

**EFEITOS DO TREINAMENTO CRÔNICO DE NATAÇÃO E DA
TERAPIA ESTROGÊNICA SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR
CORONARIANA E EXPRESSÃO DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES
EM RATAS OVARIECTOMIZADAS**

Erick Roberto Gonçalves Claudio

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

CENTRO BIOMÉDICO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

VITÓRIA-ES, MAIO DE 2012.

ERICK ROBERTO GONÇALVES CLAUDIO

**EFEITOS DO TREINAMENTO CRÔNICO DE NATAÇÃO E DA
TERAPIA ESTROGÊNICA SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR
CORONARIANA E EXPRESSÃO DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES
EM RATAS OVARIECTOMIZADAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro Biomédico da Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

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

VITÓRIA

2012

Claudio, Erick Roberto Gonçalves

Efeitos do treinamento crônico de natação e da terapia estrogênica sobre a reatividade vascular coronariana em ratas: papel das enzimas antioxidantes. Vitória – 2012.

71 f.

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

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Espírito Santo. Centro Biomédico. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

1. Ovariectomia. 2. Exercício Físico. 3. Terapia Estrogênica

**EFEITOS DO TREINAMENTO CRÔNICO DE NATAÇÃO E DA
TERAPIA ESTROGÊNICA SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR
CORONARIANA E EXPRESSÃO DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES
EM RATAS OVARIECTOMIZADAS**

ERICK ROBERTO GONÇALVES CLAUDIO

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

Aprovada em 17 de maio de 2012.

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a Gláucia Rodrigues de Abreu
Departamento de Ciências Fisiológicas – UFES
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Virgínia Soares Lemos
Departamento de Fisiologia e Biofísica – ICB - UFMG

Prof^o. Dr. Roger Lyrio dos Santos
Departamento de Ciências Fisiológicas - UFES

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

Vitória, Maio de 2012.

DEDICO ESTE TRABALHO

À minha esposa Adriana, a minha família, em especial a minha mãe, a todos os amigos, a todos que me apoiaram e a todos que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por estar sempre presente em nossas vidas.

À minha esposa Adriana, pelo seu amor, carinho, confiança e também pelo seu apoio incondicional em tudo.

A toda minha família, em especial minha mãe, minha irmã e meus sobrinhos, que mesmo de longe me apóiam, me incentivam e torcem por mim em todos os meus projetos.

Ao meu amigo Divanei dos Anjos Zaniqueli pelo grande incentivo ao ingresso no mestrado, por acreditar no meu potencial e pelos ótimos momentos de discussões.

A Profa. Dra. Glaucia, pela oportunidade, pelo apoio e por toda sua confiança.

Ao meu amigo e membro da banca, Prof. Dr. Roger Lyrio dos Santos por toda ajuda, paciência e conhecimento.

A todos meus amigos de laboratório, Patrick, Mariana, Cíntia, Simone, Renata, Fabrício, Prof. Dra Sônia, Walckiria e Washington pelos ótimos momentos juntos, pelo conhecimento, por toda ajuda e apoio.

A Prof. Dra. Margareth e a todos seus alunos por toda ajuda, por disponibilizar o laboratório para os experimentos e por me permitir participar das discussões dos seminários, que me acrescentaram muito.

A Prof. Dra. Nazaré e a todos os alunos do seu laboratório que também me auxiliaram em muitos momentos.

Aos alunos de iniciação científica do laboratório, Simone (agora aluna do mestrado), Michelle e Paulo, sem vocês esse trabalho não seria possível.

A Prof. Dra Virginia Soares Lemos, por me acolher gentilmente em seu laboratório para a realização dos meus experimentos, a sua aluna Josiane Fernandes da Silva pela enorme atenção, paciência e conhecimento.

A todos os meus amigos, que estão sempre torcendo por mim, mesmo que distantes.

*“O sábio não é o homem que
fornece as verdadeiras
respostas; é o que formula as
verdadeiras perguntas.”*

Claude Lévi-Strauss

SUMÁRIO

RESUMO	15
ABSTRACT	16
1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	
2.1 – Objetivo Geral.....	30
2.2 – Objetivos Específicos.....	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 – Animais Experimentais.....	31
3.2 – Grupos Experimentais.....	31
3.3 – Protocolo Experimental.....	31
3.4 – Ovariectomia.....	32
3.5 – Terapia Estrogênica.....	32
3.6 – Treinamento Físico.....	33
3.7 – Dissecção das Artérias Coronárias.....	33
3.8 – Western Blotting.....	34
3.9 – Estudos com Coração Isolado (Langendorff).....	35
3.10 – Análise Estatística.....	36
4. RESULTADOS	
4.1 – Peso Corporal e dos Órgãos.....	37
4.2 – Pressão de Perfusão Coronariana Basal.....	38

4.3 – Resposta Vasodilatadora Dependente do Endotélio.....	38
4.4 – Expressão das enzimas antioxidantes.....	39
5. DISCUSSÃO.....	47
6. REFERÊNCIAS.....	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Principais vias de formação das espécies reativas de oxigênio no sistema vascular.....	21
Figura 2 – Mecanismos de ação do E2 nas células vasculares.....	25
Figura 3 – Aparato utilizado para o treinamento de natação das ratas.....	33

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Pressão de perusão basal média (PPCm) no leito vascular coronariano.....	39
Gráfico 2 – Resposta vasodilatadora dependente do endotélio vascular a bradicinina no leito vascular coronariano.....	40
Gráfico 3 – Expressão da isoforma citosólica da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD-1) em artérias coronárias.....	41
Gráfico 4 - Expressão da isoforma mitocondrial da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD-2) em artérias coronárias.....	42
Gráfico 5 - Expressão da enzima antioxidante catalase (CAT) em artérias coronárias.....	43
Gráfico 6 – Expressão da enzima antioxidante glutiona peroxidase (GPx) em artérias coronárias.....	44
Gráfico 7 – Expressão da isoforma endotelial da enzima óxido nítrico sintase em artérias coronárias.....	45
Gráfico 8 – Expressão da isoforma induzida da enzima óxido nítrico sintase em artérias coronárias.....	46

LISTA DE ABREVIACÕES

ADMA – Arginina Dimetil Assimétrica

AKT – Proteína quinase B

Ang II – Angiotensina II

ANOVA – Análise de variância

ANP – Peptídeo Atrial Natriurético

AP-1 – Fator de transcrição proteína ativadora 1

ApoE KO – Deleção gênica para o receptor de apolipoproteína E

AT1 – Receptor da angiotensina II

BH₄ – Tetrahidrobiopterina

BK_{Ca} – Canal de potássio de alta condutância ativado por cálcio

CAT – Catalase

CMLV – Células do músculo liso vascular

CT – Colesterol Total

DAC – Doença Arterial Coronariana

DCV – Doenças Cardiovasculares

DNA – Ácido desoxirribonucleico

E2 - 17β-Estradiol

ECA – Enzima conversora de angiotensina

EDHF – Fator hiperpolarizante derivado do endotélio

EGF – Fator de crescimento epidermal

eNOS – Isoforma endotelial da enzima óxido nítrico sintase

ERE – Elemento de resposta estrogênica

EROS – Espécies reativas de Oxigênio

ERα – Receptor de estrogênio alfa

ERβ - Receptor de estrogênio beta

g – Grama

G1 – Agonista seletivo para o receptor de membrana do estrogênio GPR 30

GP – Gordura Parametrial

GPR 30 – Receptor de estrogênio de membrana acoplado a proteína G

GPx – Glutathione Peroxidase

GR – Gordura retroperitoneal

H₂O – Água

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

HERS - Heart and Estrogens/Progestin Replacement Study

HOCL – Ácido hipocloroso

ICAM – Molécula de adesão intercelular

IL-1 – Interleucina 1

IL-6 – Interleucina 6

iNOS – Isoforma induzida da enzima óxido nítrico sintase

JNK – Jun N-terminal Kinase

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

mg/g – Miligrama por grama

mmHg – Milímetros de mercúrio

NFκB – Fator de transcrição nuclear kappa B

ng – Nanograma

NO – Óxido nítrico

O₂ – Oxigênio molecular

O₂^{•-} - Ânion superóxido

OEX – Grupo treinado

OH[•] - Radical hidroxil

ONOO⁻ - Peroxinitrito

OTREX – Grupo treinado mais reposição hormonal

OTRH – Grupo tratado com reposição estrogênica

OVX – Grupo Ovariectomizado

PA – Pressão Arterial

PC – Peso corporal

PCOR – Peso do coração

PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas

pH – Potencial hidrogeniônico

PI3K – Fosfatidilinositol 3-fosfato quinase

PPCm – Pressão de perfusão coronariana média

PU – Peso uterino

PVE – Peso do ventrículo esquerdo

RL – Radical livre

RNA_m – Ácido ribonucleico mensageiro

SERMs – Moduladores seletivos de receptor de estrogênio

SHR – Ratos espontaneamente hipertensos

SOD-1 – Isoforma citosólica da enzima superóxido dismutase

SOD-2 - Isoforma mitocondrial da enzima superóxido dismutase

SOD-3 - Isoforma extracelular da enzima superóxido dismutase

TGF- β – Fator de transformação do crescimento beta

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

VCAM – Molécula de adesão de células vasculares

WHI – Women health initiative

RESUMO

As doenças cardiovasculares representam uma grande fonte de morbidade e mortalidade na maioria dos países industrializados. Em mulheres no período pós-menopausa essas doenças permanecem como a principal causa de morte. Com a diminuição na produção dos estrógenos, observa-se o aparecimento e a elevação de vários fatores que podem aumentar o risco de desenvolvimento dessas doenças. Dentre esses fatores, o estresse oxidativo tem se destacado como um importante mediador com significativa contribuição na fisiopatologia de várias doenças, como a hipertensão, a aterosclerose e a disfunção endotelial. Estudos experimentais e clínicos demonstram um aumento marcante nos biomarcadores de estresse oxidativo após a menopausa. Apesar de vários trabalhos experimentais relatarem efeitos benéficos da reposição hormonal com estrogênio (E2) na redução do risco cardiovascular, os resultados de estudos clínicos ainda estão longe de serem conclusivos sobre o uso dessa terapia como indicação exclusiva de prevenir e tratar as doenças cardiovasculares. Nesse contexto, modificações no estilo de vida se fazem necessárias, como a incorporação da prática regular de exercícios físicos. Muitos estudos têm demonstrado que o exercício físico pode influenciar positivamente sobre os principais fatores de risco cardiovascular, inclusive em mulheres na pós-menopausa. O objetivo do presente estudo é analisar os efeitos do treinamento físico crônico através da natação e da terapia estrogênica na reatividade vascular do leito coronariano de ratas ovariectomizadas, e o papel da expressão de enzimas antioxidantes nessas respostas. Os experimentos foram conduzidos com ratas ovariectomizadas, divididas aleatoriamente em cinco grupos: SHAM, ovariectomizadas (OVX), ovariectomizadas tratadas com E2 (OTRH), ovariectomizadas treinadas (OEX) e ovariectomizadas tratadas com E2 mais exercício físico (OTREX). A reposição com E2 foi feita através de injeções s.c. contendo 5 µg de 17β-Estradiol três vezes por semana. O treinamento foi conduzido através do treinamento contínuo de natação, por sessenta minutos diários e cinco vezes por semana. Tanto a terapia quanto o treinamento iniciaram-se sete dias após a ovariectomia e tiveram duração de oito semanas. Quarenta e oito horas após a última sessão de treinamento e/ou tratamento, as ratas foram sacrificadas para realização de dois protocolos distintos de análise. Para o estudo funcional com coração isolado, avaliou-se os efeitos dos tratamentos sobre a resposta vasodilatadora mediada pela bradicinina, e para a avaliação da expressão proteica das enzimas antioxidantes foi realizada a dissecação das artérias coronárias. Os resultados encontrados, demonstram que o exercício e o E2 podem influenciar positivamente sobre a composição corporal. A resposta vasodilatadora foi melhorada em todos os grupos comparados ao OVX na maior concentração (1000 ng), porém foi mais pronunciada no grupo OEX, onde foi significativamente maior nas três maiores concentrações. Em relação as enzimas antioxidantes, a SOD-1 aumentou nos três grupos experimentais em relação a OVX, a catalase aumentou somente no grupo OEX comparado ao OVX, a glutathiona peroxidase diminuiu em todos os grupos comparados ao SHAM e a expressão da enzima eNOS foi significativamente maior no grupo OEX em relação ao OTRH, enquanto que a de iNOS esteve diminuída apenas no grupo OEX comparado ao SHAM. Portanto, de acordo com os resultados desse estudo, pode-se concluir que tanto o treinamento físico quanto a reposição com E2 exercem efeitos cardioprotetores, e a prática regular do exercício pode ser uma excelente alternativa à terapia estrogênica em mulheres na pós-menopausa.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are a major source of morbidity and mortality in most industrialized countries. In women in the postmenopausal period these diseases remain the leading cause of death. With the decreased production of estrogens we can observe the appearance and the rise of many factors which could increase the risk of its development. Among these factors, the oxidative stress has been highlighted as an important mediator with significant contribution in the pathophysiology of many diseases, like hypertension, atherosclerosis and endothelial dysfunction. Experimental and clinical studies show a markedly rise in the oxidative stress biomarkers after menopause. Although many experimental works report beneficial effects of hormonal replacement with estrogen (E2) in the reduction of cardiovascular diseases risk, the results of clinical studies are so far to be conclusive about the use of this therapy as exclusive indication to prevent and treat cardiovascular diseases. In this context, lifestyle modifications are necessary, as the incorporation of regular physical activity. Many studies have demonstrated that physical training can positively influence on the main cardiovascular risk factors, including in postmenopausal women. The aim of this study is to analyze the effects of chronic physical training through swimming and the estrogen therapy in the vascular reactivity of coronary bed of ovariectomized rats, and the role of antioxidant enzymes expression in these responses. The female rats were divided in five groups following ovariectomy: SHAM, ovariectomized (OVX), ovariectomized treated with E2 (OTRH), Ovariectomized trained (OEX) and ovariectomized treated with E2 plus exercise (OTREX). E2 replacement was performed by injection s.c. containing 5 µg of 17β-Estradiol, three times a week. The training was conducted by continuous swimming training, sixty minutes daily and five times per week. Both training and therapy started seven days after ovariectomy and lasted eight weeks. Forty eight hours after the last treatment and/or training session, the animals were sacrificed to carry out two different protocols of analysis. For the functional study with isolated hearts we evaluated the effects of treatments on bradykinin-mediated dilation, and for the assessment of antioxidant enzymes expression was performed dissection of the coronary arteries. The results demonstrated that both exercise and E2 can modulate the body composition. The endothelium-dependent vasodilator response was improved in all groups compared to OVX in the highest concentration (1000 ng), however, it was more pronounced in the OEX group which was significantly higher in the three highest concentrations. In relation to antioxidant enzymes, SOD-1 increased in the three experimental groups compared to OVX. Catalase was increased only in the OEX group compared to OVX and glutathione peroxidase decreased in all groups compared to SHAM. The eNOS expression was significantly higher in the OEX group in relation to OTRH, while iNOS was decreased in this same group compared to SHAM. Thus, according to the results of the present study, we can conclude that both training and E2 treatment may play a role in the cardioprotection and the practice of physical training can be a feasible alternative in relation to estrogen therapy in post-menopausal women.

1- INTRODUÇÃO

Atualmente, as doenças cardiovasculares (DCV) representam a principal causa de morbidade e mortalidade, bem como uma grande fonte de incapacidade na maioria dos países industrializados (Merikli et al, 2003; Xu et al, 2004). Neste contexto, a doença arterial coronariana (DAC) é a principal responsável pelas mortes relacionadas as DCV entre mulheres (Maturana et al, 2007).

De acordo com a I Diretriz Brasileira sobre Prevenção de Doenças Cardiovasculares em Mulheres Climatéricas da Sociedade Brasileira de Cardiologia (2008), apesar de a maior preocupação nas mulheres após a menopausa em termos de mortalidade ser o câncer de mama, sabe-se que no Brasil, as doenças cardiovasculares ainda representam a principal causa de morte, com índices em torno de 53% comparados aos 4% atribuídos ao câncer de mama.

A menopausa, que ocorre em média em torno dos 50 anos de idade, é definida pela Organização Mundial de Saúde, como a cessação permanente da menstruação, como resultado da perda da função folicular ovariana ou da remoção cirúrgica dos ovários (ooforectomia), que resulta em uma queda abrupta nos níveis de estrógenos (Maturana et al, 2007; Sánchez-Rodríguez, 2012). Em decorrência dessas alterações, estudos observacionais e experimentais relatam uma variedade de efeitos adversos para o organismo feminino que são ocasionados pela deficiência dos estrógenos, principalmente o 17β -Estradiol (E2). Dentre eles, os principais incluem sintomas vasomotores (fogachos), atrofia urogenital, declínio cognitivo, diminuição do condicionamento físico aeróbio, força muscular e densidade mineral óssea, aumento do peso corporal e o risco de desenvolvimento de doenças crônicas degenerativas, como o diabetes do tipo II, a osteoporose e a doença de Alzheimer (Spritzer e Wender, 2007; Irigoyen et al, 2005), além do aumento dos biomarcadores para DAC como a proteína C-reativa, citocinas inflamatórias e dos biomarcadores de estresse oxidativo (Reckelhoff, 2006).

De maneira geral, as mulheres têm uma expectativa de vida média maior comparada a à média masculina (White, 2002). Uma das possíveis razões para essa discrepância parte da observação de que as mulheres no período fértil tem baixo risco e incidência de DCV , bem como relativa cardioproteção quando comparado

aos homens da mesma idade (Florian et al, 2004; Kang et al, 2011; Vassale et al, 2009; White, 2002). No entanto, essa proteção é gradualmente perdida após a menopausa, igualando ou excedendo os riscos observado nos homens (White, 2002; Kang et al, 2011).

Apesar do período da menopausa coincidir com um momento em que as mulheres se encontram em idade mais avançada, o qual já se constitui como um fator de risco para DCV, existem inúmeras evidências na literatura, de que as diferenças entre os gêneros e entre os períodos pré e pós-menopausa estejam relacionados principalmente aos hormônios sexuais, particularmente ao E2. Essa suposição ocorre devido a observação de que biomarcadores importantes para o risco cardiovascular estão aumentados mesmo em mulheres jovens que foram submetidas a ooforectomia bilateral.

Analisando essa questão, Verhoeven et al (2009) estudaram alguns dos parâmetros séricos para o risco de DAC em mulheres que se encontram na menopausa fisiológica, e as que foram submetidas à ooforectomia bilateral. Os autores verificaram que as concentrações de dimetilarginina assimétrica (ADMA), um inibidor endógeno da óxido nítrico sintase, da leptina, da homocisteína, do colesterol total (CT) e de sua fração de baixa densidade (LDL), estavam aumentados de maneira similar por ambos os tipos de menopausa.

Dentre os principais fatores que aumentam o risco para DCV após a menopausa, as espécies reativas de oxigênio (EROS) é um dos que estão em evidência nos últimos tempos, visto que, várias condições fisiopatológicas são associadas ao aumento na produção dessas espécies. Em um estudo recente, Sanchez-Rodriguez et al (2012) associaram o aumento da produção das EROS com a depleção estrogênica em mulheres, e, concluíram que a menopausa é um fator de risco para o estresse oxidativo e conseqüentemente, para o desenvolvimento de DCV.

Em estudos experimentais realizados com ratas ovariectomizadas (OVX), que são utilizadas como modelo de menopausa, observa-se que a diminuição na concentração de E2 pode reduzir a biodisponibilidade de um importante fator vasodilatador, o óxido nítrico (NO). A redução na produção dessa molécula pode gerar uma série de efeitos deletérios sobre o sistema vascular. Kang et al (2011),

demonstraram, em arteríolas coronarianas de ratas OVX e com idade avançada, uma diminuição na vasodilatação dependente do endotélio induzida por fluxo com redução na produção de NO. Esse efeito foi associado a uma redução na expressão da enzima antioxidante superóxido dismutase citosólica (SOD-1), e consequente aumento no estresse oxidativo.

Wassman et al (2001) verificou na aorta de ratas OVX espontaneamente hipertensas (SHR), que a deficiência estrogênica aumentou a produção de EROS, com um aumento na vasoconstrição induzida por angiotensina II (AngII). Observações similares foram feitas no estudo de Yung et al (2011), com ratas normotensas, na qual a OVX aumentou a expressão da enzima conversora de angiotensina (ECA), aumentou na produção de AngII na aorta e também dos receptores AT₁ da angiotensina II, paralelamente a um aumento na expressão das subunidades gp91phox e p22phox da NAD(P)H oxidase, ocasionando dano celular oxidativo, indicado pelo aumento do conteúdo de nitrotirosina.

Como consequência dessas alterações, houve um aumento na vasoconstrição induzida por AngII e piora na vasodilatação dependente de NO, ocasionada possivelmente por disfunção endotelial. Esse fenômeno se refere a um estado fisiopatológico no qual as funções homeostáticas das células endoteliais estão alteradas promovendo vasoespasmo, trombose, aumento na camada íntima vascular e inflamação (Nedeljkovic et al, 2003), resultando em prejuízo na vasodilatação dependente do endotélio, principalmente pela diminuição na biodisponibilidade de NO, e portanto, é considerado um fator chave para o desenvolvimento de DCV (Frey et al, 2009).

Portanto, através dos resultados dos estudos mencionados acima, pode-se reforçar que a deficiência estrogênica é um fator de grande importância para o aumento no risco cardiovascular observado após a menopausa, e o estresse oxidativo provavelmente exerce um papel de grande importância nesse processo.

As EROS são produzidas naturalmente no organismo através de processos metabólicos oxidativos (Schneider e Oliveira, 2004), e exercem influencia sobre vários processos fisiológicos como no sistema de defesa imunológico, inflamação,

biossíntese hormonal, fertilização, sinalização celular, entre outros (Paravicini e Touyz, 2008; Elahi et al, 2009).

Essas espécies são compostos químicos que compreendem dois principais grupos. Um deles são os radicais livres (RL), como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxil (OH^{\cdot}), radicais lipídicos (ROO^{\cdot}) e o óxido nítrico (NO), sendo definido como qualquer espécie capaz de existência independente (por isso chamado de “livre”) que contém um ou mais elétrons desemparelhados, que o torna altamente instável e reativo (Halliwell, 2006). O outro grupo, é composto pelos derivados de oxigênio não radicais, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) e o ácido hipocloroso (HOCL), que são menos reativos, mais estáveis e com meia-vida maior do que os RL, porém, possuem efeitos oxidantes e contribuem para o estresse oxidativo (Elahi et al, 2009; Paravicini e Touyz, 2008)

A espécie precursora, o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), pode ser gerada por diversas fontes a partir do oxigênio molecular, que incluem a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, as enzimas xantina oxidase, óxido nítrico sintase desacoplada, ciclooxigenase e lipoxigenase, citocromo p450, NAD(P)H oxidase, mieloperoxidase e hemoproteínas (Cai e Harrison, 2000; Elahi, 2009; Frey et al, 2009).

O $O_2^{\cdot-}$ pode ser convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) espontaneamente em baixo pH, ou pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD), formar peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) quando reage com NO, e pode também formar o RL com maior reatividade nos sistemas biológicos, o radical hidroxil (OH^{\cdot}) através da reação de Haber-Weiss quando reage com H_2O_2 . O H_2O_2 , através da reação descrita por Fenton, ainda pode formar OH^{\cdot} quando reage com metais de transição, geralmente ferro ou cobre (Schneider e Oliveira, 2004; Frey et al, 2009).

Nas células vasculares, a principal fonte de EROS é o sistema da NAD(P)H oxidase (Elahi et al, 2009; Frey et al, 2009). Esse sistema cataliza a redução do oxigênio molecular utilizando NADH ou NADPH como doadores de elétrons, sendo nessas células uma fonte constitutiva de superóxido (Nedeljkovic et al, 2003). Os principais estímulos para sua ativação são os fatores de crescimento (PDGF, EGF, TGF- β), citocinas (TNF- α , IL-1), fatores mecânicos (shear stress), fatores metabólicos (hiperglicemia, hiperinsulinemia, etc), hipóxia, agonistas acoplados a proteína G

(serotonina, bradicinina, endotelina), além da angiotensina II através do receptor AT_1 que é um importante e potente regulador (Paravicini e Touyz, 2008; Frey et al, 2009).

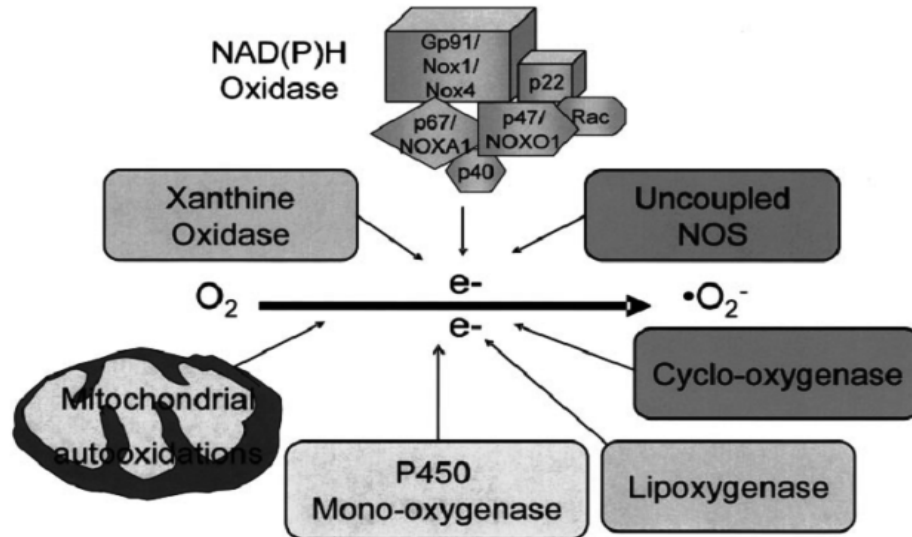


Figura 1: Principais vias de formação das EROS no sistema vascular. Extraído de Paravicini e Touyz (2008).

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre os sistemas pró e antioxidantes, de maneira que o primeiro predomine, gerando toxicidade celular pela formação excessiva de EROS (Halliwell, 2006; Schneider e Oliveira, 2004). Esse fenômeno resulta em vários processos danosos à célula, oxidando macromoléculas como o DNA, proteínas, carboidratos e lipídeos de membrana, podendo levar a diversas alterações na função celular (Cai e Harrison, 2000), e ainda é considerado um mecanismo chave na patogênese da aterosclerose, promovendo a disfunção endotelial, a proliferação e apoptose das células do músculo liso vascular (CMLV) e, supostamente, a desestabilização das placas ateroscleróticas (Strehlow et al, 2003).

Na doença vascular, o estresse oxidativo contribui de maneira marcante para a disfunção endotelial de maneira que há uma diminuição da biodisponibilidade do NO tanto pela sua inativação oxidativa pelo O_2^\cdot (formando $ONOO^-$) quanto pelo desacoplamento da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), que no lugar do NO passa a produzir O_2^\cdot contribuindo para o aumento do estresse oxidativo (Fostermann, 2010). Ainda, também foi evidenciado que essas espécies exercem

funções como sinalizadores intracelular, o qual são responsáveis pela indução do fatores de transcrição, como o fator de transcrição nuclear kappa B (NFkB) e AP-1. O NFkB é expresso em células endoteliais e nas CMLV e sua atividade é regulada de maneira redox-sensível mediada principalmente por H_2O_2 (Frey et al, 2009; Ungvari et al, 2007). Sua ativação induz a transcrição de uma variedade de genes responsáveis pela inflamação vascular, como das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6) e moléculas de adesão celular (ICAM e VCAM), portanto, sua estimulação crônica pode predispor à aterosclerose (Ungvari et al, 2007).

O $ONOO^-$, além de diminuir diretamente a biodisponibilidade de NO, pode contribuir para a fisiopatologia vascular através do aumento da expressão de moléculas de adesão e quebra do glicocálice endotelial, aumentando a adesão de neutrófilos, inibindo canais de potássio voltagem dependente e ativado por cálcio em arteríolas coronárias, inibindo a prostaciclina sintase vascular, e, dependendo do ambiente celular, estimulando ou inibindo a agregação plaquetária, além de mediar a oxidação de cofatores, como a tetrahydrobiopterina, que é a principal causa de desacoplamento da eNOS (Pacher et al, 2007). A reação entre $O_2^{\cdot-}$ e NO ocorre a uma velocidade extremamente rápida de $6.7 \times 10^9 \text{ mol/l}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, sendo cerca de três vezes mais rápida que a velocidade de reação com a SOD (Cai e Harrison, 2000), demonstrando que para a manutenção do equilíbrio nas concentrações de EROS, é necessário manter também o equilíbrio do sistema antioxidante, a fim de se evitar o estresse oxidativo e os danos consequentes à célula.

Os mecanismos celulares antioxidantes podem ser divididos em enzimático e não-enzimático. As principais enzimas antioxidantes vascular, dentre outras, são a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) (Paravicini e Touyz, 2008).

Em mamíferos, três isoformas da SOD foram identificadas: a citoplasmática CuZn-SOD (SOD-1), a mitocôndrial Mn-SOD (SOD-2) e a extracelular CuZn-SOD (SOD-3 ou ecSOD). Essas três isoformas catalizam a mesma reação, a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 , que posteriormente é convertido em H_2O e O_2 pelas enzimas peroxidases CAT e GPX. Portanto, essas enzimas evitam o acúmulo de $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 na célula, prevenindo a formação do OH^{\cdot} contra o qual não existe um sistema enzimático de defesa (Schneider e Oliveira, 2004).

O sistema não-enzimático compreende moléculas sintetizadas endógenamente como a bilirrubina, ceruloplasmina, hormônios sexuais, melatonina, coenzima Q, ácido úrico, além de outras que são ingeridas através da dieta ou pela suplementação, como o ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno (precursor da vitamina A) e grupos fenólicos de plantas (flavonóides) (Schneider e Oliveira, 2004).

Dentre os hormônios sexuais, os estrógenos também são considerados como compostos antioxidantes, desde que a presença de um anel fenólico na posição A de suas estruturas química, permite a esses hormônios atuarem como scavenger de radicais livres e prevenir o dano oxidativo (Sanchez-Rodriguez et al, 2012).

As ações biológicas dos estrógenos, cujo mais potente é o 17β -estradiol (E2), são mediadas por duas isoformas distintas de receptores nucleares (ER α e ER β) que são amplamente distribuídos nos tecidos, incluindo o sistema cardiovascular (Bolego et al, 2006). Na parede vascular, os ERs são expressos em todos seus componentes, no endotélio, nas CMLV e na camada adventícia (Ross et al, 2008). Esses receptores são definidos como fatores de transcrição ativados por ligantes e sua ligação com o E2 resulta em sua translocação para o núcleo, dimerização e recrutamento de cofatores, alterando a transcrição de genes (Murphy, 2011). Sua atividade transcricional ocorre diretamente através da ligação no DNA com elementos específicos de resposta estrogênica (ERE), indiretamente por alterar a atividade de outros fatores de transcrição (ex. AP-1, NF κ B), ou de maneira independente do ligante (ex. fatores de crescimento), mediante fosforilação em resíduos específicos de serina. (Bolego et al, 2006; Murphy, 2011).

Esses receptores ainda exercem funções não genômicas quando associados à membrana plasmática, como por exemplo, o ER α pode sofrer palmitoilação no resíduo de cisteína 447, que leva a sua associação com a caveolina (Murphy, 2011).

Mais recentemente, foi identificado um receptor de membrana acoplado à proteína G (GPR 30), com alta afinidade pelo estrogênio (Deschamps e Murphy, 2009). Verificou-se que, esse receptor é expresso em todos os tecidos responsáveis pela regulação integral do sistema cardiovascular, incluindo o endotélio e as células do músculo liso vascular (Lindsey e Chappell, 2011). Estudos avaliando o papel

vascular desse receptor verificaram que, a infusão de um agonista seletivo para GPR30 (G1) causa vasodilatação em anéis de artéria coronária epicárdica de porcos (Meyer et al, 2010). Em ratos normotensos, esse agonista causou a diminuição da pressão arterial (PA), assim como, vasodilatação em artérias mesentéricas pré-contráidas de ratos e artéria mamaria interna humana (Haas et al, 2009). Um dos mecanismos associados a vasodilatação é descrito por Yu et al (2011), que verificaram que a estimulação desse receptor diretamente sobre o músculo liso vascular causa a abertura de canais de potássio de alta condutância estimulados por Ca^{2+} (BK_{Ca}). Além disso, observou-se ainda um aumento significativo de gordura visceral em camundongos com deleção gênica para esse receptor (Haas et al, 2009), sugerindo que esses receptores possuem um papel importante na regulação da PA, no controle do tônus vascular e também na obesidade quando estimulado por E2. A figura 2 demonstra as principais vias de sinalização intracelular genômica e não-genômica dos receptores de estrogênio.

A expressão vascular desses receptores parece ser regulada diferencialmente tanto pela concentração plasmática do hormônio (E2), assim como por estados patológicos.

Pinna et al (2008), observaram que após a ovariectomia ocorre uma diminuição na expressão de $ER\alpha$, reestabelecida com a reposição de E2, assim como, foi observado por Gavin et al (2009) em células endoteliais de mulheres saudáveis após a menopausa. Nesse estudo, os autores compararam também a expressão desse receptor em diferentes fases do ciclo menstrual, que se relacionou diretamente com o período do ciclo com maior concentração de E2, na fase ovulatória tardia. Em estudo com cultura de célula endotelial de ovinos, a expressão de $ER\alpha$ aumentou significativamente após longo período de incubação (6 horas) com E2, em contraste ao $ER\beta$ que teve sua expressão diminuída, sugerindo que as isoformas são reguladas diferencialmente pelo hormônio, e seu padrão de expressão é responsável pela modificação das ações do mesmo sobre o endotélio vascular (Ihionkhan et al, 2002).

A presença de doenças vasculares também é outro fator que pode alterar de maneira considerável a expressão dos ER na parede vascular. Nakamura et al (2004) encontraram uma redução significativa na expressão de RNAm dos dois

subtipos de ER na aorta de mulheres em estágio avançado de doença aterosclerótica comparadas com mulheres em estágio moderado, indicando que o dano da parede arterial pode também danificar e regular para baixo os ER na pós menopausa. Em artéria aorta de ratas fêmeas hipertensas, foi verificado uma leve redução, que não foi estatisticamente significativa, na expressão de ambos os receptores nos animais mais velhos, sugerindo que talvez não seja somente a quantidade do receptor que esteja alterada nessa condição, mas também o mecanismo de sinalização pós-receptor (Wynne et al, 2004).

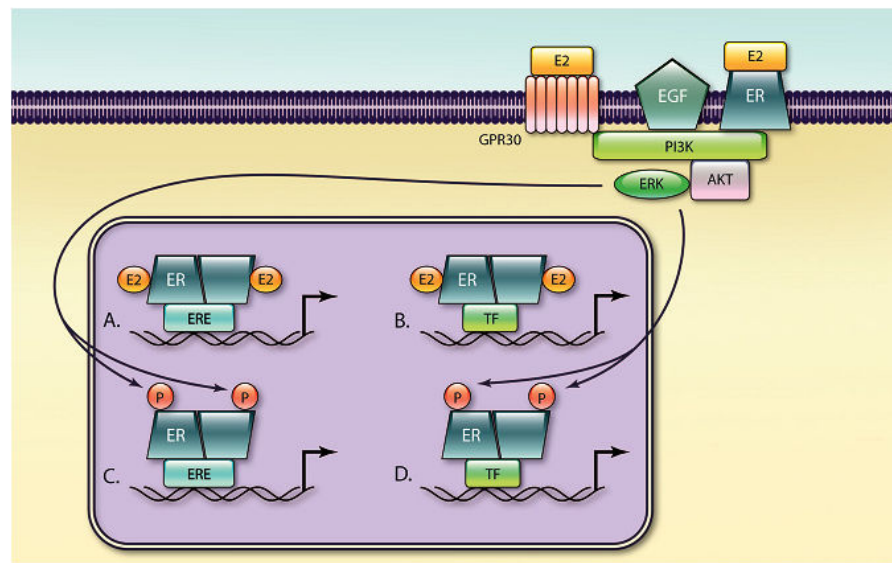


Figura 2: Mecanismo de ação celular genômico promovido pelos receptores de estrogênio: Após sua ligação com E2 e translocação para o núcleo, ER forma um dímero resultando no recrutamento de coreguladores (não demonstrado) e se liga aos elementos de resposta estrogênica (ERE) no DNA **(A)**, ou com outros fatores de transcrição (TF) - **(B)**. ER pode ser ativado também de maneira independente do ligante, através da sinalização dos receptores de membrana e de fatores de crescimento que são acoplados a enzimas quinase **(C e D)**. Extraído de Murphy (2011).

Embora ainda não se tenha elucidado completamente os mecanismos de ação dos seus receptores e sua regulação sobre o sistema cardiovascular, o fato é que verifica-se em diversos estudos, que o E2 pode exercer vários benefícios para o sistema cardiovascular.

Foi demonstrado que o tratamento com E2 pode prevenir o aumento da pressão arterial de ratas normotensas (Hernandez et al, 2000) e hipertensas (Silva-Antonialli et al, 2004), regular o tônus vascular coronariano (Santos et al, 2004), melhorar a

vasodilatação dependente do endotélio mediada por fluxo (LeBlanc et al, 2009; Kang et al, 2011) e a resposta vasodilatadora aguda induzida pela bradicinina em artéria coronária isolada de humanos (Barton et al, 1998), melhorar o perfil lipídico (Weigt et al 2012), prevenir o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas em camundongos com deleção gênica para o receptor de apolipoproteína E (ApoE KO) (Elhage et al, 1996; Bourassa et al, 1997), diminuir a produção de endotelina-1 em células endoteliais humanas (Wingrove e Stevenson, 1997; Bilsel et al, 2000), de citocinas pró-inflamatórias (Ray et al, 1997; Arenas et al, 2006), assim como, a expressão do receptor AT₁ da angiotensina II (Silva-Antonialli et al, 2004), que é um potente regulador da NAD(P)H oxidase.

O aumento na produção de NO é, provavelmente, o principal fator responsável pelos benefícios cardiovasculares do E2, uma vez que esses hormônios são conhecidos por aumentar a expressão da eNOS e também por ativar agudamente a sinalização da via da fosfatidil inositol 3-quinase (PI3K), levando a fosforilação e ativação dessa enzima (Murphy, 2011). De fato, a grande maioria dos trabalhos que avaliaram os efeitos do tratamento crônico com E2 ou com moduladores seletivos de receptores de estrogênio (SERMs), ou ainda, que avaliaram os efeitos agudos do E2 e de seus agonistas seletivos, relataram melhora da vasodilatação dependente do endotélio, com conseqüente aumento na produção de NO (Hernandez et al, 2000; Bolego et al, 2005; LeBlanc et al, 2009; Kang et al, 2011; Moraes et al, 2011) .

Os estrógenos podem ainda aumentar a biodisponibilidade de NO sem aumentar a expressão e/ou atividade da eNOS, mediante suas propriedades antioxidantes. Nessa linha, estudos demonstraram que o E2 pode regular a expressão gênica de enzimas antioxidantes. O estudo de Kang et al (2011), mostrou em arteríolas coronarianas que o tratamento com E2 aumentou a expressão da SOD-1, porém, não exerceu qualquer efeito sobre a expressão da catalase. Strehlow et al (2003) demonstraram *in vivo* e *in vitro* que o E2 pode aumentar a expressão proteica e do RNAm das isoformas da enzima superóxido dismutase mitocondrial e extracelular (SOD-2 e 3 respectivamente), além da atividade dessa enzima.

Conforme exposto acima, pode-se verificar que vários estudos experimentais demonstram que o E2 pode influenciar positivamente a saúde cardiovascular. Porém, os resultados dos grandes estudos clínicos como o *Women Health Initiative*

(WHI) e o *Heart and Estrogens/Progestin Replacement Study* (HERS), que avaliaram no âmbito da prevenção primária e secundária respectivamente, desapontaram em não demonstrar benefícios da terapia de reposição hormonal sobre os eventos cardiovasculares (Bolego et al, 2006). Contudo, deve-se deixar claro que esses estudos tiveram uma série de limitações metodológicas, e seus resultados devem ser interpretados com cautela. Portanto, muitos estudos ainda deverão ser conduzidos a fim de se elucidar completamente o papel desses hormônios sobre a saúde cardiovascular.

Nesse contexto, modificações no estilo de vida e inclusão de hábitos saudáveis como dieta balanceada e a prática regular de exercícios físicos se fazem necessário para diminuir o risco de doenças cardiovasculares na mulher após a menopausa.

A prática sistemática da atividade física está associada a inúmeros benefícios ao sistema cardiovascular. Tem sido bem estabelecido que as pessoas que praticam exercícios físicos aeróbicos regularmente se beneficiam de baixo risco cardiovascular e melhor qualidade de vida do que aqueles que são sedentários (Souza-Rabbo et al, 2004). O exercício pode também influenciar positivamente os mais diversos fatores de risco para doenças cardiovasculares, como a hipertensão, diabetes mellitus, obesidade, hiperlipidemia e disfunção endotelial (Okabe et al, 2007), portanto, a atividade física é recomendada não somente para fins preventivos, mas também como um agente terapêutico, associada ou não à terapia farmacológica (Zanesco e Zaros, 2009).

Um dos efeitos benéficos do exercício consiste em sua eficiência em modificar positivamente a composição corporal. Estudos clínicos e experimentais, inclusive em condições de deficiência estrogênica, relatam que o exercício é capaz de prevenir o ganho excessivo de gordura, assim como, alterar o seu padrão de distribuição (Genazzani e Gambacciani, 2006; Velthuis et al, 2009).

Em estudos com ratas OVX, tanto o exercício físico aeróbio (Pighon et al, 2011), como o exercício resistido (Corriveau et al, 2008) praticados de maneira crônica, foram capazes de reduzir a gordura visceral associados com uma diminuição na expressão de enzimas lipogênicas e de marcadores inflamatórios, semelhante aos resultados da terapia estrogênica, podendo-se concluir que o exercício pode exercer efeitos estrogênicos quando esse está diminuído.

Além da composição corporal, estudos conduzidos com ratos hipertensos, demonstram que o exercício pode reduzir a pressão arterial (PA) sistêmica. Em ratos SHR, Rossoni et al (2011) demonstraram que o treinamento de baixa intensidade foi suficiente em promover a redução da PA e da frequência cardíaca, associado com a reversão de fatores associados a hipertensão como a hipertrofia ventricular esquerda e a fração de colágeno miocárdico. Endlich et al (2011), verificaram que a PA de ratos SHR diminuiu em resposta tanto ao treinamento de corrida quanto ao de natação, esse, que no entanto, é associado a um aumento na concentração plasmática do peptídeo atrial natriurético.

O exercício físico crônico ainda reduz a severidade de lesões ateroscleróticas em camundongos com deleção do gene para a apolipoproteína E (ApoE KO) por melhorar o sistema antioxidante e aumentar a produção de NO (Shimada et al, 2007; Okabe et al, 2007), aumenta o fluxo sanguíneo coronariano e sua densidade capilar (Roque et al, 2011) e suprime a inflamação subclínica (Brandt e Pedersen, 2010). Em ratas OVX, o treinamento físico foi capaz de reverter a rigidez arterial, reduzir os níveis vasculares de endotelina-1 e prevenir a diminuição de NO (Park et al, 2008). Em humanos, o exercício modificou o perfil inflamatório de pacientes com DAC para um perfil antiinflamatório (Goldhammer et al, 2005) e reduziu os níveis de glicose, colesterol LDL e marcadores específicos de estresse oxidativo em mulheres na menopausa (Karolkiewicz et al, 2009).

Muitos são os relatos sobre os efeitos benéficos da prática regular do exercício físico sobre os principais fatores de risco responsáveis pelo desenvolvimento de DCV, assim como, são os trabalhos experimentais que avaliaram a terapia estrogênica. No entanto, ainda são poucos os estudos conduzidos no sentido de avaliar os efeitos vasculares do exercício físico em condição de deficiência estrogênica, como no período pós-menopausal. Assim sendo, ainda não temos conhecimento de um estudo que avaliou os efeitos crônicos do exercício físico sobre a circulação coronariana de ratas OVX.

A hipótese do presente estudo é que o exercício físico praticado de maneira crônica, possa prevenir a disfunção endotelial que é observado em a ratas OVX e melhorar a reatividade vascular coronariana, da mesma maneira que é observado nos estudos com reposição de E2. Como em estudos com outros modelos relatam que o

exercício físico pode atuar melhorando o sistema antioxidante, acreditamos que esse seja um dos possíveis mecanismos responsáveis pela melhora da reatividade vascular.

Ademais, analisar as respostas adaptativas ao exercício físico pode contribuir para que esse se justifique como uma importante alternativa terapêutica contra as alterações cardiovasculares que são geradas com a diminuição na produção desses hormônios. Levando em consideração que a expectativa de vida hoje é maior, e que as mulheres passam cerca de um terço de suas vidas nesse período, estudos nessa direção visam colaborar para que essa população envelheça com qualidade de vida.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral

Analisar os efeitos do treinamento físico crônico com natação e da terapia estrogênica sobre a reatividade vascular no leito coronariano de ratas ovariectomizadas e o papel da expressão das enzimas antioxidantes.

2.2- Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos do treinamento físico e da terapia estrogênica sobre o peso e a composição corporal de ratas ovariectomizadas;
- Avaliar os efeitos do treinamento físico e da terapia estrogênica sobre a reatividade vascular coronariana endotélio-dependente;
- Analisar os efeitos do treinamento físico e da terapia estrogênica sobre a expressão das enzimas antioxidantes (SOD-1, SOD-2, Catalase e Glutathione Peroxidase) em artérias coronárias de ratas ovariectomizadas;
- Analisar os efeitos do treinamento físico e da terapia estrogênica sobre a expressão das isoformas endotelial e induzida da óxido nítrico sintase (eNOS e iNOS).

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Animais Experimentais

Foram utilizadas para esse trabalho 120 ratas fêmeas Wistar (*Rattus Norvegicus Albinus*), com 8 semanas de idade e peso corporal entre 225 e 240 gramas. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Animais do Centro Biomédico da UFES sob parecer número 024/2011.

Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (n=5), com livre acesso à água e ração (Purina Labina), sob condições de temperatura (22-24°C), e umidade (40-60%) controladas. O ciclo de luz foi regulado para períodos de 12/12 horas alternando entre claro e escuro.

3.2- Grupos Experimentais

Foram realizados dois estudos separados. Para os dois estudos, os animais passaram exatamente pelos mesmos procedimentos durante o mesmo período de tempo. No entanto, os animais do primeiro estudo foram utilizados para a coleta das artérias coronárias (dissecção) para a análise molecular (expressão das enzimas), e do segundo, para o estudo funcional com coração isolado. Após o procedimento cirúrgico, os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos:

- 1- SHAM
- 2- Ovariectomizadas (OVX)
- 3- Ovariectomizadas tratadas com E2 (OTRH)
- 4- Ovariectomizadas tratadas com E2 e exercício físico (OTREX)
- 5- Ovariectomizadas e exercício físico (OEX)

3.3- Protocolo Experimental

- Ovariectomia.

- Recuperação da cirurgia (7 dias).
- Período de adaptação ao treinamento (5 dias).
- Treinamento físico (natação) durante 8 semanas e/ou terapia de reposição estrogênica.
- Sacrifício dos animais para dissecação das artérias coronárias ou para estudo funcional (coração isolado), quarenta e oito horas após a última sessão de treinamento e/ou tratamento (E2).

3.4- Ovariectomia

Após anestesia com ketamina (70 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) as ratas foram submetidas a uma incisão de aproximadamente 1,5 cm na pele entre o último rebordo costal e a coxa, a um centímetro da linha mediana, seguida de uma incisão na camada muscular, tendo a cavidade peritoneal aberta para remoção dos ovários e ligadura da trompa uterina em ambos os lados. Após o procedimento foi feita a sutura da musculatura e da pele. O grupo SHAM foi submetido a uma cirurgia fictícia. Ao final do procedimento, os animais receberam uma injeção de antibiótico (Enrofloxacina - 2,5% - 0,1 mL – *i.m.*). Todas as ratas foram submetidas à cirurgia na mesma época, nos seus respectivos estudos e iniciaram o treinamento físico e a terapia estrogênica sete dias após o procedimento cirúrgico. Para comprovação do sucesso da cirurgia, após o sacrifício, o útero foi retirado e pesado úmido.

3.5- Terapia Estrogênica

A terapia de reposição estrogênica foi feita através de injeções subcutânea com volume de 0,1 ml contendo 5 µg de 17β estradiol-3-benzoato (Sigma, St. Louis, MO) diluído em óleo de milho, como descrito previamente por Saengsirisuwan et al (2009). Os animais que não fizeram a TRH tiveram o mesmo volume injetado contendo somente óleo de milho.

3.6- Treinamento Físico (Natação)

Para a execução do protocolo de exercício físico das ratas através da natação, foi montado um aparato especialmente projetado para esse tipo de treinamento (figura 3). O aparato consiste de um tanque de vidro com 1,8 m de comprimento, 0,7m de altura (a profundidade da água foi mantida em torno de 0,6 m) e 0,6 m de largura, dividido em seis raias, cada uma com 0,3 m comprimento, que ainda conta com um sistema de filtragem e aquecimento da água, permitindo que a mesma seja mantida limpa e sob temperatura constante de 32 ± 1 °C.

O protocolo de treinamento foi realizado por um período de 8 semanas, no qual os animais treinaram cinco dias consecutivos com intervalo de dois dias para repouso. O treinamento foi iniciado sete dias após a ovariectomia. A primeira semana foi dedicado ao período de adaptação ao treinamento, conforme protocolo descrito por Kuru et al (2009), com o tempo inicial de 10 minutos no primeiro dia, até os animais nadarem continuamente por 60 minutos no quinto dia até o final do período de treinamento.



Figura 3: Aparato utilizado para o treinamento de natação das ratas.

3.7- Dissecção das artérias coronárias

Quarenta e oito horas após o término da última sessão de treinamento, as ratas foram sacrificadas por decapitação. O tórax foi aberto e o coração retirado e mantido em solução de Krebs Henseleit (em mmol/L: 115 NaCl, 25 NaHCO₃, 4,7 KCl, 1,2

MgSO₄.7H₂O, 2,5 CaCl₂, 1,2 KH₂PO₄, 5,5 glicose e 0,01 Na₂EDTA) a pH 7.4 durante o procedimento de dissecação. O ramo descendente anterior da artéria coronária esquerda e o ramo septal foram isolados com o auxílio de um microscópio de dissecação e congelados rapidamente em nitrogênio líquido e, posteriormente, estocado a -80 °C até a análise.

3.8- Western Blotting

A análise da expressão proteica foi determinada através do método de Western Blotting. Para as dosagens, foi feito um “pool” de 3 animais (n=1), que em cada grupo tiveram um n conforme segue: SHAM=3; OVX=4; OTRH=4; OTREX=4 e OEX=5. As amostras foram, posteriormente, homogeneizadas em tampão de lise contendo (em mmol/l) 150 NaCl, 50 Tris-HCl, 5 EDTA.2Na, 1 MgCl₂ mais inibidor de protease (Sigma Fast; Sigma). A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry et al (1951) utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. Depois, foi pipetado um volume contendo 50 µg de proteína das amostras, que foram submetidas à eletroforese (1:30 h a 100V) em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 10% e transferidas a uma membrana de nitrocelulose (1:40 h a 100V) em um sistema de blotting úmido. Após a transferência, foi realizado o bloqueio na membrana em tampão TBS-T contendo 5% de BSA overnight a 4°C, e em seguida lavada três vezes com TBS por 10 minutos cada. As membranas foram incubadas overnight com os anticorpos primários policlonal anti-goat para SOD-1 (1:2500-Sigma), policlonal anti-goat para SOD-2 (1:2000-Sigma), monoclonal anti-mouse para Catalase (1:2000-Sigma), policlonal anti-rabbit para GPx (1:1500-Santa Cruz Biotechnology), monoclonal anti-mouse para eNOS (1:1500-BD) e iNOS (1:1500-BD) e policlonal anti-mouse para β-actina (1:1500-Santa Cruz Biotechnology), proteína utilizada como padrão. Posteriormente, as membranas foram lavadas novamente com TBS, e depois incubadas por 2:30 h com o respectivo anticorpo secundário. A revelação foi realizada em uma câmara escura, adicionando na membrana o substrato (Luminata HRP Substrate-Millipore) para a enzima conjugada ao anticorpo secundário (peroxidase), que quando reage com seu substrato produz luminescência que é transferida a um filme de raio X. A análise da densidade das proteínas foram realizadas através do software ImageJ (National Institute of Health).

3.9- Estudo com coração isolado (Método de Langendorff Modificado)

Para o estudo da Pressão de Perfusão Coronariana (PPCm) basal, e a resposta vasodilatadora a bradicinina, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (40 mg/kg, *i.p.*), e sacrificados por decapitação. O tórax foi aberto, o coração dissecado de suas conexões e imediatamente transferido para o aparelho de perfusão através da canulação da aorta, no nível de sua curvatura. A perfusão retrógrada foi realizada pelo método de Langendorff modificado (Hugo Sachs Electronics, March-Hugstetten, Alemanha) sendo utilizada uma solução nutritora composta de NaCl, 120mM; CaCl₂ .2H₂O, 1,25mM; KCl, 5,4mM; MgSO₄ .7H₂O, 2,5mM; NaH₂PO₄ .H₂O, 2,0mM; NaHCO₃ , 27,0mM; Na₂SO₄ , 1,2mM; EDTA, 0,03mM e glicose 5,5mM, mantida a 37°C por um banho-maria, e continuamente aerada por mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂) na câmara de saturação de oxigênio a uma pressão controlada de 100 mmHg, mantendo o pH estável em 7,4. O fluxo coronariano foi mantido constante em 10 mL/min por meio de uma bomba peristáltica (MS-Reglo – 4 canais, Hugo Sachs, Alemanha). Um balão de látex foi inserido no ventrículo esquerdo através de uma cânula de aço conectada a um transdutor (Statham Transducer P23Db, Incor, SP, Brasil) para mensurar a força isovolumétrica cardíaca. O balão foi pressurizado por meio de uma seringa de vidro de forma a manter uma pressão diastólica intraventricular de 10 mmHg. A PPCm foi monitorada com um transdutor (Statham Transducer, P23Db) conectado a um cateter de perfusão aórtica. Como o fluxo foi mantido constante (10 mL/min), as alterações na pressão de perfusão foram relacionadas diretamente às mudanças na resistência vascular. Após o período de estabilização da preparação (40 min), a PPCm basal foi mensurada. A resposta vasodilatadora do leito coronariano foi avaliada através da administração *in bolus* (0,1 ml) em concentrações crescentes (0,1; 1; 10; 100; 300 e 1000 ng) de bradicinina (Sigma, St. Louis, MO). Os grupos foram compostos de um número conforme segue: SHAM= 6; OVX= 8; OTRH= 8; OTREX= 8 e OEX= 9.

3.10- Análise Estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). A análise da expressão das enzimas antioxidantes (SOD-1, SOD-2, CAT e GPx), da óxido nítrico sintase endotelial e induzida (eNOS e iNOS), assim como, o pesos dos órgãos e a PPCm foram feitas através da análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA). Para a análise da resposta vasodilatadora a bradicinina foi utilizado a análise de variância de duas vias (*two-way* ANOVA). Nos dois casos, para verificar entre quais grupos houveram diferenças foi utilizado o teste *post-hoc* de Fisher, e considerado como significativo o valor de $p < 0,05$.

4- RESULTADOS

4.1- Peso Corporal e dos órgãos

Conforme apresentado na tabela 1, que demonstra o peso corporal (PC) e os pesos dos órgãos no momento do sacrifício das ratas, pode-se observar que não houve diferenças no peso corporal inicial entre os grupos, porém, ao final do período de treinamento/tratamento, como esperado, as ratas dos grupos OVX estavam significativamente mais pesadas comparadas aos grupos SHAM, OTRH e OTREX ($p < 0,05$), assim como o grupo OEX, que teve seu PC final significativamente maior em comparação aos grupos SHAM e OTRH ($p < 0,05$). O percentual de variação de peso das ratas durante o protocolo demonstrou que os grupos OVX e OEX tiveram uma variação significativamente maior comparadas ao restante dos grupos ($p < 0,05$). Entretanto, quando analisado os conchins de gordura retroperitoneal, parametrial e o seu somatório, verifica-se que apenas o treinamento foi eficiente em evitar o acúmulo excessivo de gordura nas ratas que ocorre com a ovariectomia ($p < 0,05$), demonstrando que o treinamento altera positivamente a composição corporal das mesmas.

O peso uterino (PU) e sua razão com o PC, que foi utilizado para analisar indiretamente a condição estrogênica nos animais, estava significativamente menor ($p < 0,05$) nos grupos que não fizeram a reposição hormonal (OVX e OEX), demonstrando a atrofia que ocorre com os úteros com a deficiência de E2 e comprovando a eficiência da cirurgia de castração e da reposição estrogênica.

A análise do peso do coração (PCOR), assim como, o peso do ventrículo esquerdo (PVE), e suas respectivas razões com o PC, foi verificado para demonstrar a efetividade do treinamento físico. A hipertrofia cardíaca que ocorre resposta ao treinamento é uma adaptação fisiológica esperada devido ao aumento na sobrecarga de volume, desde que a intensidade seja suficiente em promover tais adaptações. O PCOR e PVE foram significativamente maior nos dois grupos treinados (OTREX e OEX) em comparação aos demais grupos ($p < 0,05$), enquanto

que suas razões mostram que todos os grupos tiveram o peso cardíaco relativamente maiores comparados as ratas OVX ($p < 0,05$).

Tabela 1: Peso corporal das ratas (PC), cochins de gordura retroperitoneal (GR) e parametrial (GP), peso do útero (PU), peso do coração (PCOR) e peso do ventrículo esquerdo (PVE).

	SHAM	OVX	OTRH	OTREX	OEX
PC (inicial) (g)	227±5	236±4	239±6	238±6	234±3
PC (final) (g)	277±10#*	328±12	279±9#*	285±5#	309±8
PC (% variação)	24.42±3.46#*	38.61±2.78	18.39±2.96#*	17.18±2.90#*	34.37±3.24
GR (g)	4.31±0.88	6.05±0.82	4.10±0.34	3.30±0.50#	3.99±0.91#
GP (g)	6.17±0.7	5.96±0.95	5.39±0.74	4.25±0.35	3.79±0.39#§
GR+GP (g)	10.48±1.46	12.01±1.36	9.48±3.24	7.55±2.14#	7.79±1.20#
PU (mg)	527±65	145±42†‡§	584±145	669±50	161±34†‡§
PU/PC (mg/g)	1.99±0.24	0.45±0.12†‡§	2.14±0.14	2.41±0.77	0.52±0.11†‡§
PCOR (mg)	844±33	857±28	866±49	1033±33#‡§	1091±32#‡§
PCOR/PC(mg/g)	3,06±0,1#	2,67±0,09	3,10±0,15#	3,64±0,12#‡§	3,57±0,15#‡§
PVE (mg)	570±20	568±13	598±29	702±28#‡§	657±23#§
PVE/PC (mg/g)	2,07±0,08#	1,83±0,08	2,11±0,07#	2,48±0,1#‡§*	2,14±0,08#

Dados expressos como média ± EPM. § $p < 0,05$ vs grupo SHAM, # $p < 0,05$ vs grupo OVX e ‡ $p < 0,05$ vs grupo OTRH, * $p < 0,05$ vs grupo OEX e † $p < 0,05$ vs grupo OTREX (*One-way ANOVA* seguido do teste *post-hoc* de Fisher).

4.2- Pressão de Perfusão Coronariana Basal

Conforme mostrado no gráfico1, não houve diferença sobre a Pressão de Perfusão Coronariana média (PPCm) basal entre os grupos (SHAM - 87.11±2.88; OVX - 79.74±3.38; OTRH - 83.47±4.66; OTREX - 76.15±3.96; OEX - 82.52±5.43 mmHg).

4.3- Resposta vasodilatadora dependente do endotélio

Como verificado no gráfico 2 a ovariectomia (OVX) diminuiu a resposta vasodilatadora dependente do endotélio a bradicinina nas três maiores concentrações (100, 300 e 1000 ng). Provavelmente, essa diminuição ocorra devido a disfunção endotelial, como já relatado em outros trabalhos com esse modelo (Moien-Ashfari et al, 2003; Xu et al, 2008; Kang et al, 2011) . Por outro lado, tanto o

treinamento quanto o tratamento com E2 previniram esse efeito, e a resposta vasodilatadora dependente do endotélio foi restaurada, sendo estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na concentração de 1000 ng comparado ao grupo OVX. No grupo treinado (OEX), essa resposta foi mais pronunciada, pois foi significativamente diferente ($p < 0,05$) nas três maiores concentrações em comparação com o grupo OVX.

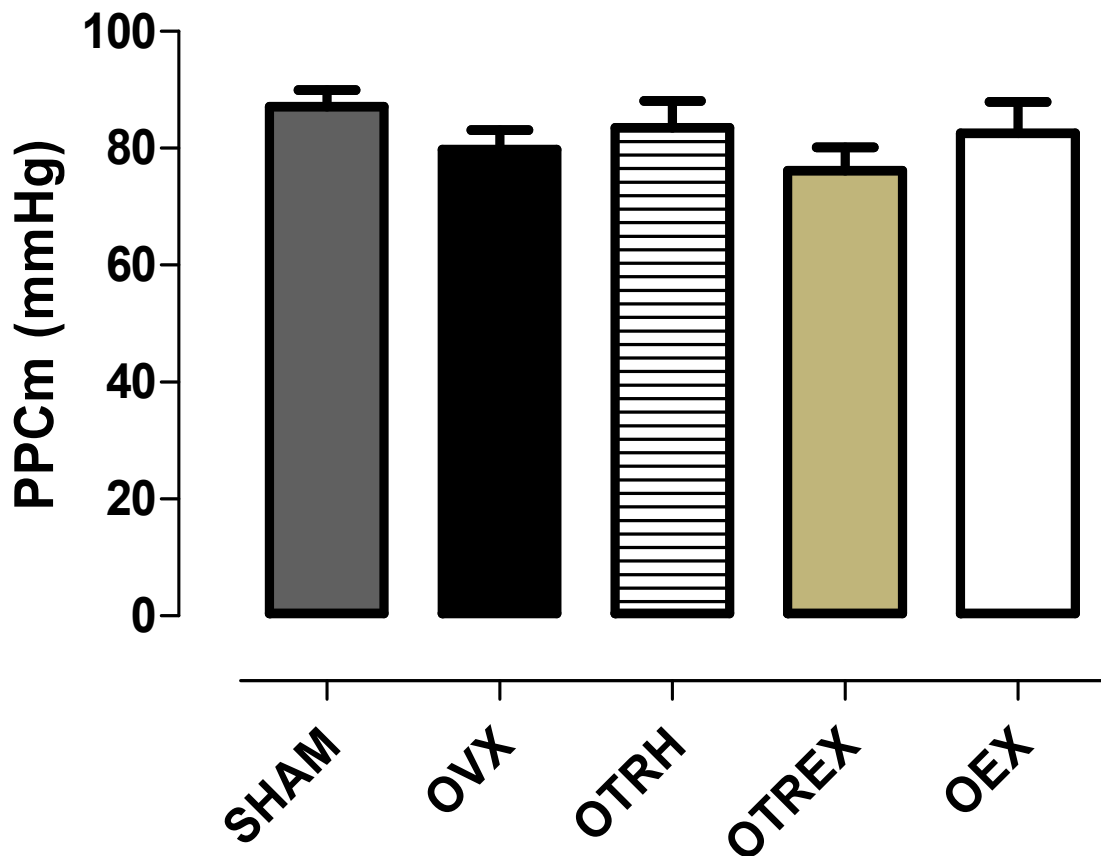


Gráfico 1: Pressão de perfusão coronariana média basal (PPCm). Dados expressos como média \pm EPM. Não houveram diferenças significativas entre os grupos. **G**

4.4- Expressão das enzimas antioxidantes

Como observado no gráfico 3, houve um aumento na expressão da isoforma citosólica da enzima superóxido dismutase (SOD-1) coronariana no grupo tratado com E2 ($p < 0,05$ vs OVX), assim como, nas ratas treinadas cronicamente ($p < 0,05$ vs OVX). Não houve efeito adicional com a interação entre o tratamento e o treinamento com E2 sobre a expressão da enzima, porém, foi significativamente

maior que o grupo OVX ($p < 0,05$). Ainda, foi verificado que houve um aumento na expressão dessa enzima comparando o grupo treinado (OEX) em relação ao grupo SHAM, mas que não atingiu significância estatística ($p = 0,052$).

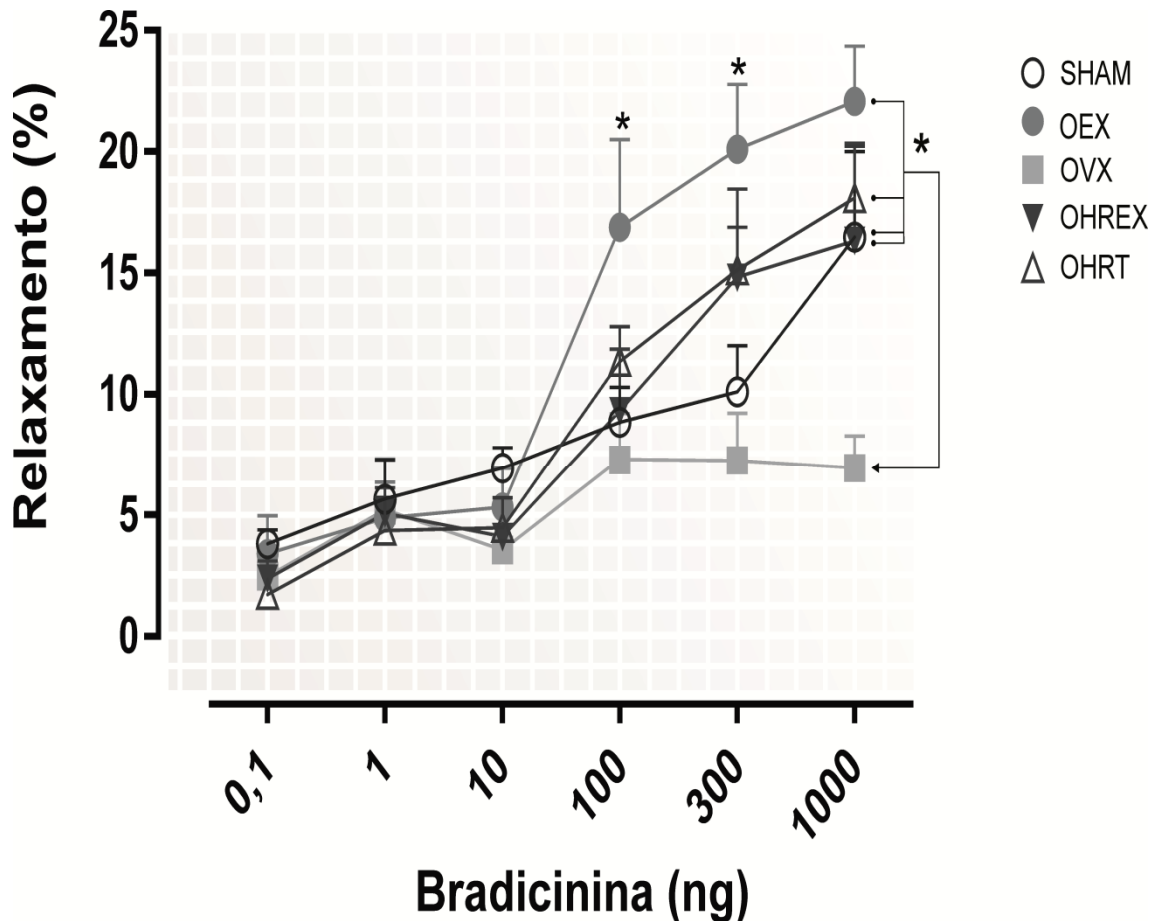
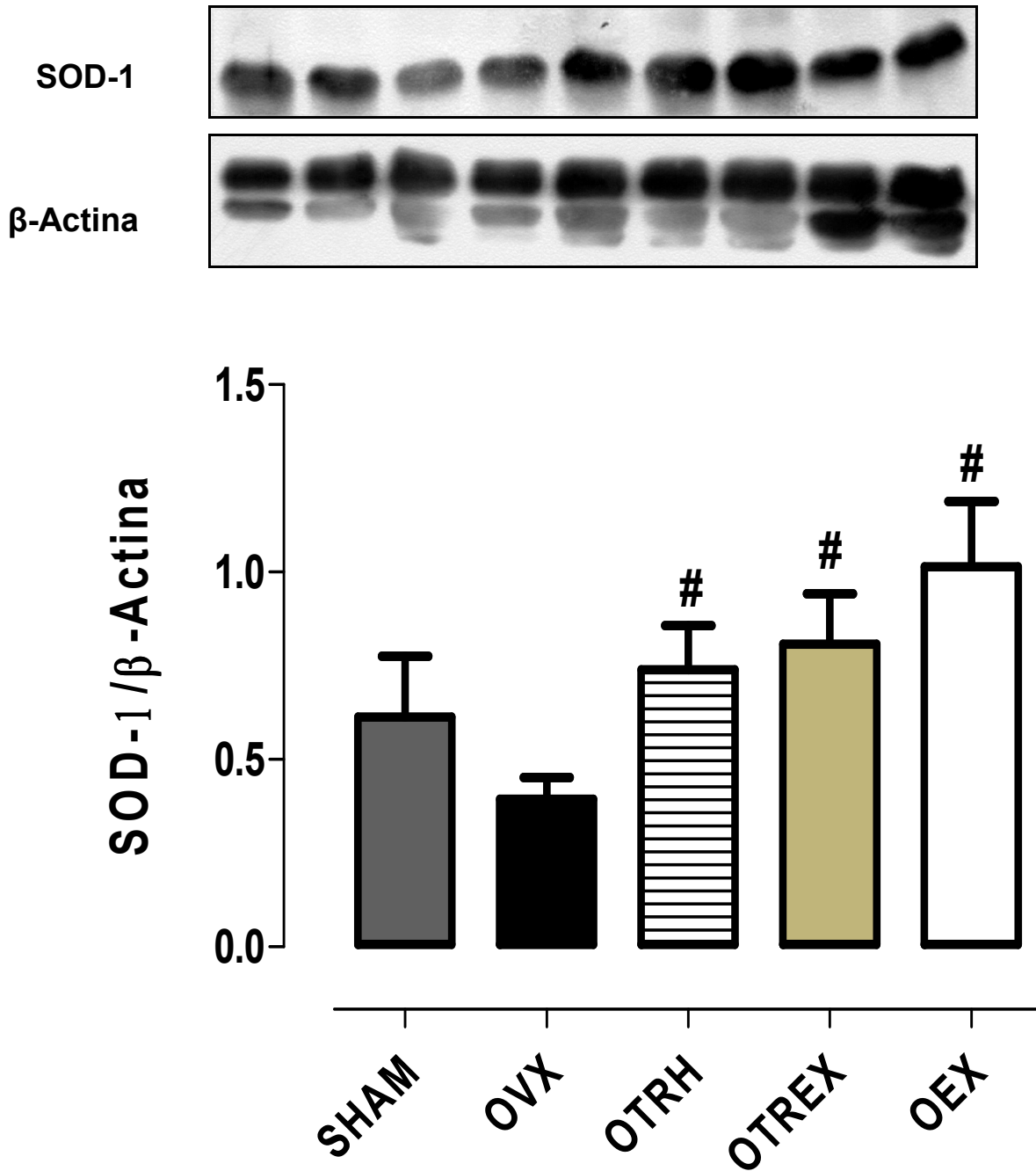


Gráfico 2: Resposta vasodilatadora dependente do endotélio em concentrações crescentes de bradicinina (0,1 a 1000 ng). Dados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ comparados ao grupo OVX.

Como mostrado no gráfico 4, não houve diferenças significativas entre os grupos sobre a expressão da isoforma mitocondrial da enzima superóxido dismutase (SOD-2).

Analisando a expressão da enzima antioxidante catalase (CAT), que decompõem o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em H_2O e O_2 , pode-se observar no gráfico 5 que houve um aumento apenas no grupo treinado (OEX) comparado ao grupo ovariectomizado (OVX, $p < 0,05$). Foi observado um aumento do grupo treinado (OEX) em relação ao grupo com reposição de estrogênio (OTRH), que, no entanto,

não atingiu significância estatística ($p= 0,058$) Curiosamente, no grupo OTREX, a reposição com E2 parece ter inibido o aumento da expressão dessa enzima que foi induzida pelo treinamento.



Gráf
ico3: Expressão da isoforma citosólica da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD-1). Dados expressos como média \pm EPM. # $p < 0,05$ comparado com o grupo OVX (*One-way* ANOVA seguido do teste *post-hoc* de Fisher).

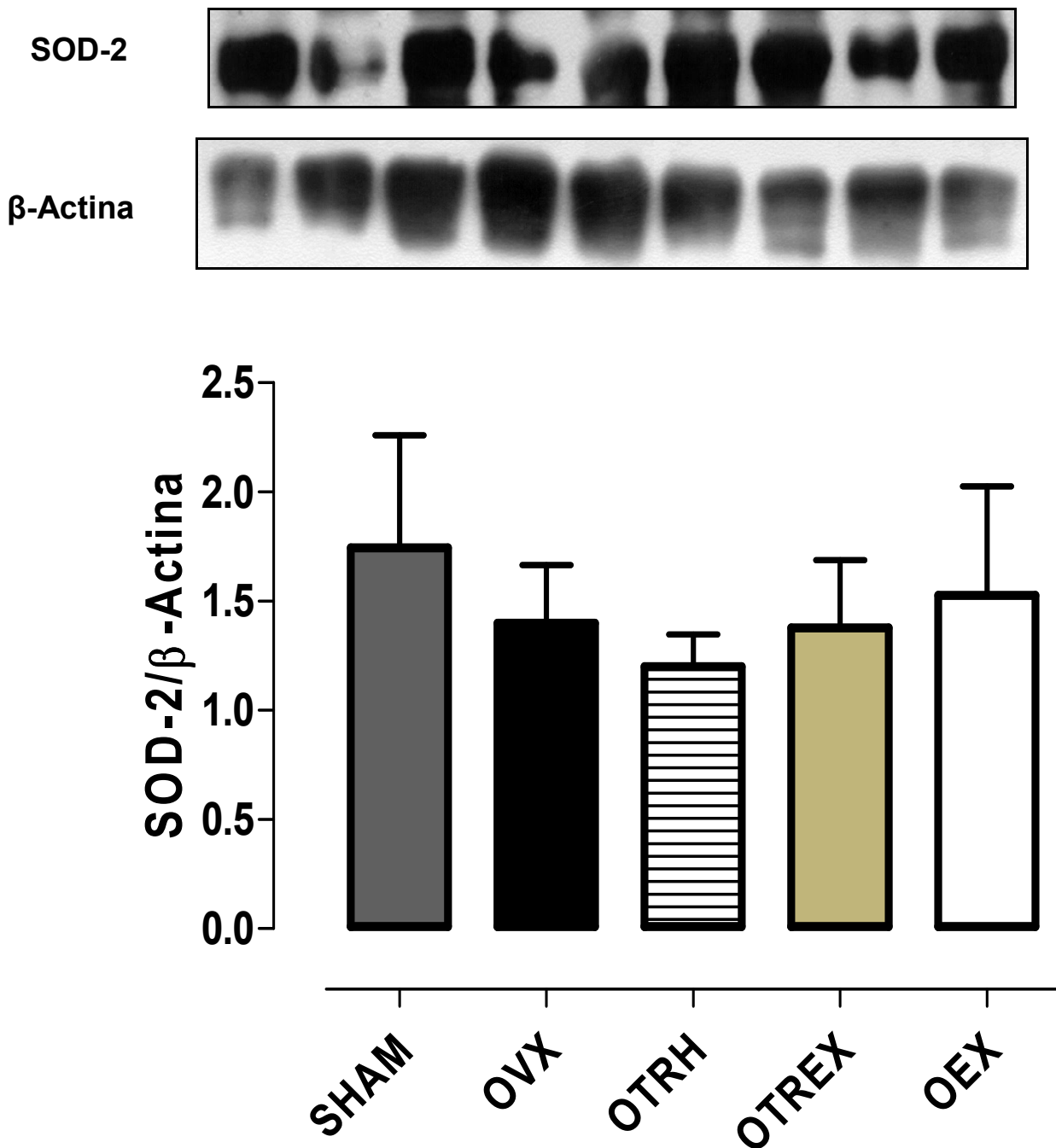


Gráfico 4: Expressão da enzima antioxidante superóxido dismutase mitocondrial (SOD-2). Dados expressos como média ± EPM.

A expressão coronariana da enzima glutathiona peroxidase (GPx), que também faz a decomposição do H_2O_2 , encontra-se diminuída em todos os grupos em comparação ao grupo SHAM ($p < 0,05$) como demonstrado no gráfico 6. Foi também verificado que os grupo treinado com terapia estrogênica (OTREX) teve a expressão

coronariana dessa enzima diminuída em relação ao grupo OVX ($p < 0,05$), assim como, o grupo que fez somente o treinamento em comparação aos grupos OVX e OTRH ($p < 0,05$).

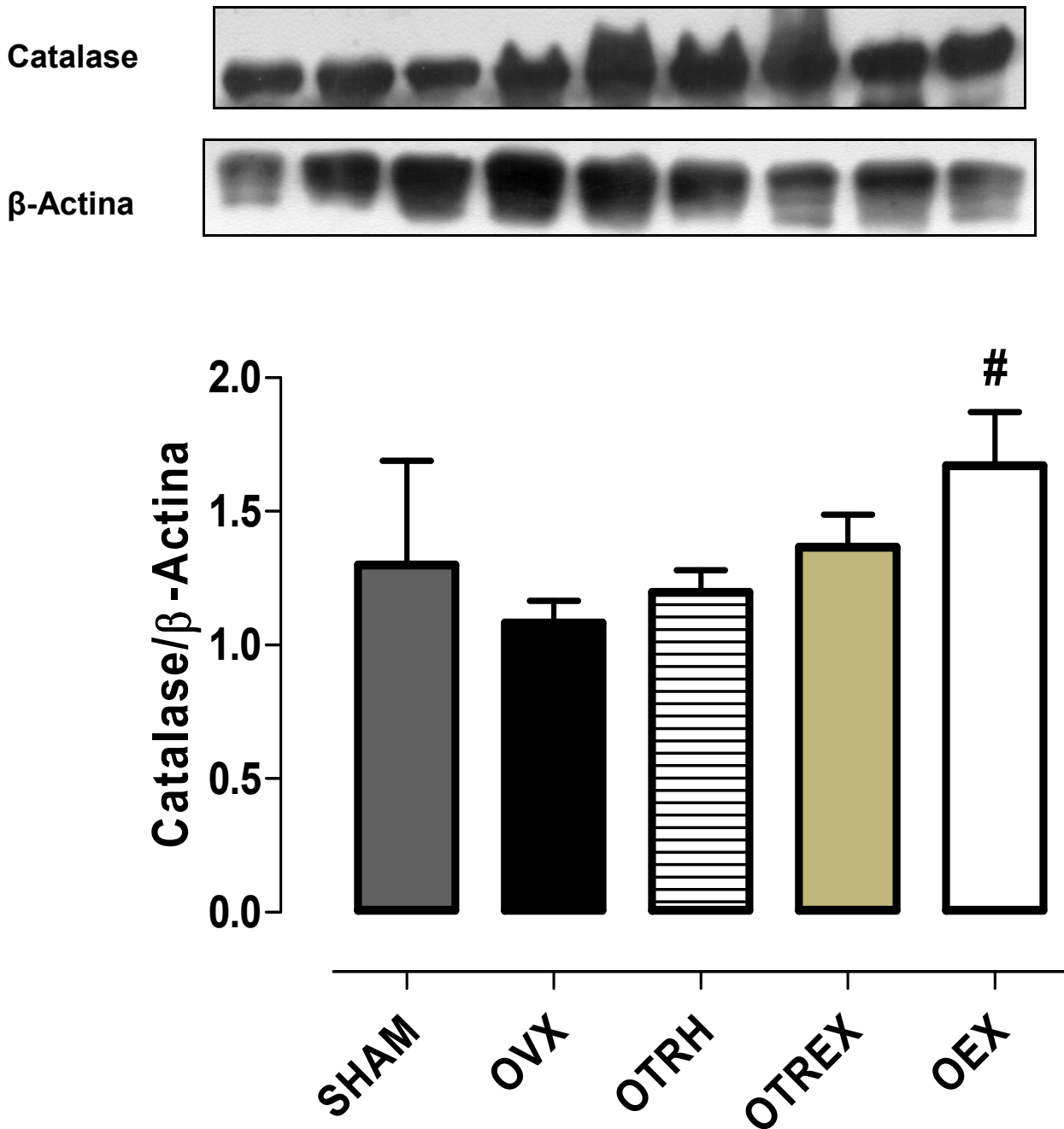
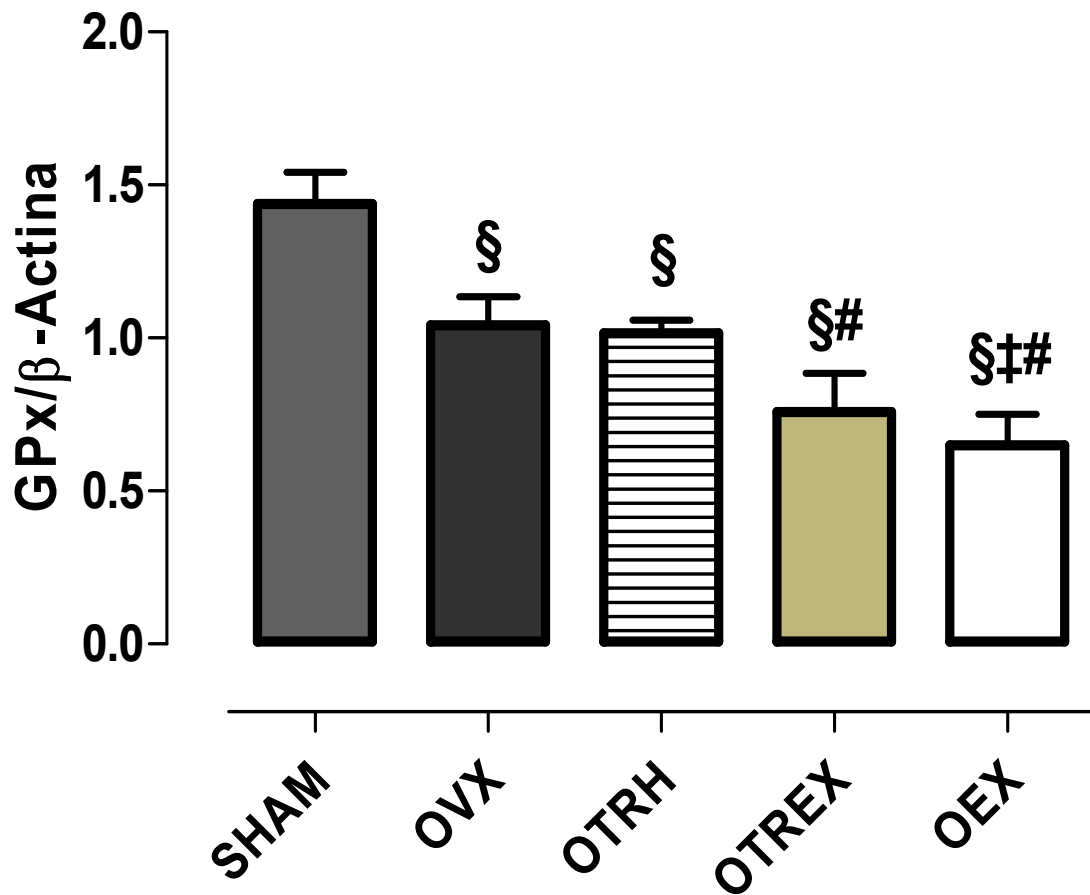
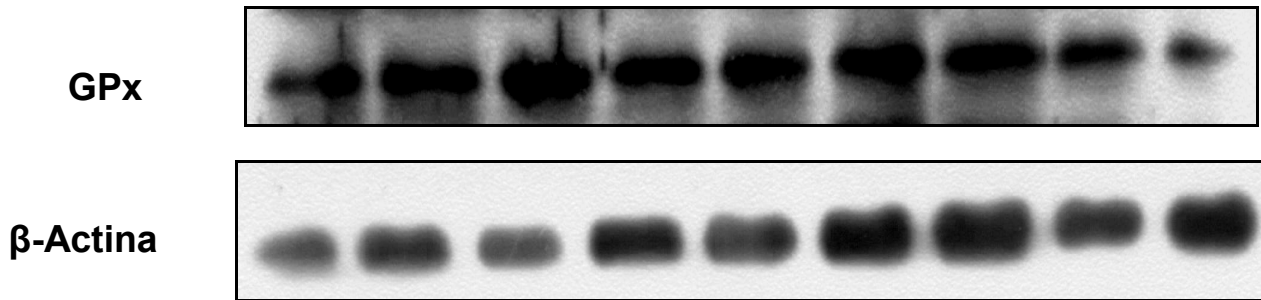


Gráfico 5: Expressão da enzima antioxidante catalase (CAT). Dados expressos como média \pm EPM. # $p < 0,05$ comparado com o grupo OVX (*One-way ANOVA* seguido do teste *post-hoc* de Fisher).



Gr

áfico 6: Expressão da enzima glutathiona peroxidase (GPx). Dados expressos como média \pm EPM. § $p < 0,05$ comparados com o grupo SHAM, # $p < 0,05$ comparados com o grupo OVX e ‡ $p < 0,05$ comparado com o grupo OTRH (*One-way ANOVA* seguido do teste *post-hoc* de Fisher).

O gráfico 7 mostra a expressão da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), a qual foi significativamente maior somente no grupo treinado (OEX, $p < 0,05$) em comparação com o grupo tratado com E2 (OTRH). Assim como observado com a enzima CAT, o tratamento com E2 preveniu o aumento da expressão dessa enzima no grupo tratado e treinado (OTREX).

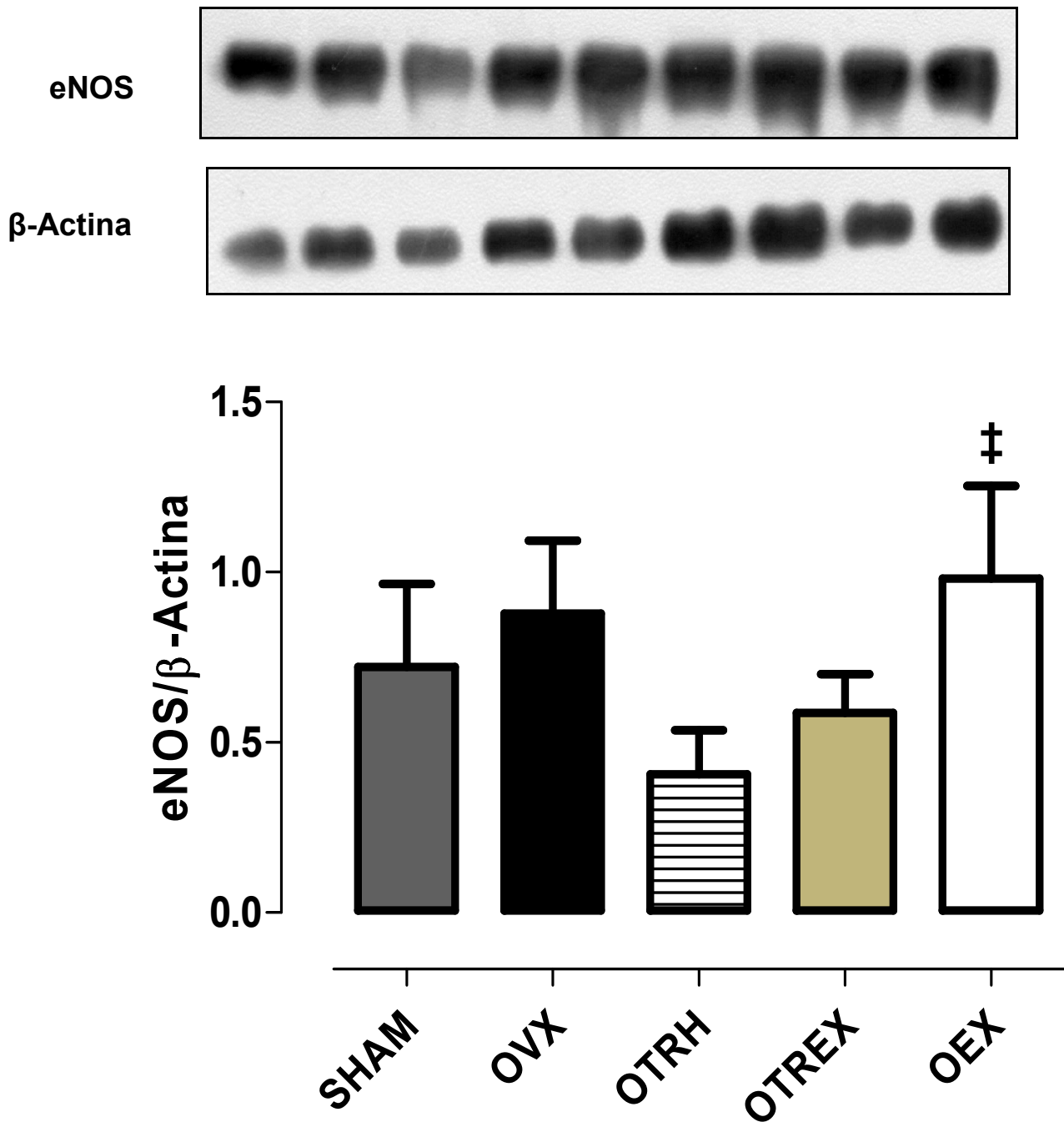
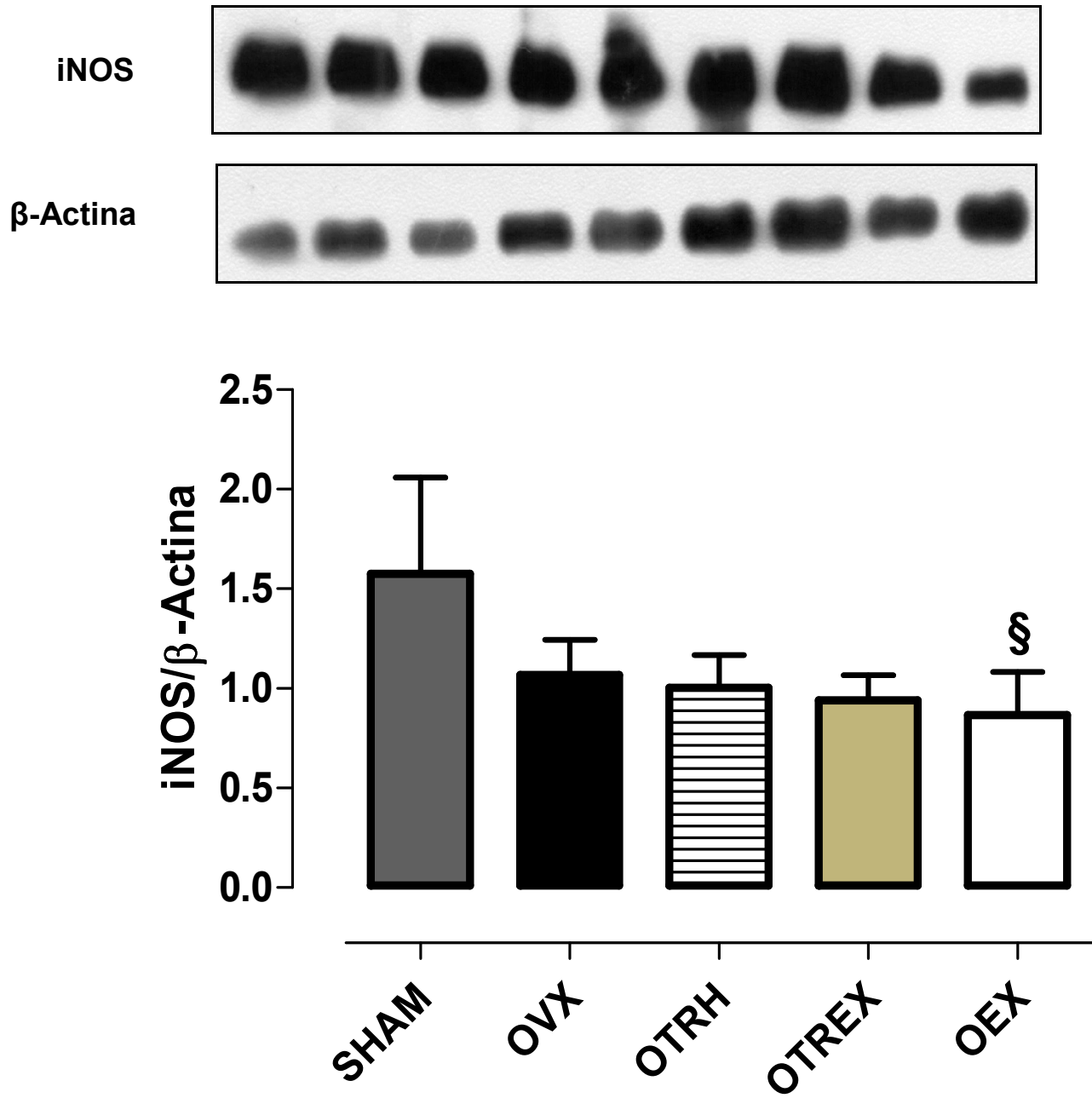


Gráfico 7: Expressão da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). Dados expressos como média \pm EPM. ‡ $p < 0,05$ comparado com o grupo OTRH (*One-way ANOVA* seguido do teste *post-hoc* de Fisher).

Como analisado no gráfico 8, a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) está diminuída em todos os grupos comparados ao grupo SHAM, entretanto, apenas estatisticamente significativa somente no grupo treinado (OEX, $p < 0,05$).



ráfico 8: Expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS). Dados expressos como média \pm EPM. § $p < 0,05$ comparado com o grupo SHAM (One-way ANOVA seguido do teste *post-hoc* de Fisher). **G**

5- DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo analisar os efeitos do treinamento físico crônico de natação e da terapia estrogênica sobre a vasoreatividade do leito vascular coronariano de ratas OVX, e verificar o papel da expressão das enzimas antioxidantes sobre esses efeitos.

Demonstramos nesse estudo que tanto o treinamento físico crônico quanto a terapia estrogênica podem melhorar a vasodilatação dependente do endotélio no leito vascular coronariano de ratas OVX, assim como, aumentar a expressão proteica de algumas enzimas antioxidantes. Esse pode ser um dos mecanismos relacionados aos benefícios do exercício físico e da reposição com estrogênio sobre a função vascular e a prevenção da aterosclerose.

Durante o período de treinamento/tratamento pôde-se observar que as ratas do grupo OVX tiveram um aumento significativo no PC. Esses resultados já estão bem estabelecidos na literatura, onde vários autores demonstram o aumento do PC em ratas com deficiência estrogênica, inclusive associados a uma série de alterações metabólicas (Latour et al, 2001; Shinoda et al, 2002; Corriveau et al, 2008; Xu et al, 2008; Zoth et al, 2010; Pighon et al, 2011).

Esses resultados também se reproduzem em humanos, onde se observa que há um aumento de peso corporal após a menopausa, juntamente com o aumento no percentual de gordura (Douchi et al, 2002; Genazzani e Gambacciani, 2006; Sénéchal et al, 2011). O estudo realizado por Genazzani e Gambacciani (2006), avaliaram em 2175 mulheres, os efeitos do climatério sobre as modificações do peso e a distribuição de gordura corporal. Esses autores verificaram que as mulheres no período de transição para a menopausa (perimenopausa) e pós-menopausa tendem a ter um aumento no peso corporal, assim como, uma mudança do padrão glúteo-femoral (ginóide), para um padrão central de distribuição de gordura (andróide), padrão esse que predispõe as maiores alterações metabólicas e ao aumento no risco cardiovascular. Entretanto, as mulheres menopausadas tratadas com E2, estavam com a composição corporal semelhante as observadas em mulheres na pré-menopausa, podendo-se concluir então que essas alterações estão relacionadas

com as mudanças endócrinas ocorridas durante o climatério. Em adição, com a deficiência estrogênica observa-se uma alteração do metabolismo lipídico, havendo uma diminuição da atividade de enzimas lipolíticas, e aumento da atividade de enzimas lipogênicas, como a lipase lipoproteica, mecanismo esse, que favorece o ganho de gordura após a menopausa (Ferrara et al, 2002).

O treinamento crônico de natação não conseguiu prevenir o ganho de peso nas ratas, como aconteceu com os grupos que fizeram a reposição com E2, porém, foi suficiente em alterar a composição corporal, como analisado pelo peso dos depósitos de gordura (retroperitoneal e parametrial) e sua somatória. Resultados similares com animais exercitados foram encontrados por Shinoda et al (2002) em ratas OVX e Zoth et al (2010) em ratas Wistar OVX com obesidade induzida por dieta, embora esses autores não tenham avaliado exatamente os mesmos depósitos de gordura desse estudo, porém, demonstrando que tanto o exercício, quanto a reposição com E2 e a combinação de ambos, podem influenciar positivamente as mudanças na composição corporal induzidas pela OVX. Ainda, corroborando com os estudos animais, estudos clínicos em mulheres na menopausa, demonstraram que esses efeitos são contrabalanceados tanto pela reposição com E2 (Genazzani e Gambacciani, 2006; Yuskel et al, 2007), quanto pelo exercício físico (Douchi et al, 2000; Velthuis et al, 2009).

Em dois estudos transversais, foram avaliados os efeitos do exercício físico sobre a distribuição corporal e densidade mineral óssea em mulheres após a menopausa. O estudo de Douchi et al (2000) verificou que as mulheres que se exercitavam regularmente tinham redução de gordura central e maior densidade óssea, e o estudo de Velthuis et al (2009) analisaram os efeitos de um programa de treinamento aeróbio em conjunto com treinamento resistido de 12 meses sobre o PC e a adiposidade de mulheres na menopausa. Corroborando com o que foi verificado nesse estudo com ratas OVX, os resultados não demonstraram diferenças significativas sobre o PC, porém, o grupo treinado teve uma redução nos valores de percentual de gordura e na circunferência de cintura, reforçando os efeitos positivos do exercício físico sobre a composição corporal.

Embora a PPCm basal não tenha diferido entre os grupos (gráfico 1), a vasodilatação dependente do endotélio foi significativamente maior em todos os

grupos na maior concentração, quando comparados ao grupo OVX, mostrando que a OVX diminui consideravelmente a vasodilatação dependente do endotélio, e tanto o exercício físico quanto a terapia estrogênica foram capazes de evitar essa redução (gráfico 2). Moien-Ashfari et al (2003) demonstraram em artéria caudal de ratas, que a OVX diminuiu a sensibilidade a vasodilatação dependente do endotélio induzida pela acetilcolina. Essa diminuição foi máxima em aproximadamente 12 semanas após a cirurgia de OVX, próximo ao tempo de cirurgia do presente estudo que foi de 9 semanas. Assim como foi verificado nesse estudo, a reposição com E2 preveniu a diminuição da resposta vasodilatadora. Outros estudos com E2 corroboram com esses resultados, como o de Xu et al (2008), que demonstrou em ratas, que a partir da nona semana após a OVX há um aumento significativo da PA, aumento da atividade da renina, diminuição do NO, do ANP, e da angiotensina II plasmáticos, sendo somente esse último não compatível com o resultado do estudo. Como consequência, houve uma diminuição da resposta vasodilatadora dependente do endotélio a acetilcolina verificado em anéis de aorta torácica. Todos esses efeitos foram revertidos pelo tratamento com E2. No estudo de LeBlanc et al (2009), houve uma diminuição da dilatação dependente do mediada por fluxo em arteríolas coronarianas com a OVX, que ocorre devido a uma diminuição na produção de NO, assim como, no trabalho de Kang et al (2011), que ainda associou esses efeitos com o aumento no estresse oxidativo vascular. No entanto, esses efeitos foram revertidos com a reposição de E2, que restaurou a produção de NO juntamente com a diminuição no estresse oxidativo. Ainda, o estudo de Barton et al (1998) demonstrou que a pré-incubação com E2 em artérias coronárias isoladas de humanos potencializou significativamente a resposta vasodilatadora a bradicinina. Portanto, de acordo com esses resultados, pode-se concluir que a deficiência de E2 pode alterar o balanço entre os fatores endoteliais responsáveis pela regulação tanto do tônus quanto da reatividade vascular, e a terapia estrogênica restaura esse balanço.

No entanto, no grupo treinado (OEX) essa resposta foi mais pronunciada, uma vez que foi significativamente maior nas três maiores concentrações em relação ao grupo OVX. Estudos em animais, que avaliaram as respostas do exercício sobre a reatividade vascular demonstraram resultados semelhantes sobre a vasodilatação dependente do endotélio em vários leitos, como o trabalho de Moraes et al (2008),

que verificou uma melhora da vasodilatação induzida pela acetilcolina em anéis de aorta e no leito vascular mesentérico de ratas com obesidade induzida por dieta, assim como, o trabalho de Wang et al (1993), em artéria coronária de cachorros em resposta a acetilcolina e o de Laughlin et al (2002), em artéria coronária de porcos com a vasodilatação induzida pela BK. Estudos em ratas OVX, demonstram que o exercício físico aeróbio pode prevenir a disfunção endotelial induzidas pela OVX na aorta, por evitar a calcificação arterial e a diminuição na expressão da eNOS, associado com uma diminuição na síntese de endotelina-1 (Park et al, 2008), e, inclusive o exercício resistido isométrico pode melhorar marcadamente a resposta vasodilatadora em anéis de aorta induzido pela acetilcolina (Figard et al, 2006). Estudos em mulheres na pós menopausa apóiam esses resultados em modelos experimentais, como o estudo de McKechnie et al (2001), que verificaram que as mulheres que eram fisicamente mais ativas em suas atividades cotidianas, avaliadas por auto relato em um questionário, exibiam melhor reatividade vascular, este que foi avaliado pela hiperemia reativa e pelo teste pressórico ao frio, assim como, o estudo de Tew et al (2012) que avaliou os efeitos de 48 semanas de treinamento sobre a reatividade microvascular cutânea, e demonstrou que a mesma esteve reduzida nas mulheres pós menopausa e foi restaurada a níveis similares aos das mulheres jovens.

A diminuição no estresse oxidativo com o aumento na expressão das enzimas antioxidantes, SOD-1 e catalase, no grupo treinado, pode ser um dos possíveis mecanismos associado a esse resultado. A expressão da SOD-1 aumentou tanto em resposta ao treinamento quanto nos grupos que fizeram o tratamento com E2 (gráfico 3). A importância desse fato, consiste no relato de que a atividade da SOD-1 em aorta de camundongos, contabiliza por cerca de 50-80% de toda a atividade das isoformas da SOD na parede vascular, a isoforma mitocondrial por 2-12%, e o remanescente à isoforma extracelular, com padrão similar observado em humanos (Faraci e Didion, 2004; Shimokawa, 2010). Morikawa et al (2003), ainda descreveu que essa enzima exerce um papel fundamental como um EDHF sintase no leito mesentérico e coronariano de camundongos, desde que o H_2O_2 foi descrito como um EDHF. Em artéria basilar de caninos, a inibição da atividade dessa enzima pelo dietilditiocarbamato, reduziu significativamente o relaxamento vascular induzido pela bradicinina, que foi restaurado após a adição de Tiron, um composto scavenger de

O_2^\bullet . (Wambi-Kiéssé e Katusic, 1999). Essa enzima ainda previne a reação do NO com o superóxido, e a consequente formação de um poderoso oxidante, o peroxinitrito. Foi demonstrado por Laursen et al (2001) em camundongos ApoE KO, que o peroxinitrito é o principal responsável pela oxidação de um co-fator essencial para a atividade da eNOS, a tetrahidrobiopterina (BH_4). A oxidação desse co-fator causa o desacoplamento dessa enzima, que ao invés de produzir NO, passa a produzir predominantemente o ânion superóxido, contribuindo ainda mais para o aumento no estresse oxidativo vascular. Os experimentos de Zou e Ulrich (1996) verificaram que o peroxinitrito também diminui a formação de prostaciclina, através da inibição da prostaciclina sintase, confirmando em estudo posterior que o mecanismo pelo qual a inibição ocorre é devido a nitração de resíduos de tirosina dessa enzima pelo peroxinitrito (Zou et al, 1997). Além disso, Liu et al (2002), relataram que esse composto inibe ainda a atividade de canais de potássio ativado por Ca^{2+} (BK_{Ca}) nas células do músculo liso vascular, contribuindo para a diminuição do relaxamento mediado por EDHF. Portanto, de acordo com esses resultados, pode-se verificar que além do papel de remoção do O_2^\bullet , essa enzima ainda pode mediar o relaxamento vascular via EDHF, assim como, aumentando a biodisponibilidade de NO por inibir sua reação com O_2^\bullet . Como visto acima, o peroxinitrito interfere negativamente sobre a produção e atividade dos três principais fatores que causam o relaxamento vascular, evidenciando assim, a necessidade da regulação finamente controlada da produção do O_2^\bullet pela SOD.

Em estudos avaliando o tratamento com E2, verifica-se que a expressão dessa enzima diminui com a OVX, como no estudo de Kang et al (2011) em arteríolas coronarianas, demonstrando que esse hormônio provavelmente exerce um papel regulador sobre essa enzima. Strehlow et al, (2003), ainda relataram em cultura de CMLV de aorta de ratas e em monócitos humano, que a incubação com E2 não exerce efeito sobre a expressão de SOD-1, porém, aumenta a expressão da SOD-2, contrário ao que foi observado em nosso estudo com artérias coronárias. Por outro lado, em estudos animais com o exercício físico verifica-se que a expressão vascular de SOD-1 é aumentada em várias espécies como em artéria coronária de porcos (Rush et al, 2000; Laughlin et al, 2002), na aorta e no leito mesentérico de ratos com obesidade induzida por dieta (Moraes et al, 2008) e aorta de camundongos diabéticos (Lee et al, 2011), todos eles relatando aumento na

vasodilatação mediada pelo endotélio, sugerindo que essa enzima é, de fato, de grande importância para a manutenção da função endotelial.

O mecanismo que parece regular essa resposta nos ratos exercitados é o aumento no stress mecânico endotelial. O trabalho de Inoue et al (1996) demonstrou que, de fato, o shear stress é capaz de modular sua expressão em células endoteliais de aorta de humanos, porém, não no músculo liso.

Com o aumento na expressão da SOD-1, acredita-se que nos grupos tratados, tenha havido um aumento na produção de H_2O_2 . As enzimas peroxidases, como a catalase e a GPx tem um papel essencial na manutenção do equilíbrio de H_2O_2 nas células, por sua conversão a água e oxigênio (Suvorava e Kojda, 2009). Como verificado nos gráficos 5 e 6, a expressão da catalase aumentou somente no grupo treinado, enquanto a de GPx foi diminuída. Provavelmente, o aumento na expressão da catalase contrabalanceou a diminuição da GPx no grupo treinado, enquanto que nos outros grupos a expressão dessas enzimas foram mais homogêneas. Similarmente, no estudo realizado por Kang et al, 2011, a expressão coronariana da catalase não foi alterada em função do tratamento com E2, assim como no estudo de Strehlow et al (2003), onde a incubação com E2 em CMLV não alterou a expressão dessa enzima. Porém, outros trabalhos têm relatado o aumento na expressão vascular dessa enzima em função do treinamento agudo e crônico, com diminuição nas lesões ateroscleróticas de camundongos com deleção para o receptor de LDL (Meilhac et al, 2001), e da vasodilatação dependente do endotélio em ratos (Husain, 2004). No estudo de Meilhac et al (2001), inclusive, foi avaliado o efeito da suplementação exógena com a vitamina E. Os resultados desse estudo demonstraram que a adição dessa vitamina antioxidante exógenamente, diminuiu tanto a expressão quanto a atividade da catalase por diminuir o estresse oxidativo extracelular, requisito necessário para a indução de sua expressão e aumentar sua atividade. Cabe ressaltar novamente, que o E2 é, por si só, um antioxidante, devido ao anel fenólico localizado na posição A de sua estrutura molecular (Sanchez-Rodriguez, 2012), que, no entanto, possui muita similaridade com a molécula da vitamina E. Essa pode ser uma das razões pelo qual a reposição com E2 parece ter inibido o aumento na expressão da catalase observada no grupo que fez o tratamento com a terapia estrogênica e o treinamento (OTREX).

Em contraste ao estudo de Meilhac et al (2001), que demonstrou um aumento na expressão da catalase na aorta com 1 e 6 semanas de treinamento, o estudo de Lauer et al (2005) não conseguiu detectar essas alterações com 3 semanas de treinamento. Entretanto, é difícil de explicar esses resultados conflitantes, pois os autores utilizaram os mesmos animais (camundongos), exatamente a mesma metodologia de treinamento, como o tipo de treinamento que foi a esteira, o tempo de treinamento de 30 minutos e a intensidade que foi de 15 m/min, além do método utilizado para o sacrifício, dentre outros. Porém, o estudo de Husain et al (2004) demonstrou que o treinamento aumentou a expressão e atividade de várias enzimas antioxidantes na aorta de ratos, inclusive da catalase.

Recentemente, as funções do H_2O_2 sobre as células vasculares têm sido amplamente relatadas. Essa molécula é reconhecidamente um importante componente de sinalização de receptor, o qual atua como um mensageiro intracelular mediando várias funções celulares, como a proliferação, diferenciação, apoptose e senescência (Rhee et al, 2005). Dentro de variações fisiológicas, o H_2O_2 modula a vasodilatação induzida pelo aumento do metabolismo cardíaco em artérias coronárias de ratos (Otake, 2010), atua como um fator hiperpolarizante derivado do endotélio em alguns leitos vasculares de várias espécies (Matoba et al, 2000; Shimokawa, 2010), inclusive em arteríolas coronariana de humanos (Liu et al, 2011), assim como, já foi descrito em aorta de camundongos, que o H_2O_2 derivado da isoforma neuronal da óxido nítrico sintase, é um dos principais fatores de relaxamento derivado do endotélio vascular em resposta a acetilcolina (Capettini et al, 2008). Em conformidade com o seu papel de segundo mensageiro intracelular, o H_2O_2 atua também como regulador da expressão gênica e ativador seletivo de fatores de transcrição (Faraci and Didion, 2004), como o fator de transcrição nuclear kappa B (NFkB), responsável pela transcrição de genes de moléculas pró-inflamatórias, e portanto, sua estimulação crônica com o aumento no estresse oxidativo pode aumentar a predisposição para o desenvolvimento da aterosclerose (Ungvari et al, 2007). Nesse sentido, Rhee et al (2005), colocam que em estudos com mensageiros intracelulares como os nucleotídeos cíclicos e inositol 3-fosfato indicam que a eliminação dos mensageiros após o término de suas funções é crítico para a função celular, sendo, portanto, um processo altamente regulado. No caso do H_2O_2 isso parece especialmente verdadeiro, desde que essa molécula é

prontamente convertida a espécie deletéria OH^{\bullet} , contra o qual não se tem conhecimento de um sistema enzimático que o decomponha.

Estudos em camundongos ApoE KO, demonstraram uma redução do desenvolvimento da aterosclerose em animais que superexpressavam a catalase, ou a catalase e SOD-1, mas não o que somente superexpressava SOD-1, sugerindo que talvez o H_2O_2 tenha um potencial aterogênico maior que do que o superóxido, provavelmente pelo aumento da sinalização induzida por H_2O_2 sobre o NFkB (Yang et al, 2004; Yang et al, 2009). Resultado semelhante foi encontrado em aorta de camundongos com receptor de LDL^{-/-} através do exercício físico (Meilhac, 2001), onde houve aumento da expressão da catalase. Em estudo com cultura celular, foi verificado que a superexpressão da catalase diminui a translocação do NFkB para o núcleo induzido pelo TNF- α , diminuindo a transcrição gênica mediado por esse fator de transcrição (Lupertz et al, 2008). Como a expressão da catalase encontra-se aumentada nos ratos treinados, possivelmente esse seja um dos mecanismos responsáveis pela menor expressão de iNOS nesse grupo, demonstrando também o efeito antiinflamatório do exercício físico.

Confirmando essa hipótese, Yang e Chen (2003), demonstraram em aorta de coelhos hipercolesterolêmicos que o exercício regular diminui a produção vascular de iNOS e a expressão de moléculas de adesão vascular, além de prevenir o espessamento da camada íntima e melhorar a disfunção vascular severa induzida pela dieta rica em colesterol, demonstrado pela vasodilatação induzida pela acetilcolina.

Ainda, um outro fator que justificaria a melhora da dilatação dependente do endotélio integrada com o aumento das enzimas antioxidantes nos ratos treinados é demonstrado por Suvorava et al (2010). Esses autores verificaram em camundongos transgênicos, que o aumento na concentração vascular de H_2O_2 induzido pelo exercício diminui o número de células endoteliais progenitoras circulantes. No entanto, nos animais que superexpressam a catalase houve um aumento na liberação dessas células após o exercício, evidenciando que, o aumento da expressão dessa enzima pode auxiliar no mecanismo de reparo endotelial.

Também já foi reportado, que o H_2O_2 aumenta a expressão de eNOS em cultura celular, por um mecanismo dependente de Ca^{2+} /Proteína quinase dependente de calmodulina-II e JNK-2 (Cai et al, 2001). Em outro estudo desse mesmo grupo de pesquisadores (Lauer et al, 2005), foi analisado em camundongos transgênicos que superexpressam catalase especificamente no endotélio, o papel do H_2O_2 sobre a expressão vascular da eNOS. A expressão dessa enzima foi maior nos animais selvagens exercitados em comparação aos que superexpressavam a catalase, mostrando que o H_2O_2 endógeno exerce um papel fundamental na adaptação endotelial ao exercício por estimular a expressão da eNOS.

Portanto, assim como verificado por Meilhac et al (2001) em camundongos, e por Ulker et al (2003) em ratos SHR, a desregulação na expressão e atividade das enzimas antioxidantes contribui de maneira relevante para a disfunção endotelial. Nesse contexto, como notado pelos autores mencionados acima, a catalase parece ter um papel fundamental na reversão dos efeitos vasculares deletérios causados pelo estresse oxidativo, que geralmente ocorre com a deficiência estrogênica (Hernandez et al, 2000, Sanchez-Rodriguez et al, 2012). O exercício físico, como demonstrado por esse e outros estudos (Meilhac et al, 2001; Husain, 2004) parece contribuir com a melhora da função vascular também nesse sentido.

Outro mecanismo, além do H_2O_2 , como o shear stress laminar é um estímulo potente para o aumento na expressão e estabilização do RNAm da eNOS (Davis et al, 2001), assim como, o aumento da sua atividade mediante fosforilação do resíduo de Ser1179, por mecanismos dependentes de proteína quinase A e B/Akt (Boo et al, 2002b; Go et al, 2001), e no resíduo de Ser635, dependente de proteína quinase A demonstrado em células endoteliais bovina (Boo et al, 2002a). Como o exercício físico de forma aguda, reconhecidamente aumenta tanto o estresse oxidativo quanto a tensão exercida sobre a parede vascular, e conseqüentemente a produção de NO, provavelmente, o aumento da dilatação endotélio dependente no grupo treinado ocorra por meio tanto da elevação na liberação desse fator vasodilatador quanto no aumento de sua biodisponibilidade.

Em outros trabalhos, foi verificado que a expressão vascular da eNOS, de fato, aumenta com o exercício (McAllister and Price, 2010; Kuru et al, 2009), e conseqüentemente, há uma melhora da dilatação endotélio dependente, ainda que

ocorra a inibição crônica dessa enzima (Kuru et al, 2009). Resultados similares foram encontrados em cachorros (Wang et al, 1993) o qual foi demonstrado que o exercício crônico aumenta a reatividade vascular a acetilcolina de artérias coronárias epicárdicas através do aumento na produção de NO. Posteriormente, Sessa et al (1994) comprovou esse mecanismo por identificar um aumento na produção de NO (nitrito) em grandes e microvasos coronarianos estimulada por acetilcolina, assim como, um aumento na expressão do RNAm da eNOS na aorta desses mesmos animais.

Os resultados do presente estudo demonstram que o treinamento físico crônico de natação pode melhorar a dilatação dependente do endotélio e prevenir a disfunção endotelial observado em ratas OVX, na mesma proporção aos observados com a terapia estrogênica. Um dos mecanismos potenciais para esses efeitos é o aumento na expressão de enzimas antioxidantes, que por sua vez, evita o aparecimento do estresse oxidativo vascular induzido pela deficiência de E2 e as consequências de seus efeitos citotóxicos. A resposta mais pronunciada do grupo exercitado pode estar relacionada principalmente com o aumento na expressão da enzima catalase, que parece ter um papel essencial na reversão da disfunção endotelial, assim como foi observado em outros estudos (Meilhac et al, 2001; Ulker et al, 2003). Além disso, os efeitos positivos do exercício físico sobre a composição corporal é outro importante fator que pode estar associado a esses resultados, visto que o aumento da adiposidade pode aumentar demasiadamente o risco cardiovascular. Portanto, esses dados apóiam a teoria de que o exercício físico praticado de maneira regular pode ser uma alternativa terapêutica viável em relação a terapia estrogênica na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares no período pós-menopausa.

No entanto, outros mecanismos além da expressão das enzimas antioxidantes podem estar associados a esses resultados promovidos pelo exercício físico, abrindo a possibilidade de futuras investigações para o esclarecimento dessa e de outras possíveis questões.

Em conclusão, tanto o treinamento físico crônico quanto a terapia estrogênica podem exercer um papel importante sobre a reatividade vascular coronariana e a expressão de enzimas antioxidantes, e essa pode ser uma das razões pelo qual o

exercício e a terapia estrogênica reduzem o risco de doença arterial coronariana em mulheres na pós-menopausa.

6 – REFERÊNCIAS

I Diretriz Brasileira sobre prevenção de doenças cardiovasculares em mulheres climatéricas e a influência da terapia de reposição hormonal da sociedade brasileira de cardiologia e da associação brasileira do climatério. *Arq Bras Cardiol* 2008;1(1):1-23.

Arenas IA, Armstrong SJ, Xu Y, Davidge ST. Tumor necrosis factor- α and vascular angiotensin ii in estrogen-deficient rats. *Hypertension* 2006;48:497-503.

Barton M, Cremer J, Mugge A. 17 β -Estradiol acutely improves endothelium-dependent relaxation to bradykinin in isolated human coronary arteries. *Eur J Pharmac* 1998;362:73-76.

Bilsel AS, Moini H, Tetik E, Aksungar F, Kaynak B, Ozer A. 17b-Estradiol modulates endothelin-1 expression and release in human endothelial cells. *Cardiovascular Res* 2000;46:579-584.

Bolego C, Cignarella A, Sanvito P, et al. The acute estrogenic dilation of rat aorta is mediated solely by selective estrogen receptor- α agonists and is abolished by estrogen deprivation. *J Pharmac Experim Therap* 2005;313:1203-1208.

Bolego C, Vegeto E, Pinna C, Maggi A, Cignarella A. Selective agonists of estrogen receptor isoforms: new perspectives for cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:2192-2199.

Boo YC, Hwang J, Sykes M. Shear stress stimulates phosphorylation of eNOS at Ser⁶³⁵ by a protein kinase A-dependent mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002a;283:1819-1828.

Boo YC, Sorescu G, Boyd N, et al. Shear stress stimulates phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase at Ser¹¹⁷⁹ by Akt-independent mechanisms. *J Biol Chem*. 2002b;5:3388-3396.

Borgo MV, Lopes AB, Gouvêa AS, et al. Effect of tamoxifen on the coronary vascular reactivity of spontaneously hypertensive female rats. *Braz J Med Biol Res*. 2011;44(8):786-792.

Bourassa PK, Milos PM, Gaynor BJ, Breslow JL, Aiello RJ. Estrogen reduces atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci* 1996;93:10022-10027.

Brandt C, Pedersen BK. The Role of Exercise-induced myokines in muscle homeostasis and the defense against chronic diseases. *J Biomed Biotechnol* 2010;1-6.

Cai H, Davis ME, Drummond GR, Harrison DG. Induction of Endothelial NO synthase by hydrogen peroxide via a Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II/Janus kinase 2-dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:1571-1576.

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

Capettini LSA, Cortes SF, Gomes MA, et al. Neuronal nitric oxide synthase-derived hydrogen peroxide is a major endothelium-dependent relaxing factor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;295:H2503-H2511.

Corriveau P, Paquette A, Brochu M, Prud'homme D, Rabasa-Lhoret R, Lavoie J-M. Resistance training prevents liver fat accumulation in ovariectomized rats. *Maturitas* 2008;59:259–267.

Davis ME, Cai H, Drummond GR, Harrison DG. Shear stress regulates endothelial nitric oxide synthase expression through c-Src by divergent signaling pathways. *Circ Res* 2001;89:1073-1080.

Deschamps AM, Murphy E. Activation of a novel estrogen receptor, GPER, is cardioprotective in male and female rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;297: H1806–H1813.

Douchi T, Yamamoto S, Oki T, et al. The effects of physical exercise on body fat distribution and bone mineral density in postmenopausal women. *Maturitas*.2000;35:25-30.

Douchi T, Yamamoto S, Yoshimitsu N, Andoh T, Matsuo T, Nagata Y. Relative contribution of aging and menopause to changes in lean and fat mass in segmental regions. *Maturitas* 2002;42:301-306.

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

Elhage R, Arnal JF, Pieraggi MT, et al.17 β -estradiol prevents fatty streak formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*1997; 17(11): 2679-2684.

Endlich PW, Firmes LB, Gonçalves WLS, et al. Involvement of the atrial natriuretic peptide in the reduction of arterial pressure induced by swimming but not by running training in hypertensive rats. *Peptides*. 2011;32(8):1706-1712.

Faraci FM, Didion SP. Vascular Protection: Superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1367-1373.

Ferrara CM, Lynch NA, Nicklas BJ, Ryan AS, Berman DM. Differences in adipose tissue metabolism between postmenopausal and perimenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(9):4166–4170.

Figard H, Gaume V, Mouglin F, Demougeot C, Berthelot A. Beneficial effects of isometric strength training on endothelial dysfunction in rats. *Appl Physiol Nutr Metab* 2006;31(5):621-630.

Florian M, Freiman A, Magder S. Treatment with 17- β -estradiol reduces superoxide production in aorta of ovariectomized rats. *Steroids* 2004;69:779–787.

Förstermann U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Arch* 2010;459:923-939.

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.

Gavin KM, Seals DR, Silver AE, Moreau KL. Vascular endothelial estrogen receptor {alpha} is modulated by estrogen status and related to endothelial function and endothelial nitric oxide synthase in healthy women. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:3513-3520.

Genazzani AR, Gambacciani MA. Effect of climacteric transition and hormone replacement therapy on body weight and body fat distribution. *Gynecol Endocrinol* 2006;22(3):145-150.

Go YM, Boo YC, Park H, et al. Protein kinase B/Akt activates c-Jun NH₂-terminal kinase by increasing NO production in response to shear stress. *J Appl Physiol* 2001;91:1574-1581.

Goldhammer E, Tanchilevitch A, Maor I, Beniamini Y, Rosenschein U, Sagiv M. Exercise training modulates cytokines activity in coronary heart disease patients. *Int J Cardiol* 2005;100(1):93-99.

Haas E, Bhattacharya I, Brailoiu E, et al. regulatory role of G protein-coupled estrogen receptor for vascular function and obesity. *Circ Res* 2009;104:288-291.

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

Hernández I, Delgado JL, Díaz J. 17 β -Estradiol prevents oxidative stress and decreases blood pressure in ovariectomized rats. *Am J Physiol* 2000;279:1599-1605.

Husain K. Interaction of regular exercise and chronic nitroglycerin treatment on blood pressure and rat aortic antioxidants. *Biochim Biophys Acta* 2004;1688(1):18-25.

Ihionkhan CE, Chambliss KL, Gibson LL, Hahner LD, Mendelsohn ME, Shaul PW. Estrogen causes dynamic alterations in endothelial estrogen receptor expression. *Circ Res* 2002;91:814-820.

Inoue N, Ramasamy S, Fuka T, Nerem RM, Harrison DG. Shear stress modulates expression of Cu/Zn superoxide dismutase in human aortic endothelial cells. *Circ Res* 1996;79(1):32-37.

Irigoyen M-C, Paulini J, Flores LJF, et al. Exercise training improves baroreflex sensitivity associated with oxidative stress reduction in ovariectomized rats. *Hypertension* 2005;46:998-1003.

Kang LS, Chen B, Reyes RA, et al. Aging and estrogen alter endothelial reactivity to reactive oxygen species in coronary arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; 300:2105-2115.

Karolkiewicz J, Michalak E, Pospieszna B, Deskur-Smielecka E, Nowak A, Pilaczyńska-Szcześniak Ł. Response of oxidative stress markers and antioxidant parameters to an 8-week aerobic physical activity program in healthy, postmenopausal women. *Arch Gerontol Geriatr* 2009;49(1):67-71.

Kuru O, Sentürk ÜK, Koçer G, et al. Effect of exercise training on resistance arteries in rats with chronic NOS inhibition. *J Appl Physiol*. 2009;107:896-902.

Latour MG, Shinoda M, Lavoie J-M. Metabolic effects of physical training in ovariectomized and hyperestrogenic rats *J Appl Physiol* 2001;90: 235–241.

Lauer N, Suvorava T, Ruqther U. Critical involvement of hydrogen peroxide in exercise-induced up-regulation of endothelial NO synthase. *Cardiovasc Res* 2005;65:254-262.

Laughlin MH, Rubin LJ, Rush JWE, Price EM, Schrage W, Woodman CR. Short-term training enhances endothelium-dependent dilation of coronary arteries, not arterioles. *J Appl Physiol*. 2002;94:234-244.

Laursen JB, Somers M, Kurz S, et al. Endothelial regulation of vasomotion in apoe-deficient mice implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation* 2001;103:1282-1288.

Leblanc AJ, Reyes R, Kang LS, et al. Estrogen replacement restores flow-induced vasodilation in coronary arterioles of aged and ovariectomized rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009; 297:1713-1723.

Lee S, Park Y, Dellsperger KC, Zhang C. Exercise training improves endothelial function via adiponectin-dependent and independent pathways in type 2 diabetic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;301:306-314.

Lindsey SH, Chappell MC. Evidence That the G protein-coupled membrane receptor GPR30 contributes to the cardiovascular actions of estrogen. *Gender Med* 2011;8(6):343-354.

Liu J, Yeo HC, Overvik-Douki E, et al. Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. *J Appl Physiol* 2000;89:21-28.

Liu Y, Bubolz AH, Mendoza S, Zhang DX, Gutterman DD. H₂O₂ is the transferrable factor mediating flow-induced dilation in human coronary arterioles. *Circ Res* 2011;108:566-573.

Liu Y, Terata K, Chai Q, Li H, Kleinman LH, Gutterman DD. Peroxynitrite inhibits Ca²⁺-activated K⁺ channel activity in smooth muscle of human coronary arterioles. *Circ Res* 2002;91:1070-1076.

Lowry HO, Rosebrough NI, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193(1):265-75.

Lüpertz R, Chovolou Y, Kampkötter A, Wätjen W, Kahl R. Catalase overexpression impairs TNF-alpha induced NF-kappaB activation and sensitizes MCF-7 cells against TNF-alpha. *J Cell Biochem* 2008;103(5):1497-1511.

Matoba T, Shimokawa H, Nakashima M, et al. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *J Clin Invest* 2000;106(12):1521-1530.

Maturana MA, Irigoyen MC, Spritzer PM. Menopause, estrogens, and endothelial dysfunction: current concepts. *Clinics* 2007;62(1):77-86.

Mcallister RM, Price EM. Effects of exercise training on vasodilatory protein expression and activity in rats. *Eur J Appl Physiol* 2010;110:1019-1027.

McKechnie R, Rubenfire M, Mosca L. Association between self-reported physical activity and vascular reactivity in postmenopausal women. *Atherosclerosis* 2001;159(2):483-90.

Meilhac O, Ramachandran S, Chiang K, Santanam N, Parthasarathy. Role of arterial wall antioxidant defense in beneficial effects of exercise on atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1681-1688.

Merikli M, Nádasy GL, Szekeres M, et al. Estrogen replacement therapy reverses changes in intramural coronary resistance arteries caused by female sex hormone depletion. *Cardiovasc Res* 2004; 61:317 – 324.

Meyer MR, Baretella O, Prossnitz ER, Barton M. Dilation of epicardial coronary arteries by the G protein-coupled estrogen receptor agonists G-1 and ICI 182,780. *Pharmacology* 2010;86:58–64.

Moien-Ashfari F, Kenyon E, Choy JC, Battistini B, McManus BM, Laher I. Long-term effects of ovariectomy and estrogen replacement treatment on endothelial function in mature rats. *Maturitas* 2003;45:213-223.

Moraes AN, Gouvêa SA, Gonçalves WLS, et al. Raloxifene reduces blood pressure in hypertensive animals after ovarian hormone deprivation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2011;109(5):334-338.

Moraes C, Davel APC, Rossoni LV, Antunes E, Zanesco A. Exercise training improves relaxation response and SOD-1 expression in aortic and mesenteric rings from high caloric diet-fed rats. *BMC Physiology* 2008;29:8-12.

Morikawa K, Shimokawa H, Matoba T, et al. Pivotal role of Cu,Zn-superoxide dismutase in endothelium-dependent hyperpolarization. *J Clin Invest* 2003;112:1871–1879.

Murphy, E. Estrogen signaling and cardiovascular disease. *Circ Res* 2011;109:687-696.

Nakamura Y, Suzuki T, Miki Y, et al. Estrogen receptors in atherosclerotic human aorta: inhibition of human vascular smooth muscle cell proliferation by estrogens. *Mol Cell Endocrinol* 2004;219(1-2):17-26.

Nedeljkovic ZS, Gokce N, Loscalzo J. Mechanisms of oxidative stress and vascular dysfunction. *Postgrad Med J* 2003; 79:195–200.

Okabe T, Shimada K, Hattori M, et al. Swimming reduces the severity of atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice by antioxidant effects. *Cardiovasc Res* 2007;74:537-545.

Otake A, Saitoh S, Takeishi Y. Hydrogen peroxide generated from cardiac myocytes impacts metabolic dilation in coronary arterioles. *Int Heart J* 2010;51(2):125-128.

Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007;87:315– 424.

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

Park JH, Iemitsu M, Maeda S, Kitajima A, Nosaka T, Omi N. Voluntary running exercise attenuates the progression of endothelial dysfunction and arterial calcification in ovariectomized rats. *Acta Physiol* 2008;193:47–55.

Pighon A, Gutkowska J, Jankowski M, Rabasa-Lhoret R, Lavoie JM. Exercise training in ovariectomized rats stimulates estrogenic-like effects on expression of genes involved in lipid accumulation and subclinical inflammation in liver. *Metabolism* 2011;60:629–639.

Pinna C, Cignarella A, Sanvito P, Pelosi V, Bolego C. Prolonged ovarian hormone deprivation impairs the protective vascular actions of estrogen receptor α agonists. *Hypertension* 2008, 51:1210-1217.

Ray P, Ghosh SK, Zhang DH, Ray A. Repression of interleukin-6 gene expression by 17β -estradiol :inhibition of the DNA-binding activity of the transcription factors NF-IL6 and NF- B by the estrogen receptor. *FEBS Lett* 1997;409:79-85.

Reckelhoff JF. Cardiovascular disease, estrogen deficiency, and inflammatory cytokines. *Hypertension* 2006;48:372-373.

Rhee SG, Yang K-S, Kang SW, Woo HA, Chang T-S. Controlled elimination of intracellular H_2O_2 : regulation of peroxiredoxin, catalase, and glutathione peroxidase via post-translational modification. *Antioxid Redox Signal* 2005;7,619–626.

Roque FR, Soci UPR; De Angelis K, et al. Moderate exercise training promotes adaptations in coronary blood flow and adenosine production in normotensive rats. *Clinics* 2011;66(12):2105-2111.

Ross RL, Serock MR, Khalil RA. Experimental benefits of sex hormones on vascular function and the outcome of hormone therapy in cardiovascular disease. *Curr Cardiol Rev* 2008;4:309-322.

Rossoni LV, Oliveira RA, Caffaro RR, et al. Cardiac benefits of exercise training in aging spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2011;29(12):2349-2358.

Rush JWE, Laughlin MH, Woodman CR, Price EM. SOD-1 expression in pig coronary arterioles is increased by exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279:2068-2076.

Saengsirisuwan V, Pongseeda S, Prasannarong M, Vichaiwong K, Toskulkao C. Modulation of insulin resistance in ovariectomized rats by endurance exercise training and estrogen replacement. *Metabolism* 2009;58:38-47.

Sanchez-Rodriguez MA, Zacarias-Flores M, Arronte-Rosales A, Correa-Munõz E, Mendoza-Nunes VM. Menopause as risk factor for oxidative stress. *Menopause* 2012;9(3):361-367.

Santos RL, Abreu GR, Bissoli NS, Moysés MR. Endothelial mediators of 17 β -estradiol-induced coronary vasodilation in the isolated rat heart. *Braz J Med Biol Res* 2004;37:569-575.

Schneider CD, Oliveira AR. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Rev Bras Med Esporte* 2004;10(4):308-313.

Sénéchal M, Arguin H, Bouchard DR, et al. Weight gain since menopause and its associations with weight loss maintenance in obese postmenopausal women. *Clin Interv Aging* 2011;6:221-225.

Sessa WC, Pritchard K, Seyedi N, Wang J, Hintze TH. Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. *Circ Res* 1994;74:349-353.

Shimada K, Kishimoto C, Okabe K, et al. Exercise training reduces severity of atherosclerosis in apolipoprotein e knockout mice via nitric oxide. *Circ J* 2007;71:1147-1151.

Shimokawa H. Hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Pflugers Arch* 2010;459(6):915-922.

Shinoda M, Latour MG, Lavoie JM. Effects of physical training on body composition and organ weights in ovariectomized and hyperestrogenic rats. *Int J Obes* 2002; 26:335-343.

Silva-Antonialli MM, Tostes RCA, Fernandes L, et al. A lower ratio of AT1/AT2 receptors of angiotensin II is found in female than in male spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res* 2004;62:587-593.

Souza-Rabbo MP, Araújo ASR, Fernandes TRG, et al. Influence of exercise training frequency on cardiac and hepatic oxidative stress in rats. *Exp Clin Cardiol* 2004;8(4):201-205.

Spritzer PM, Wender MCO. Terapia hormonal na menopausa: quando não usar. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2007;51(7):1058-1063.

Stice, JP, Chen L, Kim S-C, et al. 17 β -Estradiol, aging, inflammation, and the stress response in the female heart. *Endocrinology* 2011;152:1589 –1598.

Strehlow K, Rotter S, Wassmann S, et al. Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. *Circ Res* 2003;93:170-177.

Suvorava T, Kojda G. Reactive oxygen species as cardiovascular mediators: Lessons from endothelial-specific protein overexpression mouse models. *Biochim Biophys Acta* 2009;1787:802-810.

Suvorava T, Kumpf S, Rauch BH, Dao VT, Adams V, Kojda G. Hydrogen peroxide inhibits exercise-induced increase of circulating stem cells with endothelial progenitor capacity. *Free Radic Res* 2010;44(2):199-207.

Tew GA, George KP, Cable NT, Hodges GJ. Endurance exercise training enhances cutaneous microvascular reactivity in post-menopausal women. *Microvasc Res* 2012;83(2):223-228.

Ulker S, McMaster D, McKeown PP, Bayraktutan U. Impaired activities of antioxidant enzymes elicit endothelial dysfunction in spontaneous hypertensive rats despite enhanced vascular nitric oxide generation. *Cardiovasc Res* 2003;59:488-500.

Ungvari Z, Orosz Z, Labinsky N, et al. Increased mitochondrial H₂O₂ production promotes endothelial NF- κ B activation in aged rat arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293: 37-47.

Vassale C, Mercuri A, Maffei S. Oxidative status and cardiovascular risk in women: Keeping pink at heart. *World J Cardiol* 2009;1(1):26-30.

Velthuis MI, Schuit AJ, Peeters PHM, Monnikhof EM. Exercise program affects body composition but not weight in postmenopausal women. *Menopause* 2009;16(4):777-784.

Verhoeven MO, Van der Mooren MJ, Teerlink T, Verheijen RHM, Scheffer PG, Kenemans P. The influence of physiological and surgical menopause on coronary heart disease risk markers. *Menopause* 2009;16(1):37-49.

Wambi-Kiéssé CO, Katusic ZS. Inhibition of copper/zinc superoxide dismutase impairs NO-mediated endothelium-dependent relaxations. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1999;276:H1043-H1048.

Wang J, Wolin MS, Hintze TH. Chronic exercise enhances endothelium-mediated dilation of epicardial coronary artery in conscious dogs. *Circ Res* 1993;73:829-838.

Wassman S, Baumer AT, Strehlow K, et al. Endothelial dysfunction and oxidative stress during estrogen deficiency in spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 2001;103:435-441.

Weigt C, Hertrampf T, Zoth N, Fritzeimer KH, Diel P. Impact of estradiol, ER subtype specific agonists and genistein on energy homeostasis in a rat model of nutrition induced obesity. *Mol Cell Endocrinol* 2012;351(2):227-238.

Wenger NK. Coronary heart disease: an older woman's major health risk. *BMJ*. 1997;315:1085-1090.

White RE. Estrogen and vascular function. *Vascul Pharmacol* 2002; 38(2):73-80.

Wingrove CS, Stevenson JC. 17 β -Oestradiol inhibits stimulated endothelin release in human vascular endothelial cells. *Eur J Endocrinol* 1997;137:205-208.

Wynne FL, Payne JA, Cain AE, Reckelhoff JF, Khalil RA. Age-related reduction in estrogen receptor-mediated mechanisms of vascular relaxation in female spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2004;43(2):405-412.

Xu X, Xiao J-C, Luo L-F, et al. Effects of ovariectomy and 17 β -estradiol treatment on the renin-angiotensin system, blood pressure, and endothelial ultrastructure. *Int J Cardiol* 2008;130:196-204.

Xu Y, Armstrong S, Arenas IA, Pehowich DJ, Davidge ST. Cardioprotection by chronic estrogen or superoxide dismutase mimetic treatment in the aged female rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287:165-171.

Yang A-L, Chen H-I. Chronic exercise reduces adhesion molecules/iNOS expression and partially reverses vascular responsiveness in hypercholesterolemic rabbit aortae. *Atherosclerosis* 2003;169:11-17.

Yang H, Roberts L, Shi M, et al. Retardation of atherosclerosis by overexpression of catalase or both Cu/Zn-Superoxide dismutase and catalase in mice lacking apolipoprotein E. *Circ Res* 2004;95(11):1075-81.

Yang H, Zhou L, Wang Z, et al. Overexpression of antioxidant enzymes in ApoE-deficient mice suppresses benzo(a)pyrene-accelerated atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2009; 207(1):51-58.

Yu X, Ma H, Barman SA, et al. Activation of G protein-coupled estrogen receptor induces endothelium-independent relaxation of coronary artery smooth muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011;301: E882–E888.

Yung LM, Wong WT, Tian XY, et al. Inhibition of renin-angiotensin system reverses endothelial dysfunction and oxidative stress in estrogen deficient rats. *PLoS ONE* 2011;6(3):1-9.

Yuskel H, Odabasi AR, Demircan S, Koseoglu K, Kizilkaya K, Onur E. Effects of postmenopausal hormone replacement therapy on body fat composition. *Gynecol Endocrinol* 2007;23(2):99-104.

Zanesco A, Zaros P. Exercício físico e menopausa. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2009;1(5):254-61.

Zoth N, Weigt C, Laudenbach-Leschowski U, Diel P. Physical activity and estrogen treatment reduce visceral body fat and serum levels of leptin in an additive manner in a diet induced animal model of obesity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010;122:100-105.

Zou M, Martin C, Ulrich V. Tyrosine nitration as a mechanism of selective inactivation of prostacyclin synthase by peroxynitrite. *Biol Chem* 1997;378(7):707-713.

Zou M-H, Ulrich V. Peroxynitrite formed by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide selectively inhibits bovine aortic prostacyclin synthase. *FEBS Lett* 1996;382:101-104.