



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
DOUTORADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

VITOR ULISSSES DE MELO

**INFLUÊNCIA DOS HORMÔNIOS OVARIANOS SOBRE
ESTRUTURAS OCITOCINÉRGICAS PRÉ-AUTONÔMICAS
ENVOLVIDAS NO CONTROLE DA PRESSÃO ARTERIAL EM
RATAS**

**SÃO CRISTÓVÃO / SE
2017**

VITOR ULISSES DE MELO

**INFLUÊNCIA DOS HORMÔNIOS OVARIANOS SOBRE
ESTRUTURAS OCITOCINÉRGICAS PRÉ-
AUTONÔMICAS ENVOLVIDAS NO CONTROLE DA
PRESSÃO ARTERIAL EM RATAS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Valter Joviniano de Santana Filho

SÃO CRISTÓVÃO / SE

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

M528i

Melo, Vitor Ulisses de

Influência dos hormônios ovarianos sobre estruturas
ocitocinérgicas pré-autonômicas envolvidas no controle da pressão
arterial em ratas / Vitor Ulisses de Melo ; orientador Valter
Joviniano de Santana Filho. – São Cristovão, 2017.

56 f. : il.

Tese (doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade
Federal de Sergipe, 2017.

1. Barorreflexo. 2. Ocitocina. 3. Sistema nervoso autônomo. 4.
Ovariectomia. I. Santana Filho, Valter Joviniano de, orient. II. Título.

CDU 612.146

VITOR ULISSES DE MELO

**INFLUÊNCIA DOS HORMÔNIOS OVARIANOS SOBRE
ESTRUTURAS OCITOCINÉRGICAS PRÉ-
AUTONÔMICAS ENVOLVIDAS NO CONTROLE DA
PRESSÃO ARTERIAL EM RATAS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas.

1º Examinador: Prof. Dr. Valter Joviniano de Santana Filho (UFS)

2º Examinador: Profa. Dra. Josimari Melo de Santana (UFS)

3º Examinador: Prof. Dr. Marcelo Mendonça Mota (Estácio/Fase)

4º Examinador: Prof. Dr. Daniel Badaue Passos Júnior (UFS)

5º Examinador: Profa. Dra. Sandra Lauton dos Santos (UFS)

Dedico esta dissertação a Deus, pelo fôlego de vida. A minha mãe Joselita, meu pai Sydnei, ao meu irmão Sydnei Júnior e minha esposa Rayssa, que com muito carinho e esforço foram meus pilares para que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Valter Joviniano de Santana Filho, por ter aberto as portas da ciência e, desde o ínicio, contribuiu para a minha formação científica e pessoal ao confiar e acreditar no meu trabalho.

A Profa. Dra. Josimari Melo de Santana pela imensa contribuição pessoal e profissional durante as aulas, bancas de avaliação e conversas pelos corredores da universidade.

Aos professores do PROCFIS, DFS e DEF por dividirem comigo um pouco do conhecimento por eles adquiridos.

Ao pessoal da secretaria do PROCFIS, em especial Renivan (Renivelson ou Renivas) por ser sempre solícito, atencioso, pelos valiosos auxílios e pelas conversas para falar besteiras...rsrs

Aos amigos de pós-graduação, em especial ao Mitchel, Fabrício, Ítalo, Neguinho, Thássio, Robervan, Lari, Thatá, Marcelinho, Paty, Cácia, Larissa e André. Muito obrigado! Vocês fizeram os dias de estudo e trabalho mais fáceis.

Aos companheiros do laboratório de Fisiologia Cardiovascular, Profa. Dra. Josiane Cruz e a Profa. Dra. Lisete Michelini por acreditarem no meu projeto e potencial para executá-lo.

Aos amigos do Lira Lab, Jay, Jordan Fuqua, Jordan Rose, Mitch, Caleb, Nick e Trey. Obrigado pelos ensinamentos e paciência.

Ao Prof. Dr. Vitor e Ana Lira que me receberam de maneira tão especial, agradeço por ter vocês como mentores.

A minha roomate Livia, nunca esqueceremos o que fez por nós.

Aos amigos de Iowa City, valeu Brunão sem alma!!! Thanks for everything Lauren!!! Tamo junto!!!

Aos laços estreitados em Iowa City e que seguirão em Aju, valeu Thiagão!!!

Aos meu primos Alê e Jairinho, Tia Jô e Vanessa. Isso só foi possível por tê-los como a base paulista. Base de trabalho, carinho e diversão, claro.

Aos meus pais pelo amor, incentivo e suporte incondicional. Muito obrigado!
Amo vocês.

Ao meu irmão pelo carinho, pelas brigas...rsrs e pela amizade. Te amo mlk.

À minha esposa pelo carinho e aguentar meu *stress* quando as coisas davam errado. Por acreditar nos meus sonhos e vive-los ao meu lado. Por atravessar o planeta, se distanciar da própria família, suportar temperaturas extremas, sempre com um sorriso no rosto. Te amo meu Amor!!!

Aos meus avós e tios, me desculpem pela ausência, muito obrigado por tudo!

À CAPES/FAPITEC pelo auxílio financeiro que permitiu a realização dessa pesquisa.

Aos animais que, como parte do processo da pesquisa, contribuem com o desenvolvimento de evidências científicas para a melhoria da vida dos seres humanos.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram, incentivaram e me apoiaram neste projeto.

Muito obrigado a todos!!!!

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus.
Muito, nos aproxima.”
Louis Pasteur

RESUMO

Influência dos hormônios ovarianos sobre estruturas ocitocinérgicas pré-autonômicas envolvidas no controle da pressão arterial em ratas, Vitor Ulisses de Melo, São Cristóvão, 2017.

A prevalência de doenças cardiovasculares, incluindo hipertensão arterial, aumenta em mulheres após o período de menopausa. Entretanto os mecanismos envolvidos na gênese desses processos patológicos não estão completamente elucidados. Neurônios ocitocinérgicos (OTérgicos) estão presentes em grande quantidade no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN). Estudos prévios mostraram que o aumento de ação OTérgica para o tronco encefálico pode melhorar a sensibilidade do barorreflexo, bem como, o controle autonômico da circulação. Considerando que neurônios pré-autonômicos do PVN expressam diferentes tipos de receptores para estrogênio, hipotetizamos que a privação de hormônios ovarianos causaria diminuição da eficiência do barorreflexo, disautonomia e hipertensão por impactar negativamente as projeções OTérgicas e a expressão de ocitocina nesse local. Para testar tal hipótese, mensuramos gene e expressão proteica de ocitocina (qPCR e imunohistoquímica) em subnúcleos do PVN de ratas Wistar ovariectomizadas ou sham. Registros hemodinâmicos em animais acordados foram utilizados para mensuração da pressão arterial, frequência cardíaca, sensibilidade espontânea do barorreflexo. A modulação autonômica cardíaca e a vascular foram estimadas por meio da potência de análise espectral. Observamos que a privação de hormônios ovarianos promoveu redução da sensibilidade do barorreflexo, aumento da modulação simpática concomitante a diminuição da modulação vagal cardíaca e elevação da pressão arterial média em repouso. Ademais, ratas ovariectomizadas tiveram menor expressão de RNAm e expressão de ocitocina em todos os núcleos pré-autonômicos do PVN. Além disso, reduzido nível proteico de ocitocina correlaciona-se positivamente com a diminuída sensibilidade do barorreflexo e negativamente com a razão LF/HF. Esses achados sugerem que a redução da expressão de ocitocina em neurônios pré-autonômicos do PVN contribui para a disfunção do barorreflexo e desregulação autonômica observada após privação de hormônios ovarianos.

Palavras-chave: barorreflexo, ocitocina, sistema nervoso autônomo, ovariectomia.

ABSTRACT

Influence of ovarian hormones in oxytocinergic preautonomic nuclei related to blood pressure control in female rats, Vitor Ulisses de Melo, São Cristóvão, 2017.

The prevalence of cardiovascular diseases including hypertension increases dramatically in women after menopause, however the mechanisms involved remain incompletely understood. Oxytocinergic (OTergic) neurons are largely present within the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN). Several studies have shown that OTergic drive from PVN to brainstem increases baroreflex sensitivity and improves autonomic control of the circulation. Since preautonomic PVN neurons express different types of estrogen receptors, we hypothesize that ovarian hormone deprivation causes baroreflex impairment, autonomic imbalance and hypertension by negatively impacting OTergic drive and oxytocin levels in pre-autonomic neurons. Here, we assessed oxytocin gene and protein expression (qPCR and immunohistochemistry) within PVN subnuclei in sham-operated and ovariectomized Wistar rats. Conscious hemodynamic recordings were used to assess resting blood pressure and heart rate and the autonomic modulation of heart and vessels was estimated by power spectral analysis. We observed that the ovarian hormone deprivation in ovariectomized rats decreased baroreflex sensitivity, increased sympathetic and reduced vagal outflows to the heart and augmented the resting blood pressure. Of note, ovariectomized rats had reduced PVN oxytocin mRNA and protein expression in all pre-autonomic PVN subnuclei. Furthermore, reduced PVN oxytocin protein levels were positively correlated with decreased baroreflex sensitivity and negatively correlated with increased LF/HF ratio. These findings suggest that reduced oxytocin expression in preautonomic neurons of the PVN contributes to the baroreflex dysfunction and autonomic deregulation observed with ovarian hormone deprivation.

Keywords: baroreflex, oxytocin, arterial pressure, autonomic nervous system, ovariectomy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do eixo hipotálamo – hipófise – ovários..	6
Figura 2. Representação esquemática das vias bulbares e suprabulbar de controle da pressão arterial..	10
Figura 3. Avaliação hemodinâmica em ratas submetidas a ovariectomia (OVX) ou cirurgia SHAM..	23
Figura 4. Variabilidade da frequência cardíaca e barorreflexo em ratas submetidas a ovariectomia (OVX) ou cirurgia SHAM..	24
Figura 5 Variabilidade da pressão arterial em ratas submetidas a ovariectomia (OVX) ou cirurgia SHAM.....	24
Figura 6. Expressão gênica e proteica de ocitocina (OT) no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) em ratas SHAM e ovariectomizadas (OVX).....	25
Figura 7. Correlação entre imunorreatividade para ocitocina (OT) e sensibilidade do barorreflexo (sBRS) após privação de hormônios ovarianos.....	27

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Massa corporal (no início e final dos experimentos) em ratas submetidas a ovariectomia (OVX) ou cirurgia SHAM 23

Tabela 2. Equações de regressão correlacionando imunorreatividade de ocitocina (OT, mensurados por densidades relativa e integrada em diferentes subnúcleos do PVN) com sensibilidade espontânea do barorreflexo (sBRS) e balanço simpato-vagal cardíaco (razão LF/HF) em ratas submetidas a ovariectomia (OVX) ou SHAM 26

LISTA DE ABREVIATURAS

AVP	Vasopressina
CVLM	Núcleo caudal ventrolateral do bulbo
DCV	Doenças cardiovasculares
DMV	Núcleo dorsal motor do vago
ER-β	Receptor tipo beta para estrogênio
FC	Frequência cardíaca
FSH	Hormônio folículo estimulante
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
GPER	Receptor para estrogênio acoplado a proteína G
HF	Banda de alta frequência
IP	Intervalo de pulso
LF	Banda de baixa frequência
LH	Hormônio luteinizante
NA	Núcleo ambíguo
NTS	Núcleo do trato solitário
OT	Ocitocina
OTérgicos	Ocitocinérgicos
PA	Pressão arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial media
PAS	Pressão arterial sistólica
PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo
RVLM	Núcleo rostral ventrolateral do bulbo
sBRS	Sensibilidade espontânea do barorreflexo
SNA	Sistema nervoso autônomo
VLF	Banda de muito baixa frequência

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO DE LITERATURA	3
Fisiologia do sistema reprodutor feminino	5
Controle reflexo da pressão arterial	6
Centro suprabulbar de controle cardiovascular.....	9
A Ocitocina como modulador do controle autonômico da pressão arterial.....	10
Relação entre ocitocina e hormônios ovarianos	13
OBJETIVOS	15
MATERIAL E MÉTODOS.....	16
Animais.....	16
Procedimentos cirúrgicos.....	16
Mensuração do controle autonômico cardiovascular.....	18
Coleta de tecidos	19
PCR em tempo real quantitativo	20
Análise imunohistoquímica	21
Aquisição de imagens e análise	21
Análise estatística	22
RESULTADOS	22
Massa corporal e controle autonômico cardiovascular.....	22
Efeitos da privação de hormônios ovarianos em neurônios ocitocinérgicos do PVN	24
DISCUSSÃO	27
CONCLUSÃO.....	33
SUPORTE FINANCEIRO	34
REFERÊNCIAS	35
ANEXO A	46
Artigo publicado.	46
ANEXO B	47
Artigo publicado.	47
ANEXO C	48
Declaração do comitê de ética em pesquisa com animais.	48

INTRODUÇÃO

A menopausa é caracterizada pela redução das concentrações circulantes de hormônios ovarianos (progesterona e estrogênio) sendo considerada um importante fator de risco cardiovascular. Estudos tem demonstrado que a redução desses hormônios promovem hipertensão arterial, disfunção endotelial, elevação do estresse oxidativo, aumento do conteúdo plasmático de lipídios, disautonomia e deterioração do controle barorreflexo que, coletivamente, resultam em alto risco de morbidade e mortalidade por processos patológicos que atingem o sistema cardiocirculatório. (JENSEN; NILAS; CHRISTIANSEN, 1990; TADDEI et al., 1996; MERCURIO et al., 2000; IRIGOYEN et al., 2005; FLUES et al., 2010). De fato, doenças cardiovasculares são as principais causas de morte em mulheres após a menopausa (MOZAFFARIAN et al., 2015).

Está bem estabelecido que núcleos do tronco encefálico e o Núcleo Paraventricular do Hipotálamo (PVN) são os principais centros de regulação das respostas autonômicas cardiovasculares. Para exemplificar, temos que o aumento da pressão arterial (PA) ativa neurônios dentro do Núcleo do Trato Solitário (NTS), que por sua vez, estimulam neurônios parassimpáticos no Núcleo ambíguo (NA) e no Núcleo Dorsal Motor do Vago (DMV) (DAMPNEY, 1994). O NTS também se projeta e excita neurônios GABAérgicos para o Núcleo Caudal Ventrolateral do Bulbo (CVLM), que reduz a atividade de neurônios simpáticos pré-motores do Núcleo Rostral Ventrolateral do Bulbo (RVLM) que são direcionados ao coração e vasos (DAMPNEY, 1994). Essa complexa rede de informação continuamente se comunica com neurônios pré-autonômicos do PVN, por meio de aferências catecolaminérgicas oriundas do NTS e do CVLM, que controlam a atividade neurosecretora do núcleo hipotalâmico (MICHELINI; STERN, 2009; SLADEK et al., 2015). Neurônios pré-autonômicos ocitocinérgicos

(OTérgicos) encontrados nos núcleos dorsal cap, ventromedial e posterior do PVN são ativados por essas aferências ascendentes e se projetam novamente para núcleos do tronco encefálico e medula espinhal, deste modo, modulando o controle autonômico circulatório. (BUIJS, 1978; MICHELINI; STERN, 2009; GEERLING et al., 2010; CRUZ et al., 2013; SLADEK et al., 2015). A relevância fisiológica da via de sinalização central dependente de ocitocina (OT) no controle das respostas cardiovasculares tem sido mostrada em diversos estudos. Aumento da ação ocitocinérgica em áreas do tronco encefálico melhora a sensibilidade do barorreflexo cardíaco facilitando a resposta bradicárdica (HIGA et al., 2002; CAVALLERI et al., 2011).

Diferentes tipos de receptores para estrogênio são expressos no PVN. Mais especificamente, o receptor nuclear para estrogênio β (ER- β) e receptor para estrogênio acoplado a proteína G são encontrados em neurônios OTérgicos (ALVES et al., 1998; HRABOVSZKY et al., 1998; BRAILOIU et al., 2007); entretanto, a ligação funcional entre hormônios ovarianos e a sinalização central por OT permanece não esclarecida. Desta forma, hipotetizamos que a privação de hormônios ovarianos atenua a expressão e a sinalização ocitocinérgica em áreas pré-autonômicas do PVN, contribuindo para o surgimento da hipertensão, disautonomia e redução da sensibilidade do barorreflexo.

Os hormônios ovarianos, além de possuírem papel fundamental na regulação do sistema reprodutor, são importantes mantenedores da pressão arterial agindo por mecanismos reflexos e humorais, direta e indiretamente. Considerando que a menopausa é um evento que acometerá as mulheres devido ao envelhecimento ou de forma precoce após a retirada dos ovários, é importantíssimo que hajam estudos que avaliem as repercussões cardiovasculares e mecanismos pelo qual estas ocorrem com o intuito de embasar futuros trabalhos em busca de métodos de prevenção e tratamento das doenças que incidem sobre o sistema cardiovascular após privação dos hormônios femininos.

REVISÃO DE LITERATURA

A menopausa é definida como a cessação do processo de menstruação por uma redução da atividade dos folículos ovarianos. A diminuição das concentrações de estrogênio, a redução da progesterona circulante e a elevação dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH) causam amenorreia (“Research on the menopause in the 1990s. Report of a WHO Scientific Group”, 1996). A persistência dos sintomas por 12 semanas se caracteriza como menopausa (“Research on the menopause in the 1990s. Report of a WHO Scientific Group”, 1996).

Doenças cardiovasculares (DCV) estão entre os grandes problemas de saúde pública (GO et al., 2013; NICHOLS et al., 2013). Vários estudos têm mostrado menor incidência de DCV em mulheres quando comparado aos homens com idade entre 30 e 45 anos, entretanto, essa diferença diminui com o envelhecimento, aumentando o risco cardiovascular pós-menopausa (BECKER; CORRAO, 1990; WENGER; SPEROFF; PACKARD, 1993; TUNSTALL-PEDOE et al., 1994; GOLDEN et al., 2002).

Diversos estudos mostraram que mulheres no período pós-menopausa apresentam maior risco de insuficiência coronariana, infarto do miocárdio, acidentes vasculares e mortalidade. Esses efeitos são relacionados com o declínio do conteúdo sanguíneo de estrogênio (KANNEL et al., 1976; GORDON et al., 1978; LA VECCHIA et al., 1987; UTIAN, 1989; VAN DER GRAAF; DE KLEIJN; VAN DER SCHOUW, 1997; JACOBSEN; KNUTSEN; FRASER, 1999; MOSCA et al., 2006; GHOLIZADEH; DAVIDSON, 2008; RIVERA et al., 2009).

Estudos experimentais mostraram que ratas ovariectomizadas tornam-se hipertensas, têm a sensibilidade do barorreflexo diminuída e desenvolvem disautonomia (IRIGOYEN et al., 2005; FLUES et al., 2010). Além disso, o estrogênio é capaz de atenuar a magnitude do aumento da PA após indução de hipertensão por aldosterona/NaCl

(XUE et al., 2009, 2013). Desta forma, as evidências científicas sugerem que os hormônios ovarianos possuem efeito cardioprotetor relacionados a homeostase do mecanismo autonômico de controle neural cardiovascular.

A PA é uma das variáveis fisiológicas que necessita ser finamente controlada. Para isso, existem mecanismos fisiológicos neurais e endócrinos capazes de manter a homeostase pressórica em curto, médio e longo prazo. Dentre os hormônios que atuam nessa função encontra-se a OT. Este peptídeo é classicamente estudado pela importância na função reprodutora. No entanto, a literatura científica relata que a OT liberada na circulação promove ajustes hidroelectrolíticos e cardiovasculares, aumentando a natriurese, diminuindo a força de contração e a frequência cardíaca (FC) (CHAN; SAWYER, 1962; HAANWINCKEL et al., 1995; COSTA-E-SOUZA et al., 2005).

Na década de 1990, surgiram trabalhos sugerindo a relevância da OT não somente como hormônio, mas também como neurotransmissor. O PVN é uma das principais regiões produtoras de OT e possui projeções para neurohipófise, onde a OT é liberada como hormônio. Além disso, esse núcleo apresenta sinapses diretas com subnúcleos bulbares que controlam reflexamente a PA (BUIJS, 1978; RUSS; WALKER, 1994; MICHELINI; MORRIS, 1999).

O barorreflexo e o quimiorreflexo são mecanismos de ação reflexa que regulam a PA. Formados por receptores localizados nas artérias aorta e carótidas, possuem aferências projetadas para o bulbo que funcionam como um “centro de integração” das repostas cardiovasculares e recebe projeções ocitocinérgicas. (BUIJS, 1978; CAVALLERI et al., 2011).

Fisiologia do sistema reprodutor feminino

O período reprodutivo feminino é caracterizado por variações nas concentrações de hormônios femininos e órgãos sexuais denominado ciclo menstrual. De forma geral, essas variações ocorrem a cada 28 dias através de alteração da quantidade de hormônios hipotalâmicos, hipofisários e ovarianos com o intuito de promover a liberação do óvulo maduro e desenvolver o endométrio para a fertilização. Caso isso não ocorra, o endométrio é descartado através da menstruação e um novo ciclo se inicia (HALL; GUYTON, 2006; FARAGE; MAIBACH, 2016).

Os hormônios gonadotrópicos, FSH e LH, secretados pela hipófise são responsáveis por desencadear o ciclo menstrual. A ausência de FSH e LH mantem os ovários permanentemente inativos, como observado na infância. Em idade de puberdade há elevação da síntese e liberação desses hormônios para induzir o desenvolvimento ovariano (HALL; GUYTON, 2006; FARAGE; MAIBACH, 2016).

A regulação da concentração ideal de hormônios femininos acontece por meio da alça de feedback negativo no eixo hipotálamo – hipófise – ovários que controla a expressão adequada de estrogênio e progesterona, de acordo com a fase do ciclo menstrual. Inicialmente, durante a primeira metade do ciclo denominada folicular, o hipotálamo promove a liberação do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) que estimula o aumento da produção de FSH e LH que, por sua vez, eleva o conteúdo sanguíneo de estrogênio resultando em crescimento e maturação dos folículos ovarianos e consequente ovulação (HALL; GUYTON, 2006; FARAGE; MAIBACH, 2016).

A segunda etapa do período é caracterizada por elevada concentração de LH sendo denominada como fase lútea. O LH é essencial para a fase final da ovulação. Aproximadamente 2 dias antes da ovulação ocorre um aumento de FSH e LH que causam crescimento do folículo e redução da expressão de estrogênio um dia antes da ovulação.

Após este processo, o LH atua na conversão do folículo em corpo lúteo que marcadamente atua liberando o hormônio progesterona. Se a fecundação não ocorrer haverá uma abrupta redução da progesterona circulante que inicia a descamação do endométrio. As baixas concentrações de estrogênio e progesterona estimulam a liberação de GnRH reiniciando o ciclo. A cessação desse processo começa a acontecer por volta dos 45 anos e quando atinge o período de um ano com ausência de menstruação é denominado menopausa (HALL; GUYTON, 2006; FARAGE; MAIBACH, 2016).

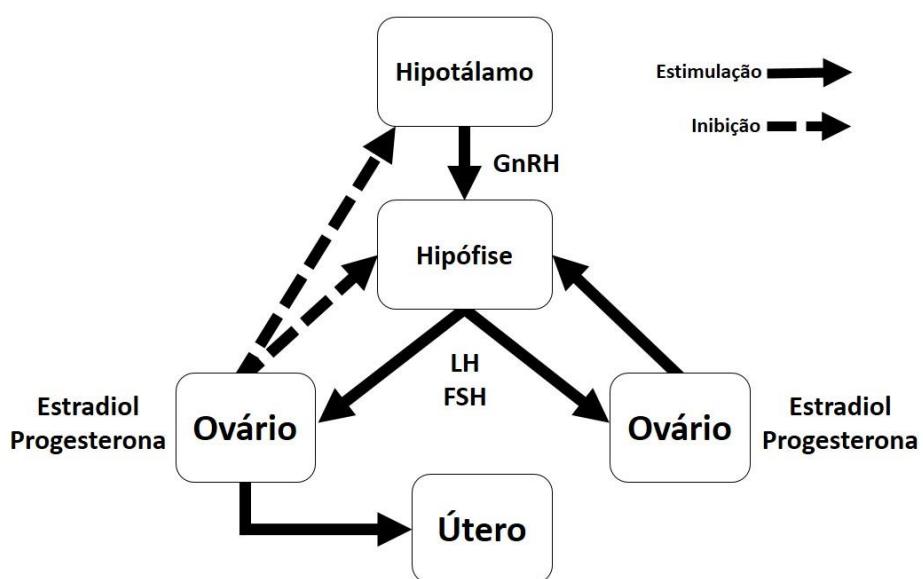


Figura 1. Representação esquemática do eixo hipotálamo – hipófise – ovários. Hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo estimulante (FSH).

Controle reflexo da pressão arterial

A manutenção adequada da PA é essencial para que haja a perfusão sanguínea ideal para os tecidos, sendo resultante da relação entre débito cardíaco e resistência vascular periférica. Para isso, variáveis como volume de ejeção sistólica, volume

sanguíneo, capacidade vascular, retorno venoso e resistência periférica total devem ser finamente controlados.

A regulação em curto e médio prazos da PA é realizada por elementos neurohumorais mediados por receptores que, de forma reflexa, são capazes de tamponar as variações pressóricas, além da liberação de substâncias vasoativas. Dentre esses mecanismos estão o barorreflexo e o quimiorreflexo (CHALMERS; PILOWSKY, 1991; DAMPNEY, 1994).

O barorreflexo consiste em uma porção aferente que envia informações relacionadas às alterações da PA para o sistema nervoso central, o qual, por sua vez, integra essas informações e, por meio de vias eferentes autonômicas (simpática e parassimpática), promove ajustes na PA (CHAPLEAU; ABOUD, 2001).

O componente simpático do sistema nervoso autônomo (SNA) é o principal determinante do tônus vasomotor, atuando, diretamente, na resistência periférica. Entretanto, a atividade cardíaca é modulada por ambas as divisões, simpática e parassimpática, do SNA. Assim, a ação simpática, por meio da noradrenalina, promove vasoconstrição periférica e respostas inotrópicas e cronotrópicas positivas do coração (CHAPLEAU; ABOUD, 2001; KIRCHHEIM, 1976).

A ação parassimpática no sistema cardiocirculatório se expressa, fundamentalmente, por meio de seu mediador químico acetilcolina, o qual promove uma resposta cronotrópica negativa e, também, embora menos expressiva, uma resposta inotrópica negativa (BROWN, 1980; KIRCHHEIM, 1976).

Desta forma, ao serem ativados por um aumento da PA, os barorreceptores induzem diminuição da atividade simpática para coração e vasos, e aumento da atividade vagal cardíaca, promovendo redução da FC, da resistência periférica total e, também, do débito cardíaco, contribuindo para o retorno da PA aos valores normais. Por outro lado,

queda na PA promove redução da atividade dos barorreceptores, a qual induz aumento da atividade simpática para coração e vasos, e redução da atividade vagal cardíaca, para que a PA retorne aos níveis normais (SHEPHERD; VANHOUTTE, 1979).

Outro grupo de receptores que possuem células capazes de detectar variações químicas no sangue são denominados quimiorreceptores. Presentes nos corpúsculos aórticos e seios carotídeos respondem, principalmente, a variações da pressão parcial de oxigênio, gás carbônico e a alterações no pH.

Estudos clássicos mostram que a passagem de sangue pelos quimiorreceptores em animal com hipoventilação provoca aumento da resposta ventilatória. Ademais, a ativação desses receptores pela administração endovenosa de cianeto ou isquemia dos mesmos evoca resposta hipertensiva, taquipnêia e vasoconstrição, demonstrando que o quimiorreflexo também atua na regulação da PA (BERNTHAL, 1937; DALY; HAZZLEDINE; HOWE, 1965; WINDER; BERNTHAL; WEEKS, 1938).

As aferências de quimiorreceptores e barorreceptores se unem, compondo o nervo do seio carotídeo, e se projetam ao centro de integração no sistema nervoso central, de onde partem respostas neurais ventilatórias e pressóricas (CHAPLEAU et al., 1995; M K SUN, 1991; ZOCCAL et al., 2014).

Centros bulbares de controle cardiovascular

O NTS encontra-se na região dorsal do bulbo e tem papel crucial como centro integrador ao receber as projeções aferentes provenientes das terminações nervosas químico e baroceptoras. A ativação dos receptores propaga potenciais de ação que ativam o NTS, desencadeando diversas respostas autonômicas (ANDRESEN; KUNZE, 1994).

A ação parassimpática cardíaca se inicia através de projeções glutamatérgicas (excitatórias) do NTS para neurônios pré-ganglionares do Núcleo Dorsal Motor do Vago

DMV e NA que se dirigem ao coração e, por meio da liberação de acetilcolina, provocam redução da frequência e da força de contração (GEIS; WURSTER, 1980; MACHADO; BRODY, 1988).

Por outro lado, o controle simpático cardiocirculatório é disparado por uma via alternativa que se inicia por projeções glutamatérgicas destinadas ao CVLM, que por sua vez age no RVLM por neurônios GABAérgicos (inibitórios), modulando a liberação de acetilcolina em neurônios pré-ganglionares da cadeia simpática. Quando ativados, estes neurônios evocam elevação da força de contração e FC, além de aumento da resistência vascular periférica através da via adrenérgica (GORDON, 1987; BLESSING, 1988; JESKE; REIS; MILNER, 1995).

Vale ressaltar que as duas vias (simpática e parassimpática) atuam de forma coordenadas de acordo com a quantidade de disparos dos receptores que ocorrem com as variações de pressão. Em outras palavras, o aumento da PA estimula a resposta parassimpática, em contrapartida, a redução da PA eleva a ação simpática.

Centro suprabulbar de controle cardiovascular

Como discutido no tópico anterior, o NTS recebe as aferências originadas nos receptores arteriais e emite projeções para diversas outras áreas bulbares que atuam no controle autonômico cardiorrespiratório, além disso o NTS também se projeta para áreas suprabulбарes que modulam essas funções, dentre elas o PVN (DAMPNEY, 1994; SAWCHENKO; SWANSON, 1982).

O PVN é formado por neurônios magnocelulares e parvocelulares que sintetizam OT e vasopressina (AVP) e fazem conexão com a neurohipófise, núcleos bulbares e medula espinhal (BUIJS, 1978).

As projeções do NTS para o PVN são monossinápticas e caracterizadas por neurônios catecolaminérgicos e, de maneira recíproca, partem do PVN neurônios parvocelulares pré-autonômicos OTérgicos dos subnúcleos dorsal cap, ventromedial e posterior em direção ao NTS, RVLM, NA, DMV e medula espinhal, que modulam a ação do sistema nervoso autônomo (BUIJS, 1978; CRUZ et al., 2013; GEERLING et al., 2010; KALIA; FUXE; GOLDSTEIN, 1985).

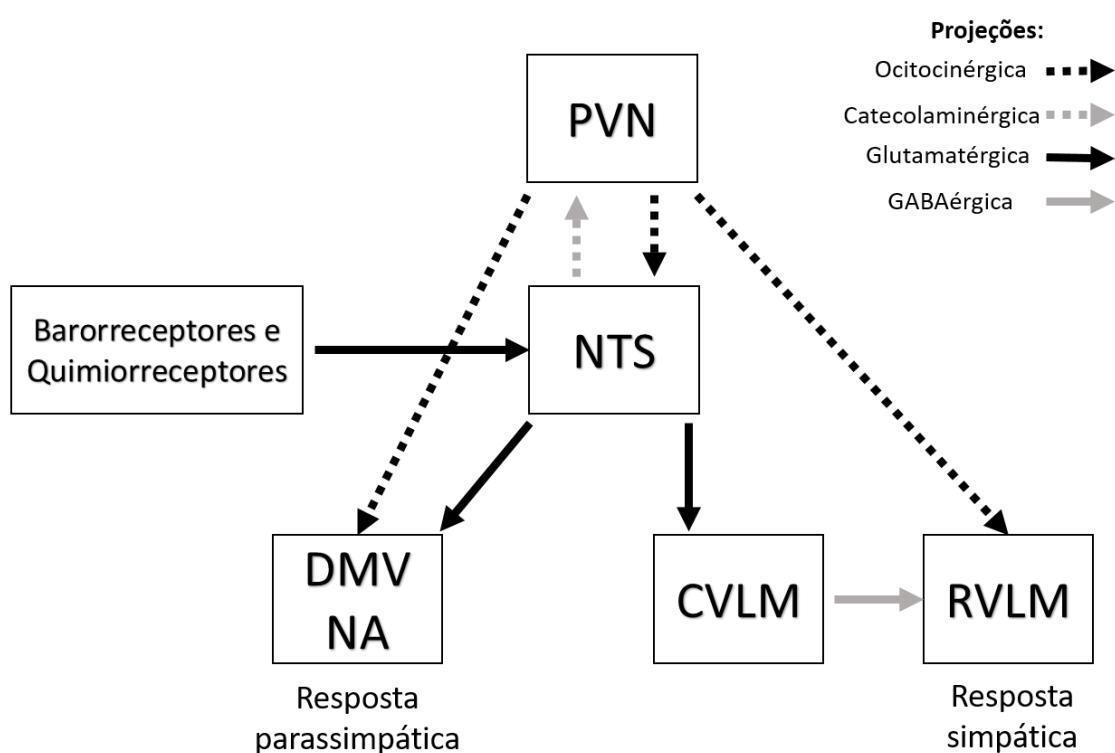


Figura 2. Representação esquemática das vias bulbares e suprabulbar de controle da pressão arterial. Núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), núcleo do trato solitário (NTS), núcleo dorsal motor do vago (DMV), núcleo ambíguo (NA), núcleo caudal ventrolateral (CVLM), núcleo rostral ventrolateral (RVLM).

A Ocitocina como modulador do controle autonômico da pressão arterial

A OT é um peptídeo com função endócrina e neuromoduladora produzido no PVN. Classicamente, é conhecido pela participação no processo de parto e ejeção de leite

sendo essencial para o fenômeno reprodutivo (IVELL; RUSSELL, 1996; LOHMEIER, 2003).

Nos últimos anos, diversos trabalhos têm mostrado o papel da OT na regulação do sistema cardiovascular através de atuação direta no coração (redução da frequência e da força de contração) e vasos sanguíneos (vasodilatação dependente de óxido nítrico) (COSTA-E-SOUSA et al., 2005; KATUSIC; SHEPHERD; VANHOUTTE, 1986; SUZUKI et al., 1992). Entretanto, mais recentemente tem se evidenciado a OT como neurotransmissor regulador do SNA cardiovascular, principalmente, frente a um estímulo que cause desequilíbrio na homeostase.

Em estudo realizado em ratos submetidos ao protocolo de estresse por jato de ar observou-se que animais que receberam microinjeção intracerebroventricular de antagonista de receptor de OT atingem maiores valores de PA e FC durante o procedimento (WSOL et al., 2008).

Os receptores para OT são classificados como receptores acoplados a proteína Gq que se ligam e ativam as subunidades $\beta\gamma$ e, concomitantemente, estimulam as isoformas C e B de fosfolipases. Isso resulta na fosforilação do inositol trifosfato e 1,2-diacilglicerol. O inositol trifosfato causa liberação de estoques intracelulares de cálcio, ao mesmo tempo em que o diacilglicerol é capaz de ativar a proteína quinase C. Juntos são responsáveis por desencadear diferentes efeitos. Como exemplo, o aumento das concentrações citosólicas de cálcio controla a excitabilidade, o padrão de disparos e a liberação de neurotransmissores em células neurosecretora (GIMPL; FAHRENHOLZ, 2001).

Outro trabalho demonstrou experimentalmente que a microinjeção de OT diretamente no NTS melhora a sensibilidade do barorreflexo, facilitando a resposta de bradicardia frente ao aumento pressórico. Em oposição, a administração de OT na medula espinhal evoca uma resposta taquicárdica, sugerindo que a OT cause diferentes respostas

dependentes da área de controle do sistema nervoso autônomo em que atua (HIGA et al., 2002; YANG; HAN; COOTE, 2009).

Além dos efeitos na PA, também ocorre ação nos centros de controle respiratório. Neurônios parvocelulares do PVN se projetam para o complexo pré-Botzinger situado na porção ventrorostral do bulbo, esta área atua no controle respiratório. A estimulação do PVN pelo antagonismo de receptores GABA promove aumento da FC, PA e frequência respiratória; todavia, quando é realizado o antagonismo de receptores para OT no complexo pré-Botzinger, essa resposta é diminuída (MACK et al., 2007).

Diversas doenças podem estar envolvidas com anormalidades na via ocitocinérgica do controle cardiorrespiratório. Lesão de neurônios do PVN ou antagonismo de receptores de OT induzem obesidade em ratos, de modo concordante, o agonismo desses receptores diminui a ingestão alimentar. A obesidade torna os indivíduos mais suscetíveis a hipertensão, hipoventilação e apneia obstrutiva do sono, doenças essas relacionadas com deficiência na função do barorreflexo e hipersensibilização do quimiorreflexo (ARLETTI; BENELLI; BERTOLINI, 1990; BENELLI; BERTOLINI; ARLETTI, 1991; BRISTOW et al., 1969; OLSON et al., 1991; OLSON; ZWILLICH, 2005; LEIBOWITZ; HAMMER; CHANG, 1981; MOLKOV et al., 2011).

Estudos com ratos espontaneamente hipertensos mostrou que há menor quantidade de receptores para OT expressos no PVN, enquanto que a indução para expressão de maior quantidade desses receptores no mesmo núcleo promove aumento da sensibilidade do barorreflexo e melhora o tamponamento das variações da PA (LOZIĆ et al., 2014; MARTINS et al., 2005).

Para a manutenção da perfusão sanguínea, é necessário que a PA esteja adequada. Para isto, mecanismos de controle reflexo batimento a batimento da FC e por meio de variações bioquímicas sanguíneas sinalizam quais as respostas autonômicas necessárias

para que ocorra a devida homeostase pressórica. A OT é um dos responsáveis por esta ação, e a deficiência nesta via está relacionada a comorbidades que afetam o sistema cardiorrespiratório.

Relação entre ocitocina e hormônios ovarianos

Neurônios OTérgicos do PVN (exclusivamente parvocelulares) e do núcleo Supraóptico expressam para estrogênio ER- β que são capazes de modular a produção desse hormônio. No PVN, neurônios responsáveis por expressar OT que contenham ER- β são encontrados nos subnúcleos ventromedial, dorsal cap e posterior. Ademais, a literatura mostra que neurônios pré-autonômicos do PVN (subnúcleo parvocelular posterior) que se projetam para o RVLM apresentam alta densidade de ER- β e têm a excitabilidade diminuída pelo déficit de estrogênio (ALVES et al., 1998; HRABOVSZKY et al., 1998; STERN; ZHANG, 2003).

ER- β possui ação genômica, que é considerada lenta e, por isso, pode não ser o único responsável pela rápida ativação de neurônios OTérgicos ou liberação de OT (ISRAEL; POULAIN, 2000). Sabe-se que algumas células respondem rapidamente ao estímulo do estrogênio para a produção de óxido nítrico, mobilização de cálcio e ativação de tirosina quinases (MORLEY et al., 1992; BRUBAKER; GAY, 1999; KARPUZOGLU et al., 2006).

Baseado nisso, estudos propuseram receptores de ação não genômica para o estrogênio e, mais recentemente, foi descoberto o receptor para estrogênio acoplado a proteína G (GPER) (REVANKAR et al., 2005; THOMAS et al., 2005). Em estudo que avaliou a distribuição de GPER em áreas do sistema nervoso central, foi mostrado que há grande concentração desses receptores no PVN, mais especificamente nas regiões parvocelulares ventral, dorsal cap e, em menor quantidade, nos neurônios parvocelulares

anterior e posterior (BRAILOIU et al., 2007), núcleos esses relacionados ao controle autonômico cardiovascular (BUIJS, 1978; SOFRONIEW; SCHRELL, 1981; SAWCHENKO; SWANSON, 1982).

Diante do exposto, evidencia-se a necessidade de investigação nas possíveis repercussões cardiovasculares, principalmente no sistema nervoso autônomo, causados pela privação de hormônios ovarianos, possivelmente através da via ocitocinérgica de controle reflexo da pressão arterial.

OBJETIVOS

- Avaliar os efeitos da ovariectomia na pressão arterial e na frequência cardíaca.
- Observar os efeitos da ovariectomia na modulação autonômica cardíaca e vascular, além da sensibilidade espontânea do barorreflexo.
- Investigar as densidades relativas e integradas de neurônios ocitocinérgicos no núcleo paraventricular do hipotálamo (subnúcleos ventromedial, dorsal cap, posterior e magnocelular) após ovariectomia.
- Verificar a expressão de RNAm para ocitocina no núcleo paraventricular do hipotálamo em ratas ovariectomizadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Todos os procedimentos cirúrgicos e protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal de Sergipe (11/2014), em acordo com o Guia para cuidado e uso de animais em laboratório publicado pelo National Institute of Health (NATIONAL RESEARCH COUNCIL (US) COMMITTEE FOR THE UPDATE OF THE GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS, 2011). Após o desmame, com 21 dias de vida, os animais foram aleatoriamente divididos em gaiolas (até 5 animais/gaiola), numeradas em ordem crescente e posicionadas de forma randômica na bancada. As caixas com numeração ímpar foram selecionadas para o grupo SHAM, enquanto, as caixas com números pares foram determinadas como OVX. Trinta e três ratas Wistar (193 ± 5 g) foram mantidas em gaiolas de propileno com temperatura ambiente controlada ($22\pm1^{\circ}\text{C}$), ciclo claro/escuro de 12 horas com ração e água *ad libitum*. Os animais foram aleatoriamente divididos em dois grupos e submetidos a ovariectomia (OVX, n = 16) ou cirurgia fictícia (SHAM, n = 17). O pesquisador estava encoberto em relação ao tratamento recebido pelo animal para análise das variáveis. Os registros originais foram nomeados com letras por um segundo pesquisador e, posteriormente, cedidos ao responsável pelas análises. Ao final dos procedimentos, os dados foram identificados e separados por grupo.

Procedimentos cirúrgicos

Na décima semana de idade, as ratas foram anestesiadas (Cetamina: Fort Dodge IA, EUA, $80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ mais Xilazina: Fort Worth TX, EUA, $12 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, *i.p.*) e uma incisão abdominal foi realizada. Os ovários foram expostos e removidos por secção do oviducto.

Os animais do grupo SHAM foram submetidos aos mesmos procedimentos, exceto remoção do ovários. As ratas foram tratadas com Cetoprofeno (Biofen 1%, 2mg.kg⁻¹; Biofarm, Jaboticabal, Brasil) e penicilina (Pentabiótico Veterinário 24,000 i.u.kg⁻¹; Fontoura Wyeth, São Paulo, Brasil) durante uma semana (IRIGOYEN et al., 2005). A eficiência da ovariectomia foi confirmada por meio da análise de esfregaço vaginal coletado em quatro dias consecutivos, uma semana após a cirurgia. Somente as ratas que exibiam a fase diestro do ciclo estral em todas as avaliações foram incluídas no grupo OVX. Todos os animais alocados no grupo SHAM apresentaram ciclo estral regular e foram eutanasiados com a mesma idade (18 semanas).

Oito semanas após a cirurgia de ovariectomia ou procedimento SHAM, as ratas foram anestesiadas (Cetamina, 80 mg.kg⁻¹, Fort Dodge IA, EUA, mais Xilazina, 12 mg.kg⁻¹, Fort Worth TX, USA, *i.p.*) e cateter de polietileno foi implantado (PE-10/PE-50, Intramedic, Becton Dickinson Company, Sparks, MD, EUA) na artéria femoral esquerda. Vinte e quatro horas após a cirurgia, os animais se movimentavam livremente pela caixa e não exibiam sinais de estresse.

O cateter arterial foi conectado a um transdutor de pressão acoplado a pré-amplificador (FE221, Bridge Amp, ADInstruments, Bella Vista, NSW, Austrália) e ao sistema de registro (Powerlab, ADInstruments, Bella Vista, NSW, Austrália). Os sinais pulsáteis e a pressão arterial de repouso foram continuamente registrados por 30 minutos e processados através de software específico (LabChart 7, ADInstruments, Bella Vista, NSW, Austrália). Os pontos de inflexão da pressão foram identificados e geraram séries batimento-a-batimento de pressão arterial media (PAM), pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e intervalo de pulso (IP). A FC foi calculada como 1/IP.

Mensuração do controle autonômico cardiovascular

As análises de variabilidade do IP e da PAS foram realizadas utilizando o software CardioSeries (v2.4, Ribeirão Preto, SP, Brasil), como previamente descrito (OLIVEIRA et al., 2012). Séries batimento-a-batimento foram gerados a partir da pressão arterial pulsátil e convertidos em pontos discretos utilizando interpolação *spline* cúbica (10 Hz).

Um intervalo de dez minutos de registro de cada animal foi usado para essa análise. Antes do cálculo da densidade espectral, os dados foram visualmente inspecionados e os segmentos não estacionários desconsiderados. Em seguida, os dados foram divididos em sequências de meia sobreposição com 512 pontos de dados (51,2 s). Sobre o resultado obtido, aplicou-se a janela de Hanning e o espectro de cada segmento foi calculado por meio da transformada rápida de Fourier.

O espectro do IP, que representa a variabilidade do controle autonômico cardíaco, é composto por bandas de muito baixa frequência (VLF; <0,02 Hz), baixa frequência (LF; 0,2-0,75 Hz) e alta frequência (HF; 0,75-3,0 Hz). Os valores são usualmente expressos em unidades normalizadas (un). LF e HF são obtidos pela divisão da potência da respectiva banda pela potência total menos a potência da banda VLF. VLF do IP representa fatores humorais que influenciam a FC, HF do IP indica a modulação parassimpática cardíaca, LF do IP é geralmente aceito como índice da modulação simpática ao coração, enquanto a razão LF/HF representa o equilíbrio simpato-vagal. (MALLIANI et al., 1991; STAUSS, 2007; OLIVEIRA et al., 2012).

O espectro da pressão arterial sistólica reflete a variabilidade da pressão arterial sendo representado em mmHg². O componente VLF da PAS recebe influência da função vascular miogênica, sistema renina-angiotensina e óxido nítrico, LF da PAS representa a modulação simpática vasomotora concomitante a modulação endotelial pelo óxido nítrico. Finalizando, o HF da PAS é prioritariamente influenciado por alterações no débito

cardíaco acoplado a mudanças no retorno venoso durante a respiração. (JANSSEN et al., 1995; Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology, 1996; STAUSS, 2007).

A sensibilidade espontânea do barorreflexo (sBRS) foi calculada no domínio do tempo, utilizando o método de sequência (RIENZO, 1995). Séries batimento-a-batimento foram analisadas utilizando o software CardioSeries (v2.4, Ribeirão Preto, SP, Brasil) para detectar sequências de, no mínimo, quatro batimentos com aumento da PAS seguido em alongamento do IP ou redução da PAS com encurtamento do IP apresentando correlação maior que 0,85. O *slope* da regressão linear entre SAP e IP é usado como medida da sBRS (mmHg/s).

Coleta de tecidos

Após as medidas funcionais, as ratas foram profundamente anestesiadas com Cetamina e Xilazina (300 mg/kg e 60 mg/kg, respectivamente, *i.p.*) induzindo parada respiratória. Os animais designados para o PCR em tempo real (6 por grupo) foram imediatamente submetidos a perfusão transcardíaca com solução salina (0,09 %, 40 mL/min, 5 min) e decapitados para remoção do encéfalo, rapidamente transferido para gelo seco. Uma fatia contendo as porções medial e caudal do PVN (de 1,40 a 2,30 mm caudal para bregma, 800 –1,000 µm) foi obtida ao nível do hipotálamo e imediatamente congelado para a retirada de *punchs* bilaterais do PVN. As amostras foram armazenadas a -80°C para análise subsequente. As ratas alocadas no ensaio de imunofluorescência foram sujeitas a perfusão transcardíaca com Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM-Sigma, 40 mL/min, ~300mL), seguido por infusão de 4% paraformoldeído em 0,01M PBS (pH 7,4; 40 mL/min, ~300mL) e decapitado para remoção do encéfalo. Este

foi pós-fixado em 4% paraformoldeído por 48 h em temperatura ambiente, crio protegido em Tris-PBS (10 mM Tris, 0,9% NaCl, 10 mmol/L tampão fosfato, pH 7,4, contendo 0,05% mertiolate) com 20% sucrose em temperatura ambiente por 24-30 horas, e depois incubado em 0,01M PBS que continha solução de 30% sucrose em 4°C por 3-4 dias antes do processamento.

PCR em tempo real quantitativo

A expressão de RNAm foi mensurada por meio de PCR em tempo real quantitativo (qPCR). Reagente TRizol (0,5 mL) foi adicionado e a extração de RNA realizada de acordo com as instruções do fabricante. Após este processo, o RNA foi dissolvido em 10 µL de água DEPC e armazenado -80°C. A reação da transcriptase reversa ocorreu somente após a adição de DNase I as amostras. A síntese de cDNA foi executada utilizando 1 µg RNA/reAÇÃO, por meio do ImProm-II Reverse transcriptase (Promega, EUA), seguindo instruções do fabricante. RNaseOUT foi incluído em todo o processo e o cDNA armazenado a -20°C. O processo de qPCR foi feito no aparelho Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (ThermoFisher, Califórnia, EUA) usando Platinum SYBR QPCR Supermix-UDG e oligonucleotídeos específicos para Ocitocina (OT, sense primer, TAGACCTGGATATGCGCAAG; antisense primer, CTCGGAGAACGGCAGACTCAG) e Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH, sense primer, GGGCAGCCCAGA ACATCAT; antisense primer, CCGTTCAGCTCTGGGATGAC). A expressão de RNAm para OT foi normalizada pela expressão de RNAm para GAPDH, calculada através do método $\Delta\Delta Ct$ (PFAFFL, 2001) e expressa em percentual de alteração em relação aos valores exibidos pelo grupo SHAM. Todos os reagentes e oligonucleotídeos foram obtidos da Invitrogen (San Diego, CA, EUA).

Análise imunohistoquímica

Sequências coronais hipotalâmicas (30 µm, -1,80 a -2,12 caudal para o Bregma) foram adquiridas como previamente descrito (PAXINOS; WATSON, 2006), por meio de criostato (Leica CM 1850; Nussloch, Alemanha). As secções foram depositadas em poços para cultura de célula com 0,01 M PBS e, depois, incubadas com 0,03% Triton X-100 e 10% soro normal de jumento por 30 minutos. Para o ensaio de imunofluorescência, as secções foram incubadas *overnight* com anticorpo primário (Cobaia policlonal anti-ocitocina, com diluição 1:200.000; Bachem, Bubendorf, Suíça), seguido por 2h de incubação com anticorpo secundário (jumento anti-cobaia Cy3-labeled, diluição de 1:500; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, EUA), diluído em T-PBS, contendo 0,03% Triton X-100, em temperatura ambiente. As secções foram colocadas em lâminas de vidro e montadas com lamínula e solução adequada para preservar a fluorescência (SlowFade Gold anti-fade reagent). A especificidade dos anticorpos foi testada processando as secções lado-a-lado, sem incubação com anticorpo primário ou secundário.

Aquisição de imagens e análise

A imunorreatividade para OT foi capturada através de microscópio de epifluorescência (Leica DMLB, Wetzlar, Alemanha; com magnificação ×200) acoplado a câmera digital (Axio-Cam HRC; Carl Zeiss, Vision GmbH, Aalen, Alemanha). As secções foram visualmente inspecionadas para a localização dos subnúcleos dorsal cap, ventromedial, posterior e magnocelular do PVN. As análises das imagens foram realizadas por meio do software ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD, EUA), como descrito anteriormente (HIGA-TANIGUCHI et al., 2007; CAVALLERI et al., 2011; CRUZ et al., 2013). As densidades relativa e integrada de OT foram utilizadas

como índice de conteúdo proteico em cada subnúcleo do PVN. A densidade relativa de OT foi calculada pela razão da área ocupada pela intensidade limiar de sinal e a área total de interesse (expresso como percentual da área total). A densidade integrada de OT (em unidades arbitrárias, UA) foi obtida pelo produto da densidade de OT e intensidade do sinal.

Análise estatística

Os resultados foram expressos em médias \pm EPM. Para testar se os dados apresentavam distribuição normal foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. A massa corporal foi analisada por ANOVA de duas vias seguido por teste *post hoc* de Bonferroni. Potenciais diferenças em OT RNAm e conteúdo de proteína OT dentro dos subnúcleos do PVN, bem como parâmetros hemodinâmicos e sensibilidade do barorreflexo foram comparados entre os grupos SHAM e OVX e analisados por teste *t* de Student não pareado. Relação entre conteúdo de OT no PVN ventromedial e sBRS foi obtida por Coeficiente de correlação de Pearson. Diferenças foram consideradas significativas com valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Massa corporal e controle autonômico cardiovascular

Não houve diferença na massa corporal entre os grupos no início dos experimentos, as ratas OVX tiveram ganho significativamente maior que o grupo SHAM ao final do estudo (~50% vs. ~26%, respectivamente; Tabela 1). O grupo OVX apresentou elevada PAM ($p = 0,019$) mas não houve alteração da FC quando comparado ao grupo SHAM ($p = 0,062$; Figura 3). A variância do IP em unidades absolutas foi similar nos grupos ($p = 0,344$); no entanto, as ratas ovariectomizadas aumento da razão LF/HF ($p =$

0,015) em unidades normalizadas (Figura 4). A variância da PAS foi maior em OVX vs. SHAM ($p = 0,011$), entretanto, não houve diferença significativa entre grupos na variável LF da PAS ($p = 0,210$) (Figura 5). Ademais, sBRS encontra-se reduzida no grupo OVX quando comparado ao SHAM (-59%, $p = 0,005$) (Figura 4).

Tabela 1. Massa corporal (no início e final dos experimentos) em ratas submetidas a ovariectomia (OVX) ou cirurgia SHAM.

Massa corporal (g)	SHAM	OVX
Inicial	196 ± 2	191 ± 1
Final	248 ± 3 †††	288 ± 7 †††, ***

Valores expressos como média \pm EPM. Massa corporal foi avaliada em 16-17 ratas/grupo. Foi utilizado ANOVA de duas vias seguido por teste *post hoc* de Bonferroni. Significâncias (††† ou *** $p < 0,001$) ***vs. SHAM; ††† vs. início.

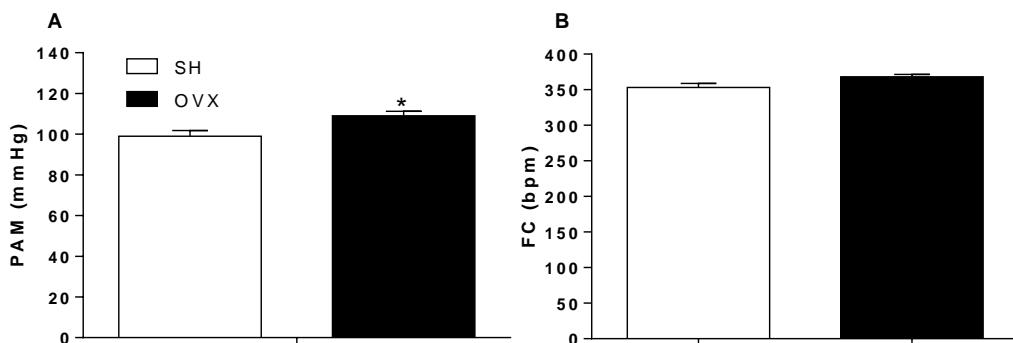


Figura 3. Avaliação hemodinâmica em ratas submetidas a ovariectomia (OVX) ou cirurgia SHAM. Valores expressos como média \pm EPM. Medidas hemodinâmicas/autonômicas foram realizadas em 6-7 ratas/grupo. Painel A: pressão arterial média (PAM). Painel B: frequência cardíaca (FC). Comparações realizadas por teste *t* não pareado. Significância (* $p < 0,05$) *vs. SHAM.

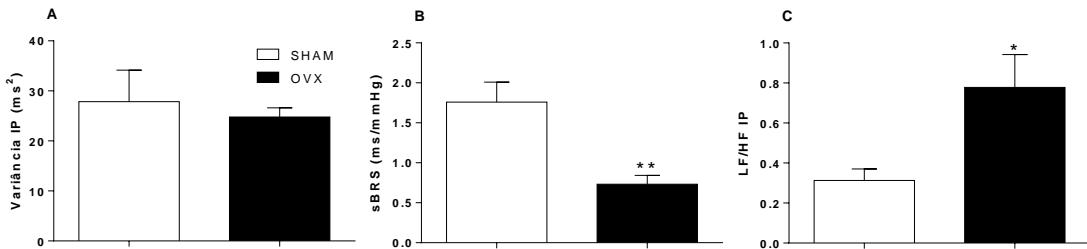


Figura 4. Variabilidade da frequência cardíaca e barorreflexo em ratas submetidas a ovariectomia (OVX) ou cirurgia SHAM. Medidas autonômicas foram realizadas em 6-7 ratas/grupo. Painel A: Variância do intervalo de pulso (IP), painel B: sensibilidade espontânea do barorreflexo (sBRS) e painel C: razão LF/HF que representam bandas de baixa e alta frequência da variabilidade do IP. Comparações realizadas por teste *t* não pareado. Significâncias (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$) *vs. SHAM.

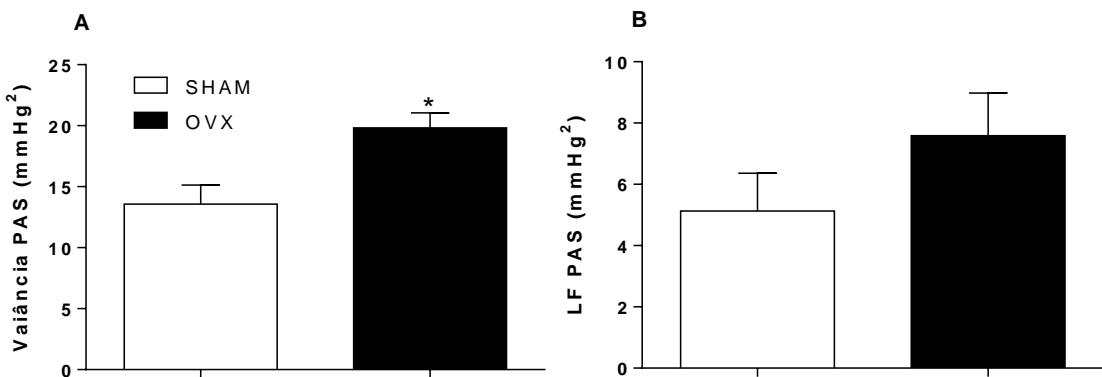


Figura 5 Variabilidade da pressão arterial em ratas submetidas a ovariectomia (OVX) ou cirurgia SHAM. Medidas autonômicas foram realizadas em 6-7 ratas/grupo. Painel A: Mostra a variância da pressão arterial sistólica (PAS). Painel B: LF representa a banda de baixa frequência da variabilidade da PAS. Comparações realizadas por teste *t* não pareado. Significância (* $p < 0,05$) *vs. SHAM.

Efeitos da privação de hormônios ovarianos em neurônios ocitocinérgicos do PVN

A expressão relativa de RNAm para OT foi 45% menor em ratas OVX comparadas ao SHAM ($p = 0,030$) (Fig. 6A). No mesmo sentido, a privação de hormônios ovarianos reduziu significativamente a expressão da proteína OT, quantificada por

densidades relativa e integrada nos subnúcleos posterior ($p = <0,001$ e $p = 0,024$; respectivamente), ventromedial ($p = 0,009$ para ambas comparações) e dorsal cap ($p = 0,041$ e $p = 0,029$; respectivamente) do PVN (Fig. 2B-C). Em contraste, não foram observadas diferenças em neurônios magnocelulares no grupo OVX comparado ao controle SHAM ($p = 0,778$ e $p = 0,852$; respectivamente) (Fig. 2B-C).

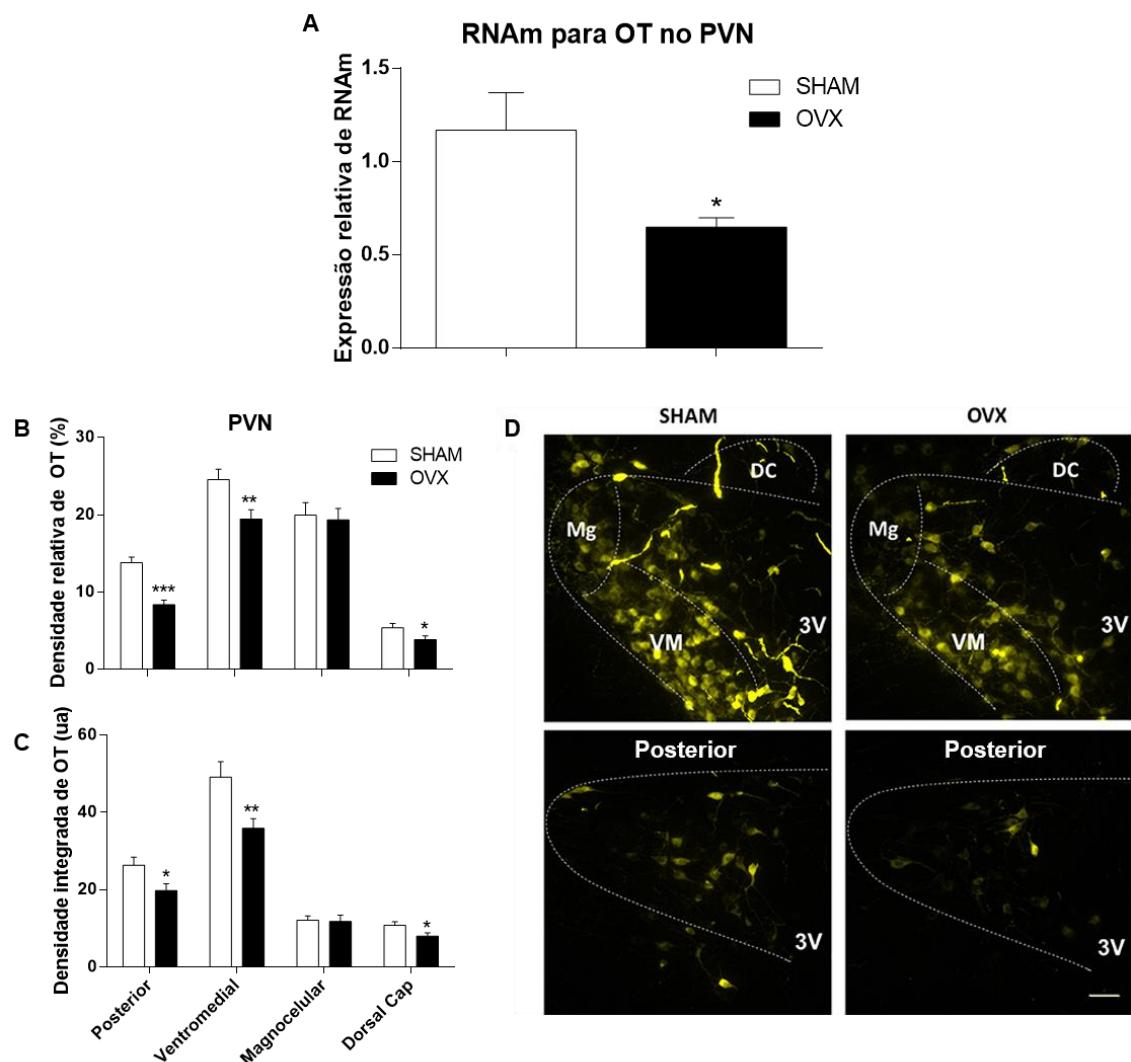


Figura 6. Expressão gênica e proteica de ocitocina (OT) no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) em ratas SHAM e ovariectomizadas (OVX). Painel A: comparação relativa do conteúdo de RNAm para OT em ratas SHAM e OVX. Painel B: quantificação da densidade relativa de OT nos subnúcleos pré-autonômicos do PVN. Painel C: quantificação da densidade integrada de OT nos subnúcleos pré-autonômicos do PVN. Painel D: fotomicrografias ilustrativas da imunorreatividade de OT mostram diferentes subnúcleos do PVN em ratas SHAM e OVX. Significâncias são (* $p<0,05$;

** $p<0,01$ vs. SHAM. Barra de escala corresponde a 50 μm , terceiro ventrículo (3V), ventromedial (VM), magnocelular (Mg) e dorsal cap (DC).

Interessantemente, níveis reduzidos de OT nos subnúcleos posterior e ventromedial do PVN se correlacionam fortemente com diminuição do controle autonômico do coração em ratas OVX, como indicado pela diminuição da sensibilidade espontânea do barorreflexo e elevação da razão LF/HF (Tabela 2). Ainda que não tenha sido observada diferença significativa, relação similar está presente entre expressão de OT no subnúcleo dorsal cap e sBRS (Tabela 2).

Tabela 2. Equações de regressão correlacionando imunorreatividade de ocitocina (OT, mensurados por densidades relativa e integrada em diferentes subnúcleos do PVN) com sensibilidade espontânea do barorreflexo (sBRS) e balanço simpato-vagal cardíaco (razão LF/HF) em ratas submetidas a ovariectomia (OVX) ou SHAM.

	Densidade relativa de ocitocina (% área)	Densidade integrada de ocitocina (unidades arbitrárias)
OT x sBRS		
PVN ventromedial	$Y = 0,109x - 1,213$ ** $r = 0,806$ $p = 0,005$	$Y = 0,037x - 0,319$ * $r = 0,730$ $p = 0,017$
PVN posterior	$Y = 0,193x - 0,886$ *** $r = 0,945$ $p < 0,001$	$Y = 0,054x + 0,041$ * $r = 0,630$ $p = 0,049$
PVN dorsal cap	$Y = 0,247x + 0,110$ $r = 0,568$ $p = 0,087$	$Y = 0,091x + 0,409$ $r = 0,436$ $p = 0,207$
PVN magnocelular	$Y = 0,057x + 0,153$ $r = 0,181$ $p = 0,615$	$Y = -0,042x + 1,725$ $r = -0,184$ $p = 0,611$
OT x razão LF/HF		
PVN ventromedial	$Y = -0,037x + 1,372$ $r = -0,431$ $p = 0,213$	$Y = -0,009x + 0,930$ $r = -0,288$ $p = 0,419$
PVN posterior	$Y = -0,095x + 1,590$ * $r = -0,737$ $p = 0,015$	$Y = -0,008x + 0,710$ $r = -0,142$ $p = 0,696$
PVN dorsal cap	$Y = -0,147x + 0,082$ $r = -0,536$ $p = 0,110$	$Y = -0,044x + 0,948$ $r = -0,336$ $P = 0,342$
PVN magnocelular	$Y = -0,018x + 0,887$ $r = -0,091$ $p = 0,802$	$Y = 0,072x - 0,279$ $r = 0,501$ $p = 0,140$

Correlações OT x sBRS e OT x razão LF/HF foram realizadas com 8-10 ratas. * ($p<0,05$), ** ($p<0,01$) e *** ($p<0,001$) denotam correlações significativas.

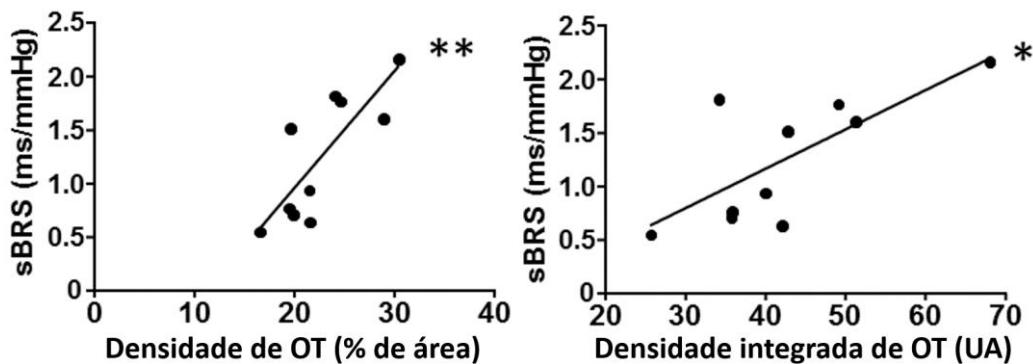


Figura 7. Correlação entre imunorreatividade para ocitocina (OT) e sensibilidade do barorreflexo (sBRS) após privação de hormônios ovarianos. * denota correlação com valor de $p < 0,05$ ou ** $p < 0,01$.

DISCUSSÃO

Os presentes achados confirmaram que privação de hormônios ovarianos é uma das causas de disfunção do controle autonômico cardiovascular. Mais especificamente, nossos resultados demonstram que a falta desses hormônios produziu efeitos deletérios sobre o controle reflexo barorreceptor da FC, desequilíbrio do sistema nervoso autônomo e elevação da PA. Embora diversos mecanismos celulares e moleculares estejam comumente envolvidos, este estudo indica que a redução da expressão de OT em neurônios de subnúcleos pré-autonômicos do PVN está envolvida na deterioração da regulação autonômica observada.

O importante papel da OT para o controle pressórico havia sido previamente documentado (MERCURIO et al., 2000; CAVALLERI et al., 2011; CRUZ et al., 2013). Entretanto, para o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a mostrar que a privação de hormônios ovarianos reduz a expressão de genes, bem como conteúdo proteico de OT em neurônios pré-autonômicos do PVN, e essas alterações estão fortemente associadas com a disfunção autonômica em ratas ovariectomizadas.

A incidência de doenças cardiovasculares é consideravelmente menor em mulheres antes da menopausa quando comparadas a homens. No entanto, essa diferença é inexistente com a redução dos níveis circulantes de estrogênio que ocorre com o envelhecimento (BECKER; CORRAO, 1990; WENGER; SPEROFF; PACKARD, 1993; TUNSTALL-PEDOE et al., 1994; GOLDEN et al., 2002). Nossos resultados concordam com estudos anteriores ao mostrarem que o estrogênio possui função cardioprotetora e atua na manutenção da homeostase metabólica, por sua vez, a redução da expressão desse hormônio promove efeitos deletérios no sistema cardiovascular, aumento de massa corporal com aumento de gordura abdominal ao mesmo tempo em que reduz a ação da via de sinalização que controla o apetite e saciedade em núcleos do sistema nervoso central (IRIGOYEN et al., 2005; FLUES et al., 2010; LIZCANO; GUZMÁN, 2014).

A OT é um importante peptídeo envolvido no controle da ingestão de calorias. Quando administrada centralmente, OT ou agonista para receptor de OT reduziram o consumo de comida, enquanto o pré-tratamento com antagonista para receptor de OT aboliu o efeito. (OLSON et al., 1991; MULLIS; KAY; WILLIAMS, 2013). De fato, o aumento da massa corporal induzida por uma expressão central de OT anormal *per se* pode ser um fator que contribui para o surgimento de disfunção do barorreflexo (SKRAPARI et al., 2007; RE, 2009).

Trabalhos previamente publicados mostraram que a privação de hormônios ovarianos é capaz de causar menor expressão de RNAm para OT no encéfalo, incluindo o PVN (MILLER et al., 1989; PATISAUL et al., 2003). No entanto, este é o primeiro trabalho a mostrar que a diminuição de hormônios femininos circulantes reduz o conteúdo de OT especificamente em subnúcleos pré-autonômicos do PVN e, este efeito, está associado ao desequilíbrio do sistema nervoso autônomo.

Resposta simpática aumentada para o coração e reduzida sensibilidade do barorreflexo são preditores de morbidade e mortalidade para diversas doenças cardiovasculares (BILLMAN; SCHWARTZ; STONE, 1982; BECKER; CORRAO, 1990; MERCURIO et al., 2000). Neste estudo, observamos que a redução da sBRS acompanhada da maior modulação simpática ao coração e elevada PA em ratas submetidas a privação de hormônios ovarianos. Esses resultados estão de acordo com estudos prévios, em ratas ovariectomizadas, que associaram essas alterações com aumento do estresse oxidativo no coração (IRIGOYEN et al., 2005; FLUES et al., 2010).

Notamos também que alguns trabalhos não encontraram déficit de controle autonômico ou aumento pressórico em animais após ovariectomia (NICKENIG et al., 1998; DIAS et al., 2010). Essa inconsistência nos resultados pode ser explicada pelo tempo em que as ratas ficaram expostas a concentrações reduzidas de hormônios ovarianos.

Nos estudos supracitados, os experimentos foram executados entre 3 e 5 semanas após a ovariectomia. Para o nosso conhecimento, estudos mostrando altos níveis pressóricos e disautonomia foram realizados com, no mínimo, 8 semanas após a cirurgia de retirada dos ovários (HERNÁNDEZ et al., 2000; IRIGOYEN et al., 2005; FLUES et al., 2010) e o presente conjunto de dados.

Os resultados apresentados neste trabalho em conjunto com os previamente publicados sugerem que uma deficiente expressão de OT em neurônios pré-autonômicos do PVN pode ser um importante mecanismo de desregulação autonômica central, que contribui com o estresse oxidativo cardíaco causando, disfunção no coração. Estudos futuros são necessários para testar essa proposta pois, em verdade, doenças cardíacas são as principais causas de morbidade e mortalidade em mulheres no período pós-menopausa (MOZAFFARIAN et al., 2015).

O acúmulo de evidências indica o papel crucial de neurônios pré-autonômicos OTérgicos do PVN na modulação do controle barorreflexo cardíaco. O complexo núcleo do trato solitário/ núcleo dorsal motor do vago (NTS/DMV) recebe densas projeções OTérgicas oriundas do PVN que, quando ativadas, facilitam a resposta vagal ao coração, melhorando o reflexo bradicárdico durante transientes de aumento de pressão (BUIJS, 1978; BRAGA et al., 2000; HIGA et al., 2002). Também é importante salientar que a liberação de OT no NTS/DMV durante a prática de exercício físico reduz a resposta taquicárdica e promove bradicardia de repouso em animais treinados (BRAGA et al., 2000; HIGA-TANIGUCHI; FELIX; MICHELINI, 2009).

Coletivamente, essas observações indicam que adequada expressão de OT em subnúcleos do PVN é requerida para uma efetiva regulação autonômica do sistema cardiovascular. Nossos resultados mostraram deficiente expressão de OT no PVN ventromedial e posterior com dano ao barorreflexo em ratas OVX. Foi mostrado que reduzido conteúdo de OT, neurotransmissor co-liberado com glutamato nos neurônios pré-autonômicos, atenua a ativação de projeções OTérgicas para áreas dorsais do tronco encefálico (PIÑOL et al., 2014).

Peters et al. (2008) também mostrou que a ativação dessas projeções aumentam a probabilidade de liberação de glutamato e a frequência de correntes excitatórias pós-sinápticas em neurônios de segunda ordem do NTS, enquanto o pré-tratamento com antagonista para receptor de OT bloqueia completamente esse efeito. A administração de OT no NTS/DMV, mimetizando a ativação das projeções OTérgicas descendentes, aumenta o reflexo de bradicardia durante a carga sobre os barorreceptores. (HIGA et al., 2002).

Em estudos prévios do nosso laboratório, mostramos que o pré-tratamento com atropina, mas não com propranolol, aboliu o aumento do reflexo bradicárdico, indicando

que o ganho do barorreflexo induzido por OT eleva o tônus vagal ao coração (HIGA et al., 2002; MICHELINI, 2007). O presente conjunto de dados revelou forte correlação positiva entre o conteúdo de OT e sensibilidade do barorreflexo. Embora a correlação *per se* não é uma prova de causalidade, os resultados acerca da OT e controle autonômico aqui apresentados somados aos previamente reportados fortemente sugerem que a redução da ação OTérgica do PVN em ratas ovariectomizadas pode ser responsável por atenuar a sensibilidade do barorreflexo e causar o desequilíbrio simpato-vagal no coração.

A variabilidade da FC tem sido amplamente aceita como índice da função autonômica cardiovascular. HF e LF são associados a modulação parassimpática simpática respectivamente, porém há evidências de que o componente vagal é parcialmente agregado a esta banda (APPEL et al., 1989; BURR, 2007). Alguns estudos verificaram que o LF do IP não se associa com o aparecimento (*spillover*) de noradrenalina e encontra-se muito reduzido em indivíduos com insuficiência cardíaca, condição esta conhecida por hiperatividade simpática. (ADAMOPOULOS et al., 1992; GUZZETTI et al., 1995; EISENHOFER et al., 1996; MOAK et al., 2007). Mesmo considerando que a fidedignidade do método de variabilidade da frequência cardíaca ainda esteja em debate, neste estudo os resultados corroboram dados publicados anteriormente em que a mensuração das variáveis autonômicas foram realizadas após bloqueio farmacológico (padrão ouro) em protocolos similares de privação de hormônios ovarianos em animais da mesma espécie e idade (FLUES et al., 2010; IRIGOYEN et al., 2005).

Neurônios OTérgicos expressam receptores para estrogênio do tipo β (ER- β), que podem controlar a expressão de OT (gene/proteína) (ALVES et al., 1998; HRABOVSKY et al., 1998). Stern e Zhang (2003) encontraram que neurônios pré-autonômicos do subnúcleo posterior do PVN que se projetam para o RVLM exibiram alta

densidade de ER- β e menor excitabilidade após período de privação dos hormônios ovarianos. Um segundo tipo de receptor para estrogênio, denominado GPER é localizado em diversas áreas do sistema nervoso central, incluindo neurônios parvocelulares do PVN ventromedial e dorsal cap (BRAILOIU et al., 2007). Estes receptores colocalizam-se com neurônios OTérgicos magnocelulares do PVN e núcleo supra óptico (BRAILOIU et al., 2007). Se a interação entre GPER e OT no PVN de fato ocorrem, e como esta interação poderia contribuir para a manutenção dos níveis de OT permanecem por serem determinados. A potencial regulação transcricional do gene para OT pela ativação do ER- β também necessita de futuras investigações.

A redução do conteúdo sanguíneo de estrogênio é associado com maior risco de insuficiência coronariana, infarto do miocárdio, acidentes vasculares e mortalidade. Esse declínio hormonal é um evento característico da menopausa que acometerá, em sua totalidade, as mulheres durante o envelhecimento natural (KANNEL et al., 1976; GORDON et al., 1978; LA VECCHIA et al., 1987; UTIAN, 1989; VAN DER GRAAF; DE KLEIJN; VAN DER SCHOUW, 1997; JACOBSEN; KNUTSEN; FRASER, 1999; MOSCA et al., 2006; GHOLIZADEH; DAVIDSON, 2008; RIVERA et al., 2009). Com isso, é importante que hajam estudos com o objetivo de identificar os impactos dessas alterações e como prevenir possíveis doenças relacionadas ao sistema cardiovascular associadas a privação de hormônios ovarianos.

Os resultados apresentados nesta tese mostraram que os hormônios ovarianos são reguladores da expressão de OT em núcleos pré-autonômicos do PVN e associados com o controle pressórico. A correlação entre expressão OTérgica e sistema nervoso autonômico sugere interação entre os sistemas, mas não pode ser considerado como prova dessa hipótese.

O bloqueio farmacológico utilizando antagonista para receptores de estrogênio no PVN, bem como, antagonista para receptores de OT em núcleos como NTS, RVLM, DMV e NA são necessários para confirmar os resultados. Ademais, a dupla marcação de neurônios no PVN, utilizando traçador retrógrado administrado em núcleos autonômicos no bulbo e imunofluorescência para OT, é uma ferramenta que pode ser utilizada para comprovar que os neurônios afetados pela baixa quantidade de estrogênio são realmente pré-autonômicos.

Em uma perspectiva clínica, novos estudos serão importantes para avaliar se a reposição hormonal, utilizando hormônios sintéticos, seria capaz de prevenir ou reverter os desfechos reportados. Além disso, o treinamento físico é capaz de aumentar a expressão de OT no PVN em animais espontaneamente hipertensos após serem submetidos a oito semanas de exercícios aeróbicos (CAVALLERI et al., 2011; CRUZ et al., 2013), entretanto, não se sabe se esse efeito ocorreria em populações femininas com baixas concentrações de hormônios ovarianos. Sendo assim, essas possibilidades de novos métodos terapêuticos permanecem por serem testadas.

CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados apresentados mostraram que a privação de hormônios ovarianos reduzem tanto a expressão de OT quanto genes para esta proteína em neurônios pré-autonômicos do PVN envolvidos no controle circulatório. O déficit observado na modulação OTérgica foi acompanhado por redução da modulação vagal, aumento da modulação simpática no coração, menor sensibilidade do barorreflexo e maior variabilidade da PA. Finalmente, o conteúdo de OT no PVN associado com o controle autonômico cardíaco sugere que a depressão da modulação OTérgica hipotalâmica

contribui para o efeitos deletérios cardiovasculares observados em privação de hormônios ovarianos.

SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/ Proc BEX 6292/15-1 PDSE e PROMOB), Fundação de Apoio à Pesquisa e Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe (FAPITEC-SE) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, proc 2011/51410-9).

REFERÊNCIAS

- ADAMOPOULOS, S.; PIEPOLI, M.; MCCANCE, A.; BERNARDI, L.; ROCADAELLI, A.; ORMEROD, O.; FORFAR, C.; SLEIGHT, P.; COATS, A. J. Comparison of Different Methods for Assessing Sympathovagal Balance in Chronic Congestive Heart Failure Secondary to Coronary Artery Disease. **The American Journal of Cardiology**, v. 70, n. 20, p. 1576–1582, 15 dez. 1992.
- ALVES, S. E.; LOPEZ, V.; MCEWEN, B. S.; WEILAND, N. G. Differential Colocalization of Estrogen Receptor Beta (ER β) with Oxytocin and Vasopressin in the Paraventricular and Supraoptic Nuclei of the Female Rat Brain: An Immunocytochemical Study. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 6, p. 3281–3286, 17 mar. 1998.
- ANDRESEN, M. C.; KUNZE, D. L. Nucleus Tractus Solitarius—Gateway to Neural Circulatory Control. **Annual Review of Physiology**, v. 56, n. 1, p. 93–116, 1994. . Acesso em: 19 mar. 2015.
- APPEL, M. L.; BERGER, R. D.; SAUL, J. P.; SMITH, J. M.; COHEN, R. J. Beat to Beat Variability in Cardiovascular Variables: Noise or Music? **Journal of the American College of Cardiology**, v. 14, n. 5, p. 1139–1148, 1 nov. 1989.
- ARLETTI, R.; BENELLI, A.; BERTOLINI, A. Oxytocin Inhibits Food and Fluid Intake in Rats. **Physiology & Behavior**, v. 48, n. 6, p. 825–830, dez. 1990.
- BECKER, R. C.; CORRAO, J. M. Cardiovascular Disease in Women: Scope of the Problem. **Cardiology**, v. 77 Suppl 2, p. 6–7, 1990.
- BENELLI, A.; BERTOLINI, A.; ARLETTI, R. Oxytocin-Induced Inhibition of Feeding and Drinking: No Sexual Dimorphism in Rats. **Neuropeptides**, v. 20, n. 1, p. 57–62, set. 1991.
- BERNTHAL, T. Chemo-Reflex Control of Vascular Reactions Through the Carotid Body. **American Journal of Physiology -- Legacy Content**, v. 121, n. 1, p. 1–20, 31 dez. 1937. . Acesso em: 13 mar. 2015.
- BILLMAN, G. E.; SCHWARTZ, P. J.; STONE, H. L. Baroreceptor Reflex Control of Heart Rate: A Predictor of Sudden Cardiac Death. **Circulation**, v. 66, n. 4, p. 874–880, out. 1982.
- BLESSING, W. W. Depressor Neurons in Rabbit Caudal Medulla Act via GABA Receptors in Rostral Medulla. **The American Journal of Physiology**, v. 254, n. 4 Pt 2, p. H686-692, abr. 1988.
- BRAGA, D. C.; MORI, E.; HIGA, K. T.; MORRIS, M.; MICHELINI, L. C. Central Oxytocin Modulates Exercise-Induced Tachycardia. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 278, n. 6, p. R1474-1482, jun. 2000.
- BRAILOIU, E.; DUN, S. L.; BRAILOIU, G. C.; MIZUO, K.; SKLAR, L. A.; OPREA, T. I.; PROSSNITZ, E. R.; DUN, N. J. Distribution and Characterization of Estrogen

Receptor G Protein-Coupled Receptor 30 in the Rat Central Nervous System. **The Journal of Endocrinology**, v. 193, n. 2, p. 311–321, maio 2007.

BRISTOW, J. D.; HONOUR, A. J.; PICKERING, G. W.; SLEIGHT, P.; SMYTH, H. S. Diminished Baroreflex Sensitivity in High Blood Pressure. **Circulation**, v. 39, n. 1, p. 48–54, 1 jan. 1969. . Acesso em: 20 mar. 2015.

BROWN, A. M. Receptors under Pressure. An Update on Baroreceptors. **Circulation Research**, v. 46, n. 1, p. 1–10, jan. 1980.

BRUBAKER, K. D.; GAY, C. V. Estrogen Stimulates Protein Tyrosine Phosphorylation and Src Kinase Activity in Avian Osteoclasts. **Journal of cellular biochemistry**, v. 76, n. 2, p. 206–216, dez. 1999.

BUIJS, R. M. Intra- and Extrahypothalamic Vasopressin and Oxytocin Pathways in the Rat. Pathways to the Limbic System, Medulla Oblongata and Spinal Cord. **Cell and tissue research**, v. 192, n. 3, p. 423–435, 26 set. 1978.

BURR, R. L. Interpretation of Normalized Spectral Heart Rate Variability Indices In Sleep Research: A Critical Review. **Sleep**, v. 30, n. 7, p. 913–919, 1 jul. 2007.

CAVALLERI, M. T.; BURGI, K.; CRUZ, J. C.; JORDÃO, M. T.; CERONI, A.; MICHELINI, L. C. Afferent Signaling Drives Oxytocinergic Preautonomic Neurons and Mediates Training-Induced Plasticity. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 301, n. 4, p. R958-966, out. 2011.

CHALMERS, J.; PILOWSKY, P. Brainstem and Bulbospinal Neurotransmitter Systems in the Control of Blood Pressure. **Journal of Hypertension**, v. 9, n. 8, p. 675–694, ago. 1991.

CHAN, W. Y.; SAWYER, W. H. Natriuresis in Conscious Dogs during Arginine Vasopressin Infusion and after Oxytocin Injection. **Experimental Biology and Medicine**, v. 110, n. 4, p. 697–699, 8 jan. 1962. . Acesso em: 24 mar. 2015.

CHAPLEAU, M. W.; ABOUD, F. M. Neuro-Cardiovascular Regulation: From Molecules to Man. Introduction. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 940, p. xiii–xxii, jun. 2001.

CHAPLEAU, M. W.; CUNNINGHAM, J. T.; SULLIVAN, M. J.; WACHTEL, R. E.; ABOUD, F. M. Structural versus Functional Modulation of the Arterial Baroreflex. **Hypertension**, v. 26, n. 2, p. 341–347, ago. 1995.

COSTA-E-SOUZA, R. H.; PEREIRA-JUNIOR, P. P.; OLIVEIRA, P. F.; OLIVARES, E. L.; WERNECK-DE-CASTRO, J. P. S.; MELLO, D. B.; NASCIMENTO, J. H. M.; CAMPOS-DE-CARVALHO, A. C. Cardiac Effects of Oxytocin: Is There a Role for This Peptide in Cardiovascular Homeostasis? **Regulatory Peptides**, v. 132, n. 1–3, p. 107–112, 15 dez. 2005.

CRUZ, J. C.; CAVALLERI, M. T.; CERONI, A.; MICHELINI, L. C. Peripheral Chemoreceptors Mediate Training-Induced Plasticity in Paraventricular Nucleus Pre-Autonomic Oxytocinergic Neurons. **Experimental Physiology**, v. 98, n. 2, p. 386–396, fev. 2013.

- DALY, M. de B.; HAZZLEDINE, J. L.; HOWE, A. Reflex Respiratory and Peripheral Vascular Responses to Stimulation of the Isolated Perfused Aortic Arch Chemoreceptors of the Dog. **The Journal of Physiology**, v. 177, n. 2, p. 300–322, 1 mar. 1965. . Acesso em: 13 mar. 2015.
- DAMPNEY, R. A. Functional Organization of Central Pathways Regulating the Cardiovascular System. **Physiological Reviews**, v. 74, n. 2, p. 323–364, abr. 1994.
- DIAS, D. P. M.; OLIVEIRA, M.; SALGADO, H. C.; FAZAN, R. Ovariectomy Does Not Affect the Cardiac Sympathovagal Balance of Female SHR but Estradiol Does. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Médicas E Biológicas / Sociedade Brasileira De Biofísica ... [et Al.]**, v. 43, n. 10, p. 969–975, out. 2010.
- EISENHOFER, G.; FRIBERG, P.; RUNDQVIST, B.; QUYYUMI, A. A.; LAMBERT, G.; KAYE, D. M.; KOPIN, I. J.; GOLDSTEIN, D. S.; ESLER, M. D. Cardiac Sympathetic Nerve Function in Congestive Heart Failure. **Circulation**, v. 93, n. 9, p. 1667–1676, 1 maio 1996.
- FARAGE, M. A.; MAIBACH, H. I. **The vulva: anatomy, physiology, and pathology**. [s.l.] CRC Press, 2016.
- FLUES, K.; PAULINI, J.; BRITO, S.; SANCHES, I. C.; CONSOLIM-COLOMBO, F.; IRIGOYEN, M.-C.; DE ANGELIS, K. Exercise Training Associated with Estrogen Therapy Induced Cardiovascular Benefits after Ovarian Hormones Deprivation. **Maturitas**, v. 65, n. 3, p. 267–271, mar. 2010.
- GEERLING, J. C.; SHIN, J.-W.; CHIMENTI, P. C.; LOEWY, A. D. Paraventricular Hypothalamic Nucleus: Axonal Projections to the Brainstem. **The Journal of comparative neurology**, v. 518, n. 9, p. 1460–1499, 1 maio 2010.
- GEIS, G. S.; WURSTER, R. D. Cardiac Responses during Stimulation of the Dorsal Motor Nucleus and Nucleus Ambiguus in the Cat. **Circulation Research**, v. 46, n. 5, p. 606–611, maio 1980.
- GHOLIZADEH, L.; DAVIDSON, P. More Similarities than Differences: An International Comparison of CVD Mortality and Risk Factors in Women. **Health care for women international**, v. 29, n. 1, p. 3–22, jan. 2008.
- GIMPL, G.; FAHRENHOLZ, F. The Oxytocin Receptor System: Structure, Function, and Regulation. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 2, p. 629–683, 1 abr. 2001.
- GO, A. S.; MOZAFFARIAN, D.; ROGER, V. L.; BENJAMIN, E. J.; BERRY, J. D.; BORDEN, W. B.; BRAVATA, D. M.; DAI, S.; FORD, E. S.; FOX, C. S.; FRANCO, S.; FULLERTON, H. J.; GILLESPIE, C.; HAILPERN, S. M.; HEIT, J. A.; HOWARD, V. J.; HUFFMAN, M. D.; KISSELA, B. M.; KITTNER, S. J.; LACKLAND, D. T.; LICHTMAN, J. H.; LISABETH, L. D.; MAGID, D.; MARCUS, G. M.; MARELLI, A.; MATCHAR, D. B.; MCGUIRE, D. K.; MOHLER, E. R.; MOY, C. S.; MUSSOLINO, M. E.; NICHOL, G.; PAYNTER, N. P.; SCHREINER, P. J.; SORLIE, P. D.; STEIN, J.; TURAN, T. N.; VIRANI, S. S.; WONG, N. D.; WOO, D.; TURNER, M. B.; AMERICAN HEART ASSOCIATION STATISTICS COMMITTEE AND STROKE STATISTICS SUBCOMMITTEE. Heart Disease and Stroke Statistics--2013 Update: A

Report from the American Heart Association. **Circulation**, v. 127, n. 1, p. e6–e245, 1 jan. 2013.

GOLDEN, S. H.; MAGUIRE, A.; DING, J.; CROUSE, J. R.; CAULEY, J. A.; ZACUR, H.; SZKLO, M. Endogenous Postmenopausal Hormones and Carotid Atherosclerosis: A Case-Control Study of the Atherosclerosis Risk in Communities Cohort. **American journal of epidemiology**, v. 155, n. 5, p. 437–445, 1 mar. 2002.

GORDON, F. J. Aortic Baroreceptor Reflexes Are Mediated by NMDA Receptors in Caudal Ventrolateral Medulla. **The American Journal of Physiology**, v. 252, n. 3 Pt 2, p. R628-633, mar. 1987.

GORDON, T.; KANNEL, W. B.; HJORTLAND, M. C.; McNAMARA, P. M. Menopause and Coronary Heart Disease. The Framingham Study. **Annals of internal medicine**, v. 89, n. 2, p. 157–161, ago. 1978.

GUZZETTI, S.; COGLIATI, C.; TURIEL, M.; CREMA, C.; LOMBARDI, F.; MALLIANI, A. Sympathetic Predominance Followed by Functional Denervation in the Progression of Chronic Heart Failure. **European Heart Journal**, v. 16, n. 8, p. 1100–1107, ago. 1995.

HAANWINCKEL, M. A.; ELIAS, L. K.; FAVARETTO, A. L.; GUTKOWSKA, J.; MCCANN, S. M.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Oxytocin Mediates Atrial Natriuretic Peptide Release and Natriuresis after Volume Expansion in the Rat. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 17, p. 7902–7906, 15 ago. 1995.

HALL, J. E.; GUYTON, A. C. **Medical physiology**. [s.l.] Elsevier Saunders, 2006.

Heart Rate Variability: Standards of Measurement, Physiological Interpretation and Clinical Use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. **Circulation**, v. 93, n. 5, p. 1043–1065, 1 mar. 1996.

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. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 279, n. 5, p. R1599–R1605, 1 nov. 2000.

HIGA, K. T.; MORI, E.; VIANA, F. F.; MORRIS, M.; MICHELINI, L. C. Baroreflex Control of Heart Rate by Oxytocin in the Solitary-Vagal Complex. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 282, n. 2, p. R537-545, fev. 2002.

HIGA-TANIGUCHI, K. T.; FELIX, J. V. C.; MICHELINI, L. C. Brainstem Oxytocinergic Modulation of Heart Rate Control in Rats: Effects of Hypertension and Exercise Training. **Experimental Physiology**, v. 94, n. 11, p. 1103–1113, nov. 2009.

HIGA-TANIGUCHI, K. T.; SILVA, F. C. P.; SILVA, H. M. V.; MICHELINI, L. C.; STERN, J. E. Exercise Training-Induced Remodeling of Paraventricular Nucleus (Nor)adrenergic Innervation in Normotensive and Hypertensive Rats. **American Journal**

of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, v. 292, n. 4, p. R1717-1727, abr. 2007.

HRABOVSZKY, E.; KALLÓ, I.; HAJSZÁN, T.; SHUGHRUE, P. J.; MERCENTHALER, I.; LIPOSITS, Z. Expression of Estrogen Receptor-Beta Messenger Ribonucleic Acid in Oxytocin and Vasopressin Neurons of the Rat Supraoptic and Paraventricular Nuclei. **Endocrinology**, v. 139, n. 5, p. 2600–2604, maio 1998.

IRIGOYEN, M.-C.; PAULINI, J.; FLORES, L. J. F.; FLUES, K.; BERTAGNOLLI, M.; MOREIRA, E. D.; CONSOLIM-COLOMBO, F.; BELLÓ-KLEIN, A.; DE ANGELIS, K. Exercise Training Improves Baroreflex Sensitivity Associated with Oxidative Stress Reduction in Ovariectomized Rats. **Hypertension**, v. 46, n. 4, p. 998–1003, out. 2005.

ISRAEL, J. M.; POULAIN, D. A. 17-Oestradiol Modulates in Vitro Electrical Properties and Responses to Kainate of Oxytocin Neurones in Lactating Rats. **The Journal of physiology**, v. 524 Pt 2, p. 457–470, 15 abr. 2000.

IVELL, R.; RUSSELL, J. A. Oxytocin: Cellular and Molecular Approaches in Medicine and Research. **Reviews of Reproduction**, v. 1, n. 1, p. 13–18, jan. 1996.

JACOBSEN, B. K.; KNUTSEN, S. F.; FRASER, G. E. Age at Natural Menopause and Total Mortality and Mortality from Ischemic Heart Disease: The Adventist Health Study. **Journal of clinical epidemiology**, v. 52, n. 4, p. 303–307, abr. 1999.

JANSSEN, B. J.; OOSTING, J.; SLAAF, D. W.; PERSSON, P. B.; STRUIJKER-BOUDIER, H. A. Hemodynamic Basis of Oscillations in Systemic Arterial Pressure in Conscious Rats. **The American Journal of Physiology**, v. 269, n. 1 Pt 2, p. H62-71, jul. 1995.

JENSEN, J.; NILAS, L.; CHRISTIANSEN, C. Influence of Menopause on Serum Lipids and Lipoproteins. **Maturitas**, v. 12, n. 4, p. 321–331, nov. 1990.

JESKE, I.; REIS, D. J.; MILNER, T. A. Neurons in the Barosensory Area of the Caudal Ventrolateral Medulla Project Monosynaptically on to Sympathoexcitatory Bulbospinal Neurons in the Rostral Ventrolateral Medulla. **Neuroscience**, v. 65, n. 2, p. 343–353, mar. 1995.

KALIA, M.; FUXE, K.; GOLDSTEIN, M. Rat Medulla Oblongata. II. Dopaminergic, Noradrenergic (A1 and A2) and Adrenergic Neurons, Nerve Fibers, and Presumptive Terminal Processes. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 233, n. 3, p. 308–332, 15 mar. 1985.

KANNEL, W. B.; HJORTLAND, M. C.; MCNAMARA, P. M.; GORDON, T. Menopause and Risk of Cardiovascular Disease: The Framingham Study. **Annals of internal medicine**, v. 85, n. 4, p. 447–452, out. 1976.

KARPUZOGLU, E.; FENAUX, J. B.; PHILLIPS, R. A.; LENGI, A. J.; ELVINGER, F.; ANSAR AHMED, S. Estrogen up-Regulates Inducible Nitric Oxide Synthase, Nitric Oxide, and Cyclooxygenase-2 in Splenocytes Activated with T Cell Stimulants: Role of Interferon-Gamma. **Endocrinology**, v. 147, n. 2, p. 662–671, fev. 2006.

- KATUSIC, Z. S.; SHEPHERD, J. T.; VANHOUTTE, P. M. Oxytocin Causes Endothelium-Dependent Relaxations of Canine Basilar Arteries by Activating V1-Vasopressinergic Receptors. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 236, n. 1, p. 166–170, jan. 1986.
- KIRCHHEIM, H. R. Systemic Arterial Baroreceptor Reflexes. **Physiological Reviews**, v. 56, n. 1, p. 100–177, jan. 1976.
- LA VECCHIA, C.; DECARLI, A.; FRANCESCHI, S.; GENTILE, A.; NEGRI, E.; PARAZZINI, F. Menstrual and Reproductive Factors and the Risk of Myocardial Infarction in Women under Fifty-Five Years of Age. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 157, n. 5, p. 1108–1112, nov. 1987.
- LEIBOWITZ, S. F.; HAMMER, N. J.; CHANG, K. Hypothalamic Paraventricular Nucleus Lesions Produce Overeating and Obesity in the Rat. **Physiology & Behavior**, v. 27, n. 6, p. 1031–1040, dez. 1981.
- LIZCANO, F.; GUZMÁN, G. Estrogen Deficiency and the Origin of Obesity during Menopause. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 757461, 2014.
- LOHMEIER, T. E. Neurohypophysial Hormones. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 285, n. 4, p. R715-717, out. 2003.
- LOZIĆ, M.; GREENWOOD, M.; ŠARENAC, O.; MARTIN, A.; HINDMARCH, C.; TASIĆ, T.; PATON, J.; MURPHY, D.; JAPUNDŽIĆ-ŽIGON, N. Overexpression of Oxytocin Receptors in the Hypothalamic PVN Increases Baroreceptor Reflex Sensitivity and Buffers BP Variability in Conscious Rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 19, p. 4385–4398, out. 2014.
- M K SUN, K. M. S. Responses of rostroventrolateral medulla spinal vasomotor neurones to chemoreceptor stimulation in rats. **Journal of the autonomic nervous system**, v. 33, n. 1, p. 79–84, 1991.
- MACHADO, B. H.; BRODY, M. J. Role of the Nucleus Ambiguus in the Regulation of Heart Rate and Arterial Pressure. **Hypertension**, v. 11, n. 6 Pt 2, p. 602–607, jun. 1988.
- MACK, S. O.; WU, M.; KC, P.; HAXHIU, M. A. Stimulation of the Hypothalamic Paraventricular Nucleus Modulates Cardiorespiratory Responses via Oxytocinergic Innervation of Neurons in Pre-Bötzinger Complex. **Journal of Applied Physiology**, v. 102, n. 1, p. 189–199, 1 jan. 2007.. Acesso em: 20 mar. 2015.
- MALLIANI, A.; PAGANI, M.; LOMBARDI, F.; CERUTTI, S. Cardiovascular Neural Regulation Explored in the Frequency Domain. **Circulation**, v. 84, n. 2, p. 482–492, ago. 1991.
- MARTINS, A. S.; CRESCENZI, A.; STERN, J. E.; BORDIN, S.; MICHELINI, L. C. Hypertension and Exercise Training Differentially Affect Oxytocin and Oxytocin Receptor Expression in the Brain. **Hypertension**, v. 46, n. 4, p. 1004–1009, out. 2005.
- MERCURO, G.; PODDA, A.; PITZALIS, L.; ZONCU, S.; MASCIA, M.; MELIS, G. B.; ROSANO, G. M. Evidence of a Role of Endogenous Estrogen in the Modulation of

Autonomic Nervous System. **The American Journal of Cardiology**, v. 85, n. 6, p. 787–789, A9, 15 mar. 2000.

MICHELINI, L. C. Differential Effects of Vasopressinergic and Oxytocinergic Pre-Autonomic Neurons on Circulatory Control: Reflex Mechanisms and Changes during Exercise. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, v. 34, n. 4, p. 369–376, abr. 2007.

MICHELINI, L. C.; MORRIS, M. Endogenous Vasopressin Modulates the Cardiovascular Responses to Exercise. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 897, p. 198–211, 1999.

MICHELINI, L. C.; STERN, J. E. Exercise-Induced Neuronal Plasticity in Central Autonomic Networks: Role in Cardiovascular Control. **Experimental Physiology**, v. 94, n. 9, p. 947–960, set. 2009.

MILLER, F. D.; OZIMEK, G.; MILNER, R. J.; BLOOM, F. E. Regulation of Neuronal Oxytocin mRNA by Ovarian Steroids in the Mature and Developing Hypothalamus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 7, p. 2468–2472, abr. 1989.

MOAK, J. P.; GOLDSTEIN, D. S.; ELDADAH, B. A.; SALEEM, A.; HOLMES, C.; PECHNIK, S.; SHARABI, Y. Supine Low-Frequency Power of Heart Rate Variability Reflects Baroreflex Function, Not Cardiac Sympathetic Innervation. **Heart Rhythm: The Official Journal of the Heart Rhythm Society**, v. 4, n. 12, p. 1523–1529, dez. 2007.

MOLKOV, Y. I.; ZOCCAL, D. B.; MORAES, D. J. A.; PATON, J. F. R.; MACHADO, B. H.; RYBAK, I. A. Intermittent Hypoxia-Induced Sensitization of Central Chemoreceptors Contributes to Sympathetic Nerve Activity during Late Expiration in Rats. **Journal of Neurophysiology**, v. 105, n. 6, p. 3080–3091, 1 jun. 2011. . Acesso em: 20 mar. 2015.

MORLEY, P.; WHITFIELD, J. F.; VANDERHYDEN, B. C.; TSANG, B. K.; SCHWARTZ, J. L. A New, Nongenomic Estrogen Action: The Rapid Release of Intracellular Calcium. **Endocrinology**, v. 131, n. 3, p. 1305–1312, set. 1992.

MOSCA, L.; EDELMAN, D.; MOCHARI, H.; CHRISTIAN, A. H.; PAULTRE, F.; POLLIN, I. Waist Circumference Predicts Cardiometabolic and Global Framingham Risk among Women Screened during National Woman's Heart Day. **Journal of women's health (2002)**, v. 15, n. 1, p. 24–34, fev. 2006.

MOZAFFARIAN, D.; BENJAMIN, E. J.; GO, A. S.; ARNETT, D. K.; BLAHA, M. J.; CUSHMAN, M.; FERRANTI, S. de; DESPRÉS, J.-P.; FULLERTON, H. J.; HOWARD, V. J.; HUFFMAN, M. D.; JUDD, S. E.; KISSELA, B. M.; LACKLAND, D. T.; LICHTMAN, J. H.; LISABETH, L. D.; LIU, S.; MACKEY, R. H.; MATCHAR, D. B.; MCGUIRE, D. K.; MOHLER, E. R.; MOY, C. S.; MUNTNER, P.; MUSSOLINO, M. E.; NASIR, K.; NEUMAR, R. W.; NICHOL, G.; PALANIAPPAN, L.; PANDEY, D. K.; REEVES, M. J.; RODRIGUEZ, C. J.; SORLIE, P. D.; STEIN, J.; TOWFIGHI, A.; TURAN, T. N.; VIRANI, S. S.; WILLEY, J. Z.; WOO, D.; YEH, R. W.; TURNER, M.

B. Heart Disease and Stroke Statistics—2015 Update A Report From the American Heart Association. **Circulation**, v. 131, n. 4, p. e29–e322, 27 jan. 2015.

MULLIS, K.; KAY, K.; WILLIAMS, D. L. Oxytocin Action in the Ventral Tegmental Area Affects Sucrose Intake. **Brain Research**, v. 1513, p. 85–91, 4 jun. 2013.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (US) COMMITTEE FOR THE UPDATE OF THE GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS. **Guide for the care and use of laboratory animals**. 8th. ed. Washington (DC): National Academies Press (US), 2011.

NICHOLS, M.; TOWNSEND, N.; SCARBOROUGH, P.; RAYNER, M. Trends in Age-Specific Coronary Heart Disease Mortality in the European Union over Three Decades: 1980-2009. **European heart journal**, v. 34, n. 39, p. 3017–3027, out. 2013.

NICKENIG, G.; BÄUMER, A. T.; GROHÈ, C.; KAHLERT, S.; STREHLOW, K.; ROSENKRANZ, S.; STÄBLEIN, A.; BECKERS, F.; SMITS, J. F.; DAEMEN, M. J.; VETTER, H.; BÖHM, M. Estrogen Modulates AT1 Receptor Gene Expression in Vitro and in Vivo. **Circulation**, v. 97, n. 22, p. 2197–2201, 9 jun. 1998.

OLIVEIRA, L. R.; DE MELO, V. U.; MACEDO, F. N.; BARRETO, A. S.; BADAUE-PASSOS, D.; VIANA DOS SANTOS, M. R.; DIAS, D. P. M.; SLUKA, K. A.; DESANTANA, J. M.; SANTANA-FILHO, V. J. Induction of Chronic Non-Inflammatory Widespread Pain Increases Cardiac Sympathetic Modulation in Rats. **Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical**, v. 167, n. 1–2, p. 45–49, 3 abr. 2012.

OLSON, A. L.; ZWILLICH, C. The Obesity Hypoventilation Syndrome. **The American Journal of Medicine**, v. 118, n. 9, p. 948–956, set. 2005.

OLSON, B. R.; DRUTAROSKY, M. D.; CHOW, M. S.; HRUBY, V. J.; STRICKER, E. M.; VERBALIS, J. G. Oxytocin and an Oxytocin Agonist Administered Centrally Decrease Food Intake in Rats. **Peptides**, v. 12, n. 1, p. 113–118, fev. 1991.

PATISAUL, H. B.; SCORDALAKES, E. M.; YOUNG, L. J.; RISSMAN, E. F. Oxytocin, but Not Oxytocin Receptor, Is Regulated by Oestrogen Receptor Beta in the Female Mouse Hypothalamus. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 15, n. 8, p. 787–793, ago. 2003.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition**. [s.l.] Academic Press, 2006.

PETERS, J. H.; MCDOUGALL, S. J.; KELLETT, D. O.; JORDAN, D.; LLEWELLYN-SMITH, I. J.; ANDRESEN, M. C. Oxytocin Enhances Cranial Visceral Afferent Synaptic Transmission to the Solitary Tract Nucleus. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 28, n. 45, p. 11731–11740, 5 nov. 2008.

PFAFFL, M. W. A New Mathematical Model for Relative Quantification in Real-Time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. e45, 1 maio 2001.

PIÑOL, R. A.; JAMESON, H.; POPRATILOFF, A.; LEE, N. H.; MENDELOWITZ, D. Visualization of Oxytocin Release that Mediates Paired Pulse Facilitation in

Hypothalamic Pathways to Brainstem Autonomic Neurons. **PLOS ONE**, v. 9, n. 11, p. e112138, 7 nov. 2014.

RE, R. N. Obesity-Related Hypertension. **The Ochsner Journal**, v. 9, n. 3, p. 133–136, 2009.

Research on the Menopause in the 1990s. Report of a WHO Scientific Group. **World Health Organization technical report series**, v. 866, p. 1–107, 1996.

REVANKAR, C. M.; CIMINO, D. F.; SKLAR, L. A.; ARTERBURN, J. B.; PROSSNITZ, E. R. A Transmembrane Intracellular Estrogen Receptor Mediates Rapid Cell Signaling. **Science (New York, N.Y.)**, v. 307, n. 5715, p. 1625–1630, 11 mar. 2005.

RIENZO, M. D. **Computer analysis of cardiovascular signals**. [s.l.] IOS Press, 1995.

RIVERA, C. M.; GROSSARDT, B. R.; RHODES, D. J.; BROWN, R. D. J.; ROGER, V. L.; MELTON, L. J. 3rd; ROCCA, W. A. Increased Cardiovascular Mortality after Early Bilateral Oophorectomy. **Menopause (New York, N.Y.)**, v. 16, n. 1, p. 15–23, fev. 2009.

RUSS, R. D.; WALKER, B. R. Oxytocin Augments Baroreflex Bradycardia in Conscious Rats. **Peptides**, v. 15, n. 5, p. 907–912, 1994.

SAWCHENKO, P. E.; SWANSON, L. W. Immunohistochemical Identification of Neurons in the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus That Project to the Medulla or to the Spinal Cord in the Rat. **The Journal of comparative neurology**, v. 205, n. 3, p. 260–272, 1 mar. 1982.

SHEPHERD, J. T.; VANHOUTTE, P. M. **The human cardiovascular system: facts and concepts**. [s.l.] Raven Press, 1979.

SKRAPARI, I.; TENTOLOURIS, N.; PERREA, D.; BAKOYIANNIS, C.; PAPAZAFIROPOULOU, A.; KATSILAMBROS, N. Baroreflex Sensitivity in Obesity: Relationship with Cardiac Autonomic Nervous System Activity. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 15, n. 7, p. 1685–1693, jul. 2007.

SLADEK, C. D.; MICHELINI, L. C.; STACHENFELD, N. S.; STERN, J. E.; URBAN, J. H. Endocrine-Autonomic Linkages. **Comprehensive Physiology**, v. 5, n. 3, p. 1281–1323, 1 jul. 2015.

SOFRONIEW, M. V.; SCHRELL, U. Evidence for a direct projection from oxytocin and vasopressin neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus to the medulla oblongata: Immunohistochemical visualization of both the horseradish peroxidase transported and the peptide produced by the same neurons. **Neuroscience Letters**, v. 22, n. 3, p. 211–217, 25 mar. 1981. . Acesso em: 18 mar. 2014.

STAUSS, H. M. Identification of Blood Pressure Control Mechanisms by Power Spectral Analysis. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, v. 34, n. 4, p. 362–368, abr. 2007.

STERN, J. E.; ZHANG, W. Preautonomic Neurons in the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus Contain Estrogen Receptor Beta. **Brain research**, v. 975, n. 1–2, p. 99–109, 13 jun. 2003.

SUZUKI, Y.; SATOH, S.; KIMURA, M.; OYAMA, H.; ASANO, T.; SHIBUYA, M.; SUGITA, K. Effects of Vasopressin and Oxytocin on Canine Cerebral Circulation in Vivo. **Journal of Neurosurgery**, v. 77, n. 3, p. 424–431, set. 1992.

TADDEI, S.; VIRDIS, A.; GHIADONI, L.; MATTEI, P.; SUDANO, I.; BERNINI, G.; PINTO, S.; SALVETTI, A. Menopause Is Associated with Endothelial Dysfunction in Women. **Hypertension**, v. 28, n. 4, p. 576–582, out. 1996.

THOMAS, P.; PANG, Y.; FILARDO, E. J.; DONG, J. Identity of an Estrogen Membrane Receptor Coupled to a G Protein in Human Breast Cancer Cells. **Endocrinology**, v. 146, n. 2, p. 624–632, fev. 2005.

TUNSTALL-PEDOE, H.; KUULASMAA, K.; AMOUYEL, P.; ARVEILER, D.; RAJAKANGAS, A. M.; PAJAK, A. Myocardial Infarction and Coronary Deaths in the World Health Organization MONICA Project. Registration Procedures, Event Rates, and Case-Fatality Rates in 38 Populations from 21 Countries in Four Continents. **Circulation**, v. 90, n. 1, p. 583–612, jul. 1994.

UTIAN, W. H. Biosynthesis and Physiologic Effects of Estrogen and Pathophysiologic Effects of Estrogen Deficiency: A Review. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 161, n. 6 Pt 2, p. 1828–1831, dez. 1989.

VAN DER GRAAF, Y.; DE KLEIJN, M. J.; VAN DER SCHOUW, Y. T. Menopause and Cardiovascular Disease. **Journal of psychosomatic obstetrics and gynaecology**, v. 18, n. 2, p. 113–120, jun. 1997.

WENGER, N. K.; SPEROFF, L.; PACKARD, B. Cardiovascular Health and Disease in Women. **New England Journal of Medicine**, v. 329, n. 4, p. 247–256, 22 jul. 1993. . Acesso em: 5 mar. 2014.

WINDER, C. V.; BERNTHAL, T.; WEEKS, W. F. Reflex Hyperpnea and Vasoconstriction Due to Ischemic Excitation of the Carotid Body. **American Journal of Physiology -- Legacy Content**, v. 124, n. 1, p. 238–245, 30 set. 1938. . Acesso em: 13 mar. 2015.

WSOL, A.; CUDNOCH-JEDRZEJEWSKA, A.; SZCZEPANSKA-SADOWSKA, E.; KOWALEWSKI, S.; PUCHALSKA, L. Oxytocin in the Cardiovascular Responses to Stress. **Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society**, v. 59 Suppl 8, p. 123–127, dez. 2008.

XUE, B.; BADAUE-PASSOS, D. J.; GUO, F.; GOMEZ-SANCHEZ, C. E.; HAY, M.; JOHNSON, A. K. Sex Differences and Central Protective Effect of 17beta-Estradiol in the Development of Aldosterone/NaCl-Induced Hypertension. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 296, n. 5, p. H1577-1585, maio 2009.

XUE, B.; ZHANG, Z.; BELTZ, T. G.; JOHNSON, R. F.; GUO, F.; HAY, M.; JOHNSON, A. K. Estrogen Receptor-β in the Paraventricular Nucleus and Rostroventrolateral Medulla Plays an Essential Protective Role in Aldosterone/Salt-Induced Hypertension in Female Rats. **Hypertension**, v. 61, n. 6, p. 1255–1262, jun. 2013.

YANG, Z.; HAN, D.; COOTE, J. H. Cardiac Sympatho-Excitatory Action of PVN-Spinal Oxytocin Neurones. **Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical**, v. 147, n. 1–2, p. 80–85, 11 maio 2009.

ZOCCAL, D. B.; FURUYA, W. I.; BASSI, M.; COLOMBARI, D. S. A.; COLOMBARI, E. The Nucleus of the Solitary Tract and the Coordination of Respiratory and Sympathetic Activities. **Frontiers in Physiology**, v. 5, p. 238, 2014.

ANEXO A

Artigo publicado.



ORIGINAL RESEARCH
published: 13 October 2016
doi: 10.3389/fphys.2016.00461



Ovarian Hormone Deprivation Reduces Oxytocin Expression in Paraventricular Nucleus Preautonomic Neurons and Correlates with Baroreflex Impairment in Rats

Vitor U. De Melo^{1,2}, Rayssa R. M. Saldanha¹, Carla R. Dos Santos³, Josiane De Campos Cruz⁴, Vitor A. Lira², Valter J. Santana-Filho^{1†} and Lisete C. Michelini^{2†*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Ovidiu Constantin Balata,
Universidade Camilo Castelo Branco,
Brazil

Reviewed by:

Rohit Ramchandani,
University of Auckland, New Zealand
Cara Hildreth,
Macquarie University Australia

*Correspondence:

Lisete C. Michelini
michelini@usp.br

[†]These authors have contributed equally to this work.

Specialty section:

This article was submitted to
Integrative Physiology,
a section of the journal
Frontiers in Physiology

Received: 06 July 2016

Accepted: 26 September 2016

Published: 13 October 2016

Citation:

De Melo VU, Saldanha RR, Dos Santos CR, Cruz JC, Lira VA, Santana-Filho VJ and Michelini LC (2016) Ovarian Hormone Deprivation Reduces Oxytocin Expression in Paraventricular Nucleus Preautonomic Neurons and Correlates with Baroreflex Impairment in Rats. *Front. Physiol.* 7:461.
doi: 10.3389/fphys.2016.00461

The prevalence of cardiovascular diseases including hypertension increases dramatically in women after menopause, however the mechanisms involved remain incompletely understood. Oxytocinergic (OTergic) neurons are largely present within the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN). Several studies have shown that OTergic drive from PVN to brainstem increases baroreflex sensitivity and improves autonomic control of the circulation. Since preautonomic PVN neurons express different types of estrogen receptors, we hypothesize that ovarian hormone deprivation causes baroreflex impairment, autonomic imbalance and hypertension by negatively impacting OTergic drive and oxytocin levels in pre-autonomic neurons. Here, we assessed oxytocin gene and protein expression (qPCR and immunohistochemistry) within PVN subnuclei in sham-operated and ovariectomized Wistar rats. Conscious hemodynamic recordings were used to assess resting blood pressure and heart rate and the autonomic modulation of heart and vessels was estimated by power spectral analysis. We observed that the ovarian hormone deprivation in ovariectomized rats decreased baroreflex sensitivity, increased sympathetic and reduced vagal outflows to the heart and augmented the resting blood pressure. Of note, ovariectomized rats had reduced PVN oxytocin mRNA and protein expression in all pre-autonomic PVN subnuclei. Furthermore, reduced PVN oxytocin protein levels were positively correlated with decreased baroreflex sensitivity and negatively correlated with increased LF/HF ratio. These findings suggest that reduced oxytocin expression in OTergic neurons of the PVN contributes to the baroreflex dysfunction and autonomic dysregulation observed with ovarian hormone deprivation.

Keywords: baroreflex, oxytocin, arterial pressure, autonomic nervous system, ovariectomy

ANEXO B

Artigo publicado.

ARTIGO ORIGINAL

ISSN 1677-5090

© 2016 Revista de Ciências Médicas e Biológicas

Controle reflexo da pressão arterial: qual o papel da oxitocina como neurotransmissor autonômico?

Blood pressure reflex control: what is oxytocin role as an autonomic neurotransmitter?

Vitor Ulisses de Melo¹, Larissa Resende Oliveira¹, Rayssa Rizério Moura Saldanha², Mylena Maria Salgueiro Santana³, Valter Joviniano de Santana-Filho^{4*}

¹ Mestre em Ciências Fisiológicas. UFS; Doutorando do Programa de Pós-Graduação Ciências Fisiológicas. UFS; ² Acadêmica do Curso de Farmácia. UFS; ³ Bacharel em Fisioterapia. UFS; ⁴ Professor Adjunto do Departamento de Fisioterapia. UFS

Resumo

Objetivo: Contextualizar a relação entre os mecanismos reflexos de controle da pressão arterial e a oxitocina como neuromodulador autônomo. **Metodologia:** Foi realizada uma busca sistemática por artigos nas bases de dados PubMed, Scielo e Lilacs, através dos descritores oxitocina associado a barorreflexo, quimiorreflexo e pressão arterial. A busca também foi realizada no idioma inglês. **Resultados:** Foram selecionados 47 artigos para discussão. **Conclusão:** A oxitocina é crucial para a manutenção dos níveis pressóricos tanto em repouso quanto em situações de estresse. Diminuição da atividade da via oxitocinérgica está relacionada com comorbidades que afetam o sistema cardiorrespiratório, entretanto o treinamento físico é capaz de promover a recuperação desta via, dependente do barorreflexo e quimiorreflexo.

Palavras-chave: Oxitocina. Pressão Arterial. Barorreflexo.

Abstract

Aim: Contextualize the mechanisms of blood pressure reflex control and the oxytocin role as an autonomic neuromodulator. **Methodology:** Was performed a systematic search of articles in PubMed, Scielo and Lilacs databases, were used as descriptors oxytocin associated with baroreflex, chemoreflex, blood pressure and arterial pressure. The search for articles also was performed with descriptors in Portuguese language. **Results:** Were selected 47 articles for discussion. **Conclusion:** Oxytocin is crucial for maintenance of pressure level in the rest and stressful situations. Reduction in oxytocinergic pathway activity is related with comorbidity states, however exercise training is able to recover this pathway dependent of baroreflex and chemoreflex.

Keywords: Oxytocin. Arterial Pressure. Baroreflex.

INTRODUÇÃO

A pressão arterial (PA) é uma das variáveis fisiológicas que necessita ser finamente controlada, para isso existem mecanismos fisiológicos neurais e endócrinos capazes de manter a homeostase dos níveis pressóricos a curto, médio e longo prazo.

Dentre os hormônios que atuam nessa função encontra-se a Oxitocina (OT). Este peptídeo é classicamente estudado pela grande importância na função reprodutora, no entanto, a literatura científica relata que a OT liberada na circulação promove ajustes hidroeletrolíticos e cardiovasculares aumentando a natriurese, diminuindo a força de contração e frequência cardíaca (FC) (CHAN; SAWYER, 1962; COSTA-E-SOUZA et al., 2005; HAANWINCKEL et al., 1995).

Na década de 1990 surgiram trabalhos sugerindo a relevância da OT não somente como hormônio, mas também como neurotransmissor. O Núcleo Paraventricular do Hipotálamo (PVN) é uma das principais regiões produtoras

de OT e possui projeções para a neuro-hipófise, onde a OT é liberada como hormônio. Além disso, esse núcleo apresenta sinapses diretas com subnúcleos bulbares que controlam reflexamente a PA (BUIS, 1978; MICHELINI; MORRIS, 1999; RUSS; WALKER, 1994).

O barorreflexo e quimiorreflexo possuem ação reflexa que regulam a PA. Formados por receptores localizados nas artérias aorta e carótidas, esses mecanismos possuem aferências projetadas para o Bulbo, o qual funciona como um "centro de integração" das repostas cardiovasculares, e também recebe projeções oxitocinérgicas. De forma interessante, o exercício físico promove alteração na plasticidade de neurônios oxitocinérgicos, mas essa resposta é abolida na ausência da ativação de baro e quimiorreceptores (BUIS, 1978; CAVALLERI et al., 2011; CRUZ et al., 2013).

Desta forma, o objetivo deste trabalho é contextualizar como atuam os mecanismos neurais de controle da PA e a forma como a OT age na regulação pressórica por essas vias. Ademais, esclarecer qual a relação com diferentes doenças cardiorrespiratórias e como, experimentalmente, o exercício físico pode atuar no processo de recuperação da ação oxitocinérgica.

Correspondente/Corresponding: * Valter Joviniano de Santana-Filho – Departamento de Fisioterapia Universidade Federal de Sergipe Rod. Marechal Rondon, s/n São Cristóvão, SE, Brasil 49100-000 – Tel: (79) 21056827 – E-mail: vjf@infonet.com.br

ANEXO C

Declaração do comitê de ética em pesquisa com animais.

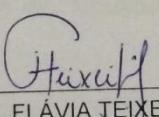


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)

DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa intitulado **“AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE NEURÔNIOS PRÉ-AUTONÔMICOS OCITOCINÉRGICOS DO NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO NA HIPERTENÇÃO EM RATAS OVARIECTOMIZADAS”**, sob coordenação do Prof. Dr. Valter Joviniano de Santana Filho (protocolo **CEPA 11/2014**) foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal de Sergipe, em reunião realizada dia 21/08/2014.

São Cristóvão, 21 de agosto de 2014.


 Prof.^a. Dr.^a. FLÁVIA TEIXEIRA SILVA
 Coordenadora do CEPA/UFS

Cidade Universitária “Prof. Aloísio de Campos”
 Jardim Rosa Elze – São Cristóvão – SE
 49100-000
 Fones: 3212 6661/6606