

**IMPLICAÇÕES DA TERAPIA ESTROGÊNICA ASSOCIADA AO
EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A FUNÇÃO CARDÍACA DE RATAS
INFARTADAS E OVARIECTOMIZADAS**

Simone Alves de Almeida Simões

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**

VITÓRIA-ES, MARÇO DE 2019.

SIMONE ALVES DE ALMEIDA SIMÕES

**IMPLICAÇÕES DA TERAPIA ESTROGÊNICA ASSOCIADA AO
EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A FUNÇÃO CARDÍACA DE RATAS
INFARTADAS E OVARIECTOMIZADAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gláucia Rodrigues de Abreu

**VITÓRIA
2019**

Implicações da terapia estrogênica associada ao exercício físico sobre a função cardíaca de ratas infartadas e ovariectomizadas

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do Título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Gláucia Rodrigues de Abreu
(Orientadora)

Prof^a. Dra. Nazaré de Souza Bissoli
(Membro interno)

Prof. Dr. Henrique de Azevedo Futuro Neto
(Membro externo)

Prof. Dr. Helder Mauad
(Membro externo)

Prof. Dr. André Soares Leopoldo
(Membro externo)

DEDICATÓRIA

DEDICO ESTE TRABALHO

Às minhas filhas Ana Clara e Isabela, ao meu esposo Robson e a toda minha família que contribuíram de alguma forma para a realização desse projeto.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a DEUS, pela força, cuidado e proteção, pois sem ele não teria completado mais uma etapa em minha vida.

As minhas duas filhas Ana Clara e Isabela, por cada beijo, cada abraço e por todas as manifestações de carinho. Amor incondicional.

Ao meu esposo Robson, pelo carinho, paciência, compreensão e apoio em todas as minhas decisões, estando sempre ao meu lado.

Aos meus pais Geraldo e Neidite, que foram a base da minha educação e sempre me ensinaram a nunca desistir e acreditar sempre no meu potencial.

A minha sogra Ilma, que esteve sempre ao meu lado, me apoiando e ajudando a cuidar das meninas e do seu filho. Além de cuidar também de mim. Sem a sua ajuda eu não teria chegado até o fim desse doutorado.

A minha querida irmã Gabriela, pelo carinho e apoio. Sempre companheira.

A todos os meus familiares pelas orações, estando sempre na torcida pela minha vitória.

Aos colegas de laboratório, Fabrício, Suelen, Vinícius e o mais recente, Bruno, que na verdade foram verdadeiros irmãos e me apoiaram durante todo o doutorado.

Ao meu amigo Erick, pela parceria e orientação durante os anos de convivência no laboratório. Pode ter certeza que teve uma importante contribuição para a finalização desse projeto. Meu muito obrigada.

A minha amiga, parceira e irmã, Girlandia. Meu muito obrigada pelo exemplo de pessoa e pesquisadora.

Aos alunos de iniciação científica, Jafia e Camille, muito obrigada pela ajuda.

A Profª Drª Gláucia, pelo apoio, oportunidade, confiança e compreensão.

Enfim, a todos os colegas que estiveram na torcida de mais uma conquista em minha vida.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”. (Marthin Luther King)

SUMÁRIO

RESUMO	15
ABSTRACT	17
1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	32
2.1 – Objetivo Geral	32
2.2 – Objetivos Específicos	32
3. MATERIALE MÉTODOS	34
3.1 – Animais Experimentais	34
3.2 – Ovariectomia	34
3.3 – Indução do Infarto do Miocárdio	35
3.4 – Grupos Experimentais	36
3.5 – Protocolo de Treinamento de Corrida	37
3.6 – Terapia de Reposição Estrogênica	38
3.7 – Avaliação da Função Cardíaca	38
3.8 – Coleta de tecidos	40
3.9 – Determinação da expressão proteica pela técnica de Western Blotting	40
3.10 – Eletroforese e Transferência das amostras	41
3.11 – Incubação com os Anticorpos	41
3.12 – Detecção das Bandas de Proteínas	42
3.13 – Determinação dos produtos avançados de oxidação de proteínas	

.....	42
3.14 – Atividade das Enzimas Antioxidantes.....	43
3.15 – Avaliação Histológica.....	44
3.16 – Hipertrofia e Deposição de colágeno.....	44
3.17 – Avaliação da Área de Extensão do Infarto.....	45
3.18 – Análise Estatística.....	45
4. RESULTADOS.....	48
4.1 – Avaliação dos dados ponderais e hemodinâmicos.....	48
4.2 – Área de Infarto.....	50
4.3 – Função Cardíaca.....	52
4.4 - Avaliações Histológicas.....	54
4.5 – Produtos Avançados de Oxidação Proteica (AOPP).....	57
4.6 – Expressão Proteica.....	58
4.7 Atividade das Enzimas Antioxidantes.....	61
5. DISCUSSÃO.....	63
6. CONCLUSÕES.....	76
7. REFERÊNCIAS.....	78
8. ANEXOS.....	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diferentes fases do remodelamento cardíaco após a Indução do Infarto do Miocárdio.

Figura 2: Diferentes estímulos para formação de espécies reativas de oxigênio.

Figura 3: Principais vias de formação das espécies reativas de oxigênio.

Figura 4: Ação das enzimas antioxidante na conversão do ânion superóxido.

Figura 5: Indução do Infarto do Miocárdio com oclusão do ramo descendentes anterior coronária esquerda.

Figura 6: Representação esquemática da distribuição dos grupos experimentais.

Figura 7: Representação do todo protocol experimental.

Figura 8: Figura representativa de uma onda de pressão ventricular, delimitando os pontos de onde foram obtidas as variáveis.

Figura 9: Análise histológica da área de extensão do IM.

Figura 10: Parâmetros Funcionais do Ventrículo Esquerdo.

Figura 11: Avaliação da área de secção transversa dos miócitos cardíacos.

Figura 12: Avaliação do colágeno intersticial no tecido cardíaco.

Figura 13: Análise dos Produtos Avançados de Oxidação Proteica (AOPP).

Figura 14: Avaliação da expressão proteica das enzimas antioxidante no tecido cardíaco.

Figura 15: Avaliação da expressão proteica do receptor AT-1R, e da enzima pró- oxidante gp91phox no tecido cardíaco.

Figura 16: Atividade das enzimas antioxidante SOD e Catalase no tecido cardíaco.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeitos do Exercício Físico e E2 sobre os parâmetros ponderais das ratas OVX e IM.

Tabela 2: Parâmetros Hemodinâmicos oito semanas após exercício físico e E2.

LISTA DE ABREVIATURAS

+dP/dt – Derivada positiva do desenvolvimento de pressão ventricular

-dP/dt - Derivada negativa do desenvolvimento de pressão ventricular

μL – Microlitro

μm – Micrometro

μmol/L – Micromol por litro

Ang-II – Angiotensina II

ANOVA – Análise de variância

AOPP – Produtos avançados de oxidação proteica

AT-1R – Receptor do tipo 1 da Angiotensina II

C - Celsius

CAT – Enzima antioxidante catalase **DCV** – Doenças cardiovasculares

E2 – 17-β Estradiol

ECG - Eletrocardiograma **EPM** – Erro padrão da média

EROS – Espécies reativas de oxigênio

FC – Frequência cardíaca

g – Grama (unidade de peso)

gp91phox – Isoforma de membrana do complexo da NADPH oxidase (Nox-2)

GPx – Glutathione peroxidase

i.m -Intramuscular

i.p -Intraperitoneal

IL – Interleucina (IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10)

IM – Infarto do Miocárdio

EF – Exercício Físico

kg - Kilograma

km/h – Kilometros por hora

M - Mol

MEC – Matriz extracelular

mg - Miligrama **min** - Minuto

mL - Mililitro **mM** - Milimol

MMP – Metaloproteinases de matriz (do inglês, “matrixmetaloproteinases”)

nm - Nanometro

NOX – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase

OVX - Ovariectomia

PA – Pressão arterial

PAD – Pressão arterial diastólica

PAM – Pressão arterial média

PAS – Pressão arterial sistólica

PC – Peso corporal

PDFVE – Pressão diastólica final do ventrículo esquerdo

PSVE – Pressão sistólica do ventrículo esquerdo

SHAM – Grupo submetido a cirurgia fictícia para a indução do infarto

SOD – Enzima antioxidante superóxido dismutase

s.c. – Subcutâneo

SOD-2 - Isoformamitochondrial da SOD

SRAA – Sistema renina-angiotensina

VE – Ventrículo esquerdo

TRH – Terapia de reposição hormonal

RESUMO

O período pós-menopausa é caracterizado pela queda abrupta do estrogênio circulante, isto causa mudanças fisiológicas que determinam aumento na incidência de eventos cardiovasculares como o infarto agudo do miocárdio (IM). Para reverter as alterações cardiovasculares ocasionadas pela menopausa, a terapia de reposição hormonal (TRH) vêm sendo estudado como uma opção terapêutica para tratamento e redução da incidência de doenças cardiovasculares, entretanto, o uso da TRH ainda é controverso. Além da TRH, o Exercício físico têm sido utilizado na prevenção e tratamento de algumas doenças. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da terapia de reposição estrogênica (E2) de forma isolada e associada ao exercício físico (EF) sobre o processo de remodelamento cardíaco em ratas ovariectomizadas (OVX) e infartadas. Ratas *Wistar* foram ovariectomizadas (OVX), seguido da indução do IM, sendo separadas em 5 grupos: SHAM (cirurgia fictícia de IM); IM (Infarto do Miocárdio); IM+EF (infarto do miocárdio + exercício físico); IM+E2 (infarto do miocárdio + terapia estrogênica) e IM+EF+E2 (infarto do miocárdio + exercício físico + terapia estrogênica). Quinze dias após o IM, ou cirurgia fictícia, foram iniciados os protocolos de treinamento físico em esteira com intensidade leve a moderada (5x/sem.) e/ou de terapia estrogênica, com injeções s.c de 17- β Estradiol-3-benzoato (E2), 3 vezes por semana, durante 8 semanas. Após o período de tratamento e/ou treinamento, os animais foram submetidos à avaliação hemodinâmica cardíaca mediante a cateterização do ventrículo esquerdo (VE), sendo avaliadas a pressão sistólica e diastólica final do VE (PSVE e PDFVE, respectivamente), derivadas máxima de contração e relaxamento do VE (dP/dt+ e dP/dt-) e o tempo de relaxamento isovolumétrico (Tau). Além disso, foram realizadas as análises histológicas do coração (colágeno e área seccional transversa), do estresse oxidativo cardíaco (AOPP), da expressão de proteínas pró e antioxidantes por western blotting e a atividade das enzimas antioxidantes cardíacas. O IM reduziu a PSVE, dP/dt+ e dP/dt- e aumentou a PDFVE e o Tau. O E2 não preveniu as alterações induzidas pelo IM sobre a função cardíaca, mesmo quando associado ao EF. Foi observado um aumento na dP/dt+ no grupo E2 comparado ao IM. Não houve mudanças na deposição de colágeno e na área seccional transversa dos miócitos pelos tratamentos. O aumento na AOPP, na expressão da Gp91phox e do

receptor AT-1 promovidos pelo IM não foram reduzidos pelo E2. Não houve alterações na expressão das enzimas antioxidantes pelo IM e nem pelos tratamentos, enquanto que, houve uma redução na atividade das enzimas SOD e catalase pós-IM. A redução da atividade da SOD foi prevenida somente pelo EF. Portanto, concluímos que a E2 não previne as alterações induzidas pelo IM sobre a função e piora os parâmetros relacionados ao remodelamento cardíaco. Além disso, o E2 reverte os efeitos preventivos do EF quando é feito de maneira associada.

Palavras chave: Ovariectomia; Terapia estrogênica; Função cardíaca; Remodelamento; Estresse oxidativo.

ABSTRACT

There is an increase in the incidence of cardiovascular events such as myocardial infarction (MI) after menopause. However, the use of estrogen therapy (E2) remains controversial. The aim of this study was to evaluate the effects of E2, alone and combined with exercise training (ET), on cardiac function and remodeling in ovariectomized (OVX) rats after MI. Wistar female rats underwent ovariectomy, followed by MI induction were separated into five groups: S; MI; MI+ET; MI+E2; and MI+ET+E2. Fifteen days after MI or sham surgery, treadmill ET and/or estrogen therapy [17- β estradiol-3-benzoate (E2), s.c. three times/week] were initiated and maintained for 8 weeks. After the treatment and/or training period, the animals underwent cardiac hemodynamic evaluation through catheterization of the left ventricle (LV); the LV systolic and diastolic pressures (LVSP and LVEDP, respectively), maximum LV contraction and relaxation derivatives (dP/dt+ and dP/dt-), and isovolumic relaxation time (Tau) were assessed. Moreover, histological analyses of the heart (collagen and hypertrophy), cardiac oxidative stress [advanced oxidation protein products (AOPPs)], pro- and antioxidant protein expression by Western blotting and antioxidant enzyme activity in the heart were evaluated. The MI reduced the LVSP, dP/dt+ and dP/dt- but increased the LVEDP and Tau. E2 did not prevent the MI-induced changes in cardiac function, even when combined with ET. An increase in the dP/dt+ was observed in the E2 group compared with the MI group. There were no changes in collagen deposition and myocyte hypertrophy caused by the treatments. The increases in AOPP, gp91-phox, and angiotensin II type 1 receptor expression induced by MI were not reduced by E2. There were no changes in the expression of catalase caused by MI or by the treatments, although, a reduction in superoxide dismutase (SOD) expression occurred in the groups subjected to E2 treatment. Whereas there were post-MI reductions in activities of SOD and catalase enzymes, only that of SOD was prevented by ET. Therefore, we conclude that E2 therapy does not prevent the MI-induced changes in cardiac function and worsens parameters related to cardiac remodeling. Moreover, E2 reverses the positive effects of ET when used in combination, in OVX infarcted female rats.

Keywords: ovariectomy, estrogen therapy, cardiac function, remodeling, oxidative stress



1. Introdução

Dados recentes, demonstram que as doenças cardiovasculares (DCV) ainda permanece entre as principais causas de morte no mundo moderno (Benjamim et al., 2018). Estima-se que esse número aumente para mais de 23,6 milhões no ano de 2030. Dentre as DCVs, o infarto do miocárdio (IM) se destaca, pois é considerado uma doença de alta prevalência no mundo ocidental (Mozaffarian et al., 2016), sendo resultado da interrupção do fluxo sanguíneo nas artérias coronárias, o que causa hipóxia e lesão cardíaca (Sukumalchantra et al. 1970).

Em 2010, o número de mortalidade hospitalar dos pacientes internados por IM se manteve persistentemente elevado, com média de 15,3% do total das internações registradas em todo país Timerman et al. 2006). No Espírito Santo, no ano 2016, morreram 815 mulheres em decorrência do IM (Datasus, 2011).

Além disso, existe uma diferença na prevalência dessa doença entre homens e mulheres. A prevalência de IM em mulheres é inferior em comparação com os homens na mesma faixa etária (Mendis et al., 2011), entretanto, os valores se igualam e até mesmo se invertem em mulheres acima dos 60 anos (Kannel, 2002). Nessa idade ocorre a interrupção na produção dos hormônios sexuais femininos, período conhecido como menopausa (Puzianowska-Kuznicka, 2012). Diversos estudos indicam que há uma relação entre a queda na produção de estrogênio (E2) pelas gônadas e o desenvolvimento de IM (Piro et al. 2010; Terrellet et al. 2008; Van Eickelset et al. 2003; Santos et al. 2014),

sugerindo efeito protetor do E2 contra o IM em mulheres. Esses efeitos benéficos do estrogênio são mais amplos, de forma geral os hormônios ovarianos contribuem de forma benéfica sobre o perfil aterogênico, inflamação, produção endotelial de óxido nítrico, além de efeitos antioxidantes. Em conjunto, esses efeitos levam a uma cardioproteção para o desenvolvimento de IM em mulheres (Resanovicet *al.*, 2013).

Estudo clínico demonstra que mulheres que são submetidas a cirurgia de histerectomia ou ooforiectomia bilateral antes da menopausa, apresentam maior risco de acometimento pelo IM (Falkebornet *al.*, 2000). Em modelo experimental de menopausa, a deficiência estrogênica está associada a redução da força contrátil após estimulação com cálcio e com um agonista β -adrenérgico (isoproterenol), sendo esses efeitos dependentes da ativação do receptor AT-1 (AT-1R) da Angiotensina II (Ang-II), aumento na produção das espécies reativas de oxigênio (EROs) e alterações na expressão das proteínas responsáveis pelo manejo de cálcio (Ribeiro Jr. *et al.*, 2012; Ribeiro Jr. *et al.*, 2013). Nessa mesma linha, cardiomiócitos isolados de camundongos com deficiência estrogênica, apresentam redução na velocidade de encurtamento e relaxamento das células cardíacas (Turdiet *al.*, 2015).

Diante dos dados apresentados na literatura, observa-se que a deficiência estrogênica promove alterações cardíacas deletérias, o que explica, pelo menos em parte, o aumento do risco de DCVs, especialmente do IM, em mulheres que apresentam ausência dos hormônios ovarianos.

O IM é caracterizado pela redução no aporte de oxigênio e nutrientes no tecido

cardíaco, promovendo lesão e morte tecidual (Sukumalchantra et al. 1970). Esse processo leva a um conjunto de alterações estruturais, bioquímicas e eletrofisiológicas que envolve tanto zonas infartadas quanto não infartadas. Esse conjunto de alterações são denominadas de remodelamento ventricular e essas modificações deletérias influenciam na função do ventrículo esquerdo e de acordo com essas modificações haverá pior prognóstico pós IM (Mill *et al.*, 2011).

Na literatura, o processo de remodelamento apresenta-se dividido em diferentes fases após a obstrução da coronária, sendo elas, a fase aguda (até 72 horas após a obstrução coronariana total) e a fase crônica que acontece após esse período (Figura 1).

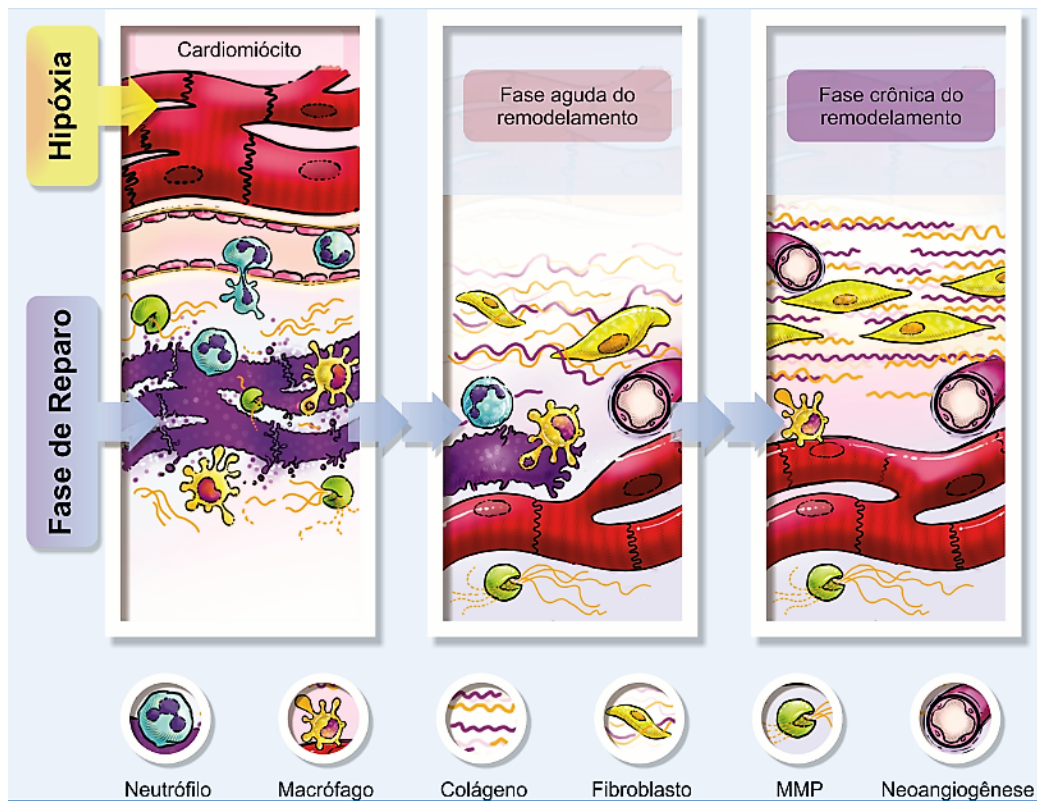


Figura 1. Diferentes fases do remodelamento ventricular após o infarto do miocárdio (Adaptado de Vanhoutte et al., 2006). Observa-se fagocitose no tecido necrosado e deposição de colágeno no tecido remanescente.

A fase inicial é caracterizada pelo acionamento da primeira linha de defesa, que corresponde a ativação de uma cascata de respostas mediadas pela imunidade inata e caracterizada pela participação de citocinas, moléculas de adesão e espécies reativas derivadas do oxigênio, a maioria produzida diretamente ou indiretamente pelas células do sistema imune. (Erickson et al., 2008; Horiet al., 2009). As citocinas próinflamatórias liberadas, tais como, interleucinas (IL)-6, IL-1 β e o fator de necrose tumoral (TNF- α , sigla referente ao inglês “tumor necrosis factor”), estão envolvidas em diversas etapas durante o processo de remodelamento, promovendo a indução da apoptose, alterações na matriz extracelular (MEC) e outras modificações morfométricas (Segura et

al., 2014; Frangogiannis *et al.*, 2006; Stefanon, *et al.*, 2013).

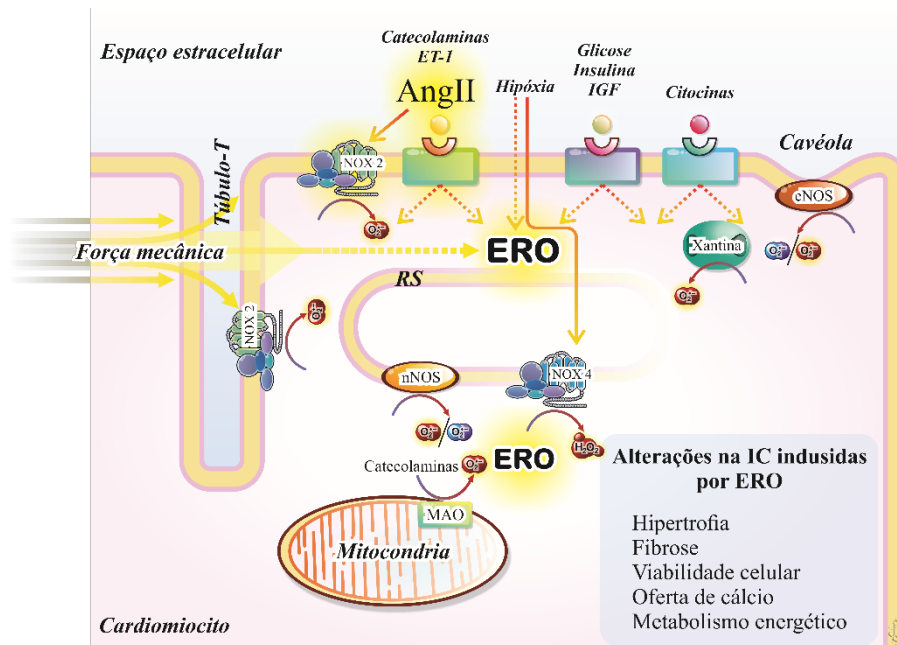
Ainda na fase aguda, ocorre a liberação de moléculas quimiotáticas e consequente recrutamento de células inflamatórias no local da lesão, induzindo o processo de fagocitose do tecido necrosado. Simultaneamente, há a desintegração do colágeno interfibrilar pela ativação de enzimas dependentes de zinco, as metaloproteinases de matriz (MMPs) que regulam a cascata de reparo da lesão cardíaca pela clivagem de substratos da MEC (Vanhoutte *et al.*, 2006). Atualmente, das 11 isoformas de MMP, a isoforma MMP-9 apresenta-se elevada durante a primeira semana pós-IM (Iyer *et al.*, 2016). Esse fato ocasiona alterações importantes como a perda do tecido de sustentação, afilamento da região e dilatação do segmento infartado (Horiet *al.*, 2009; Frangogiannis *et al.*, 2006; Mill *et al.*, 2011).

As modificações produzidas pela resposta exacerbada e persistente, produzem modificações na matriz extracelular que irão contribuir para as alterações estruturais e funcionais cardíaca. (Stefanon, *et al.*, 2013). As maiores modificações consistem na síntese dos colágenos do tipo I e III e aumento do tamanho dos cardiomiócitos, processo denominado de hipertrofia ventricular.

As modificações ocorridas na síntese de colágeno são preferencialmente mediadas por miofibroblastos, em resposta a diferentes estímulos. Estes incluem o estresse mecânico, fatores vasoativos, tal como a Ang II e fatores de crescimento, tal como fator transformador de crescimento β (TGF- β) (Segura *et al.*, 2014).

A Ang II é o principal efetor do Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA) (Sparks et al., 2014). Na via clássica do SRAA, a renina circulante cliva o angiotensinogênio, sintetizado pelo fígado, em um decapeptídeo inativo, a Angiotensina I que, por sua vez, é clivada pela enzima conversora de angiotensina (ECA), formando um octapeptídeo, a Ang II (Huber *et al.*, 2017). Em condições fisiológicas, o receptor de Ang II tipo 1 (AT1) medeia os efeitos clássicos da Ang II, como a manutenção da pressão arterial e líquidos corporais (Sparks et al., 2014). Contudo, o aumento nos níveis de Ang II, ou aumento na expressão do receptor AT1, pode resultar no aumento da atividade simpática, vasoconstrição do músculo liso vascular, estimulação da liberação de catecolaminas, estimulação da produção de aldosterona e crescimento celular (Husain *et al.*, 2015; Paul *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2008).

No coração, a ativação transitória do SRAA durante a fase aguda do IM, está associada ao remodelamento cardíaco adverso porque induz apoptose (Cigola *et al.*, 1997), hipertrofia ventricular (Liu *et al.*, 1998; Lijnen&Petron, 1999) e aumento na produção de colágeno (Mill *et al.*, 2003; Silvestre *et al.*, 1999), contribuindo assim para o comprometimento hemodinâmico e para a progressão da disfunção cardíaca.



cardiomiócito (Figura 2).

Figura 2. Os diferentes estímulos para a formação de EROs. No Box algumas respostas ocorridas no cardiomiócito pela sinalização de EROs na Insuficiência cardíaca. (Adaptado de Hafstadet *al.*, 2013).

A perda do tecido contrátil desencadeia como processo adaptativo o crescimento celular da região próxima ao infarto, ou seja, hipertrofia dos cardiomiócitos. A hipertrofia leva a um rearranjo estrutural de componentes da parede ventricular, com aumento da rigidez e comprometimento da função sistólica e diastólica. Estímulos tais como tensão mecânica, ativação neuro-hormonal, citocinas e formação de EROs têm sido reconhecidos como importantes para a promoção da hipertrofia de miócitos (Zhaoet *al.*, 2009; Zornoffet *al.*, 2009).

As EROs são moléculas que se formam naturalmente no nosso organismo, provenientes do metabolismo oxidativo. Em baixas concentrações regulam uma grande variedade de vias de sinalização fisiológicas (Sart et al., 2015). As EROs são divididas em 2 grupos de acordo com o seu grau de reatividade. O primeiro grupo é composto por espécies radicalares, que são espécies altamente instáveis e reativas, como o O_2^- , radical hidroxil ($OH^\cdot$), radicais lipídicos ($ROO^\cdot$) e o óxido nítrico ($NO^\cdot$) que possuem tempo de meia vida muito curto, devido a sua alta reatividade (Halliwell, 2006). O outro grupo de EROS é composto por espécies não radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), peroxinitrito ($ONOO^-$) e o ácido hipocloroso ($HOCL$), estas possuem um tempo de meia-vida maior que as espécies radicalares (Elahiet *al.*, 2009; Paravicini e

Touyz, 2008). O $O_2^{\bullet}$ pode ser formado por diversas vias, como a NADPH oxidase (NOX), cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, as enzimas xantina oxidase, óxido nítrico sintase desacoplada, ciclooxigenase e lipoxigenase, citocromo p450, mieloperoxidase e hemoproteínas (Figura 3) (Cai e Harrison, 2000; Elahi, 2009; Frey *et al.*, 2009).

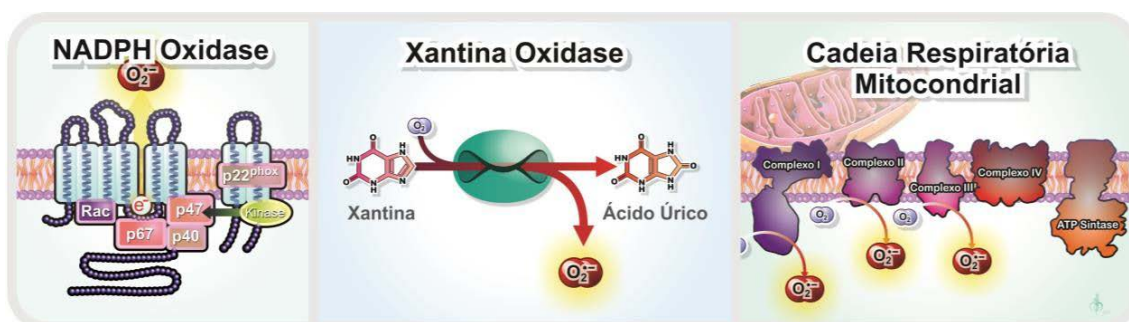


Figura 3. Principais vias de formação das espécies reativas de oxigênio (EROS) no miocárdio isquêmico (Fonte: Claudio, E. R. G., 2017).

Dentre essas, sabe-se que no miocárdio isquêmico a NADPH oxidase, via sua subunidade NOX-2 (também conhecida como gp91phox), é a principal fonte formadora de $O_2^{\bullet}$ (Virdiset *al.*, 2011).

As EROs são neutralizadas no organismo por um sistema antioxidante, o qual inclui enzimas, como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutational peroxidase (GPx) (Paravicini e Touyz, 2008), além do sistema enzimático, outras moléculas produzidas endogenamente, como a bilirrubina, ceruloplasmina, hormônios sexuais, melatonina, coenzima Q, ácido úrico também auxiliam na retirada dessas substâncias (Schneider e Oliveira, 2004) (Figura 4). O predomínio das vias geradoras de EROs (pró-oxidante) sobre o sistema antioxidante, leva a condição conhecida como estresse oxidativo (EO)

(Halliwell, 2006). A citotoxicidade causada pela formação excessiva de EROs está envolvida em uma série de alterações danosas às células (Lambeth, 2004).

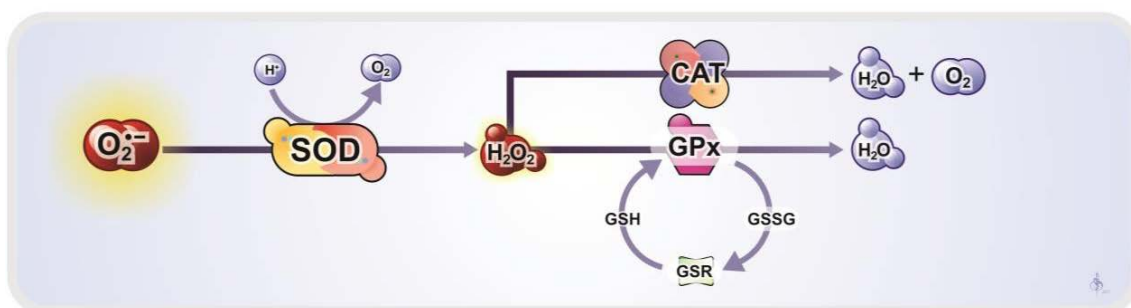


Figura 4. Conversão do ânion superóxido em H_2O e O_2 via ação das enzimas antioxidante. (Fonte: Claudio, E. R. G., 2017). Legenda: O_2 , Oxigênio Molecular; $O_2^{\cdot-}$, Ânion Superóxido; H_2O , Água; H_2O_2 , Peróxido de Hidrogênio; SOD, Superóxido Dismutase; CAT, Catalase; GPx, Glutationa Peroxidase; GSR, Glutationa Redutase; GSH, Glutationa Reduzida; GSSG, Glutationa Oxidada

A literatura demonstra que no tecido pós-infarto há aumento na expressão da NOX-2, o que auxilia no aumento do estresse oxidativo cardíaco (Almeida *et al.*, 2014) e consequente indução da hipertrofia cardíaca e fibrose intersticial induzida por Ang-II. Esses efeitos foram evidenciados em camundongos com deleção gênica para essa enzima ($NOX-2^{-/-}$), nesses animais tanto a hipertrofia quanto a fibrose foram inibidos quando os animais foram submetidos a infusão com Ang-II (Bendallet *et al.*, 2002). Esses resultados sugerem que o estresse oxidativo mediado por esse complexo enzimático tem papel fundamental na indução da disfunção cardíaca e do remodelamento adverso pós-IM.

De fato, são vários os fatores e mecanismos de ação envolvidos no processo de remodelamento e progressão da insuficiência cardíaca após o IM. Buscas

por opções terapêuticas farmacológicas e não farmacológicas têm sido estudadas na tentativa de novas descobertas para reduzir os agravos do remodelamento. Em mulheres, devido à perda da cardioproteção durante a menopausa, período caracterizado pela redução nos níveis de estrogênio, a utilização da terapia estrogênica vem sendo amplamente estudada.

O uso da TRH, entretanto, permanece controverso na literatura (Shlipaket *al.* 2001; Gambaccianiet al., 2015). Estudos clínicos têm observado relação entre a TRH e a redução de mortalidade em mulheres após a menopausa (Folsom *et al.*, 1995; England *et al.*, 1997; Shlipak *et al.*, 2001). Contudo, os efeitos benéficos promovidos pela TRH parecem estar relacionados com a hipótese do tempo de início da terapia (Nudyet *al.*, 2019). Um estudo conduzido por Hodis e colaboradores (2014), discute a redução dos riscos para as DCV e mortalidade em mulheres que iniciam a TRH antes da menopausa. Atualmente, outro grupo de pesquisa demonstrou que mulheres que iniciaram a TRH com idade menor que 60 anos apresentaram redução na incidência de mortalidade quando comparadas com as de idade acima dos 60 anos. Porém, a redução da mortalidade foi acompanhada do aumento no risco de embolia sistêmica e acidente vascular cerebral (Nudyet *al.*, 2019).

Os mecanismos envolvidos nas ações cardiovasculares utilizando a terapia estrogênica (E2) ainda permanecem pouco esclarecidos. Evidências demonstram efeitos antioxidantes dos hormônios, o que promove aumento da biodisponibilidade de óxido nítrico endotelial (NO), gerando vasodilatação e consequente redução na resistência vascular periférica (Strehlow *et al.*, 2003).

Este efeito vasoprotetor tem sido atribuído ao aumento na expressão da enzima Superóxido Dismutase (SOD), que é responsável pela degradação do ânion superóxido (Campos *et al.*, 2014; Borrás *et al.*, 2010), principal radical livre produzido nos vasos, e responsável pela depleção de NO, importante agente vasodilatador (Judkin *et al.*, 2010). Além disso, o E2 influencia vias humorais de controle cardiovascular, como o Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA) (Shenoy *et al.*, 2009). Nickenig e colaboradores (2000), demonstraram que o estrogênio é capaz de promover redução na expressão gênica do receptor AT1 em células de músculo liso vascular, sugerindo que o E2 é capaz de modular a expressão do AT1, e dessa forma, regular a pressão arterial e crescimento celular.

No coração, estudo experimental realizado em ratas ovariectomizadas avaliando a influência do 17- β estradiol na fase aguda e crônica após o IM, demonstrou que o uso da terapia E2 na fase aguda do infarto pode ser prejudicial, resultando no aumento do tamanho do infarto (Smith *et al.*, 2000). Nessa mesma linha, Van Eickels e colaboradores (2003), observaram aumento da mortalidade e do remodelamento cardíaco em camundongos fêmeas ovariectomizadas e submetidas ao MI. Por outro lado, camundongos machos submetidos ao IM e tratados com 17- β estradiol, apresentaram redução na atividade da MMP-9 e aumento na expressão gênica da via de sinalização anti-apoptótica, Akt-Bcl-2 (Cao *et al.*, 2011).

Além da terapia estrogênica, a prática de exercícios físicos (EF) regulares tem sido sugerida como de grande importância na prevenção e tratamento de DCV,

inclusive para mulheres no período pós-menopausa (Moilanenet *al.* 2012; Oliveira *et al.*, 2013). Os benefícios do EF no período pós-menopausa, descritos em estudos clínicos e em modelos experimentais de ovariectomia são amplos (Grindlerand Santoro 2015; Mazureket *al.*, 2017; Endlichet *al.*, 2013; Moilanenet *al.*, 2012). Em uma revisão sistemática, Grindler e Santoro (2015), demonstraram que o EF promove melhora significativa nas várias comorbidades cardiovasculares, como hipertensão, doença coronariana, infarto, entre outros, além de fatores metabólicos como dislipidemia, diabetes e obesidade.

Estudos experimentais em modelo de deficiência estrogênica, demonstraram que o EF de natação melhora a vasoconstrição induzida pela Ang II (Endlichet *al.*, 2013) e a vasodilatação dependente do endotélio (Claudio *et al.*, 2013) no leito coronariano, além de prevenir o aumento na deposição de gordura corporal (Claudio *et al.*, 2013; Endlichet *al.*, 2013). Além disso, em modelo de hipertensão pós-menopausa, Endliche colaboradores (2017) verificaram significativa redução na pressão arterial, associado a melhora na reatividade vascular a Ang II e a Ang 1-7 em anéis de aorta. No coração, ratas ovariectomizadas submetidas ao IM, que realizaram oito semanas de EF de corrida apresentaram melhora da função cardíaca, associada a atenuação de parâmetros envolvidos no processo de remodelamento (Almeida *et al.*, 2014).

Foi demonstrado na literatura que o EF é capaz de modular diversas vias de sinalização, promovendo melhora em vários fatores regulatórios da função

cardíaca após o IM (Almeida *et al.*, 2014; Adams *et al.*, 2005; Barbosa *et al.*, 2012). Na terapia estrogênica, embora alguns trabalhos demonstrem efeitos cardioprotetores do E2 (Cao *et al.*, 2011; Paige *et al.*, 2011), pouco se sabe sobre os efeitos da reposição com E2 na função cardíaca, assim como, se a associação com o exercício físico poderia promover efeitos aditivos após o IM.

Nesse sentido, a hipótese do presente estudo é que o tratamento com E2 associado ao EF em ratas ovariectomizadas submetidas ao IM atenua os efeitos do remodelamento adverso.

OBJETIVOS

2 - OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo foi avaliar os efeitos da terapia de reposição hormonal e sua associação com o EF sobre o processo de remodelação cardíaca em ratas ovariectomizadas submetidas ao infarto do miocárdio.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar os efeitos do tratamento com E2 e sua associação com o EF em ratas ovariectomizadas submetidas ao infarto do miocárdio, sobre:

- Extensão do infarto do miocárdio;
- A função ventricular esquerda;
- O processo de remodelamento ventricular esquerdo;
- O estresse oxidativo cardíaco;
- Expressão de proteínas pró e antioxidantes no tecido cardíaco;
- Atividade das enzimas antioxidantes cardíacas.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais Experimentais

Foram utilizadas ratas Wistar (*RattusNovergicusAlbinus*), com oito semanas de idade, pesando entre 250-300 gramas. Os animais foram fornecidos pelo Biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), acomodados em gaiolas coletivas (n= 5 por gaiola), com livre acesso à água e ração (Purina Labina, SP, Brasil). A temperatura do ambiente (22 e 24°C) e o ciclo claro/escuro (12-12h) foram controlados. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa com Animais do Centro de Ciências da Saúde da UFES (CEUA-UFES; protocolo nº 059/2012), e todos os procedimentos experimentais foram conduzidos conforme o CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CONCEA(2016) e “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (2011) do National Institutes of Health (NIH).”

3.2 Ovariectomia

A ovariectomia foi realizada em todos os grupos experimentais, conforme descrito previamente (Almeida *et al.* 2014). Os animais foram anestesiados com uma mistura de Cetamina e Xilazina (50 mg/kg e 10 mg/kg, i.p., respectivamente). Após a anestesia, foi realizada uma incisão na pele, entre o último rebordo costal e a coxa a um centímetro da linha mediana, seguida de uma incisão na camada muscular e exposição da cavidade peritoneal para a

remoção dos ovários (ovariectomia) e ligadura da tuba uterina em ambos os lados.

Após o procedimento, a musculatura e a pele foram suturados e limpos e os animais receberam uma injeção de antibiótico (Enrofloxacina – 2,5% - 0,1 mL – intramuscular - *i.m.*). Para comprovação do sucesso da cirurgia, após o sacrifício, o útero foi retirado e pesado úmido.

3.3 Indução do Infarto do Miocárdio

Sete dias após a ovariectomia, os animais foram novamente anestesiados com Cetamina e Xilazina (50 mg/kg e 10 mg/kg, *i.p.*, respectivamente). Alcançado o plano anestésico desejável (confirmado pela ausência do reflexo da córnea), os animais tiveram seus membros fixados na mesa cirúrgica em posição supina. Após a assepsia do local, foi realizado uma incisão na pele para exposição e dissecação dos músculos intercostais. Uma sutura em forma de bolsa foi preparada previamente para o rápido fechamento da incisão cirúrgica. Uma incisão lateral no nível do quarto espaço intercostal foi realizada para exposição do coração. O coração foi exteriorizado e a artéria coronária descendente anterior esquerda permanentemente ocluída por um fio de mononylon 6.0 montado em agulha não traumática (figura 5). Após a oclusão, o tórax foi imediatamente fechado. A confirmação de lesões decorrentes da oclusão foi monitorada através do eletrocardiograma, e somente os animais que apresentaram sinais claros de alterações no segmento ST (intervalo entre o fim da despolarização e o início da repolarização ventricular), foram utilizados no estudo. Para os animais que sinais de ventilação pulmonar (frequência

respiratória), foi realizada uma ventilação mecânica com uma máscara de borracha aplicada diretamente sobre os orifícios nasais.

O grupo SHAM (S) foi submetido ao procedimento de cirurgia fictícia, que consistiu na aplicação de todos os passos descritos anteriormente, exceto a oclusão da artéria coronária. Após o procedimento cirúrgico os animais receberam uma injeção de antibiótico (enrofloxacino - 10 mg/kg, *i.m.*) e o manejo da dor pós-IM foi realizada durante 2 dias mediante a injeção de analgésico (dipirona monossódica – 100 mg/kg, *s.c.*).



Figura 5. Indução do infarto do miocárdio com a oclusão do ramo descendente anterior da artéria coronária esquerda com um fio mononylon 6.0.

3.4 Grupos Experimentais

Duas semanas após a indução do infarto do miocárdio ou cirurgia fictícia, os animais foram separados aleatoriamente nos seguintes grupos (n = 10 cada): Grupo Sham (S), grupo infartado sedentário (IM), grupo infartado submetido ao treinamento físico (IM+EF), grupo infartado submetido a terapia de reposição estrogênica (IM+E2) e grupo infartado submetido ao treinamento físico e a terapia estrogênica (IM+EF+E2) (Figura 6).

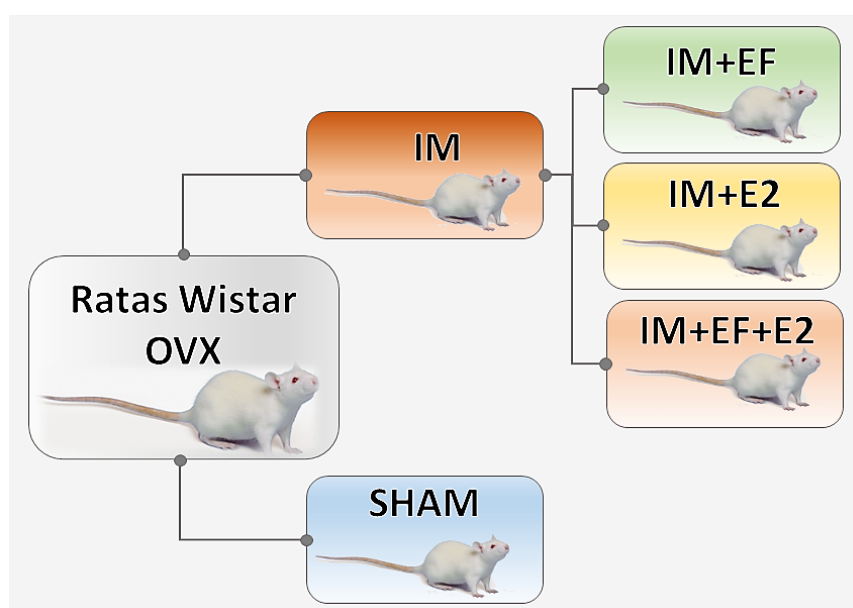


Figura 6. Representação esquemática da distribuição dos grupos. OVX, Ovariectomia; IM, Infarto do Miocárdio; EF, Exercício Físico; E2, Terapia Estrogênica.

3.5 Protocolo de Treinamento de Corrida em Esteira

O treinamento de corrida foi realizado em uma esteira elétrica (EP 131, Insight, Brazil), iniciando duas semanas após a indução do infarto do miocárdio, conforme descrito previamente (Almeida *et al.* 2014).

O treinamento foi dividido em duas fases. A primeira foi dedicada a um período de adaptação por uma semana (10 min/dia a 0,3 km/h) com aumento progressivo do tempo até o quinto dia, atingindo o tempo máximo de 60 minutos. A partir da segunda semana, a duração do exercício foi mantida constante (60 min/dia) e a intensidade do exercício foi gradualmente aumentada a partir de 0,3 km/h, durante período de treinamento até atingir a velocidade de 1,2 km/h. O exercício físico foi realizado 5x por semana durante o período de oito semanas, com intensidade de leve a moderada (Figura 7).

3.6 Terapia de Reposição Estrogênica

Duas semanas após a indução do IM, a terapia estrogênica (E2) foi iniciada com injeções subcutâneas de estradiol-3-benzoato (5 µg; Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA), diluído em 0,1 mL de óleo de milho (utilizado como veículo), três vezes por semana, pelo período de oito semanas (Saengsirisuwanet *al.* 2009). Os grupos que não foram submetidos a terapia receberam o mesmo volume contendo somente o veículo (óleo de milho). Antes do início do EF e terapia com E2, os animais foram pesados para avaliação do peso corporal

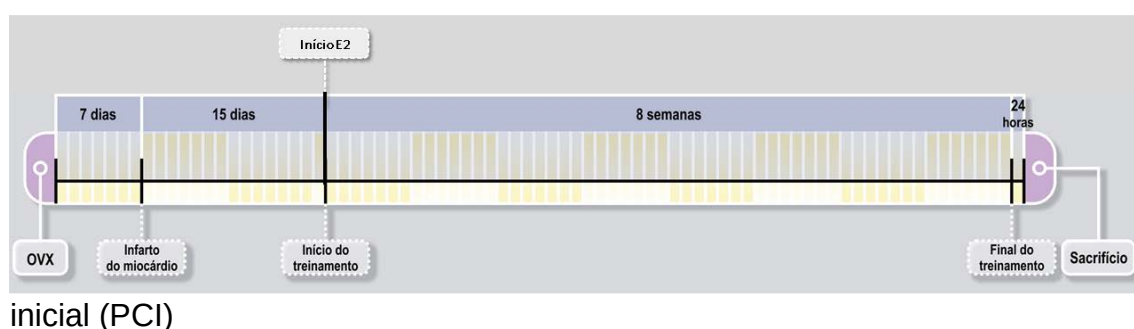


Figura 7. Representação de todo protocolo experimental. Legenda: OVX, Ovariectomia;

3.7 Avaliação da Função Cardíaca

Vinte e quatro horas após o último dia de treinamento de corrida e tratamento E2, os animais foram pesados para avaliação do peso corporal final (PCF). Após isso, os animais foram anestesiados com Cetamina e Xilazina (50 mg/kg e 10 mg/kg *i.p.*, respectivamente). Após atingir a ponto anestésico, os animais foram fixados em uma mesa cirúrgica na posição supina para o procedimento de cateterização ventricular esquerda, conforme descrito por Resende e colaboradores (2007).

A avaliação da função do ventrículo esquerdo (VE) foi realizada através da introdução de um cateter de polietileno (PE50) preenchido com solução salina heparinizada (50 U/mL – Ariston Heparina Sódica, São Paulo, SP, Brazil) na artéria carótida esquerda, e, em seguida conectado a um transdutor de pressão (FE221 Bridge Amp, ADInstruments, Austrália) acoplado a um sistema de aquisição de dados (Powerlab 4/35). O cateter foi conduzido cuidadosamente ao VE, onde foram obtidas as pressões sistólicas (PSVE) e diastólica final (PDFVE), a derivada máxima de contração e relaxamento ($dP/dt+$ e $dP/dt-$, respectivamente), além do Tempo de Relaxamento Isovolumétrico (TAU) (Figura 8). Após a avaliação da função ventricular o cateter foi recuado novamente para a artéria carótida para verificar a integridade da valva aórtica.

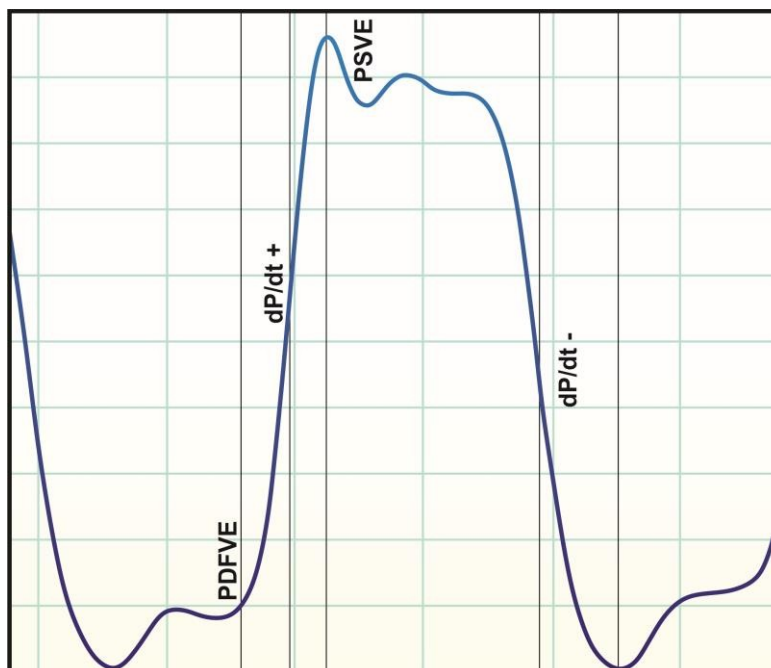


Figura 8. Figura representativa de uma onda de pressão ventricular, delimitando os pontos de onde foram obtidas as variáveis. PDFVE, Pressão Diastólica Final do Ventrículo Esquerdo; dP/dt+, Derivada Positiva do Desenvolvimento de Pressão; Dp/dt-, Derivada Negativa do Desenvolvimento de Pressão; PSVE; Pressão Sistólica do Ventrículo Esquerdo.

3.8 Coleta de tecidos

Após a avaliação hemodinâmica, os animais foram eutanasiados por overdose anestésica (100 mg/kg e 20 mg/kg *i.p.*, respectivamente). O coração foi rapidamente removido, lavado em solução salina, os átrios e os ventrículos foram separados. O ventrículo esquerdo foi armazenado em tampão formalina a 10% para as análises histológicas ou em freezer a -80° Celsius (C) para as avaliações de expressão proteica e estresse oxidativo. Os pulmões foram retirados, limpos, secados e pesados. Em seguida foram levados à estufa, a uma temperatura de 98° C, por um período de 24 horas, para a determinação do percentual de água (Lutz, 2008). O útero foi retirado e pesado para verificar a eficiência da terapia estrogênica. A pesagem dos tecidos foi realizada em uma

balança analítica digital com precisão de 0,0001g (Shimadzu, São Paulo, Brasil).

3.9 Determinação da expressão proteica pela técnica de Western Blotting

A técnica de Western Blotting foi utilizada para análise da expressão de proteínas do sistema pró-oxidante e do sistema antioxidante no VE.

As amostras do VE foram homogeneizadas em tampão de lise contendo: NaCl (150 mM), Tris-HCl (50 mM), EDTA.2Na (5mM), $MgCl_2$ (1mM) e inibidor de protease (Sigma Fast, Sigma Aldrich, EUA). A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando a albumina de soro bovina (BSA) como padrão.

3.10 Eletroforese e Transferência das amostras

Quantidades iguais de proteína (50 μ g) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 10% (gel de corrida: 0,5 M Tris HCl pH:6,8, acrilamida 40%, SDS 10%, APS 10% e Temed) e 10% (gel de entrada: 1,5 M Tris HCl pH: 8.8, acrilamida 40%, SDS 10%, APS 10% e Temed). Após a preparação dos géis, os mesmos foram imersos em um tampão de corrida para eletroforese (25 mM de Tris HCl, 190 mM de glicina e 0,1% de SDS) e foi realizado o carregamento com as amostras nos respectivos géis. Em seguida, as amostras foram submetidas a uma corrente constante de 80V por

aproximadamente 2 horas e 30 minutos para a separação das proteínas pelo peso molecular (PowerPac™ HC, BioRad, CA, EUA). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) durante período de 2:30 h a 60 V em um sistema de blotting úmido. Para isso, o gel, a membrana e o papel filtro foram montados em um sistema de sanduíche banhados por uma solução de tampão de transferência que foi mantida em aproximadamente 4° C durante todo processo de transferência (Tris 25mM, glicina 190mM, e Metanol 20%).

3.11 Incubação com os Anticorpos

Após a transferência, foi realizado o bloqueio da membrana com TBS-T + leite desnatado (5%) (Tris HCl 10 mM, NaCl 100mM e Tween 20 à 0,1%, pH 7,6) por 2:30 horas, para evitar ligações inespecíficas de outras proteínas. Depois, as membranas foram lavadas e incubadas por 4 horas com anticorpos monoclonais de camundongo para a catalase (CAT; 1:2000; Sigma, EUA), anticorpos policlonais de coelho para superóxido dismutase (SOD-2; 1:500; Sigma, USA), GP91phox (1:1000; BD, New Jersey, USA) e AT-1 (1:500; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Após, as membranas foram lavadas três vezes, sob agitação, com solução TBS-T para remoção do excesso de anticorpo primário e possível ligação inespecífica. A solução de TBS-T foi trocada a cada 10 minutos. Posteriormente, as membranas foram incubadas por 2 horas em temperatura ambiente sob agitação com os anticorpos secundários conjugadas a enzima fosfatase alcalina anti-mouse IgG (Diluição 1:3000, Abcam, Cambridge, MA, EUA), ou um anticorpo anti-rabbit IgG (Diluição 1:7000, Santa Cruz

Biotechnology, CA,EUA), de acordo com as especificações dos fabricantes dos anticorpos.

3.12 Detecção das Bandas de Proteínas

As bandas foram visualizadas usando um sistema de nitrobluetetrazoliumchloride/ 5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine (NBT/BCIP) (Invitrogen Corporation, CA, EUA) e quantificada utilizando o software ImageJ (NationalInstituteof Health, NIH). As mesmas membranas foram usadas para determinar a expressão β -actina utilizando anticorpo monoclonal de camundongo para β -actina (1:5000; Sigma, EUA), e os resultados foram calculados utilizando a relação entre a densidade das proteínas de interesse corrigidas pela intensidade da proteína utilizada como controle (β -actina).

3.13 Determinação dos produtos avançados de oxidação de proteínas

Os produtos avançados de oxidação proteínas (AOPP) foram determinados no tecido cardíaco por espectrofotometria. O tecido cardíaco foi homogeneizado e diluído (1:5) em tampão fosfato (PBS; pH 7,4). Em seguida, 200 μ L da amostra foi adicionada a uma placa de 96 poços, juntamente com 10 μ L de iodeto de potássio (1,16 M) e 20 μ L de ácido acético glacial. A leitura foi feita imediatamente em 340 nm em leitor de Elisa (Filter Max F5 Multi-ModeMicroplateReaders, Molecular Devices, California, EUA). O branco foi preparado substituindo a amostra por PBS e posteriormente os valores das

amostras foram subtraídas pelo branco. As concentrações de AOPP foram expressas como μM de Cloramina-T/ μg de proteína (Valente *et al.* 2013).

3.14 Atividade das Enzimas Antioxidantes

A avaliação da atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT foi realizada por meio da técnica de espectrofotometria. Para a determinação da SOD foi utilizada a técnica descrita por Misra and Fridovich (1972), que se baseia na auto-oxidação da epinefrina. Para tanto as amostras do tecido cardíaco, previamente homogeneizadas, foram misturadas ao meio reacional contendo tampão carbonato (0,2 M; pH 10.2) e KCl (0,015 M). A reação foi iniciada ao adicionar solução de epinefrina (0,025 M), a leitura foi realizada a 480 nm em intervalos de 15 segundos por 1 minuto em espectrofotômetro (T80+ UV/VIS Spectrometer, PglInstruments Ltd, UK). O resultado foi expresso como USOD/mg proteína, sendo que uma unidade de SOD foi considerada a quantidade capaz de reduzir em 50% a auto-oxidação da epinefrina.

Para a avaliação da atividade da Catalase, foi utilizado o método descrito por Aebi (1984). Brevemente, 40 μL de peróxido de hidrogênio (0,066 M) foi adicionado ao meio reacional contendo 3 mL de tampão fosfato (0,050 M; pH 7,4). Posteriormente, 60 μL da amostra foi misturado e a leitura foi realizada em 240 nm e registradas a cada 15 segundos durante o tempo de um minuto (T80+ UV/VIS Spectrometer, PglInstruments Ltd, UK). Os resultados foram expressos como coeficiente de extinção do peróxido por minuto ($\Delta\text{E} \cdot \text{min}/\text{mg}$ proteína).

3.15 Avaliação histológica

As análises histológicas foram realizadas no Laboratório de Endocrinologia e Toxicologia Celular do Departamento de Morfologia da UFES. Após avaliação da função cardíaca, os ventrículos esquerdos foram fixados em formol tamponado a 10% para análises histológicas posteriores.

3.16 Hipertrofia Cardíaca e Deposição de Colágeno

O tecido foi mantido em tampão formalina e em seguida foram processados e incluídos em parafina. Cortes transversais foram feitos (4 μ m) e corados com hematoxilina e eosina (H/E) e PicrosíriusRed para a avaliação da hipertrofia cardíaca e da área ocupada por colágeno, respectivamente. A porcentagem de coloração vermelho do Picrosírius indicou o valor percentual ocupada por colágeno. Nove áreas de cada corte foram analisadas na camada subendocárdica e subepicárdica. As imagens foram obtidas com uma câmera digital (Evolution, Media Cybernetics, Inc., Bethesda, MD, EUA) acoplado a um microscópio óptico (Eclipse 400, Nikon) no aumento de 400 vezes. A área de secção transversa do miócito, 40 a 60 miócitos posicionados perpendicularmente ao plano da secção e tendo tanto um núcleo visível e uma membrana de células claramente definida e ininterrupta foram selecionados em cada animal. Imagens celulares vistas com uma câmera de vídeo foram projetadas em um monitor e rastreadas. Imagens para a quantificação da deposição de colágeno e avaliação da área de secção transversa do miócito foram processadas com o software ImageJ (NIH, EUA).

3.17 Avaliação da Área de Extensão do Infarto

Para análise da extensão do infarto do miocárdio, o ventrículo esquerdo foi dividido em secções transversais e corados com Picrosírius. Após este procedimento, as secções da imagem foram digitalizadas (Laserjet Pro M1132, HP, EUA) e analisadas com o software ImageJ (NIH, EUA). O perímetro do epicárdio relacionado à área infartada foi delimitado pela coloração com Picrosírius Red. Todos os procedimentos foram repetidos para o endocárdio. A extensão do infarto foi apresentada como o valor percentual médio do perímetro infartado do ventrículo esquerdo (Fraccarollo *et al.*, 2008).

3.18 Análise Estatística

Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). A distribuição dos dados foi avaliada pelo teste de D'Agostino e Pearson. As médias dos pesos de órgãos, da expressão proteica e dos parâmetros hemodinâmicos foram avaliadas por análise de variância de uma via (ANOVA), seguido pelo teste *post-hoc* de Fisher. As análises histológicas foram avaliadas pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguidos pelo teste *post-hoc* de Dunn's. A extensão do infarto foi avaliada pelo teste de Mann-Whitney. Os valores de alfa menores do que 5% foram considerados como estatisticamente significativos.



RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação dos dados ponderais e hemodinâmica

Após as oitos semanas do protocolo experimental, as primeiras análises foram realizadas. Conforme apresentado na Tabela 1, a massa corporal dos animais estava igual no início do protocolo. Ao final do protocolo experimental não houve diferenças significativa na massa corporal nos animais do grupo IM quando comparado ao S, entretanto, os animais que receberam E2 isolada ou em associação com o EF, apresentaram redução na massa corporal final ($p < 0.05$ vs. IM e S). Não foram observadas diferenças significativas no PCF entre os grupos que realizaram o EF comparado aos grupos S e IM. Comparando o efeitos dos tratamentos sobre o PCF, foi observado que os animais tratados com E2 apresentaram redução do PCF quando comparado aos animais que IM+EF e, quando associado EF e E2 pós IM, observa-se uma significativa redução quando comparado aos grupos IM e Sham.

Para avaliar a congestão pulmonar em decorrência do IM, foi realizado o peso úmido e seco do pulmão. Como esperado, pode-se observar que houve aumento no conteúdo de água nos pulmões no grupo IM, esse aumento foi mantido quando houve a associação entre E2 e EF ($p < 0.05$ vs. S) (Tabela 1). Contudo, quando avaliados os tratamentos de forma isolada, tanto do grupo

que realizou o EF quanto a terapia com E2, não foi observado o acúmulo de água nos pulmões.

O peso do útero foi utilizado para avaliar a eficácia da terapia estrogênica. Foi observado que os grupos que realizaram a terapia estrogênica (IM+E2 e IM+EF+E2) apresentaram aumento no peso úmido do útero comparado aos grupos S, IM e IM+EF ($p < 0.05$). Esses dados confirmam a eficácia tanto da

Tabela 1: Efeitos do EF e E2 sobre os parâmetros ponderais das ratas OVX e IM.

	S	IM	IM+EF	IM+E2	IM+EF+E2
	N=10	N=10	N=10	N=10	N=10
PC Inicial (g)	235,4 ± 15,1	215,7 ± 8,5	211,4 ± 4,8	211,7 ± 11,9	222,3 ± 8,8
PC Final (g)	336,6 ± 5,9	332 ± 8,4	330,6 ± 11,4	287,1 ± 7,6 * # †	256,6 ± 6,8 * # † §
PU	0,1212 ± 0,008	0,0922 ± 0,004	0,0927 ± 0,004	0,4894 ± 0,038 * # †	0,4025 ± 0,024 * # † §
Pulmão (g)	1,70 ± 0,05	2,02 ± 0,2325	2,42 ± 0,32	2,51 ± 0,25 *	2,67 ± 0,47 *
Pulmão/PC (mg/g)	4,95 ± 0,23	10,73 ± 1,28 *	6,83 ± 0,77 #	10,8 ± 1,39 * †	11,54 ± 1,84 * †
% Água no Pulmão	80,08 ± 0,45	82 ± 0,66 *	81,81 ± 0,49	81,49 ± 0,56	82,26 ± 0,72 *

ovariectomia quanto da terapia de reposição com E2.

Dados são expressos como média ± EPM. Avaliado pela ANOVA de uma via e pós-teste de Fisher para múltiplas comparações. PC, peso corporal; PU, peso do útero. * $p < 0.05$ vs. S; # $p < 0.05$ vs. IM; § $p < 0.05$ vs. IM+E2; † $p < 0.05$ vs. IM+EF.

Os parâmetros hemodinâmicos oito semanas após o exercício físico e terapia estrogênica estão mostrados na tabela 2. Na avaliação das pressões arteriais diastólica (PAD), sistólica (PAS), da pressão arterial média (PAM) e da frequência cardíaca, não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos.

Tabela 2. Parâmetros Hemodinâmicos oito semanas após exercício físico e terapia estrogênica.

	S	IM	IM+EF	IM+E2	IM+EF+E2
	N=10	N=10	N=10	N=10	N=10
FC (bpm)	200 ± 30	139 ± 28	154 ± 21	170 ± 7	193 ± 12
PAS (mmHg)	124 ± 11	108 ± 15	118 ± 9	113 ± 3	120 ± 3
PAD (mmHg)	94 ± 10	81 ± 12	94 ± 8	87 ± 1	96 ± 2
PAM (mmHg)	108 ± 10	92 ± 13	104 ± 9	99 ± 2	106 ± 3

Os dados são expressos como média ± EPM. Avaliado pela ANOVA de uma via e pós-teste de Fisher para múltiplas comparações. Legenda: IM, Infarto do Miocárdio; EF, Exercício Físico, E2, terapia Estrogênica; FC, Frequência Cardíaca; bpm, Batimentos por Minuto; PAS, Pressão Arterial Sistólica; PAD, Pressão Arterial Diastólica; PAM, Pressão Arterial Média; mmHg, Milímetros de Mercúrio.

4.2 Área de infarto.

Foi observado um aumento significativo do percentual da área infartada nos grupos que realizaram a terapia estrogênica, associada ou não ao EF ($p < 0.05$ IM) (Figura 9). Avaliando os efeitos do EF isolado, foi observado que o EF foi capaz de prevenir o aumento da extensão da área de infarto, apresentando valores similares ao grupo IM ($p > 0.05$). Contudo, quando associado a terapia estrogênica, o efeito preventivo do EF foi abolido ($p < 0.05$ vs. E2).

O efeito da terapia estrogênica, mostra que o tratamento com E2 aumenta a extensão da área infartada e quando associado ao EF pode intensificar essa resposta quando comparado aos demais grupos ($p < 0.05$ vs. IM, IM+EF e IM+E2).

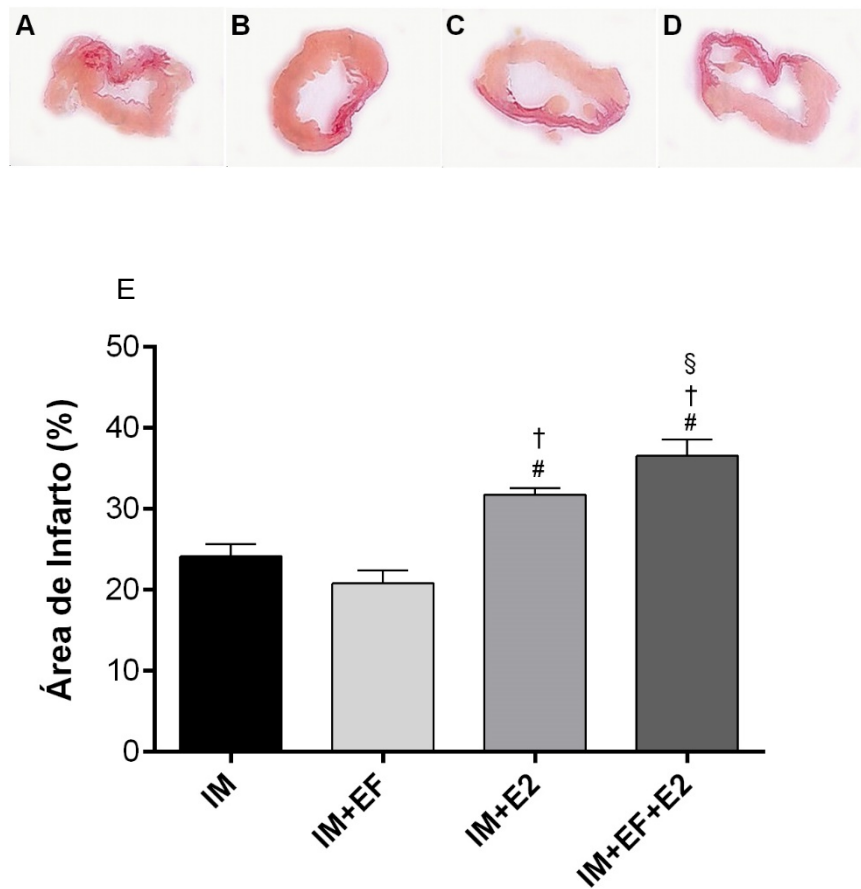


Figura 9. Análise histológica da área de extensão do IM. As imagens representativas são demonstradas de **A-D**, os resultados do percentual de extensão no gráfico **E**. Os dados são expressos como média $\pm$ EPM. Avaliado pela ANOVA de uma via e pós-teste de Fisher. # $p < 0.05$ vs. IM; † $p < 0.05$ vs. EF; § $p < 0.05$ vs. E2. Legenda: IM, infarto do miocárdio; EF, exercício físico; E2, terapia estrogênica.

4.3 Função cardíaca

A Figura 10 demonstra os resultados dos parâmetros funcionais cardíacos avaliados através da cateterização ventricular esquerda. O infarto promoveu redução da PSVE no grupo IM ($p < 0.05$ vs. S), sendo que essa mesma resposta não foi observada nos grupos que realizaram o EF e E2, assim como, a associação.

Quando avaliado a PDFVE, utilizado como parâmetro de disfunção diastólica, como esperado, o grupo IM apresentou um aumento quando comparado ao grupo Sham ($p < 0.05$ vs. S). Avaliando o efeito do EF na prevenção da disfunção diastólica, os resultados mostram que o EF de forma isolada foi capaz de prevenir o aumento da PDFVE após o IM. No grupo tratado com E2, foi observado que a terapia estrogênica de forma isolada ou associada causaram um aumento da PDFVE quando comparado aos grupo IM+EF ($p < 0.05$), demonstrando que o tratamento com E2 interfere de forma negativa na PDFVE e não previne a disfunção diastólica do VE após o IM (Figura 10B). Ainda, em adição os efeitos negativos encontrados no aumento da área de extensão do infarto nos grupos tratados com E2, corroboram os efeitos funcionais.

Outro parâmetro de função diastólica avaliado foi o tempo de relaxamento isovolumétrico (Tau). Dessa forma, o IM promoveu aumento do Tau quando comparado ao grupo S ($p < 0.05$). Nos grupos que realizaram o EF de forma isolada, os valores foram mantidos similares ao grupo S (Figura 10C).

A análise da $+dP/dt$, mostra que os animais tratados com a terapia E2 apresentaram aumento dessa variável quando comparado aos demais grupos infartados. Nenhum tratamento foi capaz de alterar a $-dP/dt$ (Figura 10E).

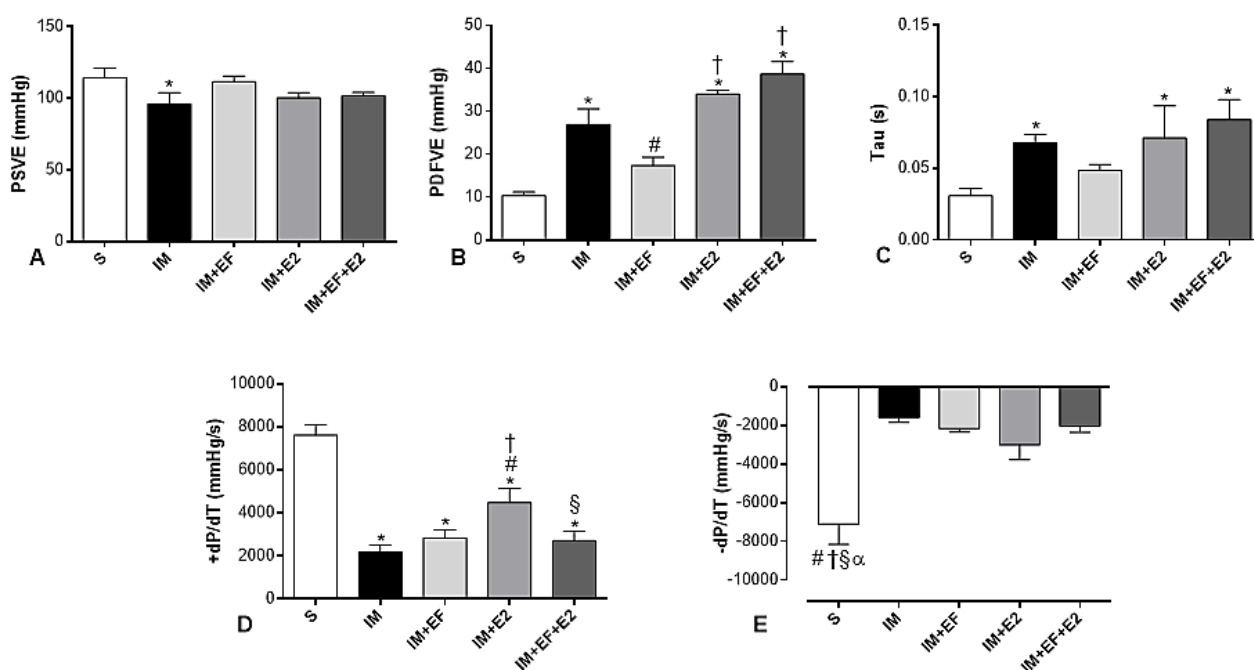


Figura 10. Parâmetros Funcionais do Ventrículo Esquerdo. **(A)** Pressão Sistólica do Ventrículo Esquerdo (PSVE); **(B)** Pressão Diastólica Final do Ventrículo Esquerdo (PDFVE); **(C)** Tempo de Relaxamento Isovolumétrico (Tau); **(D)** Derivada Positiva do Desenvolvimento de Pressão (+dP/dt); **(E)** Derivada Negativa do Desenvolvimento de Pressão (-dP/dt). Dados são expressos como Média ± EPM. ANOVA de uma via e pós-teste de Fisher para múltiplas comparações. *p < 0.05 vs. S; #p < 0.05 vs. IM; †p < 0.05 vs. IM+EF; § p < 0.05 vs. IM+E2; α p < 0.05 vs. IM+EF+E2. Legenda: IM, infarto do miocárdio; EF, exercício físico; E2, terapia estrogênica.

4.4 Avaliações histológicas

Os resultados mostrados anteriormente demonstram, que o aumento na área de infarto nos grupos tratados com E2 isolado, assim como em associação ao EF, foram acompanhados das alterações funcionais cardíacas.

A análise de hipertrofia cardíaca, avaliada pela área de secção transversa do cardiomiócito, não demonstrou diferenças significativas no grupo submetido ao IM quando comparado ao grupo S. Contudo, os animais que foram tratados com E2 isolado e em associação com EF, apresentaram um aumento da área de secção transversa do cardiomiócito, quando comparados ao grupo IM+EF ($p < 0.05$) (Figura 11). O mesmo não foi observado nos animais submetidos ao EF, apresentando resultado similar ao grupo S ($p < 0.05$).

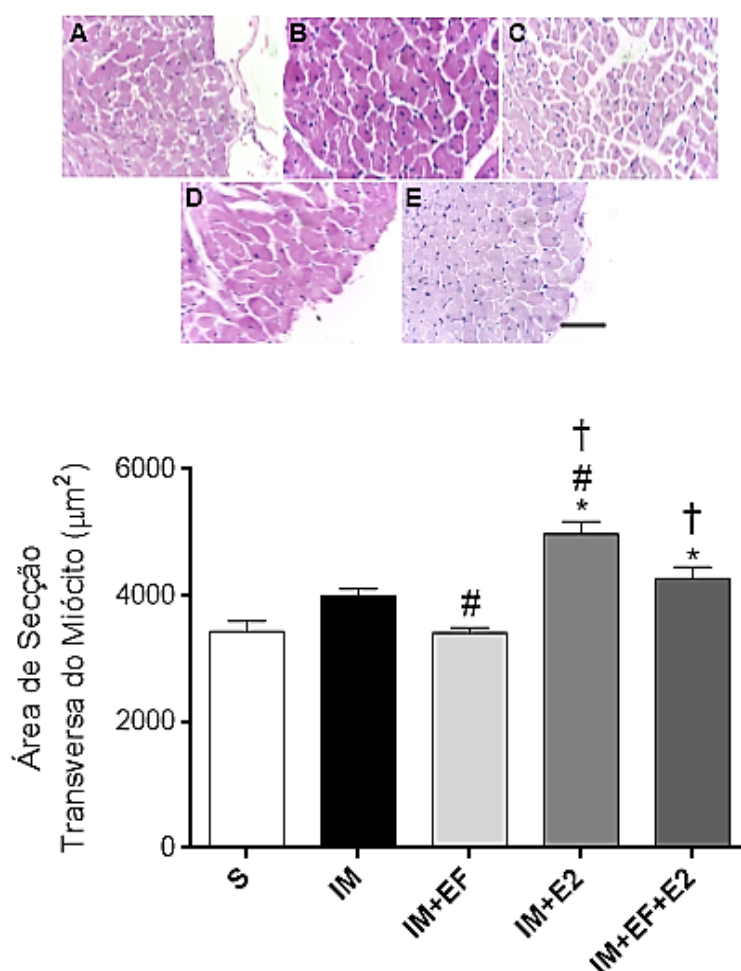


Figura 11. Avaliação da área de secção transversa dos miócitos cardíacos. Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM. Imagens representativas A-E e gráfico com análise da área de secção transversa do miócito. Avaliado pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn's para múltiplas comparações. * $p < 0.05$ vs. S; # $p < 0.05$ vs. IM; † $p < 0.05$ vs. EF. Aumento: 400x. Barra: 50 μ m. Legenda: IM, infarto do miocárdio; EF, exercício físico; E2, terapia estrogênica.

Nas análises da deposição de colágeno intersticial, o IM induziu aumento na deposição de colágeno cardíaco ($p < 0.05$ vs. S). O EF foi capaz de prevenir esse aumento (Figura 12), no entanto, quando associado à terapia com E2 essa resposta foi abolida ($p < 0.05$). A terapia com E2 de forma isolada ou associada não foi capaz de prevenir a fibrose cardíaca, uma vez que ocorreu aumento da área de deposição de colágeno quando comparado ao grupo IM ($p < 0.05$).

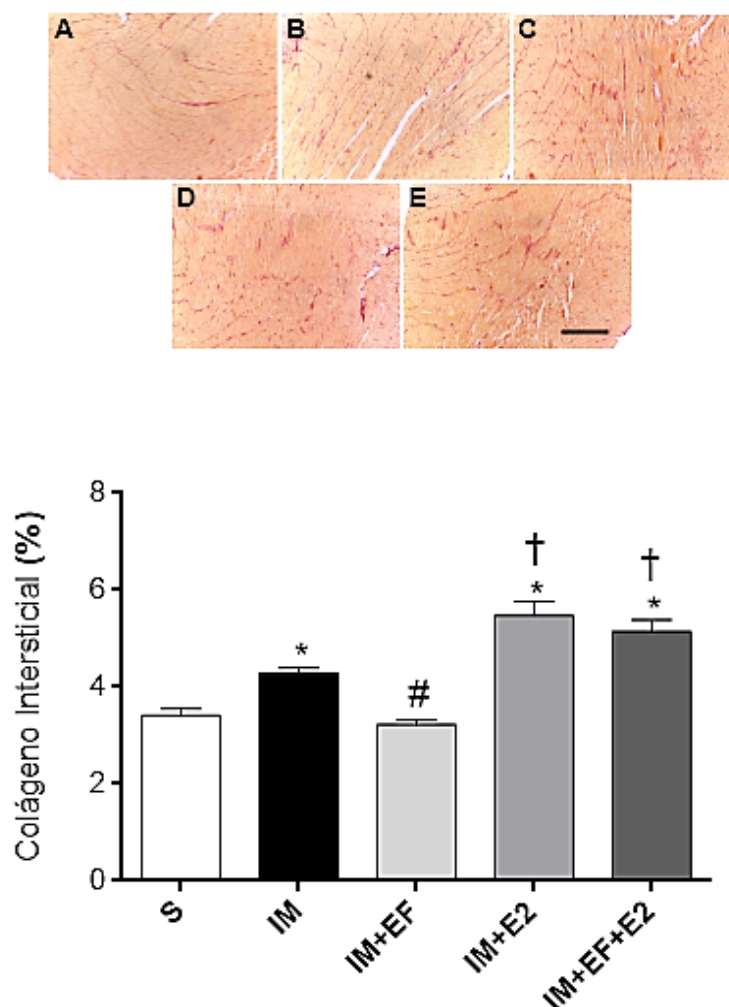


Figura 12. Avaliação do colágeno intersticial no tecido cardíaco. Os dados são expressos como média $\pm$ EPM. Imagens representativas dos grupos A-E e gráfico (F) com análise do percentual de colágeno intersticial. Avaliado pelo teste de Kruskal- Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn's para múltiplas comparações. * $p < 0.05$ vs. to S; # $p < 0.05$ vs. IM; † $p < 0.05$ vs. EF. Aumento: 400x. Barra: 200 μ m. Legenda: IM, infarto do miocárdio; EF, exercício físico; E2, terapia estrogênica.

4.5 Produtos Avançados de Oxidação Proteica (AOPP)

A Figura 13 mostra que o infarto do miocárdio promoveu aumento na formação dos produtos avançados de oxidação proteica no VE. Quando avaliado o efeito do exercício físico, houve redução da formação do AOPP após o IM, entretanto, essa mesma reposta não ocorreu nos animais tratados com E2, uma vez que não apresentaram diferença quando comparado ao grupo IM. O grupo IM+E2 apresentou aumento na formação da AOPP quando comparados ao grupo IM+EF ($p < 0.05$). A associação dos tratamentos não apresentou diferenças significativas dos demais grupos.

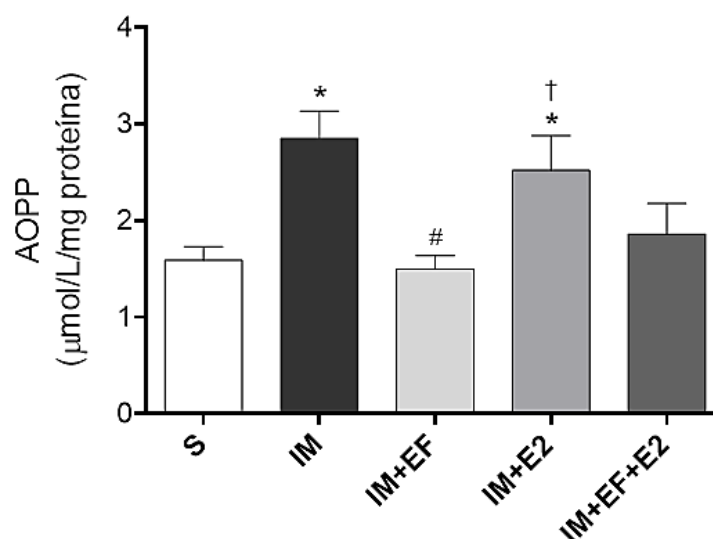


Figura 13. Análise dos Produtos Avançados de Oxidação Proteica (AOPP). Dados são expresso como Média $\pm$ EPM. Avaliado pela ANOVA de uma via e pós-teste de Fisher para múltiplas comparações. * $p < 0.05$ vs. S; # $p < 0.05$ vs. IM; † $p < 0.05$ vs. IM+EF. Legenda: IM, infarto do miocárdio; EF, exercício físico; E2, terapia estrogênica.

4.6 Expressão proteica

A Figura 14, observa – se que oito semanas após EF e terapia estrogênica há redução na expressão da SOD nos grupos tratados com E2 de forma isolada, assim como, em associação com o EF ($p<0.05$). O grupo IM apresentou resultado similar ao S, e o EF manteve esse parâmetro. Quando analisada a expressão da Catalase, não foram encontradas diferenças entre os grupos (Figura 14A e 14B).

Na expressão da GP91-phox, importante fonte formadora das EROS no coração, o EF promoveu redução na expressão dessa proteína quando comparado ao grupo S e IM ($p<0.05$). Analisando o efeito da terapia estrogênica, o grupo tratado com E2 de forma isolada apresentou valores similares ao IM, porém, ocorreu um aumento significativo quando comparado ao grupo IM+EF ($p<0.05$). Analisando a associação, observamos que os efeitos providos pelo EF na expressão da gp91phox foram atenuados quando associado ao E2, apresentando valores similares ao grupo IM (Figura 15A).

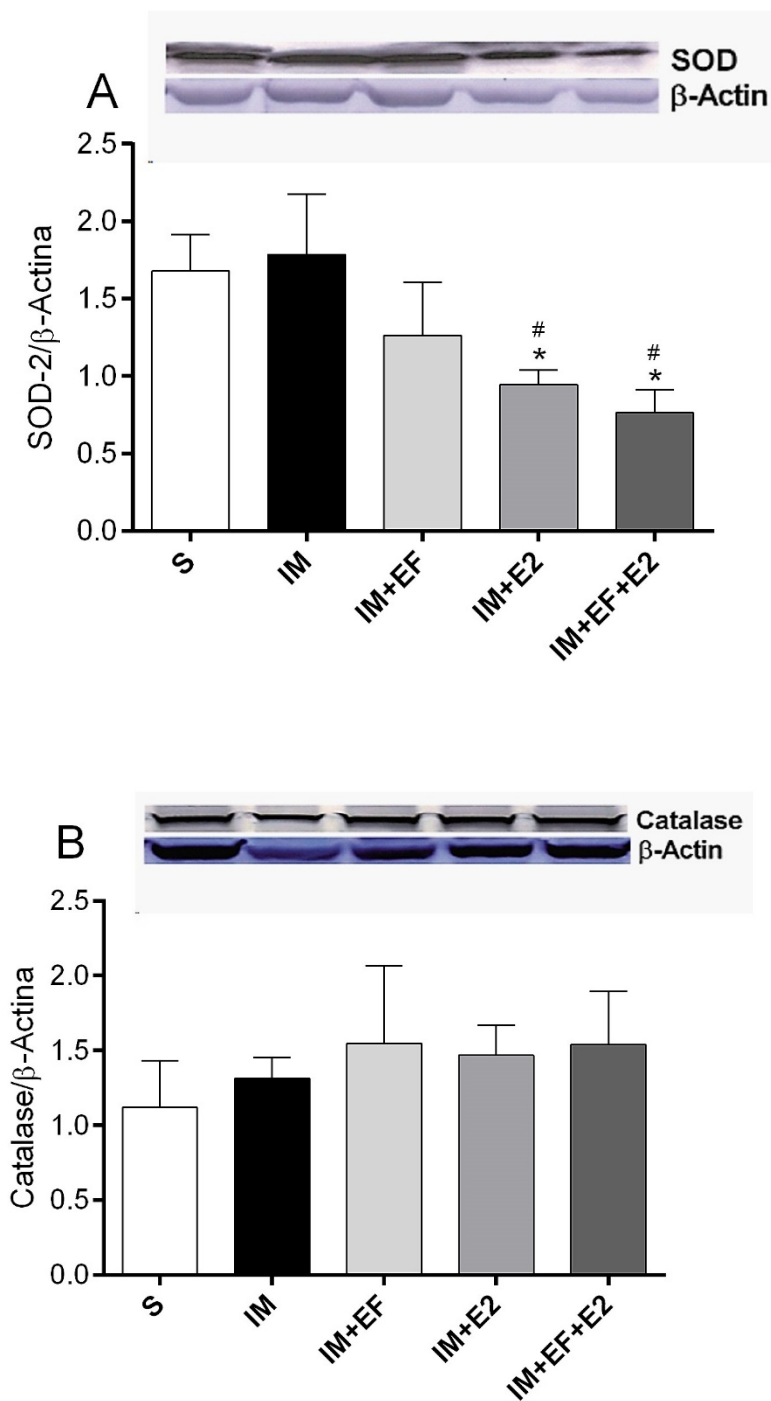


Figura 14. Avaliação da expressão proteica das enzimas antioxidante no tecido cardíaco. **(A)** SOD-2 e **(B)** Catalase. Dados são expresso como Média $\pm$ EPM. Avaliado pela ANOVA de uma via e pós-teste de Fisher para múltiplas comparações. *p < 0.05 vs. S; #p < 0.05 vs. IM. Legenda: IM, infarto do miocárdio; EF, exercício físico; E2, terapia estrogênica; SOD, SuperóxidoDismutase.

Na Figura 15B, os resultados mostram que o IM induziu aumento na expressão do receptor AT-1 quando comparado ao grupo Sham ($p < 0.05$). O EF foi capaz de prevenir o aumento da expressão proteica do receptor AT-1 em comparação ao grupo IM ($p < 0.05$). Entretanto, a terapia estrogênica aumentou a expressão do receptor AT-1 ($p < 0.05$ vs. IM+EF), e quando associado ao exercício, não foi observada mudança neste parâmetro.

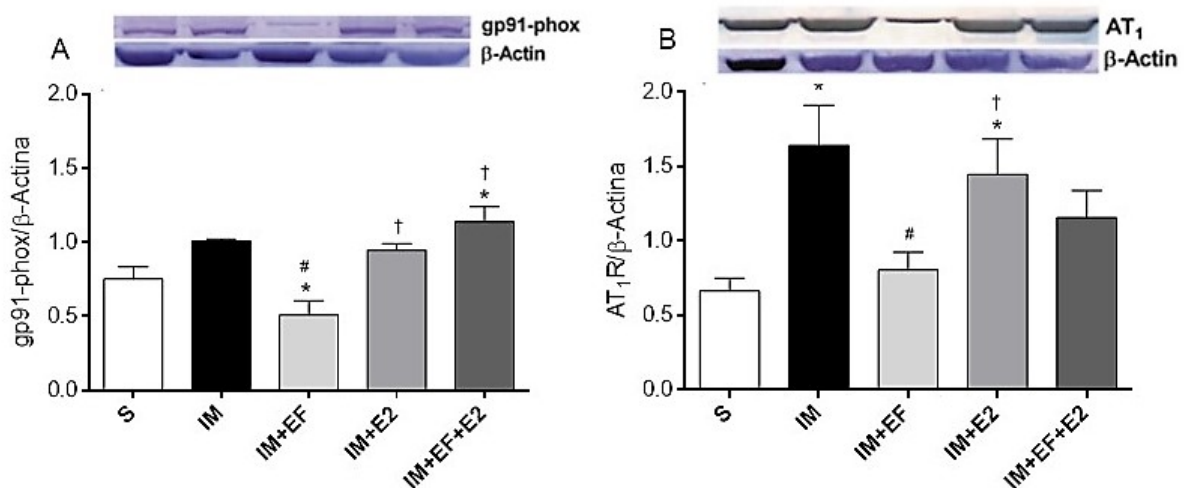


Figura 15. Avaliação da expressão proteica do receptor AT-1R **(A)**, e da enzima pró- oxidante gp91phox **(B)** no tecido cardíaco. Dados são expresso como Média $\pm$ EPM. Avaliado pela ANOVA de uma via e pós-teste de Fisher para múltiplas comparações. * $p < 0.05$ vs. S; # $p < 0.05$ vs. IM; † $p < 0.05$ vs. EF. Legenda: IM, infarto do miocárdio; EF, exercício físico; E2, terapia estrogênica; AT-1R, Receptor do Tipo I da Angiotensinall.

4.7 Atividade das enzimas antioxidantes

Além da expressão das enzimas antioxidantes, foi avaliada a atividade da SOD e da Catalase oito semanas após o protocolo experimental. Conforme demonstrado nas figuras 16A e 16B, o IM induziu a redução na atividade de ambas as enzimas ($p < 0.05$ vs. S). Nenhum tratamento foi capaz de reverter a redução na atividade da CAT. Por outro lado, o EF preveniu a redução da SOD nos grupos IM+EF e IM+EF+E2. Avaliando os efeitos da terapia com E2 sobre a atividade da Catalase, os resultados mostram que os valores obtidos nos animais que realizaram a terapia estrogênica foram significativamente menores quando comparados ao grupo IM ($p < 0.05$).

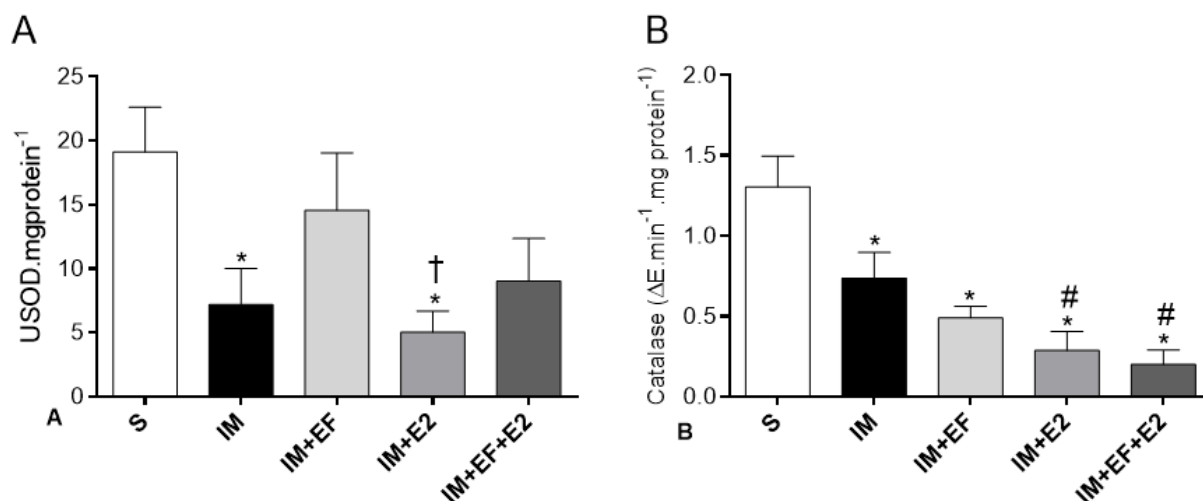


Figura 16. Atividade das enzimas antioxidante SOD (A) e Catalase (B) no tecido cardíaco. Dados são expresso como Média $\pm$ EPM. Avaliado pela ANOVA de uma via e pós- teste de Fisher para múltiplas comparações. * $p < 0.05$ vs. S. # $p < 0.05$ vs. IM. † $p < 0.05$ vs. EF.



DISCUSSÃO

5. Discussão

Já está bem estabelecido na literatura que o E2 e o EF modulam importantes vias de sinalizações envolvidas nos danos causados pelo IM. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da associação entre a terapia estrogênica e o exercício físico sobre a função cardíaca de ratas ovariectomizadas submetidas ao infarto do miocárdio.

Os principais achados do presente estudo foram que: i) o tratamento com E2 não previne a disfunção diastólica cardíaca nas ratas ovariectomizadas submetidas ao IM; ii) altera de forma negativa os parâmetros envolvidos no remodelamento cardíaco; iii) quando associado ao EF, os resultados sugerem que o E2 reverte os efeitos benéficos do EF sobre a função cardíaca.

Analisando inicialmente o peso corporal dos animais, observa-se resultados semelhantes entre os grupos, entretanto, ao final das 8 semanas da reposição estrogênica e exercício físico, os animais tratados com E2 apresentaram redução do peso corporal. Esse resultado justifica-se pela capacidade de ação central do E2, via receptores do tipo $ER\alpha$ e $ER\beta$, em diferentes regiões do cérebro (hipotálamo, núcleo arqueado, área pré-óptica e núcleo do trato solitário) no controle do peso corporal (Saito *et al.*, 2015). De fato, o receptor de $E2\alpha$ no núcleo ventromedial do hipotálamo desempenha um papel essencial no controle do balanço energético e peso corporal (Musatov *et al.*, 2007).

Na extensão da área de infarto no VE, observa-se que os resultados obtidos no tratamento com E2 sobre o peso corporal foi acompanhado do aumento da extensão de área infartada. Em concordância com a literatura, o tratamento durante 11 semanas com E2, é capaz de aumentar a área de infarto, associado ao aumento de mortalidade (Smith *et al.*, 2000). O EF não alterou o peso corporal, assim como, a extensão da área de infarto. Na associação, a área de extensão de infarto manteve-se aumentada apresentando valores similares aos animais tratados com E2.

Em revisão, autores discutem a expansão da área de infarto como sendo um desbalanço entre as respostas inflamatórias e anti-inflamatórias, que levam a ativação de mediadores de crescimento da matriz extracelular, dentre eles, as MMPs (MacKenna *et al.*, 2000). Conforme citado na introdução, as MMPs estão presentes no coração e são responsáveis pela regulação entre a produção e degradação de colágeno pós infarto (Creemers *et al.*, 2001).

Em um estudo recente, Szabó e colaboradores (2018) demonstraram a participação das MMPs nas alterações cardíacas na condição de privação dos hormônios ovarianos, em que ratas ovariectomizadas apresentaram aumento na deposição de colágeno via aumento na atividade de metaloproteinases de matriz tipo 2 (MMP-2). Quando inibidas, as MMPs atenuam o remodelamento cardíaco após IM, por meio da redução na dilatação do ventrículo esquerdo (Rohde *et al.*, 1999). Esses resultados enfatizam a participação do colágeno no agravamento do remodelamento adverso, tanto na ausência dos hormônios ovarianos quanto pós IM.

Investigando a participação da terapia estrogênica, estudos evidenciam que o tratamento com 17β -estradiol previne a fibrose cardíaca, via redução na deposição de colágeno do tipo I e III (Pedramet *al.*, 2010; Caoet *al.*, 2011). Em nosso estudo, os resultados encontrados no tratamento com E2 foram contrários aos descritos na literatura, em que os animais dos grupos E2 e E2+EF apresentaram resultados similares ao grupo IM, no percentual da deposição de colágeno no VE, demonstrando resultados benéficos somente no grupo que realizou o EF.

As controvérsias relacionadas ao tratamento com E2 pode se justificar pela utilização de diferentes doses utilizadas nos estudos. Apesar de existir diferentes doses (Caoet *al.*, 2011; Paigelet *al.*, 2011) na literatura, a dose utilizada neste estudo (5 μ g - 3 vezes por semana) é uma dose que restaura as concentrações fisiológicas das ratas (Cláudio *et al.*, 2013; Endlichet *al.*, 2017), justificando que a concentração estrogênica dessas ratas está próxima das ratas sham.

Diante dos resultados obtidos nos grupos tratados com E2, buscou-se investigar possíveis vias de sinalizações envolvidas na deposição de colágeno. Sabe-se que o aumento na deposição de colágeno envolve a ativação de uma cascata de vias de sinalizações neuro-humorais, dentre eles, o SRAA (Mehta e Griendling., 2007).

O SRAA é uma das vias ativadas durante o processo de remodelamento cardíaco após o IM, e está associada na patogênese da insuficiência cardíaca (Mehta e Griendling, 2007). No coração, o aumento da Ang II ocorre 10 minutos

a partir do estiramento do cardiomiócito (Sadoshima *et al.*, 1992). Uma vez ativado nas células cardíacas, o receptor AT1 provoca aumento na deposição de colágeno através de múltiplas vias de sinalização (Tziakaset *et al.*, 2003).

A ativação do SRAA, via receptor AT1, acontece pós-IM e ovariectomia (Sun, 2009; Ribeiro-Jr *et al.*, 2012). Em ambas situações, os efeitos promovidos pela ativação exacerbada do SRAA, levam ao aumento da área de infarto (Jalowyt *et al.*, 1998) e deposição de colágeno (Sun *et al.*, 2000).

Um estudo conduzido por Jalowyt e colaboradores (1998) evidencia que a inibição do receptor AT1 é capaz de reduzir o tamanho da área de infarto no coração de porcos. Dados previamente publicados por nosso grupo de pesquisa (Almeida *et al.*, 2014) demonstram aumento na expressão do receptor AT-1, associado ao aumento na deposição de colágeno e aumento da área de expansão do infarto em ratas ovariectomizadas submetidas ao IM, sugerindo o aumento na expressão do AT1 como uma das vias envolvidas no remodelamento cardíaco nesse modelo experimental.

Investigando as respostas do tratamento com E2 na expressão do receptor AT1, observa-se que os animais quando tratados com E2 não apresentaram mudanças na expressão desse receptor comparado ao grupo IM. Com o EF a expressão do receptor AT1 foi reduzida após o IM e quando associado ao E2, parece prevenir os efeitos do tratamento com E2 de forma isolada sobre a expressão do receptor AT1. Um estudo prévio demonstrou que a terapia com E2 é capaz de regular ou mesmo reduzir a expressão do receptor AT1 em ratas ovariectomizadas (Dean *et al.*, 2004). Em cultura de fibroblastos cardíacos

incubados com Ang II e E2, é foi observada a prevenção no aumento de colágeno tipo I e III, assim como, do TGF β 1. Baseado nos resultados encontrados na literatura, observam-se respostas contrárias ao encontrado neste estudo. Contudo, é importante ressaltar que nenhum dos estudos foram realizados em modelos de privação dos hormônios ovarianos submetidos ao IM, sendo que, a redução do E2, é um fator adicional no remodelamento cardíaco pós-IM, via ativação do receptor AT1 (Ribeiro-Jr *et al.*, 2012)

Nas análises histológicas do presente estudo, além de não alterar a deposição de colágeno pós IM, foi também observado que os animais que foram tratados com E2 desenvolveram hipertrofia cardíaca, demonstrada pelo aumento da área de secção transversa do miócito. A área de secção transversa do miócito é utilizada como parâmetro de hipertrofia cardíaca por muitos estudos (Clark e Rodnick., 1998; Almeida *et al.*, 2014; Ju *et al.*, 1997).

De fato, a hipertrofia cardíaca é uma das respostas adaptativas do coração, que pode ocorrer por diferentes estímulos, tal como, aumento de carga pressórica e de volume, condição observada em resposta ao IM, denominada de hipertrofia patológica (Mill *et al.*, 2011).

A hipertrofia do miócito é iniciada pela ativação neuro-hormonal, dentre eles, o SRAA (Lindpaintner *et al.*, 1993). Conforme citado anteriormente, a ativação do SRAA está envolvida na patogênese da insuficiência cardíaca após IM e envolve aumento circulante de Ang II, e ativação do receptor AT1 (Sadoshima *et al.*, 1992; Paul *et al.*; 2006; Sun, 2009). Ju e colaboradores

(1997) demonstraram que o bloqueio do receptor AT1, com Losartan, é capaz de reduzir a hipertrofia cardíaca, assim como a disfunção cardíaca pós-IM.

Adicionalmente, a redução dos hormônios ovarianos aumenta a densidade do receptor AT1 no ventrículo esquerdo de ratas ovariectomizadas, sendo essa resposta revertida quando tratados com E2 (Dean *et al.*, 2004), contudo, os resultados encontrados na literatura ainda são controversos. Um estudo desenvolvido por Wang e colaboradores (2013) demonstrou que ratas tratadas por quatro semanas com E2, não apresentaram diferenças na expressão do receptor AT1 quando comparadas Sham vs OVX, assim como, OVX vs OVX+E2.

Sobre os efeitos do EF na hipertrofia do cardiomiócito, estudos reforçam que a prática do EF é capaz de modular a expressão do receptor AT1 (Xue *et al.*, 2008) e prevenir o processo de hipertrofia do cardiomiócito após o IM (Wisløff *et al.*, 2002). Corroborando aos nossos resultados, outro estudo conduzido por nosso grupo de pesquisa, também observou efeitos benéficos do exercício físico na redução da deposição colágeno, hipertrofia dos cardiomiócitos e redução na expressão do receptor AT1, em ratas ovariectomizadas submetidas ao IM (Almeida *et al.*, 2014).

Diante dos resultados encontrados na literatura e citados acima, existem fortes evidências de que o aumento na expressão do AT1 é uma das vias envolvidas no remodelamento cardíaco adverso após o IM. Entretanto, ao analisar os resultados obtidos com a associação dos tratamentos, é possível notar que a expressão do receptor AT1 não foi modificada. Sugerindo assim, a

possibilidade do envolvimento de outras vias de sinalizações nas alterações morfológicas encontradas neste estudo, quando associado à terapia de reposição estrogênica e exercício físico.

Outro dado importante obtido em nosso estudo foram as mudanças ocorridas na expressão das proteínas pró e antioxidante. Na literatura, estudos demonstram que o aumento na formação de ang II, via receptor At1, induza formação de O_2^- e supressão do sistema antioxidante (Lu *et al.*, 2004; Hafstad *et al.*, 2013).

Estudos evidenciam o envolvimento do estresse oxidativo, mediado pela formação excessiva das espécies reativas de oxigênio (EROS) na patogênese do remodelamento cardíaco pós-IM (Hill *et al.*, 1996; Looiet *et al.*, 2008; Hafstad *et al.*, 2013).

As EROS são formadas naturalmente no nosso organismo e são conhecidas como importantes sinalizadores intracelulares (Finkel, 1999). Entretanto, o desequilíbrio entre as fontes geradores de EROS e o sistema antioxidante pode gerar toxicidade causando uma série de alterações danosas a célula, condição denominada de estresse oxidativo (Griendling *et al.*, 2002). A toxicidade associada a produção excessiva das EROS é combatida pelo sistema de defesa antioxidante, que incluem as enzimas, como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx) (Halliwell., 2006).

A literatura tem destacado que o IM estimula a formação de EROS, (Hill *et al.*, 1996) acompanhado da redução na expressão das enzimas antioxidantes (Hill

et al., 1996; Barbosa *et al.*, 2012). No coração submetido ao IM, as principais fontes formadoras das EROS são a mitocôndria e as enzimas xantina oxidase e nicotinamida adenina nucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase – NOX) (Hori e Nishida, 2009). A NADPH oxidase é uma enzima com múltiplas subunidades, dentre elas, a gp91phox (denominado também de NOX-2) (Griendling *et al.*, 2000). Sobre os efeitos da gp91phox no coração, estudos *in vitro* utilizando cardiomiócitos de ratos demonstraram que a ativação da gp91phox, via Ang II, é um mediador central na indução da hipertrofia do cardiomiócito (Hingtgen *et al.*, 2006). No Infarto, um estudo conduzido por Looi e colaboradores (2008), apresentam que a deleção do gene da gp91phox em camundongos infartados reduz a hipertrofia cardíaca, apoptose, fibrose intersticial, assim como, outros fatores relacionados a deposição de colágeno.

Em nosso estudo, ao contrário dos resultados demonstrados na literatura (Hill *et al.*, 1996; Hori e Nishida., 2009), observou-se que o IM não alterou a expressão da gp91phox. Contudo, os efeitos do EF corroboram aos apresentados na literatura (Almeida *et al.*, 2014). Neste estudo, a terapia com E2 de forma isolada ou associado ao EF não apresentaram diferenças na expressão da gp91phox quando comparado ao grupo IM. É importante ressaltar que a resposta encontrada na expressão da gp91phox com a terapia E2 de forma isolada, foi similar a formação de AOPP, fato esse que demonstra aumento do estresse oxidativo no coração desses animais.

Já está bem estabelecido na literatura que o EF praticado de forma regular é capaz de reduzir a formação das EROS, via expressão da gp91phox (Pinho *et*

al., 2012; Almeida *et al.*, 2014) e promover adaptações no sistema antioxidante, via aumento na expressão da SOD, Catalase e GPx em coração submetido ao IM (Barbosa *et al.*, 2012).

Avaliando os efeitos da terapia estrogênica, um estudo conduzido por Xu e colaboradores (2004), utilizando modelo experimental de isquemia/reperfusão, demonstrou redução na expressão da gp91phox quando tratados com E2. Nessa mesma linha, Kim e colaboradores (2006), evidenciaram a redução na formação de EROS em animais tratados com E2. Entretanto, grande parte dos estudos encontrados na literatura não foram realizados em animais submetidos ao IM.

Na literatura, alguns estudos correlacionam a ativação do SRAA ao aumento das EROS (Yunget *al.*, 2011; Hingtgenet *al.*, 2006). Em conformidade com essa observação, já foi demonstrado um sistema conjunto de ativação de vias oxidativas, especialmente relacionado a enzima GP91Phox, indicando que o SRAA, via ativação do receptor AT-1, estimula o estresse oxidativo por meio da NADPH oxidase (Yunget *al.*, 2011). No coração, a ativação do receptor AT-1 promove hipertrofia dos cardiomiócitos, por uma ação conjunta da via Akt, Rac-1 e GP91Phox (Hingtgenet *al.*, 2006). Esses resultados sugerem que o aumento na formação de AOPP, via ativação da gp91phox, pode ser regulado pela expressão do receptor AT1.

Sobre a expressão das enzimas antioxidantes, foi demonstrado que o tratamento com E2 reduziu a expressão da SOD, associado à redução na atividade da SOD e Catalase.

Em estudo, Zhao e colaboradores (2014), discutem que a redução do estrogênio no coração potencializa o remodelamento cardíaco e disfunção diastólica, via aumento na formação de EROS, por meio do desacoplamento da BH4 (tetraidrobiopterina), sendo esses efeitos revertidos com E2. Nessa mesma linha, outro estudo utilizando células do músculo liso vascular, demonstraram que o tratamento com 17 β -estradiol aumentou a expressão e atividade da MnSOD e ecSOD (Strehlowet *al.*, 2003). Diante da escassez de estudos que demonstram os efeitos da terapia de reposição hormonal no coração de ratas ovariectomizadas submetidas ao IM, os resultados obtidos nesse estudo apontam que o tratamento com E2 reduz a capacidade antioxidante e não previne a formação das EROS no modelo no modelo experimental de IM.

Diante dos resultados obtidos nas análises morfométricos e moleculares do presente estudo, buscou-se avaliar quais as respostas funcionais cardíacas nos animais tratados com E2 e, associado ao EF. Dentre as análises funcionais, a PDFVE apresentou-se como um importante resultado, tendo em vista, ser um importante parâmetro a ser alterado após o IM, além de ser utilizado como parâmetro de disfunção diastólica cardíaca (Meriket *al.*, 2014)

Sabe-se que após o IM a elevada rigidez da parede ventricular e consequente prejuízo no enchimento promove o declínio da função cardíaca (Meng *et al.*, 2016). Adicionalmente, a redução dos hormônios ovarianos altera a contratilidade cardíaca, por meio do prolongamento no tempo de contração e relaxamento no coração de ratas submetidas ao IM (Giubertiet *al.*, 2006).

Observa-se em nosso estudo que os efeitos adversos do IM não foram prevenidos com E2. As alterações encontradas nos parâmetros morfométricos e moleculares, foram similares as PDFVE e Tau. A PDFVE apresenta-se como parâmetro importante na avaliação da função ventricular e seu aumento, em geral, está associado a disfunção diastólica e insuficiência cardíaca (Pfeffer *et al.*, 1984; Mericet *et al.*, 2014; Kanget *et al.*, 2012). A disfunção diastólica refere-se a anormalidades mecânicas e funcionais durante o relaxamento e enchimento do ventrículo esquerdo (Zhao *et al.*, 2014). O Tau é definido como o tempo constante de relaxamento isovolumétrico e o seu aumento também está associado a redução da função diastólica do ventrículo esquerdo (Baier *et al.*, 2008; Davis *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 1992).

Deste modo, os resultados obtidos neste estudo demonstram que o E2 isolado ou associado ao EF não altera os efeitos adversos do IM sobre a PDFVE e o Tau. Sugerindo assim, disfunção diastólica ventricular esquerda nos animais que receberam o tratamento com E2 independente da associação com o exercício.

Analisando as alterações encontradas com o EF, nota-se a eficácia das 8 semanas de exercício físico na prevenção do remodelamento adverso e disfunção cardíaca pós-IM. Do mesmo modo, animais que realizaram o treinamento de corrida apresentaram atenuação da hipertrofia celular e ventricular, associados a uma restauração da função contrátil, do manejo e da sensibilidade ao cálcio intracelular e melhorando o controle do cálcio diastólico dos cardiomiócitos (Wisløff *et al.*, 2002; Kemper *et al.*, 2012). Além disso, outro

estudo desenvolvido por nosso grupo de pesquisa, verificou-se normalização da área de secção transversa do miócito e da deposição de colágeno, em conjunto com uma redução da PDFVE em ratas com deficiência estrogênica que realizou treinamento de esteira (Almeida *et al.*, 2014).

Sobre a terapia estrogênica, evidências na literatura relatam efeitos cardioprotetores, em que camundongos fêmeas submetidas ao IM apresentaram maior fração de ejeção ventricular quando comparadas aos machos (Cavasinet *al.*, 2004). Além disso, Paigel e colaboradores (2011) relatam que o tratamento com E2 durante 60 dias previne a redução da força de contração em ratas ovariectomizadas. Em nosso estudo, além das alterações deletérias encontradas nas análises morfométricas e funcionais no ventrículo esquerdo dos animais tratados com E2, observou-se também, que os resultados benéficos obtidos com o EF foram abolidos quando associado a terapia estrogênica.

Em síntese, nosso trabalho demonstrou que o tratamento com E2 não é capaz de prevenir os efeitos do remodelamento cardíaco adverso após o IM, e ainda, quando associado reverte os efeitos benéficos do EF. Esses resultados têm relevância, uma vez que foram demonstradas alterações morfométricas importantes associadas às alterações funcionais do ventrículo esquerdo. Entretanto, nossos resultados não elucidam completamente as vias de sinalizações envolvidas nas alterações morfométricas e funcionais quando utilizado o tratamento com E2, assim como, quando associado ao EF, sugerindo a necessidade de estudos adicionais.

76

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou que 8 semanas de terapia estrogênica não foram capazes de reverter os efeitos adversos do remodelamento cardíaco pós IM. Além disso, quando associado ao exercício físico, piorou o processo de remodelamento cardíaco induzido pelo IM, como o aumento na extensão da área infartada, não preveniu deposição de colágeno e hipertrofia dos cardiomiócitos, não alterou a formação de EROS, via AOPP e, consequentemente, manteve a disfunção diastólica do ventrículo esquerdo pós IM.

Dessa forma, podemos concluir que o uso da terapia com E2 não é capaz de prevenir as alterações cardíacas induzidas pelo IM na disfunção diastólica do VE assim como, não reverte os parâmetros relacionados ao remodelamento cardíaco. Além disso, quando combinado com EF, o E2 prejudica as mudanças positivas promovidas por EF em ratas fêmeas ovariectomizadas submetidas ao IM.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

Adams V, Linke A, Kränkel N, Erbs S, Gielen S, Möbius-winkler S. Impact of regular physical activity on the NAD(P)H oxidase and angiotensin receptor system in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2005;111,555–562.

Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984. 105, 121–126.

Almeida SA, Claudio ERG, Mengal VF, Oliveira SG, Merlo E, et al. Exercise training reduces cardiac dysfunction and remodeling in ovariectomized rats submitted to myocardial infarction. *PLoS ONE* 2014; 9(12):e115970.

Bai X. Calculation of left ventricular relaxation time constant-tau in humans by continuous-wave doppler. *Open Cardiovasc. Med* 2008. J. 2, 9–11.

Barbosa V, Luciano TF, Vitto MF, Cesconetto PA, Marques SO, Souza DR, Bom K, Pimentel GD, Katashima CK, Ropelle ER, Pinho RA, Souza CT. Exercise training plays cardioprotection through the oxidative stress reduction in obese rats submitted to myocardial infarction. *International journal of cardiology* 2012;157(3)

Bendall JK, Cave AC, Heymes C, Gall N, Shah AM. Pivotal role of a gp91phox-containing NADPH oxidase in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circulation* 2002; 105:293–296.

Emelia J. Benjamin, Salim S. Virani, Clifton W. Callaway, Alanna M. Chamberlain, Alexander R. Chang, et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2018 Update A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2018;137:e67–e492.

Borrás C, Gambini J, López-Grueso R, Pallardó FV, Viña J. Direct antioxidant and protective effects of estrogen on mitochondrial function in aged mice. *Biochem. Biophys. Acta* 2010.1802,205–211.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*1976; 72:248-254.

Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular disease: The role of oxidant stress. *Circ Res* 2000; 87:840-844.

Campos C, Casali KR, Baraldi D. E defenses and heart rate variability. *Oxid. Med. Cell Longev*. 2014:218749.doi:10.1155/2014/21874

fficacyofalowdo

Cao J, Zhu T, Lu L, Geng L, Wang L, Zhang Q, Yang K, Wang H, Shen W. Estrogen Induces cardioprotection in male C57BL/6J mice after acute myocardial infarction via decreased activity of matrix metalloproteinase-9 and increased Akt-Bcl-2 anti-apoptotic signaling. *International Journal Of Molecular Medicine* 2011. 28:231-237,

Cavasin M, Tao Z, Menon S, Yang X. Gender differences in cardiac function during early remodeling after acute myocardial infarction in mice. *Life sciences* 2004;75(18):2181–92.

Cigola E. Angiotensin II activates programmed myocyte cell death in vitro. *Exp Cell Res* 1997. v. 231, n. 2, p. 363-71, Mar 15.

Clark RJ, Rodnick KJ. Morphometric and biochemical characteristics of ventricular hypertrophy in male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Biol* 1998 May;201(Pt 10):1541-52.

Claudio ER, Endlich PW, Santos RL, Moysés MR, Bissoli NS, Gouvêa SA, Silva JF, Lemos VS, Abreu GR. Effects of chronic swimming training and oestrogen therapy on coronary vascular reactivity and expression of antioxidant enzymes in ovariectomized rats. *PLoS One*. 2013 Jun 3;8(6):e64806.

Creemers EEJM, Cleutjens JPM, Smits JFM, Daemen MJ P. Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: A new approach to prevent heart failure? *Circ Res* 2001;89(3):201–210.

Datasus. MS/SVS/CGIAE - Sistema de Informações sobre Mortalidade – SIM. Consolidação da base de dados de 2011.

Davis KL, Mehlhorn U, Schertel ER, Geissler HJ, Trevas D, Laine GA. Variation in tau, the time constant for isovolumic relaxation, along the left ventricular base-to-apex axis. *Basic Res. Cardiol* 1999. 94, 41–48.

De Resende MM, Mill JG. Effect of high salt intake on local renin-angiotensin system and ventricular dysfunction following myocardial infarction in rats. *Clin Exp PharmacolPhysiol* 2007. v. 34, n. 4, p. 274-9.

Dean RG, Balding LC, Candido R, Burns WC, Cao Z, Twigg SM, Burrell LM. Connective tissue growth factor and cardiac fibrosis after myocardial infarction. *The journal of histochemistry and cytochemistry* 2005;53(10):1245–56.

Dostal DE, Hunt RA, Kule CE, Bhat GJ, Karoor V, McWhinney CD, Baker KM. Molecular Mechanisms of Angiotensin II in Modulating Cardiac Function: Intracardiac Effects and Signal Transduction Pathways. *J Mol CellCardiol* 1997. 29, 2893–2902.

Elahi MM, Kong YX, Matata BM. Oxidative stress as a mediator of cardiovascular disease. *Oxid Med Cell Long* 2009; 2(5):259-269.

Endlich PW, Claudio ERG, Lima LCF, Ribeiro Júnior RF, Peluso AAB, et al. Exercise modulates the aortic renin-angiotensin system independently of estrogen therapy in ovariectomized hypertensive rats. *Peptides* 2017; 87:41–49.

England TN, Tampfer MJS, Colditz GA, Willett WC, Manson JE, Joffe M, Rosner B, Fuchs C, Hankinson SE, Hunter DJ, Hennekens CH, Speizer FE.

Postmenopausal hormone therapy and mortality. *The New England Journal of Medicine* 1997;19:1769–1775.

Erickson B, Sperber K, Frishman WH. Toll-like receptors: new therapeutic targets for the treatment of atherosclerosis, acute coronary syndromes, and myocardial failure. *Cardiol Rev* 2008. v. 16, n. 6, p. 273-9.

Falkeborn M, Schairrer C, Naessén T, Persson I. Risk of myocardial infarction after oophorectomy and hysterectomy. *J Clin Epidemiol* 2000; 53:832–837.

Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species in non-phagocytic cells. *J Leukoc Biol* 1999 Mar;65(3):337-40.

Folsom AR, Mink PJ, Sellers TA, Hong C, Zheng W, Potter JD. Hormonal replacement therapy and morbidity and mortality in a prospective study of postmenopausal women. *American journal of public health* 1995;85(8 Pt 1):1128–32.

Fraccarollo D, Galuppo P, Schraut S, Kneitz S, Rooijen NV, Ertl G, et al. Immediate mineralocorticoid receptor blockade improves myocardial infarct healing by modulation of the inflammatory response. *Hypertension* 2008. 51, 905–914.

Frangogiannis NG. The mechanistic basis of infarct healing. *Antioxid Redox Signal* 2006. v. 8, n. 11-12, p. 1907-39.

Frey RS, Ushio-Fukai M, Malik AB. NADPH oxidase-dependent signaling in endothelial cells: role in physiology and pathophysiology. *Antioxid Redox Signal* 2009;11(4):791-810.

Gambacciani M, Levancini M. Hormone replacement therapy: who should be treated?. *Minerva Ginecol*. 2015 Jun;67(3):249-55. Epub 2015 Feb 13.

Giuberti K, Pereira RB, Bianchi PR, Paigel AS, Vassallo DV, Stefanon I. Influence of ovariectomy in the right ventricular contractility in heart failure rats. *Arch Med Res*. 2007 Feb;38(2):170-5. Epub 2006 Dec 11.

Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: Role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 2000; 86:494-501.

Grindler NM, Santoro NF. Menopause and exercise. *Menopause* 2015. 22,1351–1358.

Hafstad AD, Nabeebaccus A, Shah AM. Novel aspects of ROS signalling in heart failure. *Basic research in cardiology* 2013;108(4):359.

Halliwell B. Reactive species and antioxidants: Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 2006;141:312-322.

Hill MF, Singal PK. Antioxidant and Oxidative Stress Changes during Heart Failure Subsequent to Myocardial Infarction in Rats. *American journal of Pathology* 1996;148(1):291–300.

Hingtgen SD, Tian X, Yang J, Dunlay SM, Peek AS, Wu Y, Sharma RV, Engelhardt JF, Davisson RL. Nox2-containing NADPH oxidase and Akt activation play a key role in angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Physiological genomics* 2006;26(3):180–91.

Hodis HN, Mack WJ. Hormone replacement therapy and the association with coronary heart disease and overall mortality: clinical application of the timing hypothesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2014 Jul;142:68-75.

Hori M, Nishida K. Oxidative stress and left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2009; 81:457–464.

Huber G, Schuster F, Raasch W. Brain renin-angiotensin system in the pathophysiology of cardiovascular diseases. *Pharm. Res* 2017, 125, 72–90.

Husain K, Hernandez W, Ansari RA, Ferder L. Inflammation, oxidative stress and renin angiotensin system in atherosclerosis. *World J Biol Chem* 2015 August 26; 6(3): 209-217

Iyer RP, Castro Brás LE, Patterson NL, Bhowmick M, Flynn ER. Early matrix metalloproteinase-9 inhibition post-myocardial infarction worsens cardiac dysfunction by delaying inflammation resolution. *J Mol Cell Cardiol* 2016; 100:109–117.

Jaloway A, Schulz R, Dorge H, Behrends M, Heusch G. Infarct size reduction by AT1- receptor blockade through a signal cascade of AT2-receptor activation, bradykinin and prostaglandins in pigs. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32(6):1787-1796.

Ju H, Zhao S, Jassal DS, Dixon IMC. Effect of AT1 receptor blockade on cardiac collagen remodeling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 1997; 35:223-232.

Judkins CP, Diep H, Broughton BR, Mast AE, Hooker EU, Miller AA. Direct evidence of a role for Nox2 in superoxide production, reduced nitric oxide bioavailability, and early atherosclerotic plaque formation in ApoE^{-/-} mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol* 2010. 298, H24–H32.

Kang WY, Seung HH, Hwang SH, Kim W, Park KH, Hong YJ. E change on clinical outcomes in overweight and obese patients with acute myocardial infarction who underwent successful percutaneous coronary intervention. *Chonnam Med* 2012. J.48,32–38.

ffects of weight

Kannel, WB. The framingham study: historical insight on the impact of cardiovascular risk factors in men versus women. *J. Gend. Specif Med* 2002.5,27–37.

Kemi OJ, Macquaide N, Hoydal MA, Ellingsen O, Smith GL, Wisløff U. Exercise

training corrects control of spontaneous calcium waves in hearts from myocardial infarction heart failure rats. *J Cell Physiol* 2012; 227:20–26.

Kim JK, Pedram A, Razandi M, Levin ER. Estrogen prevents cardiomyocyte apoptosis through inhibition of reactive oxygen species and differential regulation of p38 kinase isoforms. *The Journal of biological chemistry* 2006;281(10):6760–7.

Lambeth JD. Nox enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 2004; 4:181-189.

Lijnen P, Petrov V. Antagonism of the renin-angiotensin system, hypertrophy and gene expression in cardiac myocytes. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1999, v. 21, n. 5, p. 363-74.

Lindpaintner K, Lu W, Neidermayer N, Schieffer B, Just H, Ganten D, Drexler H. Selective activation of cardiac angiotensinogen gene expression in post-infarction ventricular remodeling in the rat. *J Mol Cell Cardiol.* 1993 Feb;25(2):133-43.

LIU Y. Angiotensin II stimulation in vitro induces hypertrophy of normal and postinfarcted ventricular myocytes. *Circ Res* 1998, v. 82, n. 11, p. 1145-59.

Looi YH, Grieve DJ, Siva A, Walker SJ, Anilkumar N, et al. Involvement of Nox2 NADPH oxidase in adverse cardiac remodeling after myocardial infarction. *Hypertension* 2008; 51:319-325.

Lu L, Quinn MT, Sun Y. Oxidative stress in the infarcted heart: role of de novo angiotensin II production. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 325:943–951.

Mackenna D, Summerour SR, Villarreal FJ. Role of mechanical factors in modulating cardiac fibroblast function and extracellular matrix synthesis. *Cardiovasc Res* 2000. 46,257–263.

Mazurek K, Piotr Z, Kozdroń E, Fojt A, Czajkowska A, Szczypiorski P. Cardiovascular risk reduction in sedentary postmenopausal women during organised physical activity. *Kardiol* 2017. Pol. 75, 476–85.

Mehta P, Griendling K. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;292: C82–C97.

Mendis S, Puska P, Norrving B. Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control. Genoa: *World Health Organization* 2011.

Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. TGF- β : the master regulator of fibrosis. *Nat Rev Nephrol* 2016; 48:Epub ahead of print.

Meric M, Yesildag O, Yuksel S, Soylu K, Arslanoglu M, Dursun I. Tissue doppler myocardial performance index in patients with heart failure and its relationship with hemodynamic parameters. *Int. J. Cardiovasc* 2014. Imaging 30, 1057–1064.

Mill JG, Stefanon I, Dos Santos L, Baldo MP. Remodeling in the ischemic heart: the stepwise progression of heart failure. *Braz J Med Biol Res* 2011; 44(9): 890-898.

Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972; 247:3170–3175.

Moilanen JM, Aalto A, Raitanen J, Hemminki E, Aro AR, Luoto R. Physical activity and change in quality of life during menopause -an 8-year follow-up study. *Health Qual Life Outcomes* 2012.10:8.

Moza

statistical update heart disease and stroke statistics — 2016 update Are port from the american heart association. *Circulation* 2016.133,e38–e360.

Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P. Inflammatory Cytokines and Postmyocardial Infarction Remodeling. *Circ Res*.2004;94:1543-1553.

Nickenig G, Strehlow K, Wassmann S, Baumer AT, Albory K, Sauer H. Di

expression in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 2000.102, 1828–1833.

Nudy M, Chinchilli VM, Foy AJ. A systematic review and meta-regression analysis to examine the 'timing hypothesis' of hormone replacement therapy on mortality, coronary heart disease, and stroke. *Int J Cardiol Heart Vasc*. 2019 Jan 18;22:123-131.

Oliveira LN, Ribeiro F, Alves AJ, Teixeira M, Miranda F, Oliveira J. Heart rate variability in myocardial infarction patients: Effects of exercise training. *Rev Port Cardiol*. 2013.

Paigel AS, Ribeiro Jr. RF, Fernandes AA, Targueta GP, Vassallo DV, Stefanon I. Myocardial contractility is preserved early but reduced late after ovariectomy in young female rats. *Reprod Biol Endocrinol* 2011; 9:54.

Paravicini TM, Touyz RM. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension. *Diabetes Care* 2008; 31(2):S170–S180.

Paul M, Mehr ALIP, Kreutz R. Physiology of Local Renin-Angiotensin Systems. *Physiol Rev* 2006;86:747–803.

Pedram A, Razandi M, O'Mahony F, Lubahn D, Levin ER. Estrogen receptor-beta prevents cardiac fibrosis. *Mol Endocrinol* 2010; 24:2152–2165.

Pfe ffM Pfe

with myocardial infarction and failure. *Am. J. Med* 1984. 76, 99–103.

ffer M, Fletcher

Pinho CA, Tromm, CB, Tavares AMV, Silva LA, Silveira PCL, et al. Effects of

different physical training protocols on ventricular oxidative stress parameters in infarction-induced rats. *Life Sci* 2012;90:553-559.

Piro M, Bona RD, Abbate A, Biasucci LM, Crea F. Sex-related differences in myocardial remodeling. *J. Am. Coll. Cardiol* 2010. 55, 1057–1065.

Puzianowska-Kuznicka M. ESR1 in myocardial infarction. *Clin. Chim. Acta* 2012.413,81–87.

Resanovic I, Rizzo M, Zafirovic S, Bjelogric P, Perovic M, Savic K, Patti AM, Isenovic RE. Antiatherogenic effects of 17 β -estradiol. *HormMetab Res* 2013; 45:701–708.

Ribeiro Jr. RF, Pavan BMM, Potratz FF, Fiorim J, Simões MR, et al. Myocardial contractile dysfunction induced by ovariectomy requires AT1 receptor activation in female rats. *Cell PhysiolBiochem*2012; 30: 1-12.

Rohde LE, Ducharme A, Arroyo LH, Aikawa M, Sukhova GH, Lopez-Anaya A, McClure KF, Mitchell PG, Libby P, Lee RT. Matrix Metalloproteinase Inhibition Attenuates Early Left Ventricular Enlargement After Experimental Myocardial Infarction in Mice. *Circulation* 1999;99(23):3063–3070.

Sadoshima J, Jahn L, Takahashi T, Kulik TJ, Izumo S. Molecular characterization of the stretch-induced adaptation of cultured cardiac cells: an in vitro model of load- induced cardiac hypertrophy. *J Biol Chem* 1992; 267:10551–10560.

Saengsirisuwan V, Pongseeda S, Prasannarong M, Vichaiwong K, Toskulkao C. Modulation of insulin resistance in ovariectomized rats by endurance exercise training and estrogen replacement. *Metab. Clin. Exp* 2009.58,38–47.

Saito K, Cao X, He Y, Xu. Progress in the molecular understanding of central regulation of body weight by estrogens. *Obesity (Silver Spring)*. 2015 May; 23(5): 919–926.

Santos RA, Ferreira AJ, Simoes ESAC. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. *Exp Physiol*2008, v. 93, n. 5, p. 519-27.

Santos RL, Silva FB, Ribeiro RF, Stefanon I. Sex hormones in the cardiovascular system. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig* 2014. 18, 89–103.

Sart S, Song L, Li Y. Controlling Redox Status for Stem Cell Survival, Expansion, and Differentiation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity Volume* 2015, Article ID 105135, 14 pages

Segura AM, Frazier OH, Buja LM. Fibrosis and heart failure. *Heart Fail Rev* 2014, v. 19, n. 2, p. 173-85.

Shenoy V, Grobe JL, Qi Y, Ferreira AJ, Fraga-Silva RA, Collamat G. 17 β -estradiol modulates local cardiac renin-angiotensin system to prevent cardiac

remodeling in the DOCA-salt model of hypertension in rats. *Peptides* 2009.30,2309–2315.

Silvestre JS. Activation of cardiac aldosterone production in rat myocardial infarction: effect of angiotensin II receptor blockade and role in cardiac fibrosis. *Circulation* 1999, v. 99, n. 20, p. 2694-701.

Smith PJW, Ornatsky O, Stewart DJ, Picard P, Dawood F, Wen W, Liu PP, Webb DJ, Monge JC. Effects of Estrogen Replacement on Infarct Size, Cardiac Remodeling, and the Endothelin System After Myocardial Infarction in Ovariectomized Rats. *Circulation* 2000;102(24):2983–2989.

Sparks MA, Crowley SD, Gurley SB, Mirotsoy M, Coffman T. Classical Renin-Angiotensin System in Kidney Physiology. *Compr Physiol*. 2014 July; 4(3):

STEFANON I. Left and right ventricle late remodeling following myocardial infarction in rats. *PLoS One* 2013, v. 8, n. 5, p. e64986.

Strehlow K, Rotter S, Wassmann S, Adam O, Grohé C, Laufs K, Böhm M, Nickenig G. Modulation of Antioxidant Enzyme Expression and Function by Estrogen. *Circulation Research* 2003, 93:170-177:

Strehlow K, Rotter S, Wassmann S, Adam O, Grohé C, Laufs K, Böhm M, Nickenig G. Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. *Circulation research* 2003;93(2):170–7.

Sukumalchantra Y, Danzig R, Levy SE, Swan HJC. The mechanism of arterial hypoxemia in acute myocardial infarction. *Circulation* 1970.41,641–650.

Sun Y, Zhang JQ, Zhang J, Lamparter S. Cardiac remodeling by fibrous tissue after infarction in rats. *J Lab Clin Med* 2000; 135(4):316-323.

Sun Y. Myocardial repair/remodeling following infarction: roles of local factors. *Cardiovasc Res* 2009; 81:482–490.

Szabó R, Karácsonyi Z, Börzsei D, Juhász B, Al-awar A, Török S, Berkó AM, Takács I, Kupai K, Varga C, Pósa A. Role of Exercise-Induced Cardiac Remodeling in Ovariectomized Female Rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2018, Article ID 6709742, 9 pages

Terrell A., Crisostomo PR, Markel TA, Wang M, Abarbanell AM, Herrmann JL. Postischemic infusion of 17-betaestradiol protects myocardial function and viability. *J. Surg. Res* 2008. 146, 218–224.

Thomas JD, Flachskampf FA, Chen C, Guererro JL, Picard MH, Levine RA. Isovolumic relaxation time varies predictably with its time constant and aortic and left atrial pressures: implications for the noninvasive evaluation of ventricular relaxation. *J Am Heart* 1992.124,1305–1313.

Timerman S, Gonzalez MM, Zaroni AC, Ramirez JA. Emergency medical

services: Brazil. *Resuscitation* 2006 Sep;70(3):356-9. Epub 2006 Aug 9.

Turdi S, Huff AF, Pang J, He EY, Chen X, et al. 17- β estradiol attenuates ovariectomy-induced changes in cardiomyocyte contractile function via activation of AMP-activated protein kinase. *Toxicol Lett* 2015; 232:253–262.

Tziakas DN, Chalikias GK, Xatseras DI. Neurohormonal Hypothesis in Heart Failure. *Hellenic J Cardiol* 2003;44:195–205.

Valente AJ, Yoshida T, Clark RA, Delafontaine P, Siebenlist U, Chandrasekar B. Advanced oxidation protein products induce cardiomyocyte death via Nox2/Rac1/superoxide-dependent TRAF3IP2/JNK signaling. *Free Radic Biol Med* 2013; 60:125–135.

Van Eickels M, Patten RD, Aronovitz MJ, Alsheikh-Ali A, Gostyla K, Celestin F. 17-beta-estradiol increases cardiac remodeling and mortality in mice with myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol* 2003. 41, 2084–2092.

Vanhoutte D, Schellings M, Pinto Y, Heymans S. Relevance of matrix metalloproteinases and their inhibitors after myocardial infarction: a temporal and spatial window. *Cardiovasc Res* 2006 Feb 15;69(3):604-13. Epub 2005 Dec 19.

Virdis A, Duranti E, Taddei S. Oxidative stress and vascular damage in hypertension: role of angiotensin II. *Int. J. Hypertens.* 2011,1–7.

Wang H, Jessup JA, Zhao Z, Da Silva J, Lin M, MacNamara LM, Ahmad S, Chappell MC, Ferrario CM, Groban L. Characterization of the cardiac renin angiotensin system in oophorectomized and estrogen-replete mRen2.Lewis rats. *PLoS One* 2013 Oct 25;8(10):e76992.

Wisløff U, Loennechen JP, Currie S, Smith GL, Ellingsen Ø. Aerobic exercise reduces cardiomyocyte hypertrophy and increases contractility, Ca²⁺ sensitivity and SERCA-2 in rat after myocardial infarction. *Cardiovas Res* 2002;54:162–174.

Xu X, Wan W, Powers AS, Li J, Ji LL, et al. Effects of exercise training on cardiac function and myocardial remodeling in post myocardial infarction rats. *J Mol Cell Cardiol* 2008; 44:114–122.

Yung LM, Wong WT, Tian XY, Leung FP, Yung LH, Chen ZY, Yao X, Lau CW, Huang Y. Inhibition of renin-angiotensin system reverses endothelial dysfunction and oxidative stress in estrogen deficient rats. *PLoS one* 2011;6(3):17437.

ZHAO W. Cardiac oxidative stress and remodeling following infarction: role of NADPH oxidase. *Cardiovasc Pathol* 2009, v. 18, n. 3, p. 156-66.

Zhao Z, Wang H, Jessup JA, Lindsey SH, Chappell MC, Groban L. Role of estrogen in diastolic dysfunction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol* 2014.

306,H628–H640.

ZORNOFF LA. Infarto do miocárdio experimental em ratos: análise do modelo. *Arq Bras Cardiol* 2009. v. 93, n. 3, p. 434-440.

Musatov S, Chen W, Pfaff DW, Mobbs CV, Yang XJ, Clegg DJ, Kaplitt MG, Ogawa S. Silencing of estrogen receptor alpha in the ventromedial nucleus of hypothalamus leads to metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Feb 13;104(7):2501-6. Epub 2007 Feb 6.



ANEXOS