e 40 em relação aos demais tempos (Tabela 3.16).

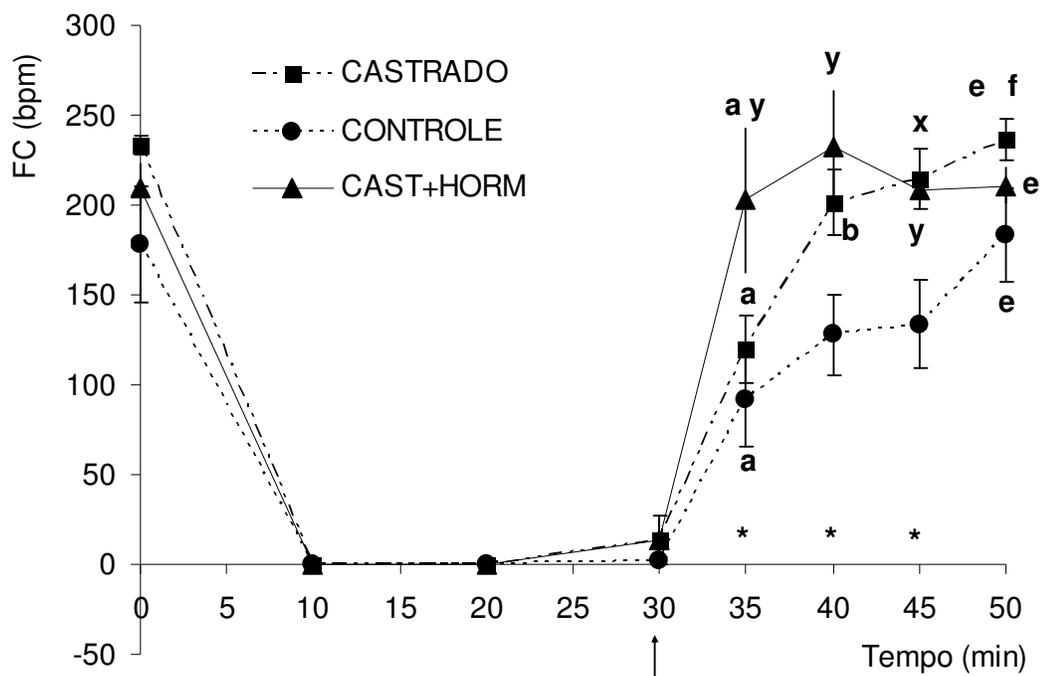


Figura 3.21: Frequência cardíaca (FC) em batimento por minuto (bpm) de corações de ratas submetidos à Isquemia e Reperusão nos diferentes grupos experimentais na via transdermal. Os resultados estão expressos como média \pm EPM, tendo o grupo CONTROLE n= 5, CASTRADO n= 6, CAST+HORM n= 7 animais por grupo.

Utilizam-se as notações de significância:

A seta indica o final da isquemia e início da reperusão.

* - diferença significativa entre os grupos experimentais, ANOVA nos tempos 35 ($p < 0,044$; $F = 3,87$), 40 ($p < 0,035$; $F = 4,029$) e 45 ($p < 0,0023$; $F = 9,403$);

y - diferença significativa entre os grupos CAST+HORM e CONTROLE ($p < 0,05$);

x - diferença significativa entre os grupos CASTRADO e CONTROLE ($p < 0,001$);

a - diferença significativa no grupo, no tempo 30 e 35;

b - diferença significativa no grupo, no tempo 35 e 40;

e - diferença significativa no grupo, no tempo 30 e 50;

f - diferença significativa no grupo, no tempo 35 e 50.

Tabela 3.16: Freqüência cardíaca (FC), utilizando o delineamento em medidas repetidas, na isquemia-reperfusão.

Tempo	Grupo						Total	
	Controle		Castrado		Cast+Horm		Média	Erro-padrão
	Média	Erro-padrão	Média	Erro-padrão	Média	Erro-padrão		
0	177,80 ^{Aa}	32,40	233,00 ^{Aa}	5,34	209,86 ^{Aa}	13,00	208,67	11,04
35	92,40 ^{Ba}	20,74	120,00 ^{ABb}	18,71	203,14 ^{Aa}	39,72	144,67	20,34
40	128,20 ^{Aa}	16,69	201,50 ^{Aab}	17,90	232,14 ^{Aa}	31,66	193,06	17,10
45	133,60 ^{Aa}	24,26	231,33 ^{Aa}	15,76	208,71 ^{Aa}	8,71	195,39	12,84
50	184,60 ^{Aa}	24,99	236,33 ^{Aa}	11,18	210,71 ^{Aa}	9,83	212,00	9,50
Total	143,32	12,14	204,43	10,19	212,91	10,30	190,76	6,92

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na linha diferem significativamente e médias seguidas de letras minúsculas distintas na coluna diferem significativamente, através da Análise de Variância, utilizando o delineamento em medidas repetidas, complementada pelo teste de Comparações Múltiplas de Tukey, ao nível de significância de 5%.

3.7.2.2 Pressão Ventricular Sistólica (PVSist)

Análise de variância de uma via demonstrou diferença significativa no período de reperfusão nos tempos 35min ($p < 0,036$; $F = 4,148$), 40min ($p < 0,0130$; $F = 5,768$), 45min ($p < 0,0476$, $F = 3,75$) e 50min ($p < 0,0326$; $F = 4,337$) na pressão Ventricular Sistólica do grupo CAST+HORM em relação aos grupos CONTROLE e CASTRADO.

No tempo 35min, o grupo CAST+HORM apresentou um aumento significativo da PVSist ($p < 0,05$) em relação ao grupo CONTROLE. No tempo 40min, é observado um aumento significativo do grupo CAST+HORM em relação aos grupos CASTRADO ($p < 0,05$) e CONTROLE ($p < 0,05$). No tempo 50min foi observado um aumento significativo do grupo CAST+HORM em relação ao CONTROLE ($p < 0,05$).

Foi observado, que ao longo do protocolo, o grupo com reposição hormonal apresentou maior Pressão sistólica que os demais grupos (figura 3.22).

Na análise de variância utilizando o delineamento de medidas repetidas, não houve diferença significativa entre os grupos experimentais (Tabela 3.17).

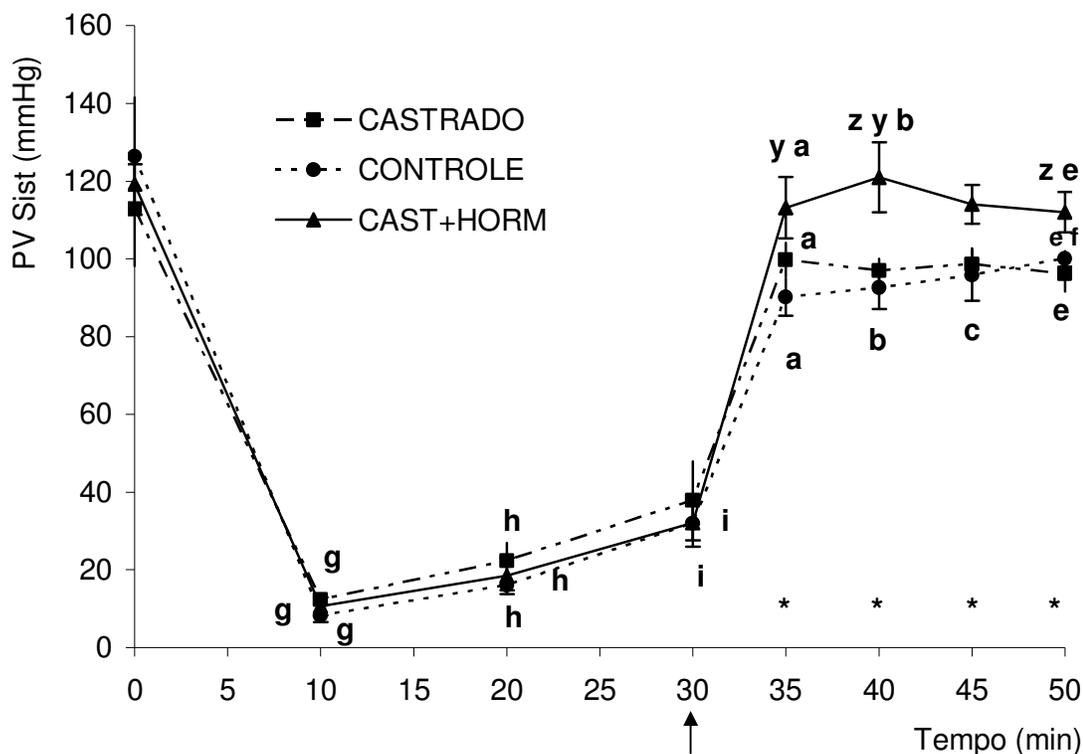


Figura 3.22: Pressão Ventricular Sistólica (PVSist) (em mmHg) de corações de ratos submetidos à Isquemia e Reperfusão nos diferentes grupos experimentais na via transdermal. Os resultados estão expressos como média \pm EPM, tendo o grupo CONTROLE n= 5, CASTRADO n= 6, CAST+HORM n= 7 animais por grupo.

Utilizam-se as notações de significância:

A seta indica o final da isquemia e início da reperfusão.

* - diferença significativa entre os grupos, ANOVA nos tempos 35, 40, 45 e 50 minutos;

y - diferença significativa entre os grupos CAST+HORM e CONTROLE ($p < 0,05$);

z - diferença significativa entre os grupos CAST+HORM e CASTRADO ($p < 0,001$);

a - diferença significativa no grupo, no tempo 30 e 35;

b - diferença significativa no grupo, no tempo 35 e 40;

c - diferença significativa no grupo, no tempo 40 e 45;

e - diferença significativa no grupo, no tempo 30 e 5;

g - diferença significativa no grupo, no tempo 0 e 10;

h - diferença significativa no grupo, no tempo 10 e 20;

i - diferença significativa no grupo, no tempo 20 e 30.

Tabela 3.17: Pressão Ventricular Sistólica (PVSist), utilizando o delineamento em medidas repetidas, na isquemia e reperfusão.

Tempo	Grupo						Total	
	Controle		Castrado		Cast+Horm		Média	Erro-padrão
	Média	Erro-padrão	Média	Erro-padrão	Média	Erro-padrão		
0	126,40 ^{Aa}	15,05	112,83 ^{Aa}	14,72	119,14 ^{Aa}	5,17	119,06	6,43
10	8,20 ^{Ac}	1,59	12,33 ^{Ab}	0,88	10,71 ^{Ab}	2,32	10,56	1,06
20	16,00 ^{Ac}	1,26	22,33 ^{Ab}	4,61	18,43 ^{Ab}	4,62	19,06	2,34
30	32,00 ^{Ac}	4,45	37,83 ^{Ab}	10,06	32,14 ^{Ab}	6,25	34,00	4,12
35	90,20 ^{Ab}	4,82	99,83 ^{Aa}	4,37	113,86 ^{Aa}	7,72	102,61	4,14
40	92,60 ^{Ab}	5,56	96,83 ^{Aa}	2,60	121,43 ^{Aa}	8,67	105,22	4,79
45	95,80 ^{Ab}	6,45	98,67 ^{Aa}	4,09	114,29 ^{Aa}	5,25	103,94	3,50
50	100,00 ^{Aab}	2,05	96,17 ^{Aa}	4,64	112,29 ^{Aa}	112,29	103,50	2,87
Total	70,15	6,99	72,10	6,01	80,29	6,60	74,74	3,78

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na linha diferem significativamente e médias seguidas de letras minúsculas distintas na coluna diferem significativamente, através da Análise de Variância, utilizando o delineamento em medidas repetidas, complementada pelo teste de Comparações Múltiplas de Tukey, ao nível de significância de 5%.

3.7.2.3 Pressão Ventricular Diastólica (PVDiast)

Na avaliação da PVDiast, utilizando a análise de variância de uma via, essa mostrou diferenças significativas ao longo de todo o período em que houve a reperfusão demonstrando claramente que os grupos CONTROLE e CAST+HORM apresentaram melhor capacidade para o relaxamento ventricular do que o grupo CASTRADO. Assim houve diferenças significativas nos tempos 30min ($p < 0,0182$; $F = 5,291$), 35min ($p < 0,006$; $F = 7,15$), 40min ($p < 0,002$; $F = 9,07$), 45min ($p < 0,0003$; $F = 14,262$) e 50min ($p < 0,0004$; $F = 14,129$) minutos no grupo CASTRADO em relação ao CONTROLE e CAST+HORM (Figura 3.23).

Análise de Variância, utilizando o delineamento em medidas repetidas, mostra que os grupos CAST+HORM e CONTROLE apresentam uma diminuição significativa da PVDiast a partir do tempo 35 em relação ao grupo CASTRADO, recuperando melhor a PVDiast nesses grupos. (Tabela 3.18).

Foi observado que as variações no grupo CASTRADO ocorreram entre os tempos 30min e 50min, 35min e 50min, 45min e 50min. Nos grupos CONTROLE e CAST+HORM foram observados que a partir do tempo 35min a PV Diast não varia mais quando comparado ao tempo 50 minutos (Tabela 3.18).

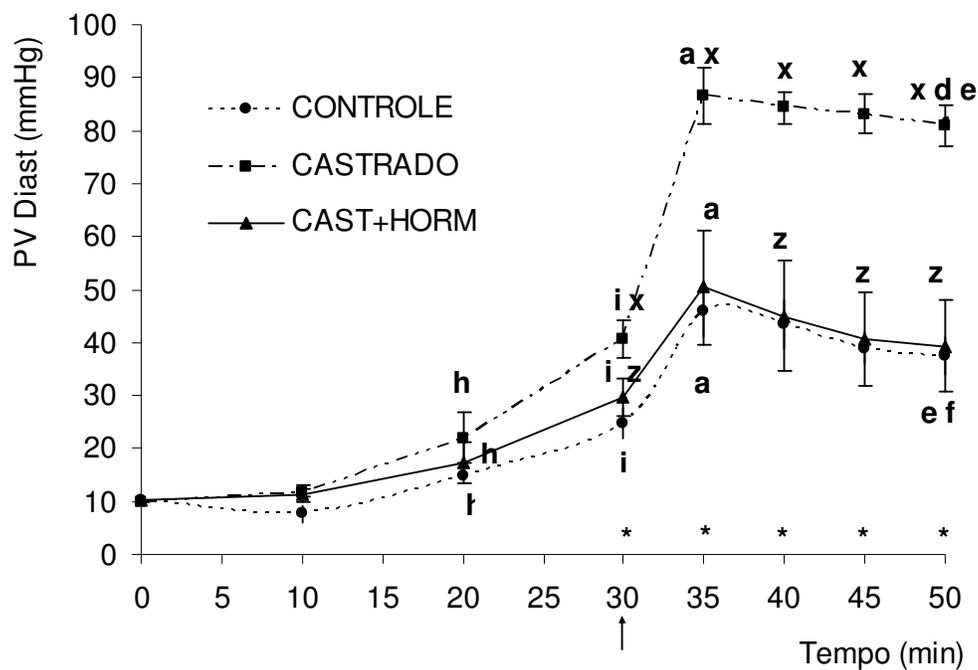


Figura 3.23: Pressão Ventrículo Diastólica (PV Diast) (em mmHg) de corações de ratas submetidos à isquemia e reperfusão nos diferentes grupos experimentais na via transdermal. Os resultados estão expressos como média \pm EPM, tendo o grupo CONTROLE n= 5, CASTRADO n= 6, CAST+HORM n= 7 animais por grupo.

Utilizam-se as notações de significância:

A seta indica o final da isquemia e início da reperfusão.

* - diferença significativa entre os grupos, ANOVA nos tempos 30 ($p < 0,0182$; $F = 5,291$), 35 ($p < 0,006$; $F = 7,15$), 40 ($p < 0,002$; $F = 9,07$), 45 ($p < 0,0003$; $F = 14,262$) e 50 ($p < 0,0004$; $F = 14,129$) minutos;

x - diferença significativa entre os grupos CONTROLE e CASTRADO nos tempos 30 ($p < 0,05$), 35 ($p < 0,05$), 40 ($p < 0,01$), 45 ($p < 0,001$) e 50 ($p < 0,01$);

z - diferença significativa entre os grupos CAST+HORM e CASTRADO nos tempos 30 ($p < 0,05$), 35 ($p < 0,01$), 40 ($p < 0,01$), 45 ($p < 0,001$) e 50 ($p < 0,001$);

a - diferença significativa no grupo, no tempo 30 e 35;

d - diferença significativa no grupo, no tempo 45 e 50;

e - diferença significativa no grupo, no tempo 30 e 5;

f - diferença significativa no grupo, no tempo 35 e 50;

h - diferença significativa no grupo, no tempo 10 e 20;

i - diferença significativa no grupo, no tempo 20 e 30.

Tabela 3.18: Pressão Ventricular Diastólica (PVDiast), utilizando o delineamento em medidas repetidas, na isquemia e reperfusão

Tempo	Grupo						Total	
	Controle		Castrado		Cast+Horm		Média	Erro-padrão
	Média	Erro-padrão	Média	Erro-padrão	Média	Erro-padrão		
0	10,20 ^{Ab}	0,20	10,00 ^{Ac}	0,00	10,14 ^{Ac}	0,14	10,11	0,08
10	7,60 ^{Ab}	1,50	11,67 ^{Ac}	0,84	11,43 ^{Ac}	1,48	10,44	0,84
20	15,00 ^{Ab}	0,89	22,00 ^{Abc}	4,74	17,29 ^{Ac}	3,87	18,22	2,19
30	24,80 ^{Aab}	2,89	40,50 ^{Ab}	3,50	29,57 ^{Abc}	3,47	31,89	2,41
35	45,80 ^{Ba}	4,71	86,67 ^{Aa}	5,33	50,43 ^{Ba}	10,78	61,22	6,28
40	43,60 ^{Ba}	4,60	84,33 ^{Aa}	3,07	45,00 ^{Bab}	10,43	57,72	6,17
45	39,00 ^{Bab}	3,03	83,17 ^{Aa}	3,71	40,57 ^{Bab}	8,92	54,33	6,11
50	37,60 ^{Bab}	3,53	81,00 ^{Aa}	3,86	39,29 ^{Bab}	8,63	52,72	6,00
Total	27,95	2,53	52,42	4,89	30,46	3,09	37,08	2,31

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na linha diferem significativamente e médias seguidas de letras minúsculas distintas na coluna diferem significativamente, através da Análise de Variância, utilizando o delineamento em medidas repetidas, complementada pelo teste de Comparações Múltiplas de Tukey, ao nível de significância de 5%.

3.7.2.4 Velocidade de Contração Ventrículo Esquerdo (+dP/dt)

Na figura 3.24, utilizando a análise de variância de uma via, esta não demonstrou variação na contratilidade entre os grupos experimentais. Ao avaliarmos as médias dentro de cada grupo, em diferentes tempos, foi constatado que o grupo CAST+HORM recupera melhor a contratilidade, pois apresenta aumento da +dP/dt entre os tempos 30min e 50min, 35min e 50min; enquanto o grupo CASTRADO apresentou variações entre os tempos 30min e 50min, já o grupo CONTROLE não demonstrou diferença no período da reperfusão.

Através da Análise de Variância, utilizando o delineamento em medidas repetidas, ao nível de significância de 5%, verifica-se não haver interação significativa entre Tempo e Grupo, quanto aos efeitos principais somente Tempo foi significativo (Tabela 3.19).

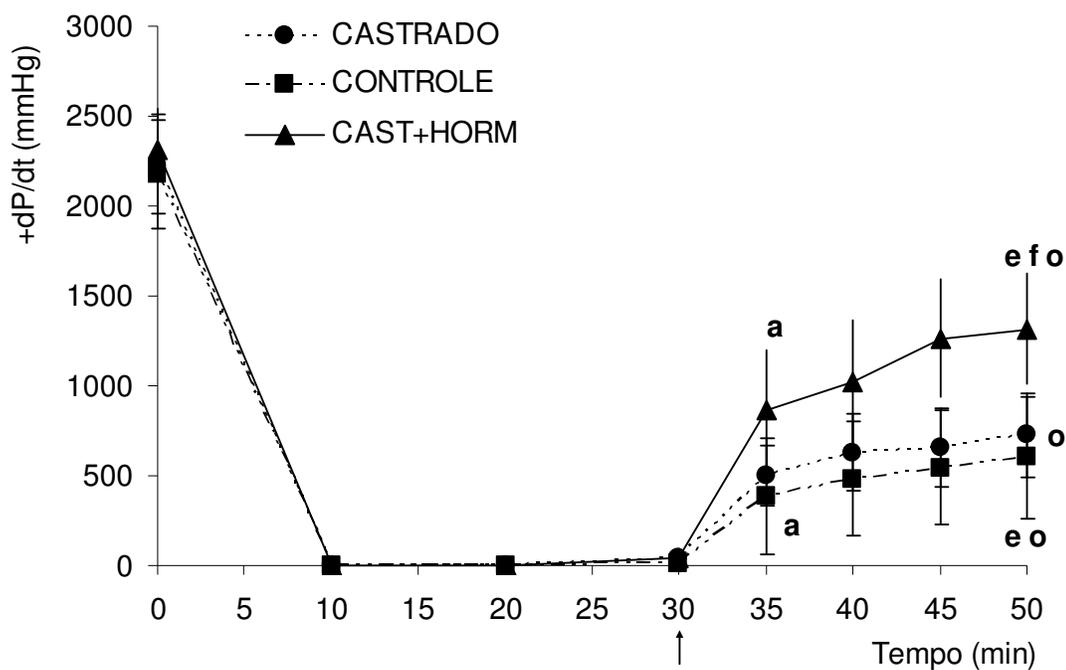


Figura 3.24: Velocidade de Contração do Ventrículo Esquerdo (+dP/dt) de corações de ratas submetidos à Isquemia e Reperusão nos diferentes grupos experimentais na via transdermal. Os resultados estão expressos como média \pm EPM, o grupo CONTROLE n= 5, CASTRADO n= 6, CAST+HORM n= 7 animais por grupo.

Utilizam-se as notações de significância:

A seta indica o final da isquemia e início da reperusão.
a - diferença significativa no grupo, no tempo 30 e 35;
e - diferença significativa no grupo, no tempo 30 e 50;
f - diferença significativa no grupo, no tempo 35 e 50;
o - diferença significativa no grupo, no tempo zero e 50.

Tabela 3.19: Velocidade de Contração do Ventrículo Esquerdo (+dP/dt), utilizando o delineamento em medidas repetidas, na isquemia e reperfusão.

Tempo	Grupo						Total	
	Controle		Castrado		Cast+Horm			
	Média	Erro-padrão	Média	Erro-padrão	Média	Erro-padrão	Média	Erro-padrão
0	2174,00	302,27	2233,00	272,87	2311,86	229,30	2247,28 ^a	143,79
35	385,60	324,39	503,67	166,53	868,14	332,77	612,61 ^b	165,42
40	482,60	315,10	629,83	215,26	1018,86	344,95	740,22 ^b	174,54
45	546,20	315,02	656,33	221,98	1265,00	324,24	862,44 ^b	178,66
50	582,40	346,33	691,83	244,84	1317,00	305,49	904,56 ^b	181,66
Total	834,16	189,88	942,93	152,88	1356,17	156,43	1073,42	97,30

Médias seguidas de letras distintas diferem significativamente, através da Análise de Variância, utilizando o delineamento em medidas repetidas, complementada pelo teste de Comparações Múltiplas de Tukey, ao nível de significância de 5%.

3.7.2.5 Velocidade de Relaxamento Ventricular Esquerdo (-dP/dt)

Quanto à velocidade de relaxamento, observada no gráfico 3.25, é possível verificar que o grupo CAST+HORM recuperou a função diastólica de maneira superior em relação aos demais grupos. Utilizando a análise de variância de uma via, esta demonstrou variação significativa do grupo CAST+HORM nos tempos 40 ($p < 0,0003$; $F = 14,244$), 45 ($p < 0,0001$; $F = 18,603$), 50 ($p < 0,0002$; $F = 15,775$) em relação aos grupos CASTRADO e CONTROLE.

O grupo CAST+HORM apresentou variação significativa em relação ao grupo CASTRADO e CONTROLE nos tempos 40 ($p < 0,001$), 45 ($p < 0,001$) e 50 ($p < 0,001$).

Ao analisarmos as variações ocorridas dentro de cada grupo, figura 3.23, foi constatado que entre os tempos 30 e 35 os três grupos experimentais, ao serem reperfundidos, apresentaram variações significativas. Entre os tempos 35min e 40min o grupo CASTRADO e CAST+HORM demonstraram variações significativas;

entre os tempos 40min e 45min apenas o grupo CAST+HORM apresentou aumento significativo; entre os tempos 45min e 50min os grupos CONTROLE e CASTRADO apresentaram diferenças significativas; entre os tempos 35min e 50min observamos que os grupos CASTRADO e CAST+HORM apresentaram diferenças significativas dentro do grupo. Constatamos que o grupo CAST+HORM recuperou em 71% o relaxamento do ventrículo esquerdo em relação aos demais grupos.

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na linha diferem significativamente e médias seguidas de letras minúsculas distintas na coluna diferem significativamente, através da Análise de Variância, utilizando o delineamento em medidas repetidas, complementada pelo teste de Comparações Múltiplas de Tukey, ao nível de significância de 5% (Tabela 3.20).

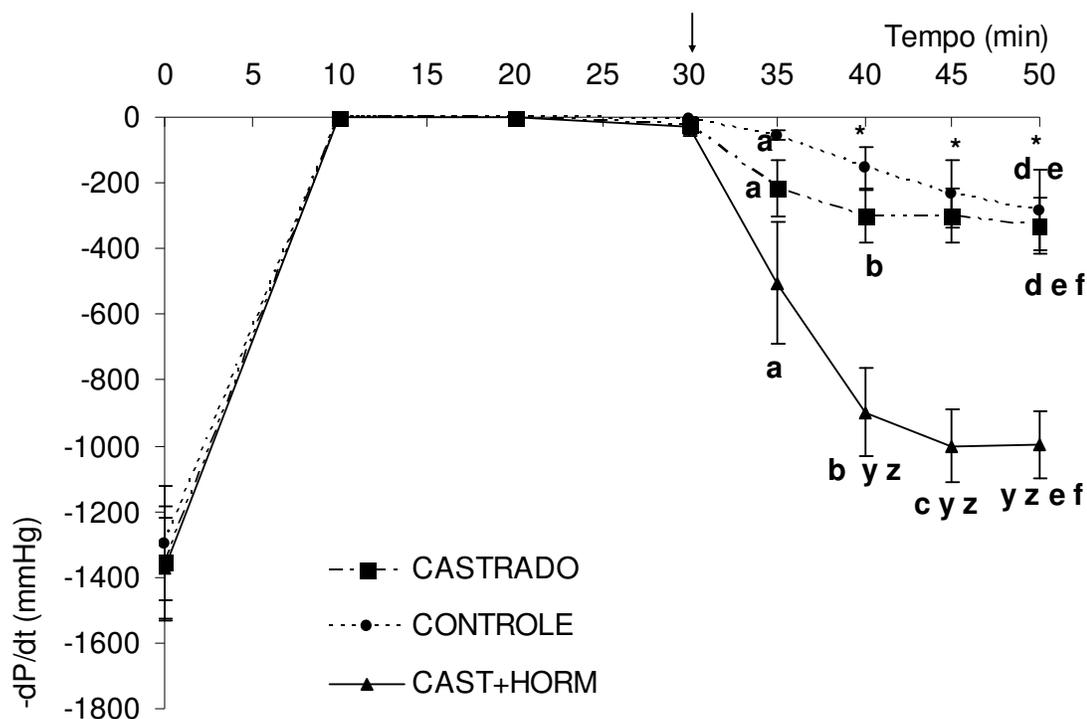


Figura 3.25: Velocidade de relaxamento do ventrículo esquerdo (-dP/dt) de corações de ratas submetidos à isquemia e reperfusão nos diferentes grupos experimentais na via transdermal. Os resultados estão expressos como média \pm EPM, tendo o grupo CONTROLE n= 5, o CASTRADO n= 6 e o CAST+HORM n= 7 animais por grupo.

Utilizam-se as notações de significância:

A seta indica o final da isquemia e início da reperfusão.

* - diferença significativa entre os grupos, ANOVA nos tempos 40 ($p < 0,0003$; $F = 14,244$), 45 ($p < 0,0001$; $F = 18,603$), 50 ($p < 0,0002$; $F = 15,775$);

y - diferença significativa entre os grupos CAST+HORM e CONTROLE nos tempos 40 ($p < 0,001$), 45 ($p < 0,001$) e 50 ($p < 0,001$);

z - diferença significativa entre os grupos CAST+HORM e CASTRADO nos tempos 40 ($p < 0,001$), 45 ($p < 0,001$) e 50 ($p < 0,001$);

a - diferença significativa no grupo, no tempo 30 e 35;

b - diferença significativa no grupo, no tempo 35 e 40;

c - diferença significativa no grupo, no tempo 40 e 45;

d - diferença significativa no grupo, no tempo 45 e 50;

e - diferença significativa no grupo, no tempo 30 e 50;

f - diferença significativa no grupo, no tempo 35 e 50.

Tabela 3.20: Velocidade de relaxamento do ventrículo esquerdo (-dP/dt), utilizando o delineamento em medidas repetidas, na isquemia e reperfusão.

Tempo	Grupo						Total	
	Controle		Castrado		Cast+Horm		Média	Erro-padrão
	Média	Erro-padrão	Média	Erro-padrão	Média	Erro-padrão		
0	1297,40 ^{Aa}	174,58	1368,00 ^{Aa}	175,65	1375,14 ^{Aa}	155,65	1351,17	91,69
35	54,80 ^{Ab}	14,00	216,50 ^{Ab}	85,29	504,14 ^{Ab}	184,83	283,44	86,44
40	155,80 ^{Bb}	62,70	301,33 ^{ABb}	81,66	899,14 ^{Aab}	133,16	493,39	98,47
45	233,80 ^{Bb}	101,21	301,33 ^{Bb}	82,73	999,86 ^{Aa}	110,40	554,22	102,41
50	283,20 ^{Bb}	121,32	330,17 ^{Bb}	87,21	997,57 ^{Aa}	102,95	576,67	99,06
Total	405,00	102,61	503,47	92,39	955,17	75,93	651,78	56,98

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na linha diferem significativamente e médias seguidas de letras minúsculas distintas na coluna diferem significativamente, através da Análise de Variância, utilizando o delineamento em medidas repetidas, complementada pelo teste de Comparações Múltiplas de Tukey, ao nível de significância de 5%.

3.7.2.5 Pressão de Perfusão (PP)

Análise de variância de uma via demonstrou variação significativa entre os grupos nos tempos 35 ($p < 0,0459$; $F = 3,81$), 40 ($p < 0,0362$; $F = 4,17$), 45 ($p < 0,048$; $F = 3,74$) e 50 ($p < 0,045$; $F = 3,82$). Foi observado que os grupos CONTROLE e CAST+HORM apresentam maior PP nas coronárias do que o grupo CASTRADO, sendo que este já parte de uma PP menor que os demais. No tempo 40min, foi observada diferença significativa entre os grupos CAST+HORM e CASTRADO ($p < 0,05$).

Com relação às variações dentro de cada grupo é observado que os grupos CONTROLE e CAST+HORM apresentam o mesmo perfil de variação, figura 3.26.

Através da Análise de Variância, utilizando o delineamento em medidas repetidas, ao nível de significância de 5%, verifica-se não haver interação significativa entre Tempo e Grupo, quanto aos efeitos principais somente Tempo foi significativo (Tabela 3.21).

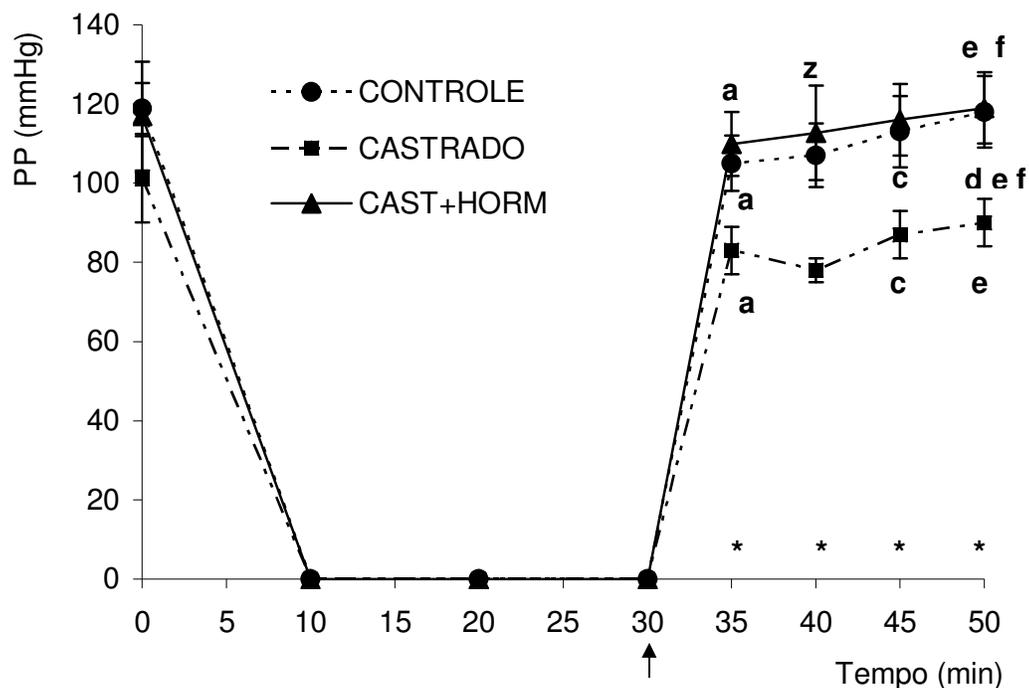


Figura 3.26: Pressão de Perfusão (PP) de corações de ratas submetidos à Isquemia e Reperusão nos diferentes grupos experimentais na via transdermal. Os resultados estão expressos como média \pm EPM, o grupo CONTROLE n= 5, CASTRADO n= 6, CAST+HORM n= 7 animais por grupo.

Utilizam-se as notações de significância:

A seta indica o final da isquemia e início da reperusão.

* - diferença significativa entre os grupos, ANOVA nos tempos 35 ($p < 0,0459$; $F = 3,81$), 40 ($p < 0,0362$; $F = 4,17$), 45 ($p < 0,048$; $F = 3,74$) e 50 ($p < 0,045$; $F = 3,82$);

z - diferença significativa entre os grupos CAST+HORM e CASTRADO no tempo 40 ($p < 0,05$);

a - diferença significativa no grupo, no tempo 30 e 35;

c - diferença significativa no grupo, no tempo 40 e 45;

d - diferença significativa no grupo, no tempo 45 e 50;

e - diferença significativa no grupo, no tempo 30 e 50;

f - diferença significativa no grupo, no tempo 35 e 50.

Tabela 3.21: Pressão de Perfusão (PP), utilizando o delineamento em medidas repetidas, na isquemia e reperfusão.

Tempo	Grupo						Total	
	Controle		Castrado		Cast+Horm			
	Média	Erro-padrão	Média	Erro-padrão	Média	Erro-padrão	Média	Erro-padrão
0	118,80	6,40	101,00	10,89	117,00	13,73	112,17 ^a	6,62
35	104,60	6,56	83,33	6,35	109,86	8,09	99,56 ^c	4,87
40	107,00	8,23	78,00	3,42	112,71	11,93	99,56 ^c	6,25
45	113,00	8,72	87,17	5,79	116,00	9,29	105,56 ^b	5,49
50	117,80	8,96	89,67	6,24	118,86	9,40	108,83 ^{ab}	5,66
Total	112,24	3,41	87,83	3,23	114,89	4,52	105,13	2,59

Médias seguidas de letras diferem significativamente, através da Análise de Variância, utilizando o delineamento em medidas repetidas, complementada pelo teste de Comparações Múltiplas de Tukey, ao nível de significância de 5%.

4. DISCUSSÃO

A discussão dos resultados será apresentada conforme a ordem de apresentação dos resultados.

4.1 Eficácia da Castração e Reposição Estrogênica

Sabe-se pela literatura que, após 7 dias de castração, os animais já simulam a “menopausa”, não é mais detectado o hormônio em nível plasmático (BARP, et al. 2002). Neste trabalho, foi confirmado este achado, onde foram realizadas medidas hormonais do 17β -estradiol, após uma semana de ovariectomia, e não foi detectado o hormônio pelo método de quimiluminescência. Assim, optamos por realizar a ovariectomia e, após sete dias, fazer a reposição estrogênica ou a introdução do placebo. Os grupos CASTRADO e CAST+HORM tiveram os ovários retirados cirurgicamente e o grupo CONTROLE passou pelo estresse da cirurgia, onde verificamos que a castração e a reposição hormonal foram eficazes, observando a tabela 3.1. Kim (1996), encontrou valores de concentração estrogênica superiores àqueles encontrados neste trabalho: nos animais controle os valores foram 20 ± 8 pg/mL, e nos animais com reposição em torno de 732 ± 42 pg/mL. Neste trabalho, os

valores encontrados para o controle foram de 39 ± 7 , o CASTRADO não foi detectado e o grupo CAST+HORM foi de 113 ± 12 pg/mL.

Outro parâmetro utilizado para comprovar a eficácia da castração e da reposição hormonal foi o peso do útero dos animais. É nítida a redução no peso dos úteros dos animais em que foi retirado o ovário, indicando claramente a eficácia da cirurgia de castração. Fica evidente também que, nas ratas com reposição estrogênica, o aumento do peso tanto úmido quanto seco é significativamente maior ao comparar-se com os grupos CONTROLE e CASTRADO (Figuras 3.1 e 3.2). O útero de mulheres na pós-menopausa diminui de tamanho e suas paredes se afinam, passando de um peso de 50-120g para 25-30g. O endométrio se torna fino, com glândulas pequenas e estroma fibrosado, mas mantém a capacidade de proliferar sob estímulo estrogênico, endógeno ou exógeno (UTIAN, et al. 1987). O estrogênio estimula a maior absorção de água e pode levar à proliferação celular isto provoca o aumento do tamanho do útero nos animais que têm níveis plasmáticos significativos do hormônio (UTIAN, 1987). No trabalho de Gorodeski, et al. (1995), considera-se que o peso do útero é um indicativo de que a reposição hormonal foi eficaz. Nas três vias de reposição realizadas (intramuscular, intravenosa e transdermal) foi encontrado que o peso dos úteros dos animais com reposição era até 3 vezes maior do que os animais castrados. O trabalho de Thompson et al. (2000), mostra um aumento do peso uterino em doses baixas de estradiol (0,1 mg) quando comparado com ratas ovariectomizadas e não houve aumento adicional em altas doses de estradiol. O aumento do peso do útero deve-se ao fato dele apresentar uma maior concentração de estradiol que o plasma, sugerindo uma grande diferença entre os níveis do plasma e do útero. Isto é atribuído a uma

concentração relativamente alta de receptores de estrogênio neste tecido (THOMPSON, et al. 2000).

Neste estudo, optamos por utilizar reposição hormonal apenas com estrogênio. Esta decisão levou em conta vários estudos que mostram efeitos mais significativos apenas com reposição estrogênica. No trabalho de Imthurn, et al. (1997), diferentes vias de administração de estradiol puro ou combinado com progesterona (medroxiprogesterona e acetato de ciproterona) foram utilizadas em pacientes com comprovada menopausa, e avaliou-se então os níveis de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$, de LDL e HDL bem como os de hormônios circulantes. Quando o estrogênio está sozinho, os níveis de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ são significativamente maiores do que quando comparados à associação entre estrogênio e medroxiprogesterona. Os dados sugerem que a administração concomitante de estrogênio e progesterona atenua o efeito benéfico da terapia estrogênica com menor liberação de óxido nítrico. Gerhart (1998) conduziu um estudo randomizado onde mulheres hipercolesterolêmicas receberam durante 14 semanas placebo e 14 semanas de estradiol transdermal puro, assim como estradiol com progesterona em creme vaginal por igual período de tempo. Foram realizadas medidas do efeito vasodilatador dependente do endotélio da artéria braquial por ultra-sonografia. Comparando os resultados, houve um aumento significativo na dilatação da artéria braquial dependente do endotélio no grupo estradiol ($p < 0,001$), e a adição da progesterona não teve um efeito vasodilatador significativamente diferente do efeito vasodilatador do estrogênio. Alguns estudos têm também mostrado que a progesterona pode neutralizar os benefícios do estrogênio, em particular, a habilidade do estrogênio em aumentar os níveis de HDL (Group for the PEPI Trial, 1995, apud GANZ, 2002). Diferentes estudos, utilizaram diferentes vias de administração e doses. Neste estudo, optamos

por testar se diferentes vias de administração alteravam a resposta do estrogênio no estresse oxidativo e nos outros parâmetros avaliados.

4.2 Estresse Oxidativo

4.2.1 LPO nas três vias de administração

As avaliações de estresse oxidativo foram efetuadas em tecido cardíaco e em eritrócito. Recentemente, o foco dos benefícios produzidos pelos estrogênios tem mudado do sistema vascular para o miocárdio (BABIKER, et al. 2002). Isto porque foram identificados receptores estrogênicos no coração, capazes de regular a expressão gênica de várias proteínas como a α -miosina de cadeia pesada, muito abundante no coração (GROHÉ, et al. 1997), já descritos na introdução.

Para a avaliação dos níveis da LPO, foram utilizados dois métodos, pois estas técnicas são medidas indiretas da lipoperoxidação. A técnica das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) mede malondialdeído e outros aldeídos resultantes do processo de LPO, e a quimiluminescência (QL) mede a luz emitida por carbonilas excitadas e oxigênio singlet originados nas etapas de terminação da LPO. Assim, se os resultados obtidos por estas técnicas forem concordantes, os resultados são aceitáveis.

Os resultados de LPO, encontrados neste trabalho, avaliados pelas técnicas de TBARS e QL foram concordantes em todas as vias de administração realizadas. A castração aumentou significativamente a LPO em todas as vias de administração e a reposição hormonal voltou aos valores do grupo controle, diminuiu significativamente a LPO comparada com o grupo castrado.

Os resultados obtidos confirmam outro trabalho realizado em nosso laboratório por Barp, et al. (2002), onde foi verificado que ratas castradas apresentam maior lipoperoxidação cardíaca que ratas com ovários intactos; neste estudo foi também observado que os machos têm níveis de LPO cardíaca maiores do que as fêmeas e que a castração não altera este perfil. Niki (1990), em seus estudos, encontrou que os estrogênios, especialmente catecóis estrogênios, têm função como “scavengers” de radicais livres e inibem a lipoperoxidação in vivo e in vitro. Mostrou que estradiol, estrona e estriol inibem a peroxidação do metil linoleato sob irradiação UV, e reduzem a formação de dienos conjugados e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Estrona, estradiol e estriol também suprimem a oxidação de fosfolipídios em microssomas de fígados de ratos induzidos por Fe^{+3} -ADP-NADPH, Fe^{+3} -ADP-Adriamicina ou Fe^{+3} -ADP-ascorbato. O 2-hidroxiestradiol e a 2-hidroxiestrona são os metabólitos do estradiol e da estrona que exibem maior efeito antioxidante. O estradiol e o 2-hidroxiestradiol administrados intraperitonealmente em ratos diminuem os níveis de peroxidação lipídica no fígado (NIKI, 1990).

Pudemos observar que, nas três vias de administração houve um aumento significativo da LPO por TBARS (Figura 3.3, 3.5 e 3.7) e por QL (Figuras 3.4, 3.6 e 3.8) no grupo CASTRADO e uma diminuição significativa ao repormos o hormônio no grupo CAST+HORM, observada nas figuras citadas acima. Em todas as vias de administração não houve diferença entre os grupos CONTROLE e CAST+HORM. Estes resultados demonstram claramente a influência da presença do hormônio 17β -estradiol como um potente antioxidante. Estes resultados concordam com a bibliografia disponível (NIKI, 1990; RÖMER, et al. 1997; BEDNAREK-TUPIKOWSKA,

et al. 2001; IDE, et al. 2002; OZGONUL, et al. 2003; BORRAS, et al. 2003; OGE A, et al. 2003; TAM, 2003).

Este papel antioxidante do estrogênio é devido, em parte, a sua estrutura hidrofênolica que pode doar átomos de hidrogênio para radicais lipídicos, como o peroxil, terminando assim com a reação em cadeia da LPO (RÖMER, et al. 1997; BEDNAREK-TUPIKOWSKA, et al. 2001). Assim, o estrogênio age como um “scavenger” de radical livre. Este papel é uma atividade per se, ou seja do próprio hormônio. O estrogênio, além de agir como antioxidante direto, pode também ativar receptores, modular neurotransmissores (OGE, et al. 2003) e estimular a expressão de enzimas antioxidantes (BORRAS, et al. 2003).

O trabalho de Thibodeau, et al. (2002), mostra que o estrogênio é comparável ao Trolox, a vitamina E hidrossolúvel, em inibir a lipoperoxidação induzida por radiação. O estrogênio em baixas concentrações (1 μ M) e o Trolox inibem a formação de dienos conjugados induzidos por radiação. Em altas concentrações o estrogênio protege completamente o ácido linoleico da irradiação- γ . Hernández et al. (2000) demonstraram que ratas ovariectomizadas apresentam níveis aumentados do radical superóxido e, com isso, aumento nos níveis de LPO, diminuição da enzima superóxido dismutase (SOD), diminuição de grupamentos tióis e redução da capacidade antioxidante total em plasma e isto foi reestabelecido com a reposição estrogênica.

4.2.2 Enzimas antioxidantes

As enzimas antioxidantes não apresentaram respostas homogêneas nos diferentes grupos e vias de administração. Isto pode ser devido, entre outros fatores, ao tempo e vias de reposição hormonal que diferiu nos grupos.

A enzima superóxido dismutase foi avaliada por duas técnicas: a da oxidação da adrenalina (nas vias IM e IP) e a da oxidação do pirogalol (nas vias IP e VT). Quando se iniciou este estudo, em nosso laboratório, a técnica disponível era apenas a da oxidação da adrenalina. Como esta técnica tem um custo mais elevado e pode sofrer alterações com o perfil plasmático ou tecidual das catecolaminas, foi padronizada outra técnica, a da oxidação do pirogalol, que sofre menos influências e tem um custo menor. No grupo IP, verificamos que os resultados das duas técnicas, demonstram o mesmo perfil. Assim na VT, passamos a avaliar a SOD apenas pela oxidação do pirogalol. Na via IM, não observamos diferenças com a castração ou com a reposição hormonal na atividade da SOD. Já na via IP, observamos que as ratas castradas apresentaram o mesmo perfil encontrado nas ratas controle na atividade da SOD pela técnica da oxidação da adrenalina, bem como na técnica da oxidação do pirogalol. Porém, a reposição hormonal provocou um aumento significativo da sua atividade em relação ao grupo CASTRADO. Na via VT, foi encontrado que a castração reduz significativamente a atividade desta enzima em relação ao grupo CONTROLE, e ao repormos o hormônio a atividade da enzima volta aos valores do grupo CONTROLE. Estes resultados sugerem que a redução desta defesa enzimática possa estar contribuindo para o aumento da LPO. O aumento desta defesa não enzimática no grupo CAST+HORM contribui para reverter o dano (LPO) promovido pela castração. Esses resultados corroboram os achados de Oberley, et al. (1994) em que o estrogênio administrado exogenamente aumenta a atividade da SOD no rim.

Römer (1997), em seu estudo sobre vários metabólitos do estrogênio, demonstrou que estes inibem a produção do ânion radical superóxido in vitro, bem

como influenciam no ciclo redox do ferro, levando a uma menor formação de radicais livres.

Borras, et al. (2003) investigaram que mitocôndrias de fêmeas apresentam maior expressão das enzimas antioxidantes que machos. A mitocôndria é a maior fonte de radicais livres (RL) na célula. Ratas ovariectomizadas apresentam os mesmos níveis das enzimas que machos, e com a reposição estrogênica há maior expressão da atividade de glutathione peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD). Isto gera um dano oxidativo em machos quatro vezes maior que em fêmeas, pois as fêmeas têm maior proteção contra o dano induzido pelos radicais livres.

Nas vias IM e IP, a atividade da enzima CAT não variou com a castração e nem com a reposição estrogênica. Já na via VT, observamos claramente que houve um aumento da atividade da CAT nos animais castrados e, com a reposição estrogênica, a atividade da enzima é semelhante aos animais controle. O aumento da atividade da enzima pela castração sugere que os animais ovariectomizados apresentam uma elevação na concentração de peróxido de hidrogênio. Esta hipótese foi comprovada pelo trabalho de Strehlow, et al. (2003) que mostrou que a ovariectomia aumentou a LPO, por aumentar a produção peróxido de hidrogênio. Este resultado encontrado na via transdermal (VT) concorda com os resultados encontrados em outros trabalhos como o de Ozgonul, et al. (2003), em que fêmeas Sprague-Dawley ovariectomizadas têm um aumento da atividade da enzima CAT em fígado e a reposição estrogênica reverte esse efeito, retornando aos valores dos animais controles. No trabalho de Sudoh et al. (2001), em que o estresse oxidativo produzido por peróxido de hidrogênio induz apoptose nas células endoteliais, a reposição estrogênica em valores semelhantes aos encontrados neste trabalho tem

uma ação protetora contra a apoptose, inibindo o fator de necrose tumoral- α (TNF α), por aumentar a reendotelização (aumenta a proliferação das células endoteliais).

Na via IM, observamos que a castração promoveu um aumento da atividade da enzima GPx em relação ao grupo CONTROLE, e não houve diferença em relação ao CAST+HORM. Na via IP, a atividade da enzima GPx apresenta uma diminuição significativa no grupo CASTRADO em relação ao CONTROLE, e esses níveis voltam a aumentar com a reposição hormonal. Na reposição pela via VT, os resultados são semelhantes àqueles da IP. Esses dados corroboram com os achados de Borrás et al (2003), como já foi citado. Em vários protocolos experimentais distintos, a CAT e a GPx, apresentam uma correlação inversa nas suas atividades. Quando as concentrações de peróxido de hidrogênio são da ordem de nM a CAT é mais ativa, sendo que a GPx atuaria preferencialmente em concentrações da ordem μ M de peróxido de hidrogênio (YU, 1994).

Hernández, et al. (2000) evidenciaram em seu estudo que a castração levou a uma diminuição dos grupos tióis (-SH) e da capacidade antioxidante total no plasma, assim como um aumento dos lipoperóxidos no plasma, refletindo um desequilíbrio a favor dos processos oxidativos. Várias substâncias que agem como defesas enzimáticas e não enzimáticas dependem dos grupos tióis, como: GPx, GST e GSH e podem ter sua atividade ou concentração alterada em função da retirada do hormônio.

A enzima glutathione S-transferase (GST) foi medida tanto no tecido cardíaco como no plasma apenas na via VT, que foi a via onde foi feita uma avaliação mais completa, tanto do estresse oxidativo (EO) quanto funcional. A GST, que é mais específica para peróxidos orgânicos, apresentou comportamento semelhante àquele

da GPx, em que no grupo CASTRADO houve uma diminuição em relação ao CONTROLE, e com a reposição hormonal voltou a valores semelhantes àqueles do grupo CONTROLE. Este dado pode estar relacionado à disponibilidade de glutathione (GSH) para efetuar a detoxificação de peróxidos. Esta hipótese foi confirmada quando medimos a concentração de GSH no tecido cardíaco (Tabela 3.5). Como no trabalho de Hernández, et al. (2000), a GSH apresentou-se diminuída no grupo CASTRADO em relação ao grupo CONTROLE, e a reposição hormonal recuperou o nível deste antioxidante. Novamente, a redução deste importante antioxidante, a GSH, que é o antioxidante hidrossolúvel mais abundante nas células, pode estar contribuindo para o incremento do dano oxidativo nos animais castrados (HERNÁNDEZ, et al. 2000; BORRAS, 2003).

4.2.3 LPO Sistêmica

Uma vez que não foram observadas diferenças na LPO avaliada por TBARS e QL nos tecidos e porque o método de TBARS no sangue apresenta dificuldades técnicas para sua realização, a LPO no sangue foi efetuada apenas pelo método da QL.

A LPO sistêmica mostrou que o grupo CASTRADO apresentou um aumento de 112% ao compararmos com o grupo CONTROLE, e isto foi revertido com a reposição estrogênica, que apresentou uma diminuição de 40% em relação ao CASTRADO (Figura 3.9). A QL sistêmica repetiu o mesmo comportamento encontrado no tecido cardíaco nas três vias de administração.

A LPO sistêmica é uma medida de dano oxidativo na membrana do eritrócito, e pode ser um reflexo do balanço entre dano oxidativo e defesa antioxidante nos diferentes tecidos. Tem sido usada como marcador periférico de

dano oxidativo, especialmente importante em pacientes, pois representa uma medida minimamente invasiva (MAXWELL, 1993).

4.2.4 Sistema de defesa enzimático e não enzimático sistêmico.

A avaliação da enzima SOD no sangue demonstra que ocorre uma diminuição da atividade da mesma no grupo CASTRADO em relação ao grupo CONTROLE, e no grupo CAST+HORM esta foi significativamente maior em relação aos demais (Tabela 3.6). Esse perfil foi o mesmo encontrado na avaliação do tecido cardíaco nas vias IP e VT.

No trabalho de Lutoslawska et al. (2002), que avaliou os níveis de TBARS e atividade das enzimas antioxidantes no sangue, em mulheres com ciclos menstruais com e sem ovulação, foi encontrado que os níveis de TBARS, GPx, GSH, GR e CAT não sofrem alterações significativas em mulheres com ciclos ovulatórios e não ovulatórios. A enzima SOD, no entanto, sofre alterações importantes no eritrócito. A SOD eritrocitária é especialmente importante para essas células, pois protege contra a autooxidação da hemoglobina. Essa enzima eritrocitária também é um potente antioxidante para outros tecidos, pois os canais aniônicos transportam superóxido e outros radicais para dentro da hemácea. Assim, as flutuações da atividade eritrocitária refletem mudanças na geração das ERO não só da hemácea, mas também de outros tecidos. Neste trabalho, foi observado que a atividade da SOD é diretamente proporcional à concentração do 17β -estradiol. Assim, a atividade elevada da SOD encontrada em mulheres com distúrbios hormonais, como ovários policísticos, pode revelar uma adaptação antioxidante para enfrentar situações de estresse oxidativo.

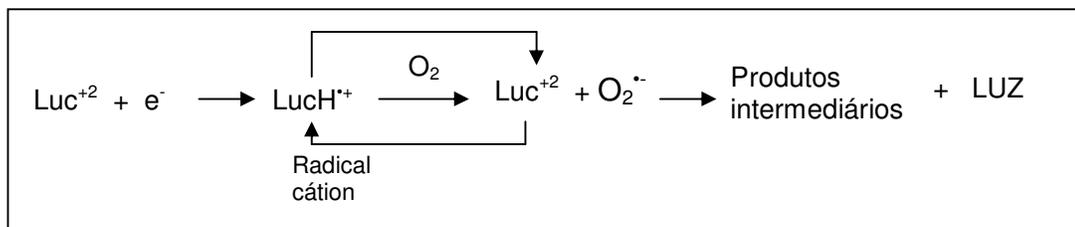
A atividade sistêmica da enzima CAT também reflete o mesmo comportamento encontrado no tecido cardíaco na VT em que a castração promove um aumento da atividade e a reposição hormonal diminui a atividade da mesma aos valores do CONTROLE. Isso pode refletir uma maior produção de peróxido de hidrogênio ao nível sistêmico. Podemos observar que há um comportamento oposto entre a atividade da enzima CAT e a atividade da GPx, que se apresenta aumentada no grupo com reposição estrogênica. Isso também ocorre no tecido cardíaco e já discutido na sessão correspondente

As defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas dependentes de glutathione (GPx, GST e GSH) não sofreram alterações significativas na sua atividade em nível sistêmico em função da variação hormonal. Talvez, como o coração seja um tecido com poucas defesas antioxidantes, comparativamente a outros, a retirada do estrogênio se reflita de forma mais dramática, havendo alterações de todos os sistemas antioxidantes avaliados. No plasma, há uma maior concentração e atividade de antioxidantes. Outra possibilidade é que outras defesas não enzimáticas, não avaliadas, tais como as vitaminas antioxidantes (A e E) e outros compostos de alto peso molecular, possam estar sendo mobilizados para a neutralização dos RL formados.

4.3 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DO ÂNION SUPERÓXIDO EM AORTA

A produção do ânion radical superóxido pode ser avaliada pelo método da lucigenina. Essa substância é reduzida a radical Luch^{•+} na presença de doadores de elétrons (NADH/NADPH). O radical Luch^{•+} reage com oxigênio e forma o O₂^{•-} e emite luz, a qual é detectada pelo contador β adaptado à medida de

quimiluminescência. Assim, quanto maior a concentração do ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), maior será a emissão de luz (LIOCHEV, et al. 1997).



JANISZEWSKI, et al. (2002) colocam em seu estudo que os valores representados nesta técnica pela exposição ao NADH são superestimados, logo não devemos considerá-los para a medida do ânion superóxido, pois este dado provavelmente seja o resultado da combinação entre dois ânions superóxido levando à formação de peróxido de hidrogênio.

O $O_2^{\cdot-}$ pode ser produzido nos vasos sanguíneos a partir de várias fontes tais como os sistemas xantina oxidase, lipoxigenase, cicloxigenase, citocromo P450, NADH/NADPH oxidases. Destes, o último parece ser o mais importante, sendo considerado a principal fonte de superóxido no vaso (ZALBA, et al. 2001). Essa ERO tem sido considerada como um importante fator para a determinação do tônus vascular, uma vez que pode levar a um aumento da vasoconstrição. Essa ação deve-se ao fato de que esse radical livre, produzido pelo endotélio, combina-se com o principal fator de relaxamento do endotélio, o óxido nítrico, formando o peroxinitrito. Esta reação tem inclusive uma velocidade maior do que a taxa de decomposição do superóxido pela SOD. Nessa situação, pela retirada de um importante vasodilatador (NO) e produção de um forte oxidante, o peroxinitrito, a vasoconstrição fica favorecida. Outro fator importante é o aumento de peróxido de hidrogênio nos animais castrados, sabe-se que este em altas doses leva a vasodilatação.

A óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) requer tetrahidrobiopterina (BH_4), ligada próximo ao grupo heme, para transferir elétrons ao nitrogênio guanidino da L-arginina para formar NO. O desacoplamento da eNOS ocorre pela falta de BH_4 ou L-arginina, levando à produção de $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , (HUA & HARRISON, 2000; VÁSQUEZ-VIVAR, et al. 1999).

Neste estudo, não foi avaliada a atividade da SOD em aortas, mas esta foi estimada no sangue. Observa-se que a atividade da NADPH oxidase acompanha as variações da SOD no sangue, estando ambas diminuídas na castração em relação ao controle e voltando a aumentar com a reposição estrogênica. Já a atividade da NADH oxidase apresenta um comportamento inverso estando aumentada com a castração e reduzida com a reposição de estrogênio. Esse padrão de oscilação segue as variações da atividade da CAT em nível sistêmico. Isto talvez possa ser explicado pelo fato de que com o NADH de substrato, ocorre em última análise produção de peróxido de hidrogênio, como explicado anteriormente (JANISZEWSKI, et al. 2002). Sabe-se que o estrogênio pode modular os receptores de angiotensina II (AT I), sendo que, quando o estrogênio é reduzido, aumenta a expressão desses receptores. Desta forma, nos animais castrados há uma maior ativação da NADPH pela angiotensina II, aumentando a produção de superóxido. O aumento deste radical, assim como de outras espécies derivadas podem inibir a atividade enzimática da SOD (EVELSON, et al. 2001).

4.4 AVALIAÇÃO DOS METABÓLITOS DO ÓXIDO NÍTRICO.

Quanto à avaliação dos metabólitos do NO, verificamos que, no tecido cardíaco, o grupo CAST+ HORM e o grupo CASTRADO apresentam maior quantidade de nitratos que o grupo CONTROLE (Figura 3.11). O nível de nitritos no

tecido cardíaco não foi alterado nos três grupos (Figura 3.12). A grande parte do NO formado é degradado em nitrato, pouco é metabolizado em nitrito. Isto pode ser evidenciado pela diferença na ordem de grandeza da concentração destes metabólitos (Figuras 3.11 e 3.12), os nitratos estão na faixa de 1,5 mmol/L, enquanto que os nitritos em torno de 0,06 mmol/L. Ao avaliarmos o nível sistêmico de nitratos, observamos, na figura 3.13, que o grupo CAST+HORM apresenta um nível aumentado de nitrato em relação aos demais grupos, bem como o nível de nitritos (Figura 3.14). Sugerindo, então, que a reposição estrogênica está estimulando a produção de NO (CROSS, et al. 2002; HERNÁNDEZ, et al. 2000; KIM, et al. 1996; JIANG, et al. 1991)

Num estudo anterior realizado em nosso laboratório (BARP, 2002), foi avaliado o perfil sistêmico dos metabólitos do NO em ratas aos 3, 10 e 20 dias após a castração. Foi encontrado que, precocemente (aos 3 dias), o nível de nitratos plasmáticos estava reduzido, sendo que esses voltavam ao nível controle já aos 10 dias de castração. Neste mesmo estudo, ao final de 21 dias, o conteúdo de nitratos cardíacos mostrou-se aumentado nas ratas castradas em relação às controles. Esses resultados foram confirmados no nosso estudo, onde os nitratos cardíacos estão aumentados na castração e ainda mais após a reposição hormonal. Assim, a deficiência de estrogênio promove uma redução de nitratos precocemente, mas parece haver uma adaptação rápida desses níveis. É possível que as adaptações antioxidantes promovidas pela castração contribuam para uma maior biodisponibilidade do NO.

O trabalho de Imthurn (1997), protocolo já descrito anteriormente, também demonstra que a reposição estrogênica eleva os níveis de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$, bem como diminui os níveis de LDL e aumenta HDL colesterol.

No trabalho de Huang et al (1998), foi mostrado que ratas fêmeas espontaneamente hipertensas (SHR) mantinham preservado o fluxo induzido pelo NO, o que não acontecia em ratos machos SHR. O estrogênio preserva a liberação do NO, que é induzido pelo "shear stress" (estresse de cisalhamento), promovendo a dilatação dos vasos em ratas fêmeas hipertensas, fato este que não ocorre em ratos machos hipertensos (SHR). O "shear stress" na parede pode contribuir para o mecanismo pelo qual o estrogênio mantém a pressão sanguínea sistêmica mais baixa e com isso menor incidência de doenças cardiovasculares em mulheres em idade reprodutiva.

4.5 Avaliação das respostas hemodinâmicas

Como podemos observar nas tabelas 3.8 e 3.9, não houve diferenças significativas entre os grupos em nenhum parâmetro hemodinâmico nas vias intraperitoneal e transdermal. Ou seja, a reposição estrogênica não alterou a pressão arterial sistólica (PAS), a pressão arterial diastólica (PAD), a pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC). Alguns trabalhos como o de Hernández et al (2000), demonstram que ratas normotensas ovariectomizadas apresentam aumento da pressão arterial. Milsted et al (1998) apontam para um aumento da pressão sistólica em ratas fêmeas após 7 semanas de ovariectomia. Nickening, et al (1996) em seus experimentos demonstram que não houve diferenças significativas entre ratas Wistar-Kyoto ovariectomizadas e controles. Já em ratas ovariectomizadas geneticamente hipertensas, após 4 semanas de reposição

estrogênica, houve uma diminuição significativa da pressão arterial comparando-as com ratas não tratadas, sugerindo um efeito benéfico do estrogênio (BROSNIHAN, et al. 1994). Nos trabalhos de HUANG et al (1998), foi demonstrado que o estrogênio preserva vasodilatação mediada por NO induzida pelo “shear stress”, mantendo a dilatação arteriolar maior em ratas SHR que em machos SHR, nesse estudo, o estrogênio diminuiu a pressão sangüínea sistêmica

As discrepâncias observadas nos estudos citados podem ser explicadas pelos diferentes protocolos experimentais que foram empregados, onde o tempo de ovariectomia, o tempo de reposição e a dose hormonal utilizada variava consideravelmente (HERNÁNDEZ, et al. 2000).

No protocolo experimental de Hernández et al (2000), onde foi verificado que o 17β -estradiol previne o estresse oxidativo e diminui a pressão em ratas ovariectomizadas, foram encontrados baixos níveis plasmáticos de nitritos/nitratos, baixo nível de antioxidantes plasmáticos, reduzidos grupos tióis e um aumento plasmático de lipoperóxidos em ratas ovariectomizadas, sendo que estes efeitos foram prevenidos com a reposição estrogênica. Os resultados encontrados por esses autores mostram que a administração de estrogênio diminui a pressão arterial e aumenta a condutância vascular em ratas. Esses efeitos podem estar relacionados a um aumento da síntese de óxido nítrico e/ou prevenção do estresse oxidativo, melhorando a função endotelial. A diferença entre o protocolo citado e o utilizado neste estudo foi o tempo de ovariectomia, 12 semanas, enquanto que neste trabalho foi de sete dias. Muitos estudos com populações de mulheres demonstram que essas apresentam menor prevalência de hipertensão antes da menopausa. A principal hipótese para explicar este fato é que o hormônio feminino tem um papel

significante, ao longo do tempo, na regulação da resistência periférica. Acredita-se também que mecanismos neurais e humorais e fatores intrínsecos na parede dos vasos apresentam um papel importante na regulação da resistência periférica. Esses fatores são relacionados à função endotelial e ao músculo liso arteriolar. Estudos prévios em vasos isolados sugerem que a liberação de NO é maior em fêmeas que em machos e que a ovariectomia elimina essa diferença e diminui a dilatação por agonistas conhecidos por liberar NO. Assim, o efeito protetor do estrogênio endógeno na vasodilatação dependente do endotélio em mulheres antes da menopausa pode possivelmente resultar do efeito direto do hormônio nas células endoteliais, regulando a transcrição de NO sintase.

4.6 PERFUSÃO CARDÍACA

Avaliamos a função mecânica do coração das ratas nos três grupos experimentais através da obtenção de curvas de Starling. Vários estudos indicam que a terapia estrogênica na pós-menopausa reduz o risco e progressão das doenças cardiovasculares (SALEH, et al. 2000; ROSANO, et al. 1993; HUGEL, et al. 1999; SCHUNKERT, et al. 1997; FRASER, et al. 1999). Estes estudos enfocam a melhora da disfunção endotelial e perfil lipídico. Nosso objetivo foi o de verificar se a variação hormonal tem influência direta na atividade mecânica do coração, com melhora dos parâmetros funcionais com a reposição estrogênica.

4.6.1 Curva de Função Ventricular – (Frank-Starling)

A relação comprimento-tensão no músculo cardíaco é semelhante à do músculo esquelético; quando o músculo é estirado, a tensão desenvolvida aumenta até um máximo e, a seguir, diminui à medida que o estiramento fica mais extremo. Starling afirmou que a energia da contração é proporcional ao comprimento inicial da

fibra muscular cardíaca; essa afirmação passou a ser conhecida como Lei de Starling, do coração ou lei de Frank-Starling. Para o coração, o comprimento das fibras musculares (isto é, o grau da pré-carga) é proporcional ao volume diastólico final. A relação entre o débito sistólico ventricular e o volume diastólico final é evidenciada na curva de Starling.

No protocolo realizado neste trabalho, avaliamos se a castração ou a reposição estrogênica interferiam na contratilidade miocárdica, pois o músculo cardíaco apresenta receptores estrogênicos do tipo $ER\alpha$ e $ER\beta$ (principalmente). Ambos os receptores poderiam mediar efeitos protetores do estrogênio (LEVIN, 2002).

Observamos que, nas diferentes pressões diastólicas: (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 mmHg), a frequência cardíaca (FC) (Figura 3.15, Tabela 3.10) não apresentou variações significativas entre os grupos. Quanto à PVSist (Figura 3.16, Tabela 3.11), não houve alteração entre os diferentes grupos, mas sim, uma evolução proporcional nos três grupos em função da variação da PVDiast. Isto reproduz a Lei de Frank Starling: quanto maior a pressão de enchimento, maior será a força de contração. A ANOVA de uma via demonstrou uma variação significativa entre os grupos nas PVDiast de 10 e 40, sendo maior no grupo CAST+HORM que no CASTRADO. Na Pressão Ventricular Desenvolvida (PVD) (Figura 3.17, Tabela 3.12), também não houve variações entre os grupos. Quanto à velocidade de contração do ventrículo esquerdo (+dP/dt) (Figura 3.18, Tabela 3.13), não houve variação entre os diferentes grupos, mas a evolução da +dP/dt dentro do mesmo grupo, mostrou-se maior no grupo CASTRADO em relação aos demais. A velocidade de relaxamento do ventrículo esquerdo (-dP/dt) (Figura 3.19, Tabela

3.14), também não mostrou variação entre os diferentes grupos, mas dentro do mesmo grupo, o CASTRADO apresentou maior velocidade de relaxamento. O grupo CAST+HORM apresentou valores de $-dP/dt$, iguais aos iniciais. Assim, observamos que o grupo CASTRADO contrai e relaxa mais rápido do que os outros grupos, ou seja ele parece conseguir disponibilizar o cálcio mais rápido do retículo sarcoplasmático e do líquido extracelular para o músculo e vice-versa. No trabalho de Cross et al (2002), demonstrou-se uma maior expressão da eNOS em fêmeas que machos, sendo que NO atua diretamente liberando o cálcio do RS e acelerando o ciclo do cálcio prevenindo seu aumento no mioplasma. Assim, os corações das fêmeas estão mais protegidos do aumento do cálcio citosólico provocado por cardioplegias, hipercalcemia, tratamento com agonistas adrenérgicos.

A Pressão de Perfusão (PP) (Figura 3.20, Tabela 3.15) avaliada pela ANOVA de uma via demonstrou variação entre os grupos a partir do tempo 15 minutos. O grupo CASTRADO apresenta uma menor PP em relação aos demais. Acreditamos que isto se deva ao fato deste grupo apresentar maior produção cardíaca de NO, como já foi discutido, o que leva há uma maior vasodilatação. Outro fato importante é que este grupo pode apresentar um aumento de peróxido de hidrogênio o que contribui para aumentar o estresse oxidativo, e em altas doses levar à vasodilatação. A menor PP, poderia também ser em função de que pode estar havendo uma maior estimulação simpática neste grupo, levando à vasodilatação coronariana. No trabalho de Saleh et al (2000), diz que a reposição estrogênica aumenta a sensibilidade ao barorreflexo, aumenta o tônus parassimpático e diminui o tônus simpático, diminuindo a resistência vascular, em baixas doses de estrogênio, protegendo contra acidentes cardiovasculares.

No estudo de Thompson et al (2000), ele demonstra que o estrogênio pode ser um cardioprotetor por aumentar a vasodilatação da circulação coronariana. Infusão aguda de estrogênio aumenta o fluxo coronariano, e os mecanismos propostos mediados pelo estrogênio incluem alterações nas propriedades das membranas e/ou bloqueando os canais de cálcio, estimulando a cGMPc/NO e ativação de canais de K^+ no músculo liso da artéria coronariana. Neste trabalho Thompson infundiu LNA, e mesmo assim a vasodilatação estava presente, ele sugere outros mecanismos independentes do NO, tais como liberação de prostaglandinas, ou fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio. Este protocolo foi realizado com infusões crônicas de estrogênio que podem estimular agonistas do NO derivados do endotélio, produzindo NO por alterar a expressão gênica da eNOS, como um potencial mecanismo cardioprotetor. Assim a reposição estrogênica pode normalizar a hiperreatividade por agentes constritores e por aumentar a produção do NO dependente do endotélio na microcirculação coronariana.

4.6.2 Isquemia seguida da reperfusão

A isquemia ocorre quando uma porção do tecido é privada de O_2 . Por sua vez, severa restrição de fluxo sanguíneo no tecido, levando a concentrações de O_2 mais baixas que o normal, resulta em hipóxia. Os tecidos respondem à isquemia de várias maneiras. Inicialmente as respostas incluem taxas aumentadas de degradação de glicogênio e glicólise, levando à formação de lactato e ao estado de acidose. Os níveis de ATP começam a diminuir, AMP é degradado causando acúmulo de hipoxantina (Figura 4.1), aumentam os níveis de cálcio intracelular provocando ativação de proteases estimuladas pelo cálcio e, possivelmente, da óxido nítrico sintase (NOS). Tudo isso leva posteriormente ao dano da membrana.

No mecanismo de isquemia/reperfusão observa-se a formação de superóxido e peróxido de hidrogênio. A falta de oxigênio é lesiva, mas a falta seguida da reperfusão é muito mais lesiva, pois levará à formação de ERO, ocorrendo então um processo conhecido como o paradoxo do oxigênio. Esse fenômeno foi primeiramente descrito em 1973, quando foi constatado que a reoxigenação abrupta do coração, após um episódio isquêmico, produzia alterações substanciais no músculo cardíaco (SOUTHORN & POWIS, 1988). As alterações mais graves que podem ocorrer nessa situação são a síndrome do “stunned heart” (coração arritmico, atordoado) e do “stone heart” (contratura do coração, coração de pedra) (BELLÓ-KLEIN, et al. 1994, HEARSE, et al. 1977). Esta síndrome é uma condição rara e irreversível em que há parada do coração em sístole durante ou imediatamente após uma parada cárdio-respiratória.

Existem várias teorias propostas para explicar este fenômeno, no entanto, todas elas apontam para a geração de peróxido de hidrogênio; esse fato fez com que os trabalhos realizados por BIANCHINI & BELLÓ, 1988; BELLÓ & BELLÓ, 1988, fossem utilizadas injeções de peróxido de hidrogênio no coração isolado e perfundido (à pressão constante) de rato como modelo de contratura cardíaca.

No coração de rato, doses de peróxido de hidrogênio (8-64mM) induziram um efeito inotrópico positivo com potenciação pós-extrassistólica (efeito similar ao “stunned heart”) (BIANCHINI & BELLÓ, 1988). Doses mais altas (128-2048mM) induziram contraturas cardíacas (“stone heart”) (BELLÓ & BELLÓ, 1988), semelhantes às que se observam durante a isquemia-reperfusão (contraturas isquêmicas).

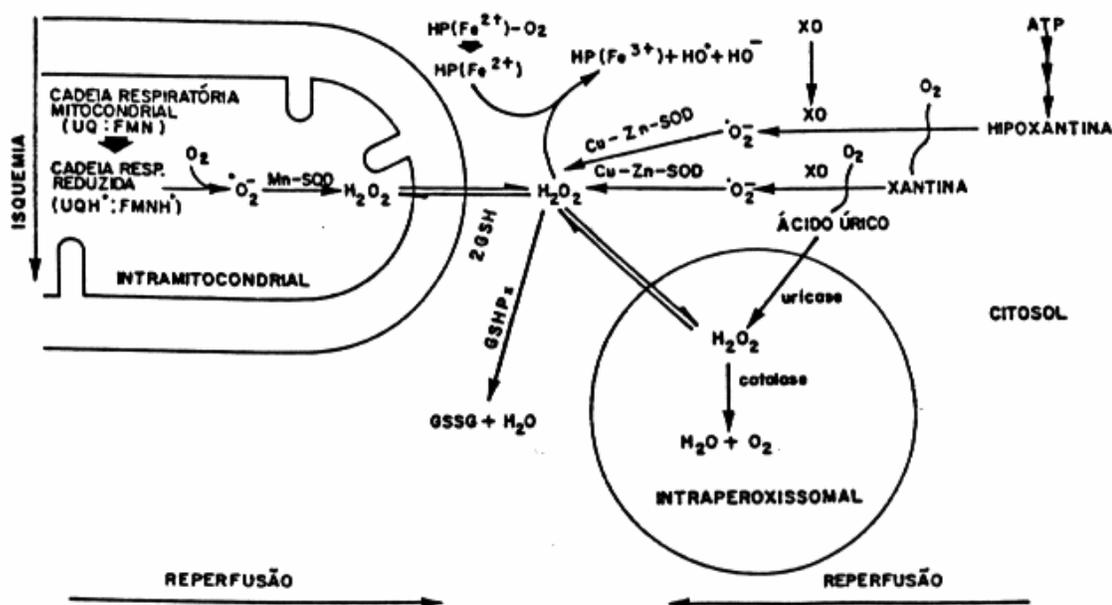


Figura 4.1: Mecanismo gerador do dano celular mediado por ERO durante o processo de isquemia-reperfusão (adaptado de BAST et al., 1991)

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que, ao final de 30 min de isquemia seguida de reperfusão, os valores de FC (Figura 3.21, Tabela 3.16) do grupo CAST+HORM são recuperados mais rapidamente quando comparados aos demais grupos (Figura 3.21). A ANOVA de uma via e a evolução dentro do grupo mostrada na figura 3.22 e tabela 3.17 revelam que o grupo CAST+HORM recupera logo nos cinco minutos iniciais de reperfusão a PVSist. O mesmo ocorre ao avaliarmos a PVDiast (Figura 3.23 e Tabela 3.18), onde o grupo CAST+HORM mantém ao longo da reperfusão, uma pressão diastólica semelhante ao CONTROLE. Verificamos que o grupo com ausência estrogênica, CASTRADO, apresenta uma contratura isquêmica maior do que os demais grupos. Este fenômeno pode ser denominado de contratura isquêmica, caracterizando-se por uma progressiva incapacidade de relaxamento cardíaco, que pode ser entendida como perda da função contrátil (CORRETI, et al. 1991, apud BAUERMANN, 2000). Tem

sido relatado que a contratatura induzida por isquemia-reperfusão pode ser mediada por ERO e seja desenvolvida devido ao ciclo de pontes cruzada persistente durante a diástole. Esse processo seria mediado, possivelmente, por sobrecarga de cálcio (MALATIALI, et al. 1995, apud BAUERMANN, 2000). Node et al (1997) demonstraram a ação do estrogênio após isquemia-reperfusão estimulando a liberação do NO e ativando canais de cálcio. A presença de estrogênio parece estar melhorando o retorno de cálcio aos locais de depósito semelhante à condição fisiológica. O aumento da LPO no grupo CASTRADO pode estar contribuindo para esta sobrecarga de cálcio (Figuras 3.7 e 3.8). Alterações fisiológicas importantes na permeabilidade do cálcio, pela diminuição da atividade da $Ca^{+2}/ATPase$, acumulando Ca^{+2} no tecido, podem estar ocorrendo no grupo CASTRADO em maior proporção.

Cross, et al. (2002), demonstraram, em corações de ratos machos e fêmeas pré-tratados com cálcio após isquemia, que as fêmeas recuperavam melhor a função contrátil, ou seja os machos apresentavam um dano maior após o processo de isquemia-reperfusão. Após o tratamento com isoproterenol, os machos apresentaram maior depleção de ATP quando comparados com as fêmeas, indicando uma grande demanda de energia nos ratos tratados com isoproterenol.

No trabalho de Fraser, et al. (1999), o tratamento crônico com 17β -estradiol recupera melhor o glicogênio durante a reperfusão e aumenta a atividade da glicogênio sintase. Isto tem como consequência a melhora da função mecânica pós-isquêmica, aumentando da atividade da glicogênio sintase, aumentando a capacidade de ressíntese do glicogênio (gliconeogênese), que é benéfico para o coração pós-isquêmico, contribuindo para a uma melhora da função mecânica e produção de ATP.

Quanto à avaliação da velocidade de contração ($+dP/dt$) (Figura 3.24, Tabela 3.19) e de relaxamento ($-dP/dt$) do ventrículo esquerdo (Figura 3.25, Tabela 3.20), observamos que o grupo CAST+HORM apresenta melhores índices do que os demais grupos, restabelecendo mais rapidamente os níveis iniciais. Esta recuperação pode ser em função de que este grupo deve apresentar um aumento do suprimento de ATP durante a reperfusão. Esse aumento permite o desligamento de uma certa quantidade de pontes cruzadas, acelerando os ciclos contração-relaxamento. Isso pode ser observado nas figuras 3.22 e 3.23, pois esse grupo melhora a PVDiast, PVSist, $+dP/dt$ e $-dP/dt$. Já o grupo CASTRADO deve apresentar uma redução no conteúdo de ATP cardíaco provocando decréscimo tanto na velocidade de contração quanto na velocidade de relaxamento cardíaco (Figura 3.24, Tabela 3.19; Figura 3.25, Tabela 3.20).

No trabalho de Smith et al (2000) concluiu-se que o estrogênio pode aumentar a sobrevivência de mulheres que sofrem de infarto do miocárdio. Esse trabalho foi realizado em ratas Sprague-Dawley ovariectomizadas e tratadas ou não com 17β -estradiol, com ligadura da artéria coronária esquerda. Foi encontrado que o estrogênio reduz a contratilidade do ventrículo esquerdo por diminuir a expressão da Endotelina I, que atua como inotrópico positivo e estimula a hipertrofia. A endotelina é encontrada em níveis elevados em pacientes com infarto do miocárdio, gerando alto risco de mortalidade. O estrogênio aumenta a depuração da ET-I, inibindo a dilatação do ventrículo esquerdo, o que pode contribuir para um aumento da sobrevivência. O estrogênio atua na regulação do sistema endotelina, particularmente na expressão dos receptores de endotelina.

Quanto à Pressão de Perfusão (PP) (Figuras 3.26, Tabela 3,21), encontramos que os grupos CAST+HORM e CONTROLE recuperam os valores da PP, praticamente aos mesmos valores do período que antecede a isquemia. Já o grupo CASTRADO, na avaliação ANOVA de uma via demonstra valores significativamente menores. Na avaliação do delineamento de medidas repetidas, complementadas pelo teste comparações múltiplas de Tukey verificamos apenas variações no tempo final dos grupos. O trabalho de Hugel, et al. (1999) mostrou os múltiplos mecanismos que estão envolvidos no efeito vasodilatador do 17β -estradiol em coração isolado e perfundido de ratos, em que o hormônio melhora o fluxo coronariano e as disfunções metabólicas por aumentar a liberação de NO e abrir os canais de potássio e cálcio. Jiang et al (1991), mostraram que o relaxamento induzido pelo 17β -estradiol em artérias coronárias de coelhos era causado por propriedades de antagonista de cálcio e isto se repetia no músculo uterino.

Foi relatado que, nos primeiros minutos de reperfusão de coração de rato ocorreu um aumento em cerca de 600% no conteúdo miocárdico de H_2O_2 . Essa ERO acumulou-se no sarcolema, nas miofibrilas, no endotélio, nas mitocôndrias e no espaço intersticial. Esses locais de maior concentração e/ou geração de H_2O_2 poderiam ser áreas mais vulneráveis à injúria (SLEZAK, et al. 1995; GAN, et al. 1998, apud POTHIN, 1999). Além disso, a exposição de células a altos níveis de H_2O_2 (NAGY, et al. 1996, apud POTHIN, 1999), proporcionaria danos iniciais a proteínas da fosforilação oxidativa mitocondrial e isto poderia ser um mecanismo comum a uma variedade de processos citotóxicos geradores de ERO. Tal mecanismo seria relevante principalmente sob condições onde o balanço oxidante/pró-oxidante local é alterado pela sobrecarga de ferro mitocondrial. Uma combinação de tais eventos (lesão mitocondrial e sobrecarga de ferro) tem sido

mostrada ocorrer em cardiomiócitos sob isquemia-reperfusão (COMELLI, et al. 1998). Isso poderia justificar o dano provocado no grupo CASTRADO em relação à reperfusão, pois deve ocorrer súbita liberação de ferro citosólica e isso catalisaria a geração do radical hidroxil, via reação de Fenton. Este achado está de acordo com os resultados de estresse oxidativo previamente discutidos.

O grupo CAST+HORM recuperou melhor todos os parâmetros avaliados pós-isquemia, demonstrando assim que a reposição hormonal contribui para melhora na função cardíaca nesta situação. Nos parâmetros de estresse oxidativo, verificamos que o grupo que recebeu hormônio apresentou menor estresse oxidativo e aumento das reservas antioxidantes. O grupo CASTRADO sem reposição estrogênica, apresentou maior dano oxidativo e não reverteu o danos promovidos pela isquemia e reperfusão.

Assim, o modelo desenvolvido neste trabalho confirma a hipótese de que o estrogênio aumenta as reservas antioxidantes, reduzindo o dano oxidativo e melhora a função cardiovascular pós-isquemia e reperfusão.

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

1. Quanto ao estresse oxidativo tecidual foi encontrada, no grupo com reposição hormonal, uma diminuição significativa da LPO e um aumento das enzimas SOD, GPx e GST, demonstrando um menor dano oxidativo. No grupo castrado foi encontrado aumento do estresse oxidativo, diminuição das enzimas SOD, GPx, GST e aumento da enzima CAT. O aumento da CAT sugere um aumento do peróxido de hidrogênio o que poderia ampliar os danos observados neste grupo.

2. Quanto ao estresse oxidativo sistêmico foi observado que o grupo cast+horm apresentou uma menor LPO, um aumento da GPx e SOD e uma diminuição da CAT. O grupo castrado demonstrou um aumento da LPO e da CAT, sugerindo novamente um aumento do peróxido de hidrogênio neste grupo. Este resultado é semelhante ao observado no estresse oxidativo tecidual.

3. Quanto ao sistema não enzimático avaliado pela glutathione foi encontrado que ela está aumentada no grupo com reposição hormonal e diminuída no grupo castrado, demonstrando assim um estímulo das defesas no grupo com reposição hormonal.

4. Na avaliação do ânion superóxido pela técnica da lucigenina, utilizando o NADPH como substrato, no grupo cast+horm, evidenciou-se um aumento da produção do ânion superóxido. Utilizando NADH, que reflete a produção de peróxido de hidrogênio, observamos um aumento no grupo castrado. Estes dados demonstram um aumento do dano oxidativo no grupo castrado.

5. Quanto aos metabólitos do óxido nítrico, o grupo castrado apresentou um aumento dos nitratos no plasma. No grupo cast+horm, evidenciou-se níveis ainda mais aumentados destes metabólitos, sendo que estes foram detectados tanto no tecido quanto no plasma.

6. Quanto à hemodinâmica, não observamos alterações nos diferentes parâmetros nos grupos experimentais, sugerindo que as substâncias vasoconstritoras e vasodilatadoras estejam em equilíbrio.

7. Quanto à análise das curvas da função ventricular (curvas de Frank-Starling), o grupo castrado contrai e relaxa mais rapidamente só que atinge menor pico de pressão ventricular sistólica, e apresenta menor pressão de perfusão. Estes dados poderiam ser um reflexo da concentração aumentada de peróxido de hidrogênio, que se supõe existir. O grupo cast+horm atinge maior pico de pressão ventricular sistólica, podendo ser este efeito relacionado ao papel do estrogênio na captação e recaptção de cálcio o que melhora a maquinaria contrátil.

8. No processo de isquemia e reperfusão, no parâmetro da pressão ventricular diastólica, o grupo castrado apresenta uma contratatura isquêmica bastante importante, demonstrando perda da função diastólica pela isquemia. O grupo cast+horm consegue reverter o dano provocado pela isquemia, pois foi observada melhora da função diastólica e sistólica (verificadas pelas pressões ventriculares e respectivas derivadas), que neste grupo recupera os valores iniciais, antes da isquemia.

Como foi observado nos diferentes protocolos experimentais, os animais que receberam o hormônio 17β -estradiol apresentam uma melhora do perfil antioxidante e reversão dos danos cardíacos induzidos pela castração.

CONCLUSÕES

1) A cirurgia de castração foi eficaz em determinar a redução dos níveis plasmáticos de 17β -estradiol, assim como em reduzir o peso dos cornos uterinos. A reposição estrogênica, mediante as três vias de administração distintas (IM, IP, VT), foi eficaz em produzir níveis hormonais supra-fisiológicos.

2) Na avaliação do estresse oxidativo, no tecido cardíaco, encontramos nas três vias de administração, menores níveis de LPO no grupo com reposição estrogênica (CAST+HORM) e aumento da atividade das enzimas antioxidantes GPx, SOD, GSH e GST. O grupo CASTRADO apresentou maiores níveis de LPO e diminuição da atividade das enzimas antioxidantes. Isto demonstra a ação antioxidante da reposição estrogênica, levando a um menor estresse oxidativo.

3) Na avaliação do estresse oxidativo sistêmico, assim como no tecido cardíaco, observamos que a falta do hormônio aumentou o estresse oxidativo e a reposição hormonal o diminuiu.

4) A avaliação das defesas antioxidantes não enzimáticas no tecido cardíaco demonstrou que houve um aumento da GSH com a reposição hormonal.

5) O metabolismo do NO, avaliado por seus metabólitos, demonstrou estar aumentado com a reposição hormonal no tecido cardíaco e no plasma. A reposição hormonal aumenta os níveis de óxido nítrico, o fator de relaxamento do endotélio.

6) Quanto à produção do ânion superóxido em aorta isolada, encontramos que esta está aumentada no grupo com reposição hormonal, acompanhando as oscilações na atividade sistêmica da SOD.

7) Não foram observadas alterações nas medidas hemodinâmicas nem com a retirada nem com a reposição de estrogênio.

8) Na perfusão cardíaca, ao avaliarmos a curva de Starling, não encontramos diferenças importantes entre os grupos exceto que à menor PP encontramos no grupo CASTRADO. Já na situação de isquemia-reperfusão, observamos que o grupo que recebeu reposição estrogênica apresenta uma melhora importante da função cardíaca, não observada no grupo sem reposição. Os animais castrados apresentam contratura isquêmica, durante a reperfusão, muito mais significativa que os animais controles. Este efeito é revertido com a reposição estrogênica.

Assim, os resultados obtidos confirmam a hipótese proposta de que o estrogênio apresenta uma ação antioxidante importante, promovendo a diminuição do estresse oxidativo e melhora do perfil antioxidante que coincide com uma melhora da função cardíaca tanto em situação fisiológica quanto após um insulto isquêmico. Assim o estrogênio reverte os danos cardíacos induzidos pela castração.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS MR, KAPLAN JR, MANUCK SB, KORINIK DR, PARKS JS, WOLF MS, CLARKSON TB. Inhibition of coronary artery atherosclerosis by 17- β estradiol in ovariectomized monkeys: lack of an effects of added progesterone. *Arteriosclerosis*. 10:1051-1057, 1990.

BAKER H, LINDSEY JR, WEISBROTH SH. The laboratory rat biology and disease. *Academic Press*. v1, 1979.

BARP J, ARAÚJO ASR, FERNANDES TRG, RIGATTO KV, LLESUY S, BELLÓ-KLEIN A, SINGAL P. Myocardial antioxidant and oxidative stress changes due to sex hormones. *Braz Med Biol Res*. 35(9):1075-81, 2002.

BARP J. Avaliação do estresse Oxidativo no desenvolvimento da hipertensão renovascular: papel protetor dos estrogênios. Dissertação de Mestrado. *Departamento de Fisiologia – UFRGS*. 125pp, 2002.

BAST, A.; HAENEN, G. R. M. M.; DOELMAN, C. J. A. Oxidants and antioxidants: state of the art. *Am. J. Med*. 91(sup. 3C): 2-13 1991,.

BAUERMANN L. Estudo das alterações cardiovasculares e do metabolismo de oxigênio na anemia e na sobrecarga de ferro. *Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação – UFRGS*. 1-140, 2000.

BABICKER FA, DE WINDT LJ, VAN EICKELS M, GROHÉ C, MEYER R, DOEVENDANS PA. Estrogenic hormone action in the heart regulatory network function. *Cardiovasc Res*. 53(3): 709-719, 2002.

BEDENAREK-TUPIKOWSKA G, BOHDANOWICZ-PAWLAK A, BIDZINSKA B, MILEWICZ A, ANTONOWICZ-JUCHNIEWICZ J, ANDRZEJAK R. Serum lipid peroxide levels and erythrocyte glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity in premenopausal and postmenopausal women. *Gynecol Endocrinol*. 15(4): 298-303, 2001.

BELLÓ AR & BELLÓ AA. Cardiac contracture induced by hydrogen peroxide. *Med. Sci. Res.* 16: 1149-1150, 1988.

BELLÓ-KLEIN A, OLIVEIRA AR, BRUNETTO AF, IRIGOYEN MC, LLESUY & BELLÓ AA. Effect of vitamin A on cardiac contracture induced by hydrogen peroxide. *Med. Sci. Res.* 22: 411-413, 1994.

BELLÓ-KLEIN A, BOCK PM, TRAVACIO M, SENNA SM, LLESUY S, de BITTENCOURT PI Jr, IRIGOYEN MC, BELLÓ AA, KUMAR D, SINGAL PK. Myocardial oxidative stress and antioxidants in hypertension as a result of nitric oxide synthase inhibition. *Cardiovasc Toxicol.* 1(1): 43-50, 2001.

BEUTLER E, DURAN O, KELLY BM. Improved method for determination of blood glutathione. *J. Lab Clin. Med.* 61, 802-888, 1963).

BIANCHINI, A & BELLÓ, AA . Hydrogen Peroxide effects on the Contractile Force and the Coronary Flow of the Rat Isolated Heart. *Med. Sci. Res.* 16: 1265-1266, 1988.

BISBY RH. Interactions of Vitamin E with Free Radicals and Membranes. *Free Rad. Res. Comms.* 8: 4-6, 1990.

BORRAS C, SASTRE J, GARCIA-SALA D, LLORET A, PALLARDO FV, VINA J. Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radic Biol Med.* 34(5):546-52, 2003.

BOVERIS A, FRAGA CG, VARSAVSKY A & KOCH O. Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. *Arch. Biochem. Biophys.* 227: 534-541, 1983.

BOVERIS A & CHANCE B. The Mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 134:707-716, 1973.

BOVERIS A, LLESUY SF, FRAGA CG. Increased liver chemiluminescence in tumor-bearing mice. *Free Rad. Biol. Med.* 1: 131-138, 1985

BROSNIHAN BK, MORIGUCHI A, NAKAMOTO H, DEAN RH, DANTEN D, FERRARIO C. Estrogen augments the contribution of nitric oxide to blood pressure regulation in transgenic hypertensive rats expressing the mouse Ren-2 gene. *Am J. Hypertens* 7:576-582, 1994.

BUEGE JÁ, AUST SD. Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods Enzymology*, 52:302-309, 1978.

CASTRO LS, COELHO ACJ, BAGOSSIAN L, PERROTA U. Radicais Livres de Oxigênio - Aspectos Químicos, Biológicos e Fisiopatológicos em Medicina, in: *Jornal Brasileiro de Medicina.* 59(4):11-21, 1990.

CHRISTIANSEN C, RIIS BJ, NILAS L, REFDROS P & DEFTOS L: Uncoupling of bone formation and resorption by combined o estrogen and progestagen therapy in postmenopausal osteoporosis. *Lancet ii* 11:800-1, 1985.

COMELLI M, LONDERO D, MAVELLI I. Severe energy impairment consequent to inactivations of mitochondrial ATP synthase as an early event in cell death: a mechanism for the selective sensitivity to H₂O₂ of differentiating erythrocyte cells. *Free Radic. Biol. Méd.* 24:924-932, 1998.

CROSS RH, MURPHY E, STEENBERGEN C. Ca⁺² loading and adrenergic stimulation reveal male/female differences in susceptibility to ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H481-H489, 2002.

DANTAS APV, CARVALHO MHC. Efecto protector de los estrógenos en el sistema cardiovascular. *Antioxidantes y calidad de vida*. Mayo, Vol 7, n^o28, 6-11, 2000.

DELGADO JL, LANDERAS J, CARBNELL LF, PARRILLA JJ, ABAD L, QUESADA T, FIOL G, HERNÁNDEZ I. Effect of N-Acetyl-cysteine on vascular endothelium function in aorta from oophorectomized rats. *Gen Pharmacol* 32:23-27, 1998.

DEL MAESTRO RF. An Approach to Free Radicals in Medicine and Biology, in: *Act Physiol Scand*, Suppl. 492: 153-168, 1980.

DENEKE SM & FANBURG BL. Regulation of Cellular Glutathione. *Am. J. Physiol.* 257 (Lung Cell. Mol. Physiol. 1): L163-L173, 1989.

DITKOFF ED, GRARY WG, CRISTO M, LOBO RA. Estrogen improves Psychological Function in Asymptomatic Postmenopausal Women. *Obstetrics and Gynecology.* 78(6):991-5, 1991.

DUBEY RK. Vasodilator-derived nitric oxide inhibits angiotensin II and fetal calf serum-induced growth of arteriolar smooth muscle cells. *J.Pharmacol. Exp. Therap.* 269: 402-408, 1994.

DUBEY RK, JACKSON EK, LÜSCHER TF. Nitric oxide inhibits angiotensin II - induced migration of rat aortic smooth muscle cell: role of cyclic-nucleotides and angiotensin 1 receptors. *J.Clin.Invest.* 96: 141-149, 1995.

ETTINGER B, GENANT HK, STEIGER P & MADVIG P: Low-dosage micronized 17 β -estradiol prevents bone Loss in postmenopausal women. *Am J Obstet Gynecol* 166:479-88, 1992.

EVELSON, P.; TRAVACIO, M.; REPETTO, M.; ESCOBAR, J.;LLESUY, S.; LISSI, E.A. Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. *Arch. Biochem. Biophys.* 388(2):261-266, 2001.

EVORA PRB, PEARSON PJ, DISCIGIL B, SECCOME JF, SCHAFF HV. Endotélio e óxido Nítrico: História, fisiologia e as primeiras observações relacionadas com a hipertensão arterial. *Hiper Ativo* v 2(2):9-21, 1995.

FELSON DT, ZHANG Y, HANNAN MT et al. The effect of progestin therapy on cortical and trabecular bone density in elderly women. *N Engl J Med* 329:1141-6, 1993.

FERREIRA R. El Hierro: Amigo y Enemigo. *Antioxidantes y Calidad Vida*. Septiembre 1(2):18-25, 1994.

- FLOHÉ, L.; GUNZLER, W.A. Assay of Glutathione Peroxidase. *Methods Enzymology*, 105:114-121, 1984.
- FRASER H, DAVIDGE ST, CLANACHAN AS. Enhancement of post-ischemic myocardial function by chronic 17 β -estradiol treatment: role of alterations in glucose metabolism. *J Mol Cardiol*. 31: 1530-1549, 1999.
- FUCHS FD, TRAVI GM, VAZ MG, NOGUEIRA MC, SILVA MR, NERENE LL. Terapia de Reposição Hormonal pós-menopausa: Efeitos sobre os fatores de risco e incidência de doenças cardiovasculares. *Ver Pesq. Méd.*, Porto Alegre, 29(1): 37-40, 1995.
- FURCHGOTT RF, ZAWADZKI JV. The obligatory of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 288: 373-376, 1980.
- GANONG W. Fisiologia Médica. *Prentice/Hall do Brasil*. 15^a. Ed. 312-325. 1993.
- GANZ P. Vasomotor and vascular effects of hormone replacement therapy. *Am J Cardiol*. 99(suppl), 11F-16F, 2002.
- GERARD M, WALSH BW, TAWAKOL A, HALEY EA, CREAGER SJ, SEELY EW, GANZ P, CREAGER MA. Estradiol therapy combined with progesterone and endothelium-dependent vasodilatation in postmenopausal women. *Circulation*;98:1158-1163, 1998.
- GOLDIN JR & RAYMUNDO MM. Pesquisa em saúde e direito dos animais. 2^a. ed. *HCPA*, Porto Alegre, RS, 1997.
- GONZALEZ, FLECHA, B, LLESUY S, BOVERIS A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of liver, heart and muscle. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 10:41-47, 1991.
- GORODESKI GJ, YANG T, LEVY MN, GOLDFARB J, UTIAN W. Effects of estrogen in vivo on coronary vascular resistance in perfused rabbit hearts. *Am J. Physiol*. 269 (regulatory Integrative Comp. Physiol. 38): R1333-R1338, 1995.
- GORODESKI GJ, YANG T, LEVY MN, GOLDFARB J, UTIAN W. Modulation of coronary vascular resistance in female rabbits by estrogen and progesterone. *J Soc Gynecol Invest* 5:197-202, 1998.
- GOSS SPA, HOGG N, KALYANARAMAN. The effect of Nitric Oxide Release Rates on the oxidation of human low density lipoprotein. *J of Biological Chemistry*. 272(34): 21647-21653, 1997.
- GRADY D. Postmenopausal Hormones – Therapy for Symptoms only. *N Engl J Med*. 348;19 1-3, 2003.
- GRANGER, DL, ANSTEY NM, MILLER WC, WEINBERG JB. Measuring nitric oxide production in human clinical studies. *Methods in Enzymology*, 301:58-61, 1999.

GROHÉ C, KAHLERT S, LOEBBERT K, STIMPEL M, KARAS RH, VETTER H, NEYSES L. Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors. *FEBS Letters*. 416: 107-112, 1997.

GRODSTEINS F, STAMPEFER MJ, COLDITZ GA, WILLET WC, MANSON JE, JPFPE M, ROSNER B, FUCHS C, HANKINSON S, HUNTER DJ, HENNKENS C, SPEIZER F. Postmenopausal hormone therapy and mortality. *J Med* 336:1769-75, 1997.

GROUP FOR THE WOMEN'S HEALTH INITIATIVE INVESTIGATORS. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women. *JAMA*. 288(3) 321-333, 2002.

GRUBER CJ, TSCHUGGUEL W, SCHNEEBERGER C, HUBER JC. Production and Actions of Estrogens. *N Engl J Med*, Vol 346(5) 340-351, 2002.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. Oxygen Toxicity, Oxygen Radicals, Transition Metal and Disease, in *Biochem. J*. 219: 1-14, 1984.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. Free Radicals in Biology and Medicine - second edition, *Clarendon Press*, Oxford, 1995.

HARRISON DG. Perspective Series: Nitric oxide and nitric oxide synthases. cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *America Society for Clinical Investigation*, Inc. 100(9): 2153-2157, 1997.

HAUNG A, SUN D, KALEY G, KOLLER A. Estrogen preserves regulation of shear stress by nitric oxide in of female hypertensive rats. *Hypertension* Jan;31(1):309-14, 1998.

HAYASHI T, FUKUTTO JM, IGNARRO LJ, CHAUDHURI G. Basal release of nitric oxide from aortic rings is greater in female rabbits than male rabbits: implications for atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:11259-11263, 1992.

HEARSE DJ, GARLICK PB, HUMPHREY SM. Ischemic Contracture of the Miocardium: Mechanism and Prevention. *Am. J. Cardiol*. 39: 986-993, 1977.

HERNÁNDEZ I, DELGADO JL, DÍAZ J, QUESADA T, TERUEL MJG, LLANOS MC, CARBONELL LF. 17 β -Estradiol prevents oxidative stress and decreases blood pressure in ovariectomized rats. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*. 279:R1599-R1605, 2000.

HIRVONEN E, CACCIATORE B, WAHLSTRÖM T, RITA H, WILÉ-ROSENQVIST. Efeitos da Terapia com estrogênio Transdérmico em mulheres na Pós-menopausa: Estudo comparativo entre o Gel de Estradiol e u Adesivo de Liberação de Estradiol. *Br. J. Obstet Gynaecol.*, 104(Suppl. 16):26-31,1997.

HUA C, HARRISON DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*. 87(10): 840-844, 2000.

HUANG A, SUN D, KALEY G, KOLLER A. Estrogen Preserves Regulation of shear stress by nitric oxide in arterioles of female hypertensive rats. *American Heart Association*. 31(2): 309-314, 1998.

HUGEL S, NEUBAUER S, LIE SZ, ERNST R, HORN M, SCHIMIDT HHW, ALLOLIO B, REINCKE M. Multiple mechanisms are involved in the acute vasodilatory of 17 β -estradiol in the perfused rat heart. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 33(6): 852-858, 1999.

IDE T, TSUTSUI H, OHASHI N, HAYASHIDANI S, SUEMATSU N, TSUCHIHASHI M, TAMAI H, TAKESHITA A. Greater oxidative stress in healthy young men compared with premenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 22(3): 438-42, 2002.

IMTHURN B, ROSSELLI M, JAEGER AW, KELLER PJ, DUBEY RK. Differential effects nitric oxide (Nitrite/Nitrate) levels in Postmenopausal Women Substituted with 17 β -estradiol Valerate end Cyproterone Acetate or Medroxyprogesterone Acetate. *J. Clin Endocrinology Metabolism*. 82:388-394, 1997.

JANISZEWSKI M, SOUZA HP, LIU X, PEDRO MA, ZWEIER JL, LAURINDO FRM. Overestimations of NADH-driven vascular oxidase activity due to lucigenin artifacts. *Free Radical Biology & Medicine*. 32(5), 446-453, 2002.

JIANG CW, SARREL PM, LINDSAY DC, POOLE WPA, COLLINS P. Endothelium-independent relaxation of rabbit coronary artery by 17 β -estradiol in vitro. *Br J Pharmacol*. 104:1033-7, 1991.

KAISER S, DI MASCIIO, P, MURPHY M & SIES H. Physical and Chemical Scavenging of Singlet Molecular Oxygen by Tocopherols. *Arch. Biochem. Biophys*. 277(1): 101-108, 1990.

KAROUI H, HOGG N, KALYANARAMAN B. Effect of superoxide dismutase mimics on radical adduct formation during the reaction between peroxynitrite and thiols—na ESR-spin trapping study. *Arch Biochem Biophys*. 330(1): 115-24, 1996.

KATZENELLENBOGEN BS, CHOI I, DELAGE-MOURROUX R, EDIGER TR, MARTINI PGV, MONTANO M, SUN J, WEIS K, K JA. Molecular mechanisms of estrogen actions: selective ligands and receptor pharmacology. *Journal of Steroids Biochemistry & Molecular Biology*. 74: 270-285, 2000.

KIM TD, CHEN B, BEAUREGARD J, KOURETAS P, THOMAS G, FARHAT MY, MYERS AK, LEES DE. 17 β -estradiol prevents Dysfunction of Canine Coronary Endothelium and Myocardium and Reperfusion Arrhythmias After Brief Ischemia/Reperfusion. *Circulation*. 94: 2901-2908, 1996.

KOH KK, JIN DK, YANG SH, LEE SK, HWANG HY, KANG MH, KIM W, KIM DX, CHOI IS, SHIN EK. Vascular effects of synthetic or natural progestagen combined with equine estrogen healthy postmenopausal women. *Circulation*. 103:1961-1966, 2001.

KRINSKY NI. Antioxidant Functions of Carotenoids. *Free Rad. Biol. & Med*. 7: 617-635, 1989.

- KUHL H. Cardiovascular effects and estrogen/progestagen substitution therapy. *Ther-umsch.* 51(11): 148-154, 1995.
- LANGENDORFF O. Untersuchungen am überlebender saugthierherzen. *Phlüegers Arch. Physiol.* 61:291-332, 1895.
- LEVIN ER. Estrogen- β and the cardiovascular system. *Trends in Endocrinology & metabolism.*13(5):184-185, 2002.
- LIOCHEV SI, FRIDOVICH I. Lucigenin (Bis-N-methylacridinium) as a mediator of Superoxide Anion Production. *Archivies of Biochemistry and Biophysics.* 337(1): 115-120, 1997.
- LLESUY, S.F.; MILEI, J.; MOLINA, H.; BOVERIS, A.; MILEI, S. Comparision of Lipid Peroxidation and Myocardial Damage Induced by Adriamycin and 4'-epiadrimicin in Mice. *Tumori*, 71:241-249, 1985.
- LOBO RA. Absortion and metabolic effects of different types of estrogens and progestogens. *Obestet Gynecol Clin North Am.* 14:143-68, 1987.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, A.L.; FARR, A.L.; RANDALL, R. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275, 1951.
- LUTOSLAWSKA G, TKACZK J, PANCZENKO-KRESOWSKA B, HÜBNER-WOZNIAK E, SKIERSKA E, GAJEWSKI AK. Plasma TBARS, blood GSH concentrations, and erythrocyte antioxidant enzyme activities in regulatory menstruating women with ovulatory and anovulatory cycles. *Clinica Chimica Acta.* 331: 159-163, 2003.
- MACHLIN L & BENEDICH A. Free Radical Tissue Damage: Protective Role of Antioxidant Nutrientes, in : *FASEB J.* 1: 441-445. 1987
- MANNERVIK B, GLUTHENBERG C. Glutathione Transferase. *Methods in Enzymology*, 77:231-235, 1981.
- MANSON J, HSIA J, JOHNSON K, ROSSOUW JE, ASSAF A, LASSER N, TREVISAN M, BLACK H, HECKBERT SR, DETRANO R, STRICKLAND OL, WONG ND, CROUSE J, STEIN E, CUSHMAN M, FOR THE WOMEN'S HEALTH INITIATIVE INVESTIGATORS. *N Engl J Med.* 349(6) 523-34, 2003.
- MARKLUND, S. *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research.* Boca Raton. *CRC Press.* 243-247, 1985.
- MARSLEW U, RIIS BJ & CHRISTIANSEN C. Bleeding patterns during continues combined estrogen-progestogen therapy. *Am J Obestet Gynecol* 164:1163-8, 1991
- MASSAFRA C, GIOIA D, FELICE CD, PICCIOLINI E, DE LEO V, BONIFAZI M, BERNABEI A. Effects of estrogens and androgens on erythrocyte antioxidant superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities during the menstrual cycle. *Journal of Endocrinology* 167, 447-452, 2000.

- MAXWELL SR. Can antioxidants prevent ischemic heart disease? *J Clin Pharm Ther.* 18(2): 85-95,1993.
- MC CORD, J.M. Oxygen-derived Free Radicals in postischemic injury. *New Engl. J. Med.* 312 (3): 159-163, 1985.
- MCHUGH NA, MERRIL GF, POWELL SR. Estrogen diminishes postischemic hydroxyl radical production. *Am J Physiol* 274:H1950-1954, 1998.
- MEERSON FZ, KAGAN VE, KOSLOV YP, BELKINA LM, & ARKIPENKO YV. The role of lipid peroxidations in pathogenesis of ischemic damage and the antioxidant protection of the heart. *Basic Res. Cardiol.* 77:465-485, 1982.
- MICHEL T, FERON O. Perspective Series: Nitric Oxide and Nitric Oxide Synthases. Nitric Oxide Synthases: Which, Where, How, and Why?. *America Society for Clinical Investigation, Inc.* 100(9): 2146-2152, 1997.
- MILLER VM. Gender, Estrogen, and NOS. Cautions about Generalizations. *Cir Res.* 85:979-981, 1999.
- MILLS GCJ. Glutathione peroxidase and the destruction of hydrogen peroxide in animal tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* 86: 1-5, 1960.
- MILLS GCJ. Glutathione peroxidase and erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *Biol. Chem.* 229: 189-197, 1957
- MILSTED A, MARCELO C, TURNER ME, and ELY DL. Female Wistar-Kyoto and SHR/y rats have the same genotype but different patterns of expression of rennin and angiotensinogen. *J Hypertens* 16:823-828, 1998.
- MONCADA S, PALMER R.M.J, HIGGS E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Ver.* 43: 109-142, 1991.
- MOOREN MJVD. Hormonal Replacement Therapy (HRT). *Eur Menopause J.* 3(1):34-36, 1996.
- MORGAN-MARTINS MI. Variação sazonal do estresse oxidativo no molusco *Megalobulimus oblongus* e ratos Wistar. Dissertação de Mestrado. *Departamento de Fisiologia – UFRGS.* 155pp, 1997.
- MOSCA L, COLLINS P, HERRINGTON DM, MENDELSON ME, PASTENAK RC, ROBERTSON RM, SCHENCK-GUSTAFSSON K, SMITH SC, TAUBERT KA, WENGER NK. Hormone Replacement Therapy and Cardiovascular Disease. A Statement for Healthcare Professionals from the American Heart Association. *Circulation.* 104: 499-503, 2001.
- NABULSI AA, FOLSOM AR, WHITE A et al.: Association of hormone-replacement therapy with various cardiovascular risk factors in postmenopausal women. *N Engl J Med* 328:1069-75, 1993.
- NICKENING G, BÄUMER AT, GROHÉ C, KAHLERT S, STREHLOW K, ROSENKRANZ S, STÄBELIN A, BECKERS F, SMITS J, DAEMEN M, VETTER H,

and BÖHM M. Estrogen modulates AT₁ receptor gene expression in vitro and vivo. *Circulation* 97:2197-2201, 1996.

NIKI E, NAKANO M. Estrogens as Antioxidants. *Methods in Enzymology*. Vol 186, 330-333, 1990.

NOHL H. Nitric oxide and related radicals. *Free Radicals : Form Basic Science to Medicine*. 38-46, 1993.

NODE K, KITAKAZE M, KOSAKA H, MINAMINO T, FUNAYA H, HORI M. Amelioration of ischemia- and reperfusion-induced myocardial injury by 17beta-estradiol: role of nitric oxide and calcium-activated potassium channels. *Circulation* 96:1953-1963, 1997.

OBERLEY TD, SHULTZ JL, OBERLEY LW. In vivo modulation of antioxidant enzyme levels in normal hamster kidney and estrogen-induced kidney tumor. *Free Rad Biol Med*. 16: 741-751, 1994.

OGE A, SEZER ED, OZGONUL M, BAYRAKTAR F, SOZMEN EY. The effects of estrogen and raloxifene treatment on the antioxidant enzymes and nitrite-nitrate levels in brain cortex of ovariectomized rats. *Neurosci Lett* 338(3): 217-20, 2003.

OLSZEWER E. *Radicais Livres em Medicina*. São Paulo: *Fundo Ediorial BYK*, 122p, 1992.

OSÓRIO-WENDER MC, VITOLA D & SPRITZER PM: Percutaneous 17β-estradiol replacement therapy in hypertensive post-menopausal women. *Braz J Med Biol Res* 30:1947-53, 1997.

OZGONUL M, OGE A, SEZER ED, BAYRAKTAR F, SOZMEN EY. The effects of estrogen and raloxifene treatment on antioxidant enzyme in brain and liver of ovariectomized female rats. *Endocr Res*. 29(2): 183-9, 2003.

POTHIN H. Alterações mecânicas, metabólicas e enzimáticas induzidas por peróxido de hidrogênio ou isquemia-reperusão no coração de rato. *Tese de doutorado. Departamento de Fisiologia –UFRGS*. 1-181, 1999.

PRIOR JC, VIGNA YM, SCHECHTER ME & BURGESS AR: Spinal bone loss and ovulatory disturbances. *N Engl J Med* 323:386-98, 1990.

RAZ R & STAMM WE: A controlled trial of intravaginal estriol in postmenopausal women with recurrent urinary tract infections. *N. Engl J Med* 329:753-6, 1993.

RÖMER W, OETTEL M, MENZENBACH B, DROESCHER P, SCHWARTZ S. Novel estrogens and their radical scavenging effects, iron-chelating, and total antioxidative activities: 17α-substituted analogs of ∇9(11)-dehydro-17β-estradiol. *Steroids* 62:688-694, 1997.

ROSSANO GMC, SARREL PM, POOLE-WILSON P, COLLINS P. Beneficial effect of estrogen on exercise-induced myocardial Ischaemia in women with coronary artery disease. *Lancet*. 342: 133-36, 1993.

ROSSELI M, IMTHURN B, MACAS E, KELLER PJ, DUBEY RK. Circulating nitrite/nitrate levels increase with follicular development: indirect evidence for estradiol mediated NO release. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 202: 1543-1552, 1994.

SALEH TM, CONNELL BJ, SALEH MC. Acute injection of 17 β -estradiol enhances cardiovascular reflexes and autonomic tone in ovariectomized female rats. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 84: 78-88, 2000.

SCHUNKERT H, DANSER AHJ, HENSE HW, DERKX FHM, KURZINGER SBS, RIEGGER G. Effects of Estrogen Replacement Therapy on the Renin-Angiotensin System in Postmenopausal Women. *American Heart Association, Inc.* 95(1): 39-45, 1997.

SHARKEY LC, HOLYCROSS BJ, et al. Effect of Ovariectomy and Estrogen Replacement on Cardiovascular Disease in Heart Failure-Prone SHHF/Mcc-fa^{cp} Rats. *J Mol Cell Cardiol* 31, 1527-1537, 1999.

SIES H & MURPHY ME. Role of Tocopherols in the protection of Biological Against Oxidative Damage. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* 8: 211-224, 1991.

SIMPKINS JW, GREEN OS, GRIDLEY KE, SINGH M, FIEBRE NEC, RAJAKUMAR G. Role of Estrogen Replacement Therapy in Memory Enhancement and the Prevention of Neuronal Loss Associated with Alzheimer's Disease. *Am J Med.* 103(3A):19S-25S, 1997.

SLEZAK J, TRIBULOVA L, PRISTOKAVA K, UHRIK B, THOMAS T, KHPER N, KAUL N & SINGAL PK. Hydrogen peroxide changes in ischemic and reperfused heart. Cytochemistry and biochemical and X-ray microanalysis. *Am. J. Pathol.* 147: 772-781, 1995.

SMITH PJW, ORNATSKY O, STEWART DJ, PICARD P, DAWOOD F, WEN WH, LUI P, WEBB DJ, MONGE JC. Effects on Estrogen Replacement on Infarct Size, Cardiac Remodeling, and Endothelin System After Myocardial Infarction in Ovariectomized Rats. *Circulation.* 102:2983-2989, 2000.

SOUTHORN P & POWIS G. Free Radicals in Medicine. I. Chemical Nature and Biologic Reactions, in: *Mayo Clin Proc.*, 63: 381-389, 1988.

SOWERS, JR. Hypertension, Angiotensin II, and Oxidative stress. *The New England Journal of Medicine.* 346(25): 1999-01, 2002.

SPRITZER PM, REIS FM. Reposição Hormonal no Climatério: Princípios Terapêuticos Embasados em Evidências. *Reprod Clim* 13(1): 32-41, 1998.

STAMPFER MJ, COLDITZ GA, WILLETT WC, MANSON JE, ROSNER B, SPEIZER FE et al. Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease. Ten-year follow-up from the nurses' health study. *New Engl J Med* 325:756-762, 1991.

STEFAN IL & FRIDOVICH I. Lucigenin (Bis-N-methylacridinium as a mediator of superoxide anion production. *Achivies of Biochemistry and Biophysics.* 337(1): 115-120, 1997.

STREHLOW K, ROTTER S, WASSMANN S, ADAM O, GROCHE C, LAUFS K, BOHM M, NICKENING G. Modulation of antioxidant enzyme expression function by estrogen. *Circ Res.* 25:93(2): 170-7, 2003.

SUBBIAH MTR. Estrogen replacement therapy and cardioprotection: mechanisms and controversies. *Brazilian J Medical and Biological Research.* 35: 271-276, 2002.

SUDOH N, TOBA K, AKISHITA M, AKO J, HASHIMOTO M, IJIMA K, KIM S, LIANG YQ, OHIKE Y, WATANABE T, YAMAZAKI I, YOSHIZUMI M, ETO M, OUCHI Y. Estrogen Prevents Oxidative Stress-induced Endothelial Cell Apoptosis in Rats. *Circulation.* 103: 724-729, 2001.

SULIVAN JL. Antioxidants Effects of Iron Depletion. *Free Radical Biology & Medicine.* Vol 17 n^o 1, pp 87, 1994.

TAM NM, GHATAK S, HO SM. Sex hormone-induce alterations in the activities os antioxidant enzymes and lipid peroxidation status in the prostate of Noble rats. *Prostate.* 1;55(1): 1-8, 2003.

TIIDUS, P.M. Can estrogens diminish exercise induced muscle damage? *Can.J.Appl.Physiol.* 20(1): 26-38, 1995

THIBODEAU PA, KACHADOURIAN R, LEMAY R, BISSON M, DAY BJ, PAQUETTE B. In vitro pro- and antioxidant properties of estrogens. *Jornal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology.* 81: 227-236. 2002.

THOMPSON LP, PINKAS G, WEINER CP. Chronic 17- β estradiol replacement Increases Nitric Oxide-Mediated Vasodilation of Guinea Pig coronary Microcirculation. *Circulation.* 102:445-451, 2000.

URBANETZ AA, URBANETZ LAGLT, BAÚ C, MICHELON L, SOLEDAD P. TRH na prevenção de Doença Cardíaca coronariana. Aspectos Clínico-Epidemiológicos da TRH sobre o Sistema Cardiovascular. *Departamento de Togoginecologia Universidade Federal do Paraná. Feminina* abril 26(3):181-7, 1998.

UTIAN WH. Current perspectives in the management of the menopausal and postmenopausal patient: introduction. *Obestet Gynecol* 75(suppl. 4):1-2, 1987.

VÁSQUEZ-VIVAR J, HOGG N, MARTÁSEK P, KAROUI H, PRITCHARD KA, KALYANARAMAN B. Tetrahydrobiopterin-dependet inhibition of superoxide generation from neuronal nitric oxide synthase. *J pf Biological Chemistry.* 274(38): 26736-26742, 1999.

VAN-BUREN GA, YANG DS, CLARK KE. Estrogen-induced uterine vasodilation is antagonized by L-nitroarginine methyl ester, na inhibitor of nitric oxide synthesis. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 167: 828-833, 1992.

WAYNFORTH HB, FLECKNELL PA. Experimental and Surgical Technique in the Rat. *Academic Press London,* 1992.

WENDEL, A . Glutathione peroxidase. *Meth. Enzymol.* 77: 325-333, 1981.

WENDER MCO. Uso do 17β -estradiol percutâneo em pacientes pós-menopáusicas hipertensas. *Dissertação de Mestrado. UFRGS*, 1993.

YSUBBIAH MTR. Estrogen replacement therapy and cardioprotection: mechanisms and controversies. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 35: 271-276, 2002.

YU BC. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* 74:139-162, 1994.

ZALBA G, GORKA J, MORENO MU, FORTUÑO MA, FORTUÑO A, BEQUIMONT FJ, DÍEZ J. Oxidative stress in arterial hypertension: role of NAD(P)H oxidase. *Hypertension*. 38(6): 1395-1399, 2001.

ZHU TB, CONNEY AH. Functional role of estrogen metabolism en target cells: review and perspectives. *Carcinogenesis* vol19 no.1 pp1-27, 1998.

MENSAGEM FINAL

*“Ainda que eu falasse as línguas dos homens
e dos anjos, se não tiver amor,
serei como o bronze que soa, ou como
o címbalo que retine.*

*Ainda que eu tenha o dom de profetizar
e conheça todos os mistérios e toda a ciência;
ainda que eu tenha tamanha fé, a ponto
de transportar montanhas,
se não tiver amor, nada serei.*

*E ainda que eu distribua todos os
meus bens entre os pobres
e ainda que entregue meu próprio
corpo para ser queimado,
se não tiver amor,
nada disso me aproveitará.*

*O amor é paciente, é benigno,
o amor não arde em ciúmes,
não se ufana, não se ensoberbece,
não se conduz inconvenientemente,
não procura seus interesses,
não se exaspera,
não se ressentido do mal;
não se alegra com a injustiça,
mas regozija-se com a verdade.
Tudo sofre, tudo crê, tudo espera,
Tudo suporta.*

*O amor jamais acaba.
Mas, havendo profecias, desaparecerão;
havendo línguas, cessarão;
havendo ciência, passará.
Porque em parte conhecemos,
e em parte profetizamos.
Quando, porém, vier o que é perfeito,
o que então é em parte será aniquilado.*

*Quando eu era menino, falava como um
menino, sentia como um menino.
Quando cheguei a ser homem,
Desisti das coisas próprias de menino.*

*Porque agora vemos como em espelho,
obscuramente, e então veremos face a face;
agora conheço em parte, e então
conhecerei como sou conhecido.*

*Agora, pois, permanecem a Fé,
a Esperança, e o Amor.
Estes três.
Porém, o maior é o **Amor.**”*