

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde - ICBS
Departamento de Fisiologia
Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

**INFLUÊNCIA DO ÓXIDO NÍTRICO NA RESPOSTA À ISQUEMIA-REPERFUSÃO
EM RATAS SOB DISTINTAS CONCENTRAÇÕES ESTROGÊNICAS**

Paulo Cavalheiro Schenkel

Orientadora: Dra. Adriane Belló Klein

Porto Alegre, outubro de 2006.

AGRADECIMENTOS

A meus pais, Pedro Julio Schenkel e Odete Cavalheiro Schenkel, pelo exemplo a seguir, aposta e preocupação para que o rumo certo fosse traçado e seguido.

À minha noiva Graziela, companheira de todas as horas, pelo apoio e compreensão nos momentos mais difíceis e pelas ausências.

À minha avó Maria Luiza e meus irmãos André e Aline, pelo carinho e motivação.

À professora Adriane Belló Klein, minha orientadora, incansável na busca e no aperfeiçoamento do conhecimento. Pesquisadora exemplar, um estímulo para seus alunos.

À técnica Tânia Regina Gattelli Fernandes pelo apoio na pesquisa e pelas horas de bom humor e sorrisos.

Aos bolsistas de iniciação Rafael Oliveira Fernandes e Vinícius Urbano Viegas pela ajuda nos experimentos, paciência e amizade.

A todos colegas do laboratório pela amizade e excelente convívio durante a realização do trabalho.

RESUMO

O estrogênio, principal hormônio sexual feminino, tem importante papel na regulação da contratilidade miocárdica e função vascular. A escassez estrogênica esta associada ao aumento do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares em mulheres. Uma vez que o estrogênio tem capacidade antioxidante e age estimulando tanto a síntese, quanto a liberação do óxido nítrico (NO), um potente vasodilatador, buscou-se verificar qual a influência dessas propriedades do estrogênio na contratilidade cardíaca e na função coronariana. Para isso foram utilizadas 29 ratas Wistar ($\pm 200g$) divididas em 3 grupos: SHAM, o qual foi submetido à cirurgia fictícia (*sham operation*) de ovariectomia bilateral; OVX, que foi ovariectomizado e OVX+RH, que foi ovariectomizado e recebeu reposição estrogênica. Os grupos foram subdivididos em 2 sub-grupos para o procedimento de perfusão do coração isolado, de acordo com a solução utilizada (TYRODE ou TYRODE+LNAME). Sete dias após cirurgia de ovariectomia ou simulação da mesma, foi iniciada a reposição hormonal com a implantação de cápsulas preenchidas com 17β -estradiol (5%(p:v)) ou apenas óleo de girassol (grupos SHAM e OVX). A reposição persistiu por 21 dias e, ao término desse período, foi iniciada a determinação do ciclo estral nas ratas não submetidas à OVX. Foram utilizadas no experimento as ratas que se encontravam na fase do diestro. Feito isso, foi coletado sangue pelo plexo retroorbital, sob anestesia etérea, de todos os animais e, em seguida, eles foram mortos por deslocamento cervical e iniciado protocolo de isquemia-reperfusão. Esse protocolo consistiu de estabilização por 20 minutos, seguida de isquemia global normotérmica por 30 minutos e perfusão por 20 minutos. Foram avaliados os seguintes parâmetros: frequência cardíaca (FC), pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE), pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE), índice de contratilidade (+dP/dt), índice de relaxamento (-dP/dt) e pressão de perfusão (PP). Ao término do protocolo, os corações foram pesados e preparados para análise das concentrações de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e nitratos totais (NO_3^-), além da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). A concentração plasmática de 17β -estradiol no grupo SHAM foi de $30,7 \pm 5,6$ pg/ml. A OVX bilateral diminuiu em 53% a concentração estrogênica e a reposição hormonal aumentou 343% em relação ao grupo OVX as concentrações desse hormônio, comprovando a eficácia da reposição hormonal. A PP mostrou variação semelhante a atividade da CAT e oposta as concentrações de NO_3^- e H_2O_2 . Ao ser perfundido com TYRODE, o grupo OVX apresentou PP e atividade da CAT elevadas (28% e 20%, respectivamente) e menores concentrações de NO_3^- e H_2O_2 (ambos 35%) em relação ao SHAM. Nos animais que receberam reposição hormonal, esses parâmetros foram parcialmente restabelecidos. Quando perfundidos com LNAME, foi observado, nos animais SHAM e OVX+RH, concentrações de NO_3^- (22% e 18%, respectivamente) e H_2O_2 (36% e 30%, respectivamente) diminuídas e aumento na PP (54% e 22%, respectivamente) e CAT (19% e 31%, respectivamente) em relação aos mesmos grupos perfundidos

com TYRODE. OVX-LNAME apresentaram menor contratatura cardíaca isquêmica que os demais grupos. Não foram observadas diferenças significativas nos outros parâmetros hemodinâmicos, assim como na atividade da SOD, entre os demais grupos experimentais. Na ausência de estrogênio parece não haver uma dependência do NO na modulação do tônus vascular coronariano. Além do mais, parece haver uma influência desse vasodilatador no desenvolvimento da contratatura cardíaca isquêmica nos animais ovariectomizados. Possivelmente o balanço desregulado entre pró e antioxidantes promova adaptações que alterem as respostas cardiovasculares à isquemia-reperfusão.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Estrogênio	10
1.2 Ovariectomia	11
1.3 Estrogênio e função cardiovascular	12
1.4 Estresse oxidativo	16
1.5 Estresse oxidativo e contratatura isquêmica	19
1.6 Estresse oxidativo e estrogênio	20
1.7 Reposição estrogênica.....	21
2. OBJETIVO.....	23
2.1 Objetivo geral	23
2.2 Objetivos específicos	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Animais	24
3.2 Ovariectomia bilateral	25
3.3 Reposição estrogênica.....	26
3.4 Determinação do ciclo estral	26
3.5 Coleta de sangue e dosagem hormonal	27
3.6 Perfusão do coração isolado.....	28

3.7 Soluções de perfusão	33
3.8 Protocolo experimental	33
3.9 Preparo dos homogeneizados de tecido cardíaco	34
3.10 Quantificação de proteínas	35
3.11 Enzimas antioxidantes	36
3.11.1 Superóxido dismutase	36
3.11.2 Catalase	37
3.12 Determinação de nitritos e nitratos.....	38
3.13 Medida de peróxido de hidrogênio	39
3.14 Análise estatística	39
4. RESULTADOS	41
4.1 Dosagem hormonal e peso corporal	41
4.2 Perfusão do coração isolado.....	41
4.3 Metabolismo do óxido nítrico e concentração de peróxido de hidrogênio	46
4.4 Atividade das enzimas antioxidantes.	48
5. DISCUSSÃO	50
6. CONCLUSÃO.....	56
7. LIMITAÇÕES DO ESTUDO	58
8. REFERÊNCIAS.....	59

LISTA DE TABELAS

- Tabela I: Frequência cardíaca (FC), pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE), pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE), índice de contratilidade (+dP/dt), índice de relaxamento (-dP/dt) nos distintos grupos experimentais ao final da estabilização.42
- Tabela II: Frequência cardíaca (FC), pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE), pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE), índice de contratilidade (+dP/dt), índice de relaxamento (-dP/dt) nos distintos grupos experimentais ao final da reperfusão.43
- Tabela III: Atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) no homogeneizado cardíaco dos distintos grupos experimentais ao final da reperfusão.49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Estrutura dos estrogênios endógenos.....	10
Figura 1.2: Esquema da produção de espécies reativas de oxigênio..	17
Figura 3.1: Procedimento da cirurgia de castração.....	26
Figura 3.2: Esquema da posição do balonete no ventrículo esquerdo.....	29
Figura 3.3: Esquema da perfusão coronariana.	30
Figura 3.4: Esquema do sistema de perfusão Langendorff.....	32
Figura 3.5: Protocolo de perfusão do coração isolado	34
Figura 4.1: Pressão de perfusão coronariana (PP) em mmHg de ratas dos distintos grupos experimentais ao final da reperfusão	44
Figura 4.2: Pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE) em mmHg de ratas dos distintos grupos experimentais ao final da estabilização	45
Figura 4.3A: Concentração de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂), em µmol/g tecido, de fatias ventriculares de ratas dos respectivos grupos experimentais ao final da reperfusão..	47
Figura 4.3B: Concentração de nitratos totais (NO ₃ ⁻), em mmol/L, no homogeneizado cardíaco de ratas dos respectivos grupos experimentais ao final da reperfusão.	47

LISTA DE ABREVIATURAS

SHAM: Cirurgia fictícia de ovariectomia bilateral
OVX: ovariectomia bilateral
OVX+RH: ovariectomia bilateral + reposição hormonal
TYRODE: solução de perfusão controle
LNAME: N^G-nitro-L-arginina metil éster
SHAM-TYRODE: cirurgia fictícia perfundido com TYRODE
SHAM-LNAME: cirurgia fictícia perfundido com LNAME
OVX-TYRODE: ovariectomia bilateral perfundido com TYRODE
OVX-LNAME: ovariectomia bilateral perfundido com LNAME
OVX+RH-TYRODE: ovariectomia bilateral + reposição hormonal perfundido com TYRODE
OVX+RH-LNAME: ovariectomia bilateral + reposição hormonal perfundido com LNAME
TRH: terapia de reposição hormonal
ER α : receptor estrogênico α
ER β : receptor estrogênico β
HDL: lipoproteína de alta densidade
LDL: lipoproteína de baixa densidade
RL: radical livre
ERO: espécie reativa de oxigênio
e⁻: elétrons
O₂⁻: ânion radical superóxido
H₂O₂: peróxido de hidrogênio
SOD: superóxido dismutase
CAT: catalase
GPx: glutathione peroxidase
NO: óxido nítrico
NOS: óxido nítrico sintase
NO₂⁻+NO₃⁻: nitritos e nitratos
FC: frequência cardíaca
PSVE: pressão sistólica do ventrículo esquerdo
PDFVE: pressão diastólica final do ventrículo esquerdo
+dP/dt: índice de contratilidade do ventrículo esquerdo
-dP/dt: índice de relaxamento do ventrículo esquerdo
PP: pressão de perfusão
PAM: pressão arterial média
DPM: desvio padrão da média

1. INTRODUÇÃO

1.1 ESTROGÊNIO

Os hormônios sexuais femininos, principalmente o estrogênio, vêm sendo objetivo de diversos estudos, em especial utilizando a terapia de reposição hormonal (TRH) (HERNÁNDEZ et al., 2000; BARP et al., 2002; MORGAN-MARTINS, 2003).

Os estrogênios naturalmente sintetizados são o 17β -estradiol, a estrona e o estriol. Esses, nas mulheres, são sintetizados principalmente pelas células da teca e da granulosa dos ovários e são derivados do colesterol. A molécula do colesterol sofre uma série de modificações, incluindo a clivagem da ramificação no C17, a partir da ação da enzima citocromo P450, sendo a aromatização um passo fundamental. O complexo enzimático P450 catalisa a formação de estrogênios a partir dos precursores androstenediona e testosterona (Figura 1.1).

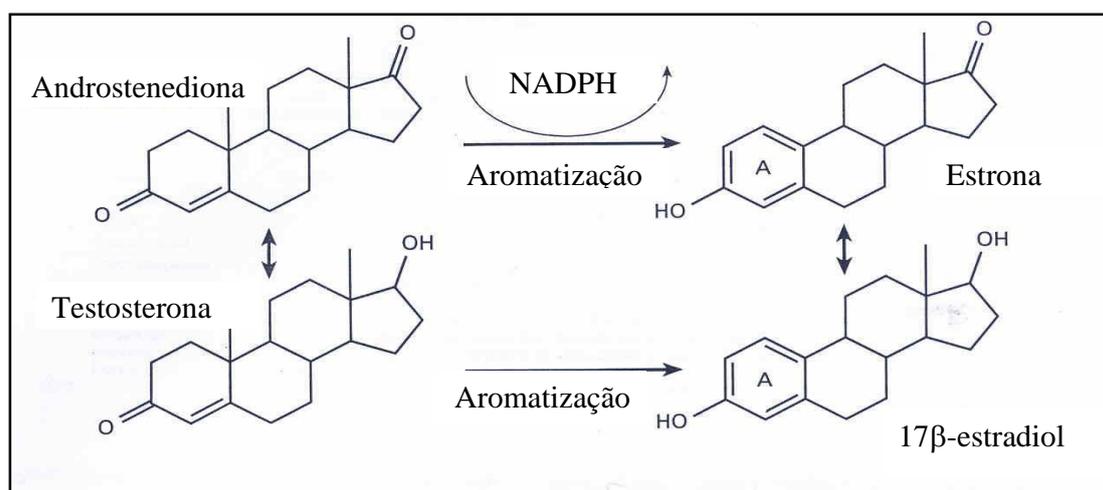


Figura 1.1: Androstenediona e testosterona como precursores dos estrogênios. O complexo enzimático P450 monooxigenase aromatase catalisa sua conversão para estrogênio (Adaptado de Gruber et al., 2002).

Além da síntese estrogênica ovariana, ela também pode ocorrer em outros tecidos como, por exemplo, cérebro, próstata, útero e glândulas mamárias. Por ser derivado do colesterol, o estrogênio tem característica lipofílica e, assim, tem facilidade de atravessar a membrana celular e ligar-se a seu receptor no citosol ou no núcleo celular (GRUBER et al., 2002).

Existem dois tipos de receptores estrogênicos: receptor α (ER α) e receptor β (ER β). Esses são homólogos e estão localizados em diversos tecidos-alvo como, por exemplo, no miocárdio, nas células do músculo liso e nas células endoteliais das artérias. O ER β é o mais expresso e que desempenha papel mais importante, principalmente nos vasos sanguíneos. Essa localização dos receptores estrogênicos indica uma possível influência desse hormônio na função cardiovascular (LEVIN, 2002).

1.2 OVARECTOMIA

Efeitos da diminuição estrogênica podem ser observados em fêmeas na menopausa ou quando realizada ovariectomia (OVX) bilateral. Normalmente, os níveis de estrogênio diminuem gradativamente nas mulheres. Aproximadamente aos 45-50 anos de vida surgem irregularidades na frequência dos ciclos menstruais, período conhecido como climatério. A partir do momento em que não há mais menstruação, inicia-se o período da menopausa. Esse período, está associado ao diminuto número de óvulos nos ovários ou até mesmo sua escassez, além de baixas concentrações estrogênicas.

Sabe-se que, em ratas Wistar, a ovariectomia bilateral promove a diminuição das concentrações de 17β -estradiol a valores muito baixos, já ao final do 7º dia após esse procedimento cirúrgico, simulando a menopausa (BARP et al., 2002). Uma vez que o estrogênio parece ter importante ação biológica, a diminuição estrogênica pode levar ao surgimento de sintomas nos tecidos-alvo (LEVIN, 2002).

Com a progressiva diminuição estrogênica pelo avançar da idade ou pela retirada dos ovários, perde-se os efeitos benéficos desse hormônio esteróide como, por exemplo, diminuição das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), aumento das lipoproteínas de alta densidade (HDL) e ação antioxidante. Desta forma, aumentam os riscos de eventos vasculares, em especial coronarianos. Quanto mais precoce for a menopausa, maiores os riscos de eventos coronarianos (van der SCHOUW et al., 1996).

Além desses efeitos, baixas concentrações de estrogênio dificultam a modulação do tônus vascular, especialmente nas coronárias, por estar associada à diminuição no metabolismo do NO (HERNÁNDEZ et al., 2000; BIANCHI et al., 2006).

1.3 ESTROGÊNIO E FUNÇÃO CARDIOVASCULAR

A ação estrogênica na regulação da função cardiovascular ainda não é totalmente compreendida. Sabe-se que ele age na modulação do tônus vascular, porém os mecanismos pelos quais faz isso ainda são incertos. A estimulação dos receptores estrogênicos ($ER\alpha$ e $ER\beta$) desencadeia respostas em diferentes

tecidos-alvo por regulação da transcrição de diferentes genes (KATZENELLENBOGEN et al., 2000).

Esse tipo de resposta genômica pode demorar de horas a dias para desencadear o efeito desejado, por isso é conhecida como uma resposta lenta. A exposição crônica ao estradiol promove uma *up-regulation* na expressão da enzima que catalisa a síntese do óxido nítrico, a óxido nítrico sintase (NOS) (KLEINER et al., 1998).

Por outro lado, o estrogênio pode também desencadear uma resposta rápida (não genômica), como, por exemplo, a estimulação das células endoteliais para liberação do NO (FUKUHARA et al., 2006).

Portanto, o estrogênio pode agir como um vasodilatador por diferentes mecanismos: genômicos e não genômicos. A estimulação rápida e a lenta promovem vasodilatação por desencadarem respostas tanto nas células endoteliais como nas células do músculo liso vascular. Santos et al. (2004) verificaram que o estrogênio, quando administrado em *bolus* nas coronárias do coração isolado de ratas, atua modulando o tônus desses vasos tanto pela liberação de NO, como pela liberação de prostaciclina, pela ação de fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio, como também pela ação direta no músculo liso vascular. No entanto, a influência na liberação do NO, que é um potente vasodilatador dependente do endotélio, é a mais estudada e discutida.

Óxido nítrico, que é um gás extremamente lábil e reativo, teve sua ação descoberta por Furchgott e Zawadzki em 1980. Ele é formado pela quebra de L-arginina em L-citrulina, reação que é catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) (MICHEL & FERON, 1997). A NOS apresenta 3 isoformas: neuronal

(nNOS) com importante expressão nas células do músculo esquelético; a induzível (iNOS) 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 endotelial (eNOS) encontrada em miócitos cardíacos, plaquetas, cérebro, e que tem fundamental importância na regulação do tônus vascular (MICHEL & FERON, 1997; MILLER, 1999; HARRISON, 1997).

As fêmeas parecem ter maior liberação de NO que os machos, provavelmente pela ação estrogênica. Uma vez retirada a influência desse hormônio esteróide, a liberação de NO, em aortas isoladas, fica semelhante entre ambos os sexos (KAUSER & RUBANYI, 1994).

Tendo em vista que existe uma dependência da enzima NOS na formação de NO, é evidente que o bloqueio dessa enzima iniba a vasodilatação. Santos et al. (2004), ao estudarem a resposta de relaxamento promovida pelo 17 β -estradiol nas artérias coronárias do coração isolado de ratos Wistar, observaram que as fêmeas tinham maior relaxamento em relação aos machos. Quando inibida a ação da NOS houve redução no relaxamento coronariano das fêmeas e nos machos não teve alteração em relação ao controle. Isso sugere que o NO tem menor importância na modulação da função vascular nesses animais machos.

Fukuhara et al. (2006) utilizaram uma dose inespecífica de Omega Nitroarginina (L-NNA) para bloquear todas as isoformas da NOS com objetivo de observar a influência do NO na modulação do tônus coronariano em ratas sob distintos níveis estrogênicos. Esses autores verificaram que os animais OVX tinham menor dependência do NO na modulação do tônus coronariano quando comparados com os animais controle adultos. Já esses animais controles adultos

tiveram uma maior dependência do NO em relação a animais controle jovens. Isso mostra que existe uma variação, ao longo da vida dos animais, no mecanismo que predomina modulando o tônus coronariano (FUKUHARA et al., 2006).

As concentrações de estrogênio parecem ter uma relação direta com a liberação e síntese de óxido nítrico pelas células endoteliais. Desta maneira, ele age como um importante cardioprotetor, melhorando a função vascular coronariana (GRUBER et al., 2002).

Quando observadas as variações nas concentrações estrogênicas e o metabolismo do NO verifica-se um padrão semelhante, ou seja, quanto maior a concentração de estrogênio, maior o metabolismo do NO (HERNÁNDEZ et al., 2000). Além do mais, nesse mesmo estudo, foi observado que nas ratas OVX a pressão arterial média (PAM) foi mais elevada. Já Morgan-Martins (2003) não verificou alteração na PAM e o metabolismo do NO apresentou-se elevado nas ratas OVX em relação às ratas controle. As respostas observadas, tanto na PAM quanto no metabolismo do NO, são muito variadas, provavelmente isso se deva aos diferentes protocolos utilizados por diversos autores, principalmente no tempo desses protocolos e nas doses hormonais utilizadas.

Esse efeito estrogênico liberando NO, além de modular o tônus vascular, também age na regulação da contratilidade miocárdica. Em contraposição com o sistema nervoso simpático, o NO modula para baixo a contratilidade cardíaca (BLOCH & JANSSENS, 2005). Sendo assim, por promover uma *up-regulation* na expressão da NOS e conseqüentemente aumento na liberação de NO, a presença de estrogênio pode influenciar na contratilidade cardíaca. Além do mais, por possuir receptores nas células miocárdicas, parece que o estrogênio atua

regulando a expressão das proteínas contráteis do coração, principalmente a porção pesada da cadeia α da miosina (GROHÉ et al., 1997).

Além dos efeitos no miocárdio e no sistema vascular, o estrogênio pode agir como antioxidante. Principalmente por possuir um grupo hidroxil fenólico, ele pode atuar como *scavenger* de radicais livres (RL), desta forma evitando possíveis danos gerados por esses como, por exemplo, dano tecidual por agressão a lipídeos, carboidratos, proteínas, DNA, entre outros (MORGAN-MARTINS, 2003).

1.4 ESTRESSE OXIDATIVO

Radical livre é qualquer espécie química capaz de existir independentemente e que contenha um ou mais elétrons desemparelhados (LLESUY, 2002).

Normalmente, no metabolismo aeróbio, a redução completa de uma molécula de oxigênio requer 4 elétrons. No entanto, devido a sua conformação eletrônica, o oxigênio tem forte tendência de receber um elétron de cada vez, e assim, formar uma série de intermediários tóxicos e reativos que são espécies reativas de oxigênio (ERO) (Figura 1.2) (MENEHINI, 1987).

Entre as diversas fontes de geração intracelular dessas ERO e RL, as mitocôndrias são consideradas a maior fonte *in vivo* (BOVERIS et al., 1980).

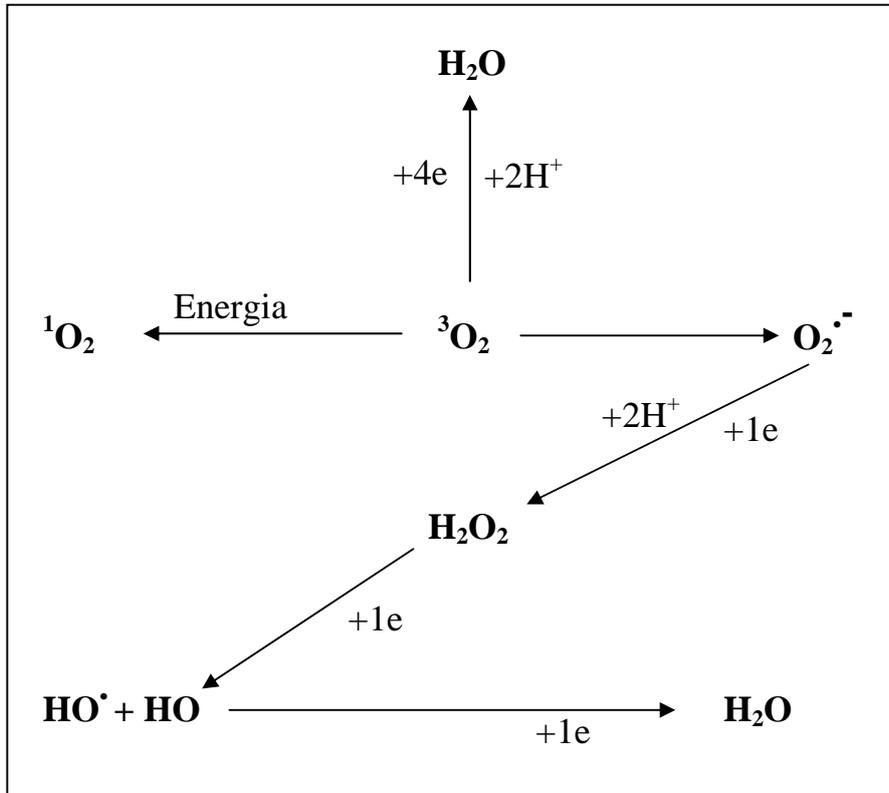
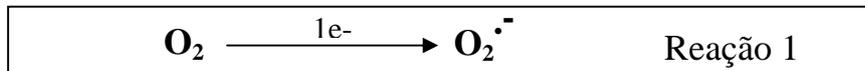


Figura 1.2: Esquema da produção das espécies reativas de oxigênio (Adaptado de LLESUY, 2002).

A adição de um elétron a uma molécula de oxigênio no estado fundamental gera um ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) (Reação 1).



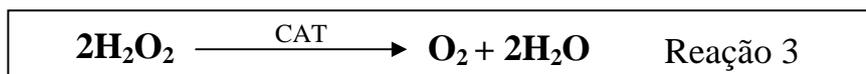
Ao ser adicionado mais um elétron e dois prótons, forma-se o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Reação 2).



A reação 2 é catalisada pela enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD), que em mamíferos existem 3 isoformas: a citosólica que contém Cu-Zn, a mitocondrial que contém Mn e uma forma extracelular que também contém Cu-Zn (BEUCHAMP & FRIDOVICH, 1973).

A dismutação do ânion superóxido é a maior fonte de peróxido de hidrogênio. Esse pode ser formado por duas reações: redução divalente do oxigênio molecular ou a partir da dismutação do ânion superóxido (Reação 2).

A redução do H_2O_2 é catalisada pelas enzimas antioxidantes catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GPx) e tem como produto água e oxigênio (Reação 3 e 4).



Essas duas enzimas desempenham papéis semelhantes, no entanto, desenvolvem suas ações em locais diferentes e de acordo com a concentração de H_2O_2 presente. A CAT está presente principalmente nos peroxissomas e age em concentrações nanomolar (nM) de H_2O_2 . Já a GPx, descoberta por Mills em 1957, age em concentrações micromolar (μM) de H_2O_2 , oxidando a glutaciona reduzida (GSH) e reduzindo o peróxido de hidrogênio à água e oxigênio (ASCENSÃO et al., 2003).

Quando há aumento nas concentrações de ERO e RL acima dos níveis fisiológicos e/ou diminuição das defesas antioxidantes denomina-se estado de

estresse oxidativo. Na verdade, existe um balanço constante entre fatores pró e antioxidantes e o estresse oxidativo pode ocorrer tanto pela diminuição das defesas antioxidantes como pelo aumento dos fatores pró-oxidantes (KAUL et al., 1993).

Muitas doenças cardiovasculares como, por exemplo, infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca, hipertensão, entre outras, estão diretamente relacionadas com estresse oxidativo (SINGAL et al., 1998). No entanto, ainda é discutida a relação de causa e consequência.

1.5 ESTRESSE OXIDATIVO E CONTRATURA ISQUÊMICA

Sabe-se que a isquemia cardíaca seguida de reperfusão causa piora da função do coração, associada com um aumento nas concentrações de RL e ERO. Esse fenômeno é conhecido como paradoxo do oxigênio (McCORD, 1985).

A isquemia/reperfusão pode desencadear várias consequências como o aparecimento de arritmias cardíacas denominadas *stunned heart* (coração atordoado) e/ou contraturas cardíacas denominadas de *stone heart* (coração de pedra) (HEARSE et al., 1977). Os efeitos da contratura cardíaca isquêmica são atribuídos principalmente ao aumento exagerado de cálcio intracelular, no entanto ainda não se conhece exatamente as causas que levariam a isso (POTHIN, 1999).

Existem teorias que tentam explicar esse fenômeno, a maioria delas apontam para a geração de peróxido de hidrogênio. Alguns estudos realizados pelo nosso grupo observaram que a contratura cardíaca isquêmica estava associada a altas concentrações de H₂O₂ (BIANCHINI & BELLÓ, 1988; BELLÓ &

BELLÓ, 1988). Belló-Klein et al, 1997, corroborando com estudos anteriores também verificaram que a perfusão do coração isolado com H_2O_2 induzia a contratatura cardíaca isquêmica e que essa era atenuada quando foi adicionado Trolox C, um potente antioxidante, na solução de perfusão. Isso demonstra a participação das espécies reativas de oxigênio, em especial do H_2O_2 , no desenvolvimento da contratatura cardíaca isquêmica.

Para que não predominem os efeitos maléficos dos RL e ERO, torna-se importante a ação de antioxidantes, que se distinguem em duas classes: enzimáticos e não enzimáticos. O estrogênio pode atuar como antioxidante não enzimático diretamente neutralizando ou diminuindo a ação de RL, como promovendo a *up-regulation* da expressão das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx (BORRAS et al., 2003).

1.6 ESTRESSE OXIDATIVO E ESTROGÊNIO

Barp et al. (2002) verificaram maior lipoperoxidação cardíaca em ratos machos que fêmeas. Do mesmo modo foram observados, nas ratas ovariectomizadas, valores de lipoperoxidação semelhantes aos machos, indicando possível efeito do estrogênio como antioxidante.

Morgan-Martins (2003) também observou padrão semelhante na lipoperoxidação cardíaca em ratas Wistar controles em relação às OVX e, quando feita a reposição estrogênica, por pellets transdermais durante 28 dias. As ratas OVX apresentaram menor defesa antioxidantes e conseqüentemente maior oxidação de lipídeos em relação ao grupo SHAM. A reposição estrogênica foi

eficaz em aumentar os antioxidantes tanto enzimáticos como não enzimáticos, atenuando a lipoperoxidação.

Mesmo perfil foi observado por Hernández et al. (2000), no entanto, esses atribuíram a atenuação do dano lipídico, nos animais que receberam reposição hormonal, ao aumento na capacidade antioxidante não enzimática.

Portanto, o estrogênio, além de ter característica de antioxidante, pode agir modulando a ação dos antioxidantes enzimáticos como dos não enzimáticos e, assim, manter o equilíbrio entre os fatores pró-oxidantes e antioxidantes. Desta forma, uma vez que a diminuição de estrogênio pode aumentar a predisposição a eventos coronarianos e diminuir a qualidade de vida, a terapia de reposição estrogênica pode ser de fundamental importância.

1.7 REPOSIÇÃO ESTROGÊNICA

Desde o final da década de 30, quando a terapia de reposição hormonal (TRH) passou a ser utilizada com objetivo de aliviar os sintomas da menopausa, que se observa uma melhora na qualidade de vida dessas mulheres (MARSLEW et al., 1991).

Os principais efeitos da TRH são a diminuição de perda óssea e a diminuição no desenvolvimento de eventos cardiovasculares. O estrogênio aumenta a expressão de osteoblastos e diminui a de osteoclastos, desta forma, diminuindo a perda de massa óssea característica da menopausa. Ele também contribui diminuindo as concentrações de LDL e mantém as de HDL, protegendo contra a formação de placas ateroscleróticas (GRUBER et al., 2002).

Além disso, a reposição estrogênica é capaz de restabelecer o metabolismo do NO em ratas OVX e regular a função vascular das mesmas, como comentado anteriormente (HERNÁNDEZ et al., 2000; BIANCHI et al., 2006).

No entanto, vários outros estudos mostram que os riscos da reposição hormonal se sobrepõem aos benefícios, especialmente no decorrer do primeiro ano de terapia (MANSON et al., 2003). Grady, 2003 verificou que há aumento no desenvolvimento de eventos coronarianos, câncer de mamas, morte súbita e eventos tromboembólicos.

Desta forma, a TRH deve ser vista de forma individual, levando-se em conta os possíveis benefícios e malefícios.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Verificar a participação do óxido nítrico na contratatura cardíaca isquêmica e na modulação do tônus vascular coronariano em ratas sob distintas concentrações estrogênicas.

2.2 Objetivos Específicos

- Induzir castração e reposição estrogênica em ratas Wistar;
- Avaliar as alterações do tônus coronariano nas ratas sob distintas concentrações de estrogênio pela avaliação da pressão de perfusão (PP) do coração isolado pelo método de Langendorff;
- Avaliar as alterações de pressão intracardíaca (pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE), pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE), índice de contratilidade (+dP/dt), índice de relaxamento (-dP/dt) e frequência cardíaca (FC) nos diferentes grupos experimentais;
- Verificar os mesmos parâmetros de mecânica cardíaca quando realizado bloqueio da síntese do NO durante a perfusão cardíaca;
- Analisar a atividade de enzimas antioxidantes e as concentrações de H₂O₂ no tecido cardíaco dos distintos grupos experimentais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizadas 29 ratas fêmeas Wistar, pesando \pm 200 gramas, em torno de 4 meses de idade que 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 no máximo cinco animais por caixa. Receberam alimentação e água ad libitum (ração Guabi – Indústria de Alimentos Alisul Ltda). Foram mantidas sob períodos de 12 horas luz, 12 horas escuro, cuja temperatura ficou em torno de 25°C. Foram divididas em 3 grupos: SHAM, o qual foi submetido à cirurgia fictícia (*sham operation*) de ovariectomia bilateral; OVX, que foi ovariectomizado e OVX+RH, que foi ovariectomizado e recebeu reposição estrogênica. Os grupos foram subdivididos em 2 sub-grupos para o procedimento de perfusão do coração isolado, de acordo com a solução utilizada (TYRODE ou LNAME).

- a) SHAM-TYRODE (n= 5);
- b) SHAM-LNAME (n= 4);
- c) OVX-TYRODE (n= 6);
- d) OVX-LNAME (n= 4);
- e) OVX+RH-TYRODE (n= 4);
- f) OVX+RH-LNAME (n= 4).

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 & RAYMUNDO, 1997).

3.2 OVARECTOMIA BILATERAL

A ovariectomia (OVX) é um procedimento cirúrgico de retirada dos ovários, a fim de induzir a pausa estrogênica. As ratas foram anestesiadas com cetamina (cloreto de cetamina-Parke-Davis, São Paulo) na dose de 90 mg/Kg de peso do animal e xilazina 10mg/Kg de peso do animal, por via intraperitoneal. 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 era repetido no outro lado. Nos animais controle, foi realizada a mesma cirurgia sem haver, no entanto, 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) (BAKER et al., 1979).

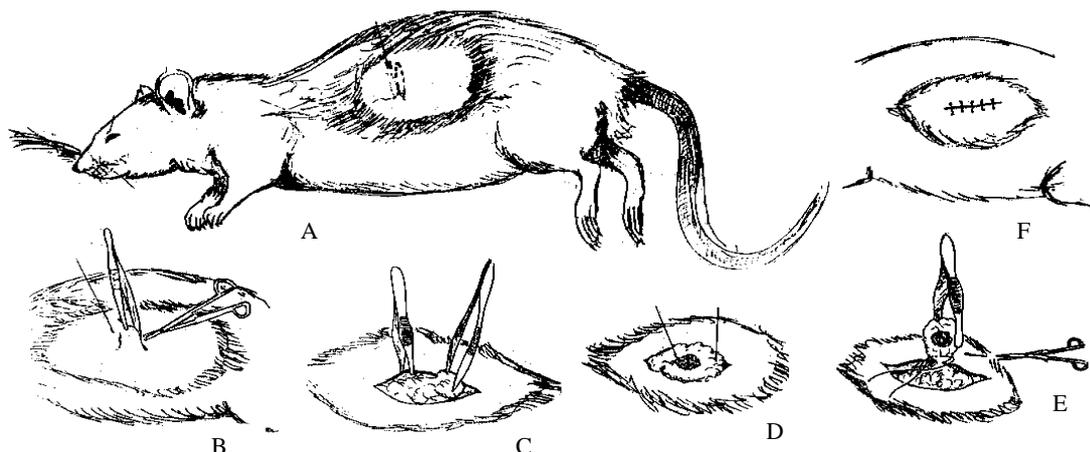


Figura 3.1: Procedimento da cirurgia de castração

3.3 REPOSIÇÃO ESTROGÊNICA

Uma cânula de silicone com 15 mm de comprimento (1,02 mm d.i x 2,16 mm d.e.) foi preenchida com 10 μ L de solução 5% (p:v) 17 β -estradiol (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) em óleo de girassol, sendo vedada após com cola de silicone. As cápsulas foram mantidas em solução salina durante a noite precedente a sua utilização e foram implantadas na região subcutânea entre as escápulas sob anestesia etérea. Animais dos grupos SHAM e OVX receberam cápsulas contendo apenas óleo de girassol (PREDIGER et al., 2004).

3.4 DETERMINAÇÃO DO CICLO ESTRAL

Nos animais não submetidos à OVX, a determinação do ciclo estral foi iniciada a partir do 28º dia após o procedimento cirúrgico de simulação da ovariectomia bilateral. O ciclo em cada fêmea foi determinado por observação do esfregaço vaginal, o qual foi coletado usando pipeta de plástico. Solução salina foi

colocada na abertura vaginal, aspirada, e colocada em lâminas para serem observadas a fresco no microscópio. As lâminas foram comparadas com os achados de Freeman (1994). Todos animais não OVX foram sacrificados na fase do diestro. Nos animais que não se encontravam nessa fase, o ciclo permanecia sendo investigado diariamente.

3.5 COLETA DE SANGUE E DOSAGEM HORMONAL

Após 28 dias da cirurgia de ovariectomia bilateral ou simulação da mesma, foi coletado sangue pelo plexo venoso retrorbital, sob anestesia etérea, com intuito de medir as concentrações plasmáticas de 17β -estradiol. Após a coleta em heparina, 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 posterior dosagem hormonal.

O método utilizado para dosar os estrogênios foi o de quimiluminescência por imunensaio competitivo. O aparelho utilizado para esta medida foi o VITROS ECi, 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 viais 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 o anticorpo das moléculas do reagente estradiol Wedge, levando à 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 de 17β -estradiol foram avaliados no Laboratório de Análises Clínicas Weinmann. Os resultados foram expressos em pg por mL de plasma.

3.6 PERFUSÃO DO CORAÇÃO ISOLADO

Os animais foram trazidos do biotério momentos antes de começar a perfusão. Eles 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 TYRODE + LNAME 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 3.2). A perfusão do coração foi realizada retrogradamente (Figura 3.3). A bomba peristáltica foi regulada para perfundir os corações com fluxo de perfusão de 10 mL/min.

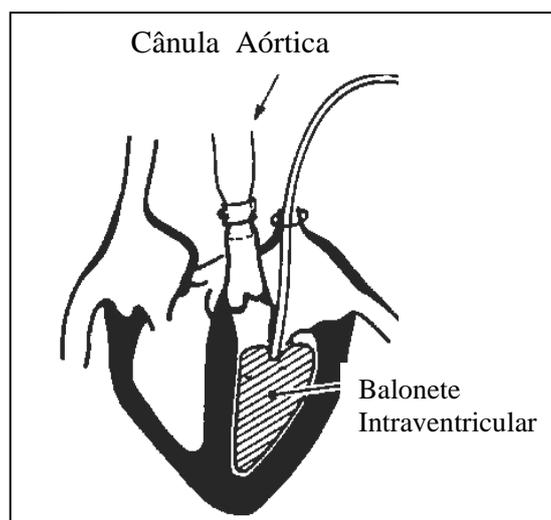


Figura 3.2: Esquema da posição do balonete no ventrículo esquerdo. (Adaptado de DÖRING & DEHNERT, 1987, apud BAUERMANN, 2000).

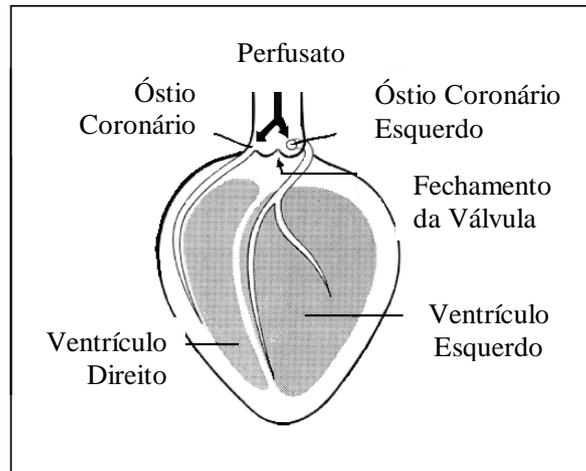


Figura 3.3: Esquema da perfusão coronariana (Copiada de BAUERMANN, 2000)

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 3.4). 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 estava conectada a um microcomputador PC-AT 486. O computador converteu os dados para uma planilha D-Base utilizando o programa ISOHEART, o qual registrava os parâmetros hemodinâmicos cardíacos durante todo o período experimental.

O volume do balão intraventricular era ajustado, usando uma seringa equipada com um micrômetro, a fim de proporcionar uma pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE) de 10 mmHg no período de estabilização. Depois de ajustado o volume do balão intraventricular, era suspenso o recipiente que mantinha a temperatura ao redor do coração controlada em 37°C, e o coração ficava imerso na solução do líquido de perfusão aquecida.

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 Sistólica do Ventrículo Esquerdo (PSVE), Pressão Diastólica Final do Ventrículo Esquerdo (PDFVE), Índice de Contratilidade (+dP/dt) e Índice de Relaxamento (-dP/dt) (Figura 3.4).

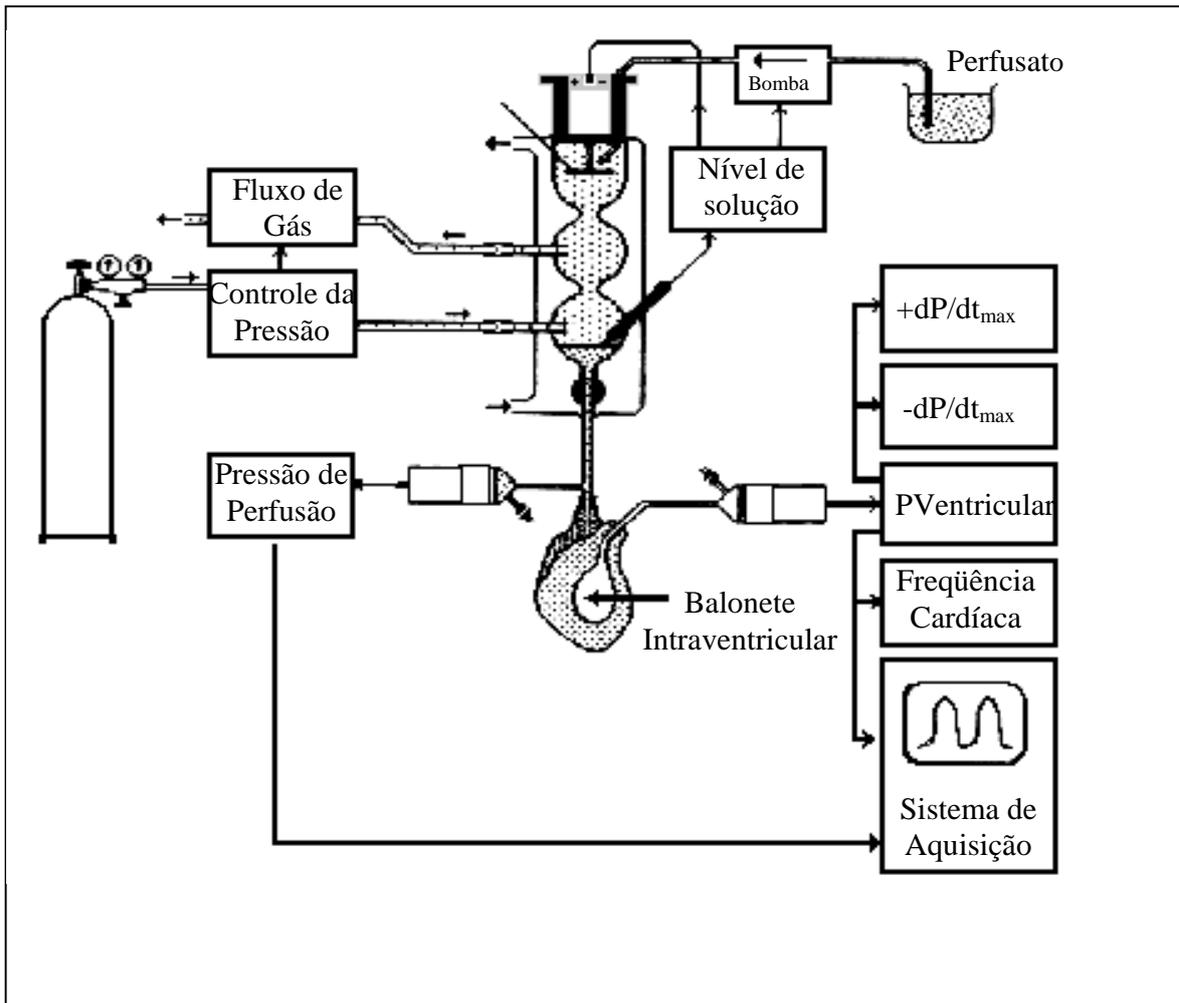


Figura 3.4: Esquema do sistema de perfusão Langendorff (Adaptado de DÖRING & DEHNERT, 1987, apud BAUERMANN, 2000).

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°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).

3.7 SOLUÇÕES DE PERFUSÃO

Os grupos experimentais foram subdivididos de acordo com a solução de perfusão utilizada. Foram utilizadas duas soluções: uma solução controle de TYRODE modificada e outra de TYRODE + LNAME. A solução de TYRODE modificada tinha a seguinte composição, em mmol/L: NaCl 120; KCl 5,4; MgCl 1,8; CaCl₂ 1,25; NaHCO₃ 27; NaH₂PO₄ 2; Na₂SO₄ 1,8 e Glicose 11,1 (Langendorff, 1985). Já a solução TYRODE + LNAME era composta pelos mesmos reagentes descritos anteriormente com o acréscimo de N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) na concentração de 100 µmol/L, dose capaz de inibir todas as isoformas de NOS (HAN et al., 2003).

3.8 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Após a extração do coração do tórax do animal, canulação aórtica e introdução do balonete no ventrículo esquerdo, esses corações permaneceram por um período de estabilização (20 min) com PDFVE controlada em 10 mmHg

como já descrito. Ao término desse intervalo de tempo, a bomba perfusora foi desligada, iniciando-se o período de isquemia global normotérmica que foi mantida por 30 min (MORGAN-MARTINS, 2003). Em seguida, o coração foi reperfundido por mais 20 min e avaliaram-se então os parâmetros propostos (Figura 3.5).

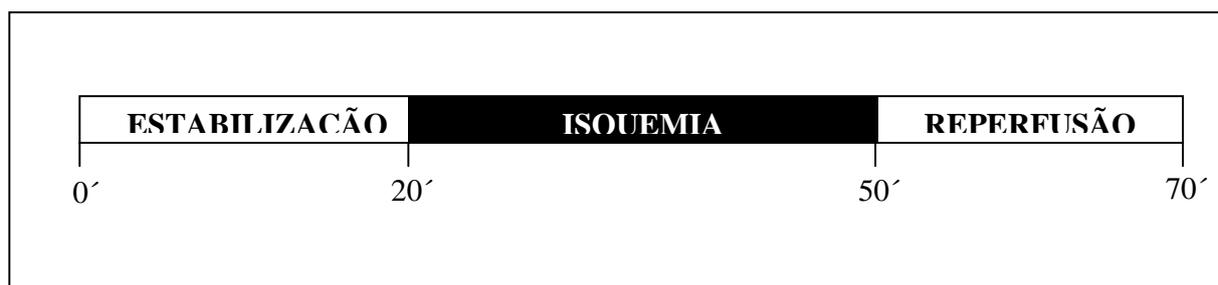


Figura 3.5: Tempo, em minutos, do protocolo de perfusão do coração isolado.

3.9 PREPARO DOS HOMOGENEIZADOS DE TECIDO CARDÍACO

Ao término do protocolo de perfusão, os corações foram homogeneizados durante 40 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 mmol/L em isopropanol (10 μ L 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).

3.10 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 et al., 1951). Para a realização das dosagens foram utilizados os seguintes reagentes:

Reativo de Folin Ciocalteau 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) 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 Ciocalteau, 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 (1mg/mL). Os resultados foram expressos em mg de proteína/mL.

3.11 ENZIMAS ANTIOXIDANTES

3.11.1 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).

A técnica para determinação da SOD baseou-se na inibição da reação do ânion radical superóxido com o pirogalol. Para isso, utilizou-se uma solução tampão (Tris-base na concentração de 50 mmol/L; EDTA na concentração de 1 mmol/L em pH 8,2), pirogalol 24 mmol/L (em ácido clorídrico a 10 mmol/L) e catalase a 30 μ mol/L. 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 concentrações conhecidas de SOD, disponível comercialmente (Sigma Chemical Co., St Louis, MO). 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 das amostras. Com as amostras, procedeu-se da mesma forma, apenas com o reajuste do volume de tampão de acordo com a quantidade de homogeneizado de tecido adicionada, para se ter um volume final de 1mL. Essa reação leva à formação de um produto colorido, detectado espectrofotometricamente a 420 nm. A atividade da enzima foi expressa em U SOD/mg de proteína (MARKLUND, 1985).

3.11.2 CATALASE (CAT)

Esta enzima é altamente específica e possui atividade apenas para peróxido de hidrogênio, hidroperóxidos de metila e etila. A CAT é uma hemoproteína que catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio à água e oxigênio. A atividade da catalase é diretamente proporcional à taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio. 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 50 mmol/L pH 7,4 e peróxido de hidrogênio 0,3 mol/L. Em cubeta de quartzo, foram adicionados 955 μ L do tampão fosfato e

10 μ L de amostra do tecido, essa cubeta foi colocada em espectrofotômetro e descontada contra um branco de tampão fosfato. Após, foram adicionados 35 μ L do peróxido de hidrogênio e foi feito o monitoramento da diminuição da absorbância no comprimento de onda selecionado. Os resultados foram expressos em pmoles por mg de proteína (AEBI, 1985).

3.12 DETERMINAÇÃO DE NITRITOS E NITRATOS

Os níveis de nitratos e nitritos foram medidos pela reação das amostras com o reagente de Griess. Alíquotas de 50 μ L 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 μ L de amostra, 10 μ L de NADPH, 7 μ L de Tris, 23 μ L de uma mistura de G6P/G6PDH e 10 μ L 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).

3.13 MEDIDA DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

O método foi baseado na oxidação do vermelho de fenol pelo peróxido de hidrogênio mediado pela peroxidase de rabanete. Fatias de ventrículo foram incubadas por 30 min. em tampão fosfato 10 mmol/L (NaCl 140 mmol/L e dextrose 5 mmol/L). Meio de incubação foi coletado e adicionado à solução tampão de vermelho de fenol 0,28 mmol/L e peroxidase de rabanete 8,5 U/mL. Após o intervalo de 5 min., foi adicionado NaOH 1N e efetuada a leitura a 610 nm. Os resultados foram expressos em μ moles de H_2O_2 por g de tecido (PICK & KEISARI, 1980).

3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Depois de efetuados todos os testes, foram calculadas as médias e os desvios padrão 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 de uma via complementado com o teste de

comparações múltiplas de Tukey, sendo as diferenças consideradas significativas para $p < 0,05$ (nível de significância de, pelo menos, 5%).

4. RESULTADOS

4.1 DOSAGEM HORMONAL E PESO CORPORAL

A concentração plasmática de 17β -estradiol foi de $30,7 \pm 5,6$ pg/mL nos animais SHAM e que foram sacrificados na fase do diestro. Os OVX ($14,3 \pm 2,1$ pg/mL) apresentaram uma redução significativa de 53% nas concentrações de estradiol em relação aos SHAM. Já os OVX+RH ($63,3 \pm 2,8$ pg/mL), tiveram aumento de 106% e 343% desse hormônio esteróide em relação aos SHAM e OVX, respectivamente. O peso corporal dos animais variou de acordo com a concentração hormonal. Os animais OVX tiveram maior peso corporal, seguidos pelos SHAM, e pelos OVX+RH (252 ± 10 ; 232 ± 9 ; 210 ± 7 g), respectivamente, sendo estas diferenças significativas entre si.

4.2 PERFUSÃO DO CORAÇÃO ISOLADO

Ao final do período de estabilização, as ratas OVX, quando perfundidas com TYRODE, apresentaram diminuição da PSVE e piora no índice de relaxamento ($-dP/dt$) (17% e 28%, respectivamente), ao serem comparadas com o grupo SHAM-TYRODE (Tabela I). Já quando perfundidos com LNAME, nesse mesmo período, o grupo SHAM mostrou melhor índice de contratilidade (33%) em relação ao SHAM-TYRODE. O grupo OVX-LNAME teve reduzido (38%) esse mesmo parâmetro de contratilidade em relação ao grupo SHAM-LNAME (Tabela I).

Tabela I. Freqüência cardíaca (FC), pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE), pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE), índice de contratilidade (+dP/dt), índice de relaxamento (-dP/dt) nos distintos grupos experimentais ao final da estabilização.

		FC (bpm)	PSVE (mmHg)	PDFVE (mmHg)	+dP/dt (mmHg/s)	-dP/dt (mmHg/s)
TYRODE	SHAM	212 ± 13	111 ± 6	10 ± 0	2092 ± 359	-1120 ± 164
	OVX	209 ± 31	92 ± 10 *	10 ± 1	1784 ± 230	-803 ± 123 *
	OVX+RH	202 ± 11	98 ± 12	10 ± 1	1987 ± 387	-983 ± 208
LNAME	SHAM	221 ± 29	114 ± 10	10 ± 1	2775 ± 281 *	-1241 ± 167
	OVX	180 ± 55	103 ± 11	10 ± 1	1722 ± 424 #	-961 ± 160
	OVX+RH	203 ± 4	106 ± 3	10 ± 1	1906 ± 156	-930 ± 115

Dados representam média ± DPM de 4-6 animais/grupo. SHAM = animais submetidos à cirurgia fictícia de ovariectomia bilateral; OVX = animais ovariectomizados bilateralmente; OVX+RH = animais ovariectomizados bilateralmente e submetidos à reposição hormonal.

* diferença significativa vs SHAM-TYRODE, $p < 0,05$;

diferença significativa vs SHAM-LNAME, $p < 0,01$.

No final do período de reperfusão, variações nas concentrações de 17β -estradiol não promoveram alterações significativas na função mecânica cardíaca quando avaliados os parâmetros FC, PSVE, PDFVE, +dP/dt e -dP/dt em animais perfundidos com TYRODE (Tabela II). O mesmo foi observado durante o período de isquemia e no início da reperfusão (dados não mostrados).

Tabela II. Frequência cardíaca (FC), pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE), pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE), índice de contratilidade (+dP/dt), índice de relaxamento (-dP/dt) nos distintos grupos experimentais ao final da reperfusão.

		FC (bpm)	PSVE (mmHg)	PDFVE (mmHg)	+dP/dt (mmHg/s)	-dP/dt (mmHg/s)
TYRODE	SHAM	159 ± 16	85 ± 7	60 ± 5	411 ± 97	-240 ± 71
	OVX	180 ± 44	92 ± 13	72 ± 14	324 ± 196	-174 ± 112
	OVX+RH	186 ± 14	95 ± 10	62 ± 15	592 ± 597	-373 ± 350
LNAME	SHAM	209 ± 24	85 ± 18	61 ± 7	514 ± 237	-287 ± 145
	OVX	181 ± 27	89 ± 17	20 ± 11 *	1399 ± 594*	-783 ± 284*
	OVX+RH	201 ± 11	100 ± 12	72 ± 7 #	534 ± 397#	-308 ± 251#

Dados representam média ± DPM de 4-6 animais/grupo. SHAM = animais submetidos à cirurgia fictícia de ovariectomia bilateral; OVX = animais ovariectomizados bilateralmente; OVX+RH = animais ovariectomizados bilateralmente e submetidos à reposição hormonal.

* diferença significativa vs SHAM-LNAME e OVX-TYRODE, $p < 0,05$;

diferença significativa vs OVX-LNAME, $p < 0,05$.

No entanto, foi demonstrado um aumento significativo na PP no grupo OVX-TYRODE que não foi revertido no OVX+RH-TYRODE (Figura 4.1). Quando foi efetuado o bloqueio da síntese do NO pelo LNAME, os parâmetros de mecânica cardíaca avaliados mostraram alterações pronunciadas em função das variações estrogênicas.

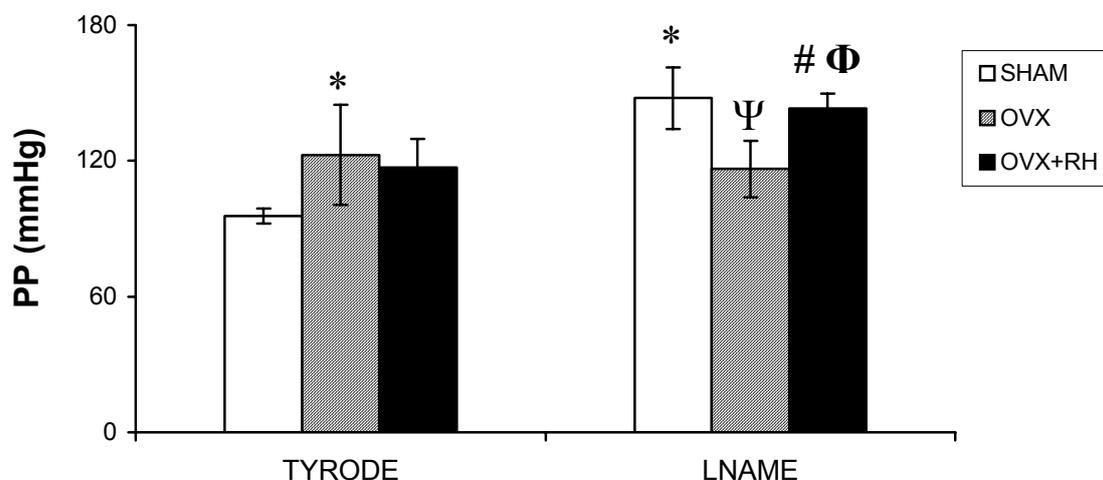


Figura 4.1. Pressão de perfusão coronariana (PP) (em mmHg) em ratas SHAM, OVX e OVX+RH ao final da reperfusão. Dados representam média \pm DPM de 4-6 animais/grupo.

* diferença significativa vs grupo SHAM-TYRODE, $p < 0,05$;

diferença significativa vs grupo OVX+RH-TYRODE, $p < 0,05$;

Ψ diferença significativa vs grupo SHAM-LNAME, $p < 0,05$;

Φ diferença significativa vs grupo OVX-LNAME, $p < 0,05$.

A ovariectomia (grupo OVX-LNAME) promoveu uma menor elevação da PDFVE em resposta à isquemia-reperfusão em relação aos grupos OVX-TYRODE e SHAM-LNAME (de 72% e 67%, respectivamente). Essa resposta não foi observada quando foi efetuada a reposição estrogênica nesses animais (Figura 4.2 e Tabela II). Associado a isso se observa que os animais do grupo OVX-LNAME apresentaram melhor índice de relaxamento ($-dP/dt$) em comparação com os demais grupos. O índice de contratilidade também se apresentou melhor no grupo OVX-LNAME em relação ao grupo OVX-TYRODE e SHAM-LNAME (332%

e 172%, respectivamente). Esse índice retorna aos valores controle quando é feita a reposição estrogênica (Tabela II).

O bloqueio do óxido nítrico na perfusão promoveu elevação (54%) da PP nos animais SHAM-LNAME quando comparado com SHAM-TYRODE. Nos animais ovariectomizados que receberam LNAME (OVX-LNAME), não há alteração da PP em relação aos perfundidos com TYRODE (OVX-TYRODE) (Figura 4.1). Quando é efetuada a reposição estrogênica nesses animais, volta a se observar elevação (22%) da PP em relação ao seu respectivo controle (OVX+RH-TYRODE).

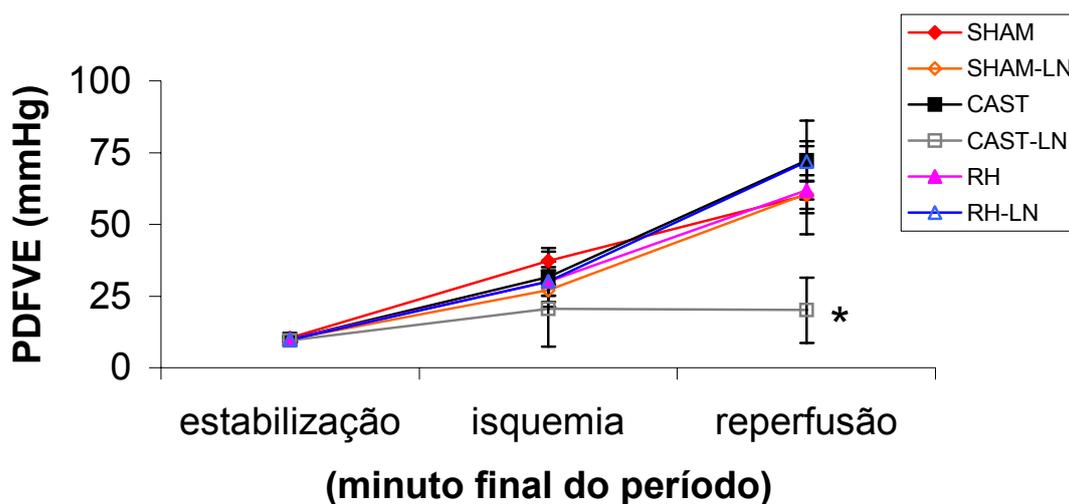


Figura 4.2. Pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE) (em mmHg) em ratas SHAM, OVX e OVX+RH durante protocolo de isquemia reperfusão. Valores representam as médias \pm DPM do último minuto da estabilização, da isquemia e da reperfusão (n= 4-6 animais/grupo).

* diferença significativa vs grupo SHAM-TYRODE, $p < 0,05$;

4.3 METABOLISMO DO ÓXIDO NÍTRICO E CONCENTRAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

O metabolismo do NO, avaliado pela medida de nitritos e nitratos ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$), e a concentração de H_2O_2 , nos animais perfundidos com TYRODE, mostraram-se ambos reduzidos em cerca de 35% nas ratas OVX em relação ao grupo SHAM. O grupo OVX+RH apresentou aumento de NO_3^- e H_2O_2 de 17% e 34%, respectivamente, quando comparado ao OVX (Figura 4.3A e B). Já os grupos SHAM-LNAME e OVX+RH-LNAME tiveram redução tanto do NO (22% e 18%, respectivamente), quanto de H_2O_2 (36% e 30%, respectivamente), quando comparados com os mesmos grupos perfundidos com TYRODE. Os animais OVX mantiveram as mesmas concentrações de NO_3^- e H_2O_2 ao final da reperfusão com as diferentes soluções. Não houve diferença entre os respectivos grupos perfundidos com L-NAME nesses parâmetros.

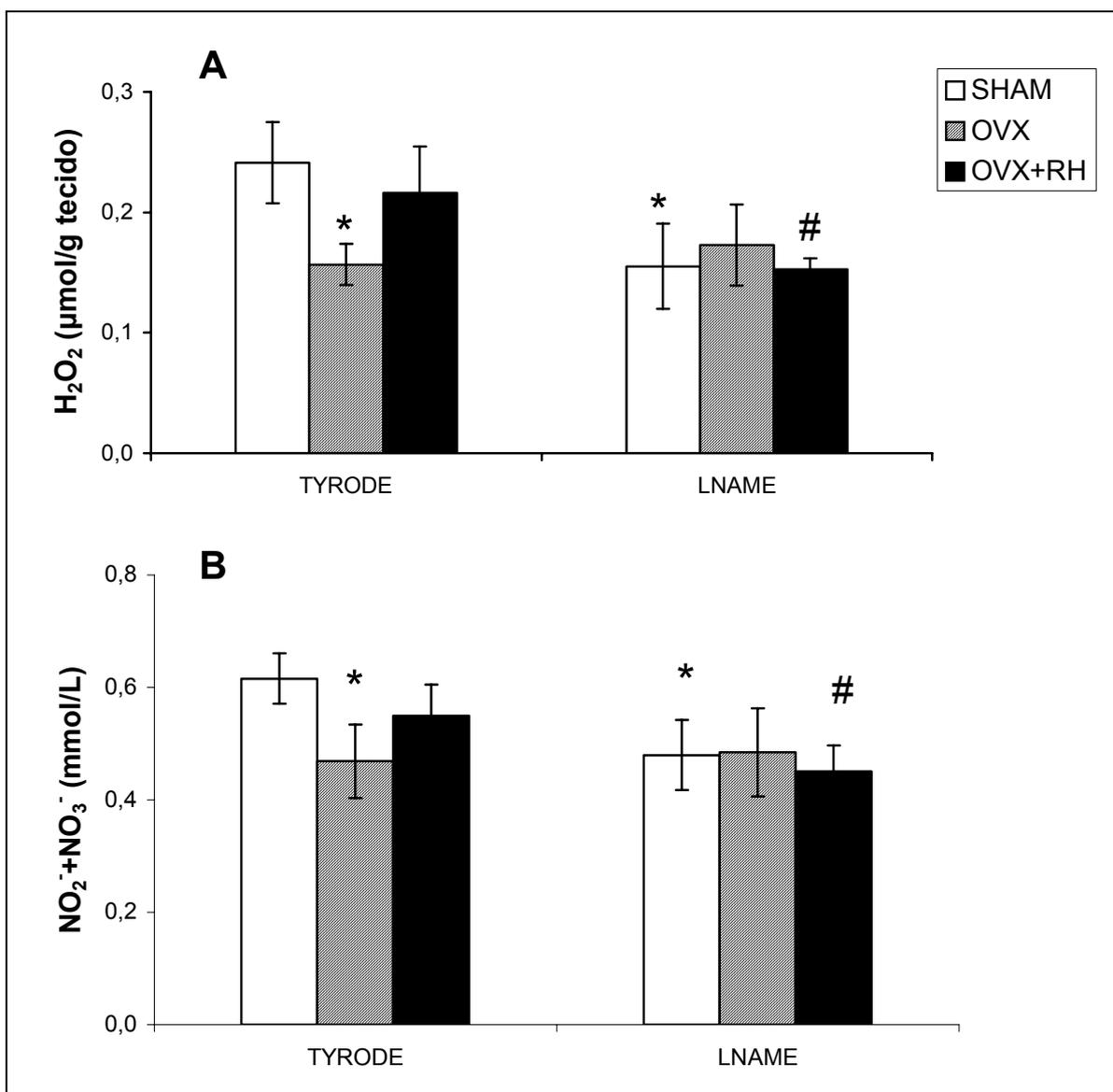


Figura 4.3. A) Concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (em $\mu\text{mol/g}$ tecido) em fatias de ventrículo. **B)** Concentração de nitritos e nitratos ($NO_2^- + NO_3^-$) (em mmol/L) em homogeneizado cardíaco de ratas SHAM, OVX e OVX+RH ao final da reperfusão. Dados representam média \pm DPM de 4-6 animais/grupo.

* diferença significativa vs grupo SHAM-TYRODE, $p < 0,05$;

diferença significativa vs grupo OVX+RH-TYRODE, $p < 0,05$.

4.4 ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

A atividade da enzima antioxidante catalase, nos animais perfundidos com TYRODE, se mostrou aumentada em 20% nas ratas OVX em relação ao grupo SHAM e essa foi reduzida em 23% no grupo OVX+RH em relação ao OVX (Tabela III). Os grupos SHAM-LNAME e OVX+RH-LNAME apresentaram aumento da atividade dessa enzima antioxidante em 19% e 31%, respectivamente, quando comparados com os mesmos grupos perfundidos com TYRODE, assim se aproximando dos valores do grupo OVX que não mostrou diferença quando perfundido com as diferentes soluções. A enzima antioxidante SOD não apresentou diferença significativa entre os grupos nem em função da variação nas concentrações estrogênicas nem na concentração de NO (Tabela III).

Tabela III. Atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) no homogeneizado cardíaco dos distintos grupos experimentais ao final da reperfusão.

		SOD (U/mg prot.)	CAT (pmol/mg prot.)
TYRODE	SHAM	13,3 ± 2,0	22,4 ± 1,7
	OVX	11,7 ± 0,9	26,9 ± 0,7 *
	OVX+RH	11,9 ± 1,2	20,8 ± 2,2 **
LNAME	SHAM	14,4 ± 1,7	26,6 ± 2,0 *
	OVX	12,0 ± 0,7	27,9 ± 2,6
	OVX+RH	12,2 ± 2,8	27,4 ± 3,1 Ω

Dados representam média ± DPM de 4-6 animais/grupo. SHAM = animais submetidos à cirurgia fictícia de ovariectomia bilateral; OVX = animais ovariectomizados bilateralmente; OVX+RH = animais ovariectomizados bilateralmente e submetidos à reposição hormonal.

* diferença significativa vs grupo SHAM-TYRODE, $p < 0,05$;

** diferença significativa vs grupo OVX-TYRODE, $p < 0,05$;

Ω diferença significativa vs grupo OVX+RH-TYRODE, $p < 0,05$.

5. DISCUSSÃO

A ovariectomia (OVX) bilateral é uma técnica que vem sendo utilizada de forma eficaz para diminuir as concentrações plasmáticas de 17β -estradiol em ratas (BARP et al., 2002 e MORGAN-MARTINS, 2003). Esses estudos verificaram que a ovariectomia bilateral leva à diminuição na concentração de 17β -estradiol para valores abaixo do limite de sensibilidade do método utilizado, não sendo esta detectável nas ratas OVX. Em nosso estudo, analisamos as concentrações de 17β -estradiol após 28 dias de ovariectomia e observou-se redução significativa desse em comparação ao controle. Nesse caso, a concentração hormonal foi detectável nas ratas ovariectomizadas devido à maior sensibilidade do novo método utilizado. Essa redução de 17β -estradiol já pode ser observada ao final da primeira semana da ovariectomia (BARP et. al., 2002 e MORGAN-MARTINS, 2003). Desta forma, optamos por iniciar a reposição com estrogênio e/ou veículo no sétimo dia após a ovariectomia. A reposição estrogênica aumentou as concentrações de 17β -estradiol confirmando a eficácia do método de reposição utilizado, como observado por Prediger et al., 2004.

O estrogênio pode agir tanto de forma rápida (não genômica) como de forma lenta (genômica) aumentando tanto a síntese quanto a liberação de NO, que é um potente vasodilatador derivado do endotélio (GRUBER et al., 2002). Sabe-se que a presença de estrogênio em fêmeas é responsável pelo aumento do metabolismo do NO (DARKOW et al., 1997). A ovariectomia promoveu uma diminuição das concentrações plasmáticas de 17β -estradiol e conseqüentemente uma diminuição no metabolismo do NO foi observada nessas ratas (Figura 4.3.B).

Hernández et al, 2000 também observaram em ratas OVX uma redução do metabolismo do NO e que isso estava associado à atenuação da pressão arterial média nessas ratas quando comparadas com ratas não ovariectomizadas. Thompson et al., 2000 mostraram que o efeito vasodilatador do estrogênio é mediado, em grande parte, pelo aumento na expressão da eNOS, uma vez que, quando bloqueada essa enzima, esse efeito foi atenuado. Em nosso estudo, as ratas ovariectomizadas mostraram maior pressão de perfusão coronariana que os demais grupos perfundidos com TYRODE, significando haver vasoconstrição coronariana. Esse efeito não foi revertido com a reposição estrogênica. Nessas ratas OVX, a influência exercida pelo NO na regulação do tônus vascular parece estar diminuída, pela diminuição da ação da NOS, ou funcionando inadequadamente (FUKUHARA et al., 2006). A ineficácia da reposição estrogênica em restabelecer a PP sugere que uma vez retirada a influência do estrogênio pela ovariectomia parece haver uma disfunção endotelial que, apesar de haver recuperado os níveis de NO, não consegue ser revertida. Nos grupos perfundidos com LNAME, a pressão de perfusão foi elevada com exceção do grupo OVX que manteve a pressão semelhante ao grupo perfundido com TYRODE. Visto que as ratas OVX mostraram metabolismo reduzido do NO, o bloqueio da NOS com LNAME não foi capaz de promover alteração no tônus coronariano dessas ratas. Nesses animais é possível que outros mecanismos reguladores do tônus possam estar predominando em relação ao NO. O metabolismo de NO manteve-se sem alterações quando comparados os grupos OVX-TYRODE e OVX-LNAME.

Uma outra possível ação do estrogênio, além de aumentar a expressão da NOS, é agir como antioxidante (BORRAS et al., 2003). Ele pode agir diminuindo a

reação do ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) com o NO. Sob condições ambientais, o $O_2^{\cdot-}$ é dismutado à H_2O_2 espontaneamente ou pela catálise da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD). No entanto, o $O_2^{\cdot-}$ pode reagir rapidamente com NO para formar peroxinitrito, uma espécie reativa de nitrogênio, e assim diminuindo a biodisponibilidade do NO (HARE & STAMLER). Não foi observada variação na atividade da SOD entre os respectivos grupos experimentais após 28 dias de ovariectomia ou simulação da mesma. Barp et al. 2002 mostraram que, após 7 dias da realização da ovariectomia bilateral de ratas, pode-se verificar aumento significativo na atividade da SOD em relação às ratas não ovariectomizadas, assim como um aumento da lipoperoxidação cardíaca dessas ratas. Entretanto, com o passar do tempo pode estar havendo um aumento da concentração de antioxidantes não enzimáticos tentando atenuar esse efeito inicial da retirada do estrogênio e restabelecer o balanço pró e antioxidante (MORGAN-MARTINS, 2003).

O H_2O_2 , produto da redução do ânion radical superóxido, parece estar envolvido tanto na regulação do tônus coronariano como na contratilidade cardíaca após protocolo de isquemia-reperfusão.

Efeitos cardiovasculares do peróxido de hidrogênio parecem ser promovidos pelo NO. O H_2O_2 pode agir como um sinalizador intracelular ativando a NOS, e potencializando a up-regulation da expressão da NOS-endotelial (eNOS) (CAI, 2005).

Como observado no nosso estudo, a concentração de H_2O_2 e o metabolismo do NO apresentaram padrão de variação semelhante. Quando bloqueada a síntese de NO, a concentração de H_2O_2 foi reduzida. Já a atividade

da enzima antioxidante catalase (CAT) e as concentrações de H_2O_2 tiveram padrão oposto. Mesmo perfil foi observado em ratas Sprague-Dawley OVX que tiveram redução da atividade da CAT em tecido cerebral e hepático e, quando efetuada a reposição hormonal, essa foi restabelecida (OZGONUL et al., 2003). A atividade aumentada dessa enzima antioxidante também foi observada em ratas OVX que tinham lipoperoxidação aumentada (MORGAN-MARTINS, 2003) e associada a elevadas concentrações de H_2O_2 (STREHLOW et al., 2003). A CAT age reduzindo o H_2O_2 em água e oxigênio.

No entanto, nessa reação da CAT com o H_2O_2 também forma-se um complexo intermediário que oxida o NO diminuindo assim sua biodisponibilidade (BALDUS et al., 2002).

Provavelmente a maior atividade da CAT nas ratas OVX deva-se a uma menor dependência ao NO na regulação do tônus vascular. Uma vez bloqueada a NOS, predomina um aumento da atividade da CAT com o H_2O_2 sendo reduzido à água e oxigênio. A atividade aumentada da CAT nos grupos SHAM e OVX+RH, perfundidos com LNAME, se aproximou dos valores das ratas OVX que permaneceu elevado mesmo nas OVX-LNAME.

Já na contratilidade cardíaca, o H_2O_2 parece estar envolvido na contratatura cardíaca isquêmica. Alguns estudos realizados pelo nosso grupo observaram isso (BIANCHINI & BELLÓ, 1988; BELLÓ & BELLÓ, 1988). Esses autores, injetando H_2O_2 diretamente na aorta do coração isolado de ratos, observaram que doses (8-64 mmol/L) induziam um efeito inotrópico positivo com potenciação pós-extrassistólica (*stunned heart*). Já doses mais elevadas (128-2048mM) induziram

contraturas cardíacas (*stone heart*) (BIANCHINI & BELLÓ, 1988; BELLÓ & BELLÓ, 1988).

A contratura cardíaca isquêmica também parece estar associada à sobrecarga de Ca^{2+} intracelular (POTHIN, 1999). Essa sobrecarga pode ser promovida pela degradação do ATP durante a isquemia gerando RL e ERO pela ativação do sistema xantina oxidase (KUPPUSAMY & ZWEIER, 1989). Como citado anteriormente, esses contribuem para o desenvolvimento da contratura cardíaca isquêmica por lesarem tanto proteínas trocadoras, como os lipídeos de membrana, impossibilitando o funcionamento adequado desses.

Sabe-se que o estrogênio pode modular os canais e os trocadores de Ca^{2+} , aumentando a expressão gênica desses, além de atuar como antioxidante protegendo contra o estado de estresse oxidativo (PARK et al., 1999).

Todos os grupos experimentais desse estudo mostraram respostas hemodinâmicas semelhantes quando perfundidos com TYRODE. A maior atividade da CAT nos animais OVX provavelmente já esteja presente antes do protocolo de isquemia-reperfusão. Ao serem castradas essas ratas apresentam um aumento nos pró-oxidantes e a ativação do sistema de defesa antioxidante se torna importante, tentando evitar o estado de estresse oxidativo. Possivelmente o aumento na atividade da CAT seja consequência de um aumento prévio nas concentrações de peróxido de hidrogênio. Essa enzima pode catalisar a redução do H_2O_2 em H_2O e O_2 ou, juntamente com o H_2O_2 , formar o composto I que age oxidando o óxido nítrico e consequentemente diminuindo sua biodisponibilidade.

Quando a isquemia-reperfusão foi realizada na presença de LNAME no líquido de perfusão, foi observado que os grupos SHAM e OVX+RH apresentaram

redução dos nitratos totais associado com o aumento da atividade da CAT. Possivelmente uma diminuição na formação de peroxinitrito tenha ocorrido devido ao bloqueio na síntese do NO, diminuindo a reação desse com o $O_2^{\cdot-}$. Com a diminuição dessa reação, predomina a redução desse radical livre até água e oxigênio.

As ratas OVX-LNAME apresentaram menor contratatura cardíaca isquêmica. Em situações que estão associadas ao estresse oxidativo como, por exemplo, a isquemia-reperfusão, hipertensão ou interrupção estrogênica, pode ocorrer o desacoplamento da NOS, passando essa enzima a produzir $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 ao invés de NO (LANDMESSER et al., 2003). Uma vez bloqueada a ação da NOS desacoplada, provavelmente ocorra a diminuição na formação desses RL e ERO, e assim, juntamente com a permanência da atividade aumentada da CAT, atuem protegendo o miocárdio contra o desenvolvimento da contratatura isquêmica, associada a situação de estresse oxidativo.

6. CONCLUSÃO

A reposição hormonal utilizada mostrou-se eficaz em recuperar as concentrações de 17β -estradiol nas ratas ovariectomizadas. Parece que o estrogênio realmente desempenha um importante papel na modulação do tônus coronariano e na contratilidade cardíaca, principalmente pela ação antioxidante e influência no metabolismo do óxido nítrico. As alterações na pressão de perfusão coronariana mostraram padrão oposto às concentrações de $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ e H_2O_2 . Como visto anteriormente, as ações vasculares do peróxido de hidrogênio parecem estar relacionadas com o NO, podendo agir como vasoconstritor ou vasodilatador, dependendo da sua concentração. O aumento nas ERO induzido pela ovariectomia promove diminuição na biodisponibilidade do NO, provavelmente pelo aumento da formação de peroxinitrito, e aumenta a atividade e concentração dos antioxidantes, tentando evitar o estado de estresse oxidativo. O peroxinitrito, uma espécie reativa de nitrogênio, juntamente com as ERO, parece estar envolvido tanto na piora da função cardíaca como na disfunção endotelial. Ao bloquear a síntese do NO, provavelmente ocorra uma diminuição na formação do peroxinitrito, predominando a dismutação do ânion radical superóxido. Desta maneira, a determinação dessa espécie reativa de nitrogênio através da quantificação de nitrotirosina, um produto da oxidação de proteínas, poderia mostrar sua participação nas respostas encontradas nos respectivos grupos experimentais.

O aumento da atividade da CAT nas ratas OVX possivelmente seja conseqüência do aumento nas concentrações de H_2O_2 quando essas ratas foram

castradas: uma adaptação durante o período experimental, fazendo com que aumentasse a atividade da CAT e reduzisse as concentrações de H_2O_2 . Visto isso, o bloqueio da atividade da CAT com azida sódica reduziria a degradação de H_2O_2 e poderia, assim, ser melhor elucidada a importância do H_2O_2 na função cardiovascular nesses grupos experimentais. A investigação do estado redox da glutatona e atividade da enzima antioxidante glutatona peroxidase também poderiam trazer informações adicionais a esse respeito, uma vez que a glutatona participa na redução do peróxido de hidrogênio a H_2O e O_2 .

Desta forma, para determinar a importância relativa do NO e do H_2O_2 nas respostas observadas nesse estudo seriam necessárias essas avaliações adicionais sugeridas.

7. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Apesar da metodologia utilizada para desenvolver o estudo ter sido considerada eficaz para os objetivos propostos, não conseguimos comprovar a importância relativa do H_2O_2 , do NO e sua inter-relação nesse modelo de estudo. Visto isso, sugerimos continuidade do trabalho buscando elucidar a importância desses na disfunção cardiovascular.

O número limitado de animais por grupo dificultou a comparação estatística entre os respectivos grupos experimentais. Mesmo havendo uma tendência de diferença em alguns parâmetros como, por exemplo, na PDFVE dos grupos perfundidos com TYRODE, devido ao pequeno número de animais, essa não foi significativa.

Portanto, devido às limitações encontradas no desenvolvimento do estudo sugerimos estudos adicionais para complementar os achados aqui descritos.

8. REFERÊNCIAS

1. AEBI, H. Catalase in vitro. *Meth Enzymol*, v.105, p.121-126, 1984.
2. ASCENSÃO, A.; MAGALHÃES, J.; SOARES, J. Exercício e stress oxidativo cardíaco. *Rev Port Cardiol*, v.22, n.5, p. 651-78, 2003.
3. BAKER, H.; LINDSEY, J.R.; WEISBROTH, S.H. The laboratory rat biology and disease. *Academic Press*, v.1, 1979.
4. BALDUS, S.; EISERICH, J.P.; BRENNAN, M.L.; JACKSON, R.M.; ALEXANDER, C.B.; FREEMAN, B.A. Spatial mapping of pulmonary and vascular nitrotyrosine reveals the pivotal role of myeloperoxidase as a catalyst for tyrosine nitration in inflammatory diseases. *Free Radic Biol Med*, v.33, p. 1010, 2002.
5. BARP, J.; ARAÚJO, A.S.R.; FERNANDES, T.R.G.; RIGATTO, K.V.; LLESUY, S.; BELLÓ-KLEIN, A.; SINGAL, P. Myocardial antioxidant and oxidative stress changes due to sex hormones. *Braz Med Biol Res*, v.35, n.9, p.1075-81, 2002.
6. BAUERMANN, L. Estudo das alterações cardiovasculares e do metabolismo de oxigênio na anemia e na sobrecarga de ferro. 2000. 140 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Fisiologia). – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
7. BELLÓ, A.R. & BELLÓ, A.A. Cardiac contracture induced by hydrogen peroxide. *Med Sci Res*, v.16, p.1149-1150, 1988.

8. BELLÓ-KLEIN, A.; OLIVEIRA, A.R.; MIRANDA, M.F.S.; IRIGOYEN, M.C.; HOMEM-DE-BITTENCOURT JR, P.I.; LLESUY, S.; BELLÓ, A.A. Effect of trolox C on cardiac contracture induced by hydrogen peroxide. *Braz J Med Biol Res*, v.30, n.11, p.1337-1342, 1997.
9. BEUCHAMP, C. & FRIDOVICH, I. Isozymes of superoxide dismutase from wheat germ. *Biochim Biophys Acta*, v.317, p.50-64, 1973.
10. BIANCHI, P.R.; GUMZ, B.P.; GIUBERTI, K.; STEFANON, I. Myocardial infarction increases reactivity to phenylephrine in isolated aortic rings of ovariectomized rats. *Life Sci*, v.78, p.875-881, 2006.
11. BIANCHINI, A. & BELLÓ, A.A. Hydrogen peroxide effects on the contractile force and the coronary flow of the rat isolated heart. *Med Sci Res*, v.16, p.1265-1266, 1988.
12. BLOCH, K.D.; JANSSENS, S. Cardiomyocyte-specific overexpression of nitric oxide synthase 3: impact on left ventricular function and myocardial infarction. *Cardiovasc Med*, v.15, p.249-253, 2005.
13. BORRAS, C.; SASTRE, J.; GARCIA-SALA, D.; LLORET, A.; PALLARDO, F.V.; VINA, J. Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radic Biol Med*, v.34, n.5, p.546-52, 2003.
14. BOVERIS, A.; CADENAS, E.; REITER, R.; FILIPKOWSKI, M.; NAKASE, Y.; CHANCE, B. Organ chemiluminescence: noninvasive assay for oxidative radical reaction. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.77, p.347-351, 1980.

15. DARKOW, D.; LU, L.; WHITE, R.E. Estrogen relaxation of coronary artery smooth muscle is mediated by NO and GMPc. *Am J Physiol*, v.272, p.H2765-H2773, 1997.
16. CAI, H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: Origins, mechanisms and consequences. *Cardiovasc Res*, v.68, p.26-36, 2005.
17. FREEMAN, M.E. In: Knobil E and Neill JD (eds). The physiology of reproduction. *New York, Raven Press*, p.613-647, 1994.
18. FUKUHARA, S.; SHONOSUKE, M.; SAKAKIBARA, Y. Changes in coronary resistance related to the stages of the female life cycle. *Circ J*, v.70, p.478-481, 2006.
19. FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V. The obligatory of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, v.288, p. 373-376, 1980.
20. GEBARA, O.C.E.; VIEIRA, N.W.; ALDRIGHI, J.M. Interações entre estrogênio e endotélio. In: DA LUZ PL, LAURINDO FRM, CHAGAS ACP. Endotélio: doenças cardiovasculares, São Paulo, Atheneu, 2003. p. 281-295.
21. GOLDIN, J.R. & RAYMUNDO, M.M. Pesquisa em saúde e direito dos animais. 2^a. ed. *HCPA*, Porto Alegre, RS, 1997.
22. GRADY, D. Postmenopausal Hormones – Therapy for Symptoms only. *N Engl J Med*, v.348, p.191-3, 2003.
23. GRANGER, D.L.; ANSTEY, N.M.; MILLER, W.C.; WEINBERG, J.B. Measuring nitric oxide production in human clinical studies. *Meth Enzymol*, v.301, p.58-61, 1999.

24. GROHÉ, C.; KAHLERT, S.; LOEBBERT, K.; STIMPEL, M.; KARAS, R.H.; VETTER, H.; NEYSES, L. Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors. *FEBS Letters*, v.416, p.107-112, 1997.
25. GRUBER, C.J.; TSCHUGGUEL, W.; SCHNEEBERGER, C.; HUBER, J.C. Production and actions of estrogens. *N Engl J Med*; v.346, n.5, p.340-351, 2002.
26. HAN, H.; KAISER, R.; HU, K.; LASER, M.; ERTL, G.; BAUERSACHS J. Selective modulation of endogenous nitric oxide formation in ischemia/reperfusion injury in isolated rat hearts. *Basic Res Cardiol*, v. 98, p.165-174, 2003.
27. HARE, J.M. & STAMLER J.S. NO/redox disequilibrium in the failing heart and cardiovascular system. *J Clin Invest*, v. 115, n. 3, p.509-517, 2005.
28. HEARSE, D.J.; GARLICK, P.B.; HUMPHREY, S.M. Ischemic contracture of the myocardium: mechanism and prevention. *Am J Cardiol*, v. 39, p.986-993, 1977.
29. HERNÁNDEZ, I.; DELGADO, J.L.; DÍAZ, J.; QUESADA, T.; TERUEL, M.J.G.; LLANOS, M.C.; CARBONELL, L.F. 17 β -Estradiol prevents oxidative stress and decreases blood pressure in ovariectomized rats. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*, v. 279, p. R1599-R1605, 2000.
30. HARRISON, D.G. Perspective Series: Nitric oxide and nitric oxide synthases. cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *Am Soc Clin Invest*, v.100, n. 9, p.2153-2157, 1997.

31. KATZENELLENBOGEN, B.S.; CHOI, I.; DELAGE-MOURROUX, R.; EDIGER, T.R.; MARTINI, P.G.V.; MONTANO, M.; SUN, J.; WEIS, K. Molecular mechanisms of estrogen actions: selective ligands and receptor pharmacology. *J Steroid Biochem*, v.74, p.270-285, 2000.
32. KAUL, N.; SIVESKI-ILISKOVIC, N.; HILL, M.; SLEZAK, J.; SINGAL, P.K. Free Radicals and the heart. *J Pharmacol Toxicol*, v.30, n.2, p.55-67, 1993.
33. KAUSER, K. & RUBANYI, G.M. Gender difference in bioassayable endothelium-derived NO from isolated rat aortas. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v.267, p.H2311-H2317, 1994.
34. KLEINER, H.; WALLERATH, T.; EUCHENHOFER, C. Estrogens increase transcription of the human endothelial NO synthase gene: analysis of the transcription factors involved. *Hypertension*, v.31, p.582-588, 1998.
35. KUPPUSAMY, P. & ZWEIER, J.L. Characterization of free radical generation by xantine oxidase. *J Biol Chem*, v.164, n.17, p.9880-9884, 1989.
36. LANDMESSER, U.; DIKALOV, S.; PRICE, S.R.; McCANN, L.; FUKAI, T.; HOLLAND, S.M. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest*, v.111, p.1201-9, 2003.
37. LANGENDORFF, O. Untersuchungen am überlebender saugethierherzen. *Phluegers Arch. Physiol*, v.61, p.291-332, 1985.
38. LEVIN, E.R. Estrogen- β and the cardiovascular system. *Trends Endocrin Met*, v.13, n.5, p.184-185, 2002.

39. LLESUY, S.F. Introducción y especies activas de oxígeno. In: Marroni, N.P. Estresse oxidativo e antioxidantes, Porto Alegre, Ulbra, 2002. p. 21-32.
40. LLESUY, S.F.; MILEI, J.; MOLINA, H.; BOVERIS, A.; MILEI, S. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadrimycin in mice. *Tumori*, v.71, p. 241–249, 1985.
41. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, A.L.; FARR, A.L.; RANDALL, R. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, v.193, p.265–275, 1951.
42. McCORD, J.M. Oxygen-derived free radicals in postischemic injury. *N Engl J Med*, v.312, p.159-163, 1985.
43. MANSON, J.; HSIA, J.; JOHNSON, K.; ROSSOUW, J.E.; ASSAF, A.; LASSER, N.; TREVISAN, M.; BLACK, H.; HECKBERT, S.R.; DETRANO, R.; STRICKLAND, O.L.; WONG, N.D.; CROUSE, J.; STEIN, E.; CUSHMAN, M. For the women's health initiative investigators. *N Engl J Med*, v.349, n.6, p.523-34.
44. MARKLUND, S. Handbook of methods for oxygen radical research. Boca Rat CRC Press, p.243-247, 1985.
45. MARSLEW, U.; RIIS, B.J.; CHRISTIANSEN, C. Bleeding patterns during continues combined estrogen-progestogen therapy. *Am J Obstet Gynecol*, v.164, p.1163-8, 1991.
46. MENEHINI, R. A toxicidade do oxigênio. *Ciência hoje* 1987;5(6):57-62.
47. MICHEL, T.; FERON, O. Perspective Series: Nitric Oxide and Nitric Oxide Synthases. Nitric Oxide Synthases: Which, Where, How, and Why?. *Am Soc Clin Invest*, v.100, n.9, p.2146-2152, 1997.

48. MILLER, V.M. Gender, Estrogen, and NOS. Cautions about Generalizations. *Circ Res*, v.85, p.979-981, 1999.
49. MORGAN-MARTINS, M.I. A reposição de estrogênio diminui o dano oxidativo, aumenta a atividade das enzimas antioxidantes e melhora a função cardíaca em ratas. 2003. 185 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Fisiologia). – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
50. OZGONUL, M.; OGE, A.; SEZER, E.D.; BAYRAKTAR, F.; SOZMEN, E.Y. The effects of estrogen and raloxifene treatment on antioxidant enzyme in brain and liver of ovariectomized female rats. *Endocr Res*, v.29, n.2, p.183-9, 2003.
51. PARK, C.O.; XIAO, X.H.; ALLEN, D.G. Changes in intracellular Na^+ and pH in rat heart during ischemia: role of Na^+/H^+ exchanger. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v.276, p.H1581-H1590, 1999.
52. PICK, E. & KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods*, v.38, p.161-170, 1980.
53. POTHIN, H.S. Alterações mecânicas, metabólicas e enzimáticas induzidas por peróxido de hidrogênio ou isquemia-reperfusão no coração isolado de rato. 1999. 181 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Fisiologia). – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

54. PREDIGER, M.E.; GAMARO, G.D.; CREMA, L.M.; FONTELLA, F.U.; DALMAZ, C. Estradiol protects against oxidative stress induced by chronic variate stress. *Neurochem Res*, v.29, n.10, p.1923-1930, 2004.
55. SANTOS, R.L.; ABREU, G.R.; BISSOLI, N.S.; MOYSÉS, M.R. Endothelial mediators of 17 β -estradiol-induced coronary vasodilation in the isolated rat heart. *Braz J Med Biol Res*, v.37, p.569-575, 2004.
56. SINGAL, P.K.; KHAPER, N.; PALACE, V.; KUMAR, D. The role of oxidative stress in the genesis of heart disease. *Cardiovasc Res*, v.40, p.426-432, 1998.
57. 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*, v.93, n.2, p.170-7, 2003.
58. THOMPSON, L.P.; PINKAS, G.; WEINER, C.P. Chronic 17- β estradiol replacement increases nitric oxide-mediated vasodilation of guinea pig coronary microcirculation. *Circulation*, v.102, p.445-451, 2000.
59. VAN DER SCHOUW, Y.T.; VAN DER GRAAF, Y.; STEYERBERG, E.W. Age at menopause as a risk factor for cardiovascular mortality. *Lancet*, v.347, p.714-8, 1996.