

**UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**LIRAGLUTIDA MELHORA O ESTRESSE OXIDATIVO CARDÍACO E  
REDUZ A PRESSÃO ARTERIAL DE RATAS ESPONTANEAMENTE  
HIPERTENSAS EM MODELO PRÉ-CLÍNICO DE MENOPAUSA**

**WEDSON CORREA DOS SANTOS**

**VILA VELHA**  
**JULHO / 2021**

**UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**LIRAGLUTIDA MELHORA O ESTRESSE OXIDATIVO CARDÍACO E  
REDUZ A PRESSÃO ARTERIAL DE RATAS ESPONTANEAMENTE  
HIPERTENSAS EM MODELO PRÉ-CLÍNICO DE MENOPAUSA**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção do grau de Mestre (a) em Ciências Farmacêuticas.

**WEDSON CORREA DOS SANTOS**

**VILA VELHA**  
**JULHO / 2021**

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

S2371 Santos, Wedson Correa dos.  
Liraglutida melhora o estresse oxidativo cardíaco e reduz a pressão arterial de ratas espontaneamente hipertensas em modelo pré-clínico de menopausa / Wedson Correa dos Santos . – 2021. 68 f. : il.

Orientadora: Girlandia Alexandre Brasil Amorim.  
Coorientadora: Nazaré Souza Bissoli.  
Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Vila Velha, 2021.  
Inclui bibliografias.

1. Farmacologia e terapêutica. 2. Menopausa. 3. Estresse oxidativo. 4. Hipertensão. I. Brasil, Girlandia Alexandre II. Nazaré Souza Bissoli. III. Universidade Vila Velha. IV. Título.

CDD 615

WEDSON CORREA DOS SANTOS

LIRAGLUTIDA MELHORA O ESTRESSE OXIDATIVO CARDÍACO  
E REDUZ A PRESSÃO ARTERIAL DE RATAS  
ESPONTANEAMENTE HIPERTENSAS EM MODELO PRÉ-  
CLÍNICO DE MENOPAUSA

Dissertação apresentada à  
Universidade Vila Velha, como pré-  
requisito do Programa de Pós-  
graduação em Ciências  
Farmacêutica, para a obtenção do  
grau de Mestre em Ciências  
Farmacêuticas.

Aprovada em 29 de JULHO de 2021,

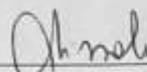
Banca Examinadora:



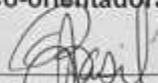
Dra. Ewelyne Miranda de Lima (UVV)



Dr. Antônio Ferreira de Melo Junior (MULTIVIX)



Dra. Nazaré Souza Bissoli (UFES)  
Co-orientadora



Dra. Girlandia Alexandre Brasil Amorim – (UVV)  
Orientadora

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus pelas bênçãos e pelas forças que tem me dado no decorrer da minha caminhada acadêmica.

Agradeço também a minha família pelo apoio que me tem dado, desde a graduação até este momento, serei eternamente grato.

Agradeço imensamente à minha orientadora Girlandia, por ter me possibilitado ingressar no mestrado. Por tantas vezes que não mediu esforços em me ajudar. Sou muito grato por cada momento que me ensinou, auxiliou e me confortou nas horas difíceis. Agradeço também os professores Tadeu e Ewelyne pelas inúmeras contribuições que tiveram em minha formação, também serei eternamente grato. Como também agradeço também a equipe do LabCardio-UVV, sem vocês eu certamente não chegaria até aqui.

Agradeço também a professora Nazaré por ter aberto as portas do seu laboratório para que eu pudesse realizar os protocolos. Muito obrigado por ter confiado em mim para executar este projeto. Obrigado por todos os momentos que separou para me ensinar, levarei para toda minha vida. Sou muito grato também a toda a equipe do LHE-UFES, muito obrigado, pelas inúmeras vezes que contribuíram para que essa pesquisa fosse realizada.

Quero também agradecer os meus amigos, não colocarei os nomes, pois são bastantes os que sempre tiveram um ombro e palavra amiga nos momentos difíceis e de alegria.

Agradeço também a CAPES e a FAPES pelo auxílio financeiro para que esta pesquisa fosse realizada.

## **SUMÁRIO**

<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>11</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>13</b>
<b>OBJETIVO GERAL</b>	<b>12</b>
<b>2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>12</b>
<b>CAPÍTULO I</b>	<b>14</b>
<b>1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	<b>15</b>
<b>1.1 Hormônios sexuais femininos e sistema cardiovascular</b>	<b>15</b>
<b>1.2 Liraglutida</b>	<b>18</b>
<b>1.3 Liraglutida e sistema cardiovascular</b>	<b>20</b>
<b>1.4 Efeitos antioxidantes da liraglutida</b>	<b>22</b>
<b>2 REFERÊNCIAS</b>	<b>25</b>
<b>CAPÍTULO II</b>	<b>31</b>
<b>ARTIGO A SER SUBMETIDO À REVISTA: LIFE SCIENCE</b>	<b>32</b>
<b>APÊNDICE</b>	<b>55</b>



## RESUMO

SANTOS, W. C., M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, julho de 2021. **Liraglutida melhora o estresse oxidativo cardíaco e reduz a pressão arterial de ratas espontaneamente hipertensas em modelo pré-clínico de menopausa.**

Orientador(a): Dra. Girlandia Alexandre Brasil Amorim; Co-orientador(a): Dra. Nazaré Souza Bissoli.

**Introdução:** A liraglutida (LIRA) é um análogo do peptídeo 1 semelhante ao glucagon (GLP-1) usado no tratamento do Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) e controle da obesidade, apesar do seu amplo uso na prática clínica, pouco se sabe sobre os efeitos benéficos da LIRA no sistema cardiovascular de fêmeas no período pós-menopausa.

**Objetivo:** Avaliar os efeitos do tratamento crônico com LIRA na performance cardíaca e o estresse oxidativo em ratas SHR em um modelo pré-clínico de menopausa.

**Métodos:** Foram utilizadas ratas SHR (150-200g) separadas aleatoriamente em 3 grupos (n=8 cada): SHAM (S) e ovariectomizadas (O) ambos foram tratadas com solução salina (NaCl 0.9%) e o grupo ovariectomizadas + LIRA (OL; liraglutida 0,6 mg/kg/s.c) uma vez ao dia por 4 semanas, seguido de 0,6 mg/kg/s.c duas vezes ao dia por mais quatro semanas. A pressão arterial sistólica (PAS) foi medida semanalmente por pletismografia de cauda. Os parâmetros hemodinâmicos (PAD, PAS, PAM e PSVE) foram avaliados ao final do protocolo, diretamente no ventrículo esquerdo (VE). A gordura inguinal, perirrenal e retroperitoneal foi pesada para avaliação do ganho/perda de gordura visceral. O coração foi congelado para avaliação da expressão de proteínas antioxidantes (CAT, SOD1 e SOD2) e de mobilidade de cálcio (SERCA2a e PLB) por Western blot. **Resultados:** O tratamento com LIRA foi capaz de aumentar a expressão da enzima catalase (CAT) no coração (S:  $1.288 \pm 0.2204$ ; O:  $0.8852 \pm 0.1697$ ; OL:  $1.793 \pm 0.2845$   $p=0,0428$ ), reduzir a PAS e PAM (S:  $171.0 \pm 6.2$  mmHg; O:  $183.0 \pm 3.1$  mmHg; OL:  $154.6 \pm 1.6$  mmHg  $p=0.001$ ), e reduzir a gordura perirrenal (S:  $0.01466 \pm 0.0022$ ; O:  $0.01886 \pm 0.0013$ ; OL:  $0.004653 \pm 0.0008$   $p < 0.0001$ ) e inguinal (S:  $0.033 \pm 0.0064$ ; O:  $0.06125 \pm 0.0082$ . OL:  $0.03332 \pm 0.0059$   $p < 0.0304$ ) dos animais após 60 dias. Entretanto, não houve diferença nos outros parâmetros hemodinâmicos e na expressão das proteínas de mobilidade de cálcio. **Conclusão:** A LIRA promoveu efeito antioxidante no VE dos animais, foi capaz de reduzir a pressão arterial e gordura visceral independente da função cardíaca e da

dinâmica de cálcio. Entretanto, novos estudos precisam ser realizados para elucidar os mecanismos envolvidos nesses efeitos.

**Palavras-chave:** Liraglutida; estrogênio; menopausa; GLP-1; estresse oxidativo; Hipertensão.

## ABSTRACT

SANTOS, W. C., M.Sc, University of Vila Velha – ES, July de 2021. **Liraglutide improves cardiac oxidative stress and reduces blood pressure in spontaneously hypertensive female rats in a preclinical menopausal model.** Advisor: Dra. Girlandia Alexandre Brasil Amorim; Co-advisor: Dr. Nazaré Souza Bissoli.

**Introduction:** Liraglutide (LIRA) is a glucagon-like peptide 1 (GLP-1) analogue used in the treatment of type 2 Diabetes Mellitus (DM2) and obesity control, despite its wide use in clinical practice, little is known about the beneficial effects of LIRA on the cardiovascular system of postmenopausal females. **Objective:** To evaluate the effects of chronic treatment with LIRA on cardiac performance and oxidative destitis in SHR rats in a preclinical model of menopause. **Methods:** SHR rats (150-200g) were randomly separated into 3 groups (n=8 each): SHAM (S) and ovariectomized (O) both were treated with saline solution (NaCl 0.9%) and the group ovariectomized + LIRA (OL; liraglutide 0.6 mg/kg/sc) once daily for 4 weeks, followed by 0.6 mg/kg/sc twice daily for another four weeks. Systolic blood pressure (SBP) was measured weekly by tail plethysmography. Hemodynamic parameters (DBP, SBP, MBP and PSVE) were evaluated at the end of the protocol, directly in the left ventricle (LV). Inguinal, perirenal and retroperitoneal fat were weighed to assess visceral fat gain/loss. The heart was frozen to evaluate the expression of antioxidant proteins (CAT, SOD1 and SOD2) and calcium mobility (SERCA2a and PLB) by Western blot. **Results:** Treatment with LIRA was able to increase the expression of the enzyme catalase (CAT) in the heart (S:  $1,288 \pm 0.2204$ ; O:  $0.8852 \pm 0.1697$ ; OL:  $1793 \pm 0.2845$  p=0.0428), reduce SBP and PAM (S:  $171.0 \pm 6.2$  mmHg; O:  $183.0 \pm 3.1$  mmHg; OL:  $154.6 \pm 1.6$  mmHg p=0.001), and to reduce perirenal fat (S:  $0.01466 \pm 0.0022$ ; O:  $0.01886 \pm 0.0013$ ; OL:  $0.004653 \pm 0.0008$  p <0.0001) and inguinal (S:  $0.033 \pm 0.0064$ ; O:  $0.06125 \pm 0.0082$ . OL:  $0.03332 \pm 0.0059$  p <0.0304) of the animals after 60 days. However, there was no difference in the other hemodynamic parameters and in the expression of calcium mobility proteins. **Conclusion:** LIRA promoted an antioxidant effect on the LV of animals, was able to reduce blood pressure and visceral fat independent of cardiac function and calcium dynamics. However, further studies need to be carried out to elucidate the mechanisms involved in these effects.

**Palavras-chave:** Liraglutide; estrogen; menopause; GLP-1; oxidative stress; hyper

## 1. INTRODUÇÃO

A menopausa é a cessação permanente da menstruação resultante da deficiência de estrogênio, essa situação ocorre na mulher geralmente próximo dos 50 anos de idade (Peacock & Ketvertis, 2021), esta situação está associada a um aumento significativo do risco de doenças cardiovasculares (Hormones, 2019).

O estrogênio endógeno além dos seus efeitos nos tecidos reprodutivos possui ainda vários efeitos na função cardiovascular, uma vez que ele promove redução dos lipídeos plasmáticos, aumento da síntese de NO vascular, melhorar a sensibilidade a insulina entre outros efeitos (Murphy et al., 2011). Todos esses efeitos favorecem a redução dos eventos cardiovasculares observados nas mulheres pré-menopausa, quando comparado aos homens na mesma idade, sendo essa etapa da vida um marco cardiovascular significativo em termos de fisiologia e fisiopatologia (Hayward et al., 2000; Colafella & Denton, 2018). Deste modo, muito se tem discutido sobre o benefício das terapias de reposição hormonal (TRH) no sistema cardiovascular, sendo seu uso ainda controverso. Assim, a busca por novas alternativas terapêuticas, que tragam benefício cardiovascular sem as implicações deletérias da TRH é importante (Thaung Zaw et al., 2018).

Assim, os estudos com as incretinas, que são hormônios produzidos pelos enterócitos frente a chegada de nutrientes e modulam o metabolismo da glicose, entre outros (Nauck; Meier, 2018), vem crescendo como alternativa terapêutica para a diabetes e obesidade e elas tem mostrado resultados cardiovasculares promissores (Kyriakos et al., 2020). Nesse sentido das incretinas estudadas, os agonistas do receptor do (GLP-1) como a Liraglutida (LIRA), tornaram-se populares e mais amplamente utilizadas (Rizzo et al., 2018).

A LIRA é um medicamento da classe das incretinas, desenvolvido a partir do GLP-1 humano é usado como uma opção terapêutica para o tratamento de alterações glicêmicas e/ou DM2. Essa droga age como agonista dos receptores do GLP-1 (GLP-1R; Agersù et al., 2002) que é expresso em diversos tecidos como o pâncreas, no trato gastrointestinal, coração, pulmão, rins e cérebro (Wei & Mojsov, 1995; Clarke et al., 2018).

Nos tecidos extra pancreáticos, o GLP-1 parece modular o tônus vascular, uma vez que seus receptores são encontrados nas células endoteliais coronarianas e no

músculo liso vascular, onde ele promove a produção de óxido nítrico (NO) e, conseqüentemente, vasodilatação (Gutniak et al., 2021). Assim, apesar do conhecimento sobre os efeitos da LIRA no sistema cardiovascular (SCV), pouco se sabe sobre os seus efeitos nas mulheres e, especialmente, no período pós-menopausa. Nossa hipótese é que o tratamento com a LIRA irá promover benefício ao SCV, melhorando a contratilidade por meio de sua ação antioxidante e, ainda, alteração nas proteínas de mobilidade de cálcio.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar os efeitos do tratamento crônico com liraglutida na performance cardíaca de ratas espontaneamente hipertensas (SHR) ovariectomizadas.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Avaliar os efeitos do tratamento crônico com liraglutida sobre:

- Parâmetros hemodinâmicos (PAS, PAD e LVSVP);
- Expressão das enzimas antioxidantes no coração (SOD1, SOD2 e catalase);
- Expressão das proteínas da mobilidade de cálcio no coração (SERCA2a e PLB);
- Ganho de peso e hipertrofia de órgãos;
- Glicemia em jejum e teste de tolerância a glicose (TTG);

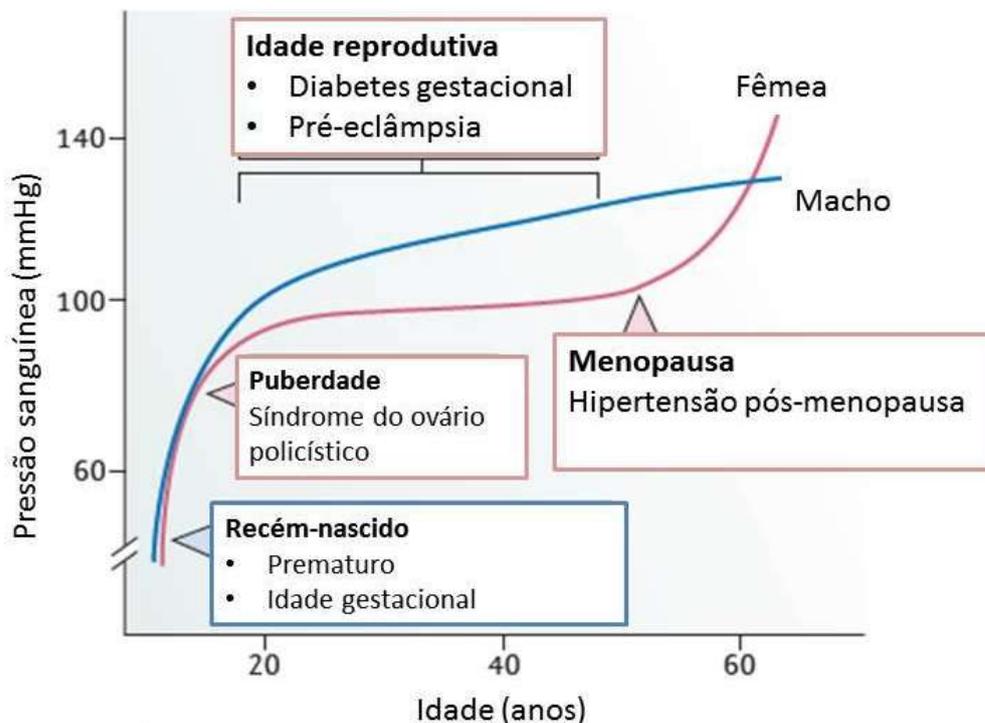
# CAPÍTULO I





**Figura 01. Painel A:** Estrutura e produção de estrogênio endógeno. **Painel B:** Síntese ovariana, transporte e metabolismo do estrogênio (modificado de Gruber et al., 2002).

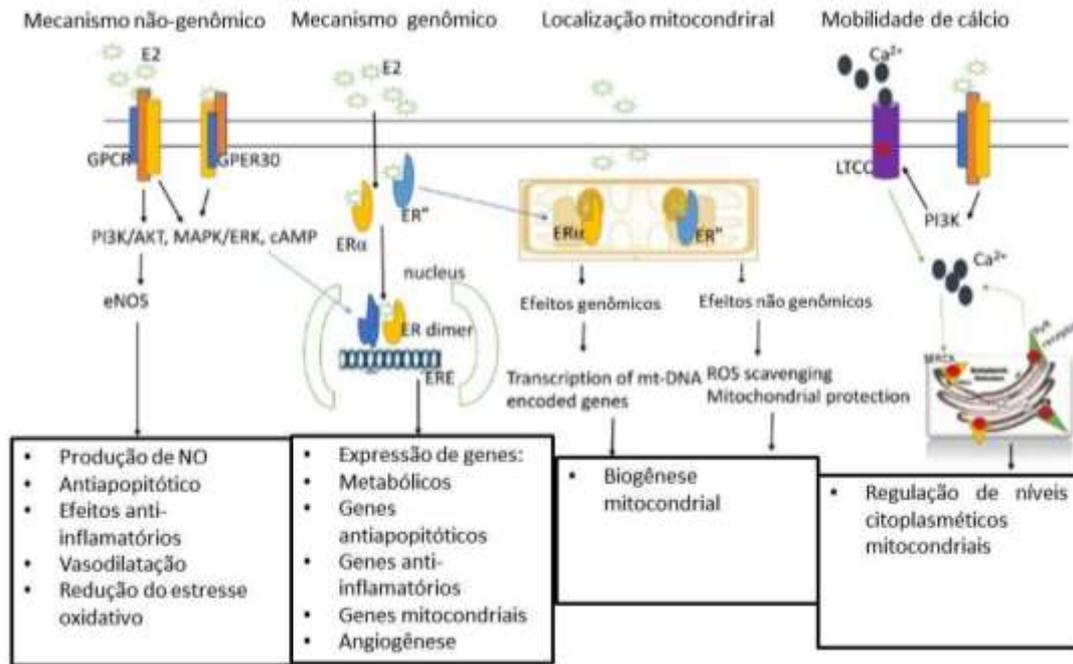
Diversos estudos demonstram que os estrógenos, especialmente o E2, possuem efeito cardioprotetor (Ren et al., 2003; Chu et al., 2006) sendo observado aumento do risco cardiovascular após a menopausa (Figura 2; Crosignani et al., 2006). Estudos já demonstraram o prejuízo da função vascular em modelo animal de ratas com a deficiência estrogênica por ovariectomia, com aumento de componentes de estresse oxidativo e inflamação, levando a redução da capacidade de relaxamento vascular (Caliman et al., 2013; Oliveira et al., 2014; Lamas et al., 2015), além de prejuízo da contratilidade cardíaca (Dalpiaz et., 2015).



**Figura 02.** Demonstração esquemática das alterações da pressão arterial entre homens e mulheres durante a vida. Após a menopausa as vias de cardioproteção diminuem e a pressão arterial (PA) aumenta (modificado de Colafella & Denton, 2018).

A cardioproteção promovida pelo E2 parece estar relacionada a modulação da pressão arterial, promovida especialmente pela liberação de fatores vasodilatadores derivados do endotélio e regulação do sistema renina-angiotensina (Dalpiaz et al, 2015) no endotélio e no tecido cardíaco. Nas células, o E2 liga-se ao

seu receptor intracitoplasmático e modulam ações genômicas e não-genômicas (Figura 03) promovendo aumento da produção de óxido nítrico (NO), aumento da expressão de genes anti-inflamatórios, e redução de estresse oxidativo (Kodogo et al., 2019).



**Figura 03.** Efeitos genômicos e não-genômicos do estrogênio nas células cardíacas (modificado de Kodogo et al., 2019).

No coração, a ação hormonal protetiva do E2 na contratilidade miocárdica, ocorre pela regulação da homeostase de cálcio intracelular, promovida por mecanismos genômicos e não-genômicos (Chu et al, 2006; Bupha-Intr et al, 2006; Paigel et al, 2011; Dalpiaz et al, 2015). O estrogênio modifica a função contrátil mediado pela regulação de  $\text{Ca}^{2+}$  conferindo uma cardioproteção, como também a perda da regulação está associada a disfunção cardíaca (Alecrin et al., 2004; Chu et al., 2006).

Além desses efeitos, há evidências de que a falta dos estrógenos promove hipertensão, aumento do sistema renina angiotensina, inflamação e aumento do estresse oxidativo (Thaung Zaw et al., 2018; Tikhonoff et al., 2019; Montoya-estrada et al. 2020; Bourgonje et al. 2020) e, comumente, levam ao surgimento de insuficiência cardíaca (Zhao, Di et al. 2020; Pelzer et al. 2005). Nesse sentido, a deficiência dos hormônios sexuais femininos a longo prazo leva a redução da contratilidade cardíaca

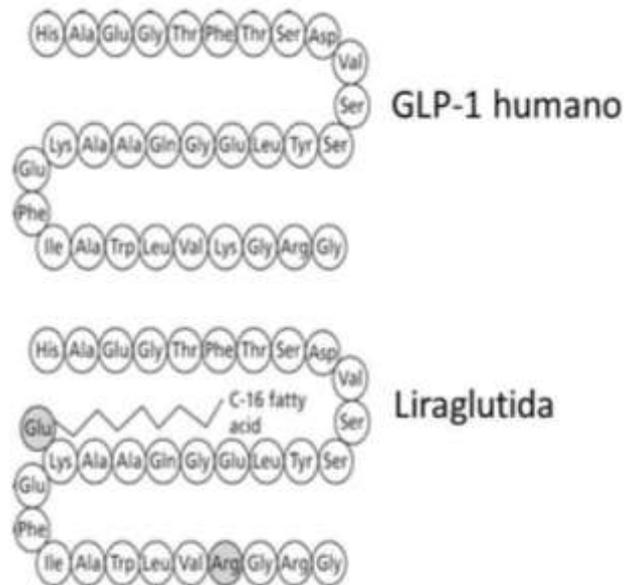
(Pines et al, 1992), que pode estar associada a alterações na expressão de proteínas contráteis,

Sendo assim, estudos clínicos foram realizados em mulheres, assim como estudos experimentais em animais avaliando os efeitos da terapia de reposição hormonal (TRH) na progressão da doença arterial coronariana na pós-menopausa (Gompel et al, 2011). Os estudos mostram que na pós-menopausa mulheres que recebem TRH têm menor taxa de doença cardiovascular e morte cardíaca do que aquelas que não receberam a terapia (Yang & Reckelhoff et al, 2011). Contudo, apesar do papel protetor dos hormônios ovarianos, a proposta de reposição hormonal na fase pós-menopausa é tema controverso, e muitos estudos apontam para aumento de risco à saúde por sua utilização, havendo aumento no desenvolvimento de cânceres hormônio sensível, a até mesmo ao aumento de risco cardiovascular em alguns casos (Sare et a, 2008; Shook, 2011, Rossouw et, 2007). Logo, a busca por novas alternativas terapêuticas se torna crucial, nesse sentido, a LIRA surge como uma alternativa viável.

## **1.2 Liraglutida (LIRA)**

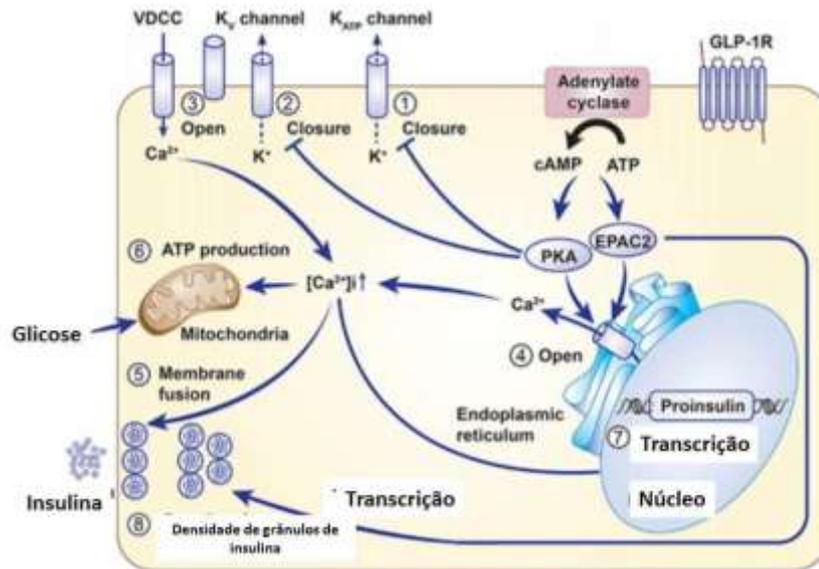
A LIRA é um análogo do hormônio “peptídeo semelhante a glucagon” (GLP-1), com ação agonista em seu receptor GLP-1R, sendo um fármaco lançado no mercado há poucos anos como opção terapêutica para o tratamento de alterações glicêmicas e/ou DM2. Além disso, bons resultados dessa medicação a tornam indicada para tratamento da obesidade (Mehta et al., 2016).

Dentre as modificações na molécula da LIRA, observamos um aumento na meia-vida plasmática do medicamento. O GLP-1 endógeno apresenta meia vida de 2 minutos após a administração intravenosa, porém a molécula da LIRA tem uma meia-vida de 13 horas após a administração subcutânea. As mudanças estruturais responsáveis pelo aumento da meia vida foi a adição de um aminoácido glutamato e uma cadeia de ácido graxo, o que permite a ligação reversível da LIRA com a albumina reduzindo, assim, a sua depuração plasmática (Figura 4; Knudsen, 2010).



**Figura 4.** Estrutura de aminoácidos de peptídeo semelhante ao glucagon-1 (GLP-1) e da liraglutida (modificado de Knudsen, 2010).

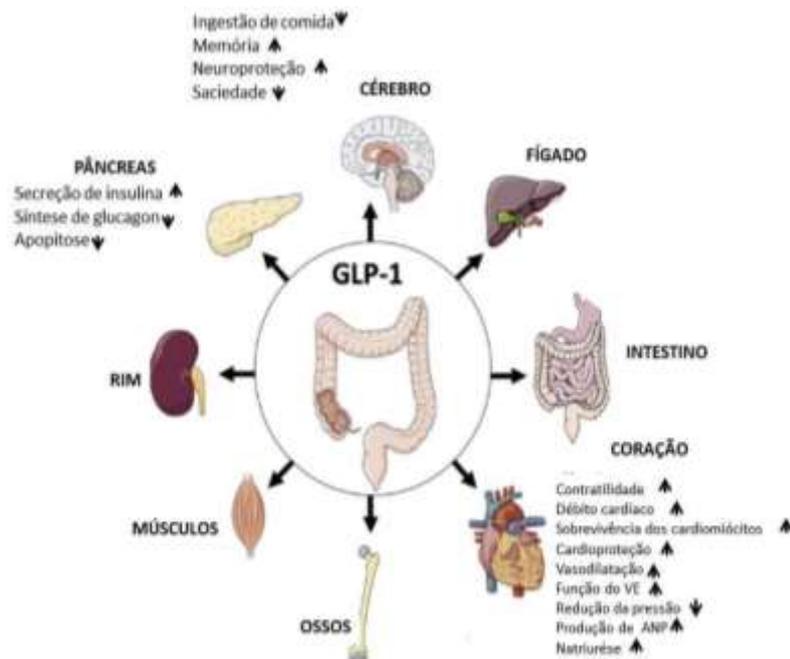
Fisiologicamente a ativação do GLP-1R promove o aumento da secreção de insulina dependente de glicose (Figura 05). Essa liberação é mediada pela ativação da adenilato ciclase e, conseqüente elevação dos níveis intracelulares de cAMP, o que leva a ativação da proteína quinase A (PKA) que, em última instância, leva a liberação das vesículas de insulina (Kalra et al., 2019). Essa liberação leva principalmente a redução da glicose sanguínea, entretanto, outros efeitos podem ser observados como o retardo no esvaziamento gástrico e a redução da absorção de triglicérides no intestino (Drucker, 2006). Além desses efeitos locais, pode-se observar um maior controle da ingestão alimentar e saciedade por ação central e periférica (Del Olmo-Garcia & Merino-Torres, 2018).



**Figura 5.** Mecanismos moleculares e efeitos do GLP-1 na produção de insulina (modificado de Kalra et al., 2019).

### 1.3 . Liraglutida e sistema cardiovascular

O GLP-1R é expresso tanto no pâncreas quanto em tecidos extra-hepáticos, como o trato gastrointestinal, coração, pulmão, rins e cérebro (Figura 6; Knudsen & Lau, 2019). Dentre os processos mediados pelo GLP-1R pode-se observar a modulação dos tónus vascular, uma vez que seus receptores são encontrados nas células endoteliais coronarianas e no músculo liso vascular, onde ele promove a produção de óxido nítrico (NO) e, conseqüente vasodilatação (Ishibashi, et a. 2010). Suas ações no SCV não se limitam aos vasos, no coração o GLP-1 promove aumento da contratilidade, do débito cardíaco, reduz da pressão sanguínea e melhora a função do ventrículo esquerdo (Müller et al., 2019).



**Figura 06.** Esquema dos efeitos metabólicos do GLP-1. Os efeitos podem ser diretos ou indiretos no metabolismo (modificado de Müller et al., 2019)

Entretanto, os efeitos nos vasos sanguíneos e, o aumento da produção de NO se destacam e, diversos estudos demonstram que eles são responsáveis pelos efeitos superiores da LIRA nos desfechos cardiovasculares dos pacientes (Mikhail, 2019). Del-Olmo e colaboradores (2018) demonstraram que a LIRA e a semaglutida, dois análogos do GLP-1 apresentam superioridade no benefício cardiovascular em pacientes com DM2 sendo, portanto, indicadas por seu efeito secundário no SCV.

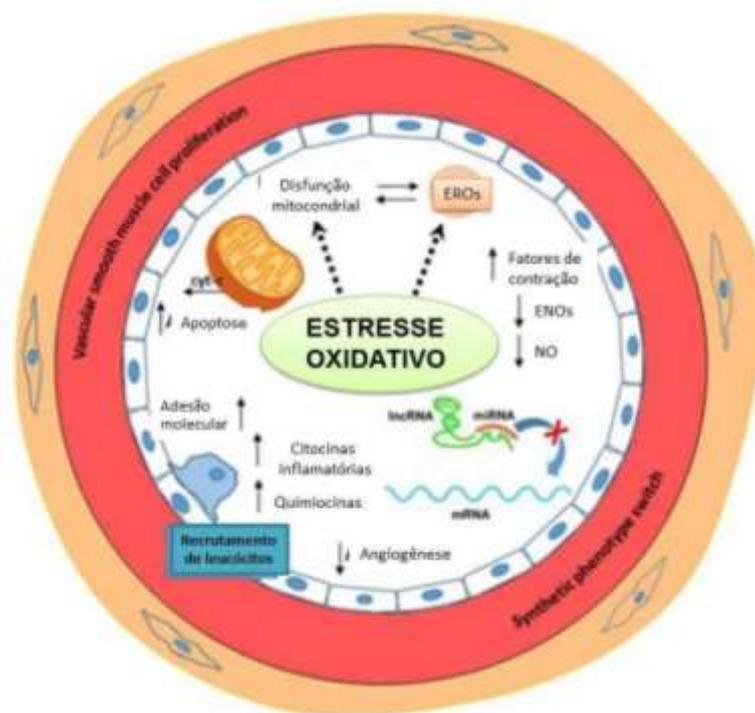
Adicionalmente, estudos utilizando modelos animais e em humanos com infarto agudo do miocárdio demonstraram melhora da performance cardíaca pelo GLP-1 (Muller, 2019). Além disso, Zhang et al., (2020) demonstrou que a LIRA possui efeito anti-inflamatório e antioxidante em cultura de cardiomiócitos o que sugere que esses poderiam ser os mecanismos dos efeitos cardíacos da LIRA. Estudo experimental realizado por Zheng et al., (2019), demonstrou que a LIRA possui efeito cardioprotetor de forma semelhante ao promovido pelo bloqueador do receptor de angiotensina 1 (AT1R) e que, ambos levam a redução da pressão arterial, atenuação da hipertrofia cardíaca e da deposição de colágeno na matriz extracelular, melhorando a função

cardíaca, sendo um potente antioxidante e reduzindo o processo inflamatório em modelo de hipertensão em rato.

#### 1.4 Efeitos antioxidantes da liraglutida

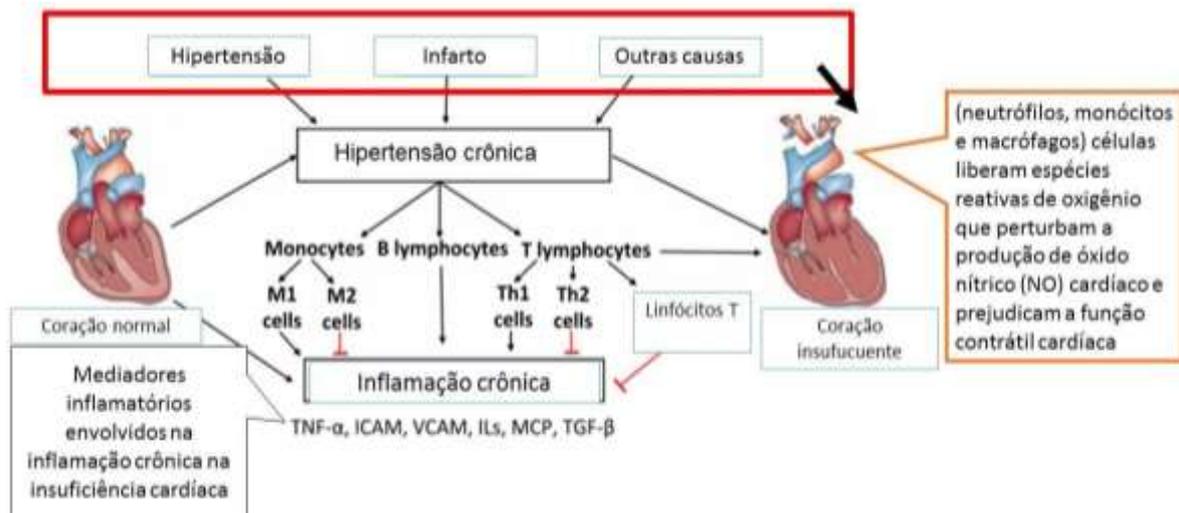
As espécies reativas de oxigênio (EROs) desempenham um papel fundamental nas doenças cardiovasculares (DCV), sendo associadas a gênese de diversas doenças crônicas como hipertensão, diabetes, insuficiência cardíaca e aterosclerose (Konior et al., 2014). Os mecanismos pelos quais os EROs levam ao desenvolvimento das DCVs estão relacionadas as mudanças moleculares promovidas, como a redução da biodisponibilidade de NO, disfunção endotelial, desenvolvimento de um estado pró-inflamatório e pró-trombótico (Scioli et al., 2020).

A inflamação, mediada pela hipertensão, induz a atividade da enzima NADPH oxidase (NOX-1) que é uma importante fonte de ânion superóxido ( $O_2^-$ ) que reage com NO e origina outros EROs prejudicando a vasodilatação mediada pelo NO (Nguyen Dinh Cat et al., 2013).



**Figura 07.** Representação esquemática dos principais mecanismos patogênicos envolvidos na disfunção endotelial (modificado de Scioli et al., 2020)

Estudos têm demonstrado a participação da LIRA como potente antioxidante, Pang et al., (2020) demonstraram que a LIRA pode reduzir espécies reativas de oxigênio (EROs) e melhorar a síntese de NO em cardiomiócitos após a hipóxia, efeitos que estão relacionados diretamente ao GLP-1R no miocárdio. Adicionalmente, a LIRA exerce efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios em células endoteliais, exercendo a regulação positiva de enzimas antioxidantes (SOD-2 e catalase), como também inibe a sinalização do NF-κB (Shiraki et al., 2012). Os efeitos benéficos cardiovasculares da LIRA são impulsionados pela sua ação anti-inflamatória e antioxidantes independente da perda de peso (Chaudhuri et al., 2012).



**Figura 08.** Ativação do sistema e inflamação crônica na insuficiência cardíaca (modificado de Shirazi et al., 2017)

Em um estudo com cultura de cardiomiócitos tratados-expostos- por IL-1 $\beta$ , mimetizando a inflamação, a LIRA foi capaz de reduzir a produção de EROs, além de proteger os cardiomiócitos da redução do potencial de membrana mitocondrial e redução de ATP independente da função cardíaca (Zhang et al., 2020).

## 2 REFERÊNCIAS

- Agersù, H., Jensen, L. B., Elbrùnd, B., Rolan, P., & Zdravkovic, M. (2002). The pharmacokinetics , pharmacodynamics , safety and tolerability of NN2211 , a new long-acting GLP-1 derivative , in healthy men.
- Bourgonje, A. R., Abdulle, A. E., Al-Rawas, A. M., Al-Maqbali, M., Al-Saleh, M., Enriquez, M. B., Al-Siyabi, S., Al-Hashmi, K., Al-Lawati, I., Bulthuis, M. L. C., Mulder, D. J., Gordijn, S. J., van Goor, H., & Saleh, J. (2020). Systemic oxidative stress is increased in postmenopausal women and independently associates with homocysteine levels. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1). <https://doi.org/10.3390/ijms21010314>
- Chaudhuri, A., Ghanim, H., Vora, M., Sia, C. L., Korzeniewski, K., Dhindsa, S., Makdissi, A., & Dandona, P. (2012). Exenatide exerts a potent antiinflammatory effect. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 97(1), 198–207. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-1508>
- Chu, S. H., Goldspink, P., Kowalski, J., Beck, J., & Schwertz, D. W. (2006). Effect of estrogen on calcium-handling proteins,  $\beta$ -adrenergic receptors, and function in rat heart. *Life Sciences*, 79(13), 1257–1267. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.03.037>
- Colafella, K. M. M., & Denton, K. M. (2018). Sex-specific differences in hypertension and associated cardiovascular disease. *Nature Reviews Nephrology*, 14(3), 185–201. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2017.189>
- Clarke, S. J., Giblett, J. P., Yang, L. L., Hubsch, A., Zhao, T., Aetesam-Ur-Rahman, M., West, N. E. J., O'Sullivan, M., Figg, N., Bennett, M., Wewer Albrechtsen, N. J., Deacon, C. F., Cheriyan, J., & Hoole, S. P. (2018). GLP-1 is a coronary artery vasodilator in humans. *Journal of the American Heart Association*, 7(22), 1–14. <https://doi.org/10.1161/JAHA.118.010321>
- Crosignani, P. G., Farley, T., Fauser, B., Glasier, A., Greer, I., Hanson, M. A., La Vecchia, C., Mishell, D., Rosano, G., Simon, T., Baird, D. T., Benagiano, G., Collins, J., Dicfalusy, E., Lanzone, A., Negri, E., Schmidt-Gollwitzer, K., Skouby, S. O., & Volpe, A. (2006). Hormones and cardiovascular health in women. *Human Reproduction Update*, 12(5), 483–497. <https://doi.org/10.1093/humupd/dml028>

- Dalpia, P. L. M., Lamas, A. Z., Caliman, I. F., Ribeiro, R. F., Abreu, G. R., Moyses, M. R., Andrade, T. U., Gouvea, S. A., Alves, M. F., Carmona, A. K., & Bissoli, N. S. (2015). Sex hormones promote opposite effects on ACE and ACE2 activity, hypertrophy and cardiac contractility in spontaneously hypertensive rats. *PLoS ONE*, *10*(5), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127515>
- Del Olmo-Garcia, M. I., & Merino-Torres, J. F. (2018). GLP-1 receptor agonists and cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes. *Journal of Diabetes Research*, *2018*. <https://doi.org/10.1155/2018/4020492>
- Drucker, D. J. (2006). *The biology of incretin hormones*. *March*, 153–165. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.01.004>
- Furukawa, T., & Kurokawa, J. (2008). Non-Genomic Regulation of Cardiac Ion Channels by Sex Hormones. *Cardiovascular & Hematological Disorders-Drug Targets*, *8*(4), 245–251. <https://doi.org/10.2174/187152908786786160>
- Gompel, A., Boutouyrie, P., Joannides, R., Christin-Maitre, S., Kearny-Schwartz, A., Kunz, K., Laurent, S., Boivin, J. M., Pannier, B., Pornel, B., Struijker-Boudier, H. A. J., Thuillez, C., Van Bortel, L., Zannad, F., Pithois-Merli, I., Jaillon, P., & Simon, T. (2011). Association of menopause and hormone replacement therapy with large artery remodeling. *Fertility and Sterility*, *96*(6), 1445–1450. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.09.010>
- Gutniak, M. K., Zhang, Q., Zhang, F., Holst, J. J., Ahre, B., Gutniak, M. K., Zhang, Q., Holst, J. J., & Ahre, B. (2021). *Effects of glucagon-like peptide-1 on endothelial function in type 2 diabetes patients with stable coronary artery disease*. 1209–1215. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00237.2004>.
- Hormones, F. E. T. (2019). Hypertension artérielle de la ménopause: dépister, traiter, accompagner, prévenir. *La Presse Médicale*, *48*(11), 1288–1294. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2019.09.050>
- Hayward, C. S., Kelly, R. P., & Collins, P. (2000). The roles of gender, the menopause and hormone replacement on cardiovascular function. *Cardiovascular Research*, *46*(1), 28–49. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(00\)00005-5](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(00)00005-5)
- Kalra, S., Das, A. K., Sahay, R. K., Baruah, M. P., Tiwaskar, M., Das, S., Chatterjee,

- S., Saboo, B., Bantwal, G., Bhattacharya, S., Priya, G., Chawla, M., Brar, K., Raza, S. A., Aamir, A. H., Shrestha, D., Somasundaram, N., Katulanda, P., Afsana, F., ... Sumanatilleke, M. (2019). Consensus Recommendations on GLP-1 RA Use in the Management of Type 2 Diabetes Mellitus: South Asian Task Force. *Diabetes Therapy*, 10(5), 1645–1717. <https://doi.org/10.1007/s13300-019-0669-4>
- Knudsen, L. B. (2010a). Liraglutide: The therapeutic promise from animal models. *International Journal of Clinical Practice*, 64(SUPPL. 167), 4–11. <https://doi.org/10.1111/j.1742-1241.2010.02499.x>
- Knudsen, L. B. (2010b). Liraglutide: The therapeutic promise from animal models. *International Journal of Clinical Practice*, 64(SUPPL. 167), 4–11. <https://doi.org/10.1111/j.1742-1241.2010.02499.x>
- Kodogo, V., Azibani, F., & Sliwa, K. (2019). Role of pregnancy hormones and hormonal interaction on the maternal cardiovascular system: a literature review. *Clinical Research in Cardiology*, 108(8), 831–846. <https://doi.org/10.1007/s00392-019-01441-x>
- Konior, A., Schramm, A., Czesnikiewicz-Guzik, M., & Guzik, T. J. (2014). NADPH oxidases in vascular pathology. *Antioxidants and Redox Signaling*, 20(17), 2794–2814. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5607>
- Kyriakos G.; Quiles-Sanchez LV, Garmpi A, Farmaki P, Kyre K, Gkogkos S, Savvanis S, Memi E. Cardiovascular and Renal Outcomes of Incretin-based Therapies: A Review of Recent Clinical Trials. *Curr Cardiol Rev.* 2020;16(4):253-257. doi: 10.2174/1573403X15666190603111056.
- Lamas, A. Z., Caliman, I. F., Dalpiaz, P. L. M., De Melo, A. F., Abreu, G. R., Lemos, E. M., Gouvea, S. A., & Bissoli, N. S. (2015). Comparative effects of estrogen, raloxifene and tamoxifen on endothelial dysfunction, inflammatory markers and oxidative stress in ovariectomized rats. *Life Sciences*, 124, 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.01.004>
- Mehta, A., Marso, S. P., & Neeland, I. J. (2016). *Liraglutide for weight management: a critical review of the evidence Obesity Science & Practice.* 9. <https://doi.org/10.1002/osp4.84>

- Meyer, M. R., Prossnitz, E. R., & Barton, M. (2011). The G protein-coupled estrogen receptor GPER / GPR30 as a regulator of cardiovascular function. *Vascular Pharmacology*, 55(1–3), 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2011.06.003>
- Mikhail N. Cardiovascular Effects of Liraglutide. *Curr Hypertens Rev.* 2019;15(1):64-69. doi: 10.2174/1573402114666180507152620.
- Montoya-estrada, A., Velázquez-yescas, K. G., Veruete-bedolla, D. B., Ruiz-herrera, J. D., Villarreal-barranca, A., Romo-yañez, J., Ortiz-luna, G. F., Arellano-eguiluz, A., Solis-paredes, M., Flores-pliego, A., Espejel-nuñez, A., Estrada-gutierrez, G., & Reyes-muñoz, E. (2020). Parameters of oxidative stress in reproductive and postmenopausal mexican women. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(5), 1–11. <https://doi.org/10.3390/ijerph17051492>
- Murphy, E. (2011). Estrogen Signaling and Cardiovascular Disease. *Circulation research*, 109(6): 1557–1558. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.236687>.
- Nauck, M. A., Perez-Tilve, D., Pocai, A., Reimann, F., Sandoval, D. A., Schwartz, T. W., ... Tschöp, M. H. (2019). Glucagon-like peptide 1 (GLP-1). *Molecular Metabolism*, 30:72–130. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.09.010>
- Nauck, M. A.; Meier, J. J. (2018). Incretin hormones: Their role in health and disease. *Diabetes Obesity Metabolism*, 1:5-21.
- Nguyen Dinh Cat, A., Montezano, A. C., Burger, D., & Touyz, R. M. (2013). Angiotensin II, NADPH oxidase, and redox signaling in the vasculature. *Antioxidants and Redox Signaling*, 19(10), 1110–1120. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4641>
- Oliveira, P. W. C., de Sousa, G. J., Caliman, I. F., Lamas, A. Z., Santos de Medeiros, A. R., de Andrade, T. U., de Abreu, G. R., de Figueiredo, S. G., & Bissoli, N. S. (2014). Metformin ameliorates ovariectomy-induced vascular dysfunction in non-diabetic wistar rats. *Clinical Science*, 127(4), 265–275. <https://doi.org/10.1042/CS20130553>
- Pang, Z., Wang, T., Li, Y., Wang, L., Yang, J., Dong, H., & Li, S. (2020). Liraglutide ameliorates COCl<sub>2</sub>-induced oxidative stress and apoptosis in H9C2 cells via regulating cell autophagy. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 3716–3722.

<https://doi.org/10.3892/etm.2020.8630>

Peacock, K., & Ketvertis, K. M. (2021). Menopause. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.

Alecrin, I. N., Aldrighi, J. M., Caldas, M. A., Gebara, O. C. E., Lopes, N. H. M., & Ramires, J. A. F. (2004). Acute and chronic effects of oestradiol on left ventricular diastolic function in hypertensive postmenopausal women with left ventricular diastolic dysfunction. *Heart*, *90*(7), 777–781.  
<https://doi.org/10.1136/hrt.2003.016493>

Chu, S. H., Goldspink, P., Kowalski, J., Beck, J., & Schwertz, D. W. (2006). Effect of estrogen on calcium-handling proteins,  $\beta$ -adrenergic receptors, and function in rat heart. *Life Sciences*, *79*(13), 1257–1267.  
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.03.037>

Ren, J., Hintz, K. K., Roughead, Z. K. F., Duan, J., Colligan, P. B., Ren, B. H., Lee, K. J., & Zeng, H. (2003). Impact of estrogen replacement on ventricular myocyte contractile function and protein kinase B/Akt activation. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, *284*(5 53-5), 1800–1807.  
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00866.2002>

Rizvi, A. A., & Cosentino, F. (2018). GLP-1 receptor agonists and reduction of cardiometabolic risk: Potential underlying mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1864*(9), 2814–2821.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.05.012>

Sare, G. M., Gray, L. J., & Bath, P. M. W. (2008). Association between hormone replacement therapy and subsequent arterial and venous vascular events: A meta-analysis. *European Heart Journal*, *29*(16), 2031–2041.  
<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehn299>

Scioli, M. G., Storti, G., D'Amico, F., Rodríguez Guzmán, R., Centofanti, F., Doldo, E., Céspedes Miranda, E. M., & Orlandi, A. (2020). Oxidative Stress and New Pathogenetic Mechanisms in Endothelial Dysfunction: Potential Diagnostic Biomarkers and Therapeutic Targets. *Journal of Clinical Medicine*, *9*(6), 1995.  
<https://doi.org/10.3390/jcm9061995>

Shiraki, A., Oyama, J. ichi, Komoda, H., Asaka, M., Komatsu, A., Sakuma, M., Kodama, K., Sakamoto, Y., Kotooka, N., Hirase, T., & Node, K. (2012). The glucagon-like peptide 1 analog liraglutide reduces TNF- $\alpha$ -induced oxidative stress and inflammation in endothelial cells. *Atherosclerosis*, *221*(2), 375–382.

<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.12.039>

- Shirazi, L. F., Bissett, J., Romeo, F., & Mehta, J. L. (2017). Role of Inflammation in Heart Failure. *Current Atherosclerosis Reports*, 19(6). <https://doi.org/10.1007/s11883-017-0660-3>
- Shook, L. L. (2011). An update on hormone replacement therapy: Health and medicine for women: A multidisciplinary, evidence-based review of mid-life health concerns. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 84(1), 39–42.
- Thaung Zaw, J. J., Howe, P. R. C., & Wong, R. H. X. (2018). Postmenopausal health interventions: Time to move on from the Women’s Health Initiative? *Ageing Research Reviews*, 48(July), 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2018.10.005>.
- Therapy, H., Thromboembolism, V., Postmenopausal, A., Esther, T., Canonico, S., Risk, T., Group, S., Unit, I., & This, T. (2007). *Chapter 7–Reproductive Endocrinology / 279*. 279–280.
- Tikhonoff, V., Casiglia, E., Gasparotti, F., & Spinella, P. (2019). The uncertain effect of menopause on blood pressure. *Journal of Human Hypertension*, 33(6), 421–428. <https://doi.org/10.1038/s41371-019-0194-y>
- Thomas, P., & Pang, Y. (2013). Protective actions of progesterone in the cardiovascular system: Potential role of membrane progesterone receptors (mPRs) in mediating rapid effects. *Steroids*, 78(6), 583–588. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2013.01.003>
- Yang, X. P., & Reckelhoff, J. F. (2011). Estrogen, hormonal replacement therapy and cardiovascular disease. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 20(2), 133–138. <https://doi.org/10.1097/MNH.0b013e3283431921>
- Zhang, L., Tian, J., Diao, S., Zhang, G., Xiao, M., & Chang, D. (2020). GLP-1 receptor agonist liraglutide protects cardiomyocytes from IL-1 $\beta$ -induced metabolic disturbance and mitochondrial dysfunction. *Chemico-Biological Interactions*, 332, 109252. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109252>
- Zheng, R. H., Bai, X. J., Zhang, W. W., Wang, J., Bai, F., Yan, C. P., James, E. A., Bose, H. S., Wang, N. P., & Zhao, Z. Q. (2019). Liraglutide attenuates cardiac

remodeling and improves heart function after abdominal aortic constriction through blocking angiotensin II type I receptor in rats. *Drug Design, Development and Therapy*, 13, 2745–2757. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S213910>

## CAPÍTULO 2

---

### **Liraglutida melhora o estresse oxidativo cardíaco e reduz a pressão arterial de ratas espontaneamente hipertensas em modelo pré-clínico de menopausa.**

Wedson Correa dos Santos<sup>1</sup>; Silas Nascimento Ronchi<sup>2</sup>; Larissa Araújo Gonçalves<sup>1</sup>, Glauciene Januário Souza<sup>2</sup>, Antonio de Melo Ferreira Junior<sup>2</sup>, Tadeu Uggere de Andrade<sup>1</sup>, Nazaré Souza Bissoli<sup>2</sup>; Girlandia Alexandre Brasil<sup>1\*</sup>

#### **RESUMO**

**Introdução:** A Liraglutida (LIRA) é agonista do receptor GLP-1 usado no tratamento de *Diabetes Mellitus* tipo 2. Esse receptor também é encontrado nos vasos e coração mediando efeitos cardioprotetores, entretanto, pouco se sabe dos efeitos dessa droga na pós-menopausa. **Objetivo:** Avaliar os efeitos da liraglutida no sistema cardiovascular em ratas espontaneamente hipertensas (SHR) ovariectomizadas. **Métodos:** Ratas SHR com 2 meses (150-200g) foram separadas em grupos: SHAM (S), ovariectomizadas (O; injeção subcutânea de salina), ovariectomizadas + liraglutida (OL; 0,6 mg/kg/dia por 4 semanas, seguido de 1,2 mg/kg/dia) e os tratamentos realizados por quatro semanas). A pressão arterial sistólica (PAS) foi avaliada semanalmente. Os parâmetros hemodinâmicos (PAD, PAS, PAM e LVESP) foram avaliados ao final diretamente no ventrículo esquerdo. O coração foi congelado para avaliação da expressão de proteínas antioxidantes e de mobilidade de cálcio por Western blot. **Resultados:** O tratamento com LIRA foi capaz de reduzir a pressão arterial sistólica e média, aumentar a expressão da enzima catalase (CAT) no coração e reduzir a gordura visceral das ratas ovariectomizadas. No entanto, não houve

diferença nos parâmetros hemodinâmicos e na expressão das proteínas de mobilidade de cálcio. **Conclusão:** A LIRA promoveu efeito benéfico no sistema cardiovascular de ratas que tiveram a menopausa induzida cirurgicamente, entretanto, novos estudos precisam ser realizados para elucidar o mecanismo envolvido nesses efeitos.

**Palavras-chave:** Liraglutide, estrogen, ovariectomized, cardiovascular, blood pressure, antioxidant, hypertension.

**Faltou o abstract**

## INTRODUÇÃO

A Liraglutida (LIRA) é uma opção terapêutica para o tratamento de alterações glicêmicas e/ou *Diabetes Mellitus* tipo 2 (DM2) [1–3]. Essa droga age como agonista dos receptores do peptídeo análogo ao glucagon 1 (GLP-1) [1]. O GLP-1 é um peptídeo da família das incretinas, que são hormônios intestinais que atuam estimulando a liberação de insulina sem causar hipoglicemia [4].

Além do pâncreas, o receptor de GLP-1 (GLP1-R) parece ser expresso no trato gastrointestinal, coração, pulmão, rins e cérebro [5–7]. Nos tecidos extra pancreáticos, o GLP-1 parece modular, entre outras coisas, o tônus vascular, uma vez que seus receptores são encontrados nas células endoteliais coronarianas e no músculo liso vascular, onde ele promove a produção de óxido nítrico (NO) e vasodilatação [8,9].

No coração, utilizando modelos animais [10–12] e em humanos [13] com infarto agudo do miocárdio, foi demonstrado melhora da performance cardíaca pelo GLP-1. Além disso, [14] demonstraram que a LIRA, possui efeito anti-inflamatório e antioxidante em cultura de cardiomiócitos, o que sugere que a LIRA pode ter efeito cardioprotetor.

As doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de morte em todo o mundo, sendo mais prevalentes em homens do que em mulheres [15], entretanto, após a menopausa esses números se igualam [16]. A proteção nas mulheres contra DCV está associada aos altos níveis de estrogênio (E2) endógeno, o que é abruptamente reduzido após a menopausa.

Ademais, parece que o aumento de DCVs nas mulheres pós-menopausa, pode estar associada ao maior estresse oxidativo nessa fase [17]. O estresse oxidativo, pode ser causado pelo aumento da produção das espécies reativas de oxigênio (EROs), ou ainda, pela redução no sistema antioxidante endógeno, formado por diversas proteínas e enzimas, como a superóxido dismutase (SOD) e catalase. Estudos indicam que a redução dos níveis de estrogênio leva ao aumento do estresse oxidativo [18,19] e que isso pode estar associado a piora na resposta vascular e, ainda, a danos no tecido cardíaco e renal [20].

O estrogênio promove diversos efeitos benéficos ao sistema cardiovascular (SCV), como o aumento da produção do NO, além de ação anti-inflamatória e antioxidante [21–24]. Entretanto, diversos estudos demonstram que a sua reposição nesse período é controversa, no que diz respeito ao SCV [25–27]. Deste modo, se faz necessário a pesquisa de novas alternativas terapêuticas para prevenção e/ou tratamento das DCVs nas mulheres no período da perimenopausa

Assim, apesar do conhecimento sobre os efeitos da LIRA no SCV, pouco se sabe sobre os seus efeitos nas mulheres e, especialmente, no período pós-menopausa. Nossa hipótese é que o tratamento com a LIRA irá promover benefício ao SCV, melhorando a contratilidade e o sistema redox cardíaco. Nosso objetivo é avaliar os efeitos do tratamento crônico com LIRA em ratas ovariectomizadas e o seu impacto sobre parâmetros hemodinâmicos e a expressão de proteínas antioxidantes e de mobilidade de cálcio.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Animais**

Foram utilizadas ratas SHR com 2 meses de idade, pesando 150-200g. Os animais foram fornecidos pelo Laboratório de Acompanhamento Experimental do Complexo Biopráticas da Universidade Vila Velha (UVV) e mantidos em gaiolas coletivas (5 animais/gaiola) com livre acesso a água e comida (Ração padrão para biotérios - Moinho Primor<sup>®</sup>), com ciclo de claro-escuro de 12 horas e temperatura e umidade controlados. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o recomendado pelo Guia de Cuidados Animais e Uso de laboratórios do National Institute of Health

(Garber, 2010) e previamente aprovado pela Comissão de Ética para o bem-estar animal da UVV (nº 540-2019).

### **Protocolo experimental**

Os animais foram separados aleatoriamente em 3 grupos: Grupo SHAM controle (S), os animais foram submetidos à cirurgia fictícia e tratados com veículo (injeção subcutânea – s.c.. de solução salina – NaCl 0.9%) em volume semelhante ao grupo tratado com LIRA; Grupo ovariectomizado controle (O), os animais foram submetidos ovariectomia e tratados com veículo; Grupo ovariectomizado tratado com LIRA (OL), os animais foram ovariectomizados e receberam a Liraglutida (Novo Nordisk Pharma Ltd., Glaxo, Dinamarca) no seguinte esquema de tratamento: nas primeiras quatro semanas a dose foi de 0.6 mg/kg uma vez ao dia, seguido de mais quatro semanas com a dose de 0.6 mg/kg duas vezes ao dia (Saber & Abd El-Rahman, 2019). Todos os tratamentos foram mantidos por oito semanas.

Os animais tiveram o peso medido ao início, no meio (quatro semanas) e ao fim do tratamento. O ganho de peso foi calculado por meio do  $\Delta$  peso. Ao fim do tratamento os animais foram submetidos ao teste de tolerância à glicose e a avaliação hemodinâmica.

### **Ovariectomia**

A ovariectomia foi realizada 24h antes do início do tratamento, sob anestesia com cetamina (80 mg/kg, intraperitoneal - i.p. Syntec do Brasil Ltda) e xilazina (12 mg/kg, i.p König laboratories, SA). Incisões dorsolaterais bilaterais foram realizadas através da pele, o tecido muscular subjacente foi dissecado para localização dos ovários e trompas de falópio. Após a localização, o tecido foi suturado e os ovários foram removidos. O músculo e a pele foram suturados com sutura absorvível. Nos animais SHAM o mesmo procedimento foi realizado sem, entretanto, a retirada dos ovários.

### **Avaliação do ciclo estral**

O ciclo estral foi determinado por meio da análise de esfregaços vaginais. Para tanto, as células epiteliais vaginais foram coletadas e examinadas em microscópio óptico, pelo mesmo pesquisador, reduzindo possíveis variáveis analíticas, no mesmo período

do dia (8:00 - 10:00 AM) [28]. Os experimentos foram realizados nos animais do grupo SHAM apenas quando elas se encontravam no proestro.

### **Glicemia em Jejum e Teste de tolerância à glicose (TTG)**

O teste de tolerância à glicose (TTG) foi realizado conforme descrito previamente [30]. Resumidamente, após em jejum prévio de 12 horas foi administrada a glicose (2 g/kg, i.p.) e a glicemia dosada imediatamente nas amostras de sangue da cauda nos tempos 0', 5', 10', 20', 30', 60' e 120 min utilizando glicosímetro (OnCall Plus II, Acon®, USA).

### **Cateterização e medidas hemodinâmicas**

Uma semana após a avaliação do TTG os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (100/10 mg/kg i.p., Syntec do Brasil Ltda; König laboratories, SA) para a realização das medidas hemodinâmicas. Um cateter de polietileno (PE-50) preenchido com solução salina (NaCl, 0.9%) foi inserido na artéria carótida direita. O cateter foi ligado a um transdutor de pressão (MP100-CE) acoplado a um sistema de aquisição de dados biológicos (Biopac Systems®, Santa Barbara, CA, EUA). Os dados de pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) foram registrados durante quinze minutos na carótida e, em seguida, o cateter foi guiado até o ventrículo esquerdo (VE) e mantido por 30 minutos, para aquisição dos parâmetros da pressão sistólica final do ventrículo esquerdo (PSVE). Após o procedimento, o cateter foi retirado do VE e a PAD foi novamente medida, os animais que apresentassem redução da PAD superior a 10 mmHg seriam excluídos do estudo, pois há indicativo de dano à válvula aórtica. Nenhum animal precisou ser excluído do presente estudo. Os dados foram analisados no software LabChart, versão 7 (AD Instruments, Castle Hill, Austrália).

### **Coleta de órgãos**

Após a avaliação hemodinâmica, os animais foram eutanasiados por exsanguinação enquanto ainda estavam anestesiados. Os órgãos foram então retirados (VE, útero, gordura perirrenal e inguinal), limpos em tampão fosfato (PBS, pH = 7.2), secos, em seguida pesados. A tíbia foi retirada, limpa e medida. A razão do peso dos órgãos pelo

comprimento da tíbia (mm) foi usada como parâmetro de hipertrofia do órgão. O VE foi armazenado em -80° C para a determinação da expressão das proteínas.

### **Western blotting**

As amostras de VE (100 mg) foram homogeneizadas em tampão de lise [Tris-HCL pH 7,4 (10 mM), PMSF (1 mM), NaVO<sub>3</sub> (1 mM), SDS (1%), DTT (0,5 mM), EDTA (5 mM) e coquetel inibidor de protease (1:100)]. O teor total de proteínas foi medido através do ensaio de Bradford [31]. 100 mg de proteínas foram separadas por eletroforese usando 7,5-10% de SDS PAGE. As membranas de nitrocelulose foram bloqueadas com 5% de leite sem gordura e depois expostas aos seguintes anticorpos primários: antiSERCA2a ([1:1000], Affinity BioReagents, LOT UI2839274 CO, USA); anti-PLB ([1:1000], invitrogen, LOT TI270655, CO, USA), SOD 1 e 2? ([1:200], LOT 0801 Sigma, Estados Unidos); Catalase (CAT) ([1:2000] Sigma, LOT E1418, Estados Unidos); e anti-Glicealdeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) ([1:4000], Merck Millipore, LOT 015M4824V, Alemanha). As membranas foram então incubadas com os anticorpos secundários (anti-mouse ou anti-rabbit monoclonal IgG), que eram conjugados peroxidase ([1:5000], Abcam, Inc., EUA). As bandas foram quantificadas usando o software Bio-Rad Image Lab 5.2.1 e os níveis de intensidade das bandas foram normalizados utilizando o GAPDH.

### **Análise estatística**

Os dados foram expressos como média +/- erro padrão da média (EPM), e a análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism, versão 8 (Software Graph Pad, La Jolla, CA, USA). Os dados tiveram a normalidade avaliada pelo método de Kolmogorov-smirnov. Os dados foram comparados utilizando-se análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo teste *post hoc* de Tukey. Nos dados onde avaliação da influência do tempo sobre o parâmetro avaliado, foi utilizada análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Sidak's.

## **Resultados**

### **Ganho de peso e hipertrofia de órgãos**

Na Tabela 1 estão descritos os resultados da razão do peso dos órgãos pelo comprimento da tíbia após o tratamento de oito semanas com liraglutida. É possível

observar que o tratamento promoveu redução no peso das gorduras inguinal e perirrenal nos animais.

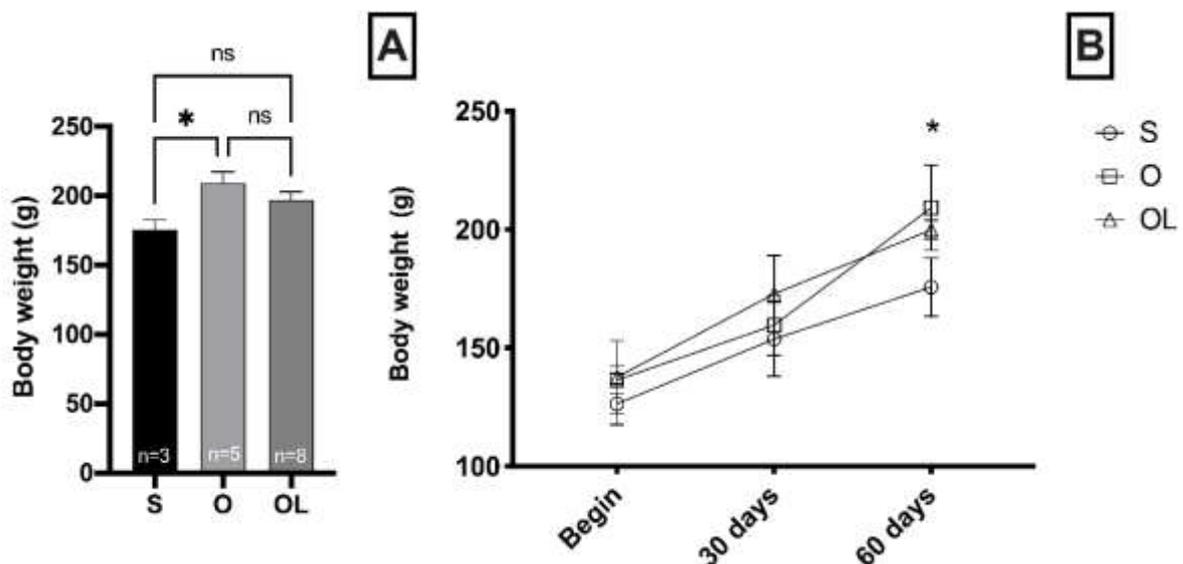
**Tabela 1.** Dados ponderais dos animais submetidos ao tratamento com Liraglutida em modelo de privação de estrogênio

Parâmetro	Grupos			F/p
	S	O	OL	
VE/TB	0.01949±0.0001 <sup>a</sup>	0.01923±0.0001 <sup>a</sup>	0.02012±0.001 <sup>a</sup>	0.9891/0.3949
U/TB	0.01172±0.0016 <sup>a</sup>	0.00186±0.0002 <sup>b</sup>	0.002062±0.0002 <sup>b</sup>	122.8 / <0.0001
GPR/TB	0.01466±0.0022 <sup>a</sup>	0.01886±0.0013 <sup>a</sup>	0.004653±0.0008 <sup>b</sup>	3696 / <0.0001
GI/TB	0.033±0.0064 <sup>a</sup>	0.06125±0.0082 <sup>a</sup>	0.03332±0.0059 <sup>b</sup>	4.88 / 0.0304

VE = Ventriculo esquerdo; U= Útero; GPR= Gordura perirrenal; GI = Gordura inguinal; TB= Comprimento da tibia. Letras diferentes na mesma linha representam diferenças estatísticas.

Como esperado, a ovariectomia promoveu redução do peso do útero, o que não foi alterado pelo tratamento com a LIRA. De forma semelhante, não foi observado impacto do tratamento sobre a hipertrofia do VE.

Com relação ao ganho de peso, observa-se que após o período experimental (60 dias) os animais do grupo ovariectomizado (O) apresentaram ganho superior ao grupo S (Figura 1, painel A; S: 175.7g±7.10g, O: 209.2g±8.07g, OL: 197.1g±5.77 g), a LIRA, entretanto, não foi capaz de impedir o ganho de peso após 60 dias (Painel B).

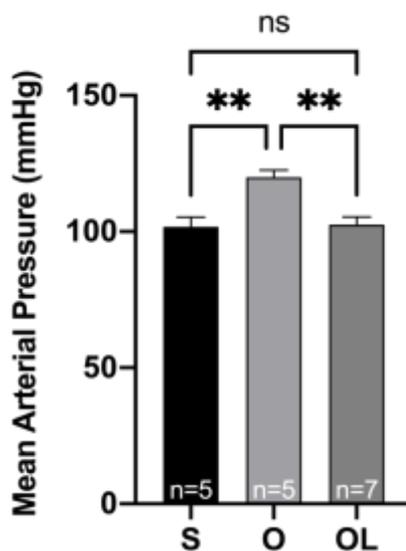


**Figura 01.** Dados de ganho de peso ao fim do tratamento (Painel A) e evolução de peso dos animais ao longo dos 60 dias de acompanhamento (Painel B). Dados

apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Dados comparados por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste *post hoc* de Tukey (Interaction.  $F=3.955$ ,  $p=0.0455$ ). \*  $p<0.05$  comparado a S.

### Medida direta da pressão arterial

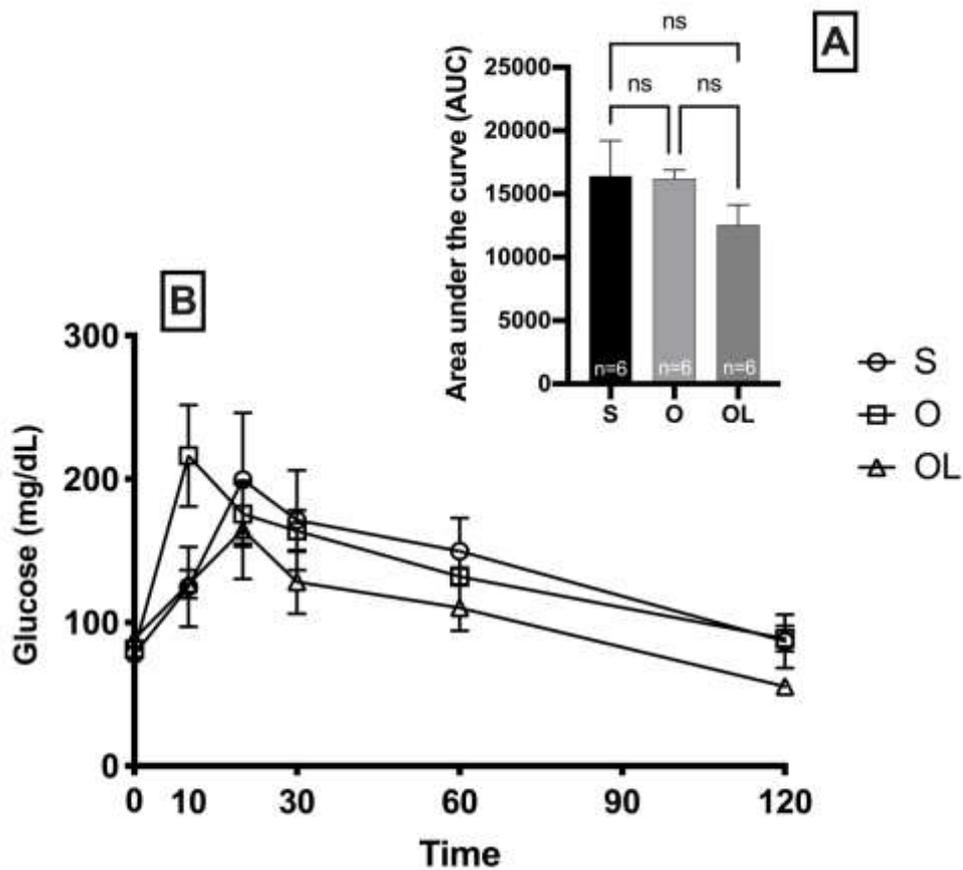
. A pressão arterial média (PAM) encontrou-se aumentada no grupo ovariectomizado quando comparado ao grupo controle, e o tratamento com LIRA promoveu redução e normalização da pressão arterial (S:  $101.7 \pm 3.54$ ; O:  $119.9 \pm 2.65$ ; OL:  $102.6 \pm 2.85$ ;  $p=0.0017$  S vs O;  $p=0.0011$  O vs OL) após 60 dias de tratamento (Figura 2).



**Figura 2:** Dados da avaliação direta da pressão arterial média (PAM). Dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Os dados foram avaliados por one-way ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Tukey ( $F=13.01$ ,  $p=0.0004$ ). \*\* $p<0,01$ .

### Teste de tolerância à glicose (TTG)

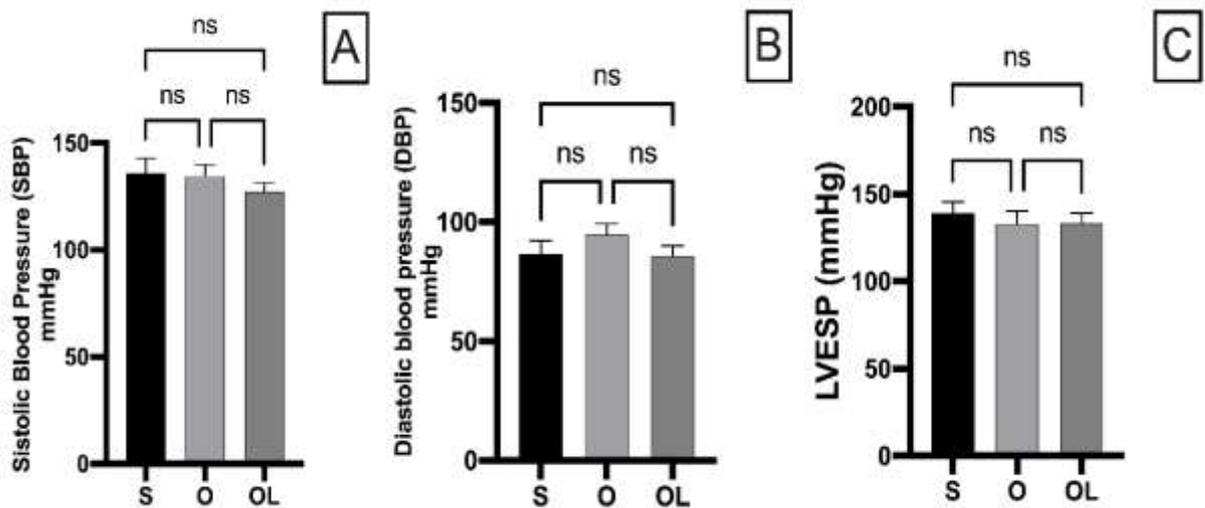
O teste de tolerância a glicose foi realizado uma semana antes do fim do protocolo experimental e nem o tratamento com LIRA ou a ovariectomia promoveram mudança no padrão de resposta (Figura 3; S:  $16404 \pm 2801$ , O:  $16208 \pm 668.8$ , OL:  $12541 \pm 1593$  AUC).



**Figura 3:** Dados do teste de tolerância oral à glicose. Área sob a curva (Painel A) e curva representativa dos diferentes grupos de tratamento (Painel B). Dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. No painel A os dados foram avaliados por ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Tukey (F: 1.312,  $p=0.2986$ )-

### Avaliação hemodinâmica

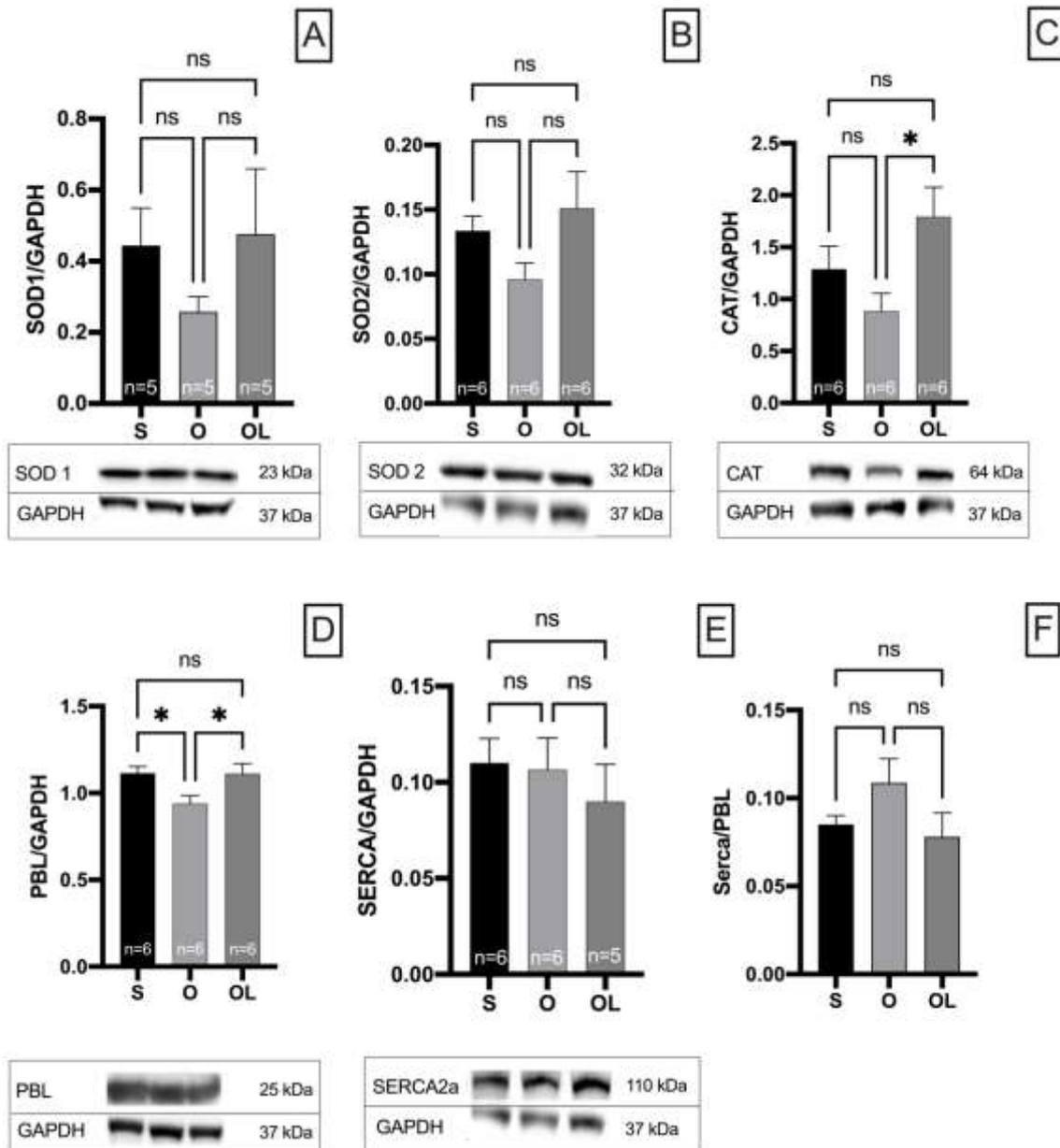
Como observado na Figura 4, a LIRA não modificou esses a PAS, PAD e PSFVE parâmetros.



**Figura 4:** Resultado das avaliações hemodinâmicas. Painel A: Dados da pressão sistólica no ventrículo esquerdo (F: 0,5936, P=0,5618); Painel B: Dados da pressão diastólica no ventrículo esquerdo (F: 0,978, P=0,3934); Painel C: Dados de Pressão sistólica final do ventrículo esquerdo – LVESP (F: 0.2502, P=0.7810); Dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Todos os dados foram avaliados por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste post hoc de Tukey.

#### **Avaliação da expressão de proteínas por Western blot**

A avaliação da expressão das enzimas antioxidantes demonstrou aumento da catalase (CAT) no grupo OL (Figura 05, Painel C; S:  $1.288 \pm 0.2204$ ; O:  $0.8852 \pm 0.1697$ ; OL:  $1.793 \pm 0.2845$ ) quando comparado ao grupo O, entretanto não foi possível notar diferença nas enzimas SOD1 e 2. Adicionalmente, a expressão da PLB foi normalizada quando comparada eu animal controle (S) e a SERCA2a não teve sua expressão modificada com o tratamento com LIRA (Figuras 5; Painéis A – F).



**Figura 05.** Avaliação da expressão proteica no coração dos animais tratados com LIRA. **Painel A:** Enzima superóxido dismutase 1 (SOD1; F: 0,3916, P=0,6843); **Painel B** Enzima Superóxido Dismutase 2 (SOD2; F: 2,177, P=0,1479); **Painel C:** Enzima Catalase (CAT; F: 3,916, P=0,0428); **Painel D:** Proteína Fosfolambam (PBL; F: 0,6435, P=0,5394); **Painel E:** Proteína SERCA (F: 0,5869, P=0,5692); **Painel F:** Razão entre a Serca e a PBL. A expressão de cada proteína foi normalizada pelo GAPDH. Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média SEM e avaliados por ANOVA de uma via, seguido pelo teste post hoc de Tukey \*  $p < 0,05$ .

## Discussão

Nosso estudo foi o primeiro a indicar que a administração de LIRA por 60 dias é capaz promover mudanças nos parâmetros cardiovasculares em ratas SHR submetidas a redução de estrogênio. Nosso estudo demonstrou, ainda, que a LIRA reduziu a PAM e promoveu aumento da expressão da enzima antioxidante catalase (CAT) e da proteína fosfolambam no tecido cardíaco dos animais. Sendo assim, melhorando a performance cardíaca em situação de redução de estrogênio.

Estudos indicam que o estrogênio tem efeito cardioprotetor, reduzindo o risco de a mulher apresentar hipertensão arterial e eventos cardiovasculares (infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, doenças tromboembólicas) na fase pós-menopausa, quando comparado com homens da mesma idade [32,33]. Na pós-menopausa os níveis de estrogênio estão reduzidos e, evidências demonstram uma associação dessa redução com aumento da incidência de hipertensão nas mulheres [15,34].

Os efeitos protetores do estrogênio parecem ocorrer por meio do seu efeito vasodilador, via endotélio vascular, que leva a liberação de fatores de relaxamento (óxido nítrico, prostaciclina, fator hiperpolarizante) e, por ação direta no músculo liso vascular [35,36]. No coração o estrogênio modula positivamente a contratilidade cardíaca, uma vez que pode alterar proteínas envolvidas na mobilidade do cálcio [37,38]. Além disso, estudos indicam que a terapia de reposição hormonal pode melhorar a contratilidade cardíaca em mulheres na pós-menopausa [39,40].

No nosso estudo, utilizamos um modelo que mimetiza a privação de estrogênio da menopausa e, avaliamos o impacto do tratamento em duas importantes proteínas envolvidas na mobilidade do cálcio, a fosfolambam (PLB) e a SERCA2a.

Nossos resultados demonstram que houve redução da expressão proteica do PLB, sem alteração da SERCA2a, além de tendência a aumento da razão SERCA2a/PLB nas ratas ovariectomizadas (O) e, que a liraglutida impediu essas alterações, igualando os resultados aos valores da rata SHAM (S). A PLB regula a  $Ca^{2+}$ -afinidade do SERCA2a, facilitando a absorção de cálcio no retículo sarcoplasmático e relaxamento muscular, que é considerado um importante mecanismo intracelular envolvido na contratilidade miocárdica [ 63]

Esses resultados contribuem para explicar o aumento da performance cardíaca nas ratas O e indicam que a LIRA pode modular a contratilidade por meio de alteração da PLB. O PLB é um repressor de variáveis contráteis basais do ventrículo esquerdo [41], e seria de se esperar que alterações nos níveis de PLB resultassem em alterações na contratilidade miocárdica.

Na literatura encontramos estudos que mostram que a ovariectomia em ratas hipertensas (SHR, [37] e normotensas (*wistar*, [38] levam a redução da contratilidade cardíaca, assim como em mulheres na pós-menopausa [39,40]. No estudo de [37], foi mostrado que a ovariectomia em ratas SHR leva a aumento da expressão proteica da PLB e da razão da PLB/SERCA2a, o que explicaria a menor performance cardíaca observada nessas ratas. Entretanto, ao examinarmos a metodologia, encontramos que nesse estudo as ratas foram ovariectomizadas com 3 meses de idade, o que difere do nosso estudo e, portanto, justifica os resultados controversos.

Por outro lado, [38] observou redução na força de contração nos animais ovariectomizados, apenas 60 dias após a privação de estrogênio, entretanto, o seu modelo de estudo foi animais normotensos o que pode, pelo menos em parte, explicar as diferenças observadas. Adicionalmente, outros estudos encontraram que a ovariectomia não levou a alteração de parâmetros funcionais [42,43] e, em relação a reposição com estrogênio, os resultados dos estudos mostram desde, não alteração [42] ou até mesmo redução [43] desses parâmetros.

É importante destacar, que o aumento em parâmetros que avaliam a contratilidade cardíaca, nem sempre são benéficos e, podem representar aumento inicial da atividade do sistema nervoso simpático, como acontece em mulheres na fase pós-menopausa [44], como forma de estimular a capacidade contrátil do coração, mas que em longo prazo, poderia levar a insuficiência cardíaca, por promover o *down regulation* dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos [45,46].

Em nosso estudo, observamos ainda que a ovariectomia promoveu aumento da pressão arterial dos animais e que a LIRA foi capaz de normalizar esses valores (Figura 2). Um estudo clínico randomizado com 4725 indivíduos (homens e mulheres) que receberam LIRA (3,0 mg/dia) ou placebo por 32 e 52 dias demonstrou que a LIRA promove redução da PAS independentemente da associação com *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2) [47].

O GLP-1 possui ação vasodilatadora no sistema cardiovascular [48–50]. E estudos utilizando a LIRA demonstram que ela promove benefício ao sistema cardiovascular

e, que esse benefício se dá, entre outras coisas, por aumentar a biodisponibilidade do NO, que é um potente vasodilatador [51,52].

Nosso estudo demonstrou que a LIRA é capaz de reduzir a pressão arterial dos animais SHR ovariectomizados, após 60 dias de tratamento. Esses dados corroboram os dados da literatura que mostram que o tratamento com LIRA melhora o desfecho cardiovascular, independente dos efeitos sobre a obesidade e glicemia [51,53,54].

Esse efeito na pressão pode ser associado, pelo menos em parte, ao aumento da expressão da enzima catalase observado (Figura 5, Painel C). Tendo em vista que o estresse oxidativo, que é caracterizado pelo aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) e/ou a perda de atividade das enzimas antioxidantes, tem efeito direto na biodisponibilidade NO, reduzindo-a [55,56].

A catalase (CAT) é uma enzima que tem papel de eliminar o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), importante radical, decompondo-o  $H_2O_2$  em água e oxigênio [55]. Estudos indicam que o desenvolvimento da hipertensão no período pós-menopausa pode estar relacionado ao maior estresse oxidativo nesse período (revisado por Lopez-Ruiz et al. 2008; Kander et al. 2017), deste modo, podemos inferir que a LIRA promoveu redução nas espécies reativas de oxigênio e que isso pode aumentar a biodisponibilidade de NO e, conseqüentemente, promover a redução da pressão arterial dos animais.

Nosso estudo demonstrou que no grupo OL houve redução dos pesos das gorduras inguinais e perirrenais (Tabela 1), entretanto, mesmo havendo ganho de peso no grupo O, a LIRA não foi capaz de prevenir esse aumento (Figura 1, painel A-B). [59] tratando ratas wistar ovariectomizadas demonstrou que a LIRA (4  $\mu g$  /kg/dia) foi capaz de prevenir o ganho de peso, o que difere do nosso estudo. Entretanto, nosso estudo foi o primeiro a avaliar o impacto da LIRA no ganho de peso de animais SHR ovariectomizados, o que pode justificar a diferença nos resultados.

Adicionalmente, demonstramos que os animais tratados com LIRA apresentavam redução no tecido adiposo perirrenal e inguinal. [60] observaram o mesmo efeito em machos orquiectomizados e, ainda, justificaram esse resultado ao aumento da lipogênese e termogênese nos animais, promovido pela ativação do receptor de GLP-1.

A distribuição de gordura corporal na mulher muda conforme o tempo, sendo observado aumento da gordura visceral na pós-menopausa [61]. As gorduras viscerais, estão associadas ao aumento da resistência vascular, aumento da pressão

intrarenal, resistência à insulina e desequilíbrio pró-inflamatório [62]. A LIRA tem demonstrado eficácia na redução tanto da gordura subcutânea quanto visceral independentemente de seus efeitos de redução da glicose [59,60]. Sendo assim, nossos dados indicam que a LIRA tem resultados interessantes nos depósitos de gordura viscerais, o que pode ser associado aos benefícios cardiovasculares e metabólicos observados.

Resumindo, tratamento com LIRA promoveu redução na pressão arterial e aumento da expressão da enzima antioxidante catalase sem, entretanto, promover mudança na contratilidade cardíaca e, ainda aumentou a expressão da proteína fosfolambam. Estes achados são importantes, pois indicam uma alternativa terapêutica para o tratamento de mulheres pós-menopausa, tendo em vista os benefícios cardiovasculares da LIRA.

Podemos concluir que a LIRA promoveu benefício cardiovascular nas ratas hipertensas e ovariectomizadas tratadas cronicamente. acreditamos que os mecanismos antioxidantes estejam relacionados a efeitos protetores adicionais ao coração, em uma situação de redução dos níveis de estrogênio independente da função cardíaca. Houve uma redução significativa da redução de gorduras viscerais após o tratamento com a LIRA, o que provavelmente contribuiu para melhoria dos níveis pressóricos, através da redução da resistência vascular, resistência à insulina e desequilíbrio pró-inflamatório.

### **Financiamento**

Este estudo teve apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo (FAPES), termo de outorga 591/2018, edital FAPES/CNPq, nº 23/2018 e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## Referências

- [1] H. Agersø, L.B. Jensen, B. Elbrønd, P. Rolan, M. Zdravkovic, The pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety and tolerability of NN2211, a new long-acting GLP-1 derivative, in healthy men, *Diabetologia*. 45 (2002) 195–202. doi:10.1007/s00125-001-0719-z.
- [2] D. Russell-Jones, A. Vaag, O. Schmitz, B.K. Sethi, N. Lalic, S. Antic, M. Zdravkovic, G.M. Ravn, R. Simó, Liraglutide vs insulin glargine and placebo in combination with metformin and sulfonylurea therapy in type 2 diabetes mellitus (LEAD-5 met+SU): A randomised controlled trial, *Diabetologia*. 52 (2009) 2046–2055. doi:10.1007/s00125-009-1472-y.
- [3] M. Marre, J. Shaw, M. Brändle, W.M.W. Bebakar, N.A. Kamaruddin, J. Strand, M. Zdravkovic, T.D. Le Thi, S. Colagiuri, Liraglutide, a once-daily human GLP-1 analogue, added to a sulphonylurea over 26 weeks produces greater improvements in glycaemic and weight control compared with adding rosiglitazone or placebo in subjects with Type 2 diabetes (LEAD-1 SU), *Diabet. Med.* 26 (2009) 268–278. doi:10.1111/j.1464-5491.2009.02666.x.
- [4] P.E. Szmitko, L.A. Leiter, S. Verma, The incretin system and cardiometabolic disease, *Can. J. Cardiol.* 26 (2010) 87–95. doi:10.1016/S0828-282X(10)70010-6.
- [5] Y. Wei, S. Mojsov, Tissue-specific expression of the human receptor for glucagon-like peptide-I: brain, heart and pancreatic forms have the same deduced amino acid sequences, *FEBS Lett.* 358 (1995) 219–224. doi:10.1016/0014-5793(94)01430-9.
- [6] P. Bullock, R. Scott, Encoding the Rat Glucagon-Like Es ( D, 137 (1996) 31–33.
- [7] L.B. Knudsen, Liraglutide: The therapeutic promise from animal models, *Int. J. Clin. Pract.* 64 (2010) 4–11. doi:10.1111/j.1742-1241.2010.02499.x.

- [8] T. Nyström, M.K. Gutniak, Q. Zhang, F. Zhang, J.J. Holst, B. Ahrén, Å. Sjöholm, Effects of glucagon-like peptide-1 on endothelial function in type 2 diabetes patients with stable coronary artery disease, *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 287 (2004) 1209–1215. doi:10.1152/ajpendo.00237.2004.
- [9] H.A. Golpon, A. Puechner, T. Welte, P. V. Wichert, C.O. Feddersen, Vasorelaxant effect of glucagon-like peptide-(7-36)amide and amylin on the pulmonary circulation of the rat, *Regul. Pept.* 102 (2001) 81–86. doi:10.1016/S0167-0115(01)00300-7.
- [10] L.A. Nikolaidis, A. Doverspike, T. Hentosz, L. Zourelis, Y.T. Shen, D. Elahi, R.P. Shannon, Glucagon-like peptide-1 limits myocardial stunning following brief coronary occlusion and reperfusion in conscious canines, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 312 (2005) 303–308. doi:10.1124/jpet.104.073890.
- [11] M.H. Noyan-Ashraf, M. Abdul Momen, K. Ban, A.M. Sadi, Y.Q. Zhou, A.M. Riazi, L.L. Baggio, R.M. Henkelman, M. Husain, D.J. Drucker, GLP-1R agonist liraglutide activates cytoprotective pathways and improves outcomes after experimental myocardial infarction in mice, *Diabetes.* 58 (2009) 975–983. doi:10.2337/db08-1193.
- [12] L.A. Nikolaidis, D. Elahi, T. Hentosz, A. Doverspike, R. Huerbin, L. Zourelis, C. Stolarski, Y.T. Shen, R.P. Shannon, Recombinant glucagon-like peptide-1 increases myocardial glucose uptake and improves left ventricular performance in conscious dogs with pacing-induced dilated cardiomyopathy, *Circulation.* 110 (2004) 955–961. doi:10.1161/01.CIR.0000139339.85840.DD.
- [13] L.A. Nikolaidis, S. Mankad, G.G. Sokos, G. Miske, A. Shah, D. Elahi, R.P. Shannon, Effects of Glucagon-Like Peptide-1 in Patients with Acute Myocardial Infarction and Left Ventricular Dysfunction after Successful Reperfusion, *Circulation.* 109 (2004) 962–965. doi:10.1161/01.CIR.0000120505.91348.58.
- [14] L. Zhang, J. Tian, S. Diao, G. Zhang, M. Xiao, D. Chang, GLP-1 receptor agonist liraglutide protects cardiomyocytes from IL-1 $\beta$ -induced metabolic disturbance and mitochondrial dysfunction, *Chem. Biol. Interact.* 332 (2020) 109252. doi:10.1016/j.cbi.2020.109252.
- [15] E.J. Benjamin, S.S. Virani, C.W. Callaway, A.M. Chamberlain, A.R. Chang, S.

- Cheng, S.E. Chiuve, M. Cushman, F.N. Delling, R. Deo, S.D. De Ferranti, J.F. Ferguson, M. Fornage, C. Gillespie, C.R. Isasi, M.C. Jiménez, L.C. Jordan, S.E. Judd, D. Lackland, J.H. Lichtman, L. Lisabeth, S. Liu, C.T. Longenecker, P.L. Lutsey, J.S. MacKey, D.B. Matchar, K. Matsushita, M.E. Mussolino, K. Nasir, M. O’Flaherty, L.P. Palaniappan, A. Pandey, D.K. Pandey, M.J. Reeves, M.D. Ritchey, C.J. Rodriguez, G.A. Roth, W.D. Rosamond, U.K.A. Sampson, G.M. Satou, S.H. Shah, N.L. Spartano, D.L. Tirschwell, C.W. Tsao, J.H. Voeks, J.Z. Willey, J.T. Wilkins, J.H.Y. Wu, H.M. Alger, S.S. Wong, P. Muntner, Heart disease and stroke statistics - 2018 update: A report from the American Heart Association, 2018. doi:10.1161/CIR.0000000000000558.
- [16] P.K. Whelton, R.M. Carey, W.S. Aronow, B. Ovbiagele, D.E. Casey, S.C.D. Smith, K.J. Collins, C.C. Spencer, C.D. Himmelfarb, R.S. Stafford, S.M. DePalma, S.J. Taler, S. Gidding, R.J. Thomas, K.A. Jamerson, K.A. Williams, D.W. Jones, J.D. Williamson, E.J. MacLaughlin, J.T. Wright, L. Mauri, D.E. Casey Jr, C. KJ, D.H. C, D. SM, G. S, J. KA, J. DW, M. EJ, M. P, O. B, S.C.S.S. Jr, S. CC, S. RS, T. SJ, T. RJ, W.K. Sr, W. JD, W.J. Jr, D.E. Casey, K.J. Collins, C.D. Himmelfarb, S.M. DePalma, S. Gidding, K.A. Jamerson, K.A. Williams, E.J. MacLaughlin, P. Muntner, B. Ovbiagele, S.C.S.S. Jr, C.C. Spencer, R.S. Stafford, S.J. Taler, R.J. Thomas, K.A. Williams, J.D. Williamson, J.T.W. Jr, K.J. Collins, C.D. Himmelfarb, S.M. DePalma, S. Gidding, K.A. Jamerson, D.W. Jones, E.J. MacLaughlin, P. Muntner, B. Ovbiagele, S.C.D. Smith, C.C. Spender, R.S. Stafford, S.J. Taler, R.J. Thomas, Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task force on Clinical Practice Guidelines, *J. Am. Coll. Cardiol.* 71 (2017) 283. doi:10.1161/HYP.000000000000065/-/DC1.The.
- [17] C. Cervellati, C.M. Bergamini, Oxidative damage and the pathogenesis of menopause related disturbances and diseases, *Clin. Chem. Lab. Med.* 54 (2016) 739–753. doi:10.1515/cclm-2015-0807.
- [18] I.F. Caliman, A.Z. Lamas, P. Lima, M. Dalpiaz, A.R. Santos, G.R. Abreu, S.G. Figueiredo, L.N. Gusmão, Endothelial Relaxation Mechanisms and Oxidative Stress Are Restored by Atorvastatin Therapy in Ovariectomized Rats, 8 (2013) 1–11. doi:10.1371/journal.pone.0080892.

- [19] P.W.C. Oliveira, G.J. de Sousa, I.F. Caliman, A.Z. Lamas, A.R. Santos de Medeiros, T.U. de Andrade, G.R. de Abreu, S.G. de Figueiredo, N.S. Bissoli, Metformin ameliorates ovariectomy-induced vascular dysfunction in non-diabetic wistar rats, *Clin. Sci.* 127 (2014) 265–275. doi:10.1042/CS20130553.
- [20] Z.N.Ö. Kumral, M. Kolgazi, S. Üstünova, Ö.K. Çakır, Ö.D. Çevik, G. Şene, B.Ç. Yeğen, Z.N. Özdemir Kumral, M. Kolgazi, S. Üstünova, Ö. Kasımay Çakır, Ö.D. Çevik, G. Şener, B.Ç. Yeğen, Estrogen receptor agonists alleviate cardiac and renal oxidative injury in rats with renovascular hypertension, *Clin. Exp. Hypertens.* 38 (2016) 500–509. doi:10.3109/10641963.2015.1116550.
- [21] W. Zhu, W. V. Everson, E.J. Smart, Estrogen in cardiovascular disease, *Curr. Opin. Lipidol.* 15 (2004) 589–593. doi:10.1097/00041433-200410000-00014.
- [22] M.E. Mendelsohn, Protective Effects of Estrogen on the Cardiovascular System, *Am. J. Od Cardiol.* 89 (2002) 12–17.
- [23] R.H. Straub, The Complex Role of Estrogens in Inflammation, 28 (2016) 521–574. doi:10.1210/er.2007-0001.
- [24] M.E. Mendelsohn, R.H. Karas, The protective effects of estrogen on the cardiovascular system, *N. Engl. J. Med.* 304 (1999) 1801–1811.
- [25] A.R. Folsom, P.J. Mink, T.A. Sellers, C.P. Hong, W. Zheng, J.D. Potter, Hormonal replacement therapy and morbidity and mortality in a prospective study of postmenopausal women, *Am. J. Public Health.* 85 (1995) 1128–1132. doi:10.2105/AJPH.85.8\_Pt\_1.1128.
- [26] D. Grady, W. Applegate, T. Bush, C. Furberg, B. Riggs, S.B. Hulley, Heart and estrogen/progestin replacement study (HERS): Design, methods, and baseline characteristics, *Control. Clin. Trials.* 19 (1998) 314–335. doi:10.1016/S0197-2456(98)00010-5.
- [27] M.L. Stefanick, B.B. Cochrane, J. Hsia, D.H. Barad, J.H. Liu, S.R. Johnson, The Women’s Health Initiative postmenopausal hormone trials: Overview and baseline characteristics of participants, *Ann. Epidemiol.* 13 (2003). doi:10.1016/S1047-2797(03)00045-0.
- [28] F. Marcondes, F. Bianchi, A. Tanno, Determination of the estrous cycle phases

of rats: Some helpful considerations, *Brazilian J. Biol.* 62 (2002) 609–614.

- [29] S.M. Saber, H.A. Abd El-Rahman, Liraglutide treatment effects on rat ovarian and uterine tissues, *Reprod. Biol.* 19 (2019) 237–244. doi:10.1016/j.repbio.2019.07.003.
- [30] L.M. Lírio, L. Forechi, T.C. Zanardo, H.M. Batista, E.F. Meira, B.V. Nogueira, J.G. Mill, M.P. Baldo, Chronic fructose intake accelerates non-alcoholic fatty liver disease in the presence of essential hypertension, *J. Diabetes Complications.* 30 (2016) 85–92. doi:10.1016/j.jdiacomp.2015.10.008.
- [31] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- [32] M. Barton, M.R. Meyer, E.R. Prossnitz, Estrogen-independent activation of estrogen receptors, *Hypertension.* 57 (2011) 1056–1057. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.173427.
- [33] L. Wang, M. Szklo, A.R. Folsom, N.R. Cook, S.M. Gapstur, P. Ouyang, Endogenous sex hormones, blood pressure change, and risk of hypertension in postmenopausal women: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis, *Atherosclerosis.* 224 (2012) 228–234. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2012.07.005.
- [34] J. Stamler, R. Stamler, W.F. Riedlinger, G. Algera, R.H. Roberts, Hypertension screening of 1 million americans, *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* 235 (1976) 2299–2306.
- [35] R.L. Santos, G.R. Abreu, N.S. Bissoli, M.R. Moysés, Endothelial mediators of 17 $\beta$ -estradiol-induced coronary vasodilation in the isolated rat heart, *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 37 (2004) 569–575.
- [36] R.L. Santos, E.B. Marin, W.L.S. Gonçalves, N.S. Bissoli, G.R. Abreu, M.R. Moysés, Sex differences in the coronary vasodilation induced by 17  $\beta$ -oestradiol in the isolated perfused heart from spontaneously hypertensive rats, *Acta Physiol.* 200 (2010) 203–210. doi:10.1111/j.1748-1716.2010.02140.x.

- [37] P.L.M. Dalpiaz, A.Z. Lamas, I.F. Caliman, R.F. Ribeiro, G.R. Abreu, M.R. Moyses, T.U. Andrade, S.A. Gouvea, M.F. Alves, A.K. Carmona, N.S. Bissoli, Sex Hormones Promote Opposite Effects on ACE and ACE2 Activity , Hypertrophy and Cardiac Contractility in Spontaneously Hypertensive Rats, *PLoS One*. 10 (2015) 1–15. doi:10.1371/journal.pone.0127515.
- [38] A.S. Paigel, R.F. Ribeiro, A.A. Fernandes, G.P. Targueta, D. V Vassallo, I. Stefanon, Myocardial contractility is preserved early but reduced late after ovariectomy in young female rats., *Reprod. Biol. Endocrinol.* 9 (2011) 54. doi:10.1186/1477-7827-9-54.
- [39] I.N. Alecrin, J.M. Aldrighi, M.A. Caldas, O.C.E. Gebara, N.H.M. Lopes, J.A.F. Ramires, Acute and chronic effects of oestradiol on left ventricular diastolic function in hypertensive postmenopausal women with left ventricular diastolic dysfunction, *Heart*. 90 (2004) 777–781. doi:10.1136/hrt.2003.016493.
- [40] T.F. Schaible, A. Malhotra, G. Ciambone, J. Scheuer, The effects of gonadectomy on left ventricular function and cardiac contractile proteins in male and female rats, *Circ. Res.* 54 (1984) 38–49. doi:10.1161/01.RES.54.1.38.
- [41] E. Bugge, T.M. Gamst, A.C. Hegstad, T. Andreassen, K. Ytrehus, Mepacrine protects the isolated rat heart during hypoxia and reoxygenation - But not by inhibition of phospholipase A2, *Basic Res. Cardiol.* 92 (1997) 17–24. doi:10.1007/s003950050013.
- [42] N. Bowling, W.E. Bloomquist, M.L. Cohen, H.U. Bryant, H.W. Cole, D.E. Magee, E.R. Rowley, C.J. Vlahos, Effects of prolonged ethinyl estradiol treatment on calcium channel binding and in vivo calcium-mediated hemodynamic responses in ovariectomized rats, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 281 (1997) 218–225.
- [43] E. Patterson, L. Ma, B. Szabo, C.P. Robinson, U. Thadani, Ovariectomy and estrogen-induced alterations in myocardial contractility in female rabbits: Role of the L-type calcium channel, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 284 (1998) 586–591.
- [44] G. Mercuro, A. Podda, L. Pitzalis, S. Zoncu, M. Mascia, G.B. Melis, G.M.C. Rosano, Evidence of a role of endogenous estrogen in the modulation of autonomic nervous system, *Am. J. Cardiol.* 85 (2000) 787–789. doi:10.1016/S0002-9149(99)00865-6.

- [45] M. Ungerer, M. Bohm, J.S. Elce, E. Erdmann, M.J. Lohse, Altered expression of  $\beta$ -adrenergic receptor kinase and  $\beta$ 1-adrenergic receptors in the failing human heart, *Circulation*. 87 (1993) 454–463. doi:10.1161/01.CIR.87.2.454.
- [46] A.Y.H. Woo, R.P. Xiao,  $\beta$ -Adrenergic receptor subtype signaling in heart: From bench to bedside, *Acta Pharmacol. Sin.* 33 (2012) 335–341. doi:10.1038/aps.2011.201.
- [47] H. Bays, X. Pi-Sunyer, J.U. Hemmingsson, B. Claudius, C.B. Jensen, L. Van Gaal, Liraglutide 3.0 mg for weight management: weight-loss dependent and independent effects, *Curr. Med. Res. Opin.* 33 (2017) 225–229. doi:10.1080/03007995.2016.1251892.
- [48] Q.F. Xiong, S.H. Fan, X.W. Li, Y. Niu, J. Wang, X. Zhang, Y.F. Chen, Y.W. Shi, L.H. Zhang, GLP-1 Relaxes Rat Coronary Arteries by Enhancing ATP-Sensitive Potassium Channel Currents, *Cardiol. Res. Pract.* 2019 (2019). doi:10.1155/2019/1968785.
- [49] E.P. Jensen, S. Møller, A.V. Hviid, S. Veedfald, J.J. Holst, J. Pedersen, C. Oslahrskov, C.M. Sorensen, GLP-1-induced renal vasodilation in rodents depends exclusively on the known GLP-1 receptor and is lost in prehypertensive rats, *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* 318 (2020) F1409–F1417. doi:10.1152/ajprenal.00579.2019.
- [50] S.J. Clarke, J.P. Giblett, L.L. Yang, A. Hubsch, T. Zhao, M. Aetesam-Ur-Rahman, N.E.J. West, M. O'Sullivan, N. Figg, M. Bennett, N.J. Wewer Albrechtsen, C.F. Deacon, J. Cheriyan, S.P. Hoole, GLP-1 is a coronary artery vasodilator in humans, *J. Am. Heart Assoc.* 7 (2018) 1–14. doi:10.1161/JAHA.118.010321.
- [51] R. Iorga, N. Bacalbasa, M. Carsote, O. Bratu, A.M. Stanescu, S. Bungau, C. Pantis, C. Diaconu, Metabolic and cardiovascular benefits of GLP-1 agonists, besides the hypoglycemic effect (Review), *Exp. Ther. Med.* (2020) 2396–2400. doi:10.3892/etm.2020.8714.
- [52] S.J. Zhou, L. Bai, L. Lv, R. Chen, C.J. Li, X.Y. Liu, D.M. Yu, P. Yu, Liraglutide ameliorates renal injury in streptozotocin-induced diabetic rats by activating

- endothelial nitric oxide synthase activity via the downregulation of the nuclear factor- $\kappa$ B pathway, *Mol. Med. Rep.* 10 (2014) 2587–2594. doi:10.3892/mmr.2014.2555.
- [53] F. Sun, S. Wu, S. Guo, K. Yu, Z. Yang, L. Li, Y. Zhang, X. Quan, L. Ji, S. Zhan, Impact of GLP-1 receptor agonists on blood pressure, heart rate and hypertension among patients with type 2 diabetes: A systematic review and network meta-analysis, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 110 (2015) 26–37. doi:10.1016/j.diabres.2015.07.015.
- [54] R. Khera, A. Pandey, A.K. Chandar, M.H. Murad, L.J. Prokop, I.J. Neeland, J. Berry, M. Camilleri, S. Sigh, Effects of Weight Loss Medications on Cardiometabolic Risk Profiles: A Systematic Review and Network Meta-Analysis, *Physiol. Behav.* 176 (2017) 139–148. doi:10.1053/j.gastro.2017.12.024.Effects.
- [55] D.G. Harrison, M.C. Gongorra, Oxidative stress and hypertension, *Med. Clin. North Am.* 34 (2009) 431–440. doi:10.1007/978-0-387-72347-1\_4.
- [56] R. Brito, G. Castillo, J. González, N. Valls, R. Rodrigo, Oxidative stress in hypertension: Mechanisms and therapeutic opportunities, *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* 123 (2015) 325–335. doi:10.1055/s-0035-1548765.
- [57] A. Lopez-Ruiz, J. Sartori-Valinotti, L.L. Yanes, R. Iliescu, J.F. Reckelhoff, Sex differences in control of blood pressure: Role of oxidative stress in hypertension in females, *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 295 (2008) 466–475. doi:10.1152/ajpheart.01232.2007.
- [58] M.C. Kander, Y. Cui, Z. Liu, Gender difference in oxidative stress: a new look at the mechanisms for cardiovascular diseases, *J. Cell. Mol. Med.* 21 (2017) 1024–1032. doi:10.1111/jcmm.13038.
- [59] J.F.A. Model, M.V. Lima, R. Ohlweiler, É. Lopes Vogt, D.S. Rocha, S.K. de Souza, P. Türck, A.S. da R. Araújo, A.S. Vinagre, Liraglutide improves lipid and carbohydrate metabolism of ovariectomized rats, *Mol. Cell. Endocrinol.* 524 (2021). doi:10.1016/j.mce.2021.111158.
- [60] J.F.A. Model, M.V. Lima, R. Ohlweiler, E. Sarapio, É.L. Vogt, D.S. Rocha, S.K. de Souza, A.S. Vinagre, Liraglutide treatment counteracts alterations in adipose

- tissue metabolism induced by orchiectomy in rats, *Life Sci.* 278 (2021). doi:10.1016/j.lfs.2021.119586.
- [61] M. Garaulet, F. Pérez-Llamas, J.C. Baraza, M.D. Garcia-Prieto, P.S. Fardy, F.J. Tébar, S. Zamora, Body fat distribution in pre- and post-menopausal women: Metabolic and anthropometric variables, *J. Nutr. Heal. Aging.* 6 (2002) 123–126.
- [62] O. Gruzdeva, D. Borodkina, E. Uchasova, Y. Dyleva, O. Barbarash, Localization of fat depots and cardiovascular risk, *Lipids Health Dis.* 17 (2018). doi:10.1186/s12944-018-0856-8.
- [63] Alecrin, I. N., Aldrighi, J. M., Caldas, M. A., Gebara, O. C. E., Lopes, N. H. M., & Ramires, J. A. F. (2004). Acute and chronic effects of oestradiol on left ventricular diastolic function in hypertensive postmenopausal women with left ventricular diastolic dysfunction. *Heart*, 90(7), 777–781. <https://doi.org/10.1136/hrt.2003.016493>
- Chu, S. H., Goldspink, P., Kowalski, J., Beck, J., & Schwertz, D. W. (2006). Effect of estrogen on calcium-handling proteins,  $\beta$ -adrenergic receptors, and function in rat heart. *Life Sciences*, 79(13), 1257–1267. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.03.037>
- Ren, J., Hintz, K. K., Roughead, Z. K. F., Duan, J., Colligan, P. B., Ren, B. H., Lee, K. J., & Zeng, H. (2003). Impact of estrogen replacement on ventricular myocyte contractile function and protein kinase B/Akt activation. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 284(5 53-5), 1800–1807. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00866.2002>

## APÊNDICE

### 1. MÉTODOS

#### 1.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

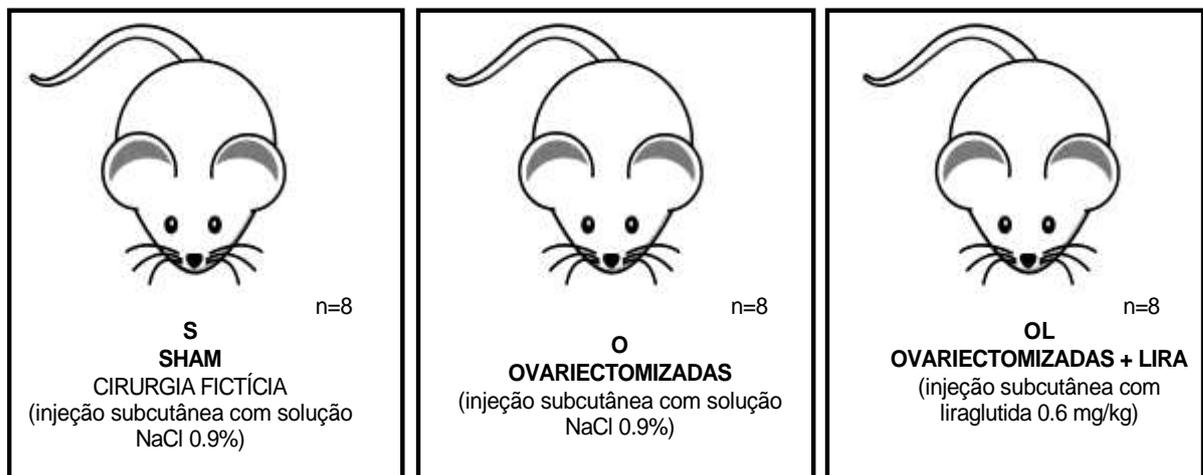
Foram utilizadas ratas espontaneamente hipertensas (Spontaneously hypertensive rats - SHR) com aproximadamente 2 meses de idade, pesando 150-200g. Os animais foram fornecidos pelo Laboratório de Acompanhamento Experimental do Complexo Biopráticas da Universidade Vila Velha (UVV) e mantidos em gaiolas coletivas (5 animais/gaiola) com livre acesso a água e comida (Ração padrão para biotérios - Moinho Primor<sup>®</sup>), com ciclo de claro-escuro de 12 horas e temperatura e umidade controlados. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal, descritos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Anima (CONCEA, 2018) e aprovados pela Comissão de Ética para o bem-estar animal da UVV (nº 540-2019).

#### 1.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram separados aleatoriamente em 3 grupos experimentais, de acordo com o protocolo de tratamento ao qual foram submetidos, os animais do grupo S foram submetidos a cirurgia fictícia (SHAM):

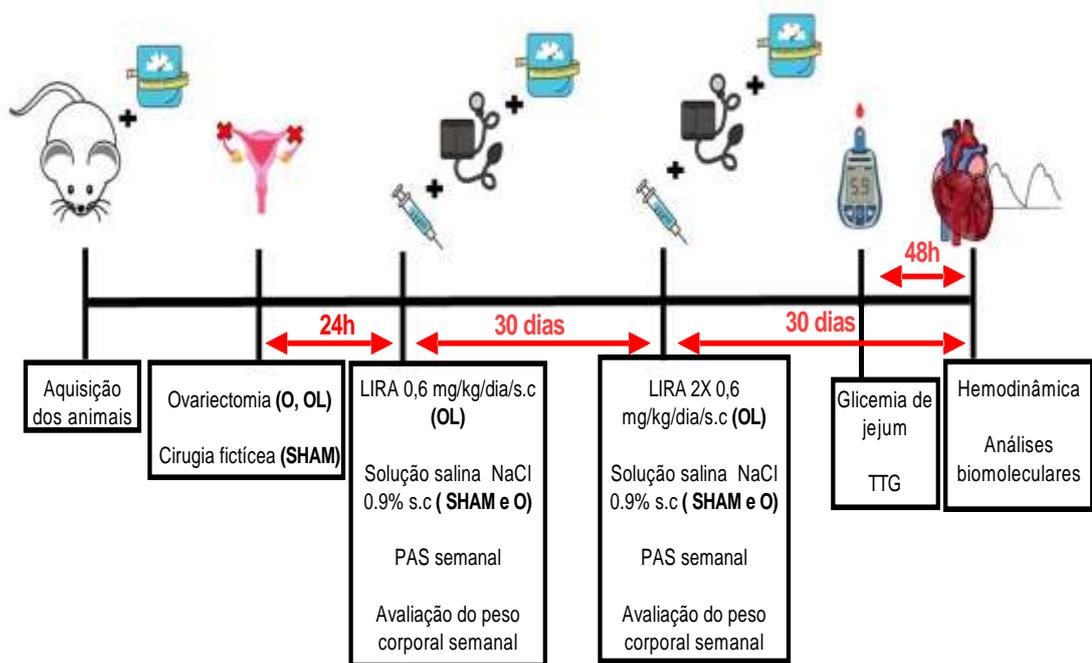
- ✓ **S** (n=8), animais submetidos à cirurgia fictícia e tratados com veículo (injeção subcutânea – s.c. de solução salina – NaCl 0.9%) em volume semelhante ao grupo tratado com LIRA;

- ✓ **O** (n=8), animais submetidos a ovariectomia e tratados com veículo (injeção subcutânea – s.c. de solução salina – NaCl 0.9%) em volume semelhante ao grupo tratado com LIRA;
- ✓ **OL** (n=8), animais submetidos a ovariectomia e tratado com liraglutida, (Novo Nordisk Pharma Ltd., Glaxo, Dinamarca) no seguinte esquema de tratamento: nas primeiras quatro semanas a dose foi de 0.6 mg/kg uma vez ao dia, seguido de mais quatro semanas com a dose de 0.6 mg/kg duas vezes no seguinte esquema de tratamento: nas primeiras quatro semanas a dose foi de 0.6 mg/kg uma vez ao dia, seguido de mais quatro semanas com a dose de 0.6 mg/kg duas vezes ao dia conforme descrito anteriormente por Saber & Abd El-Rahman (2019)



**Figura 01.** Esquematização da divisão de grupos

Os animais foram pesados no início do protocolo e separados aleatoriamente em grupos. O ganho de peso e a pressão arterial sistólica (PAS) foram verificados semanalmente durante todo protocolo experimental. A medida da glicemia em jejum e teste de tolerância a glicose foram realizados 48h antes da eutanásia dos animais conforme o cronograma de experimento (Figura 02).



**Figura 02.** Cronograma de experimento

### 1.3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

A ovariectomia foi realizada sob anestesia conforme Brasil et al., (2015), utilizando o anestésico Hidroclorato de Cetamina (80 mg/kg) e o relaxante muscular Xilazina (10 mg/kg) por via intraperitoneal (i.p.) no quadrante inferior esquerdo do abdômen.

A técnica consiste em uma incisão de 1,0 a 1,5 cm entre a última costela e a coxa, a 1,0 cm da linha mediana, seguida de uma incisão na camada muscular, abertura da cavidade peritoneal para posterior ligadura das trompas uterinas e remoção dos ovários. O procedimento foi realizado bilateralmente. Após a retirada dos ovários foi realizada sutura da musculatura e da pele com fio de nylon 3,0 monofilamentado. Ao final do procedimento foi administrado 0,1 ml do antibiótico Enrofloxacina a 2,5% (Flotril®, Schering-Plough) via intramuscular.

O grupo submetido à cirurgia fictícia (S), foi submetido a uma incisão na parede abdominal, sob o mesmo procedimento anestésico, mas não foram retirados os ovários. Ao final do procedimento os animais foram alocados em gaiolas individuais

#### **1.4 MEDIDA INDIRETA DA PRESSÃO ARTERIAL POR PLETISMOGRAFIA DE CAUDA**

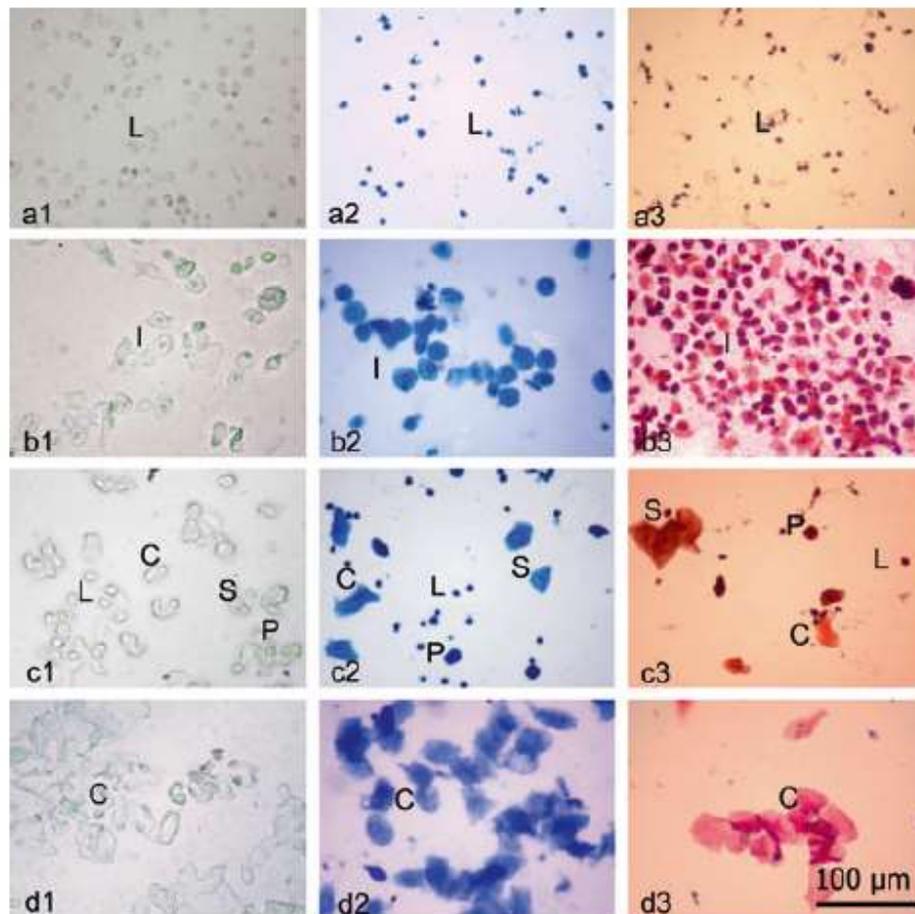
A pressão arterial sistólica (PAS) foi avaliada semanalmente durante o protocolo experimental e determinada utilizando o método não invasivo da pletismografia de cauda (EEF 306, Insight LTDA). Brevemente, os animais foram aclimatados 3 dias antes do início das aferições. A aclimação consistiu no acondicionamento do animal por cerca de 10 minutos no equipamento, evitando a influência do estresse sobre a pressão arterial. No dia do registro os animais foram acondicionados nas câmaras de contenção, em seguida acondicionados na câmara aquecida a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 5 minutos, com um cuff de pulso acoplados na região proximal da cauda. O valor da PAS foi obtido através dos sinais do transdutor acoplado a um computador, como descrito em trabalhos anteriores (Baldo et al., 2011). Foram realizadas 3 leituras consecutivas com intervalo de 1 minuto entre as medidas. A medida individual da PAS foi calculada pela média das leituras, sendo descartados os registros associados com movimento da cauda.

#### **1.4 AVALIAÇÃO DO CICLO ESTRAL PELO ESFREGAÇO VAGINAL**

A determinação da fase do ciclo estral foi realizada a fim de confirmar a ovariectomia e avaliar a atividade ovariana das ratas submetidas à cirurgia fictícia, que é influenciada diretamente pelos níveis de estradiol. Várias alterações ocorrem nos tecidos do aparelho reprodutor das fêmeas durante o ciclo estral completo duro de quatro a cinco dias, ou seja, a cada cinco dias ocorre ovulação, e está dividido nas seguintes fases conforme YENER et al., (2007):

- ✓ Proestro - marcado pelo aumento dos níveis séricos de estradiol e pico do hormônio luteinizante (LH), há atividade proliferativa do epitélio vaginal, com o predomínio de células arredondadas, epiteliais nucleadas (Figura 4- b1, b2 e b3).
- ✓ Estro – ocorre a queda dos níveis de estradiol, coincidindo com a ovulação e formação do corpo lúteo. Há diminuição da proliferação do epitélio vaginal, apresentando esfregaço vaginal constituído predominantemente de células cornificadas anucleadas (Figura 4- d1, d2 e d3).

- ✓ **Metaestro e Diestro** - Esses períodos apresentam concentrações baixas dos níveis de estradiol. Ao esfregaço vaginal na fase **Metaestro**, observa-se leucócitos em números mais altos, células cornificadas e algumas células arredondadas (Figura 4- c1, c2 e c3). Em contrapartida, na fase **Diestro**, observa-se esfregaço constituído praticamente por leucócitos (Figura 4- a1, a2 e a3).



**Figura 03.** Fotomicrografias de vaginais esfregaços de ratos fêmeas com três métodos diferentes. Dioestrus fase é representada em a1, a2 e a3, pró-estro em b1, b2 e b3, metoestro em c1, c2 e c3 e estro em d1, d2 e d3. Leucócitos (L) célula intermediária (I), célula cornificada (C), célula parabasal (P) e superficial célula (S) são indicados (Yener et al., 2007).

A determinação da fase estral das ratas foi realizada por meio da análise microscópica do esfregaço vaginal a fresco, observando os três tipos celulares: células arredondadas nucleadas, células maduras cornificadas e leucócitos (Goldman et al., 2007). O fluido vaginal foi coletado por meio de micropipetas plásticas 20µL de solução salina (NaCl 0,9%), transferido para lâminas de vidro, misturado com uma gota de lugol e sobreposto com lamínula para posterior observação em microscópio óptico com lente objetivas de 10x e 40x de aumento. Este procedimento foi realizado diariamente, durante 7 a 10 dias, entre oito e dez horas da manhã (Becker et al., 2005).

O experimento foi realizado nas fêmeas ovariectomizadas após confirmação da interrupção do ciclo e com característica de citologia vaginal compatível com a fase estro. Já as fêmeas submetidas à cirurgia fictícia, foram incluídas no experimento apenas quando estivessem ciclando normalmente e na fase Proestro.

### **1.5 GLICEMIA EM JEJUM E TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (TTG)**

Foram colhidas amostras de sangue da cauda e a glicemia medida pelo glicosímetro à base de tira (On Call® - MedLevensohn). O teste foi realizado 48h antes da avaliação hemodinâmica, obedecendo o tempo de recuperação dos animais. O teste de tolerância à glicose foi realizado após jejum de 12 horas. Injetou-se glicose por via intraperitoneal (2g/Kg), seguido de aferição da glicemia basal e nos tempos de 5, 10, 20, 30, 60, 90 e 120 minutos, segundo Jørgensen et al., (2017), com modificações.

### **1.6 AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA**

Após 48h da realização do TTG os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (100/10 mg/kg i.p., Syntec do Brasil Ltda; König laboratories, SA) para a realização das medidas hemodinâmicas. Atingindo o ponto cirúrgico, os animais foram rapidamente afixados em uma mesa cirúrgica na posição supina para o procedimento de cateterismo ventricular esquerdo como descrito anteriormente por (Forechi et al., 2012). Uma tricotomia foi realizada na altura do pescoço seguida de uma pequena incisão na pele, Após localização e dissecação da artéria carótida direita, um cateter de polietileno (PE-50) preenchido com solução salina (NaCl, 0.9%) e heparina foi inserido através do lúmen do vaso até a aorta, sendo posteriormente avançado até o ventrículo esquerdo. O cateter foi ligado a um transdutor de pressão (MP100-CE)

acoplado a um sistema de aquisição de dados biológicos (Biopac Systems®, Santa Barbara, CA, EUA).

Os dados de pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) foram registrados durante quinze minutos na carótida e, em seguida, o cateter foi guiado até o ventrículo esquerdo (VE), para aquisição dos parâmetros da pressão sistólica final do ventrículo esquerdo (PSFVE) como descrito por (Nascimento et al., 2016). Após o procedimento, o cateter foi retirado do VE e a PAD foi novamente medida, os animais que apresentassem redução da PAD superior a 10 mmHg seriam excluídos do estudo, pois há indicativo de dano à válvula aórtica. Nenhum animal precisou ser excluído do presente estudo. Os dados foram analisados no software LabChart, versão 7 (AD Instruments, Castle Hill, Austrália).

## **1.7 EVOLUÇÃO PONDERAL E COLETA DE AMOSTRAS**

Semanalmente o peso corporal dos animais foram verificados de ambos os grupos. Após a hemodinâmica os animais foram eutanasiados por decapitação, a cavidade torácica foi exposta, onde foi possível exteriorizar o coração e posteriormente realizar a separação do átrio direito (AD) e dos ventrículos.

Os animais tiveram o coração lavado em solução salina, foram secos, separados o VE e pesados. O VE foi congelado imediatamente para as análises posteriores de Western blotting. O útero, gordura perirrenal (GPR), gordura inguinal (GI) também foram isolados, lavados com solução fisiológica e pesados utilizando uma balança analítica de precisão. A tíbia também foi isolada, limpa e medida seu comprimento. A massa dos órgãos foi estimada pela razão do peso do órgão (g) pelo comprimento da tíbia (cm).

## **1.8 EXPRESSÃO PROTEICA PELA TÉCNICA DE WESTERN BLOTTING**

### **1.8.1 Quantificação de proteínas e preparo das amostras**

As amostras do VE foram homogeneizadas em tampão de lise contendo: Tris-HCL pH 7,4 (10 mM), NaVO<sub>3</sub> (1 mM), SDS (1%), DTT (0,5 mM), EDTA (5 mM), PMSF (1 mM) e inibidor de protease (diluição 1: 100). Os homogeneizados do tecido cardíaco foram centrifugados por 20 minutos a 12.000 rpm com temperatura a 4° C (Eppendorff, Alemanha). Após a centrifugação foi coletado o sobrenadante para

quantificar a concentração de proteínas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando a albumina de soro bovina (BSA) como padrão. Os homogeneizados do tecido cardíaco foram centrifugados por 20 minutos a 12.000 rpm com temperatura a 4° C (Eppendorff, Alemanha). Após a centrifugação foi coletado o sobrenadante para quantificar a concentração de proteínas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando a albumina de soro bovina (BSA) como padrão.

### 1.8.2 Eletroforese e Transferência das amostras

As amostras homogeneizadas (50 µg) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 10-12,5% (gel de corrida: Tris 1,5M – SDS (0,1%) pH 8,6, Bis/Acrilamida 30%, APS 10% e Temed) e 4% (gel de entrada: Tris 0,5M – SDS (0,1%) pH 6,8, Bis/Acrilamida 30%, APS 10% e Temed). Após a polimerização dos géis, os mesmos foram colocados em uma cuba contendo tampão de corrida para eletroforese (Tris Base 25 mM, Glicina 192 mM e SDS 0,1%) e foi pipetado as amostras nos poços do gel de entrada. Logo após, foi realizado a corrida das proteínas por meio da eletroforese por aproximadamente 2 horas e 30 minutos a uma corrente constante de 60V nos primeiros 20 min e depois a 100V, observando sempre o marcador de peso molecular (PowerPac™ HC, BioRad, CA, EUA). Em seguida, foi montado um sistema de sanduíche contendo o gel, membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF), papel filtro e esponjas para colocar na cuba com uma solução de tampão de transferência (Tris Base 25 mM, Glicina 192 mM e Metanol 20%) que foi mantida em aproximadamente 4° C durante todo processo de transferência das proteínas para as membranas por um período de 2 horas à 80V.

### 1.8.3 Incubação com os Anticorpos

Após a transferência em um sistema de blotting úmido, as membranas foram bloqueadas com TBS-T (NaCl 100 mM, Tris Base 10 mM, Tween 20 à 0,1%, pH 7,6) + leite desnatado (5%) por um período de aproximadamente 1 h e 30 min e depois lavadas com TBS-T por 4 vezes de 5 min. Após lavar as membranas, as mesmas foram incubadas overnight aos seguintes anticorpos primários: antiSERCA2a

([1:1000], Affinity BioReagents, LOT UI2839274 CO, USA); anti-PLB ([1:1000], invitrogen, LOT TI270655, CO, USA); anti-p-Ser16-PLB ([1:1000], Abcam, LOT Inc., EUA); SOD 1 ([1:200], LOT 0801 Sigma, Estados Unidos); Catalase (CAT) ([1:2000] Sigma, LOT E1418, Estados Unidos); e anti-Glicealdeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) ([1:4000], Merck Millipore, LOT 015M4824V, Alemanha). As membranas foram novamente lavadas com TBS-T e incubadas por 1 h e 30 min com anticorpos secundários conjugados à peroxidase IgG anti-mouse ou rabbit (1: 5000; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), de acordo com as especificações dos anticorpos primários. Os procedimentos de bloqueio, lavagem e incubação foram realizados sob agitação.

#### 1.8.4 Detecção das Bandas de Proteínas

Após a incubação com os anticorpos secundários, foi adicionado nas membranas 1 ml do reagente de detecção quimioluminescente ECL Prime Western Blotting (GE Healthcare, Reino Unido) e, por fim, iniciou a imunodeteção por meio do ChemiDoc (Bio-Rad). As proteínas foram quantificadas através do software Bio-Rad Image Lab 6.0.1. As mesmas membranas foram usadas para determinar a expressão de GAPDH que foi usado para normalizar os níveis de expressão das demais proteínas.

### 1.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. Os dados foram previamente analisados, quanto à normalidade por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados foram analisados utilizando a análise de variância de uma via (one-way ANOVA), seguido pelo teste post hoc de Tukey. Nos dados onde avaliação da influência do tempo sobre o parâmetro avaliado, foi utilizada análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste post hoc de Sidak's. A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism, versão 8 (Software Graph Pad, La Jolla, CA, USA).

## REFERÊNCIAS

- Baldo, M. P., Forechi, L., Morra, E. A. S., Zaniqueli, D., Machado, R. C., Lunz, W., Rodrigues, S. L., & Mill, J. (2011). Long-term use of low-dose spironolactone in spontaneously hypertensive rats: Effects on left ventricular hypertrophy and stiffness. *Pharmacological Reports*, *63*(4), 975–982. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(11\)70613-2](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(11)70613-2)
- Becker, J. B., Arnold, A. P., Berkley, K. J., Blaustein, J. D., Eckel, L. A., Hampson, E., Herman, J. P., Marts, S., Sadee, W., Steiner, M., Taylor, J., & Young, E. (2005). Strategies and methods for research on sex differences in brain and behavior. *Endocrinology*, *146*(4), 1650–1673. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1142>
- BRASIL. Conselho Nacional de Cuidado na Experimentação Animal - CONCEA. Regula a vinculação de centros públicos ou privados que realizam procedimentos em animais vivos em atividades de ensino, extensão, capacitação, treinamento, transferência de tecnologia, ou quaisquer outras com finalidade didática, ao sistema legal que regula o funcionamento do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA. Resolução Normativa nº 39 Do Concea, de 25 de julho de 2018. Diário Oficial da União, Brasília, DF, D.O.U. de 25.06.2018, Seção I, Pág. 7
- Brasil, G. A., Lima, E. M. De, Nascimento, A. M. Do, Caliman, I. F., Medeiros, A. R. S. De, Silva, M. S. B., Abreu, G. R. De, Reis, A. M. Dos, Andrade, T. U. De, & Bissoli, N. S. (2015). Nandrolone decanoate induces cardiac and renal remodeling in female rats, without modification in physiological parameters: The role of ANP system. *Life Sciences*, *137*, 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.07.005>
- Forechi, L., Baldo, M. P., Meyerfreund, D., & Mill, J. G. (2012). Granulocyte colony-stimulating factor improves early remodeling in isoproterenol-induced cardiac injury in rats. *Pharmacological Reports*, *64*(3), 643–649. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(12\)70860-5](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(12)70860-5)
- Goldman, J. M., Murr, A. S., & Cooper, R. L. (2007). The Rodent Estrous Cycle. *Birth Defects Research*, *80*(2), 83–97. <https://doi.org/10.1002/bdrb>
- Jørgensen, M. S., Tornqvist, K. S., & Hvid, H. (2017). *Jørgensen, Tornqvist, Hvid -*

2017 - Calculation of Glucose Dose for Intraperitoneal Glucose Tolerance Tests in Lean and Obese Mice. *56*(1), 95–97.

- Nascimento, A. M. do, Lima, E. M. de, Brasil, G. A., Caliman, I. F., Silva, J. F. da, Lemos, V. S., Andrade, T. U. de, & Bissoli, N. S. (2016). Serca2a and Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger are involved in left ventricular function following cardiac remodelling of female rats treated with anabolic androgenic steroid. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *301*, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.04.001>
- Saber, S. M., & Abd El-Rahman, H. A. (2019). Liraglutide treatment effects on rat ovarian and uterine tissues. *Reproductive Biology*, *19*(3), 237–244. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2019.07.003>
- Yener, T., Turkkani Tunc, A., Aslan, H., Aytan, H., & Caliskan, A. C. (2007). Determination of oestrous cycle of the rats by direct examination: How reliable? *Journal of Veterinary Medicine Series C: Anatomia Histologia Embryologia*, *36*(1), 75–77. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.2006.00743.x>



## Low and high doses of oxandrolone promote pathological cardiac remodeling in young male rats

Silas Nascimento Ronchi<sup>a</sup>, Edgar Mendes Souza Wan Mao<sup>a</sup>, Nara Rubia Dalla Bernardina<sup>a</sup>, Antonio Ferreira de Melo Júnior<sup>a</sup>, Wedson Correa dos Santos<sup>b</sup>, Tadeu Uggere de Andrade<sup>b</sup>, Gírlândia Alexandre Brasil<sup>b,\*</sup>, Nazare Gouna Bisoli<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Physiological Sciences, Federal University of Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil

<sup>b</sup> Pharmaceutical Sciences Graduate Program, University Vila Velha, Vila Velha, ES, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Anabolic androgenic steroid  
Cardiac remodeling  
Cardiac contractility  
Angiotensin-converting enzyme  
Renin-angiotensin system  
Oxidative stress

### ABSTRACT

Oxandrolone (OXA) used in clinical practice, however, its misuse is frequent, including by adolescents pursuing an aesthetic goal. However, the impacts of noxious doses on the cardiovascular system remain unknown.

Aim: To investigate cardiac effects of OXA in low (LD) and high (HD) doses.

Methods: Male Wistar prepubescent rats were separated into 3 experimental groups: control (CON), LD, and HD. Only the CON group received the carrier (carboxymethylcellulose, 0.5%), while the LD and HD groups received, respectively, 2.5 and 37.5 mg/kg/day of OXA via gavage for 4 weeks. The hemodynamic parameters (+dP/dtmax, -dP/dtmin, and Tau) and cardiac autonomic tones were assessed. Hearts were retrieved for histological analyses and oxidative stress evaluation. Expression levels of calcium-handling proteins were measured by western blot.

Results: The OXA treatment changed neither the cardiac contractility nor the cardiac autonomic tones. However, cardiac hypertrophy, collagen deposition, and increased angiotensin-converting enzyme (ACE) expression were observed in a dose-dependent way. Also, the p-phospholamban (p-PLB)/PLB ratio was observed to decrease and increase, respectively, in the LD and HD groups; the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2a (SERCA2a)/PLB ratio being higher in both groups. OXA increased SOD1 expression and decreased catalase expression only in the LD group, and protein oxidation was increased in HD.

Conclusion: Both doses of OXA could promote pathological cardiac remodeling, probably via increased ACE, and these effects were exacerbated in the HD treatment, but cardiac contractility was not affected regardless of the dose.

### 1. Introduction

Oxandrolone (OXA) is a synthetic anabolic androgenic steroid (AAS) analogue to testosterone. OXA is used in clinical practice to treat severe burns, traumas after major surgery, muscle loss related to acquired immunodeficiency syndrome, neuromuscular disorders, hereditary angioedema, and alcoholic hepatitis [1]. Additionally, OXA is used in juvenile patients to treat growth-related changes, such as idiopathic short stature, as well as rare diseases like Turner Syndrome (TS) [2,3].

However, due to its anabolic effects, the misuse of OXA for aesthetic purposes is widespread [4–6], by both adults and adolescents [7,8]. Generally, OXA cause a great number of adverse effects, such as

thickening of voice, clitoromegaly, facial hair growth, alopecia, acne, increased LH/FSH, changes in the estrous cycle in girls with TS. Despite its therapeutic indication, the main reason for OXA discontinuation is the onset of adverse effects [9]. Overall, AAS abuse can promote impairment on the cardiovascular system, as shown in previous studies by our group [10–15] and others [16–21]. This abuse can promote changes on redox balance and induce oxidative stress [22].

Some studies have reported deleterious effects in animals treated with AAS (testosterone propionate and nandrolone) during adolescence [19,23,24]; however, there are no previous reports in literature regarding possible OXA effects on the cardiovascular system [25], at this or any age. The hypothesis of the present work was that the chronic

\* Corresponding author at: Department of Pharmaceutical Sciences, University Vila Velha, Av. Conselheiro José Dantas de Melo, 31, Vila Velha, ES 29103-920, Brazil.

E-mail address: [dragirlandia@gmail.com](mailto:dragirlandia@gmail.com) (G.A. Brasil).

<https://doi.org/10.1016/j.steroids.2021.108814>

Received 24 August 2020; Received in revised form 16 February 2021; Accepted 24 February 2021

Available online 13 March 2021

0091-2818/© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.

