

**Avaliação da contração isométrica do ventrículo
direito após o infarto agudo do miocárdio em ratas
ovariectomizadas**

Karina Giuberti

**Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas
(Fisiologia Cardiovascular)**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória, Março 2005.**

Avaliação da contração isométrica do ventrículo direito após o infarto agudo do miocárdio em ratas ovariectomizadas

Karina Giuberti

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas - Fisiologia Cardiovascular.

Aprovada em 23/03/2005 por:

Prof^ª. Dr^ª. Ivanita Stefanon - Orientadora, UFES, PPGCF

Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo, UFES, PPGCF

Prof^ª. Dr^ª. Ana Lucia Kalinin, UFSCAR/SP

Coordenadora do PPGCF:

Prof^ª. Dr^ª. Ester Miyuki Nakamura Palácios

Universidade Federal do Espírito Santo - Vitória, Março de 2005.

Karina Giuberti

**Avaliação da contração isométrica do ventrículo
direito após o infarto agudo do miocárdio em ratas
ovariectomizadas**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas - Fisiologia Cardiovascular.

ORIENTADORA

Prof^a. Dr^a. Ivanita Stefanon

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Centro Biomédico
Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória, Março de 2005.**

Dedico esta dissertação de mestrado aos meus pais José Renato e Terezinha, que foram e são os mestres mais importantes da minha vida.

Ao meu irmão e cunhada por estarem sempre presentes e ao meu namorado pelo amor, paciência e incentivo.

Quero também agradecer a quem me estendeu a mão e tornou possível a realização deste trabalho. Pela confiança, carinho e amizade, muitas vezes ela foi muito mais que orientadora, foi também um exemplo como profissional e ser humano.

Ivanita, obrigada por tudo.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por dirigir meus passos e abrir meus caminhos, dando-me paz, saúde, felicidade e prosperidade.

Ao Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo, pelos ensinamentos e sabedoria comigo compartilhados, pelas conversas descontraídas e bom humor.

À professora Ana Lucia Kalinin por ter aceito participar da avaliação deste trabalho.

À toda minha família pelo apoio e confiança de sempre, especialmente minha avó Telvina pelo amor incondicional, meus tios Adelson e João que nunca se esquecem de mim, tia Johana por andar de mãos dadas comigo e ao tio Elízio pelo apoio "técnico e moral".

À Patrícia Bianchi, grande amiga dentro e fora do laboratório. Responsável pela minha ida para o LEMC e pela idéia do mestrado. Pelas traduções de inglês mesmo cansada, à 1h da manhã. Por estar ao meu lado nos momentos difíceis quando eu mesma, muitas vezes precisei ter esperanças.

Aos meus amigos Luciana Venturini e Sílvia Preti pela acolhida no LEMC desde o 1º. dia. Fizeram-me acreditar que eu poderia estar ali.

Aos colegas Carlos Damiani e Cleci Menezes pela paciência e ensinamentos da técnica papilar, quando as dúvidas eram muitas e a habilidade zero. Sem vocês as dificuldades teriam sido muito maiores.

Ao Franck Peçanha, Giulia Wiggers, Flávia Cardoso e Adriana Caiado, por estarmos juntos e indo ao nosso objetivo comum, passando por obstáculos, alegrias e tristezas do dia-a-dia. Agradeço por serem meus amigos.

Ao Altemar Paigel, que com sua inteligência e disposição em me ajudar, muito contribuiu para a obtenção dos meus resultados.

Aos companheiros do LEMC – Laboratório de Eletromecânica Cardíaca: Fabiano, Carmem, Alessandra, Evandro, Matheus, Fabíola, Diego, Rita, Luís, Brenda, Aline, Leonardo, Ana Paula, Raquel, Aurélia, Juliana, Saulo, Geysa, Anderson, Eduardo, Fabiana, Rosenberg e demais novatos, obrigada.

À professora Cicilini pela amizade e também aos demais professores da Pós-graduação, obrigada pelos ensinamentos.

Aos funcionários Cláudia, Fonseca e Maria pelo apoio técnico.

À madrinha Liliana por todo incentivo, oportunidade, confiança, paciência e acima de tudo, amizade. Obrigada.

À Capes e ao CNPq pelo apoio financeiro à realização deste trabalho.

"A vida é uma questão de nervos e fibras, e de células lentamente organizadas onde o pensamento se esconde e a paixão tem seus sonhos. Podemos nos imaginar seguros e fortes, mas uma simples tonalidade de um cômodo ou de um céu matutino, um perfume particular que um dia adoramos e que nos traz sutis recordações, um verso de um poema esquecido que nos volta a cruzar o espírito, a cadência de uma melodia que paramos de tocar - posso lhe garantir, é de coisas assim que as nossas vidas dependem."

Lorde Henry, 1890.

SUMÁRIO

Resumo	18
Abstract	20
1	
INTRODUÇÃO	23
1.1 HORMÔNIOS SEXUAIS FEMININOS.....	23
1.2 INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO.....	32
1.2.1 Complicações cardíacas do infarto agudo do miocárdio (IAM)	33
1.3 CONTRATILIDADE CARDÍACA.....	34
2	
OBJETIVOS	37
2.1 OBJETIVO GERAL.....	37
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
3	
MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	40
3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	40
3.3 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS.....	41
3.3.1 Ovariectomia bilateral	41
3.3.2 Infarto agudo do miocárdio	41
3.4 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE INFARTO DO MIOCÁRDIO.....	42
3.5 AVALIAÇÃO DA ÁREA DE INFARTO.....	42
3.6 AVALIAÇÃO DA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA	43
3.7 AVALIAÇÃO DA CONTRATILIDADE CARDÍACA.....	43
3.8 AVALIAÇÃO DA INCIDÊNCIA DE EXTRASSÍSTOLES.....	44
3.9 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	45
3.9.1 Análise da potenciação pós-pausa	45
3.9.2 Curva concentração-resposta ao cálcio extracelular	45

3.9.3 Curva concentração-resposta ao isoproterenol.....	46
3.10 DROGAS E REAGENTES.....	47
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48

4

RESULTADOS.....	50
4.1 AVALIAÇÃO PONDERAL CORPORAL, DO ÚTERO, DOS VENTRÍCULOS, DOS PULMÕES E DA ÁREA DE INFARTO.....	50
4.2 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INOTRÓPICA AO ISOPROTERENOL.....	56
4.3 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INOTRÓPICA AO CÁLCIO EXTRACELULAR.....	59
4.4 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE ATIVAÇÃO E RELAXAMENTO NA RESPOSTA INOTRÓPICA AO ISOPROTERENOL.....	62
4.5 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE ATIVAÇÃO E RELAXAMENTO NA RESPOSTA INOTRÓPICA AO CÁLCIO.....	66
4.6 AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO NA CONTRATILIDADE E RELAXAMENTO DO VENTRÍCULO DIREITO.....	70
4.7 AVALIAÇÃO DA INCIDÊNCIA DE EXTRASSÍSTOLES.....	72

5

DISCUSSÃO.....	74
-----------------------	-----------

6

CONCLUSÃO.....	81
-----------------------	-----------

7

REFERÊNCIAS.....	83
-------------------------	-----------

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores de peso corporal, peso do útero/PC, área de infarto/PC, peso dos ventrículos/PC e peso dos pulmões/PC dos grupos controle (Cont), ovariectomizados (Cast), infartados com IC (Inf-IC) e ovariectomizados-infartados com IC (Cast-Inf-IC).	51
Tabela 2: Valores da contração basal, Log do EC_{50} e $R_{máx}$ obtidos em curvas concentração-resposta ao isoproterenol em tiras de VD de animais controle (Cont), ovariectomizados (Cast), infartados com insuficiência cardíaca (Inf-IC) e ovariectomizados-infartados com insuficiência cardíaca (Cast-Inf-IC).	56
Tabela 3: Valores da contração basal, Log do EC_{50} e $R_{máx}$ obtidos em curvas concentração-resposta ao cálcio extracelular em tiras de VD de animais controle (Cont), ovariectomizados (Cast), infartados com insuficiência cardíaca (Inf-IC) e ovariectomizados-infartados com insuficiência cardíaca (Cast-Inf-IC).	59
Tabela 4: Valores do TA obtidos em diferentes concentrações isoproterenol, em tiras de VD de animais controle (Cont), ovariectomizados (Cast), infartados com insuficiência cardíaca (Inf-IC) e ovariectomizados-infartados com insuficiência cardíaca (Cast-Inf-IC).	62
Tabela 5: Valores do TR obtidos em diferentes concentrações isoproterenol, em tiras de VD de animais controle (Cont), ovariectomizados (Cast), infartados com insuficiência cardíaca (Inf-IC) e ovariectomizados-infartados com insuficiência cardíaca (Cast-Inf-IC).	64
Tabela 6: Valores do TA obtidos em diferentes concentrações de cálcio extracelular, em tiras de VD de animais controle (Cont), ovariectomizados (Cast), infartados com insuficiência cardíaca (Inf-IC) e ovariectomizados-infartados com insuficiência cardíaca (Cast-Inf-IC).	66
Tabela 7: Valores do TR obtidos em diferentes concentrações de cálcio extracelular, em tiras de VD de animais controle (Cont), ovariectomizados (Cast), infartados com insuficiência cardíaca (Inf-IC) e ovariectomizados-infartados com insuficiência cardíaca (Cast-Inf-IC).	68
Tabela 8: Valores relativos das contrações pós-pausa (PPP) obtidas após diferentes intervalos de pausa (15", 30", 60" e 120") em tiras de VD de animais controle (Cont), ovariectomizados (Cast), infartados com insuficiência cardíaca (Inf-IC) e ovariectomizados-infartados com insuficiência cardíaca (Cast-Inf-IC).	70

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Peso corporal (g), dos grupos controle (Cont; n=16), ovariectomizado (Cast; n=19), infartado com IC (Inf-IC; n=7) e ovariectomizado-infartado com IC (Cast-Inf-IC; n=6). 52
- Figura 2:** Área de infarto (%) dos grupos infartado com IC (Inf-IC; n=7) e ovariectomizado-infartado com IC (Cast-Inf-IC; n=6). 53
- Figura 3:** (A): Razão do peso do útero/peso corporal (mg/g) e (B) razão do peso dos pulmões/peso corporal (mg/g) dos grupos controle (Cont; n=16), ovariectomizado (Cast; n=19), infartado com IC (Inf-IC; n=7), ovariectomizado-infartado com IC (Cast-Inf-IC; n=6). 54
- Figura 4:** (A): Razão do peso do ventrículo direito (VD)/peso corporal e (B) esquerdo (VE)/peso corporal (mg/g) dos grupos controle (Cont; n=16), ovariectomizado (Cast; n=19), infartado com IC (Inf-IC; n=7) e ovariectomizado-infartado com IC (Cast-Inf-IC; n=6). 55
- Figura 5:** Curvas concentração-resposta ao isoproterenol dos grupos controle (Cont; n=16), ovariectomizado (Cast; n=20), infartado com IC (Inf-IC; n=8) e ovariectomizado-infartado com IC (Cast-Inf-IC; n=10). (A): dados absolutos (g/g) e (B): dados normalizados para força basal 1. 57
- Figura 6:** (A): Contração basal à curva de isoproterenol, em Ca^{+2} extracelular 0,62 mM + ácido ascórbico 0,3 mM + EDTA 0,03 mM e (B), resposta ao isoproterenol (10^{-2} M) das tiras de VD de animais controle (Cont; n=16), (Cast; n=20), infartados com insuficiência cardíaca (Inf-IC; n=8) e ovariectomizados-infartados com insuficiência cardíaca (Cast-Inf-IC; n=10). 58
- Figura 7:** Curvas concentração-resposta ao cálcio extracelular dos grupos controle (Cont; n=10), ovariectomizado (Cast; n=13), infartado com IC (Inf-IC; n=7) e ovariectomizado-infartado com IC (Cast-Inf-IC; n=6). (A): dados absolutos (g/g) e (B): dados normalizados para força basal 1. 60

Figura 8: (A): Contração basal à curva de cálcio extracelular em Ca^{+2} 0,62 mM e (B), resposta ao cálcio extracelular (5 mM) das tiras de VD de animais controle (Cont; n=10), (Cast; n=13), infartados com insuficiência cardíaca (Inf-IC; n=7) e ovariectomizados-infartados com insuficiência cardíaca (Cast-Inf-IC; n=6). 61

Figura 9: Parâmetros temporais do tempo de ativação obtidos por diferentes concentrações de isoproterenol, em tiras de VD de animais controle (Cont; n=11), ovariectomizados (Cast; n=11), infartados com insuficiência cardíaca (Inf-IC; n=5) e ovariectomizados-infartados com insuficiência cardíaca (Cast-Inf-IC; n=7). (A): Avaliação do TA na curva concentração-resposta ao isoproterenol, de todos os grupos. (B): Avaliação do TA na contração basal de todos os grupos em Ca^{+2} 0,62 mM + EDTA 0,03 mM + ácido ascórbico 0,3 mM. (C): Resposta do TA de todos os grupos na dose de isoproterenol 10^{-2} M. 63

Figura 10: Efeito do isoproterenol sobre os dados temporais de relaxamento de tiras de VD de animais controle (Cont; n=9), ovariectomizados (Cast; n=10), infartados com insuficiência cardíaca (Inf-IC; n=6) e ovariectomizados-infartados com insuficiência cardíaca (Cast-Inf-IC; n=6). 65

Figura 11: Efeito do cálcio extracelular sobre os dados temporais de ativação, em tiras de VD de animais controle (Cont; n=9), ovariectomizados (Cast; n=10), infartados com insuficiência cardíaca (Inf-IC; n=6) e ovariectomizados-infartados com insuficiência cardíaca (Cast-Inf-IC; n=6). (A): Avaliação do TA na curva concentração-resposta ao cálcio extracelular, de todos os grupos. (B): Avaliação do TA na contração basal de todos os grupos em Ca^{+2} 0,62 mM. (C): TA de todos os grupos no cálcio extracelular 5 mM. 67

Figura 12: Efeito do cálcio extracelular sobre os dados temporais de relaxamento de tiras de VD de animais controle (Cont; n=9), ovariectomizados (Cast; n=10), infartados com insuficiência cardíaca (Inf-IC; n=6) e ovariectomizados-infartados com insuficiência cardíaca (Cast-Inf-IC; n=6). 69

Figura 13: Índice relativo das contrações pós-pausa (PPP) obtidas após diferentes intervalos de pausa (15", 30", 60" e 120") em tiras de VD de animais controle (Cont; n=16), ovariectomizados (Cast; n=17), infartados com insuficiência cardíaca (Inf-IC; n=7) e ovariectomizados-infartados com insuficiência cardíaca (Cast-Inf-IC; n=8). 71

Figura 14: Percentual da incidência geral de arritmias em tiras de VD de animais controle (Cont; n=48), ovariectomizados (Cast; n=60) infartados com insuficiência cardíaca (Inf-IC; n=8) e ovariectomizados-infartados com insuficiência cardíaca (Cast-Inf-IC; n=10). 72

RESUMO

Estudos têm demonstrado a associação entre as doenças cardiovasculares e a ausência da produção dos hormônios sexuais ovarianos após a menopausa. O principal hormônio ovariano é o estrogênio, que age como bloqueador de canais de cálcio do tipo-L no músculo cardíaco, atuando na responsividade dos filamentos contráteis ao cálcio. Por outro lado, uma das consequências do infarto agudo do miocárdio com sinais de insuficiência cardíaca, é a redução da contratilidade miocárdica. Sendo assim, o objetivo deste trabalho, foi de investigar a participação dos hormônios sexuais ovarianos sobre o desempenho contrátil cardíaco, de ratas submetidas ao infarto agudo do miocárdio.

Ratas Wistar de 10 ± 1 semanas de idade foram divididas em 4 grupos: controle (Cont), ovariectomizadas (Cast), infartadas com insuficiência cardíaca (Inf-IC) e ovariectomizadas e infartadas com insuficiência cardíaca (Cast-Inf-IC). A ovariectomia bilateral foi realizada 1 semana antes da cirurgia de infarto. A cirurgia de infarto foi induzida através da oclusão da artéria coronária descendente esquerda. Após 60 dias, tiras de ventrículo direito foram colocadas em cubas superfundidas com solução de Krebs-Henseleit montadas em preparação de tensão isométrica. A contratilidade miocárdica foi avaliada através de curvas concentração-resposta ao isoproterenol (10^{-7} a 10^{-2} M) e ao cálcio extracelular (0,62 a 5 mM). O isoproterenol e o cálcio extracelular promoveram aumento de contratilidade em todos os grupos. Ocorreu queda da contratilidade miocárdica após o infarto e a ausência dos hormônios ovarianos não modificou este parâmetro (Isoproterenol –

Rmáx: Cont=80 ± 7; Cast=74 ± 6; Inf-IC=37 ± 7* e Cast-Inf-IC=19 ± 3* g/g e Cálcio – Rmáx: Cont=112 ± 10; Cast=96 ± 8; Inf-IC=46 ± 8* e Cast-Inf-IC=29 ± 12* g/g; *p<0,05 vs Cont). A ovariectomia não alterou a área de infarto (Inf-IC=42,3 ± 2,1 e Cast-Inf-IC=39,1 ± 1,7 %). O tempo de ativação da contração ao isoproterenol somente foi maior nos grupos Inf-IC e Cast-Inf-IC, em algumas doses em relação ao grupo Cont, enquanto, o tempo de relaxamento não foi diferente em nenhum grupo. O tempo de ativação da contração ao cálcio, foi maior nos grupos Cast e Cast-Inf-IC, em doses diferentes, quando comparados ao grupo Cont, e o tempo de relaxamento foi maior nos grupos Cast e Inf-IC, em doses diferentes, quando comparados ao grupo Cont. A castração praticamente dobrou a incidência geral de arritmias (Cont=32; Cast=62; Inf-IC=29 e Cast-Inf-IC=30 %).

Em resumo, o principal resultado do presente estudo indica que a ausência dos hormônios ovarianos, induzida pela ovariectomia, não interferiu na contração isométrica do ventrículo direito do grupo controle e nem 60 dias pós-infarto do miocárdio.

ABSTRACT

The association between cardiovascular diseases and absence of ovarian sex hormones production are showed in some studies. The most important ovarian hormone is the estrogen, which act as a calcium L-type channels blocker in cardiac muscle, changing the calcium contractility filament response. One of the consequence of acute myocardial infarction with heart failure sign, is the reduction of cardiac contractility. The aim of this study was to investigate the ovarian sex hormones modulation on the cardiac contractility performance of female rats submitted to myocardial infarction.

Wistar female rats with 10 ± 1 weeks old were allocated to 4 groups: control (Cont), ovariectomy (Cast), infarcted with sign of heart failure (Inf-IC) and ovariectomy + infarcted with sign of heart failure (Cast-Inf-IC). The bilateral ovariectomy was produced 1 week before the myocardial infarction surgery. The myocardial infarction surgery was induced by anterior descending branches of the left coronary artery ligation. After 60 days, right ventricle strips (VD) were mounted for isometric records, superfused with buffered Krebs-Hanseleit solution. Were evaluated force alterations during $[Ca^{+2}]_e$ (0,62 to 5 mM) and Isoproterenol (10^{-7} to 10^{-2} M) perfusion. Both isoproterenol and calcium promoted a positive inotropic action in every groups. The ovariectomy did not modify the results. Positive isometric force was reduced after myocardial

infarction. (Isoproterenol - Rmax: Cont=80 ± 7; Cast=74 ± 6; Inf-IC=37 ± 7* and Cast-Inf-IC=19 ± 3* g/g and Calcium - Rmax: Cont=112 ± 10; Cast=96 ± 8; Inf-IC=46 ± 8* and Cast-Inf-IC=29 ± 12* g/g; *p<0,05 *vs* Cont). The ovariectomy did not modify the infarction area (Inf-IC=42,3 ± 2,1 and Cast-Inf-IC=39,1 ± 1,7 %). The time to pick of isoproterenol response was increased only in some doses of Inf-IC and Cast-Inf-IC *vs* Cont groups, meanwhile no group presented any difference on the relaxation time. The time to pick from calcium response was either great only some doses of Cast and Cast-Inf-IC *vs* Cont groups, meanwhile the relaxation time was increased in different doses at Cast and Inf-IC groups *vs* Cont group. The ovariectomy almost double the general arrhythmia incidence (Cont=32; Cast=62; Inf-IC=29 and Cast-inf-IC=30 %).

In resume, the main result of this study was that the absence of ovarian sex hormones, induced by ovariectomy, did not interfere in the VD isometric force of control group neither 60 days after myocardial infarction.

1 INTRODUÇÃO

1.1 HORMÔNIOS SEXUAIS FEMININOS

A incidência do infarto agudo do miocárdio (IAM) aumenta progressivamente com a idade e na presença de fatores de risco como hipertensão, tabagismo, diabetes *mellitus* e hipercolesterolemia genética (1). Há algumas décadas, as doenças cardiovasculares são a primeira causa de morte no Brasil, segundo registros oficiais do Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM) (2). Em 2000, corresponderam a mais de 27 % do total de óbitos, ou seja, neste ano, 255.585 pessoas morreram por doenças do aparelho circulatório, frequentemente IAM (2). No Espírito Santo 5,64 % das mortes registradas em 2001, tiveram como origem o IAM, sendo a relação de 60 % de homens para 40 % de mulheres. Nas mulheres, aproximadamente 12 % das mortes por IAM ocorreram até os 49 anos e 88 %, acima dos 50 anos de idade (2).

Durante toda a vida, os homens apresentam um risco maior de IAM do que as mulheres, com declínio progressivo da diferença com o avanço da idade (3-5). Estudos têm demonstrado que a incidência de hipertensão arterial, bem como outras doenças cardiovasculares, aumenta em mulheres após a menopausa (5,6). E não é apenas o fator idade que está envolvido nesta incidência, mas também a diminuição ou ausência da produção dos HSO (7). As mulheres são notavelmente protegidas contra o infarto durante a vida reprodutiva, fato atribuído aos hormônios ovarianos estrogênicos, com exceção daquelas que apresentam alguma condição aterogênica predisponente.

Os principais hormônios sexuais da mulher são os esteróides: estrógenos, progesterona e em menor proporção, os andrógenos. Os principais esteróides sexuais femininos são os estrogênios e a progesterona. O 17 β -estradiol (E_2) é o estrogênio esteroidal de ocorrência natural mais abundante e potente, seguidos da estrona (E_1) e do estriol (E_3). Durante a fase reprodutiva da mulher, a maior fonte produtora de estrogênios é o folículo ovariano e o corpo lúteo que dele resulta após a ovulação. No climatério, a função ovariana diminui, com conseqüente redução na produção de estradiol (8).

Como efeito preponderante, o estrogênio e a progesterona atuam de forma coordenada para desenvolver e manter as características sexuais secundárias e a atividade reprodutiva da mulher.

As principais ações da progesterona sobre os tecidos-alvo são (9):

LOCAL	AÇÃO
ÚTERO	- manutenção da fase secretória lútea
GLÂNDULAS MAMÁRIAS	- desenvolvimento celular
HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE	- <i>feedback</i> negativo sobre a secreção de LH e FSH

GRAVIDEZ	- manutenção da gravidez e aumento do limiar uterino para estímulo contrátil
----------	--

A progesterona também tem sido amplamente utilizada em associação ao estrógeno na terapia de reposição hormonal com a finalidade de diminuir o risco de câncer de endométrio. Por outro lado, observou-se decréscimo da incidência de doenças cardiovasculares tanto entre mulheres que fazem uso apenas de estrógeno quanto em usuárias da associação estrógeno/progesterona (10). Quanto ao estrogênio, as principais ações são (11):

LOCAL	AÇÃO
TUBAS UTERINAS	- crescimento e diferenciação celular
ÚTERO	- crescimento do endométrio e miométrio
HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE	- secreção de LH e FSH
EPITÉLIO VAGINAL	- crescimento e diferenciação celular
GLÂNDULAS ENDOCERVICAIS	- hipertrofia e aumento da secreção de muco
GLÂNDULAS MAMÁRIAS	- crescimento celular e lactação
OVÁRIOS	- aumento do peso ovariano, estimulação do crescimento folicular e manutenção do corpo lúteo
TECIDO CONJUNTIVO	- edema de pele, de tecido celular subcutâneo e espessamento das fibras colágenas

OSSOS	- ativação da deposição de cálcio e ossificação precoce das cartilagens epifisárias dos ossos longos
SISTEMA NERVOSO CENTRAL	- atividade elétrica espontânea de neurônios
SISTEMA CARDIOVASCULAR	- composição da parede dos vasos, ativação da coagulação sangüínea, diminuição do colesterol plasmático e aumento do colesterol hepático

Uma vez atingido o período de maturidade sexual, a mulher apresenta uma fase, *menacme*, que é o período em que se encontra apta para a reprodução, até a ocorrência da menopausa (12).

Antes da menopausa, as mulheres apresentam menor pressão arterial que homens na mesma faixa etária (13) e são menos acometidas por doenças cardíacas ou acidente vascular cerebral.

A menopausa é a cessação dos ciclos menstruais, sendo mais um processo que um evento único. Uma mulher que não menstrua há um ano inteiro ou tem um nível de FSH superior a 30 mUI/ml é considerada em menopausa. Este processo decorre da diminuição gradual da função ovariana e dos níveis de estrogênio (14). A perda da produção do estrogênio endógeno pelos ovários após a menopausa, deixa de conferir às mulheres a proteção pré-menopausa quanto aos riscos de doenças cardíacas e vasculares (15), confirmando o aumento destas incidências neste período (5,6).

Mulheres na pós-menopausa apresentam maior pressão arterial, fato atribuído à diminuição do efeito vasodilatador do estradiol (16). Evidências atestam que o perfil lipídico também se altera com aumento nas taxas de triglicérideo,

colesterol total e LDL colesterol, acelerando a aterosclerose e o ganho de peso (17-23).

O papel da terapia de reposição hormonal (TRH) em mulheres pós-menopausa ainda não está bem definido. Existem os aspectos positivos da reposição, como prevenção da osteoporose, proteção vascular, diminuição do risco de doença de Alzheimer (24), do câncer de colo intestinal, redução de 50 % na mortalidade por cardiopatias coronárias (3,25) e menor perda de dentes (26). Existem também as contra-indicações absolutas como TRH em pacientes com sangramento uterino anormal não diagnosticado e doenças hepáticas, e as contra-indicações relativas, como pacientes com histórico de câncer de mama e colo de útero ou doenças trombogênicas (15). A TRH pode também aumentar o risco de um segundo evento cardiovascular no primeiro ano de uso, por maior incidência de trombose venosa profunda, doença biliar e embolia pulmonar (27).

Estudos recentes do "The National Heart, Lung and Blood Institute" (NHLBI) (28), pertencente ao "National Institutes of Health" (NIH) (29), interromperam precocemente o maior *trial*/ clínico "Women`s Health Initiative" (WHI) (30) sobre os riscos e benefícios da combinação estrogênio/progesterona na saúde da mulher em menopausa, por serem os prejuízos maiores que os benefícios. Especificamente, o estudo identificou na comparação entre o grupo estrogênio/progesterona versus grupo placebo, aumento em 41 % em acidentes vásculo-cerebrais, o dobro de casos de tromboembolismo venoso, aumento em 22 % no total de doenças cardiovasculares, aumento em 26 % no câncer de mama, redução de 37 % nos casos de câncer de colo-retal, redução em 1/3 de fratura de quadril, redução em 24 % no total de fraturas, nenhuma diferença na mortalidade total, independentemente das causas e aumento em 29 % de ataques cardíacos (31).

As ações dos estrógenos são mediadas pela ligação à um dos dois receptores específicos para estrogênio (REs); o receptor de estrogênio do tipo α (Re α) e o receptor de estrogênio do tipo β (Re β), e ambos pertencem à superfamília de receptores nucleares. O estrogênio se liga, na célula-alvo, à REs no citoplasma o que leva à alterações conformacionais e modula no núcleo, a transcrição de genes-alvo (32). Ambos os receptores são co-expressados em vários tecidos e possuem heterodímeros funcionais. A presença dos REs foi identificada nos miócitos atriais e ventriculares e nos fibroblastos cardíacos. São funcionais em miocárdios de machos e fêmeas e ambas as isoformas α e β estão presentes no coração tanto de humanos (33) quanto de roedores (34). Entretanto, o exato papel dos RE α e β na função cardíaca é ainda pouco esclarecido (35).

Os estrógenos possuem amplos efeitos biológicos, através de mecanismos genômicos e não-genômicos. Quando a ação do estrogênio ocorre no núcleo e envolve a direta participação dos REs, como a transcrição de fatores, sem outras sinalizações prévias para executar suas ações, temos a chamada "via clássica" ou mecanismo genômico. Todos os outros mecanismos de ação do estrogênio são considerados "vias alternativas" ou mecanismos não-genômicos. Estas vias são iniciadas na membrana plasmática ou no citosol e resultam em efeitos locais diretos ou na regulação secundária da transcrição de genes (36) envolvendo também os metabólitos endógenos do E_2 (37). Evidências sugerem que estas vias aumentam a produção e ativação de cascatas sinalizadoras que incluem AMPc, IP3, fofolipase C e elementos da família quinase (38). Quando os REs são co-expressados, o RE β inibe a expressão gênica mediada pelo RE α (39,40).

A ausência dos hormônios sexuais femininos em ratas interfere no desempenho cardíaco através da incidência de arritmias (41,42), alterações na ativação do canal de K^+ sensível ao ATP (43), diminuição da sensibilidade ao baroreflexo por diminuição da eNOS cardíaca (44), modulação da ação do cálcio no miocárdio via canais de cálcio tipo-L (41,45) e na responsividade dos filamentos cardíacos ao Ca^{+2} (46,47).

A ação do cálcio na contração cardíaca começa pela liberação do Ca^{+2} do retículo sarcoplasmático (RS) e, em resposta ao influxo de Ca^{+2} liberador. Esse processo é conhecido como "*liberação de cálcio induzida por cálcio*" (48) e é considerado estar ligado, principalmente ao influxo de Ca^{+2} através dos canais de Ca^{+2} tipo-L existentes no sarcolema (49-51), apesar do Ca^{+2} que entra pelo trocador sódio-cálcio poder também contribuir (52,53). Contrações e transientes de Ca^{+2} iniciados por este mecanismo são proporcionais à magnitude da corrente de Ca^{+2} tipo-L (50). Lee e colaboradores, nos anos 60 (54), demonstraram outro mecanismo, conhecido como o "*liberação de cálcio sensível à voltagem*", associando a liberação de cálcio do retículo com a despolarização do sarcolema (55-58).

No coração, a força contrátil é dependente da concentração extracelular de Ca^{+2} . Preconiza-se hoje, que o cálcio para a contração é obtido pelo influxo de cálcio extracelular através dos canais lentos de Ca^{+2} e, do estoque de Ca^{+2} do RS. O cálcio proveniente do meio extracelular passa ao interior da célula e dispara a liberação de Ca^{+2} do RS. Cerca de 30 % do Ca^{+2} necessário para elevar a concentração intracelular de cálcio às concentrações exigidas ao desenvolvimento da força máxima, é derivado do influxo de Ca^{+2} através do sarcolema e o restante 70 % representa o Ca^{+2} ativador oriundo do RS (59).

Várias informações podem ser obtidas dos registros de contração isométrica, em relação às variações da força contrátil bem como de seus dados temporais. A amplitude da contração traduz a quantidade de força desenvolvida pelo músculo. Os parâmetros temporais da contração isométrica nos fornecem dados indiretos sobre a cinética de ativação e relaxamento do músculo. O tempo de ativação (TA), medido do início da contração até seu pico máximo, traduz a cinética dos processos envolvidos na ativação da contração, ou seja, os processos que aumentam o Ca^{+2} mioplasmático; e o tempo de relaxamento (TR), medido do pico da contração até seu

término, traduz a cinética dos processos envolvidos no relaxamento, ou seja, os processos que diminuem o Ca^{+2} mioplasmático. Assim, podemos observar os efeitos das interferências que modificam a atividade mecânica cardíaca (60).

A ativação da corrente de cálcio por agonistas β -adrenérgicos em músculo cardíaco foi descrita por Reuter em 1967 (61). A via β -adrenérgica é formada por β -adrenoceptores, proteína de ligação (*G*), adenilato ciclase e AMPc. Os receptores β -adrenérgicos primeiramente se dividiram em β_1 , β_2 e β_3 (62), porém em 1967 Kaumann e colaboradores (63), reportaram a existência do subtipo β_4 em corações de mamíferos. Os β -adrenoceptores são formados por 7 domínios trans-membrana, 3 voltas intracelulares e 3 extracelulares, um domínio extracelular no N-terminal e um intracelular na cauda C-terminal (64). Os receptores β -adrenérgicos cardíacos são predominantemente β_1 , enquanto que os dos vasos e pulmões são na maioria β_2 . Em humanos, nos ventrículos predominam os β_1 , sendo de apenas 15 % a 20 % os β_2 (65,66). A densidade dos receptores β_2 nos átrios, nós sinusal e atrioventricular é duas vezes maior do que a existente nos ventrículos (67). No miocárdio, estes receptores exercem um importante papel na função cardíaca, sendo a ação β_1 preferencialmente inotrópica e a β_2 , cronotrópica e dromotrópica (65,68,69).

A proteína *G* é uma proteína de ligação essencial na interação do receptor- β com o efetor adenilato-ciclase para a formação do AMPc. A atividade da adenilato-ciclase é modulada por duas proteínas *G*: a *G_s* com capacidade de estimular e a *G_i*, que é capaz de inibir a ativação da adenilato-ciclase (70). Estas vias do receptor, podem interagir por meio de segundo-mensageiros e proteínas quinase. O estudo dessas interações iniciou-se nos anos 80, tentando explicar respostas aparentemente inconsistentes de alguns agonistas destes receptores e já é conhecida a interação entre β_1 e α_1 na regulação do ritmo e da contratilidade cardíaca (71).

A adenilato-ciclase é a uma proteína que produz AMPc e para tanto necessita apenas de ATP e magnésio. Possui estrutura semelhante à dos canais de cálcio e é normalmente encontrada na lâmina interna do sarcolema, porém, é provável que ela também exista no RS (72-75).

O AMPc desempenha um importante papel na ativação das proteínas quinase, sendo estas, responsáveis pela ativação e desativação dos canais de íons e organelas intracelulares. As proteínas quinase, que normalmente encontram-se na forma inativa, são constituídas por duas subunidades: uma reguladora (R) e outra catalítica (C). O AMPc interage com a proteína quinase inativa, liga-se à subunidade R e libera a subunidade C, tornando-a ativa. O AMPc é degradado pela fosfodiesterase, via calmodulina quinase, que é uma enzima ativada pela elevação da concentração de Ca^{+2} citosólico (68,69).

O receptor β -adrenérgico, inativo na membrana, após sofrer interação do agente agonista, promove a troca de GDP por GTP, ativando a proteína Gs, que interage com a adenilto-ciclase (70) induzindo a formação do AMPc. A ativação ou desativação de enzimas acarreta uma variedade de efeitos biológicos, causando modificações das propriedades do músculo cardíaco. Os efeitos têm sido, usualmente, chamados de efeitos β -adrenérgicos (68,69). A proteína Gs ativada pela ligação do agonista ao receptor β -adrenérgico, além de estimular a adenilato-ciclase induzindo a produção de AMPc, atua também diretamente nos canais de Ca^{+2} do sarcolema, promovendo aumento de sua permeabilidade. A proteína quinase A (PKA), ativada pelo AMPc, promove fosforilação dos canais de Ca^{+2} do sarcolema, da troponina I e da fosfolambam. A atuação da proteína Gs, diretamente nos canais de cálcio do sarcolema e a fosforilação dos canais de cálcio, via AMPc, promovem aumento da concentração de Ca^{+2} no citosol, resultando em efeito inotrópico positivo.

Quando o isoproterenol está presente, entra mais Ca^{+2} na célula a cada despolarização e grande parte deste Ca^{+2} é acumulada no RS durante o relaxamento, pela estimulação da bomba de Ca^{+2} do RS (SERCA). A corrente de cálcio (I_{Ca}) aumentada também pode elevar a quantidade de Ca^{+2} que é liberada do RS, conseqüentemente, um pico maior de $[\text{Ca}^{+2}]_i$ é liberado durante a contração (76,77). Além disso, a estimulação da SERCA também acelera o relaxamento e leva à um menor tempo para atingir o pico de contração (TA), bem como a um relaxamento mais rápido e declínio da $[\text{Ca}^{+2}]_i$. A fosforilação da fosfolambam promove sua desinibição, ativa a SERCA e acarreta maior e mais rápida recaptação de Ca^{+2} pelo RS (78). No entanto, é importante lembrar que a fosforilação da fosfolambam ocorre também pela Ca^{+2} -calmodulina quinase (79), enzima que é ativada quando ocorre elevação da concentração de Ca^{+2} no citosol. Já a fosforilação da troponina I promove diminuição da sensibilidade do sistema contrátil ao cálcio, o que induz ao aumento da velocidade de relaxamento celular (68,69,80). Assim, ocorre uma maior força de contração cardíaca e os parâmetros temporais da contração são reduzidos (TA e TR) (81,82) o que promove melhora do relaxamento, ou seja, efeito lusitrópico (83). Por outro lado, alterações no sistema cardiovascular como o IAM, levam à diminuição da força de contração enquanto aumentam os parâmetros temporais.

1.2 INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO (IAM)

O infarto consiste em uma área circunscrita de necrose tecidual causada por isquemia prolongada devido a distúrbio da circulação arterial ou venosa. Se for prolongada, a isquemia resulta em consumo da reserva energética da área afetada, provocando necrose tanto das células parenquimatosas como das estromais. Em

mais de 90 % dos casos, a causa da isquemia do miocárdio consiste na redução do fluxo sanguíneo coronariano, devido a obstruções arteriais coronarianas ateroscleróticas (84).

Os infartos do miocárdio podem ser subendocárdicos ou transmuralis. O infarto subendocárdico, constitui uma área de necrose isquêmica limitada ao terço interno ou, no máximo, à metade da parede ventricular, podendo estender-se lateralmente além do território de perfusão de uma artéria coronária. Como a região subendocárdica é a mais vulnerável à isquemia, após uma oclusão coronariana a necrose se inicia nesse local, e se propaga em direção ao epicárdio. No infarto transmural, o mais comum, a necrose isquêmica envolve toda ou quase toda a espessura da parede ventricular na distribuição de uma única artéria coronária. Entretanto, os dois tipos de infarto estão estreitamente relacionados, visto que, em modelos experimentais, o infarto transmural começa com uma zona de necrose subendocárdica, que, progressivamente, abrange toda a espessura da parede ventricular.

1.2.1 COMPLICAÇÕES CARDÍACAS DO INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO

Após o IAM, as complicações cardíacas mais frequentes são (85):

DISFUNÇÃO CONTRÁTIL	- alteração ventricular esquerda, choque cardiogênico e fibrose do músculo papilar causando regurgitação mitral
ARRITMIAS	- bradicardia e taquicardia sinusal - taquicardia e fibrilação ventricular e bloqueio cardíaco
RUPTURA MIOCÁRDICA	- da parede ventricular livre, do septo intraventricular e do músculo papilar
PERICARDITE	- fibrinosa e fibrino-hemorrágica
INFARTO VENTRICULAR DIREITO	- acompanha frequentemente a lesão isquêmica de VE e septo
EXTENSÃO DO INFARTO	- pode ocorrer nova necrose adjacente ao infarto existente
EXPANSÃO DO INFARTO	- distensão desproporcional e dilatação
TROMBO MURAL	- favorecimento do tromboembolismo
ANEURISMA VENTRICULAR	- em área de tecido cicatricial fino
INSUFICIÊNCIA CARDÍACA TARDIA PROGRESSIVA	- diminuição contínua da expressão da SERCA com progressão da IC

1.3 CONTRATILIDADE MIOCÁRDICA

Em 1882, Ringer (86) concluiu que a contratilidade cardíaca dependia da presença do íon cálcio.

Dentre os mecanismos que regulam a contratilidade miocárdica, temos os mecanismos homeométricos e heterométricos. No mecanismo homeométrico, a força de contração é regulada sem alterar o comprimento inicial do sarcômero, sendo que a força aumenta, geralmente por aumento do cálcio intracelular ou da afinidade da maquinaria contrátil ao cálcio. No mecanismo heterométrico, a regulação da força de contração depende da alteração do comprimento do sarcômero. Como mecanismo homeométrico, temos os efeitos do sistema nervoso autônomo simpático, a variação de frequência cardíaca, fenômeno este designado de "efeito escada" e o efeito Anrep. E como mecanismo heterométrico, temos a Lei de Frank-Starling (87).

Considerando o estrogênio no âmbito cardiovascular, a literatura mostra que a densidade dos canais de Ca^{+2} tipo-L na membrana é regulada pelo receptor de estrogênio e sugere que a diminuição deste hormônio pode levar a um aumento no número de canais de Ca^{+2} tipo-L, anormalidades na excitabilidade cardíaca e aumento do risco de arritmias e doenças cardiovasculares (45). Collins e colaboradores em 1993 propuseram que o efeito cardioprotetor deste hormônio na TRH devia-se ao efeito antagônico a longo-prazo, do estrogênio sobre o cálcio. (88). Sugishita e colaboradores concluíram em 2003 (89) que a cardioproteção aguda do estrogênio durante o infarto do miocárdio seria mediada pela ação anti-oxidante independente de REs, que resultava em aumento da função da bomba $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}$ ATPase. Estudos recentes indicam efeito estrogênico na expressão de canais de K^{+} e Ca^{+2} , indicando um possível papel regulador na modulação da repolarização cardíaca e do intervalo QT (90), e que a ativação dos canais de K^{+} mitocondriais sensíveis ao ATP é o maior contribuinte da cardioproteção na isquemia (43).

Levando em consideração que a contratilidade cardíaca é alterada pelo IAM por prejuízo funcional do tecido remanescente (91) e que o estrogênio possui ação bloqueadora de canais de Ca^{+2} tipo-L (88,89) e de redução da resposta β -adrenérgica em miócitos, pouco sabemos da modulação fisiológica do estrogênio sobre o coração. Conseqüentemente, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência dos hormônios sexuais femininos através da castração, na resposta inotrópica positiva ao cálcio e estimulação β -adrenérgica em tiras de VD de ratas submetidas ao IAM.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência dos hormônios sexuais ovarianos sobre o desempenho contrátil do ventrículo direito (VD) de ratas infartadas com sinais de insuficiência cardíaca (IC).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar nas tiras de VD, dos animais controle, ovariectomizados, infartados com IC e ovariectomizados e infartados com IC:

- A resposta inotrópica por estimulação β -adrenérgica;
- A resposta inotrópica por estimulação via cálcio;

- A participação do retículo sarcoplasmático sobre a resposta contrátil e de relaxamento;
- Os parâmetros mecânicos e temporais da resposta inotrópica;
- A incidência de arritmias e
- A participação dos hormônios sexuais femininos, por meio da castração, sobre a área de infarto.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

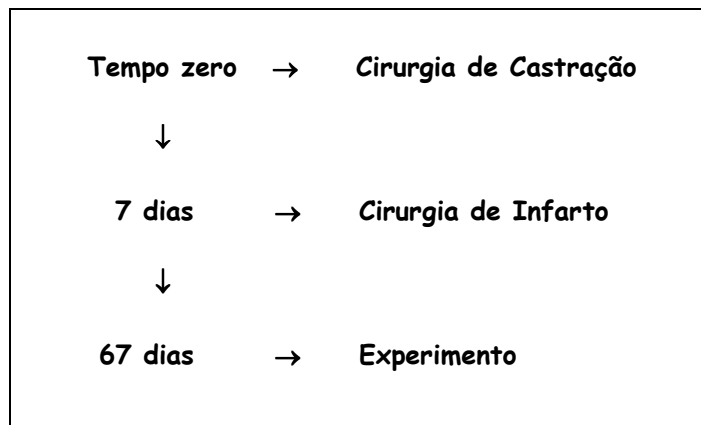
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Para a execução desse trabalho, foi utilizado ratos Wistar fêmeas (*Rattus norvegicus albinus*), pesando entre 200 - 250 gramas, com idade entre dois e três meses, fornecidos pelo Biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais receberam água e ração balanceada "ad libitum", passando por ciclo claro/escuro a cada 12 h.

3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram aleatoriamente divididos nos seguintes grupos:

- 01) Fêmeas controle (Cont)
- 02) Fêmeas ovariectomizadas (Cast)
- 03) Fêmeas infartadas com sinais de insuficiência cardíaca (Inf-IC)
- 04) Fêmeas ovariectomizadas e infartadas com sinais de insuficiência cardíaca (Cast-Inf-IC)



3.3 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

3.3.1 Ovariectomia bilateral

A castração das fêmeas foi realizada sob anestesia pelo éter. Os animais foram submetidos a uma incisão de 1 a 1,5 cm na pele e tecido celular subcutâneo, entre a última costela e a coxa, a 1 cm da linha mediana, seguida de uma incisão na camada muscular, abrindo a cavidade peritoneal para posterior ligadura da trompa uterina e remoção dos ovários. Os animais controles foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico e em tempo equivalente, exceto à ligadura da trompa uterina e retirada dos ovários.

O experimento foi realizado 67 dias após a castração. Depois da retirada do coração e montagem da preparação, o útero foi removido e pesado numa balança analítica, para posterior comparação com o útero das fêmeas normais.

3.3.2 Infarto agudo do miocárdio

O procedimento cirúrgico adotado foi baseado nas técnicas já descritas pela literatura (92,93). Os animais foram anestesiados com halotano, em seguida foi feita uma toracotomia do lado esquerdo entre o terceiro e quarto espaço intercostal. O músculo peitoral foi separado e as costelas expostas. O coração foi

então gentilmente exteriorizado. A artéria coronariana descendente anterior esquerda foi ligada aproximadamente a 3 mm distal à sua origem através do uso de fio mononylon 6-0. Após o coração ter sido colocado no lugar e o tórax fechado, através de uma ligadura em bolsa previamente preparada, os animais retornavam à respiração normal. O procedimento cirúrgico do infarto, após abertura do tórax durou no máximo 30 segundos. A ligadura coronariana assim realizada produz, na grande maioria dos animais, um infarto extenso da parede ântero-lateral do ventrículo esquerdo (94). A irrigação do ventrículo direito é preservada, sendo utilizado para o estudo da contratilidade do miocárdio remanescente que sobrevive ao infarto. O grupo controle passou pelas mesmas etapas citadas acima com exceção da ligadura da artéria coronariana.

No grupo de animais castrados e infartados, o infarto foi realizado 7 dias após a cirurgia de castração.

3.4 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE INFARTO DO MIOCÁRDIO

Para avaliar a presença de infarto agudo do miocárdio os animais foram submetidos à eletrocardiografia, 60 dias após a cirurgia, onde a constatação do desvio do eixo elétrico do complexo QRS para direita, a alta incidência de onda Q ou a redução da amplitude do QRS na derivação D1 (95) indicavam sucesso na realização da ligadura coronariana. Tal procedimento era realizado apenas para otimizar os experimentos, uma vez que todos os corações eram avaliados macroscopicamente .

3.5 AVALIAÇÃO DA ÁREA DE INFARTO

Em todos os grupos infartados estudados a área cicatricial de infarto foi cortada e medida. O septo interventricular foi considerado parte do ventrículo esquerdo. A visualização da área de cicatriz após a cirurgia foi feita por transluminação, revelando as áreas infartadas como uma zona pálida. O infarto foi confirmado através da inspeção macroscópica da parede do VE, pela presença de regiões com tecido fibroso cicatricial. Os contornos das regiões infartada e não-infartada foram delineados sobre papel milimetrado e as áreas medidas por contagem de pontos (96).

3.6 AVALIAÇÃO DA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

Ao fim de cada experimento as câmaras cardíacas foram separadas e pesadas. O peso úmido do pulmão foi corrigido pelo peso corporal. Quando a razão Pulmão/PC das ratas infartados era $\geq$ à razão Pulmão/PC + 2 EP do grupo controle, o infarto era considerado com sinais de insuficiência cardíaca (IC) (97). Do total de animais infartados, 50 % apresentaram sinais de IC e somente estes, foram incluídos neste estudo.

3.7 AVALIAÇÃO DA CONTRATILIDADE CARDÍACA

Após ser anestesiado com pentobarbital sódico - Hypnol 3 % (65 mg/Kg, ip), o animal era sacrificado, tendo o coração rapidamente retirado e perfundido

através do coto aórtico para permitir uma adequada dissecação do ventrículo direito. Tiras de ventrículo direito foram então montadas em cubas de vidro com volume de 50 ml e, continuamente superfundidas com solução nutritiva de Krebs modificada na seguinte composição em mM: NaCl 120; KCl 5,4; CaCl_2 1,25; MgCl_2 1,2; NaH_2PO_4 2; Na_2SO_4 1,2; NaHCO_3 27 e Glicose 11, tamponada com bicarbonato e gaseificada por borbulhamento com mistura carbogênica (5 % de CO_2 e 95 % de O_2), pH 7,4, à temperatura de 33° C. As preparações foram estimuladas por meio de eletrodos de platina colocados paralelamente ao comprimento do músculo, nos quais foram utilizados pulsos retangulares com intensidade 1,5 vezes a limiar e de 12 ms de duração. A frequência de estimulação padrão foi de 0,5 Hz (condição-estabilizada). A força (F) desenvolvida foi medida através transdutor de força isométrica (Nihon-Kohden, Modelo RM 6200), e registrados em polígrafo (Nihon-Koden, RMP-600, Tokyo), sendo normalizada pela massa do ventrículo (em gramas) calculada pela divisão da força obtida em gramas pelo peso úmido da tira de ventrículo direito, também em gramas (g de força / g de tecido).

Uma vez realizado o estiramento muscular para obtenção de contrações isométricas máximas e estabilização das preparações por aproximadamente 60 minutos, realizamos o seguinte protocolo: potenciação pós-pausa, resposta

inotrópica à variação da concentração extracelular de cálcio e curva concentração-resposta ao isoproterenol. Os dois últimos itens do protocolo não foram realizados na mesma tira de ventrículo direito para evitar que a perda da viabilidade funcional em função de um protocolo não prejudicasse o outro. Foram analisados os seguintes parâmetros: pico de força isométrica (F), tempo de ativação (TA), tempo de relaxamento (TR), potenciação relativa (PPP) obtida após pausas de 15, 30, 60 e 120 segundos, sob estimulação condição-estabilizada.

3.8 AVALIAÇÃO DA INCIDÊNCIA DE EXTRASSÍSTOLES

A avaliação percentual de arritmias das tiras de VD foi feita pela observação do número de extrassístoles durante a estabilização (basal) somadas às decorridas após a estimulação β -adrenérgica com isoproterenol.

3.9 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

3.9.1 **Análise da potenciação pós-pausa**

A observação da potenciação pós-pausa foi feita interrompendo-se a estimulação elétrica durante intervalos de 15, 30, 60 e 120 segundos. No rato a primeira contração imediatamente após a pausa é potencializada em relação às contrações controles (98). A potenciação relativa após cada pausa (PPP) foi obtida dividindo-se a amplitude da primeira contração após a pausa, pela amplitude da contração que a precedeu. Entre uma pausa e outra era esperado um período suficiente para que as contrações voltassem à sua força basal.

3.9.2 Curva concentração-resposta ao cálcio extracelular

Para a realização da curva concentração-resposta cumulativa para o cálcio, a superfusão com solução de Krebs foi substituída por outra com a concentração de cálcio mais baixa (0,62 mM). Após um período de estabilização, foi adicionado CaCl_2 ao banho de modo a obter concentrações crescentes de cálcio (0,62; 1,25; 2,5; 3,75 e 5,0 mM). Era esperado um período mínimo até que ocorresse um platô de estabilização, quando então era feito o registro da contração.

3.9.3 Curva concentração-resposta ao isoproterenol

Na obtenção de uma curva concentração-resposta completa a um agonista β -adrenérgico não seletivo, o isoproterenol, foi utilizada solução de Krebs com menor concentração de cálcio (0,62 mM) a qual foi adicionada de ácido ascórbico para uma concentração final de banho (0,3 mM) e EDTA (0,03 mM). A utilização dessa concentração de cálcio mais baixa, que àquela dos demais itens do protocolo (1,25 mM), se justifica pelo fato do isoproterenol, em preparações isoladas de rato, exibir um melhor efeito inotrópico positivo quando a concentração extracelular desse íon está diminuída (99). Após estabilização funcional da preparação, doses cumulativas de isoproterenol foram adicionadas ao banho de maneira a se obter concentrações crescentes e cumulativas desta substância (10^{-7} ; 10^{-6} ; 10^{-5} ; 10^{-4} ; 10^{-3} e 10^{-2} M). Da mesma maneira que na curva de cálcio, era esperado um período para que fosse atingido um platô, quando então o registro era realizado.

3.10 DROGAS E REAGENTES

Ácido Ascórbico (Merck)
Bicarbonato de Sódio (Merck)
Cloreto de Cálcio Dihidratado (Merck)
Cloreto de Magnésio Hexahidratado (Merck)
Cloreto de Potássio (Merck)
Cloreto de Sódio (Merck)
EDTA (Hoeschst)
Éter Etílico (Merck)
Fosfato de Sódio Dibásico (Merck)
Fosfato de Sódio Monobásico (Merck)
Glicose (Reagem)
Halotano (Cristália)
Heparina sódica (Roche)
L- Isoproterenol (hidroclorato - Sigma)
Pentobarbital sódico 3 % (Cristália)
Sulfato de Sódio (Merck)

Todas as soluções concentradas de isoproterenol foram dissolvidas em água bidestilada e mantidas no congelador a -20°C .

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Na análise dos dados ponderais foi usado ANOVA 1 via. Para comparação da área de infarto, foi usado o teste *t* não pareado. Para a avaliação da força de contração, dados temporais e potenciação pós-pausa, foi usado ANOVA 2 vias. Quando as análises revelavam uma diferença significativa, o teste Bonferroni era aplicado. Para a análise da incidência de arritmias, foi usado o teste Qui-quadrado com correção de Yates. Valores de $p < 0,05$ foram considerados como significativos. A análise dos dados e a plotagem das figuras foram realizadas utilizando o GraphPad Prism System (San Diego, CA, USA).

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO PONDERAL CORPORAL, DO ÚTERO, DOS VENTRÍCULOS, DOS PULMÕES E DA ÁREA DE INFARTO

Após 60 dias de infarto e 67 de castração, os animais Cast, Inf-IC e Cast-Inf-IC apresentaram aumento do peso corporal e diminuição da razão peso do útero/peso corporal quando comparados ao grupo Cont (Tabela 1 e Figuras 1 e 3). A área de infarto foi similar entre os grupos Inf-IC e Cast-Inf-IC (Tabela 1 e Figura 2). A razão entre o peso do ventrículo direito e o peso corporal foi maior nos grupos Inf-IC e Cast-Inf-IC e menor no grupo Cast, em relação ao grupo Cont (Tabela 1 e Figura 4). A razão entre o peso do ventrículo esquerdo e o peso corporal foi diferente no grupo Inf-IC em relação aos grupos Cont, Cast e Cast-Inf-IC. O peso dos pulmões foi diferente entre os grupos Inf-IC e Cast-Inf-IC e destes em relação aos grupos Cont e Cast.

Tabela 1: Valores de peso corporal (PC), peso do útero/PC, área de infarto/PC, peso dos ventrículos direito (VD) e esquerdo (VE)/PC e peso dos pulmões/PC dos grupos controle (Cont), ovariectomizados (Cast), infartados com IC (Inf-IC), ovariectomizados-infartados com IC (Cast-Inf-IC).

	Cont (n=16)	Cast (n=19)	Inf-IC (n=7)	Cast-Inf-IC (n=6)
PC (g)	224 ± 4,1	274 ± 4,6 *	236 ± 5,8 *	279 ± 6,9 * #
Útero/PC (mg/g)	2,44 ± 0,18	0,33 ± 0,01 *	2,19 ± 0,19 *	0,28 ± 0,02 * #
Área de Infarto (%)	-	-	42,3 ± 2,13	39,1 ± 1,79
Pulmões/PC (mg/g)	5,46 ± 0,16	5,09 ± 0,20	9,72 ± 0,87 * °	8,29 ± 0,60 * # °
VD/PC (mg/g)	0,44 ± 0,02	0,37 ± 0,01 *	0,97 ± 0,13 * °	1,00 ± 0,13 * °

VE/PC (mg/g)	2,02 ± 0,06	1,95 ± 0,03	2,19 ± 0,08 * °	2,00 ± 0,16 #
--------------	-------------	-------------	--------------------	------------------

Dados expressos como média ± EPM. ANOVA 1 via, *post hoc* Bonferroni, para todas as análises, exceto área de infarto em que foi usado Teste *t* não pareado.

* p<0,05 vs Cont; ° p<0,05 vs Cast e # p<0,05 vs Inf-IC.

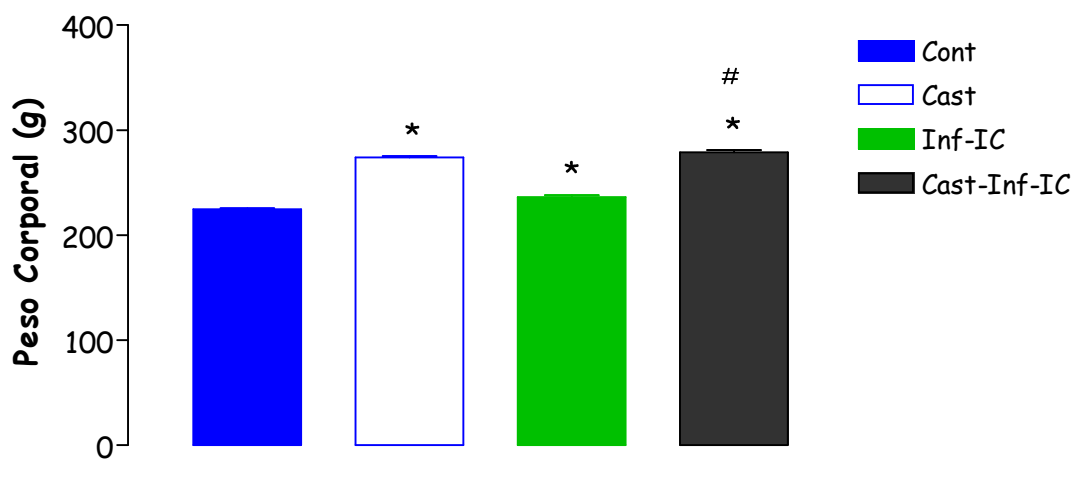


Figura 1: Peso corporal (g) dos grupos controle (Cont; n=16), ovariectomizado (Cast; n=19), infartado com IC (Inf-IC; n=7) e ovariectomizado-infartado com IC (Cast-Inf-IC; n=6). Dados expressos como média ± EPM. ANOVA 1 via, *post hoc* Bonferroni.

* p<0,05 vs Cont e # p<0,05 vs Inf-IC.

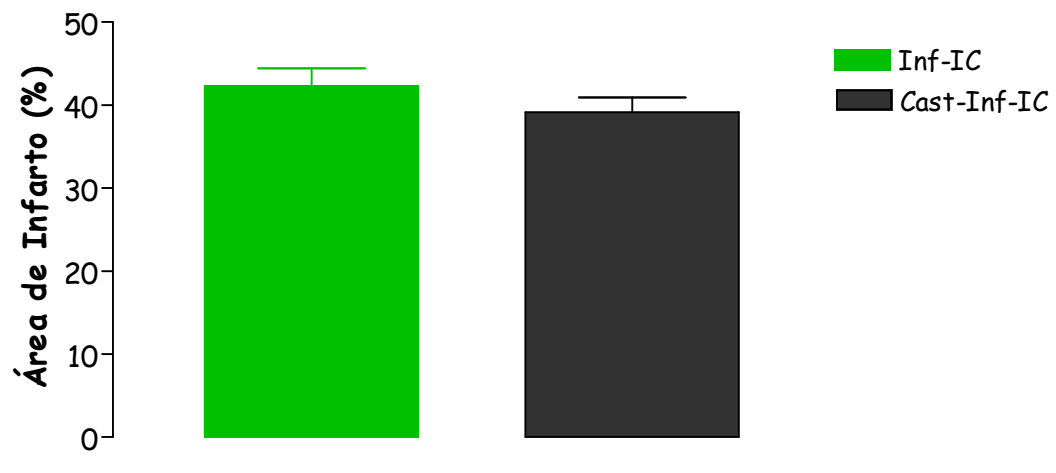


Figura 2: Área de infarto (%) dos grupos infartado com IC (Inf-IC; n=7) e ovariectomizado-infartado com IC (Cast-Inf-IC; n=6). Dados expressos como média $\pm$ EPM. Teste *t* não pareado.

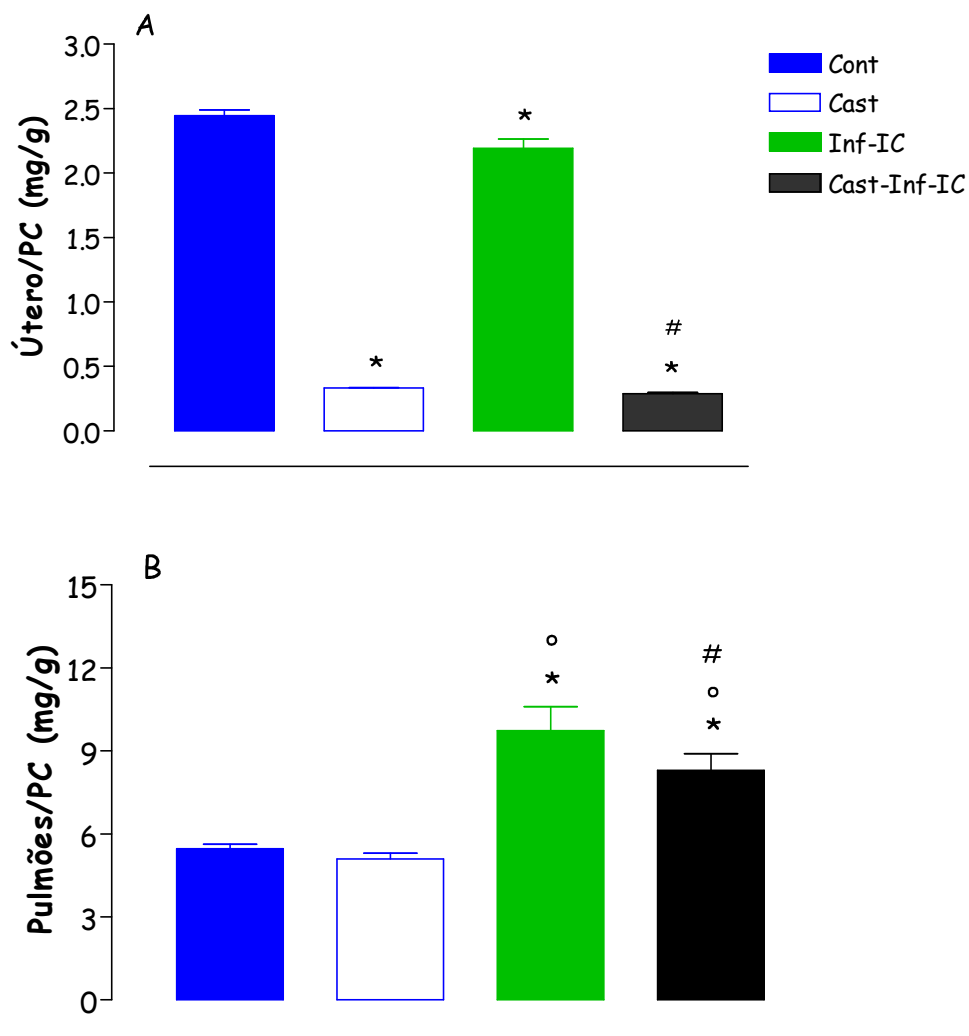


Figura 3: (A): Razão do peso do útero/peso corporal (mg/g) e **(B)** razão do peso dos pulmões/peso corporal (mg/g) dos grupos controle (Cont; n=16), ovariectomizado (Cast; n=19), infartado com IC (Inf-IC; n=7), ovariectomizado-infartado com IC (Cast-Inf-IC; n=6).

Dados expressos como média $\pm$ EPM. ANOVA 1 via, *post hoc* Bonferroni.

* $p < 0,05$ vs Cont, ° $p < 0,05$ vs Cast e # $p < 0,05$ vs Inf-IC.

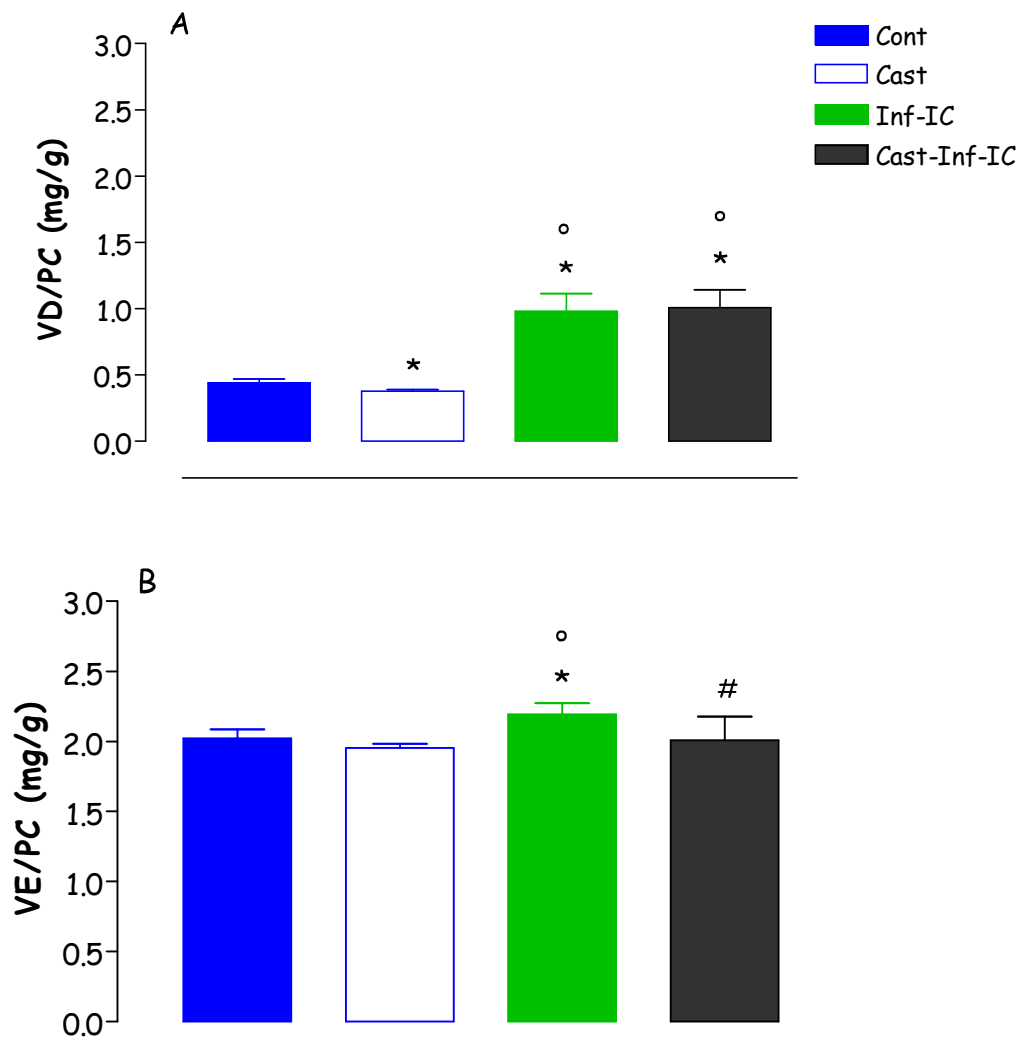


Figura 4: (A): Razão do peso do ventrículo direito/peso corporal (VD/PC) e (B) esquerdo/peso corporal (VE/PC) (mg/g) dos grupos controle (Cont; n=16), ovariectomizado (Cast; n=19), infartado com IC (Inf-IC; n=7) e ovariectomizado-infartado com IC (Cast-Inf-IC; n=6).

Dados expressos como média $\pm$ EPM. ANOVA 1 via, *post hoc* Bonferroni.

* $p < 0,05$ vs Cont, [°] $p < 0,05$ vs Cast e # $p < 0,05$ vs Inf-IC.

4.2 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INOTRÓPICA AO ISOPROTERENOL

O isoproterenol promoveu aumento na força de contração isométrica do VD de maneira concentração-dependente em todos os grupos estudados. A ovariectomia não alterou essa resposta. Nos animais submetidos à cirurgia de infarto que apresentaram IC (grupos Inf-IC e Cast-Inf-IC) a resposta inotrópica positiva foi menor que nos grupos Cont e Cast (Tabela 2 e Figura 5).

A análise de variância duas vias, demonstrou que há interação entre os grupos ($p < 0,0001$), entre as doses ($p < 0,0001$) e, entre ambos ($p < 0,05$).

Tabela 2: Valores da contração basal, Log de EC_{50} e $R_{\max}$ obtidos através de curvas concentração-resposta ao isoproterenol em tiras de VD de animais controle (Cont), ovariectomizados (Cast), infartados com insuficiência cardíaca (Inf-IC) e ovariectomizados-infartados com insuficiência cardíaca (Cast-Inf-IC).

	Contração basal (g/g)	Log EC_{50}	$R_{\max}$ (g/g)
Cont (n=16)	33 ± 4	$4,82 \pm 0,18$	80 ± 7
Cast (n=20)	35 ± 4	$5,19 \pm 0,18$	74 ± 6
Inf-IC (n=8)	16 ± 2 * °	$5,59 \pm 0,25$ ✕	37 ± 7 * °
Cast-Inf-IC (n=10)	8 ± 2 * °	$5,56 \pm 0,21$	19 ± 3 * °

Dados expressos como média $\pm$ EPM. ANOVA 2 vias, *post-hoc* Bonferroni.

* $p < 0,05$ vs Cont e ° $p < 0,05$ vs Cast.

Log de EC_{50} : ✕ $p < 0,05$ Inf-IC vs Cont.

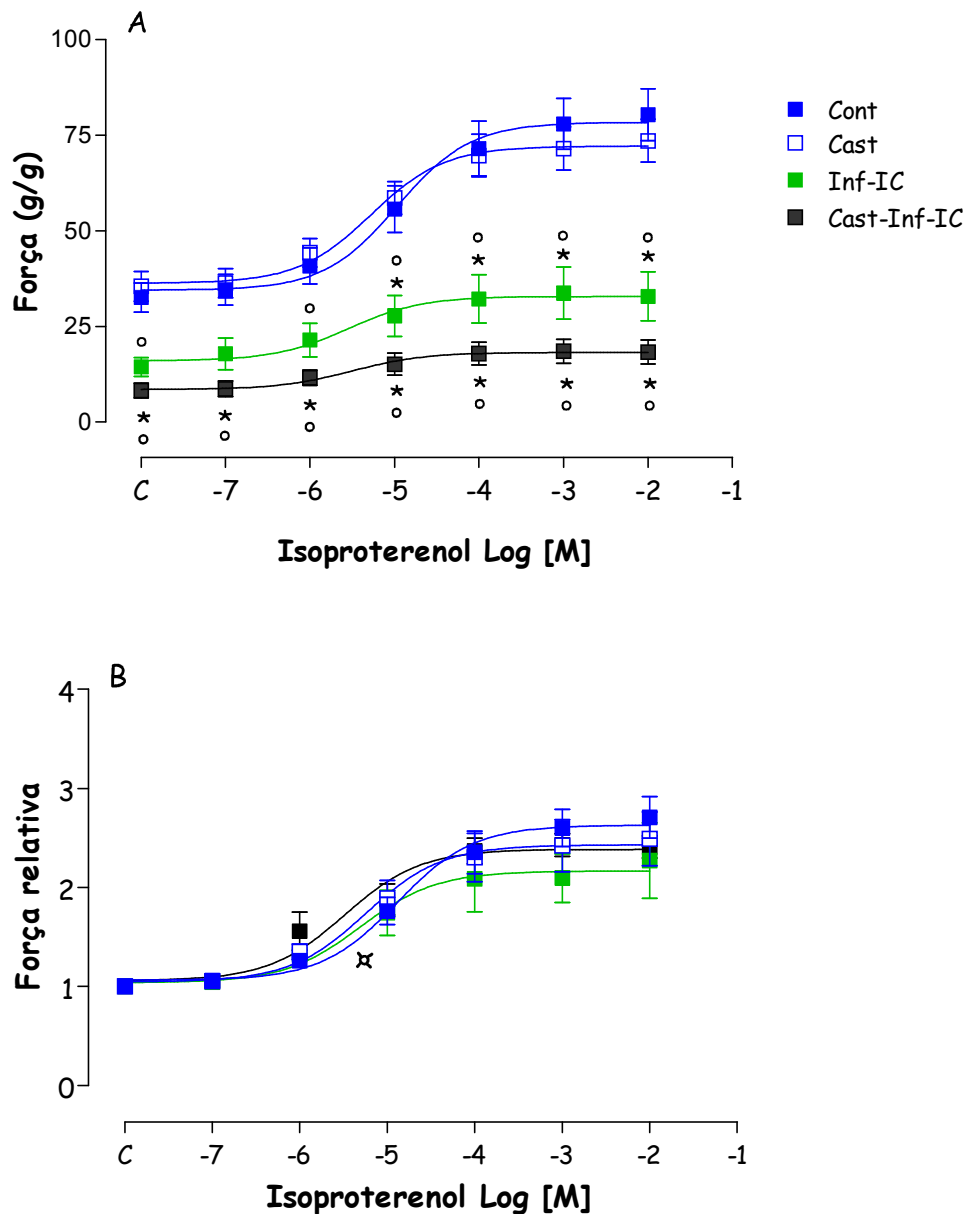


Figura 5: Curvas concentração-resposta ao isoproterenol dos grupos controle (Cont; n=16), ovariectomizado (Cast; n=20), infartado com IC (Inf-IC; n=8) e ovariectomizado-infartado com IC (Cast-Inf-IC; n=10). Dados expressos como média $\pm$ EPM. ANOVA 2 vias, *post hoc* Bonferroni.

(A): Dados absolutos (g/g). (B): Dados normalizados para a força basal (Ca^{+2} 0,62 mM) considerada 1.

C no eixo X equivale à contração basal.

* $p < 0,05$ vs Cont e $^{\circ}p < 0,05$ vs Cast.

Log de EC_{50} : $\times p < 0,05$ Inf-IC vs Cont.

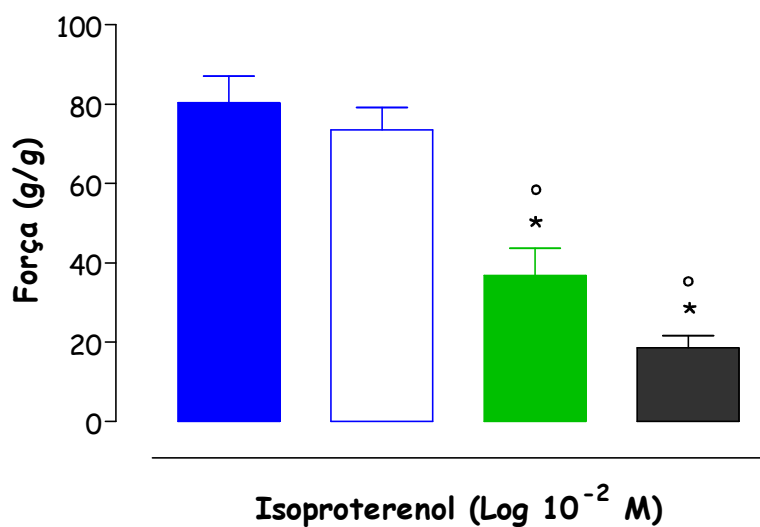
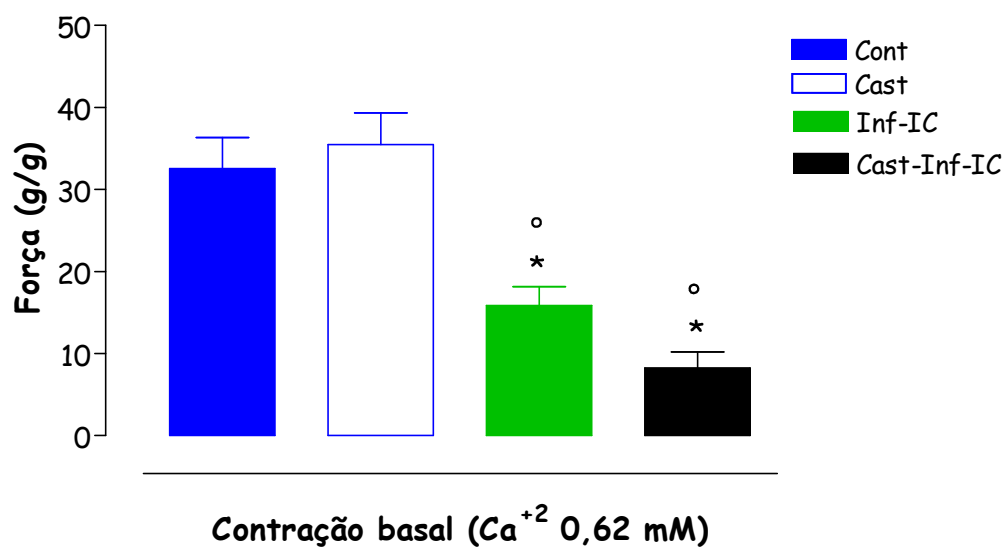


Figura 6: (A): Contração basal obtida antes do início da curva concentração-resposta ao isoproterenol, em Ca^{+2} extracelular 0,62 mM + ácido ascórbico 0,3 mM +

EDTA 0,03 mM e **(B)**, resposta ao isoproterenol na concentração de $\text{Log } 10^{-2} \text{ M}$, das tiras de VD de animais controle (Cont; n=16), (Cast; n=20), infartados com insuficiência cardíaca (Inf-IC; n=8) e ovariectomizados-infartados com insuficiência cardíaca (Cast-Inf-IC; n=10). Dados expressos como média $\pm$ EPM. ANOVA 1 via, *post-hoc* Bonferroni.

* $p < 0,05$ vs Cont e $^{\circ}p < 0,05$ vs Cast.

4.3 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INOTRÓPICA AO CÁLCIO

EXTRACELULAR

A variação do cálcio extracelular promoveu aumento na força de contração isométrica de VD de maneira concentração-dependente em todos os grupos estudados (Tabela 3 e Figuras 7 e 8). A ovariectomia não alterou a resposta nos grupos Cont e Inf e a resposta inotrópica positiva foi menor nos grupos dos animais submetidos à cirurgia de infarto com insuficiência cardíaca (Inf-IC e Cast-Inf-IC).

A análise de variância duas vias, demonstrou que há interação entre os grupos ($p < 0,0001$), entre as doses ($p < 0,0001$) e, entre ambos ($p < 0,05$).

Tabela 3: Valores da contração basal, Log de EC_{50} e $\text{R}_{\text{máx}}$ obtidos através de curvas concentração-resposta ao cálcio extracelular em tiras de VD de animais controle (Cont), ovariectomizados (Cast), infartados com insuficiência cardíaca (Inf-IC) e ovariectomizados-infartados com insuficiência cardíaca (Cast-Inf-IC).

	Contração basal (g/g)	Log EC_{50}	$\text{R}_{\text{máx}}$ (g/g)
Cont (n=10)	38 ± 5	$1,73 \pm 0,09$	112 ± 10
Cast (n=13)	36 ± 4	$1,84 \pm 0,15$	96 ± 8
Inf-IC (n=7)	15 ± 2 * $^{\circ}$	$1,82 \pm 0,16$	46 ± 8 * $^{\circ}$
Cast-Inf-IC (n=6)	11 ± 5 * $^{\circ}$	$1,46 \pm 0,08$	29 ± 12 * $^{\circ}$

Dados expressos como média $\pm$ EPM. ANOVA 1 via, *post-hoc* Bonferroni.
 * $p < 0,05$ vs Cont e $^{\circ}p < 0,05$ vs Cast.

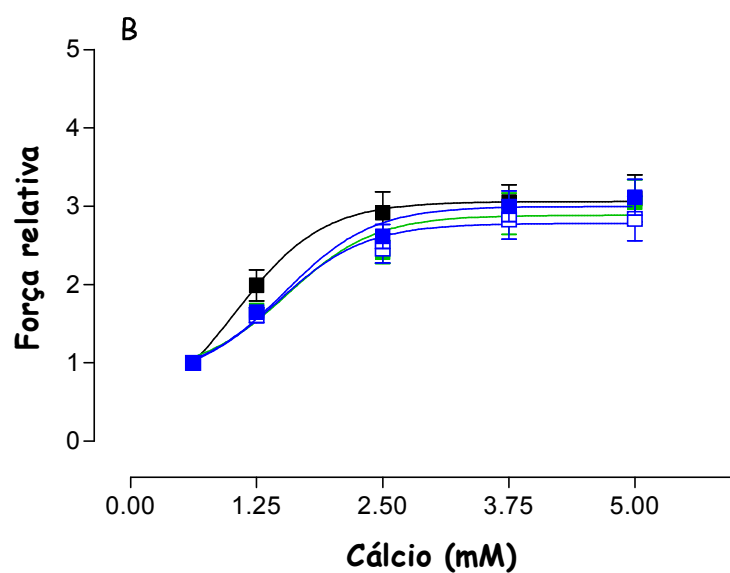
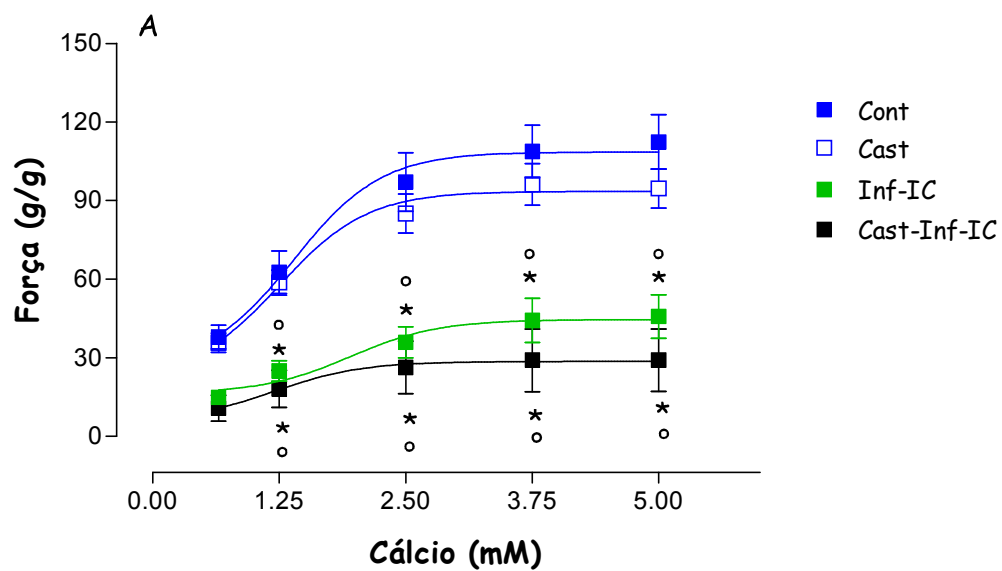


Figura 7: Curvas concentração-resposta ao cálcio extracelular dos grupos controle (Cont; n=10), ovariectomizado (Cast; n=13), infartado com IC (Inf-IC; n=7) e ovariectomizado-infartado com IC (Cast-Inf-IC; n=6). Dados expressos como média $\pm$ EPM. ANOVA 2 vias, *post hoc* Bonferroni.

(A): Dados absolutos (g/g). **(B):** Dados normalizados para a força basal (Ca^{+2} 0,62 mM) considerada 1.

* $p < 0,05$ vs Cont e $^{\circ}p < 0,05$ vs Cast.

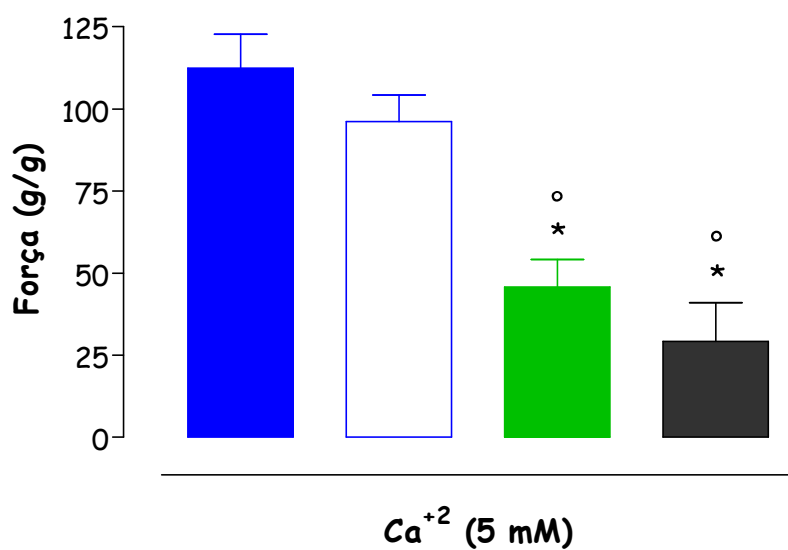
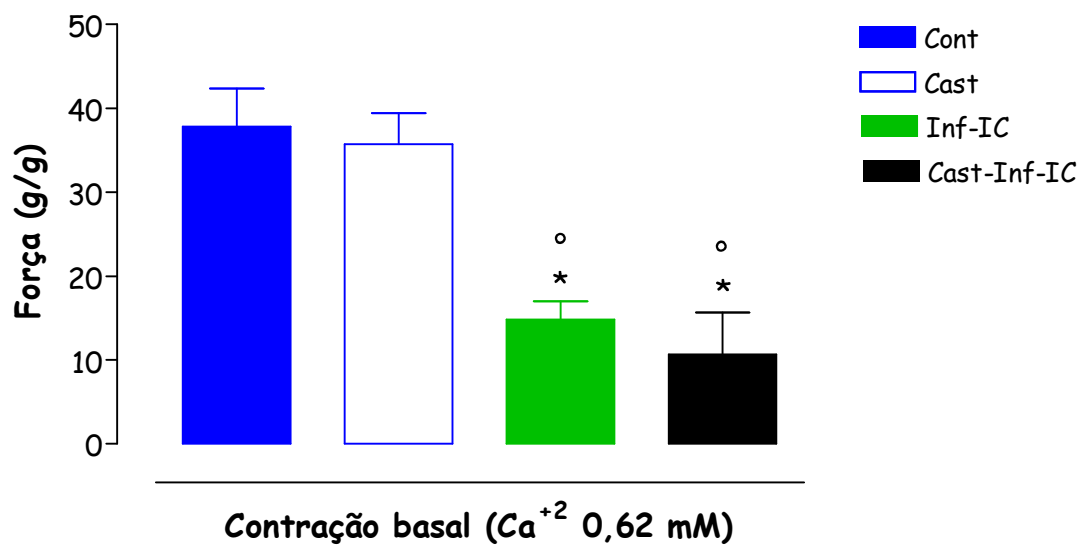


Figura 8: (A): Contração basal à curva de cálcio extracelular em Ca^{+2} 0,62 mM e (B), resposta ao cálcio extracelular (5 mM) das tiras de VD de animais controle (Cont; n=10), (Cast; n=13), infartados com insuficiência cardíaca (Inf-IC; n=7) e

ovariectomizados-infartados com insuficiência cardíaca (Cast-Inf-IC; n=6). Dados expressos como média $\pm$ EPM. ANOVA 1 via, *post-hoc* Bonferroni.

*p<0,05 *vs* Cont e °p<0,05 *vs* Cast.

4.4 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE ATIVAÇÃO E RELAXAMENTO NA RESPOSTA INOTRÓPICA AO ISOPROTERENOL

O tempo de ativação foi maior nos grupos Inf-IC (10^{-7} e 10^{-2} M) e Cast-Inf-IC, (10^{-6} M), quando comparados ao grupo Cont.

A análise de variância duas vias demonstrou que, no tempo de ativação da curva de isoproterenol, existe interação entre os grupos ($p < 0,0001$), entre as doses ($p < 0,0001$) mas não, entre ambos.

Tabela 4: Valores do tempo de ativação (TA - ms) obtidos em diferentes concentrações de isoproterenol em tiras de VD de animais controle (Cont), ovariectomizados (Cast), infartados com insuficiência cardíaca (Inf-IC) e ovariectomizados-infartados com insuficiência cardíaca (Cast-Inf-IC).

Isoproterenol (Log M)	Cont (n=11)	Cast (n=11)	Inf-IC (n=5)	Cast-Inf-IC (n=7)
Basal	86 $\pm$ 4	91 $\pm$ 6	98 $\pm$ 19	104 $\pm$ 5
10^{-7}	84 $\pm$ 4	93 $\pm$ 6	112 $\pm$ 14 *	106 $\pm$ 6
10^{-6}	75 $\pm$ 4	93 $\pm$ 6	100 $\pm$ 6	99 $\pm$ 6 *
10^{-5}	80 $\pm$ 4	84 $\pm$ 7	106 $\pm$ 6	87 $\pm$ 6
10^{-4}	67 $\pm$ 5	80 $\pm$ 6	88 $\pm$ 10	89 $\pm$ 4
10^{-3}	62 $\pm$ 5	70 $\pm$ 5	84 $\pm$ 10	81 $\pm$ 5
10^{-2}	58 $\pm$ 5	69 $\pm$ 4	88 $\pm$ 8 *	76 $\pm$ 8

Dados expressos como média $\pm$ EPM. ANOVA 2 vias, *post-hoc* Bonferroni.

*p< 0,05 *vs* Cont.

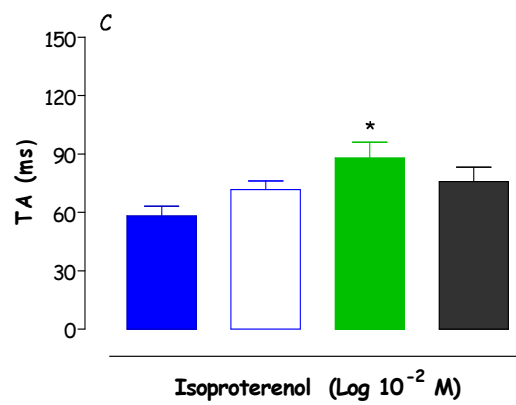
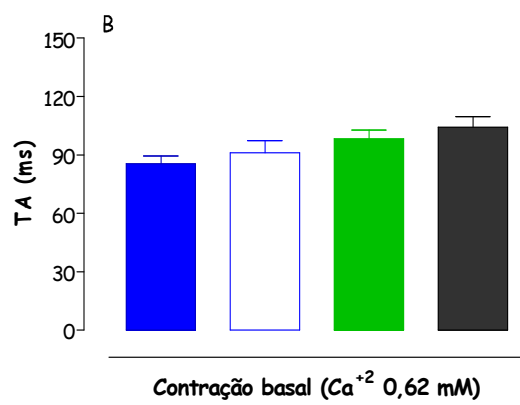
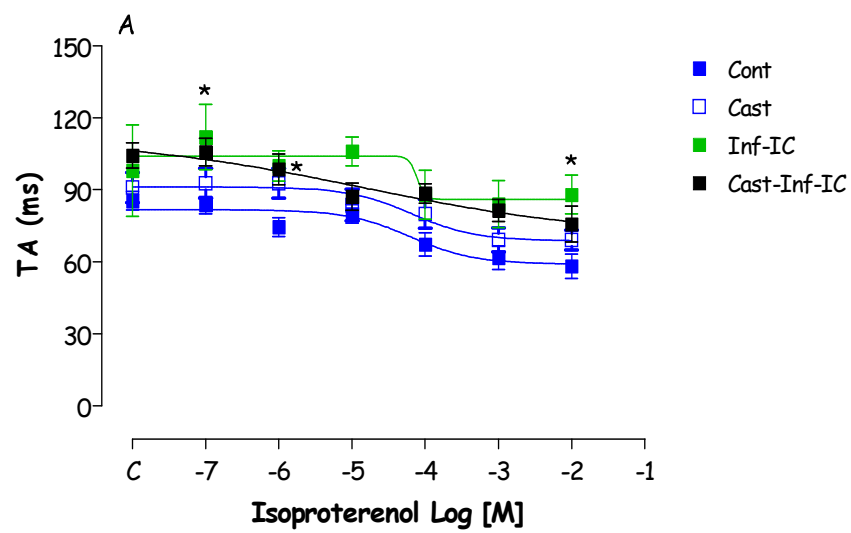


Figura 9: Parâmetros temporais do tempo de ativação (TA) obtidos em diferentes concentrações de isoproterenol, em tiras de VD de animais controle (Cont; n=11), ovariectomizados (Cast; n=11), infartados com insuficiência cardíaca (Inf-IC; n=5) e ovariectomizados-infartados com insuficiência cardíaca (Cast-Inf-IC; n=7). **(A):** Avaliação do TA na curva concentração-resposta ao isoproterenol, de todos os grupos. **(B):** Avaliação do TA na contração basal de todos os grupos em Ca^{+2} 0,62 mM + EDTA 0,03 mM + ácido ascórbico 0,3 mM. **(C):** Resposta do TA de todos os grupos na dose de isoproterenol 10^{-2} M. Dados expressos como média $\pm$ EPM. ANOVA 2 vias, *post-hoc* Bonferroni. C no eixo X equivale à contração basal.

* $p < 0,05$ vs Cont.

A análise de variância duas vias demonstrou que, no tempo de relaxamento da curva de isoproterenol, existe interação entre os grupos ($p < 0,01$), entre as doses ($p < 0,0001$) mas não, entre ambos.

Tabela 5: Valores de tempo de relaxamento (TR - ms) obtidos em diferentes concentrações de isoproterenol em tiras de VD de animais controle (Cont), ovariectomizados (Cast), infartados com insuficiência cardíaca (Inf-IC) e ovariectomizados-infartados com insuficiência cardíaca (Cast-Inf-IC).

Isoproterenol (Log M)	Cont (n=11)	Cast (n=11)	Inf-IC (n=5)	Cast-Inf-IC (n=7)
Basal	185 $\pm$ 13	224 $\pm$ 25	180 $\pm$ 20	231 $\pm$ 21
10^{-7}	183 $\pm$ 12	220 $\pm$ 24	178 $\pm$ 20	211 $\pm$ 19
10^{-6}	189 $\pm$ 11	200 $\pm$ 20	180 $\pm$ 20	190 $\pm$ 13
10^{-5}	179 $\pm$ 11	196 $\pm$ 20	156 $\pm$ 18	184 $\pm$ 20
10^{-4}	165 $\pm$ 10	173 $\pm$ 18	152 $\pm$ 10	167 $\pm$ 16
10^{-3}	159 $\pm$ 13	153 $\pm$ 19	140 $\pm$ 9	166 $\pm$ 11
10^{-2}	148 $\pm$ 10	153 $\pm$ 13	136 $\pm$ 4	166 $\pm$ 8

Dados expressos como média $\pm$ EPM. ANOVA 2 vias, *post-hoc* Bonferroni.

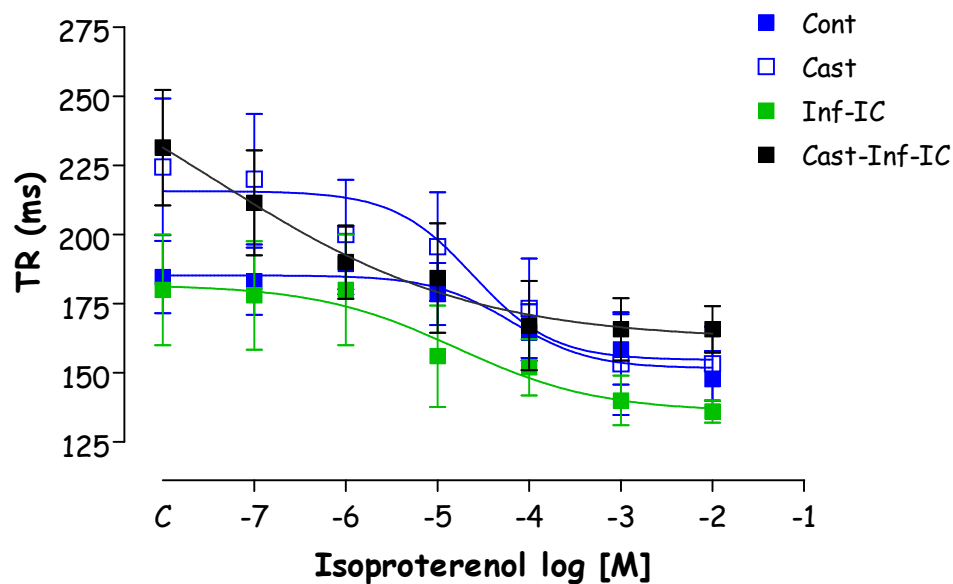


Figura 10: Efeito do isoproterenol sobre o tempo de relaxamento (TR - ms) de tiras de VD de animais controle (Cont; n=9), ovariectomizados (Cast; n=10), infartados com insuficiência cardíaca (Inf-IC; n=6) e ovariectomizados-infartados com insuficiência cardíaca (Cast-Inf-IC; n=6). Dados expressos como média $\pm$ EPM. ANOVA 2 vias, *post-hoc* Bonferroni. C no eixo X equivale à contração basal.

4.5 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE ATIVAÇÃO E RELAXAMENTO NA RESPOSTA INOTRÓPICA AO AO CÁLCIO

O tempo de ativação foi maior nos grupos Cast (0,62 mM) e Cast-Inf-IC (2,5 mM).

A análise de variância duas vias demonstrou que, no tempo de ativação da curva de cálcio, somente há interação entre as doses ($p < 0,01$).

Tabela 6: Valores do tempo de ativação (TA - ms) obtidos em diferentes concentrações de cálcio extracelular em tiras de VD de animais controle (Cont), ovariectomizados (Cast), infartados com insuficiência cardíaca (Inf-IC) e ovariectomizados-infartados com insuficiência cardíaca (Cast-Inf-IC).

Cálcio (mM)	Cont (n=11)	Cast (n=11)	Inf-IC (n=5)	Cast-Inf-IC (n=7)
0,62	82 ± 6	114 ± 13 *	100 ± 18	97 ± 2
1,25	89 ± 4	114 ± 10	105 ± 10	107 ± 4
2,50	91 ± 6	106 ± 7	103 ± 10	123 ± 2 *
3,75	96 ± 7	108 ± 8	110 ± 5	97 ± 2
5,00	109 ± 13	114 ± 9	117 ± 6	103 ± 2

Dados expressos como média ± EPM. ANOVA 2 vias, *post-hoc* Bonferroni.

* $p < 0,05$ vs Cont.

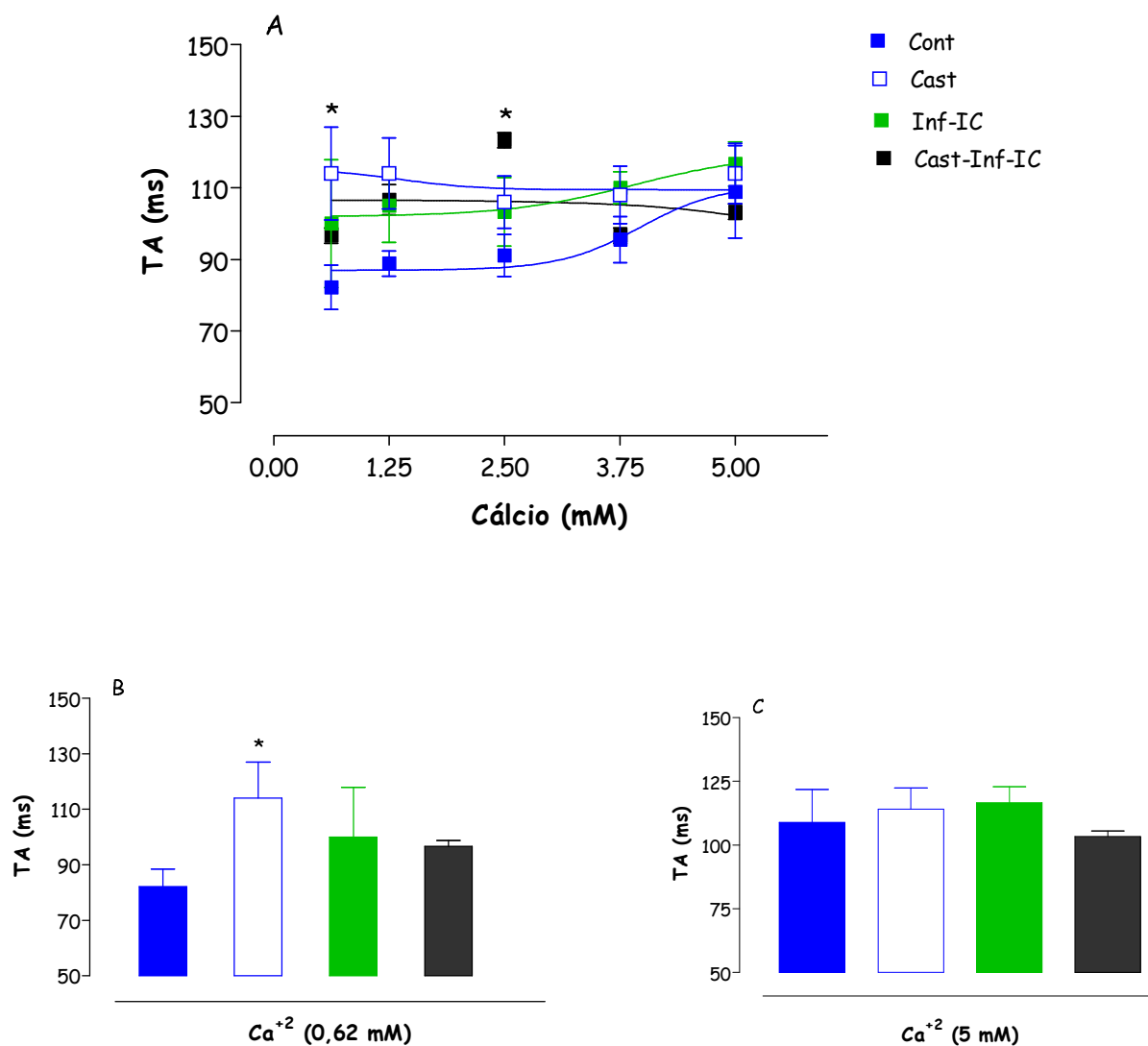


Figura 11: Efeito da variação do cálcio extracelular sobre os dados temporais de ativação (TA) obtidos em tiras de VD de animais controle (Cont; n=9), ovariectomizados (Cast; n=10), infartados com insuficiência cardíaca (Inf-IC; n=6) e ovariectomizados-infartados com insuficiência cardíaca (Cast-Inf-IC; n=6). **(A):** Avaliação do TA na curva concentração-resposta ao cálcio extracelular, de todos os grupos. **(B):** Avaliação do TA na contração basal de todos os grupos em Ca^{+2} 0,62 mM. **(C):** TA de todos os grupos na concentração de cálcio extracelular 5 mM. Dados expressos como média $\pm$ EPM. ANOVA 2 vias, *post-hoc* Bonferroni.

*p< 0,05 *vs* Cont.

O tempo de relaxamento foi maior nos grupos Inf-IC (1,25 mM e 2,5 mM) e Cast (2,5 mM) quando comparados ao grupo Cont.

A análise de variância duas vias, demonstrou que no tempo de relaxamento, da curva do cálcio, existe interação entre os grupos ($p < 0,0001$), entre as doses ($p < 0,0001$) mas não, entre ambos.

Tabela 7: Valores do tempo de relaxamento (TR - ms) obtidos em diferentes concentrações de cálcio extracelular através da análise em tiras de VD de animais controle (Cont), ovariectomizados (Cast), infartados com insuficiência cardíaca (Inf-IC) e ovariectomizados-infartados com insuficiência cardíaca (Cast-Inf-IC).

Cálcio (mM)	Cont (n=11)	Cast (n=11)	Inf-IC (n=5)	Cast-Inf-IC (n=7)
0,62	175 ± 9	204 ± 17	196 ± 16	183 ± 18
1,25	168 ± 11	227 ± 18	268 ± 26 *	227 ± 24
2,50	195 ± 12	262 ± 26 *	286 ± 24 *	263 ± 8
3,75	220 ± 14	278 ± 26	286 ± 28	270 ± 14
5,00	230 ± 14	276 ± 29	290 ± 26	252 ± 25

Dados expressos como média ± EPM. ANOVA 2 vias, *post-hoc* Bonferroni.

*p< 0,05 *vs* Cont.

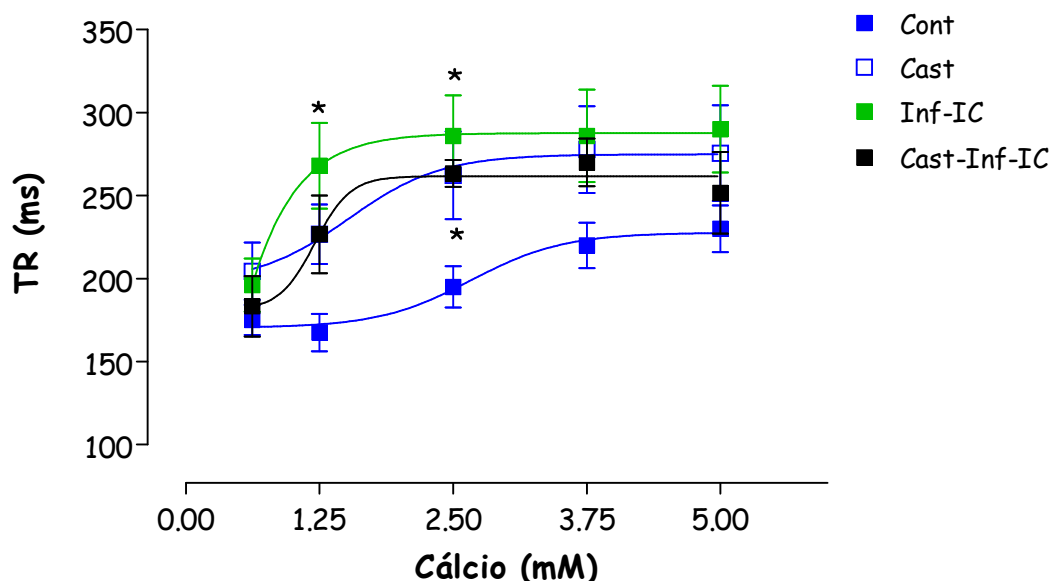


Figura 12: Efeito do cálcio extracelular sobre o tempo de relaxamento (TR- ms) de tiras de VD de animais controle (Cont; n=9), ovariectomizados (Cast; n=10), infartados com insuficiência cardíaca (Inf-IC; n=6) e ovariectomizados-infartados com insuficiência cardíaca (Cast-Inf-IC; n=6). Dados expressos como média $\pm$ EPM. ANOVA 2 vias, *post-hoc* Bonferroni.

* $p < 0,05$ vs Cont.

4.6 AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO NA CONTRATILIDADE E RELAXAMENTO DO VENTRÍCULO DIREITO

A análise de variância duas vias demonstrou que, nas contrações pós-pausa, existe interação entre os grupos ($p < 0,01$), entre as doses ($p < 0,0001$) mas não, entre ambos.

Tabela 8: Valores relativos das contrações pós-pausa (PPP) obtidas após diferentes intervalos de pausa (15", 30", 60" e 120") em tiras de VD de animais controle (Cont), ovariectomizados (Cast), infartados com insuficiência cardíaca (Inf-IC) e ovariectomizados-infartados com insuficiência cardíaca (Cast-Inf-IC).

Tempo de pausa	Cont	Cast	Inf-IC	Cast-Inf-IC
----------------	------	------	--------	-------------

(seg)	(n=16)	(n=17)	(n=7)	(n=8)
15	1,5 ± 0,05	1,7 ± 0,05	1,6 ± 0,06	1,8 ± 0,05
30	1,8 ± 0,07	1,9 ± 0,07	1,9 ± 0,15	2,1 ± 0,08
60	2,0 ± 0,10	2,3 ± 0,11	2,0 ± 0,16	2,3 ± 0,11
120	2,0 ± 0,11	2,3 ± 0,14	2,1 ± 0,17	2,3 ± 0,13

Dados expressos como média ± EPM. ANOVA 2 vias, *post-hoc* Bonferroni.

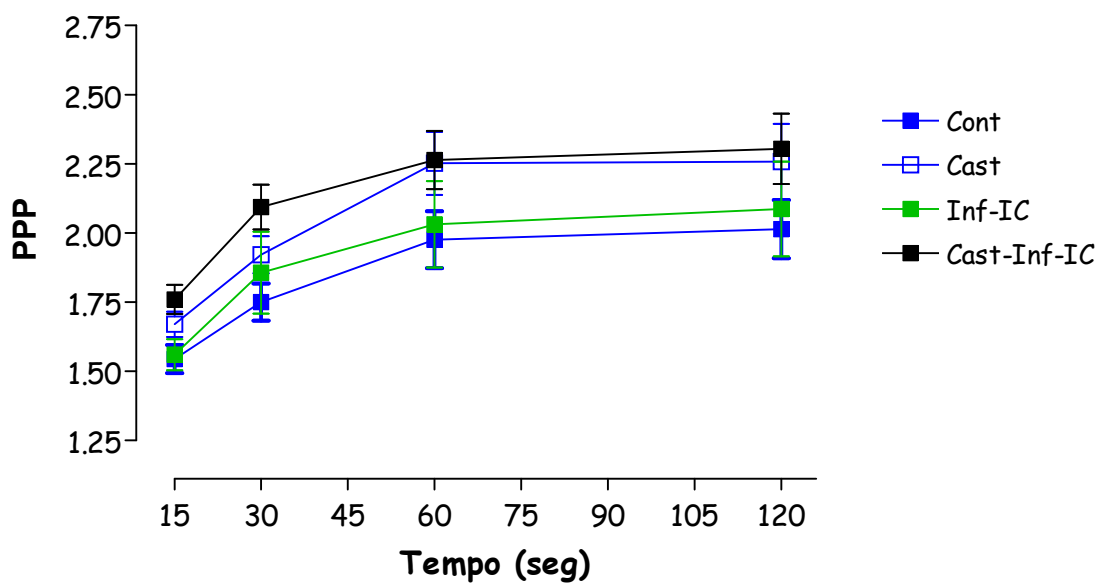


Figura 13: Índice relativo das contrações pós-pausa (PPP) obtidas após diferentes intervalos de pausa (15", 30", 60" e 120") em tiras de VD de animais controle (Cont; n=16), ovariectomizados (Cast; n=17), infartados com insuficiência cardíaca (Inf-IC; n=7) e ovariectomizados-infartados com insuficiência cardíaca (Cast-Inf-IC; n=8). Dados expressos como média ± EPM. ANOVA 2 vias, *post-hoc* Bonferroni.

4.7 AVALIAÇÃO DA INCIDÊNCIA DE EXTRASSÍSTOLES

A incidência geral de arritmias em preparações de VD, no grupo de ratas ovariectomizadas (Cast, 62 %) foi praticamente o dobro do percentual dos demais grupos (Cont, 32 %; Inf-IC, 29 % e Cast-Inf-IC, 30 %). Foram contabilizadas as arritmias durante o período de estabilização (basal) e após a estimulação β -adrenérgica com isoproterenol.

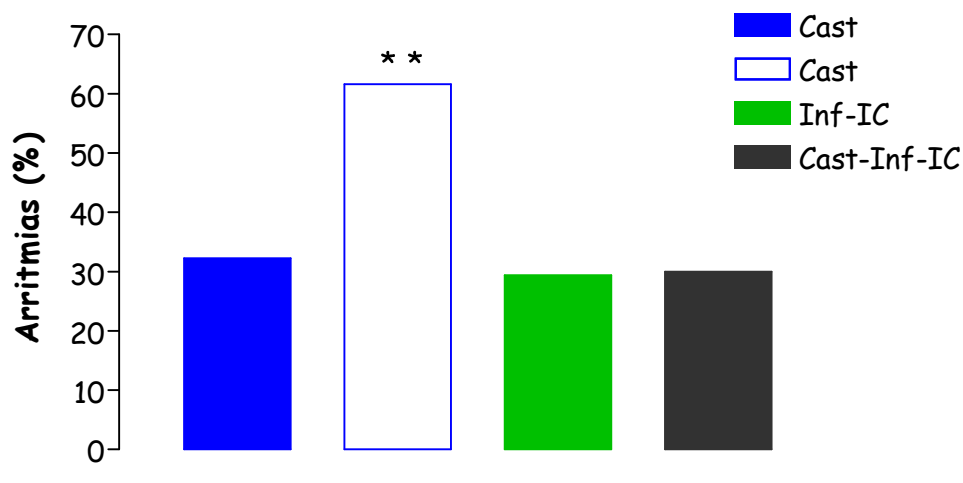


Figura 18: Percentual da incidência geral de arritmias em tiras de VD de animais controle (Cont; n=48), ovariectomizados (Cast; n=60), infartados com IC (Inf-IC; n=8) e ovariectomizados-infartados com IC (Cast-Inf-IC; n= 10).

Dados expressos como média $\pm$ EPM. Teste Qui-quadrado com correção de Yates.

**p< 0,01 vs Cont.

5 DISCUSSÃO

Os principais resultados neste trabalho são que a retirada dos hormônios sexuais ovarianos (HSO) não interfere no desempenho contrátil de tiras de VD de ratas submetidas ou não, ao infarto agudo do miocárdio (IAM), porém, dobra a incidência de arritmias nas ratas não infartadas.

Como esperado, a ausência dos hormônios sexuais femininos, obtida com o procedimento da ovariectomia, promoveu um aumento no peso corporal (PC) e diminuição da razão do peso do útero pelo PC. O ganho de PC confirma a participação destes hormônios sobre o metabolismo lipídico e protéico. Estes dados são corroborados por estudos que avaliaram o perfil lipoproteico de suínos (100) e o metabolismo de carboidratos de mulheres na pós-menopausa (101). A diminuição do peso do útero confirma a participação dos HSO no desenvolvimento e manutenção do aparelho reprodutor feminino (102-104). Houve também, aumento de PC dos animais infartados, muito embora, esta diferença tenha sido apenas 5,3 % maior que o do grupo Cont.

A oclusão cirúrgica da artéria coronária anterior esquerda de rato é uma técnica relativamente simples que resulta em uma seqüência de mudanças no miocárdio que são similares às observadas nos homens, diferindo no seu menor curso temporal. Após o infarto, o miocárdio é submetido a um processo dinâmico de reparo, que é regulado por mecanismos mecânicos, hormonais e fatores genéticos (105,106). Há substituição do tecido necrótico, formação de cicatriz, hipertrofia de miócito e dilatação das câmaras, adaptações estas, que levam à mudanças no tamanho, formato e função dos ventrículos (107).

Dos animais submetidos à oclusão da artéria coronariana, nos quais ocorreu infarto da parede anterior do VE, 50 % apresentaram sinais de insuficiência cardíaca (IC) e somente estes, tiveram aumento na razão VD/PC. Este aumento pode ser atribuído à hipertrofia do VD em função da hipertensão pulmonar (108). A

ausência dos hormônios femininos não modificou esta razão. Cavasin e colaboradores, em 2003 (109), estudando os efeitos do estrogênio em camundongos verificaram um aumento do peso de VD e do coração total de animais submetidos ao IAM quando comparados aos animais sham, e sem haver diferença entre machos e fêmeas. Assim, o presente resultado permite concluir que, os hormônios sexuais femininos não participam da regulação da hipertrofia de VD decorrente da IC, em ratas.

Houve aumento da razão VE/PC no grupo Inf-IC em relação aos grupos Cont e Cast-Inf-IC. O motivo pelo qual no grupo Cast-Inf-IC, não ocorreu aumento da razão VE/PC é que nos animais com IC, o VE apresenta-se mais pesado, entretanto, nos animais castrados, o PC que também é maior, não modificando assim, esta razão.

Um importante aspecto da cirurgia de infarto é a área de cicatriz que se forma nos dias subseqüentes a oclusão da artéria coronária. Neste trabalho, a área de infarto não foi diferente entre os grupos. Isto está de acordo com resultados de outros autores que verificaram que a presença dos HSO não é capaz de diminuir a área de infarto (109-111). Contudo, alguns estudos de isquemia e reperfusão mostram que o tratamento com 17β -estradiol reduz o tamanho do infarto do miocárdio (112,113). Entretanto, neste estudo, a indução do infarto foi feita por meio de ligação definitiva da artéria coronária, diferentemente dos estudos em que se promove isquemia miocárdica seguida de reperfusão. Neste último caso, a ligação deste vaso é temporária e o estrogênio tem acesso ao tecido isquêmico diminuindo a área infartada.

O aumento da razão do peso dos pulmões/PC foi observado nos grupos submetidos ao infarto que apresentaram IC (Inf-IC e Cast-Inf-IC). Isto, presumivelmente, se deve à congestão pulmonar e ao edema decorrente da insuficiência cardíaca pós IAM (114). O aumento da pressão nas veias pulmonares é

transmitido de modo retrógrado para capilares e artérias, resultando em pulmões mais pesados. Entretanto, o aumento da razão do peso dos pulmões/PC no grupo Cast-Inf-IC, foi significativamente menor do que no grupo Inf-IC. Isto deve-se, provavelmente ao fato de os que animais castrados apresentam o peso dos pulmões similar ao do grupo Inf-IC associado ao maior PC. Logo, apresentam uma menor razão do peso dos pulmões/PC. Outros autores verificaram que o tratamento com 17β -estradiol em ratos ovariectomizados-infartados aboliu o aumento do peso úmido dos pulmões (110). Esta diminuição de peso dos pulmões pode estar relacionada com a diminuição de PC e da congestão pulmonar, encontradas nas ratas ovariectomizadas submetidas à reposição estrogênica.

Diferentes metodologias têm sido usadas para elucidar os mecanismos pelos quais os estrógenos desempenham seu papel protetor no sistema cardiovascular, e dentre elas, a exploração dos efeitos na resposta de vasos isolados e nos ventrículos direito e esquerdo, incluindo os músculos papilares.

Neste estudo realizado em ratas ovariectomizadas, foi verificada a ação dos hormônios sexuais femininos na modulação da contração isométrica do ventrículo direito, numa situação pós IAM frente à estimulação β -adrenérgica via isoproterenol e aumento da concentração de cálcio extracelular.

Como foi descrito por Vassallo e colaboradores em 1994 (115), o efeito inotrópico positivo produzido pelo isoproterenol é pequeno nas preparações de coração isolado de rato em concentrações fisiológicas de cálcio. Considerando que o miocárdio de rato satura sua resposta inotrópica positiva em concentrações extracelulares de cálcio inferiores do que as de outras espécies (116), os experimentos foram realizados variando as concentrações extracelulares de Ca^{+2} (0,62; 1,25; 2,5; 3,75 e 5,0 mM).

Os experimentos com isoproterenol e com o cálcio extracelular, resultaram em aumento na força de contração isométrica do VD, de maneira concentração-dependente em todos os grupos estudados. A ovariectomia não alterou a resposta inotrópica positiva ao isoproterenol. Dados semelhantes foram encontrados por Patterson e colaboradores, em 1988, examinando músculos papilares de VD de coelhas, sugerindo que a força contrátil de VD independe destes hormônios (117). Entretanto, o infarto foi capaz de diminuir o inotropismo positivo induzido pelo isoproterenol e pelo cálcio extracelular. Corroborando com este achado, Capogrossi e colaboradores em 1986 (118), afirmaram que liberações espontâneas de Ca^{+2} diastólico inibem eletricamente a sincronia e magnitude da contração após o IAM. Este efeito foi atribuído à insuficiência cardíaca congestiva (119). Banijamali e colaboradores em 1991 (120) e Davidoff e colaboradores em 2004 (97) investigaram que essas liberações espontâneas de Ca^{+2} diastólico inibiam a liberação do Ca^{+2} do RS durante a subsequente ativação elétrica, visto que o nível de ativação individual dos sarcômeros não é uniforme, conseqüentemente a força de contração desenvolvida é menor. O Log de EC_{50} nos animais do grupo Inf-IC foi diferente do grupo Cont, sugerindo aumento da sensibilidade nos animais infartados com sinais de IC, quando administradas doses iguais de isoproterenol.

No músculo cardíaco, as contrações que ocorrem após pausas são potencializadas. Em mamíferos, essas contrações pós-pausas (PPP) usualmente têm força reduzida à medida em que se aumenta o período de pausa (98). Entretanto, o músculo cardíaco de rato é uma exceção, pois em músculos papilares de VE, a força de contração é aumentada a medida em que se aumenta o tempo de pausa (121). Dessa forma, foi investigado se a resposta inotrópica alterada, induzida pelo infarto do miocárdio (122) e a castração, alteravam a PPP, em tiras de VD, numa situação basal com $[\text{Ca}^{+2}]$ em 1,25 mM. A avaliação em todos os grupos, da participação do

retículo sarcoplasmático sobre a resposta contrátil e de relaxamento das tiras de VD, demonstrou que a força de contração não se alterou à medida em que o tempo de pausa foi aumentado. Nem o infarto, nem a castração foram capazes de modificar essa resposta. Estes dados, corroboram os achados de Novaes e colaboradores que em 1996, estudaram PPP em músculos papilares de VD e de VE de ratos infartados (91).

Quanto à cinética de ativação na maior concentração de isoproterenol, os animais do grupo Inf-IC apresentaram aumento do tempo de ativação em relação ao grupo Cont, apenas em algumas concentrações estudadas. Este resultado é corroborado pelos achados de Tombe e colaboradores (123) que estudaram, em 1996, ratos machos com idade de 4 semanas. Provavelmente isto ocorreu por mudanças similares nas proteínas contráteis e nas que se ligam ao Ca^{+2} , no VE e no VD, durante o desenvolvimento da IC (124-126). Na curva de cálcio, a menor concentração (Ca^{+2} 0,62 mM) extracelular, apresentou para o grupo Cast, valores maiores do tempo de ativação, sugerindo a possibilidade de modulação dos canais lentos de Ca^{+2} pelos HSO, confirmando os achados de Mayer e colaboradores, em 1998 (127). Em relação ao tempo de relaxamento da resposta inotrópica ao isoproterenol, não houve diferença significativa entre os grupos avaliados. Em relação ao cálcio na dose de 2,5 mM, o tempo de relaxamento foi maior nos grupos Cast e Inf-IC em relação aos demais. Em relação à castração, os dados foram diferentes aos descritos por alguns pesquisadores, que afirmam ser o estrogênio capaz de encurtar a duração do potencial de ação (41) e com isso, participar da diminuição do tempo de relaxamento. E em relação ao grupo Inf-IC, o resultado já era esperado, visto que a IC, modula negativamente a contratilidade miocárdica (119), conseqüentemente, o tempo gasto para o relaxamento do miocárdio é maior.

Quanto à influência da ovariectomia sobre a incidência de arritmias em tiras de VD, verificou-se que a castração praticamente dobrou a porcentagem geral de arritmias quando comparou-se o grupo Cast com os demais, corroborando dados já observados em mulheres (90), ratos machos (128), camundongos (45) e guinea-pig (129), sugerindo que a ausência dos hormônios sexuais femininos modulam a gênese de arritmias no músculo cardíaco de ratas. Meyer (127) demonstrou que o estrogênio em concentrações fisiológicas é capaz de inibir a ação estimulatória do isoproterenol, via bloqueio de canais de cálcio tipo-L em miócitos ventriculares. Essa modulação negativa do influxo de cálcio por estimulação adrenérgica reduz a frequência cardíaca e conseqüentemente o consumo de oxigênio, sugerindo um efeito cardioprotetor antiarrítmico. Também já foi demonstrado que a reposição estrogênica em mulheres pós-menopausa reduz arritmias cardíacas (130) e a dor de angina (131), e que o uso de bloqueadores de canais de cálcio são efetivos nestes casos (132). Portanto, poderíamos especular que o estrogênio, agindo por meio desses ou de outros canais envolvidos na fase da repolarização cardíaca, como os canais de potássio, influencia a gênese arrítmica em miocárdio com depleção crônica de estrogênio. No entanto, quando o IAM está presente (grupo Cast-Inf-IC), o índice arrítmico é semelhante ao do

grupo Controle sugerindo que numa situação pós-infarto, tanto a redução na densidade da corrente no canal de Ca^{+2} do tipo L, quanto do transiente de Ca^{+2} citoplasmático (133), possam exercer um equilíbrio entre os possíveis fatores pró e anti arrítmicos.

7 REFERÊNCIAS

1. Wilson PWF, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H & Kannel WB (1998). Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation*, 97 (18): 1837-1847.
2. DATASUS - Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM) (26/09/2004). *Secretaria Estadual de Saúde*. www.datasus.gov.br.
3. Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Manson JE, Rosner, Speizer FE & Hennekens CH (1991). Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease. Ten-year follow-up from the nurses' health study. *N Engl J Med.*, 325: 756-762.
4. Psaty BM, Heckbert SR, Atkins D, Siscovick DS, Koepsell TD, Wahl PW, Longstreth WTJ, Weiss NS, Wagner EH, Prentice R & colaboradores (1993). A review of the association of estrogens and progestins with cardiovascular disease in postmenopausal women. *Arch Intern Med.*, 153: 1421-1427.
5. Staessens J, Bulpitt CJ, Fagard R, Lijnen P & Amery A (1989). The influence of menopause on blood pressure. *J Hum Hypertens.*, 3(6): 427-433.
6. Mendelsohn ME (2002). Protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *Am J Cardiol.*, 89(suppl): 12E-18E.
7. Dantas APV, Nigro D, Fortes ZB, Scivoletto R & Carvalho MHC (1999). Hormônios sexuais femininos - aspectos fisiológicos. *Revista da Sociedade Brasileira de Hipertensão*, 2(3): 70-74.
8. Goodman & Gilman (1996). As bases farmacológicas e terapêuticas. 9ª. Edição. McGraw-Hill Interamericana Editores. Cap.57: 1053.
9. Costanzo LS (1999). Fisiologia. Editora Guanabara Koogan. Cap.10: 372-373.
10. Psaty BM, Heckbert SR, Atkins D, Lemaitre R, Koepsell TD, Wahl PW, Siscovick DS & Wagner EH (1994). The risk of myocardial infarction associated with the combined use of estrogens and progestins in postmenopausal women. *Arch Intern Med.*, 154: 1333-1339.

11. de Mello Aires M (1999). Fisiologia. 2ª. Edição. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan. Cap.73: 897-899.
12. Pirola E (28/01/2004). O climatério e o impacto sobre a saúde bucal. *Cultura homeopática*, nº.6, v3. www.escoladehomeopatia.org.br.
13. August P & Oparil S (1999). Hypertension in women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84(6): 1862-1866.
14. Porth CM (2004). Fisiopatologia. 6ª. Edição. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan. Cap.44: 963.
15. Cacciabardo JM & August P (1995). Female sex hormones and cardiovascular disease: implications and therapy. *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management*, Second Edition, 141: 2391-2406.
16. Staessen JA, Ginocchio G & Fagard R (1997). Conventional and ambulatory blood pressure and menopause in a prospective population study. *J Hum Hypertens.*, 11(8): 507-514.
17. Trémollières FA, Pouilles JM, Cauneille C & Ribot C (1999). Coronary heart disease risk factors and menopause: a study in 1684 French women. *Science Direct*, 142(2): 415-423.
18. Brown SA, Hutchinson R, Morrisett J, Boerwinkle E, Davis CE, Gotto AMJ & Patsch W (1993). Plasma lipid, lipoprotein cholesterol and apoprotein distributions in select US communities. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Arterioscler Thromb.*, 13(8): 1139-1158.
19. Davis CE, Pajak A, Rywik S, Williams DH, Broda G, Pazucha T & Ephross S (1994). Natural menopause and cardiovascular disease risk factors. The Poland and US Collaborative Study on Cardiovascular Disease Epidemiology. *Ann Epidemiol.*, 4(6): 445-448.

20. Jensen J, Nilas L & Christiansen C (1990). Influence of menopause on serum lipids and lipoproteins. *Maturitas*, 12(4): 321-331.
21. Matthews KA, Meilahn E, Kuller LH, Kelsey SF, Caggiula AW & Wing RR (1989). Menopause and risk factors for coronary heart disease. *N Engl J Med*, 321(10): 641-646.
22. Couillard C, Bergeron N, Prud'homme D, Bergeron J, Tremblay A, Bouchard C, Mauriège P & Després JP (1999). *Arteriosclerosis, Trombosis and Vascular Biology*, 19: 2448-2455.
23. van Beek AP, Ruijter-Heijstek FC, Erkelens DW & Bruin TWA (1999). Menopause is associated with reduced protection from postprandial lipemia. *Arteriosclerosis, Trombosis and Vascular Biology*, 19: 2737-2741.
24. Constantine GD & Pickar JH (2003). Estrogens in postmenopausal women: recent insights. *Current opinion in Pharmacology*, 3: 626-634.
25. Stampfer MJ, Willett WC, Colditz GA, Rosner B, Speizer FE & Hennekens CH (1985). A prospective study of postmenopausal estrogen therapy and coronary heart disease. *N Engl J Med*, 313 (17): 1044-1049.
26. Paganini-Hill A (1995). The risks and benefits of estrogen replacement therapy: Leisure World. *Int J Fertil Menopausal Stud*, 40 (Suppl) 1: 54-62.
27. Bush TL (1998). Lessons from HERS: the null and beyond. *J Womens Health*, 7 (7): 781-783.
28. The National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI). (09/07/2002). www.nhlbi.nih.gov.
29. National Institutes of Health (NIH). (09/07/2002). www.nih.gov/about.

30. Writing Group for the Womens's Health Initiative Investigators (2002). Risks and benefits of estrogen plus progestin in health postmenopausal women: principal results from the Womens's Health Initiative randomized controlled trial. *J Am Med Assoc.*, 288: 321-333.
31. United State National Library of Medicine (27/08/2002). www.nlm.nih.gov.
32. Murdoch FE & Gorski J (1991). The role of estrogen receptor regulation of gene expression. *Mol Cell Endocrinol.*, 78: C103-108.
33. Brandenberger AW, Tee MK, Lee JY, Chao V & Jaffe RB (1997). Tissue distribution of estrogen receptors alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNA in the midgestational human fetus. *J Clin Endocrinol Metab.*, 82: 3509-3512.
34. Grohe C, Kahlert S, Lobbart K, Stimpel M, Karas RH, Vetter H & col (1997). Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors. *FEBS Lett*, 416: 107-112.
35. Marek J, Rachelska G, Donghao W, McCann SM & Gutkowska J (2001). Estrogen receptors activate atrial natriuretic peptide in the rat heart. *PNAS*, 98(20): 11765-11770.
36. Nadal A, Díaz M & Valverde MA (2001). The estrogen trinity: membrane, cytosolic and nuclear effects. *News Physiol Sci.*, 16: 251-255.
37. Dubey RK & Jackson EK (2001). Genome and hormones: gender differences in physiology . Invited review: cardiovascular protective effects of 17 β -estradiol metabolites. *J Appl Physiol.*, 91: 1868-1883.
38. Levin ER (2002). Cellular functions of plasma membrane estrogen receptors. *Steroids*, 67: 471-475.

39. Liu MM, Albanese C, Anderson CM, Hilty K, Webb P, Uht RM, Prince RH, Jr-Pestell RG & Kushner PJ (2002). Opposing action of estrogen receptors α and β on cyclin D1 gene expression. *J Biol Chem*, 277: 24353-24360.
40. Lindberg MK, Moverare S, Skrtic S, Gao H, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA & Ohlsson C (2003). Estrogen receptor (ER)- β reduces ER- α regulated transcription supporting a "Ying Yang" relationship between ER α and ER β in mice. *Mol Endocrinol*, 17: 203-208.
41. Nakajima T, Iwasawa K, Oonuma H, Morita T, Goto A, Wang Y & Hazama H (1999). Antiarrhythmic effect and its underlying ionic mechanism of 17 beta-estradiol in cardiac myocytes. *Br J Pharmacol*, 2: 429-440.
42. Bailey MS & Curtis AB (2002). The effects of hormones on arrhythmias in women. *Curr Womens Health Rep*, 2: 83-88.
43. Lee TM, Su SF, Tsai CC, Lee YT & Tsai CH (2000). Cardioprotective effects of 17 beta-estradiol produced by activation of mitochondrial ATP-sensitive K(+) channels in canine hearts. *J Mol Cell Cardiol*, 32(7): 1147-1158.
44. Wang X & Abdel-Rahman AA (2002). Estrogen modulation of eNOS activity and its association with caveolin-3 and calmodulin in rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 282(6): H2309-H2315.
45. Johnson BD, Zheng W, Korach KS, Scheuer T, Catterall WA & Rubany GM (1997). Increased expression of the cardiac L-type calcium channel in estrogen receptor-deficient mice. *J Gen Physiol*, 110: 135-140.
46. Wattanapernpool J (1998). Increase in calcium responsiveness of cardiac myofilament activation in ovariectomized rats. *Life Sciences*, 63: 955-964.
47. Wattanapernpool J & Reiser PJ (1999). Differential effects of ovariectomy on calcium activation of cardiac and soleus myofilaments. *Am J Physiol*, 277: H467-473.

48. Fabiato A (1983). A calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol*, 245: C1-C14.
49. Barcenaz-Ruiz L & Wier WG (1987). Voltage dependence of intracellular $[Ca^{+2}]_i$ transients in guinea pig ventricular myocytes. *Circulation Research*, 61: 148-154.
50. Beuckelmann DJ & Wier M (1988). Mechanism of release of calcium from sarcoplasmic reticulum of guinea pig cardiac cells. *Journal of Physiology*, 405: 233-255.
51. Cleemann L & Morad M (1991). Role of Ca^{+2} channel in cardiac excitation-contraction coupling in the rat: evidence from Ca^{+2} transients and contraction. *Journal of Physiology*, 432: 283-312.
52. Leblanc N & Hume J (1990). Sodium current-induced release of calcium from cardiac sarcoplasmic reticulum. *Science*, 248: 372-378.
53. Lipp P & Niggli E (1994). Sodium current-induced calcium signals in isolated guinea-pig ventricular myocytes. *Journal of Physiology*, 474: 439-446.
54. Lee KS, Ladinsky H, Choi SI & Kasaya Y (1966). Studies on the vitro interaction of electrical stimulation and Ca^{+2} movement in sarcoplasmic reticulum. *Journal of General Physiology*, 49: 689.
55. Nakajime Y & Endo M (1973). Release of calcium induced by depolarization of the sarcoplasmic reticulum membrane. *Nature*, 246: 216.
56. Ferrier GR, Zhu JQ, Rodondo IM & Howlett SE (1988). Role of cAMP-dependent protein kinase A in activation of voltage-sensitive release mechanism for cardiac contraction in guinea-pig myocytes. *Journal of Physiology*, 513: 185-201.
57. Ferrier GR & Howlett SE (1995). Contractions in guinea-pig ventricular myocytes triggered by a calcium-released mechanism separate from Na^{+} and L-currents. *Journal of Physiology*, 484: 107-122.

58. Howlett SE, Zhu JQ & Ferrier GR (1998). Contribution of a voltage-sensitive calcium release mechanisms to contraction in cardiac ventricular myocytes. *Am J Physiol.*, 274: H155-H170.
59. Sperelakis N, Katsube Y, Yokoshiki H, Sada H & Sumii K (1996). Regulation of the slow Ca^{+2} channels of myocardial cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 163-164: 85-98.
60. de Mello Aires M (1999). Fisiologia. 2ª. Edição. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan. Cap.34: 368-391.
61. Reuter H (1967). The dependence of slow inward current in Purkinje fibres on the extracellular calcium-concentration. *J Physiol.*, 192(2): 479-492.
62. Strosberg AD (1997). Structure and function of the β_3 -adrenergic receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 37: 421-450.
63. Kaumann AJ (1997). Four β -adrenoceptor subtypes in the mammalian heart. *Trend Pharmacol Sci*, 18: 70-76.
64. Wallukat G (2002). The β -adrenergic receptors. *Herz*, 7: 683-690.
65. Bristow MR, Ginsburg R, Umans V & colaboradores (1986). β_1 and β_2 receptors subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardial: coupling of both receptors subtypes to muscle contraction and selective β_1 -receptor-down-regulation in heart failure. *Circ Res.*, 59: 297-309.
66. Stiles GL, Taylors S & Lefkowitz RJ (1983). Human cardiac β -adrenergic receptors: subtype heterogeneity delineated by direct radioligand binding. *Life Sci.*, 33: 467-473.
67. Vanhees L, Albert A, Fagard R, Hespel P & Amery A (1986). Influence of β_1 versus β_2 adrenoceptor blockade on left ventricular function in humans. *J Cardiovasc Pharmacol.*, 8: 1086-1091.

68. Opie LH (1991). Receptors and signal transduction. *Opie LH, ed - The Heart Physiology and Metabolism, 2 ed. New York: Raven Press.*, 145-176.
69. Bourne RH (1998). Receptors and signal transduction. *Opie LH, ed - The Heart Physiology, from Cell to Circulation, 3 ed. Philadelphia - New York: Lippincott Raven*, 173-207.
70. Neer EJ & Claphan DE (1988). Roles of G-protein subunits in transmembrane signalling. *Nature*, 333: 129-134.
71. Dzimir N (2002). Receptor crosstalk: implications for cardiovascular function, disease and therapy. *Eur J Biochem.*, 269: 4713-30.
72. Katz AM, Tada M, Repke DI, Iorio JM & Kirchberger MA (1974). Adenylate cyclase: its probable localization in sarcoplasmic reticulum as well as sarcolemma of canine heart. *J Mol Cell Cardiol.*, 6: 73-78.
73. Drumond GI & Dunhan J (1977). Adenylate cyclase in cardiac microsomal fractions. *J Mol Cell Cardiol.*, 10: 317-331.
74. Jarrot B & Oicken GM (1975). Cardiac adenylate cyclase: preparation and characterization of subcellular fraction containing catecholamine sensitive adenylate cyclase. *J Mol Cell Cardiol.*, 7: 685-695.
75. Engelhard VH, Plut DA & Storn DR (1976). Subcellular location of adenylate cyclase in rat cardiac muscle. *Biochim Biophys Acta*, 451: 48-61.
76. Spurgeon HA, Stern MD, Baartz G, Raffaelli S, Hansford RG, Talo A, Lakatta EG & Capogrossi MC (1990). Simultaneous measurements of Ca^{+2} , contraction and potential in cardiac myocytes. *Am J Physiol.*, 258: H574-H586.

77. Li L, DeSantiago J, Chu G, Kranias EG & Bers DM (2000). Phosphorilation of phospholamban and troponin I in β -adrenergic-induced acceleration of cardiac relaxation. *Am J Physiol.*, 278: H769-H779.
78. Cory RC, Grand RW & Houston ME (1994). Role of sarcoplasmic reticulum in loss of load-sensitive relaxation in pressure overload cardiac hypertrophy. *Am J Physiol.*, 266: H68-H78.
79. LePeuch CJ, Haiech J & Demaille JG (1979). Concerted regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum calcium transport by cyclic adenosine monophosphate dependent and calcium-calmodulin-dependent phosphorylation. *Biochemistry*, 18: 150-157.
80. Xiao RP, Spurgeon HA, O'Connor K & Lakata EG (1994). Age associated changes in β -adrenergic modulation on rat cardiac excitation coupling. *J Clin Invest.*, 94: 2051-2059.
81. Vassallo DV & Paes de Carvalho AP (1979). Influence of temperature on isometric contraction of rabbit atria during isotropic interventions. *Acta Physiologica Latinoamericana*, a29: 131-135.
82. Vassallo DV & Paes de Carvalho AP (1979). Phase plane determination of mechanical properties of the myocardium. *Acta Physiologica Latinoamericana*, b29: 137-149.
83. Gende AOG, Alzueta ADP & Cingolani IIE (1977). Effect of isoproterenol on relation between maximal rate of contraction and maximal rate of relaxation. *Am J Physiol.*, 233: H404-H409.
84. Constantinides P (1966). Plaques fissures in human coronary thrombosis. *J Atherosclerosis Research*, 6: 1-7.
85. Robbins SL, Cotran RS & Kumar V (2001). Fundamentos de Robbins - Patologia estrutural e funcional. 6ª. Edição. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan. Cap.13: 503-505.
86. Ringer S (1883). A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart. *J Physiol (Lond)*, 4: 29-47.

87. Vassallo DV & Tucci PJF (1978). Intensidade da ação de intervenções inotrópicas em diferentes graus de estiramento da miofibrila. Aparente inter-relação entre o mecanismo de Frank-Starling e o inotropismo cardíaco. *Arq Bras Cardiol.*, 31: 155-158.
88. Collins P, Rosano GM, Jiang C, Lindsay D, Sarrel PM & Poole-Wilson PA (1993). Cardiovascular protection by oestrogen - a calcium antagonist effect? *Lancet*, 341(8855): 1264-1265.
89. Sugishita K, Li F & Barry WH (2003). Anti-oxidant effects of estrogen reduce $[Ca^{+2}]_i$ during metabolic inhibition. *J Mol Cell Cardiol.*, 35(3): 331-336.
90. Malloy KJ & Bahinski A (1999). Cardiovascular disease and Arrhythmias: Unique Risks in Women. *The Journal of Gender-Specific Medicine*, 2(1): 37-44.
91. Novaes MAS, Stefanon S, Mill JG & Vassallo DV (1996). Contractility changes of the right and left ventricular muscle after chronic myocardial infarction. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 29: 1683-1690.
92. Johns TN & Olson BJ (1954). Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals. *Ann Surg.*, 140(5): 675-682.
93. Selye H, Bajusz E, Grasso S & Mendell P (1960). Simple techniques for the surgical occlusion of coronary vessels in the rat. *Angiology*, 11: 398-407.
94. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner R & Braunwald F (1979). Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circulation Research*, 44: 503-512.
95. Santos PE & Masuda MO (1991). The electrocardiogram of rats with an old extensive myocardial infarction. *Braz J Med Biol Res.*, 24(11): 1173-1177.

96. Mill JG, Stefanon I, Leite CM & Vassallo DV (1990). Changes in performance of the surviving myocardium after left ventricular infarction in rats. *Cardiovascular Research*, 24(9): 748-753.
97. Davidoff AW, Boyden PA, Schwartz K, Michel JB, Zhang YM, Obayashi M, Crabbe D & Ter Keurs DJ (2004). Congestive heart failure after myocardial infarction in the rat: cardiac force and spontaneous sarcomere activity. *Ann NY Acad Sci*, 1015: 84-95.
98. Vassallo DV & Mill JG (1988). Mechanical behaviour of rest contractions in cardiac muscle. *Acta Physiologica et Pharmacologica Latinoamericana*, 38: 87-97.
99. Vassallo DV, Lima EQ, Campagnaro P, Stefanon I, Leite CM & Mill JG (1994). Effects of isoproterenol on the mechanical activity of isolated papillary muscle and perfused rat hearts in various calcium concentrations. *Pharmacological Research*, 3 (29): 251-260.
100. Keaney JF, Shwaery GT, Xu A, Nicolsi RJ & Loscalzo J (1994). 17 beta-estradiol preserves endothelial vasodilator function and limits low-density lipoprotein oxidation in hypercholesterolemic swine. *Circulation*, 89: 2251-9.
101. Haarbo J, Marselew U & Gotfredsen. Christiansen C (1991). Postmenopausal hormone replacement therapy prevents central distribution of body fat after menopause. *Metabolism*, 40: 1323-6.
102. Barbacanne MA, Rami J, Michel JB, Souchard JP, Phillippe M, Besombes JP, Bayard F & Arnal JF (1999). Estradiol increases rat aorta endothelium-derived relaxing factor (EDHF) activity without changes in endothelial NO synthase gene expression: possible role of decreased endothelium-derived superoxide anion production. *Cardiovascular Research*, 41: 672-681.
103. Blom MJ, Wassink MG, Kloosterboer HJ, Ederveen AG, Lambert JG & Goos HJ (2001). Metabolism of estradiol, ethynilestradiol and moxestrol in rat uterus, vagina and aorta: influence of sex steroid treatment. *Drug Metabolism and Disposition*, 29: 76-81.

104. Tatchum-Talom R, Martel C & Marette A (2002). Influence of estrogen on aortic stiffness and endothelial function in female rats. *American Journal of Physiology*, 282: H491-H498.
105. Bouchardy B & Majno G (1974). Histopathology of early myocardial infarcts. A new approach. *American J Pathol.*, 74: 301-330.
106. Fishbein MC, MacLean D & Maroko PR (1978). Experimental myocardial infarction in the rat. Qualitative and quantitative changes during pathologic evolution. *AM J Pathol.*, 90:57-70.
107. Tibiriçá E (2001). Fisiopatologia das alterações estruturais e funcionais do coração após infarto do miocárdio. *Fisiopatologia em medicina cardiovascular - Editora Revinter Ltda (RJ)*, ISBN: 85-7309-473-7.
108. Pereira RB, Sartorio CL, Vassallo DV & Stefanon I (2004). Differences in tail vascular bed reactivity in rats with and without heart failure following myocardial infarction. *J Pharmacol Exp Ther.*, 312: 1321-1325.
109. Cavasin MA, Sankey SS, Yu AL, Menon S & Yang XP (2003). Estrogen and testosterone have opposing effects on chronic cardiac remodeling and function in mice with myocardial infarction. *American Journal of Physiology*, 284: H1560-H1569.
110. Nekooeian AA & Pang CCY (1998). Estrogens restores role basal nitric oxide in control of vascular tone in rats with chronic heart failure. *Heart Circulation Physiology*, 43: H2094-H2099.
111. McNulty PH, Jagasia D, Whiting JM & Caulin-Glaser T (2000). Effect of 6-wk estrogen withdraw or replacement on myocardial ischemic tolerance in rats. *American Journal of Physiology*, 278:H1030-H1034.
112. Hale SL, Birnbaum Y & Kloner RA (1996). Beta-estradiol, but not alpha-estradiol, reduced myocardial necrosis in rabbits after ischemia and reperfusion. *Am Heart J.*, 132(2 Pt 1): 258-262.

113. Node K, Kitakaze M, Kosaka H, Minamino T, Funaya H & Hori M (1997). Amelioration of ischemia- and reperfusion-induced myocardial injury by 17 β -estradiol. *Circulation*, 96: 1953-1963.
114. Jasmin JF, Mercier I, Hnasko R, Cheung MW, Tanowitz HB, Dupuis J & Lisanti MP (2004). Lung remodeling and pulmonary hypertension after myocardial infarction: pathogenic role of reduced caveolin expression. *Cardiovasc Res.*, 63(4): 747-55.
115. Vassallo DV, Lima EQ, Campagnaro P, Stefanon I, Leite CM & Mill JG (1994). Effects of isoproterenol on the mechanical activity of isolated papillary muscles and perfused rat hearts in various calcium concentrations. *Pharmacological Research*, 29(3): 251-260.
116. Stefanon I, Vassallo DV, Mill JG, Abaurre PF & Pelloso RA (1989). The relationship between extracellular calcium and isovolumetric systolic pressure in the Langendorff-perfused rat heart. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 22: 905-907.
117. Patterson E, Lianmin MA, Bela Szabo, Casey P, Thadani R & Thadani U (1998). Ovariectomy and estrogen-induced alterations in myocardial contractility in female rabbits: role of the L-type calcium channel. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 284: 586-591.
118. Capogrossi MC, Soares-Isla BA & Lakatta EA (1986). The interaction of electrically stimulated twitches and spontaneous contractile waves in single cardiac myocytes, *J Gen Physiol.*, 88: 615-633.
119. Houser SR & Lakatta EG (1999). Function of the cardiac myocyte in the conundrum of end-stage, dilated human heart failure. *Circulation*, 99: 600-604.
120. Banijamali H, Gao WD, MacIntosh B & col (1991). Force-interval relations of twitches and cold contractures in rat cardiac trabeculae; effect of ryanodine. *Circ Res.*, 69: 937-948.
121. Vassallo DV, Mill JG & Abreu GR (1990). Control of rests potentiation in ventricular myocardium by the Na-Ca exchange mechanism. *Acta Physiologica et Pharmacologica Latinoamericana*, 40: 129-136.

122. Pieske B, Sütterlin M, Schmidt-Schweda S, Minami K, Meyer M, Olschewski M, Holubarsch CH, Just H & Hasenfuss G (1996). Diminished post-rest potentiation of contractile force in human dilated cardiomyopathy: functional evidence for alterations in intracellular Ca^{+2} handling. *J Clin Invest.*, 98: 764-776.
123. Tombe PP, Wannesburg DF & Little WC (1996). Right ventricular contractile protein function in rats with left ventricular myocardial infarction. *Am J Physiol.*, 271: H73-79.
124. Afzal N & Dhalla NS (1992). Differential changes in left and right ventricular SR calcium transport in congestive heart failure. *Am J Physiol.*, 262: H868-874.
125. Anversa P, Beghi C, MacDonald SL, Levicky V, Kikkava Y & Olivetti G (1984). Morphometry of right ventricular hypertrophy induced by myocardial infarction in the rat. *Am J Pathol.*, 116: 504-513.
126. Geenen DL, Malhotra A & Scheuer J (1989). Regional variation in rat cardiac myosin isoenzymes and ATPase activity after infarction. *Am J Physiol.*, 256: H745-750.
127. Mayer R, Linz KW, Surges R, Meinardus S, Veas J, Hoffmann A, Windholz O & Grohe C (1998). Rapid modulation of L-type calcium current by acutely applied oestrogen in isolated cardiac myocytes from human, guinea-pig and rat. *Exp Physiol.*, 83(3): 305-321.
128. Berger F, Borchard U, Hafner D, Putz I & Weis TM (1997). Effects of 17 beta-estradiol on action potential and ionic currents in male rat ventricular myocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 356: 788-796.
129. Jiang C, Poole-Wilson PA, Sarrel PM, Mochizuki S, Collins P & MacLeod KT (1992). Effect of 17 beta-estradiol on contraction, Ca^{+2} current and intracellular free Ca^{+2} in guinea pig isolated cardiac myocytes. *Br J Pharmacol*, 106: 739-745.

130. Cagnacci A, Soldani R, Puccini E, Fioretti P & Melis GB (1992). Lipid-independent therapeutic properties of transdermal 17 β -estradiol on cardiovascular diseases. *Acta Obstet Gynecol Scand.*, 71(8): 639-641.
131. Sarrel PM (1996). Cardiovascular disease in women: implications of hormone replacement therapy. *Int J Fertil Menopausal Stud.*, 41(2): 90-93.
132. Braunwald E (1982). Calcium-channel blockers: pharmacologic considerations. *Am heart J.*, 104(3): 665-671.
133. Saraiva RM, Chedid NG, Quintero HCC, Diaz GLE & Masuda MO (2003). Impaired beta-adrenergic response and decreased L-type calcium current of hypertrophied left ventricular myocytes in postinfarction heart failure. *Braz J Med Biol Res.*, 36(5): 635-648.