

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROPSIQUIATRIA E CIÊNCIAS DO
COMPORTAMENTO**

SHIRLEY MARIA DE SOUSA

**EFEITO A CURTO E LONGO PRAZO DA RESTRIÇÃO PROTEICA PERINATAL
NO TRONCO ENCEFÁLICO DE FÊMEAS**

RECIFE, 2016

SHIRLEY MARIA DE SOUSA

**EFEITO A CURTO E LONGO PRAZO DA RESTRIÇÃO PROTEICA PERINATAL
NO TRONCO ENCEFÁLICO DE FÊMEAS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento, da Universidade Federal de Pernambuco. Área de concentração: Neurociências.

Orientadora: Claudia Jacques Lagranha

RECIFE, 2016

S725e Sousa, Shirley Maria de.
Efeito a curto e longo prazo da restrição proteica perinatal no tronco encefálico de fêmeas / Shirley Maria de Sousa. – 2016.
59 f.: il.; 30 cm.

Orientadora: Claudia Jacques Lagranha.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento. Recife, 2016.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Fêmeas. 2. Estrogênios. 3. Tronco encefálico. 4. Estresse oxidativo. I. Lagranha, Claudia Jacques (Orientadora). II. Título.

615.8 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2016-129)

SHIRLEY MARIA DE SOUSA

**EFEITO A CURTO E LONGO PRAZO DA RESTRIÇÃO PROTEICA PERINATAL
NO TRONCO ENCEFÁLICO DE FÊMEAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Aprovada em: 25/02/2016

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Mariana Pinheiro Fernandes
Universidade Federal de Pernambuco-CAV

Prof^o. Dr. Marcelo Cairrão Araújo Rodrigues
Universidade Federal de Pernambuco-CAV

Prof^a Dr^a Claudia Jacques Lagranha
Universidade Federal de Pernambuco-CAV
Presidente da Banca

Dedico essa Dissertação de Mestrado a minha
mãe Maria Correia, pelo incentivo e por me apoiar
em todas as minhas escolhas. Sua ajuda sempre é
fundamental.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que sempre guiou meus passos, me amparou nos momentos de dificuldade e permitiu que eu chegasse ao meu objetivo, a Nossa Senhora que com seu manto sagrado me protegeu de todo mal.

À minha mãe Maria Correia pelas orações, pela paciência e por tudo que sempre fez por mim, ao meu pai Antônio Amaro e a minha irmã Polyana pela força e pelo apoio.

Agradeço também à minha orientadora Prof.^a Dr.^a Claudia Lagranha, pela oportunidade, pelo compromisso que teve com minha pesquisa desde o início e pela paciência. Meu sentimento é de gratidão pela oportunidade e pela acolhida no grupo.

À Prof.^a Dr.^a Mariana Pinheiro, pelo apoio, atenção e dedicação para conclusão do trabalho principalmente na etapa final.

A toda equipe do LABBEX pelo apoio, compreensão e carinho principalmente no início. Em especial ao Rudá e Cristiane.

Ao José Luiz e ao David pela ajuda fundamental durante o período da seleção.

Ao Médico Veterinário do Biotério Vinícius Vasconcelos pelo auxílio com os animais de experimentação.

Aos professores do Programa de Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento pelos conhecimentos transmitidos.

Aos funcionários da Secretaria do Programa de Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento pela gentileza e disponibilidade.

Aos meus amigos, pela força, pelo apoio, pelas orações, pelo incentivo e por entender minha ausência em alguns momentos.

A Cnpq pelo apoio financeiro.

Até aqui me permitiu o Senhor.

Resumo

Durante o período reprodutivo, fêmeas produzem elevados níveis de estrogênios. Os três principais são estrona (E1), 17- β -estradiol (E2) e o estriol (E3). O 17- β -estradiol é o estrogênio predominante durante os anos reprodutivos tanto em termos de níveis séricos absolutos como em termos de atividade estrogênica. Inúmeros relatos na literatura postulam que os estrogênios apresentam um importante papel cardioprotetor, e que essa ação protetora pode ocorrer tanto por expressão de genes como também pela ativação de proteínas de cascata de sinalização que culmina no efeito protetor dos estrogênios. Entretanto, o papel dos estrogênios no tecido cerebral combatendo o estresse oxidativo ainda não é totalmente compreendido. No tronco encefálico, neurônio localizado especificamente na região do bulbo tem um importante papel no controle neuronal do sistema cardiovascular, pois atuam tanto no controle da atividade simpática como também na recepção dos sinais químicos e mecânicos provenientes de barorreceptores e quimiorreceptores. Em adição a essa rede neuronal do controle simpático e da decodificação de sinais aferentes, o tronco encefálico está sob a influência das ações das espécies reativas de oxigênio-EROS, moléculas essas que têm alta capacidade de induzir a oxidação de lipídios de membrana, proteínas ou mesmo ao DNA, podendo levar a um quadro definido por estresse oxidativo. Hoje em dia, o estresse oxidativo é considerado um dos principais causadores de doenças neurológicas, tais como Parkinson, Alzheimer, Esclerose lateral amiotrófica entre outras. Dessa forma, o objetivo dessa revisão foi investigar os efeitos neuromodulador dos estrogênios na prole fêmeas de mães que foram submetidas a desnutrição proteica no período perinatal (gestação e lactação).

Palavras-chave: Fêmeas. Estrogênios. Tronco encefálico. Estresse oxidativo.

Abstract:

During the reproductive age females significantly produce estrogens. The three major naturally estrogens in women are estrone (E1), 17- β -estradiol (E2) and estriol (E3). Estradiol is the predominant estrogen during reproductive years both in terms of absolute serum levels as well as in terms of estrogenic activity. Numerous reports in the literature postulates that estrogens play an important cardioprotective role, and that this protective action may occur either by expression of genes but also by activating signaling cascade of proteins that culminates in cardiovascular protection. However, in the brainstem the role of estrogen is still not fully understood. In the brainstem, specifically neuron located in the bulb region, plays an important role in the neuronal control of the cardiovascular system because they act both on the control of sympathetic activity as well as the reception of chemical and mechanical signals. In addition to this neuronal network of sympathetic control and decoding of afferent signals, the brain stem is under the influence of the actions of reactive oxygen species-EROS, these molecules having high ability to induce the oxidation of membrane lipids, proteins or even leading to nuclear DNA to a frame defined by oxidative stress which appears as a major cause of neurological diseases such as Parkinson's, Alzheimer, Amyotrophic lateral sclerosis among others. Thus the aim of the present review was to investigate the neuromodulator effects of the estrogens on female offsprings from dams that received low protein diet during

key words: Female. Estrogen. Brain Stem. Oxidative Stress.

SUMÁRIO

1.APRESENTAÇÃO	
2. INTRODUÇÃO	10
3. REVISÃO DE LITERATURA	12
4. RESULTADOS –Artigo original	19
5. CONCLUSÕES	33
REFERÊNCIAS	34
APÊNDICE	
Apêndice 1– Artigo de Revisão	43
ANEXOS	
Anexo 1-Carta de aceite do artigo de revisão	58
Anexo 2-Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	59

1. APRESENTAÇÃO

Este volume contém os artigos científicos aceito para publicação e em conclusão para o encaminhado, que compõem a proposta de dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento.

O objetivo de estudo foi investigar os efeitos de uma desnutrição proteica no tronco encefálico de fêmeas. O primeiro artigo de revisão intitulado “*Efeito neuroprotetor dos estrogênios: Combate ao estresse oxidativo*” foi aceito para publicação pela RBM-Revista Brasileira de Medicina (Qualis B4 na Medicina II) em Dezembro de 2015. Neste artigo fez-se uma revisão de literatura onde foi abordado os possíveis efeitos neuroprotetor dos estrogênios, visto que, no tronco encefálico, neurônios localizados especificamente na região do bulbo tem um importante papel no controle neuronal do sistema cardiovascular, pois atuam tanto no controle da atividade simpática como também na recepção dos sinais químicos e mecânicos provenientes de barorreceptores e quimiorreceptores. Essa região também é influenciada por ações das espécies reativas de oxigênio-EROS, moléculas essas que tem alta capacidade de induzir a oxidação de lipídios de membrana, proteínas ou mesmo ao DNA, podendo levar a um quadro definido por estresse oxidativo onde o mesmo é considerado um dos principais causadores de doenças neurológicas, tais como Parkinson, Alzheimer, Esclerose lateral amiotrófica, entre outras neuropatologias.

No segundo artigo intitulado “*Short and long-term effects of perinatal protein restriction on the female brainstem*” será encaminhado para o Journal of Nutritional Biochemistry (Qualis A1 na Medicina 2). Neste artigo avaliamos os efeitos da hiponutrição proteica materna no tronco encefálico de ratas aos 22 dias de idade e na idade reprodutiva (122 dias de vida) em relação ao estresse oxidativo, por ser o tronco encefálico uma região importante na regulação da pressão arterial. Estudos recentes mostraram que um insulto nutricional como a desnutrição proteica durante o período crítico do desenvolvimento o organismo vai esta suscetível a adaptações, e essas adaptações podem ser benéfica ou não à longo prazo. No grupo após o desmame houve uma redução do sistema antioxidante e um aumento de espécies oxidantes, já no tronco encefálico das fêmeas aos 122 dias de idade foi visto uma resposta inversa, sugerindo que o aumento nos níveis de estrógenos promove uma maior proteção devido a uma melhoria da defesa antioxidante. Sendo o tronco encefálico de fêmeas aos 122 dias de idade mais resistente do que fêmeas aos 22 dias em relação ao estresse oxidativo.

2. Introdução

Durante o período reprodutivo as fêmeas produzem hormônios importante para o desenvolvimento das características secundárias sexuais e reprodutivas. Entre os hormônios femininos, atualmente, um número crescente de artigos vem destacando a importância dos estrogênios em inúmeras ações protetoras. A terminologia estrogênio, é dada para um grupo de hormônios esteroidais, importantes no controle do ciclo reprodutivo. Os três principais estrogênios são estrona (E1), 17- β -estradiol (E2) e o estriol (E3), que diferenciam-se entre si de acordo com o número de grupamento hidroxila ou cetona¹. O 17- β -estradiol é o estrogênio predominante durante os anos reprodutivos, tanto em termos de níveis séricos absolutos como em termos de atividade estrogênica, 60-80% do estrogênio circulante nas mulheres pré-menopausa é produzido pelos ovários, durante a gravidez pode ser secretado pela placenta. Alguns estrogênios podem ser produzidos em pequenas quantidades por alguns tecidos periféricos como, por exemplo fígado, glândula adrenal, glândulas mamárias e mesmo o tecido adiposo³. Na pré e menopausa, ocorre uma grande redução na produção de estrogênios e consequente inabilidade responsiva à gonadotropina, ao hormônio folículo-estimulante (FSH) e ao hormônio luteinizante (LH)³. Com isso a produção extra-glandular dos estrogênios se torna, predominante, sendo que o principal estrogênio plasmático verificado nesse período é a estrona, entretanto esse hormônio é menos potente que o 17- β -estradiol⁴.

Estudos recentes vêm mostrando o importante papel dos estrogênios no combate ao aparecimento e/ou à progressão de doenças cardíacas. Esses estudos têm demonstrado que os estrogênios podem atuar em órgãos associado ao controle cardiovascular (central e periférico) através dos seus receptores específicos localizados nos diferentes tipos celulares. Até cerca de 10 anos atrás, todos os efeitos dos estrogênios eram atribuídos às ligações ao seu receptor nuclear, que, em seguida, translocaria para o núcleo, onde funciona como um fator de transcrição e iniciando a transcrição de genes específicos da enzima óxido nítrico sintase (NOS), que pode atuar como cardioprotetor⁵. Recentemente, relatos mostraram que os estrogênios sinalizam de forma bem mais complexas, podendo ativar receptores de membrana plasmática, onde a ligação dos estrogênios a esses receptores (especialmente o receptor de estrógeno - beta) pode ativar a via de sinalização da fosfoinositol-3-quinase (PI3K) que aumenta a proteção cardiovascular⁶. Além desses receptores de membrana, observações ainda mais recentes mostraram que os estrogênios, especificamente o estradiol, pode se ligar a um receptor órfão acoplado à proteína G conhecido como GPR30, podendo esse receptor também

ativar cascata de sinalização da PI3K. Portanto, os estrogênios podem promover seus efeitos protetores tanto através da alteração da expressão gênica, como pela ativação aguda de vias de sinalização protetoras, tais como PI3K que por sua vez podem estimular ou inibir enzimas específicas em diferentes compartimentos celulares gerando seu efeito protetor^{7,8}.

Apesar dos relatos do papel protetor dos estrogênios em tecidos cardíacos, estudos a respeito da função dos mesmos em algumas regiões específicas do cérebro ainda são escassos, como é o caso das regiões do tronco encefálico onde o papel dos estrogênios ainda é pouco discutido. Grupos de neurônios localizados no tronco encefálico, especificamente, em regiões do bulbo (Núcleo do Trato Solitário-NTS e região rostro-ventro-lateral do bulbo-RVLM) constituem um sítio importante para o controle do sistema cardiovascular, pois, têm sido apontado como principais áreas no controle da atividade simpática e estão diretamente envolvidas na recepção dos sinais aferentes provenientes dos barorreceptores arteriais e quimiorreceptores centrais e periféricos^{9,10,11,12}. Dados sugerem que o controle da atividade simpática na região do tronco encefálico pode sofrer influência da produção de espécies reativas de oxigênio-ERO_(S), Chan *et al.* (2009) demonstraram que o aumento de ERO_(S) induzido por disfunção mitocondrial em conjunto com a diminuição da ação das enzimas antioxidantes tais como: Superóxido dismutase e Catalase induz hiperativação do sistema simpático¹³. Recentemente, Chan *et al* (2014), Kaludercic *et al* (2014) e Rubattu *et al* (2015), apresentaram dados onde sugerem uma forte relação entre a formação de ERO_(S) mitocondrial e a hiperativação do sistema nervoso levando a um aumento do tônus vasomotor simpático e à hipertensão^{14,15,16}.

Nosso laboratório tem como foco entender como e quando o estresse oxidativo inicia após insultos nutricionais (tais como desnutrição proteica ou obesidade), na busca de ferramentas terapêuticas para frear ou inibir a progressão do estresse oxidativo em tecidos-chaves no controle cardiovascular. Dados recentes do nosso grupo de pesquisa em conjunto com dados de outro laboratório de nosso centro, mostraram que um insulto nutricional induz a um elevado estresse oxidativo com redução de inúmeras defesas antioxidantes tanto no coração como também no tronco encefálico de ratos machos adultos e que esse insulto nutricional também está associado à hipertensão na vida adulta^{17,18,19,20}. Associado-se esses dados com alguns outros, é tentador especular que os estrogênios podem atuar como uma possível ferramenta terapêutica para combater o estresse oxidativo induzido pelo insulto nutricional. Dessa forma, o objetivo desta revisão foi discutir o efeito neuroprotetor dos estrogênios e como poderia atuar combatendo o estresse oxidativo.

3. Revisão de Literatura

Estresse oxidativo

Espécies reativas de oxigênio- $ERO_{(S)}$, tais como ânion superóxido ou radical hidroxila podem causar a oxidação de lipídios de membrana, proteínas ou o DNA. Em condições fisiológicas, os efeitos tóxicos das $ERO_{(S)}$ podem ser prevenidos pela ação de enzimas que sequestram ou reduzem o potencial nocivo da $ERO_{(S)}$, tais como superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSHPx ou GPx), e a catalase (CAT). Além das defesas enzimáticas nossas células também contam com as defesas antioxidantes não enzimáticas, onde a principal é a glutathione na sua forma reduzida (GSH)²¹. Quando ocorre um desequilíbrio entre os elementos oxidantes e os elementos antioxidantes, predominando para a maior concentração dos elementos oxidante, induzindo reações que causam danos estruturais em organelas, como nas mitocôndrias, ou em componentes celulares como: lipídeos, proteínas e/ou DNA, definimos esse estado como estresse oxidativo²¹.

O estresse oxidativo vem sendo associado a diversas patologias como, doenças cardiovasculares e desordens neurológicas tais como Parkinson, Esclerose lateral amiotrófica ou Alzheimer. O cérebro é um tecido que apresenta alta vulnerabilidade ao estresse oxidativo devido a vários fatores, tais como:

- Estima-se que, em condições basais, 20% do oxigênio consumido pelo organismo sejam utilizado pelo cérebro principalmente devido à manutenção da atividade elétrica envolvida nos potenciais de ação;
- Ampla distribuição de íons metálicos capazes de reagir com algumas $ERO_{(S)}$ e formar radical hidroxila;
- Membranas celulares ricas em ácidos graxos poli-insaturados, potencial alvo para agentes oxidantes;
- Produção de peróxido de hidrogênio via enzimas responsáveis pela reciclagem de monoaminas (e.g. serotonina, norepinefrina e dopamina);
- Através da lise celular, com a liberação de aminoácidos excitatórios (e.g. glutamato), os quais elevam as concentrações de íons de cálcio (Ca^{2+}), o que pode levar ao estresse oxidativo e morte celular²¹.

Por ser o cérebro um tecido suscetível ao dano causado pelo estresse oxidativo, torna-se uma importante estrutura para estudo da gênese neural de diversas doenças, entre elas as cardiovasculares. Em uma região específica do tronco encefálico, grupos de neurônios

destacam-se pela integração das respostas cardiovasculares via receptores aferentes (e.g. barorreceptores e quimiorreceptores) e pelo controle do tônus simpático, os quais têm seu funcionamento alterado de acordo com o equilíbrio oxidativo neste tecido^{22,23}. Bellanti *et al.* (2013) mostrou que o estrogênio tem um papel importante na regulação do equilíbrio redox pelo aumento da expressão das enzimas antioxidantes e restaura a capacidade antioxidante total em mulheres após a reposição de estrogênios²⁴.

Efeito neuroprotetor do estrógeno

Em um estudo prospectivo de base populacional no Japão, pesquisadores observaram que mulheres que iniciavam a menopausa antes dos 40 anos de idade tinham maior risco de serem acometidas por Acidente Vascular Cerebral (AVC)²⁵. Nesse contexto, o estradiol (E2) pode desempenhar efeitos consideráveis, atuando como um agente neuroprotetor por estimular efeitos antioxidantes (TABELA 1). De Marinis, *et al* (2013) demonstrou que o E2 exerce efeito protetor contra o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), reduzindo a apoptose nas células do neuroblastoma do hipocampo e aumentando a expressão de neuroglobina (NGB) em astrócitos corticais primários. Induzindo proteção contra o estresse oxidativo eliminando $ERO_{(s)}$ e controlando a inflamação²⁶. Corroborando com esse efeito protetor do E2, Patki *et al.* (2013), em um estudo com hipocampo, em ratas com deficiência de E2 através da ovariectomia (OVX), observou um aumento do estresse oxidativo, associado ao aumento da pressão arterial, comportamento de ansiedade, deficiência de aprendizagem e memória. As ratas OVX apresentaram nível de estresse oxidativo, significativamente maior do que em relação ao grupo controle (níveis normais de E2), avaliados pelos níveis de isoprostanos e também de carbonilação. Na verificação da pressão arterial, verificaram aumento tanto na pressão sistólica como na diastólica o grupo OVX²⁷. Avaliando também o hipocampo de ratas OVX, onde duas semanas após a ovariectomia foi injetado 2 μ L de beta amiloide 25-35 (A- β 25-35), Bernal-Mondragón, *et al.* (2013) percebeu que o estresse oxidativo gerado pela administração de A- β 25-35 é suficiente para produzir um prejuízo olfativo, mas que esse efeito pode ser evitado com a administração do E2 antes e depois da injeção de A- β 25-35 sugerindo uma utilização do estradiol para o tratamento do Alzheimer. Os autores sugeriram que o efeito protetor do estradiol é mediado pela modulação positiva da bioenergética mitocondrial do cérebro se tornando assim importante meio de tratamento para o Alzheimer²⁸.

Estudos atuais tanto com humanos como com animais de experimentação, sugerem que a incidência de Alzheimer duplica ou triplica quando mulheres chegam na menopausa em comparação com homens da mesma idade. Dados prévios já demonstraram que a

suplementação com estrogênios tem efeito neuroprotetor e auxilia a manutenção da memória e cognição. Entretanto o tratamento de reposição hormonal também apresenta um “lado negro” onde estudos sugerem que uso prolongado de estrogênios pode causar câncer de endométrio ou de mama. Para prevenir esse possível efeito colateral alguns pesquisadores estão testando os possíveis efeitos neuroprotetor dos fitoestrogênios, como por exemplo a genisteína que é um fitoestrogênio presente na soja²⁹. Evesen, *et al.* (2013), em um estudo com fêmeas adultas avaliou o efeito da ovariectomia e dos tratamentos com estradiol ou genisteína em relação ao estresse oxidativo em todo o tecido cerebral (com exceção do cerebelo). Esses pesquisadores mostraram que tanto o tratamento com estradiol como o tratamento com genisteína reduzem significativamente os níveis de estresse oxidativo quando comparado ao grupo ovariectomizado, e essa redução do estresse oxidativo pode ser devido ao aumento do estado total antioxidante ou pelo aumento de enzimas antioxidantes específicas, como foi o caso do aumento da GPx observado nas fêmeas tratadas com genisteína²⁹.

Em um outro estudo com fitoestrogênios, Castro, *et al.* (2012) submeteu ratas ovariectomizadas a isquemia global cerebral (10 min) e avaliaram os efeitos do estradiol ou do coumestrol (fitoestrogênio presente na soja, couve de Bruxelas ou no espinafre que tem alta afinidade ao receptor do 17- β -estradiol) tanto em relação à morte celular como também à atividade antioxidante. Os dados sugeriram que, tanto as ratas que receberam E2 como as que receberam coumestrol apresentavam neuroproteção ao insulto de isquemia global, e essa proteção ocorria mesmo se o E2 ou o coumestrol fossem administrado 1 hora antes ou 0, 3 ou 6 horas depois do insulto. Os autores concluíram que o coumestrol pode atuar como agente neuroprotetor e sugeriram que sua ação possa ter sido por aumento da atividade antioxidante e ou ativação de receptores de membrana que medeiam a neuroproteção pelo E2³⁰. Em um estudo anterior, Rao *et al.* (2011), testando o efeito protetor do E2 contra isquemia, tratou ratas com E2 por duas semanas e observou um aumento na atividade da enzima antioxidante SOD1 em neurônios corticais. Concluíram que o E2 reduz os danos induzidos pela isquemia e a atividade da SOD1 é inversamente proporcional ao dano causado pela isquemia³¹.

Colaborando com esses estudos, Sandhir, *et al.* (2014) em um estudo com ratas ovariectomizadas observou, após quatro semanas da cirurgia, uma redução significativa das funções cognitivas, nos níveis de NADH, citocromo C redutase e o citocromo C oxidase, uma relação redox reduzida de GSH/GSSG e uma diminuição significativa da atividade das enzimas SOD e CAT no cérebro³². Pourganji, *et al.* (2014), também avaliando os efeitos da remoção dos estrogênios utilizou animais controle, ovariectomizadas (OVX),

estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS-controle), e ovariectomizadas estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS-OVX), avaliaram o estresse oxidativo quantificando o níveis de lipoperoxidação e das concentrações totais de tiol no hipocampo, verificaram que os animais tratados com LPS e os animais OVX apresentavam concentrações de MDA maior do que as concentrações dos animais controle, da mesma forma observaram que as concentrações de tiol total estavam mais reduzido no grupo tratado com LPS e no grupo OVX em relação aos animais controle; sugerindo que o E2 induzia um papel protetor importante sobre os danos oxidativos induzidos pelo LPS no hipocampo³³.

Em um estudo experimental com Parkinson, Misiak, *et al.* (2010) constataram que os neurônios mesencefálicos de machos são mais vulneráveis em relação aos neurônios de fêmeas ao 6-OHDA (6-hidroxidopamina), uma neurotoxina que destrói terminais catecolaminérgicos utilizado em modelo experimental de doença de Parkinson. Além disso, os machos apresentaram de 1,5 a 2 vezes mais células apoptóticas e necróticas do que as células do sexo feminino; em adição a essas observações, os autores verificaram que as mitocôndrias do sexo masculino produzem mais ERO_(s) do que, as mitocôndrias do sexo feminino. Quando os autores trataram essas células com E2, não observaram mais diferenças nos níveis de ERO_(s). Os autores concluíram que os mecanismos subjacentes a essa maior vulnerabilidade de neurônios do sexo masculino em relação ao feminino pode ser devido a níveis mais elevados de ERO_(s) que em conjunto com uma regulação diferenciada da transcrição do gene mitocondrial, pode levar a uma redução na atividade da cadeia respiratória e aos baixos níveis de ATP observados nos machos em comparação com as fêmeas³⁴. Em outro estudo associado ao Parkinson, Campos, *et al.* (2012), tratou com E2 por 10 dias antes da indução do Parkinson usando 6-OHDA e verificaram que o E2 impediu a perda de neurônios dopaminérgicos induzida pelo 6-OHDA tanto na substância negra como no corpo estriado, e provocou um aumento dos níveis de proteína GDNF em ambas as áreas. Concluindo que o E2 estimula o GDNF, fator neurotrófico derivado de células da glia que promovem a sobrevivência e diferenciação de neurônios dopaminérgicos em cultura³⁵.

Harish *et al.* (2011) avaliando diversas regiões do cérebro humanos demonstraram um aumento nos níveis de GSH em diferentes regiões do cérebro de mulheres (córtex frontal, cerebelo, bulbo, substância negra e hipocampo), quando comparado aos homens de mesma idade³⁶. Indo em acordo com esse estudo, entretanto avaliado em ratas, Martins *et al.* (2012), observou que ratas com 5 ou 10 meses de idade ovariectomizadas apresentavam elevados níveis de estresse oxidativo no estriado, córtex, hipocampo e cerebelo; e que quando as ratas

ovariectomizadas eram tratadas com estradiol, os níveis de estresse oxidativo reduzia para níveis iguais ou até inferior os valores controle³⁷.

Khaksari, *et al.*(2015) em um modelo de lesão cerebral traumática mostrou um aumento significativo do edema encefálico após a injúria, mas o tratamento com E2 atenuou significativamente esse aumento do edema pós injúria. Em adição a esses efeitos, a lesão traumática induziu redução do RNAm e proteico do receptor ER α no tecido cerebral, ao passo que o tratamento com E2 aumentou significativamente tanto os níveis do RNAm como dos níveis proteicos do receptor ER α . Em relação aos níveis do receptor ER β , os autores mostraram que a lesão traumática promovia uma redução nos níveis do RNAm, mas que o tratamento com E2 recuperava os níveis do RNAm do receptor ER β para níveis próximos aos valores controle. Com isso, os autores concluíram que o tratamento com E2 estimulava a expressão dos ER em conjunto com os efeitos neuroprotetores do E2, sugerindo que a expressão gênica participa dos efeitos protetores dos estrogênios³⁸.

Regiões rostro-ventro-lateral, núcleo do trato solitário e efeito dos estrogênios no controle dessas áreas

No hipotálamo, uma área específica constituída por pequenos neurônios é denominada células parvocelulares, que se localizam nos núcleos paraventriculares (PVN), esses neurônios parvocelulares se projetam para eminência mediana, tronco encefálico e coluna espinal³⁹. Nas células parvocelulares, os neurônios pré-simpáticos projetam diretamente para a coluna intermediolateral da medula espinal onde núcleos pré-ganglionares simpáticos se concentram ou se projetam indiretamente para a região rostro-ventro-lateral (RVLM) do bulbo para influenciar as vias simpáticas de saída do controle cardiovascular⁴⁰.

O RVLM contém neurônios vasomotores, que regulam de forma tônica e fásica o tônus vasomotor⁴¹. Semelhante a outros neurônios, os canais de potássio controlam a atividade de disparo dos neurônios tanto parvocelulares como do RVLM^{42,43}. Estudos têm demonstrado que a corrente transiente para o exterior de potássio (I_A) desempenha um papel importante no controle da excitabilidade da membrana e dos disparos dos neurônios do PVN-RVLM e que contribuem para a remodelação excitação neuronal em condições patológicas^{42,44}. Uma extensa rede neural, incluindo a região rostro-ventro-lateral do bulbo, núcleo do trato solitário (NTS) e hipotálamo está envolvido na geração, manutenção e regulação da atividade nervosa simpática⁴¹. Considerável evidências experimental sugerem que o RVLM desempenha um papel crucial na geração do tônus vasomotor simpático, o qual mantém a pressão arterial de repouso. Dados anatômicos e eletrofisiológico indicam que o

tônus de saída vasomotor simpático do RVLM é mediado através de projeções bulbo-espinal direto para o núcleo autonômico intermediolateral na medula espinal. Embora a ativação RVLM aumente a pressão basal, lesão bilateral ou inibição do RVLM reduz a pressão arterial para níveis que se assemelham às produzidas por transecção medular^{45,46,47}. Os neurotransmissores associados a essas interações incluem, pelo menos, adrenalina e glutamato^{45,47,48,49,50,51}.

O barorreflexo arterial é um mecanismo homeostático fundamental que fornece um feedback negativo rápido para amortecer as flutuações nos parâmetros cardiovasculares induzidas por agressões ambientais. Como parte do circuito do barorreflexo, os eferentes simpáticos vasomotores da RVLM também são modulados por *inputs* do NTS^{41,52}. Neurônios glutamatérgicos decorrentes do NTS excita neurônios na medula caudal ventrolateral (CVLM)^{53,54}. Por sua vez, os neurônios GABAérgicos do CVLM inibem os neurônios simpáticos no RVLM, que se projetam para os neurônios pré-ganglionares simpáticos e oferecem a maior unidade vasomotora de tônus simpático^{55,56,57}. Impulsionada por barorreceptores excitatório dos nervos aferentes, o NTS normalmente fornece uma poderosa influência tônica inibitória no tônus vasomotor simpático e pressão arterial^{55,56,57}.

Estudos avaliando o efeito dos estrogênios nessas regiões importantes para o controle da pressão arterial e do tônus simpáticos mostraram que o RVLM e o tronco encefálico são controlados pelos estímulos gênicos ou não gênicos dos estrogênios. Isto por que, usando técnicas de estudos com imuno-histoquímica e hibridização *in situ*, já foi determinado que dentro do tronco encefálico, tanto o RNAm dos receptores ER⁵⁸ como proteínas^{58,59,60} são expressos em neurônios do RVLM, tornando esta região um forte candidato para sofrer as ações regulatórias dos estrogênios no controle cardiovascular central. Em ratas ovariectomizadas tratadas com E2, mas não em ratos machos a injeção periférica de E2 diminui o tônus simpático e a pressão arterial sistólica (SAP). Sendo que esses efeitos são antagonizados por injeção central de antagonista seletivos dos ER^{61,62}. Wang e He (2002) estudando os efeitos do E2 na atividade elétrica dos neurônios do RVLM e avaliando a pressão arterial, frequência cardíaca e descarga espontânea desses neurônios observaram que a injeção intracarotídea de E2 diminuiu a taxa de disparo dos neurônios do RVLM, sem alteração na pressão arterial e na frequência cardíaca. No entanto, o pré-tratamento com L-NAME, um inibidor de óxido nítrico (NO) sintase, atenuou significativamente o efeito inibitório de E2. Além disso, o doador de NO (3-morpholinosydnonimine -SIN-1) potencializou o efeito de E2. Estes resultados sugerem que E2 podem inibir a atividade

elétrica espontânea dos neurônios do RVLM, mediado pela ativação da NOS com o produto resultante da liberação de NO por meio de ações não genômicas⁶³.

Shih (2010) mostrou um ativo papel do receptor-ER β no RVLM na regulação cardiovascular. Este autor mostrou que tanto o E2 como o agonista do receptor-ER β diminuem a SAP e os componentes vasomotores de espectro da SAP de forma dose-dependente, enquanto agonista do receptor-ER α não altera esses parâmetros hemodinâmicos. Este autor ainda mostrou que os efeitos depressivos cardiovasculares do ER β no RVLM dependem da estimulação da iNOS e da produção de óxido nítrico (NO)⁶⁴. Corroborando esses dados de Shih, posteriormente Wu *et al.* (2012) testando a hipótese de que a ativação do receptor-ER β no RVLM participa na regulação das funções cardiovasculares através de mecanismos não genômicos, mostrou que o E2 no RVLM evoca efeitos vasopressoras através da ativação de ER β , mas não ER α , pela ativação da cascata de sinalização intracelular da proteínas PI3K e Akt⁶⁵.

Em adição a esses efeitos dos estrogênios, estudos mostram que níveis de estrogênios regulam a transcrição de Kv4.2 ou Kv4.3 em vários tecidos, tais como o coração. Kv4.2 ou Kv4.3 são canais de potássio voltagem-dependentes que controlam corrente transiente para o exterior de potássio (I_A)⁶⁶. Segundo Stern *et al.* (2003) os receptores de estradiol, especialmente o receptor ER β , é substancialmente expresso nos neurônios PVN-RVLM, sugerindo papéis específicos de E2 nos neurônios PVN-RVLM⁶⁷. Corroborando com esses dados prévios, Lee *et al.* (2013), mostraram que o E2 significativamente regula negativamente a expressão de RNAm de Kv4.2, mas não a de Kv4.3 no RVLM, diminuindo e regulando assim a densidade da corrente I_A ⁶⁸.

Poucos artigos associam os efeitos dos estrogênios para combater o estresse oxidativo nas regiões do tronco encefálico, especificamente no NTS. Se procurado no pubmed utilizando os descritores “*NTS and estradiol or estrogens and oxidative stress or ROS*” até o presente momento não tem nenhuma publicação vinculada. Já em relação ao RVLM, utilizando também esses descritores e alguns dos critérios, apenas 3 artigos foram encontrados, sendo que 2 desses artigos foram publicados antes de 2010 e são do mesmo grupo de pesquisa. Apesar de não estar dentro da janela temporal que utilizamos ainda assim, apresentaremos para podermos ter mais base para discussão.

Dados da literatura, mostraram que os neurônios do RVLM estão sob a influência das ERO_(s) e que níveis elevados de ERO_(s) podem promover aumento da atividade simpática e consequentemente indução de hipertensão^{69,70}. Wang *et al.* (2008) avaliando a diferença de sexo em relação ao risco de doenças cardiovasculares, verificou que no RVLM de fêmeas

existe uma maior expressão dos receptores AT1 (receptor de angiotensina II), uma menor expressão de p47 phox (subunidade catalítica da NADPH oxidase, responsável pela formação de ânion superóxido) e que em neurônios de fêmeas a corrente de cálcio via canal de cálcio tipo-L era maior do que nos neurônios dos machos; com isso os autores concluíram que apesar de no RVLM de fêmeas expressar mais AT1, em contrapartida a expressão de p47phox era bem reduzida e que elevados níveis de angiotensina II regulava o fluxo de cálcio de forma distinta entre os sexos⁷¹. Posteriormente, Pierce *et al* (2009), também estudando a distribuição dos receptores AT1 e da p47phox nos neurônios adrenérgicos do RVLM, verificou uma distribuição diferenciada entre machos e fêmeas em relação aos níveis de AT1 e p47phox, onde fêmeas apresentavam significativamente mais AT1 na membrana e significativamente menos p47phox tanto na membrana quanto no citosol, sugerindo que essa diferença poderia refletir na capacidade de produzir ERO_(s)⁷².

Interessantemente, Subramanian *et al.* (2011), conduzindo um estudo com ratas intactas (com níveis normais de E2) e tratamento de E2 mostrou que o tratamento crônico por 90 dias com E2 induz aumento da pressão arterial sistólica, diastólica, da frequência cardíaca, acompanhado como o aumento na produção de ânion superóxido no RVLM. Vale chamar a atenção que esse estudo difere de todos os outros por que foi o único conduzido em ratas intactas, ou seja, ratas que apresentavam concentrações de E2 normais. Dessa forma, o tratamento adicional elevou em 37,5% os níveis normais de E2, podendo ser devido a esse nível elevado de E2 os efeitos contraditórios⁷³.

4. RESULTADOS

Artigo 2–Artigo original que será submetido para avaliação no *Journal of Nutritional Biochemistry* (Qualis A1 na Medicina II)

Short-term and long-term effect of undernutrition on the female brainstem

Sousa, S.M.^{1, 2}; Lagranha, C.J.^{1, 2}

¹Laboratory of Biochemistry and Exercise Biochemistry CAV-Federal University of Pernambuco, UFPE, 55608-680, Brazil.

²Neuropsychiatry and Behavior Science Graduate Program, Federal University of Pernambuco, 50670-901, Brazil

Running Title: Estradiol protection in female malnourished rats

#Mailing address:

Claudia Jacques Lagranha

Rua Alto do Reservatório, s/n – CEP: 55608-680 – Núcleo de Educação Física e Ciências do Esporte – Bela Vista – Vitória de Santo Antão, PE – Brasil.

Fone/Fax: (00 55 81) 35233351 **E-mail:** lagranha@hotmail.com

The authors declare that this work has no conflict of interest.

ABSTRACT

Many studies have shown that maternal low-protein diet increases the susceptibility to develop several diseases, such as hypertension. Although, some studies suggested that female has lower incidence of hypertension even after nutritional insults. The studies indicate that females are less susceptible to cardiovascular disease mainly due to the female's hormone. In the present study we investigated whether maternal low-protein diet administered during the brain developmental period can induce oxidative stress in short-term (22 days of life) and long-term (122 days of life) in the female brainstem. Wistar offspring were divided into four groups according to their mothers' diets and insult effect: control short-term (NP-22D, 17 % of protein), low-protein short-term (LP-22D, 8 % of protein); control long-term (NP-122D, 17 % of protein), low-protein long-term (LP-122D, 8 % of protein). After weaning the animals received commercial chow until sacrifice. Related to the short-term effect of nutritional insult we observe an increase in oxidative stress biomarker in LP-22D (lipid peroxidation and protein oxidation), without significant difference in lipid peroxidation but decreased in protein oxidation in LP-122D when compare with their respective controls. In addition, the LP-22D group had a decrease in CAT activity (49.6%) when compared to NP-22D group, with no differences in additional enzymes. In LP-122D we observe a significant increase in GST activity (34.7%). In addition to enzymatic defense, when we evaluate non-enzymatic defense, we observe in LP-22D a significant decrease in GSH and GSH/GSSG ratio (45% and 48%) when compared to NP-22D, however no difference was observe in LP-122D compared to NP-122D. Additionally the global oxy-score indicates predominance of oxidative damage only in LP-22D. In conclusion, our data suggest that after nutritional insult during development, brainstem from female at reproductive age is more resilient to oxidative stress than female after weaning.

Key Words: Female rats; Oxidative Balance; Protein Undernutrition, Brainstem

INTRODUCTION

Studies suggest that more than 50% of hypertension begins in the brainstem nucleus, specifically in the rostral ventrolateral medulla, where an increase in reactive oxygen species-ROS generation associated to oxidative stress, contributes to neurogenic hypertension[1-6]. Recently, studies with rats at 30- and 90-days old that had received a low-protein (LP) diet during gestation and lactation showed higher sympatho-excitatory responses to peripheral chemoreceptor stimulation and an increase in arterial blood pressure in association with a higher cardiovascular sympathetic tone[7-9] Given that central oxidative stress might lead to cardiovascular diseases originating in the central nervous system, our group, using the same experimental treatment, evaluated the oxidative stress parameters in the brainstem of male rats at 100 days of age. We observe an induction of an expressive oxidative stress in combination with a marked decrease in antioxidant defense [10].

According data from American Heart Association a higher percentage of men than women have high blood pressure until age 45. An age between 45-64, the percentage of men and women is similar; after that a much higher percentage of women than men have high blood pressure [11]. Some studies suggest that this reversal in the values after age 64 is due to the decline in women's hormones (i.e menopause effect) [12-14]. Corroborating with the idea that female are more protected, several studies had shown that the presence of female hormones decreases the risk of several diseases [15-20]. Some studies with ovariectomized females, showed an increase in the arterial blood pressure, whilst those who received estrogen replacement therapy had a decrease in the arterial blood pressure[17, 21-23]. Patki et al. (2013) using ovariectomized female rats showed an increase in oxidative stress in hippocampus in association with increase in blood pressure [24]. In another study, Campos et al. suggested that low doses of estrogen induce cardioprotection by reduced blood pressure variability and increase nitric oxide disponibility[25].

Beside the possible neuroprotective effect of sex hormones, the association to estradiol level and maternal-protein restriction in the brainstem is not totally understood. Therefore, the present study was carried out to evaluate the effects of perinatal protein restriction at short and long term in the brainstem females.

MATERIAL AND METHODS

Animals and diet

Female rats at 70 d were mated (two females for one male) and on the first day of pregnancy, determined through the spermatozoa presence in a vaginal smear, they were divided into two groups in accord to dietary manipulations. Mothers were fed with diets, based on 17% casein (normo-protein) or 8% casein (low-protein), both with the same energetic value as previously described by Ferreira et al. [10]. One day (24h) after birth, the litters were standardized to nine pups per dam. The dams were divided in accordance to the experimental groups: control short-term (NP-22D, 17 % of protein), low-protein short-term (LP-22D, 8 % of protein); control long-term (NP-122D, 17 % of protein), low-protein long-term (LP-122D, 8 % of protein). This age was chosen because 22 days of age the rats showed low levels of estradiol compared to female at 122 days of age [26]. The litters were maintained on their respective diets until weaning (21 d of age) and the late effect groups start to receive laboratory chow (Labina; Purina Agriband) until tissue collection at 122 days of age. This study was approved by animal care committee from the Biological Sciences Center of the Federal University of Pernambuco (UFPE, protocol: 23076.017806/2014-62), in accordance with the recommendations of the *NIH-Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*.

Tissue preparation

At 22 or 122 days of age, the animals were killed by decapitation and in less than 1 min their brainstems were removed and placed in a cold extraction buffer (50 mM-Tris base, pH 7.4; 1 mM-EDTA; 2 mM-phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM-sodium orthovanadate). The homogenates were centrifuged at 4 °C, 4000 rpm for 10 min and the protein content of the homogenates was determined with the Bradford protein assay[27]. Each experimental condition was carryout with 300 µg of total protein.

Lipid peroxidation evaluation

The lipid peroxidation was evaluated using a reaction with thiobarbituric acid. Quantification was performed in accordance to Buege & Aust[28]. Briefly, equal amounts of 30% TCA (w/v) and 3 mM of Tris-HCl buffer were added to the sample. After centrifugation, 2500g for 10 min, the supernatant was mixed with thiobarbituric acid and boiled at 100°C for 15 min. The pink pigment yielded was measured at 535 nm.

Carbonyl content

The protein oxidation was performed as described in Levine *et al.*,[29] The samples were centrifuged with 30% TCA (w/v) for 15 min at 4000 rpm. To the pellet was added 10 mM-2,4 dinitrophenylhydrazine (DNPH) and then incubated in a dark room for 1 hour with agitation each 15 min. A new centrifugation followed by the addition of 6 M-Guanidine hydrochloride and 30 min at RT incubation was performed and then the samples were measured at 370 nm.

Superoxide Dismutase activity (SOD)

The SOD activity was evaluated through the inhibition of epinephrine auto-oxidation method. Briefly, in a reaction mix content 50 mM-carbonate buffer (pH 10.2), 5 mM-EDTA and 300 µg of protein was incubated at 37°C for 45 minutes, added 15 mM of epinephrine and the enzymatic kinetics was analyzed during 2 min at 480 nm as previously described by Misra & Fridovich[30].

Catalase Activity (CAT)

CAT activity was performed as previously described by Aebi[31], where the decomposition of H₂O₂ is enzymatic kinetics was analyzed for 3 min at 240 nm. The assay contained 50 mM-phosphate buffer (pH 7.0 at 37°C), 300 mM-H₂O₂ and sample.

Glutathione-S-Transferase activity (GST)

The GST activity was carried out in accord to Habig *et al.*,[32]. The assay consisted of an 100 mM-phosphate buffer (pH 6.5), 1 mM-EDTA, sample, and it was activated by the addition of 60 mM-GSH and 30 mM-CDNB. The changes in absorbance were enzymatic kinetics was analyzed for 1 minute at 340 nm.

Glutathione Peroxidase (GPx)

GPx activity was performed as previously published[33]. Briefly, 300 µg of protein was added to 50 mM-phosphate buffer (pH 7.0) containing 5 mM-EDTA; 0.28 mM-NADPH; 3.75 mM-sodium azide; 5 mM-GSH and 16U glutathione reductase from Sigma (St. Louis, MO). The reaction was initiated with 2.2 mM-H₂O₂, and the oxidation of NADPH was followed at 340 nm absorbance for 4 min. One unit of GPx was defined as the amount of protein required to oxidize 1 µmol-NADPH per minute, based on its molecular absorbance.

Glutathione Levels (GSH and GSSG)

The reduced glutathione levels (GSH) were evaluated as previously described by Hissin and Hilf[34]. To the samples were added 100 mM-phosphate buffer (pH= 8.0) and 5mM-EDTA followed by 15 min of incubation with O-Phthalaldehyde (OPT) (1mg/ml) at RT. To measure oxidized glutathione (GSSG) the sample were incubated in RT with 0.04 M NEM during 30 min. After the incubation were add 0.1 M-NaOH buffer plus OPT (1mg/ml) for 15 min at RT. The samples were measured at 350 nm and 420 nm, excitation and emission respectively and compared with a known standard GSH and GSSG curve.

Calculation of a global score of oxidative status (oxy-score)

The biomarkers of oxidative status were used to calculate the oxy-score index according to Rodríguez-Rodríguez et al (2015) and Ruiz-Hurtado et al (2014) following some criteria:

- 1-Analysis of the normality of the different biomarkers through the Kolmogorov– Smirnov test;
- 2-Normalization of those parameters that did not show normal distribution;
- 3-Calculation of oxy-score based on the partial indexes (OXY and ANTIOX), according to the following equations:

$$\text{oxy-score} = (\text{ANTIOX} - \text{OXY})$$

OXY=standardized values of lipid peroxidation and carbonyl content (biomarker of oxidative damage);

ANTIOX=sum of SOD, CAT, GST, GPx, GSH (standardized antioxidant biomarkers).

Based on this calculation, a positive oxy-score indicates prevalence of antioxidant capacity and a negative oxy-score indicates predominance of oxidative damage[35, 36].

Determination of Estradiol

At 20, 30 and 122 days of age, offspring from both groups were anaesthetized with ketamine (80mg/kg) and xylazine (10mg/kg), and blood samples were collected. Estradiol concentration was assessed by an enzyme immunoassay kit (Estradiol ELISA; Interkit; Brazil) according to manufacturer's instructions. Estradiol was expressed as picograms per milliliter.

Statistical analysis

Results were expressed as the mean $\pm$ the standard error of the mean (SEM). The tests of significance were recommended based on the results of the tests of normality (Kolmogorov-Smirnov test). Once the normality proved, the unpaired Student's t-test was

used on the parametric data to assess the differences between groups. Comparisons were considered statistically significant at $P < 0.05$ and statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.0® software (GraphPad Software Inc., v.5, La Jolla, CA, USA), and differences were considered significant at $p < 0.05$.

RESULTS

Lipid peroxidation and protein oxidation

We observed an increase in lipid peroxidation in LP-22D (NP: 21.8 ± 6.5 , $n=11$, LP: 64.5 ± 14.1 nmol/mg of protein, $n=9$, $p<0.01$, 196%). Regarding protein oxidation, we also observe a significant increase in LP-22D (NP: 14.9 ± 4.4 , $n=11$, LP: 42.0 ± 9.0 nmol/mg of protein, $n=5$, $p<0.01$, 182.7%). In other hand, in LP-122D lipid peroxidation did not differ from NP group (NP: 8.9 ± 1.7 , $n=6$; LP: 5.8 ± 1.3 nmol/mg of protein, $n=9$), nevertheless in protein oxidation we observe a significant decrease (NP: 2.8 ± 0.4 , $n=5$; LP: 1.8 ± 0.1 nmol/mg of protein, $n=8$, $p<0.05$)(figure 1 A-D).

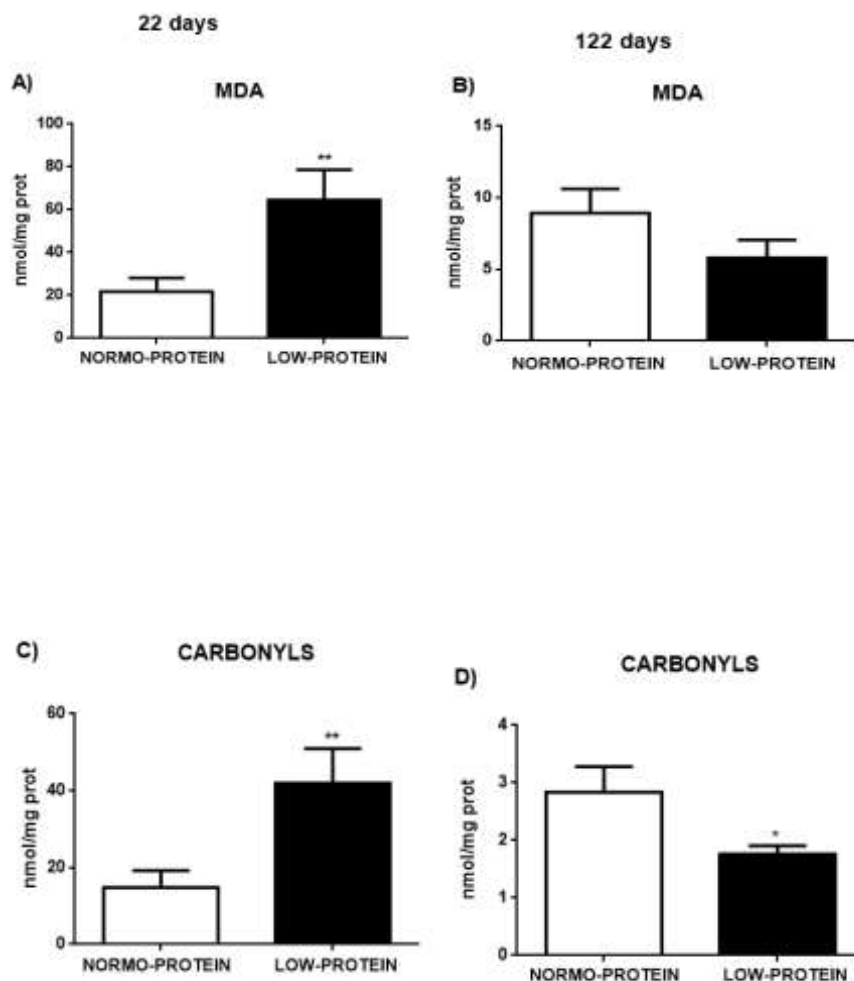
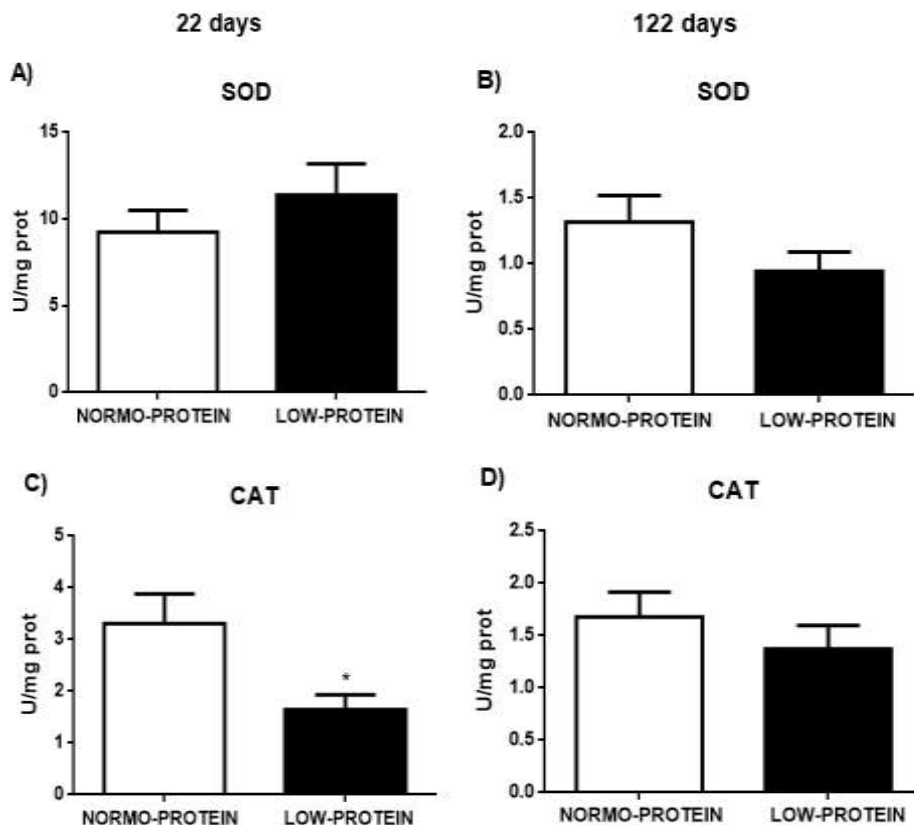


Figure 1. Oxidative stress biomarkers. Quantification in brainstem from 22 and 122 days-old female rats that received a low-protein diet during perinatal period. A) Malondialdehyde levels (MDA) 22 days, B) Malondialdehyde levels (MDA) 122 days, C) Carbonyl content 22 days and D) Carbonyl content 122 days. Values are means $\pm$ SEM. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

Antioxidant enzymatic system

After the analysis of oxidative stress biomarkers, the enzymatic antioxidant capacity was evaluated in both ages. At 22 days of age, no significant difference was detected in SOD activity (NP: 9.3 ± 1.3 , $n=11$; LP: 11.4 ± 1.8 U/mg of protein, $n=11$), however in catalase activity showed a decrease in LP-22D (NP: 3.3 ± 0.6 , $n=10$; LP: 1.6 ± 0.3 U/mg of protein, $n=11$, $p < 0.05$, 49.6%). Related to GPx and GST we did not observe difference between groups in both enzyme (GPx= NP: 6.1 ± 2.2 , $n=7$; LP: 6.2 ± 1.7 U/ mg of protein, $n=6$, $p > 0.05$; GST= NP: 32.5 ± 3.6 $n=6$; LP: 27.0 ± 6.6 U/ mg of protein, $n=7$, $p > 0.05$). In females with 122 days of age we did not observe significant difference in SOD, CAT and GPx (SOD=NP: 1.3 ± 0.2 , $n=6$; LP: 0.9 ± 0.1 U/mg of protein, $n=8$; CAT=NP: 1.7 ± 0.2 , $n=6$; LP: 1.4 ± 0.2 U/mg of protein, $n=9$; GPx=NP: 1.0 ± 0.2 , $n=6$; LP: 1.2 ± 0.3 U/mg of protein, $n=8$). However, in GST we observe a significant increase in LP group (NP: 24.2 ± 2.6 , $n=6$; LP: 32.6 ± 2.4 U/ mg of protein, $n=9$, $p < 0.05$, 34.7%) (figure 2 A-H).



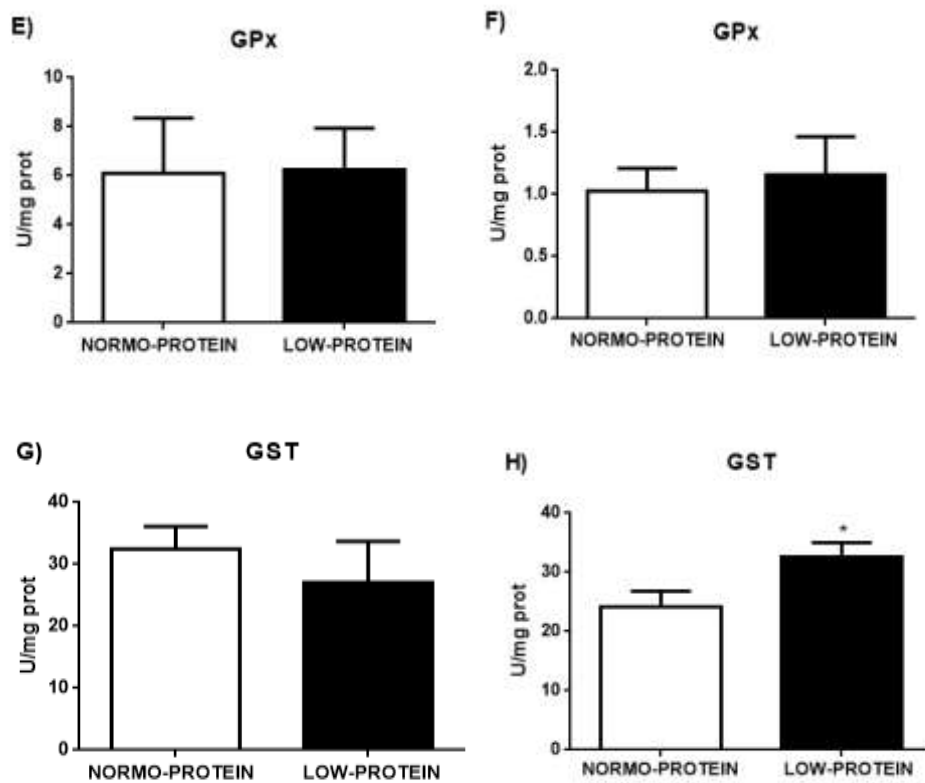


Figure 2. Enzymatic antioxidant defense. Analyzed in brainstem from 22 and 122 days-old female rats that received a low-protein diet during perinatal period. A) Superoxide dismutase-SOD 22 days, B) Superoxide dismutase-SOD 122 days, C) catalase-CAT 22 days, D) catalase-CAT 122 days, E) glutathione peroxidase-GPx 22 days, F) glutathione peroxidase-GPx 122 days, G) glutathione-S-transferase-GST 22 days and H) glutathione-S-transferase-GST 122 days. Values are means $\pm$ SEM. * $p < 0.05$.

Non-enzymatic antioxidant system – Glutathione Redox

Reduced glutathione (GSH) is the main intracellular antioxidant thiol in most brain regions. Related to nutritional effect, in 22D we observed a marked reduction in GSH levels without difference in GSSG levels (GSH=NP: 12.8 ± 1.3 , $n=5$; LP: $7.0 \pm 1.2 \mu\text{M/mg}$ of protein, $n=6$, $p < 0.01$, 45.3%; GSSG=NP: 11.3 ± 1.7 , $n=6$; LP: $10.6 \pm 2.0 \mu\text{M/mg}$ of protein, $n=6$). With the decrease in GSH, we observe a significant decrease in GSH/GSSG ratio in LP from female with 22D (GSH/GSSG ratio= NP: 1.29 ± 0.06 , $n=6$; LP: 0.67 ± 0.11 , $n=7$, $p < 0.001$, 48.06%). However in 122D we did not observe a significant alteration neither in GSH nor in GSSG (GSH NP: $42.8 \pm 10.5 \mu\text{M/mg}$ of protein, $n=5$; LP: $50.0 \pm 11.7 \mu\text{M/mg}$ of protein, $n=5$; GSSG NP: $5.3 \pm 0.7 \mu\text{M/mg}$ of protein, $n=5$; LP: $8.1 \pm 2.2 \mu\text{M/mg}$ of protein, $n=6$) (figure 3 A-F).

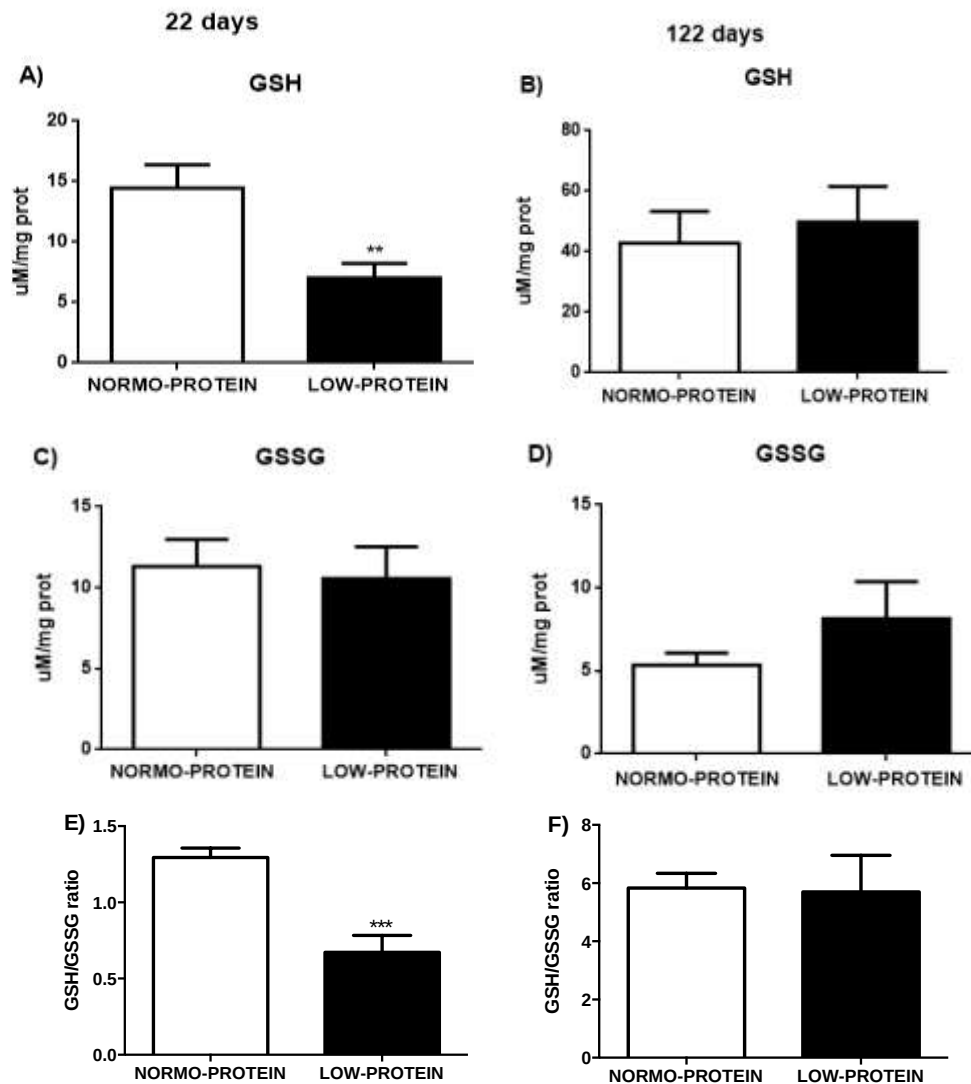


Figure 3. Non-enzymatic antioxidant defense. Analyzed in brainstem from 22 and 122 days-old female rats that received a low-protein diet during perinatal period. A) reduced glutathione-GSH 22 days, B) reduced glutathione-GSH 122 days, C) oxidized glutathione-GSSG 22 days, D) oxidized glutathione-GSSG 122 days, E) Redox state, 22 days and F) Redox state, 122 days. Values are means $\pm$ SEM. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

Oxi-score

At the age of 22D of age we observe a marked oxy-score negative in low-protein diet groups (NP: 104.5 ± 6.5 , $n=8$; LP: -61.9 ± 16.9 a.u., $n=8$, $p < 0.001$), while at 122D we did not observed significant any difference (NP: 226.4 ± 7.1 , $n=8$; LP: 244.6 ± 8.3 a.u., $n=8$ (figure 4).

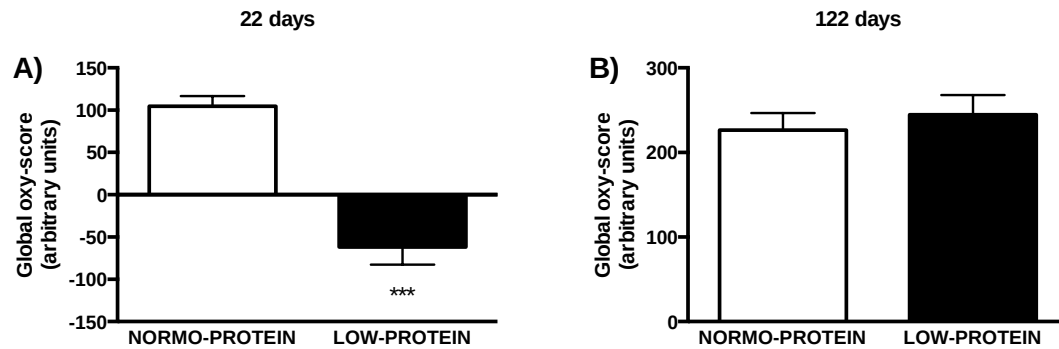


Figure 4. Global oxy-score. Analyzed in brainstem from 22 and 122 days-old female rats that received a low-protein diet during perinatal period. A) Oxy-score in 22 days, B) Oxy-score in 122 days of age. Values are means $\pm$ SEM. *** $p < 0.001$.

Dosage estradiol

With respect to concentrations of estradiol we observed that there was an increase in the normo-protein group after 20D compared with the normo-protein group after 30D (NP 20D: 156.9 ± 24 ; NP 30D: 260.0 ± 13.6 pg/mL, $n=4$), and at 120D of age (NP 20D: 156.9 ± 24 ; NP 120D: 282.0 ± 19.0 pg/mL, $n=4$). It was also seen that the low-protein diet did not influence estradiol levels in a group of animals at 120D of age (NP: 282.0 ± 19.0 , $n=4$; LP: 308.0 ± 20.1 , $n=4$) (figure 5).

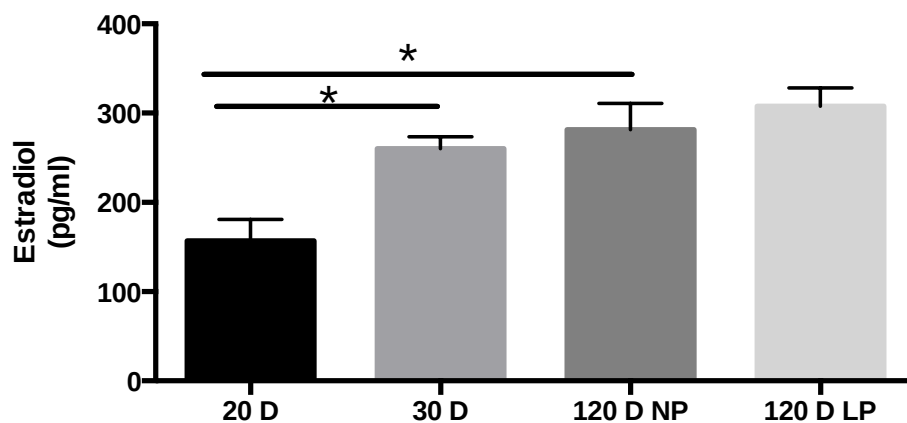


Figure 5. Dosage estradiol. Analyzed in blood from 20, 30, 120 days-old normo-protein and 120 days-old low-protein female rats that received a diet during perinatal period. Values are means $\pm$ SEM. * $p < 0.05$.

DISCUSSION

To our knowledge there have been no published studies examining effects of low-protein diet during developmental period on the brainstem of female rats from two different ages to

assess possible effect of estrogens to strengthen antioxidant defense. Our results indicated that in the age where there is low concentration of estrogens low-protein diet during development induces a detrimental effect on oxidative status in the brainstem, additionally we also observe that in reproductive age low-protein diet did not induce a marked alteration on antioxidant defense. To the best of our knowledge the majority of the studies associating the negative effects of low-protein diet during development are conducted in male rats, our data suggest that possibly due to estrogens females are more resilient to oxidative stress induced by malnutrition at developmental age.

A possible reason for the increased levels of oxidative stress in our group with 22 days of age is that at this age females have low levels of estrogens, this may be a correct hypothesis since previous studies have shown that females with 21 days of age submitted to nutritional restriction show lower levels of estrogens [35]. Corroborating with our results and Rodriguez-Rodriguez's study, Ojeda et al. (2007) showed that estrogen protects against hypertension in postpubertal female that suffer growth restriction [15]. Additionally, previous studies demonstrated that male offsprings from dams that were submitted to nutritional insult during development are more susceptible to develop hypertension than female offsprings [37].

According to previous studies, increases in oxidative stress due to a decrease in antioxidant defense contribute to neurogenic hypertension [38, 39]. Previous data from our laboratory have demonstrated that in the adult male brainstem, the maternal low-protein diet induces a significant increase in oxidative stress associated to reduction in the antioxidant defense [10]. The key mechanism responsible for induction of oxidative stress is the increased levels of ROS production, according to Demarest et al (2015) brain's mitochondria from female rats produce significantly less ROS than mitochondria from the male [40]. Together, our and literature data suggest that protein malnutrition induces higher susceptibility to oxidative stress in the brainstem in individual that has low estrogens concentration.

Related to antioxidant enzymes, our data showed no difference in SOD activity and decreases in CAT activity in female with 22 days of age and no difference in 122 days of age in both enzymes. Cardoso et al. showed that increased levels of CAT at brain's fourth ventricle are capable to detoxify hydrogen peroxide [41]. Our data at 122 days of age corroborates with Rodriguez-Rodriguez et al. (2015), that showed in plasma from 6-month-old female offsprings from dams exposed to maternal undernutrition during pregnancy no difference in SOD and CAT activity. However in 21 days old, our results disagree to the Rodriguez-Rodriguez in plasmatic activity of SOD and CAT. These discrepancies may be due

to tissue (plasma vs. brainstem), experimental model (11 days with 50% of daily intake vs. diet with 8% of protein) or timing (only 11 days during gestation period vs. 21 days of gestation plus 21 days during lactation periods). Reinforcing the importance of estrogens at the SOD and CAT activity in brain, Sandhir et al. (2014) showed that withdraw of estrogens induce a marked decrease in SOD and CAT activity in brain, with additional detrimental effect on GSH/GSSG ratio[42].

Additionally to the effects on SOD and CAT activity, our results demonstrate that GST in 122 days was the only enzyme related to glutathione system increased. GST belongs to a multi-functional family of proteins involved in cellular detoxification process and has GSH as co-factor, promoting the combination of GSH with endogenous or exogenous products that induce oxidative damage, such as hydroxyl radicals cytotoxic, peroxides of membrane lipids and products oxidative degradation of DNA and xenobiotics, avoiding the deleterious effects of these compounds[43-44]. Our data suggest that in female with higher concentration of estrogens GST is positively modulates even in an experimental group that was submitted to nutritional deprivation during development. Corroborating with our suggestion Ferreira et al (2015) and Adebayo et al (2014) showed that in male rats that was submitted to nutritional restriction a decrease in GST activity [10, 45].

The redox status is totally dependent of the GSH / GSSG ration. Our results demonstrated that in LP with 22 days of age there is distinct reduction in this ratio, but no difference in LP from 122 days of age. These results are corroborating with Harish et al. (2011), where they shows that in human female brain's region (i.e frontal cortex, cerebellum, bulb, substantia nigra and hippocampus) there is an increase in GSH levels [45]. Additionally to redox status, we have conducted the evaluation of global oxy-score, where take in consideration all bio. Additionally to redox status, we have conducted the evaluation of global oxy-score, where take in consideration all biomarkers of oxidative damage and antioxidant capacity; our data showed clearly that in LP group from 22 days of age there is a remarkable detrimental effect induced by nutritional restriction, nevertheless in LP group from 122 days of age we observe an inverse effect, suggesting that at this age, estrogen confer more resistance to the oxidative damage induced by protein deficiency during development.

Taken in together, our data suggest that after nutritional insult during critical period of development, brainstem from female at reproductive age is more resilient to oxidative stress than female after weaning.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge to the Laboratory of Biochemistry and Exercise Biochemistry-UFPE/CAV. The English version of this text was reviewed by Sidney Pratt, Canadian, BA, MAT (The Johns Hopkins University), RSAdip (TEFL- University of Cambridge).

FINANCIAL SUPPPORT

The acquisition of the reagents that were used in this work was supported financially by the Foundation to Support Science and Research from Pernambuco State—Brazil (FACEPE grant APQ-nº1026-4.09/12). We are also grateful to FACEPE and CNPQ, which provided graduation scholarships for SMS, GRFB, DFS.

CONFLICT OF INTEREST

None

AUTORSHIP

C.J.L, S.M.S, contributed to the conception and design of the study, the collection analysis and interpretation of the data as well as the drafting or revising of manuscript; S.M.S, G.R.F.B, D.F.S, contributed during the experimental procedure and data collection. M.P.F contributed to the discussion.

5. CONCLUSÕES

Os efeitos dos estrogênios contra diversos tipos de lesões são ainda uma grande fonte de estudos e discussões, entretanto os efeitos, aparentemente, estão associados a dose administrada, duração do tratamento e ao período em que foi iniciado o tratamento. Inúmeros relatos postulam que os estrogênios parece atuar como antioxidante, entretanto alguns estudos mostram que a terapia de reposição hormonal falha ou ainda induz câncer em alguns órgãos. Por isso, mais estudos, tanto com estradiol como com fitoestrogênios, são importantes para ampliar o conhecimento sobre os efeitos protetores dos estrogênios em regiões cerebrais e também em tecidos periféricos.

Apesar disso, é tentador especular que os estrogênios, principalmente o estradiol confere às fêmeas, no período fértil, uma maior proteção contra diversos tipos de injúrias do que aos machos. É possível que essa proteção conferida pelos estrogênios constitua uma

estratégia da natureza para manutenção e perpetuação das espécies, pois, é mais fácil manter as espécies se tivermos apenas 5 fêmeas e 1 só macho do que o inverso.

REFERÊNCIAS

1. Ryan KJ. Biochemistry of aromatase: significance to female reproductive physiology. *Cancer Res.* 1982; 42 (Sup.8):3342-3344.
2. Nelson LE, Bulun SE. Estrogen production and action. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2001; 45 (Sup.3):S116-124.
3. Friedlander AH, Jones LJ. The biology, medical management, and podiatric implications of menopause. *J Am Podiatr Med Assoc* 2002;92(8):437-43.
4. Mealey BL, Moritz AJ. Hormonal influences: effects of diabetes mellitus and endogenous female sex steroid hormones on the periodontium. *Periodontol* 2000;32:59-81.
5. Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med.* 1999;340(23):1801-11.
6. Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, Ley K, Chin WW, Liao JK. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature.* 2000;407(6803):538-41.
7. Filardo EJ, Thomas P. GPR30: a seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers EGF release. *Trends Endocrinol Metab.* 2005;16(8):362-7.
8. Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science.* 2005;307(5715):1625-30.
9. Mifflin SW. Arterial chemoreceptor input to nucleus tractus solitarius. *Am J Physiol* 1992; 263(2 Pt 2):R368-75.
10. Ciriello J, Schultz CG, Roder S. Collateral axonal projections from ventrolateral medullary non-catecholaminergic neurons to central nucleus of the amygdala. *Brain Res* 1994; 663(2):346-51.
11. Machado BH, Mauad H, Chianca Junior DA, Haibara AS, Colombari E. Autonomic processing of the cardiovascular reflexes in the nucleus tractus solitarii. *Braz J Med Biol Res* 1997;30:533-543.
12. Colombari E, Menani JV, Talman WT. Commissural NTS contributes to pressor responses to glutamate injected into the medial NTS of awake rats. *Am J Physiol* 1996;270:R1220-1225.

13. Chan SH, Wu KL, Chang AY, Tai MH, Chan JY. Oxidative impairment of mitochondrial electron transport chain complexes in rostral ventrolateral medulla contributes to neurogenic hypertension. *Hypertension* 2009; 53(2):217-27.
14. Chan SH, Chan JY. Brain stem NOS and ROS in neural mechanisms of hypertension. *Antioxid Redox Signal* 2014;20(1):146-63.
15. Kaludercic N, Deshwal S, Di Lisa F. Reactive oxygen species and redox compartmentalization. *Front Physiol* 2014;5:285.
16. Rubattu S, Bianchi F, Busceti CL, *et al.* Differential modulation of AMPK/PPAR α /UCP2 axis in relation to hypertension and aging in the brain, kidneys and heart of two closely related spontaneously hypertensive rat strains. *Oncotarget* 2015.
17. Nascimento L, Freitas CM, Silva-Filho R, *et al.* The effect of maternal low-protein diet on the heart of adult offspring: role of mitochondria and oxidative stress. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2014;39(8):880-7.
18. de Brito Alves JL, Nogueira VO, de Oliveira GB, *et al.* Short- and long-term effects of a maternal low-protein diet on ventilation, O₂/CO₂ chemoreception and arterial blood pressure in male rat offspring. *Br J Nutr.* 2014;111(4):606-15.
19. Ferreira DJ, Liu Y, Fernandes MP, Lagranha CJ. Perinatal low-protein diet alters brainstem antioxidant metabolism in adult offspring. *Nutr Neurosci.* 2015;2.
20. Barros MA, De Brito Alves JL, Nogueira VO, Wanderley AG, Costa-Silva JH. Maternal low-protein diet induces changes in the cardiovascular autonomic modulation in male rat offspring. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2015;25(1):123-30.
21. Ferreira DJ, Lagranha CJ. Desequilíbrio oxidativo: um mecanismo bioquímico associado a desordens cardiovasculares induzidas no início da vida. *Neurobiologia* 2013;76(1-2)
22. Chan SH, Tai MH, Li CY, Chan JY. Reduction in molecular synthesis or enzyme activity of superoxide dismutases and catalase contributes to oxidative stress and neurogenic hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Free Radic Biol Med* 2006;40:2028-2039.
23. Bruce KD, Hanson MA. The developmental origins, mechanisms, and implications of metabolic syndrome. *J Nutr* 2010;140:648-652.
24. Bellanti F, Matteo M, Rollo T, *et al.* Sex hormones modulate circulating antioxidant enzymes: impact of estrogen therapy. *Redox Biol* 2013; 1:340-6.
25. Baba Y, Ishikawa S, Amagi Y, Kayaba K, Gotoh T, Kajii E. Premature menopause is associated with increased risk of cerebral infarction in Japanese women. *Menopause* 2010;17(3):506-10.

26. De Marinis E, Acaz-Fonseca E, Arevalo MA, *et al.* 17 β -Oestradiol anti-inflammatory effects in primary astrocytes require oestrogen receptor β -mediated neuroglobin up-regulation. *J Neuroendocrinol* 2013;25:260-70.
27. Patki G, Allam FH, Atrooz F, *et al.* Grape powder intake prevents ovariectomy-induced anxiety-like behavior, memory impairment and high blood pressure in female Wistar rats. *PLoS One* 2013; 8(9):e74522.
28. Bernal-Mondragón C, Rivas-Arancibia S, Kendrick KM, Guevara-Guzmán R. Estradiol prevents olfactory dysfunction induced by A- β 25–35 injection in hippocampus. *BMC Neuroscience* 2013; 14:104.
29. Evsen MS, Ozler A, Gocmez C, *et al.* Effects of estrogen, estrogen/progesterone combination and genistein treatments on oxidant/antioxidant status in the brain of ovariectomized rats. *Medical and Pharmacological Sciences* 2013; 17: 1869-1873.
30. Castro CC, Pagnussat AS, Orlandi L, *et al.* Coumestrol has neuroprotective effects before and after global cerebral ischemia in female rats *Brain Res* 2012;1474:82-90.
31. Rao AK, Dietrich AK, Ziegler YS, Nardulli AM. 17 β -Estradiol-mediated increase in Cu/Zn superoxide dismutase expression in the brain: a mechanism to protect neurons from ischemia. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2011; 127:382-9.
32. Sandhir R, Sethi N, Aggarwal A, Khera A. Coenzyme Q10 treatment ameliorates cognitive deficits by modulating mitochondrial functions in surgically induced menopause. *Neurochem Int.*2014;74:16-23.
33. PourganjiM, Hosseini M, Soukhtanloo M, Zabihi H, Hadjzadeh, MA. Protective Role of Endogenous Ovarian Hormones Against Learning and Memory Impairments and Brain Tissues Oxidative Damage Induced by Lipopolysaccharid. *Crescent Med J* 2014; 16(3): e13954.
34. Misiak M, Beyer C, Arnold S. Gender-specific role of mitochondria in the vulnerability of 6-hydroxydopamine-treated mesencephalic neurons. *Biochim Biophys Acta* 2010;1797(6-7):1178-88.
35. Campos FL, Cristovão AC, Rocha SM, Fonseca CP, Baltazar, G. GDNF contributes to oestrogen-mediated protection of midbrain dopaminergic neurones. *J Neuroendocrinol.* 2012; 24(11):1386-97.
36. Harish G, Venkateshappa C, Mahadevan A, *et al.* Glutathione metabolism is modulated by postmortem interval, gender difference and agonal state in postmortem human brains. *Neurochem Int* 2011;59(7):1029-42.
37. Martins DB, Mazzanti CM, França RT, *et al.* 17- β estradiol in the acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation in the brain and blood of ovariectomized adult and middle-aged rats. *Life Sci*2012;90(9-10):351-9.

38. Khaksari M, Hajializadeh Z, Shahrokhi N, Esmaeili-Mahani S. Changes in the gene expression of estrogen receptors involved in the protective effect of estrogen in rat's traumatic brain injury. *Brain Res* 2015; pii:S0006-8993(15)00403-5.
39. Swanson LW, Kuypers HG: The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods. *J Comp Neurol* 1980, 194(3):555–570.
40. Pyner S, Coote JH: Identification of branching paraventricular neurons of the hypothalamus that project to the rostroventrolateral medulla and spinal cord. *Neuroscience* 2000, 100(3):549–556.
41. Dampney RA: Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. *Physiol Rev* 1994, 74(2):323–364.
42. Sonner PM, Stern JE: Functional role of A-type potassium currents in rat presympathetic PVN neurones. *J Physiol* 2007, 582(Pt 3):1219–1238.
43. Chen QH, Toney GM: Excitability of paraventricular nucleus neurones that project to the rostral ventrolateral medulla is regulated by small conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels. *J Physiol* 2009, 587(Pt 17):4235–4247.
44. Sonner PM, Filosa JA, Stern JE: Diminished A-type potassium current and altered firing properties in presympathetic PVN neurones in renovascular hypertensive rats. *J Physiol* 2008, 586(6):1605–1622.
45. Granata AR, DA Ruggiero, Parque DH, Joh TH, Reis DJ. Área de tronco cerebral com C1 neurônios epinefrina medeia as respostas vasodepressoras barorreflexo. *Am J Physiol* 1985;248(4 Pt 2): H547-67.
46. Ciriello J, Caverson MM, Polosa C. Function of the ventrolateral medulla in the control of the circulation. *Brain Res.* 1986;396(4):359-91.
47. Minson JB, Chalmers JP, Caon AC, Renaud B. Separate areas of rat medulla oblongata with populations of serotonin- and adrenaline-containing neurons alter blood pressure after L-glutamate stimulation. *J Auton Nerv Syst.* 1987;19(1):39-50.
48. Morrison SF, Callaway J, Milner TA, Reis DJ. Glutamato no núcleo intermediolateral Simpático espinal: localização por microscopia óptica e eletrônica. *Brain Res.* 1989; 503 (1): 5-15.
49. Morrison SF, Callaway J, Milner TA, Reis DJ. Rostral ventrolateral medulla: a source of the glutamatergic innervation of the sympathetic intermediolateral nucleus. *Brain Res.* 1991;562(1):126-35.
50. Bazil MK, Gordon FJ. Receptores NMDA Spinal mediar respostas pressoras evocadas a partir da medula ventrolateral rostral. *Am J Physiol* 1991; 260 (1 Pt 2): H267-75.

51. Allen AM, Adams TM, Guyenet PG. Role of the spinal cord in generating the 2- to 6-Hz rhythm in rat sympathetic outflow. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 1993; 264: R938–R945.
52. Spyer KM. Annual review prize lecture. Central nervous mechanisms contributing to cardiovascular control. *J Physiol*. 1994;474(1):1-19.
53. Gordon FJ. Aortic baroreceptor reflexes are mediated by NMDA receptors in caudal ventrolateral medulla. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 252: R628–R633, 1987.
54. Guyenet PG, Filtz TM, and Donaldson SR. Role of excitatory amino acids in rat vagal and sympathetic baroreflexes. *Brain Res* 407: 272–284, 1987.
55. Guyenet PG. Role of the ventral medulla oblongata in blood pressure regulation. In: *Central Regulation of Autonomic Functions*, edited by Loewy AD and Spyer KM. New York: Oxford Univ. Press, 1990, p. 145–167.
56. Blessing WW. *The Lower Brainstem and Bodily Homeostasis*. Oxford: Oxford Univ. Press, 1997.
57. Schreihofer AM, Stornetta RL, and Guyenet PG. Regulation of sympathetic tone and arterial pressure by rostral ventrolateral medulla after depletion of C1 cells in rat. *J Physiol* 529: 221–236, 2000.
58. Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I: Comparative distribution of estrogen receptor- α and - β mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 1997, 388:507-525.
59. Shughrue PJ, Merchenthaler I: Distribution of estrogen receptor β immunoreactivity in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 2001, 436:64-81.
60. Wang G, Drake CT, Rozenblit M, *et al* Evidence that estrogen directly and indirectly modulates C1 adrenergic bulbospinal neurons in the rostral ventrolateral medulla. *Brain Res* 2006, 1094:163-178.
61. Saleh TM, Connell BJ: Centrally mediated effect of 17 β estradiol on parasympathetic tone in male rats. *Am J Physiol* 1999, 276:R474-R481.
62. Saleh TM, Connell BJ: 17 β -estradiol modulates baroreflex sensitivity and autonomic tone of female rats. *J Auton Nerv Syst* 2000, 80:148-161.
63. Wang S, He RR. Effects of intracarotid injection of 17 β -estradiol on electrical activity of rostral ventrolateral medullary neurons in male rats. *Sheng Li Xue Bao*. 2002;54(1):47-54.
64. Shih CD: Activation of estrogen receptor β -dependent nitric oxide signaling mediates the hypotensive effects of estrogen in the rostral ventrolateral medulla of anesthetized rats. *J Biomed Sci* 2009, 16:60.

65. Wu KLH, Chen CH, Shih CD. Nontranscriptional activation of PI3K/Akt signaling mediates hypotensive effect following activation of estrogen receptor β in the rostral ventrolateral medulla of rats. *Journal of Biomedical Science* 2012, 19;76: 1-12.
66. Saito T, Ciobotaru A, Bopassa JC, Toro L, Stefani E, Eghbali M: Estrogen contributes to gender differences in mouse ventricular repolarization. *Circ Res* 2009, 105(4):343–352.
67. Stern JE, Zhang W: Preautonomic neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus contain estrogen receptor beta. *Brain Res* 2003, 975(1–2):99–109.
68. Lee SK, Ryu PD, Lee SY. Estrogen replacement modulates voltage-gated potassium channels in rat presympathetic paraventricular nucleus neurons. *BMC Neuroscience* 2013, 14;134:1-11.
69. Kishi T, Hirooka Y, Kimura Y, Ito K, Shimokawa H, Takeshita A. Increased reactive oxygen species in rostral ventrolateral medulla contribute to neural mechanisms of hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 109: 2357-2362, 2004.
70. Oliveira-Sales EB, Dugaich AP, Carillo BA, *et al.* Oxidative stress contributes to renovascular hypertension. *Am J Hypertens* 21: 98–104, 2008.
71. Wang G, Milner TA, Speth RC, *et al.* Sex differences in angiotensin signaling in bulbospinal neurons in the rat rostral ventrolateral medulla. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295: R1149 –R1157, 2008.
72. Pierce JP, Kievits J, Graustein, Speth RC, Iadecola C, Milner TA. Sex differences in the subcellular distribution of AT₁ receptor and NADPH oxidase subunits in the dendrites of C1 neurons in the rat rostral ventrolateral medulla. *Neuroscience* 163(1): 329-338, 2009.
73. Subramanian M, Balasubramanian P, Garver H, *et al.* Chronic estradiol-17 β exposure increases superoxide production in the rostral ventrolateral medulla and causes hypertension: reversal by resveratrol. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300: R1560–R1568, 2011.

REFERÊNCIAS – ARTIGO ORIGINAL

- [1] Wang G, Anrather J, Huang J, Speth RC, Pickel VM, Iadecola C. NADPH oxidase contributes to angiotensin II signaling in the nucleus tractus solitarius. *J Neurosci.* 2004;24:5516-24.
- [2] Peterson JR, Sharma RV, Davisson RL. Reactive oxygen species in the neuropathogenesis of hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 2006;8:232-41.
- [3] Chan SH, Chan JY. Brain stem NOS and ROS in neural mechanisms of hypertension. *Antioxid Redox Signal.* 2013.
- [4] Chan SH, Chan JY. Angiotensin-generated reactive oxygen species in brain and pathogenesis of cardiovascular diseases. *Antioxid Redox Signal.* 2013;19:1074-84.

- [5] Nishihara M, Hirooka Y, Matsukawa R, Kishi T, Sunagawa K. Oxidative stress in the rostral ventrolateral medulla modulates excitatory and inhibitory inputs in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 2012;30:97-106.
- [6] Marina N, Ang R, Machhada A, Kasymov V, Karagiannis A, Hosford PS, et al. Brainstem Hypoxia Contributes to the Development of Hypertension in the Spontaneously Hypertensive Rat. *Hypertension*. 2015.
- [7] Barros MA, De Brito Alves JL, Nogueira VO, Wanderley AG, Costa-Silva JH. Maternal low-protein diet induces changes in the cardiovascular autonomic modulation in male rat offspring. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2015;25:123-30.
- [8] de Brito Alves JL, Nogueira VO, Cavalcanti Neto MP, Leopoldino AM, Curti C, Colombari DS, et al. Maternal protein restriction increases respiratory and sympathetic activities and sensitizes peripheral chemoreflex in male rat offspring. *J Nutr*. 2015;145:907-14.
- [9] de Brito Alves JL, Nogueira VO, de Oliveira GB, da Silva GS, Wanderley AG, Leandro CG, et al. Short- and long-term effects of a maternal low-protein diet on ventilation, O₂/CO₂ chemoreception and arterial blood pressure in male rat offspring. *Br J Nutr*. 2014;111:606-15.
- [10] Ferreira DJ, Liu Y, Fernandes MP, Lagranha CJ. Perinatal low-protein diet alters brainstem antioxidant metabolism in adult offspring. *Nutr Neurosci*. 2015.
- [11] Go AS MD, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, Bravata DM, Dai S, Ford ES, Fox CS, Franco S, Fullerton HJ, Gillespie C, Hailpern SM, Heit JA, Howard VJ, Huffman MD, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Magid D, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, McGuire DK, Mohler ER, Moy CS, Mussolino ME, Nichol G, Paynter NP, Schreiner PJ, Sorlie PD, Stein J, Turan TN, Virani SS, Wong ND, Woo D, Turner MB. Heart disease and stroke statistics—2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2013;127:e6-e245.
- [12] Lisabeth L, Bushnell C. Stroke risk in women: the role of menopause and hormone therapy. *Lancet Neurol*. 2012;11:82-91.
- [13] Kim C, Cushman M, Khodneva Y, Lisabeth LD, Judd S, Kleindorfer DO, et al. Risk of Incident Coronary Heart Disease Events in Men Compared to Women by Menopause Type and Race. *J Am Heart Assoc*. 2015;4.
- [14] Barrett-Connor E. Sex differences in coronary heart disease. Why are women so superior? The 1995 Ancel Keys Lecture. *Circulation*. 1997;95:252-64.
- [15] Ojeda NB, Grigore D, Robertson EB, Alexander BT. Estrogen protects against increased blood pressure in postpubertal female growth restricted offspring. *Hypertension*. 2007;50:679-85.
- [16] Oparil S, Miller AP. Gender and blood pressure. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2005;7:300-9.
- [17] Reckelhoff JF. Gender differences in the regulation of blood pressure. *Hypertension*. 2001;37:1199-208.
- [18] Simpkins JW, Dykens JA. Mitochondrial mechanisms of estrogen neuroprotection. *Brain Res Rev*. 2008;57:421-30.
- [19] McCarthy MM. Estradiol and the developing brain. *Physiol Rev*. 2008;88:91-124.
- [20] Sandberg K, Ji H. Sex differences in primary hypertension. *Biol Sex Differ*. 2012;3:7.
- [21] Hernandez I, Delgado JL, Diaz J, Quesada T, Teruel MJ, Llanos MC, et al. 17 β -estradiol prevents oxidative stress and decreases blood pressure in ovariectomized rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000;279:R1599-605.
- [22] Xue B, Zhang Z, Beltz TG, Guo F, Hay M, Johnson AK. Estrogen regulation of the brain renin-angiotensin system in protection against angiotensin II-induced sensitization of hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2014;307:H191-8.

- [23] Sasser JM, Brinson KN, Tipton AJ, Crislip GR, Sullivan JC. Blood pressure, sex, and female sex hormones influence renal inner medullary nitric oxide synthase activity and expression in spontaneously hypertensive rats. *J Am Heart Assoc.* 2015;4.
- [24] Patki G, Allam FH, Atrooz F, Dao AT, Solanki N, Chugh G, et al. Grape powder intake prevents ovariectomy-induced anxiety-like behavior, memory impairment and high blood pressure in female Wistar rats. *PLoS One.* 2013;8:e74522.
- [25] Campos C, Sartorio CL, Casali KR, Fernandes RO, Llesuy S, da Rosa Araujo AS, et al. Low-dose estrogen is as effective as high-dose treatment in rats with postmenopausal hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2014;63:144-51.
- [26] McCall AL, Han SJ, Millington WR, Baum MJ. Non-saturable transport of [3H]oestradiol across the blood-brain barrier in female rats is reduced by neonatal serum. *J Reprod Fertil.* 1981;61:103-8.
- [27] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
- [28] Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978;52:302-10.
- [29] Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1990;186:464-78.
- [30] Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1972;247:3170-5.
- [31] Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121-6.
- [32] Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* 1974;249:7130-9.
- [33] Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 1967;70:158-69.
- [34] Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem.* 1976;74:214-26.
- [35] Rodriguez-Rodriguez P, de Pablo AL, Condezo-Hoyos L, Martin-Cabrejas MA, Aguilera Y, Ruiz-Hurtado G, et al. Fetal undernutrition is associated with perinatal sex-dependent alterations in oxidative status. *J Nutr Biochem.* 2015;26:1650-9.
- [36] Ruiz-Hurtado G, Condezo-Hoyos L, Pulido-Olmo H, Aranguez I, Del Carmen Gonzalez M, Arribas S, et al. Development of albuminuria and enhancement of oxidative stress during chronic renin-angiotensin system suppression. *J Hypertens.* 2014;32:2082-91; discussion 91.
- [37] Langley-Evans SC, Phillips GJ, Jackson AA. In utero exposure to maternal low protein diets induces hypertension in weanling rats, independently of maternal blood pressure changes. *Clin Nutr.* 1994;13:319-24.
- [38] Chan SH, Wu KL, Chang AY, Tai MH, Chan JY. Oxidative impairment of mitochondrial electron transport chain complexes in rostral ventrolateral medulla contributes to neurogenic hypertension. *Hypertension.* 2009;53:217-27.
- [39] Hirooka Y, Kishi T, Sakai K, Takeshita A, Sunagawa K. Imbalance of central nitric oxide and reactive oxygen species in the regulation of sympathetic activity and neural mechanisms of hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2011;300:R818-26.
- [40] Demarest TG, McCarthy MM. Sex differences in mitochondrial (dys)function: Implications for neuroprotection. *J Bioenerg Biomembr.* 2015;47:173-88.
- [41] Maximo Cardoso L, de Almeida Colombari DS, Vanderlei Menani J, Alves Chianca D, Jr., Colombari E. Cardiovascular responses produced by central injection of hydrogen peroxide in conscious rats. *Brain Res Bull.* 2006;71:37-44.
- [42] Sandhir R, Sethi N, Aggarwal A, Khera A. Coenzyme Q10 treatment ameliorates cognitive deficits by modulating mitochondrial functions in surgically induced menopause. *Neurochem Int.* 2014;74:16-23.

- [43] Carletti E, Sulpizio M, Bucciarelli T, Del Boccio P, Federici L, Di Ilio C. Glutathione transferases from *Anguilla anguilla* liver: identification, cloning and functional characterization. *Aquat Toxicol.* 2008;90:48-57.
- [44] Jakoby WB. The glutathione S-transferases: a group of multifunctional detoxification proteins. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1978;46:383-414.
- [45] Adebayo OL, Adenuga GA, Sandhir R. Postnatal protein malnutrition induces neurochemical alterations leading to behavioral deficits in rats: prevention by selenium or zinc supplementation. *Nutr Neurosci.* 2014;17:268-78.
- [46] Harish G, Venkateshappa C, Mahadevan A, Pruthi N, Srinivas Bharath MM, Shankar SK. Glutathione metabolism is modulated by postmortem interval, gender difference and agonal state in postmortem human brains. *Neurochem Int.* 2011;59:1029-42.

APÊNDICE

Artigo 1- Revisão de Literatura- Artigo submetido e aceito para publicação na RBM- Revista Brasileira de Medicina (Qualis B4 na Medicina II)

Efeito neuroprotetor dos estrogênios: Combate ao estresse oxidativo

Shirley Maria de Sousa^{1, 2}; Claudia J. Lagranha^{1, 2}

¹Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento - UFPE;

²Laboratório de Bioquímica e Bioquímica do Exercício – Centro Acadêmico de Vitória – UFPE

Running title: Estrogênio e estresse oxidativo

Endereço para correspondência:

Claudia J Lagranha

Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória - CAV/UFPE, Laboratório de Bioquímica e Bioquímica do exercício. Rua Alto do Reservatório, S/N – Bela Vista. CEP: 55608-680. Vitória de Santo Antão - PE, Brasil.

E-mail: lagranha@hotmail.com

Os autores declaram que esse trabalho não tem conflito de interesse.

Resumo

Durante o período reprodutivo, fêmeas produzem elevados níveis de estrogênios. Os três principais são estrona (E1), 17- β -estradiol (E2) e o estriol (E3). O 17- β -estradiol é o estrogênio predominante durante os anos reprodutivos tanto em termos de níveis séricos absolutos como em termos de atividade estrogênica. Inúmeros relatos na literatura postulam que os estrogênios apresentam um importante papel cardioprotetor, e que essa ação protetora pode ocorrer tanto por expressão de genes como também pela ativação de proteínas de cascata de sinalização que culmina no efeito protetor dosestrogênios. Entretanto, o papel dos estrogênios no tecido cerebral combatendo o estresse oxidativo ainda não é totalmente compreendido. No tronco encefálico, neurônio localizado especificamente na região do bulbo tem um importante papel no controle neuronal do sistema cardiovascular, pois atuam tanto no controle da atividade simpática como também na recepção dos sinais químicos e mecânicos provenientes de barorreceptores e quimiorreceptores. Em adição a essa rede neuronal do controle simpático e da decodificação de sinais aferentes, o tronco encefálico está sob a influência das ações das espécies reativas de oxigênio-EROS, moléculas essas que tem alta capacidade de induzir a oxidação de lipídios de membrana, proteínas ou mesmo ao DNA, podendo levar a um quadro definido por estresse oxidativo. Hoje em dia, o estresse oxidativo é considerado um dos principais causadores de doenças neurológicas, tais como Parkinson, Alzheimer, Esclerose lateral amiotrófica entre outras. Dessa forma, o objetivo dessa revisão foi investigar os efeitos neuromodulador dos estrogênios na prole fêmeas de mães que foram submetidas a desnutrição proteica no período perinatal (gestação e lactação).

Abstract:

During the reproductive age females significantly produce estrogens. The three major naturally estrogens in women are estrone (E1), 17- β -estradiol (E2) e o estriol (E3). Estradiol is the predominant estrogen during reproductive years both in terms of absolute serum levels as well as in terms of estrogenic activity. Numerous reports in the literature postulates that estrogens play an important cardioprotective role, and that this protective action may occur either by expression of genes but also by activating signaling cascade of proteins that culminates in cardiovascular protection. However, in the brainstem the role of estrogen is still not fully understood. In the brainstem, specifically neuron located in the bulb region, plays an important role in the neuronal control of the cardiovascular system because they act both on the control of sympathetic activity as well as the reception of chemical and mechanical signals. In addition to this neuronal network of sympathetic control and decoding of afferent signals, the brain stem is under the influence of the actions of reactive oxygen species-EROS, these molecules having high ability to induce the oxidation of membrane lipids, proteins or even leading to nuclear DNA to a frame defined by oxidative stress which appears as a major cause of neurological diseases such as Parkinson's, Alzheimer, Amyotrophic lateral sclerosis among others. Thus the aim of the present review was investigated the neuromodulator effects of the estrogens on female offsprings from dams that received low protein diet during development (gestational and lactational period).

Introdução

Durante o período reprodutivo as fêmeas produzem hormônios importante para o desenvolvimento das características secundárias sexuais e reprodutivas. Entre os hormônios femininos, atualmente, um número crescente de artigos vem destacando a importância dos estrogênios em inúmeras ações protetoras. A terminologia estrogênio, é dada para um grupo de hormônios esteroidais, importantes no controle do ciclo reprodutivo. Os três principais estrogênios são estrona (E1), 17- β -estradiol (E2) e o estriol (E3), que diferenciam-se entre si de acordo com o número de grupamento hidroxila ou cetona¹. O 17- β -estradiol é o estrogênio predominante durante os anos reprodutivos, tanto em termos de níveis séricos absolutos como em termos de atividade estrogênica, 60-80% do estrogênio circulante nas mulheres pré-menopausa é produzido pelos ovários, durante a gravidez pode ser secretado pela placenta. Alguns estrogênios podem ser produzidos em pequenas quantidades por alguns tecidos periféricos como, por exemplo fígado, glândula adrenal, glândulas mamárias e mesmo o tecido adiposo³. Na peri e menopausa, ocorre uma grande redução na produção de estrogênios e consequente inabilidade responsiva à gonadotropina, ao hormônio folículo-estimulante (FSH) e ao hormônio luteinizante (LH)³. Com isso a produção extra-glandular dos estrogênios se torna, predominante, sendo que o principal estrogênio plasmático verificado nesse período é a estrona, entretanto esse hormônio é menos potente que o 17- β -estradiol⁴.

Estudos recentes vêm mostrando o importante papel dos estrogênios no combate ao aparecimento e/ou à progressão de doenças cardíacas. Esses estudos têm demonstrado que os estrogênios podem atuar em órgãos associado ao controle cardiovascular (central e periférico) através dos seus receptores específicos localizados nos diferentes tipos celulares. Até cerca de 10 anos atrás, todos os efeitos dos estrogênios eram atribuídos às ligações ao seu receptor nuclear, que, em seguida, translocaria para o núcleo, onde funciona como um fator de transcrição e iniciando a transcrição de genes específicos da enzima óxido nítrico sintase (NOS), que pode atuar como cardioprotetor⁵. Recentemente, relatos mostraram que os estrogênios sinalizam de forma bem mais complexas, podendo ativar receptores de membrana plasmática, onde a ligação dos estrogênios a esses receptores (especialmente o receptor de estrógeno - beta) pode ativar a via de sinalização da fosfoinositol-3-quinase (PI3K) que aumenta a proteção cardiovascular⁶. Além desses receptores de membrana, observações ainda mais recentes mostraram que os estrogênios, especificamente o estradiol, pode se ligar a um receptor órfão acoplado à proteína G conhecido como GPR30, podendo esse receptor também ativar cascata de sinalização da PI3K. Portanto, os estrogênios podem promover seus efeitos protetores tanto através da alteração da expressão gênica, como pela ativação aguda de vias de

sinalização protetoras, tais como PI3K que por sua vez podem estimular ou inibir enzimas específicas em diferentes compartimentos celulares gerando seu efeito protetor^{7,8}.

Apesar dos relatos do papel protetor dos estrogênios em tecidos cardíacos, estudos a respeito da função dos mesmos em algumas regiões específicas do cérebro ainda são escassos, como é o caso das regiões do tronco encefálico onde o papel dos estrogênios ainda é pouco discutido. Grupos de neurônios localizados no tronco encefálico, especificamente, em regiões do bulbo (Núcleo do Trato Solitário-NTS e região rostro-ventro-lateral do bulbo-RVLM) constituem um sítio importante para o controle do sistema cardiovascular, pois, têm sido apontado como principais áreas no controle da atividade simpática e estão diretamente envolvidas na recepção dos sinais aferentes provenientes dos barorreceptores arteriais e quimiorreceptores centrais e periféricos^{9,10,11,12}. Dados sugerem que o controle da atividade simpática na região do tronco encefálico pode sofrer influência da produção de espécies reativas de oxigênio-ERO_(S), Chan *et al.* (2009) demonstraram que o aumento de ERO_(S) induzido por disfunção mitocondrial em conjunto com a diminuição da ação das enzimas antioxidantes tais como: Superóxido dismutase e Catalase induz hiperativação do sistema simpático¹³. Recentemente, Chan *et al* (2014), Kaludercic *et al* (2014) e Rubattu *et al* (2015), apresentaram dados onde sugerem uma forte relação entre a formação de ERO_(S) mitocondrial e a hiperativação do sistema nervoso levando a um aumento do tônus vasomotor simpático e à hipertensão^{14,15,16}.

Nosso laboratório tem como foco entender como e quando o estresse oxidativo inicia após insultos nutricionais (tais como desnutrição proteica ou obesidade), na busca de ferramentas terapêuticas para frear ou inibir a progressão do estresse oxidativo em tecidos-chaves no controle cardiovascular. Dados recentes do nosso grupo de pesquisa em conjunto com dados de outro laboratório de nosso centro, mostraram que um insulto nutricional induz a um elevado estresse oxidativo com redução de inúmeras defesas antioxidantes tanto no coração como também no tronco encefálico de ratos machos adultos e que esse insulto nutricional também está associado à hipertensão na vida adulta^{17,18,19,20}. Associado-se esses dados com alguns outros, é tentador especular que os estrogênios podem atuar como uma possível ferramenta terapêutica para combater o estresse oxidativo induzido pelo insulto nutricional. Dessa forma, o objetivo desta revisão foi discutir o efeito neuroprotetor dos estrogênios e como poderia atuar combatendo o estresse oxidativo.

Materiais e métodos

Para realização desta revisão, as buscas por artigos científicos foram realizadas nas bases de dados *Pubmed* e *Science Direct*. Utilizaram-se os seguintes descritores: “*Oxidative stress; Estradiol; Female; Brainstem, NTS; RVLM*”. Como critérios de inclusão dos artigos encontrados, utilizamos artigos publicados entre 2010 e 2015, que se encontravam disponíveis para download gratuitamente, ou que poderia ser baixado *via* o site do Periódicos CAPES e que tratavam simultaneamente de pelo menos dois dos descritores acima. Além destes critérios de inclusão dos artigos selecionados foram também utilizados artigos clássicos sobre os temas chaves da revisão.

Estresse oxidativo

Espécies reativas de oxigênio- $ERO_{(s)}$, tais como ânion superóxido ou radical hidroxila podem causar a oxidação de lipídios de membrana, proteínas ou o DNA. Em condições fisiológicas, os efeitos tóxicos das $ERO_{(s)}$ podem ser prevenidos pela ação de enzimas que sequestram ou reduzem o potencial nocivo da $ERO_{(s)}$, tais como superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSHPx ou GPx), e a catalase (CAT). Além das defesas enzimáticas nossas células também contam com as defesas antioxidantes não enzimáticas, onde a principal é a glutathione na sua forma reduzida (GSH)²¹. Quando ocorre um desequilíbrio entre os elementos oxidantes e os elementos antioxidantes, predominando para a maior concentração dos elementos oxidante, induzindo reações que causam danos estruturais em organelas, como nas mitocôndrias, ou em componentes celulares como: lipídeos, proteínas e/ou DNA, definimos esse estado como estresse oxidativo²¹.

O estresse oxidativo vem sendo associado a diversas patologias como, doenças cardiovasculares e desordens neurológicas tais como Parkinson, Esclerose lateral amiotrófica ou Alzheimer. O cérebro é um tecido que apresenta alta vulnerabilidade ao estresse oxidativo devido a vários fatores, tais como:

- Estima-se que, em condições basais, 20% do oxigênio consumido pelo organismo sejam utilizado pelo cérebro principalmente devido à manutenção da atividade elétrica envolvida nos potenciais de ação;
- Ampla distribuição de íons metálicos capazes de reagir com algumas $ERO_{(s)}$ e formar radical hidroxila;
- Membranas celulares ricas em ácidos graxos poli-insaturados, potencial alvo para agentes oxidantes;

- Produção de peróxido de hidrogênio via enzimas responsáveis pela reciclagem de monoaminas (e.g. serotonina, norepinefrina e dopamina);
- Através da lise celular, com a liberação de aminoácidos excitatórios (e.g. glutamato), os quais elevam as concentrações de íons de cálcio (Ca^{2+}), o que pode levar ao estresse oxidativo e morte celular²¹.

Por ser o cérebro um tecido suscetível ao dano causado pelo estresse oxidativo, torna-se uma importante estrutura para estudo da gênese neural de diversas doenças, entre elas as cardiovasculares. Em uma região específica do tronco encefálico, grupos de neurônios destacam-se pela integração das respostas cardiovasculares via receptores aferentes (e.g. barorreceptores e quimiorreceptores) e pelo controle do tônus simpático, os quais têm seu funcionamento alterado de acordo com o equilíbrio oxidativo neste tecido^{22,23}. Bellanti *et al.* (2013) mostrou que o estrogênio tem um papel importante na regulação do equilíbrio redox pelo aumento da expressão das enzimas antioxidantes e restaura a capacidade antioxidante total em mulheres após a reposição de estrogênios²⁴.

Efeito neuroprotetor do estrógeno

Em um estudo prospectivo de base populacional no Japão, pesquisadores observaram que mulheres que iniciavam a menopausa antes dos 40 anos de idade tinham maior risco de serem acometidas por Acidente Vascular Cerebral (AVC)²⁵. Nesse contexto, o estradiol (E2) pode desempenhar efeitos consideráveis, atuando como um agente neuroprotetor por estimular efeitos antioxidantes (TABELA 1). De Marinis, *et al* (2013) demonstrou que o E2 exerce efeito protetor contra o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), reduzindo a apoptose nas células do neuroblastoma do hipocampo e aumentando a expressão de neuroglobina (NGB) em astrócitos corticais primários. Induzindo proteção contra o estresse oxidativo eliminando $\text{ERO}_{(\text{S})}$ e controlando a inflamação²⁶. Corroborando com esse efeito protetor do E2, Patki *et al.* (2013), em um estudo com hipocampo, em ratas com deficiência de E2 através da ovariectomia (OVX), observou um aumento do estresse oxidativo, associado ao aumento da pressão arterial, comportamento de ansiedade, deficiência de aprendizagem e memória. As ratas OVX apresentaram nível de estresse oxidativo, significativamente maior do que em relação ao grupo controle (níveis normais de E2), avaliados pelos níveis de isoprostanos e também de carbonilação. Na verificação da pressão arterial, verificaram aumento tanto na pressão sistólica como na diastólica o grupo OVX²⁷. Avaliando também o hipocampo de ratas OVX, onde duas semanas após a ovariectomia foi injetado 2 μL de beta amiloide 25-35 ($\text{A-}\beta_{25-35}$), Bernal-Mondragón, *et al.* (2013) percebeu que o estresse oxidativo gerado pela

administração de A- β 25-35 é suficiente para produzir um prejuízo olfativo, mas que esse efeito pode ser evitado com a administração do E2 antes e depois da injeção de A- β 25-35 sugerindo uma utilização do estradiol para o tratamento do Alzheimer. Os autores sugeriram que o efeito protetor do estradiol é mediado pela modulação positiva da bioenergética mitocondrial do cérebro se tornando assim importante meio de tratamento para o Alzheimer²⁸.

Estudos atuais tanto com humanos como com animais de experimentação, sugerem que a incidência de Alzheimer duplica ou triplica quando mulheres chegam na menopausa em comparação com homens da mesma idade. Dados prévios já demonstraram que a suplementação com estrogênios tem efeito neuroprotetor e auxilia a manutenção da memória e cognição. Entretanto o tratamento de reposição hormonal também apresenta um “lado negro” onde estudos sugerem que uso prolongado de estrogênios pode causar câncer de endométrio ou de mama. Para prevenir esse possível efeito colateral alguns pesquisadores estão testando os possíveis efeitos neuroprotetor dos fitoestrogênios, como por exemplo a genisteína que é um fitoestrogênio presente na soja²⁹. Evesen, *et al.* (2013), em um estudo com fêmeas adultas avaliou o efeito da ovariectomia e dos tratamentos com estradiol ou genisteína em relação ao estresse oxidativo em todo o tecido cerebral (com exceção do cerebelo). Esses pesquisadores mostraram que tanto o tratamento com estradiol como o tratamento com genisteína reduzem significativamente os níveis de estresse oxidativo quando comparado ao grupo ovariectomizado, e essa redução do estresse oxidativo pode ser devido ao aumento do estado total antioxidante ou pelo aumento de enzimas antioxidantes específicas, como foi o caso do aumento da GPx observado nas fêmeas tratadas com genisteína²⁹.

Em um outro estudo com fitoestrogênios, Castro, *et al.* (2012) submeteu ratas ovariectomizadas a isquemia global cerebral (10 min) e avaliaram os efeitos do estradiol ou do coumestrol (fitoestrogênio presente na soja, couve de Bruxelas ou no espinafre que tem alta afinidade ao receptor do 17- β -estradiol) tanto em relação à morte celular como também à atividade antioxidante. Os dados sugeriram que, tanto as ratas que receberam E2 como as que receberam coumestrol apresentavam neuroproteção ao insulto de isquemia global, e essa proteção ocorria mesmo se o E2 ou o coumestrol fossem administrado 1 hora antes ou 0, 3 ou 6 horas depois do insulto. Os autores concluíram que o coumestrol pode atuar como agente neuroprotetor e sugeriram que sua ação possa ter sido por aumento da atividade antioxidante e ou ativação de receptores de membrana que medeiam a neuroproteção pelo E2³⁰. Em um estudo anterior, Rao *et al* (2011), testando o efeito protetor do E2 contra isquemia, tratou ratas com E2 por duas semanas e observou um aumento na atividade da enzima antioxidante SOD1

em neurônios corticais. Concluíram que o E2 reduz os danos induzidos pela isquemia e a atividade da SOD1 é inversamente proporcional ao dano causado pela isquemia³¹.

Colaborando com esses estudos, Sandhir, *et al.* (2014) em um estudo com ratas ovariectomizadas observou, após quatro semanas da cirurgia, uma redução significativa das funções cognitivas, nos níveis de NADH, citocromo C redutase e o citocromo C oxidase, uma relação redox reduzida de GSH/GSSG e uma diminuição significativa da atividade das enzimas SOD e CAT no cérebro³². Pourganji, *et al.* (2014), também avaliando os efeitos da remoção dos estrogênios utilizou animais controle, ovariectomizadas (OVX), estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS-controle), e ovariectomizadas estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS-OVX), avaliaram o estresse oxidativo quantificando o níveis de lipoperoxidação e das concentrações totais de tiol no hipocampo, verificaram que os animais tratados com LPS e os animais OVX apresentavam concentrações de MDA maior do que as concentrações dos animais controle, da mesma forma observaram que as concentrações de tiol total estavam mais reduzido no grupo tratado com LPS e no grupo OVX em relação aos animais controle; sugerindo que o E2 induzia um papel protetor importante sobre os danos oxidativos induzidos pelo LPS no hipocampo³³.

Em um estudo experimental com Parkinson, Misiak, *et al.* (2010) constataram que os neurônios mesencefálicos de machos são mais vulneráveis em relação aos neurônios de fêmeas ao 6-OHDA (6-hidroxidopamina), uma neurotoxina que destrói terminais catecolaminérgicos utilizado em modelo experimental de doença de Parkinson. Além disso, os machos apresentaram de 1,5 a 2 vezes mais células apoptóticas e necróticas do que as células do sexo feminino; em adição a essas observações, os autores verificaram que as mitocôndrias do sexo masculino produzem mais $ERO_{(S)}$ do que, as mitocôndrias do sexo feminino. Quando os autores trataram essas células com E2, não observaram mais diferenças nos níveis de $ERO_{(S)}$. Os autores concluíram que os mecanismos subjacentes a essa maior vulnerabilidade de neurônios do sexo masculino em relação ao feminino pode ser devido a níveis mais elevados de $ERO_{(S)}$ que em conjunto com uma regulação diferenciada da transcrição do gene mitocondrial, pode levar a uma redução na atividade da cadeia respiratória e aos baixos níveis de ATP observados nos machos em comparação com as fêmeas³⁴. Em outro estudo associado ao Parkinson, Campos, *et al.* (2012), tratou com E2 por 10 dias antes da indução do Parkinson usando 6-OHDA e verificaram que o E2 impediu a perda de neurônios dopaminérgicos induzida pelo 6-OHDA tanto na substância negra como no corpo estriado, e provocou um aumento dos níveis de proteína GDNF em ambas as áreas. Concluindo que o E2 estimula o

GDNF, fator neurotrófico derivado de células da glia que promovem a sobrevivência e diferenciação de neurônios dopaminérgicos em cultura³⁵.

Harish *et al.* (2011) avaliando diversas regiões do cérebro humano demonstraram um aumento nos níveis de GSH em diferentes regiões do cérebro de mulheres (córtex frontal, cerebelo, bulbo, substância negra e hipocampo), quando comparado aos homens de mesma idade³⁶. Indo em acordo com esse estudo, entretanto avaliado em ratas, Martins *et al.* (2012), observou que ratas com 5 ou 10 meses de idade ovariectomizadas apresentavam elevados níveis de estresse oxidativo no estriado, córtex, hipocampo e cerebelo; e que quando as ratas ovariectomizadas eram tratadas com estradiol, os níveis de estresse oxidativo reduzia para níveis iguais ou até inferior os valores controle³⁷.

Khaksari, *et al.* (2015) em um modelo de lesão cerebral traumática mostrou um aumento significativo do edema encefálico após a injúria, mas o tratamento com E2 atenuou significativamente esse aumento do edema pós injúria. Em adição a esses efeitos, a lesão traumática induziu redução do RNAm e proteico do receptor ER α no tecido cerebral, ao passo que o tratamento com E2 aumentou significativamente tanto os níveis do RNAm como dos níveis proteicos do receptor ER α . Em relação aos níveis do receptor ER β , os autores mostraram que a lesão traumática promovia uma redução nos níveis do RNAm, mas que o tratamento com E2 recuperava os níveis do RNAm do receptor ER β para níveis próximos aos valores controle. Com isso, os autores concluíram que o tratamento com E2 estimulava a expressão dos ER em conjunto com os efeitos neuroprotetores do E2, sugerindo que a expressão gênica participa dos efeitos protetores dos estrogênios³⁸.

Regiões rostro-ventro-lateral, núcleo do trato solitário e efeito dos estrogênios no controle dessas áreas

No hipotálamo, uma área específica constituída por pequenos neurônios é denominada células parvocelulares, que se localizam nos núcleos paraventriculares (PVN), esses neurônios parvocelulares se projetam para eminência mediana, tronco encefálico e coluna espinhal³⁹. Nas células parvocelulares, os neurônios pré-simpáticos projetam diretamente para a coluna intermediolateral da medula espinhal onde núcleos pré-ganglionares simpáticos se concentram ou se projetam indiretamente para a região rostro-ventro-lateral (RVLM) do bulbo para influenciar as vias simpáticas de saída do controle cardiovascular⁴⁰.

O RVLM contém neurônios vasomotores, que regulam de forma tônica e fásica o tônus vasomotor⁴¹. Semelhante a outros neurônios, os canais de potássio controlam a atividade de disparo dos neurônios tanto parvocelulares como do RVLM^{42,43}. Estudos têm

demonstrado que a corrente transiente para o exterior de potássio (I_A) desempenha um papel importante no controle da excitabilidade da membrana e dos disparos dos neurônios do PVN-RVLM e que contribuem para a remodelação excitação neuronal em condições patológicas^{42,44}. Uma extensa rede neural, incluindo a região rostro-ventro-lateral do bulbo, núcleo do trato solitário (NTS) e hipotálamo está envolvido na geração, manutenção e regulação da atividade nervosa simpática⁴¹. Considerável evidências experimental sugerem que o RVLM desempenha um papel crucial na geração do tônus vasomotor simpático, o qual mantém a pressão arterial de repouso. Dados anatômicos e eletrofisiológico indicam que o tônus de saída vasomotor simpático do RVLM é mediado através de projeções bulbo-espinhal direto para o núcleo autonômico intermediolateral na medula espinal. Embora a ativação RVLM aumente a pressão basal, lesão bilateral ou inibição do RVLM reduz a pressão arterial para níveis que se assemelham às produzidas por transecção medular^{45,46,47}. Os neurotransmissores associados a essas interações incluem, pelo menos, adrenalina e glutamato^{45,47,48,49,50,51}.

O barorreflexo arterial é um mecanismo homeostático fundamental que fornece um feedback negativo rápido para amortecer as flutuações nos parâmetros cardiovasculares induzidas por agressões ambientais. Como parte do circuito do barorreflexo, os eferentes simpáticos vasomotores da RVLM também são modulados por *inputs* do NTS^{41,52}. Neurônios glutamatérgicos decorrentes do NTS excita neurônios na medula caudal ventrolateral (CVLM)^{53,54}. Por sua vez, os neurônios GABAérgicos do CVLM inibem os neurônios simpáticos no RVLM, que se projetam para os neurônios pré-ganglionares simpáticos e oferecem a maior unidade vasomotora de tônus simpático^{55,56,57}. Impulsionada por barorreceptores excitatório dos nervos aferentes, o NTS normalmente fornece uma poderosa influência tônica inibitória no tônus vasomotor simpático e pressão arterial^{55,56,57}.

Estudos avaliando o efeito dos estrogênios nessas regiões importantes para o controle da pressão arterial e do tônus simpáticos mostraram que o RVLM e o tronco encefálico são controlados pelos estímulos gênicos ou não gênicos dos estrogênios. Isto por que, usando técnicas de estudos com imuno-histoquímica e hibridização *in situ*, já foi determinado que dentro do tronco encefálico, tanto o RNAm dos receptores ER⁵⁸ como proteínas^{58,59,60} são expressos em neurônios do RVLM, tornando esta região um forte candidato para sofrer as ações regulatórias dos estrogênios no controle cardiovascular central. Em ratas ovariectomizadas tratadas com E2, mas não em ratos machos a injeção periférica de E2 diminui o tônus simpático e a pressão arterial sistólica (SAP). Sendo que esses efeitos são antagonizados por injeção central de antagonista seletivos dos ER^{61,62}. Wang e He

(2002) estudando os efeitos do E2 na atividade elétrica dos neurônios do RVLM e avaliando a pressão arterial, frequência cardíaca e descarga espontânea desses neurônios observaram que a injeção intracarotídea de E2 diminuiu a taxa de disparo dos neurônios do RVLM, sem alteração na pressão arterial e na frequência cardíaca. No entanto, o pré-tratamento com L-NAME, um inibidor de óxido nítrico (NO) sintase, atenuou significativamente o efeito inibitório de E2. Além disso, o doador de NO (3-morpholinosydnonimine -SIN-1) potencializou o efeito de E2. Estes resultados sugerem que E2 podem inibir a atividade elétrica espontânea dos neurônios do RVLM, mediado pela ativação da NOS com o produto resultante da liberação de NO por meio de ações não genômicas⁶³.

Shih (2010) mostrou um ativo papel do receptor-ER β no RVLM na regulação cardiovascular. Este autor mostrou que tanto o E2 como o agonista do receptor-ER β diminuem a SAP e os componentes vasomotores de espectro da SAP de forma dose-dependente, enquanto agonista do receptor-ER α não altera esses parâmetros hemodinâmicos. Este autor ainda mostrou que os efeitos depressivos cardiovasculares do ER β no RVLM dependem da estimulação da iNOS e da produção de óxido nítrico (NO)⁶⁴. Corroborando esses dados de Shih, posteriormente Wu *et al.* (2012) testando a hipótese de que a ativação do receptor-ER β no RVLM participa na regulação das funções cardiovasculares através de mecanismos não genômicos, mostrou que o E2 no RVLM evoca efeitos vasopressoras através da ativação de ER β , mas não ER α , pela ativação da cascata de sinalização intracelular da proteínas PI3K e Akt⁶⁵.

Em adição a esses efeitos dos estrogênios, estudos mostram que níveis de estrogênios regulam a transcrição de Kv4.2 ou Kv4.3 em vários tecidos, tais como o coração. Kv4.2 ou Kv4.3 são canais de potássio voltagem-dependentes que controlam corrente transiente para o exterior de potássio (I_A)⁶⁶. Segundo Stern *et al.* (2003) os receptores de estradiol, especialmente o receptor ER β , é substancialmente expresso nos neurônios PVN-RVLM, sugerindo papéis específicos de E2 nos neurônios PVN-RVLM⁶⁷. Corroborando com esses dados prévios, Lee *et al.* (2013), mostraram que o E2 significativamente regula negativamente a expressão de RNAm de Kv4.2, mas não a de Kv4.3 no RVLM, diminuindo e regulando assim a densidade da corrente I_A ⁶⁸.

Poucos artigos associam os efeitos dos estrogênios para combater o estresse oxidativo nas regiões do tronco encefálico, especificamente no NTS. Se procurado no pubmed utilizando os descritores “*NTS and estradiol or estrogens and oxidative stress or ROS*” até o presente momento não tem nenhuma publicação vinculada. Já em relação ao RVLM, utilizando também esses descritores e alguns dos critérios, apenas 3 artigos foram

encontrados, sendo que 2 desses artigos foram publicados antes de 2010 e são do mesmo grupo de pesquisa. Apesar de não estar dentro da janela temporal que utilizamos ainda assim, apresentaremos para podermos ter mais base para discussão.

Dados da literatura, mostraram que os neurônios do RVLM estão sob a influência das $ERO_{(S)}$ e que níveis elevados de $ERO_{(S)}$ podem promover aumento da atividade simpática e consequentemente indução de hipertensão^{69,70}. Wang *et al.* (2008) avaliando a diferença de sexo em relação ao risco de doenças cardiovasculares, verificou que no RVLM de fêmeas existe uma maior expressão dos receptores AT1 (receptor de angiotensina II), uma menor expressão de p47 phox (subunidade catalítica da NADPH oxidase, responsável pela formação de ânion superóxido) e que em neurônios de fêmeas a corrente de cálcio via canal de cálcio tipo-L era maior do que nos neurônios dos machos; com isso os autores concluíram que apesar de no RVLM de fêmeas expressar mais AT1, em contrapartida a expressão de p47phox era bem reduzida e que elevados níveis de angiotensina II regulava o fluxo de cálcio de forma distinta entre os sexos⁷¹. Posteriormente, Pierce *et al* (2009), também estudando a distribuição dos receptores AT1 e da p47phox nos neurônios adrenérgicos do RVLM, verificou uma distribuição diferenciada entre machos e fêmeas em relação aos níveis de AT1 e p47phox, onde fêmeas apresentavam significativamente mais AT1 na membrana e significativamente menos p47phox tanto na membrana quanto no citosol, sugerindo que essa diferença poderia refletir na capacidade de produzir $ERO_{(S)}$ ⁷².

Interessantemente, Subramanian *et al.* (2011), conduzindo um estudo com ratas intactas (com níveis normais de E2) e tratamento de E2 mostrou que o tratamento crônico por 90 dias com E2 induz aumento da pressão arterial sistólica, diastólica, da frequência cardíaca, acompanhado como o aumento na produção de ânion superóxido no RVLM. Vale chamar a atenção que esse estudo difere de todos os outros por que foi o único conduzido em ratas intactas, ou seja, ratas que apresentavam concentrações de E2 normais. Dessa forma, o tratamento adicional elevou em 37,5% os níveis normais de E2, podendo ser devido a esse nível elevado de E2 os efeitos contraditórios⁷³.

Considerações finais

Os efeitos dos estrogênios contra diversos tipos de lesões são ainda uma grande fonte de estudos e discussões, entretanto os efeitos, aparentemente, estão associados a dose administrada, duração do tratamento e ao período em que foi iniciado o tratamento. Inúmeros relatos postulam que os estrogênios parece atuar como antioxidante, entretanto alguns estudos

mostram que a terapia de reposição hormonal falha ou ainda induz câncer em alguns órgãos. Por isso, mais estudos, tanto com estradiol como com fitoestrogênios, são importantes para ampliar o conhecimento sobre os efeitos protetores dos estrogênios em regiões cerebrais e também em tecidos periféricos.

Apesar disso, é tentador especular que os estrogênios, principalmente o estradiol confere às fêmeas, no período fértil, uma maior proteção contra diversos tipos de injúrias do que aos machos. É possível que essa proteção conferida pelos estrogênios constitua uma estratégia da natureza para manutenção e perpetuação das espécies, pois, é mais fácil manter as espécies se tivermos apenas 5 fêmeas e 1 só macho do que o inverso.

Tabela 1: Efeito neuroprotetor dos estrogênios

Autores/ Ano	Tratamento	Efeito	Tecido
Bellanti <i>et al.</i> (2013)	Terapia de reposição hormonal	Aumento da expressão das enzimas antioxidantes	Sangue
Baba <i>et al.</i> (2010)	Menopausa	Aumenta o risco de AVC	-----
De Marinis <i>et al.</i> (2013)	Cultura de célula tratada com E2, de camundongos machos	Diminui os efeitos deletérios do H2O2 e aumenta a expressão de neuroglobina (NGB)	Astrocitos corticais
Bernal-Mondragón, <i>et al.</i> (2013)	Ovariectomia + E2	Aumenta o estresse oxidativo Bioenergética mitocondrial	Hipocampo
Evesen <i>et al.</i> (2013)	Ovariectomia + E2 Genisteína	Diminui o estresse oxidativo, aumenta o estatus total antioxidante e aumenta atividade da GPx	Todo o Cérebro (menos cerebelo)
Castro <i>et al.</i> (2013)	Ovariectomia + E2 Coumestrol	Diminui o estresse oxidativo, aumenta atividade antioxidante	Todo o cérebro
Rao <i>et al.</i> (2011)	Fêmeas 5-9 dias de idade + E2	Aumenta a SOD 1	Neurônios corticais
Sandhir <i>et al.</i> (2014)	Ovariectomia	Diminui os níveis de NADH, a razão GSH/GSSG, SOD e CAT.	Todo o cérebro
Pourganji, <i>et al.</i> (2014)	Ovariectomia	Aumenta o níveis de MDA e reduz as concentrações dos Tiol totais	Hipocampo

Misiak <i>et al.</i> (2010)	Diferença de gêneros	Machos produzem mais ERO _(s)	Neurônios Mesencefálicos
Campos, <i>et al.</i> (2012)	Rato macho adulto tratados com E2	Impediu a perda de neurônios dopaminérgicos e aumento dos níveis de proteína GDNF	Substância Negra, Corpo Estriado
Harish <i>et al.</i> (2011)	Diferença de gêneros	Mulher tem mais GSH	Córtex, Cerebelo, Bulbo, Substância Negra, Hipocampo
Martins, <i>et al.</i> (2012)	Ovariectomia	Aumenta o estresse oxidativo	Hipocampo, Estriado, Córtex, Cerebelo
Khaksari, <i>et al.</i> (2015)	Ovariectomia + E2	Diminui edema pós traumático; aumenta a expressão de ER α e ER β	Encéfalo
Saleh e Connel (1999)	Rato macho adulto tratados com E2	Diminui tônus simpático e pressão arterial sistólica	Sistêmico
Saleh e Connel (2000)	Rato macho adulto tratados com E2	Diminui tônus simpático e pressão arterial sistólica	Sistêmico
Wang e He (2002)	E2 em machos	Diminuição da taxa de disparo nos neurônios do RVLM, aumento da expressão da NOS, sem diferença em pressão arterial e frequência cardíaca	RVLM
Shih (2009)	Rato macho adulto + E2	Diminui pressão arterial sistólica, aumenta a expressão de iNOS e produção de NO	RVLM
Wu <i>et al.</i> (2012)	Rato macho adulto + E2	Aumenta expressão de ER β , ativa PI3K e AKT	RVLM
Lee <i>et al.</i> (2013)	Ovariectomia + E2	Diminui a expressão de Kv4.2 e da corrente I _A	RVLM
Wang <i>et al.</i> (2008)	Diferença de gênero	Fêmeas tem mais expressão de AT1, menor expressão de p47phox	RVLM
Pierce <i>et al.</i> (2009)	Diferença de gênero	Fêmeas tem mais expressão de AT1, menor expressão de p47phox	RVLM
Subramanian <i>et al.</i> (2011)	E2 em fêmeas intactas	Aumenta a pressão arterial sistólica, diastólica e a produção de ERO _(s)	RVLM

17/12/2015

GetFileAttachment (1950x2783)



GRUPO EDITORIAL MOREIRA JR.

São Paulo, 14 de dezembro de 2015.

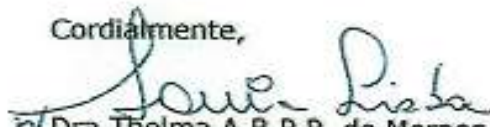
Ilma.Sra.
 Dra. Cláudia Jacques Lagranha
Vitória de Santo Antão - PE

Prezada Dra.Claudia:

Queremos, através desta, informar que o artigo intitulado: "**EFEITO NEUROPOTETOR DOS ESTROGÊNIO: COMBATE AO ESTRESSE OXIDATIVO**", de autoria das Dras.: Shirley Maria de Sousa, David Filipe de Santana, Mariana Pinheiro Fernandes e Claudia Jacques Lagranha, foi **aprovado** pelo Conselho Editorial da **Revista Brasileira de Medicina**, e sua publicação seguirá uma ordem cronológica de aprovação de artigos.

Sempre ao seu inteiro dispor, subscrevemo-nos.

Cordialmente,


 Dra. Thelma A.B.P.P. de Moraes
 Editora
redacao@moreirajr.com.br

RUA PRINCÍPIO DA REPÚBLICA, 493 - CEP 04534-000 - SÃO PAULO - SP - FONE: (011) 3884-9611 - FAX: (011) 3884-9693
 E-MAIL: editorial@moreirajr.com.br - WEB SITE: www.moreirajr.com.br



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-920 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8040 / 2126 8251
fax: (55 81) 2126 8353
www.ccb.ufpe.br

Recife, 10 de julho de 2014.

Ofício nº 25/14

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: Prof.ª **Claudia Jacques Lagranha**
Núcleo de Educação Física e Ciências do Esporte
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.017806/2014-62

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, "Desnutrição protéica Repercussões no tronco encefálico de fêmeas."

Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos parecer favorável aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério; Animais: rato heterogênico;
Linhagem: Wistar; Sexo: macho e fêmea; Peso: 240g;
Número de animais previsto no protocolo: 72.

Atenciosamente,

Barcelo